

浓香白酒生产中乳酸利用菌的分离鉴定及特性研究

镇 达,郭艺山,陈茂彬

(发酵工程省部共建教育部重点实验室,湖北工业大学生物工程学院,湖北 武汉 430068)

摘 要: 采用乳酸盐为碳源从枝江大曲窖泥、出窖糟醅、黄水及大曲中分离纯化 16 株乳酸利用菌。其中,从黄水和大曲中分离到多种降乳菌,黄水中的 3 株菌可将乳酸转化为乙醇,大曲中的多数降乳菌可转化乳酸为异丁酸、己酸、异戊酸、乙醇等风味成分。通过模拟固体发酵证明部分菌株在厌氧固体发酵条件下显示有降乳作用。

关键词: 白酒; 大曲; 乳酸; 降乳菌

中图分类号: TS262.31; TS261.4; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)08-0052-03

Separation & Identification of Lactic Acid-utilizing Bacteria in Luzhou-flavor Liquor Production and Study of Its Properties

ZHEN Da, GUO Yi-shan and CHEN Mao-bin

(Key Lab of Fermentation Engineering (Ministry of Education), College of Bioengineering,
Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

Abstract: 16 lactic acid-utilizing bacteria strains were isolated from Zhijiang Daqu pit mud, fermented grains, yellow water and Daqu by using lactate as carbon source. Among them, 3 strains isolated from yellow water could convert lactic acid into ethanol and most strains isolated from Daqu could convert lactic acid into flavoring compositions such as ethanol, isobutyric acid, caproic acid or isovaleric acid etc. The simulated solid fermentation proved that part of the isolated strains could decompose lactic acid under anaerobic solid fermentation conditions.

Key words: liquor; Daqu starter; lactic acid; lactate

在白酒生产中,在入窖前后乳酸菌容易在原料中产生大量乳酸。乳酸的大量存在对白酒香气成分乳酸乙酯含量有重大影响。从枝江大曲窖池中分离利用乳酸生长的微生物,研究其种类、分布及发酵作用等特性,有利于分析降解乳酸类微生物的生理特性及产品独特的风格特点。

1 材料与方法

1.1 样品及试剂

样品采自枝江酒厂 10 月份生产窖池;培养基试剂为分析纯及生化试剂,气相色谱分析用异丁酸、己酸、异戊酸、丙酸、乙醇标样为色谱纯。

1.2 乳酸利用培养基(Lu 培养基)

每升含 5 g 乳酸,2 g 酵母膏,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,14.3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,3 g KH_2PO_4 ,0.28 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,0.3 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.06 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,1 mg CaCl_2 ,0.05 mg CuSO_4 ,0.05 mg ZnSO_4 和 0.05 mg H_3BO_3 。自然 pH。Lu-YE 培养基:不含酵母膏。

基金项目:湖北工业大学博士科研启动基金资助(32700223)。

收稿日期:2009-06-07

作者简介:镇达(1968-),男,湖北松滋人,博士,发表论文数篇。

通讯作者:陈茂彬,hgchenmaobin@163.com。

1.3 降乳菌的分离

取窖泥、出窖糟醅、黄水、大曲各样品 1 g,加无菌水 10 mL,振荡 1 min,用接种环取少量液体在 Lu 平板上划线,每样 4 皿。分别在真空条件和常压下,35 °C 培养 2~3 d。

液体静置发酵:250 mL 三角瓶装 30 mL 培养基,接种一环;35 °C 静止培养 6 d。

1.4 混合碳源静置液体发酵

在 Lu 培养基中加入 0.5 % 葡萄糖,以未加入葡萄糖的 Lu 培养基为对照,在 250 mL 三角瓶装 30 mL 培养基,同样接种,30 °C 静置培养 6 d。

1.5 模拟固体发酵

高粱、大米、糯米、小麦、玉米,粉碎度为 4、6、8 瓣(直接从工厂取粉碎料),分别按 36 %、22 %、18 %、16 % 和 8 % 混合;蒸粮时先预先蒸糠 40 min;粮(糟的 25 %)、母糟、熟糠(粮粉的 25 %)混合后蒸 30 min,晾至室温,加大曲粉(曲粮比)20 %,根据需要加入或不加入降乳菌,

搅匀,填满 18×180 mm 试管空间,用无菌纸及三层塑料膜密闭,置于 30 ℃环境中发酵 30 d。

1.6 分析方法

1.6.1 乳酸及乳酸盐含量半定量测定

采用纸层析结合标准品测定。用培养液在新华三号层析滤纸上点样 10 μL,以正丁醇:甲酸:水=80:15:5 溶液层析展开 1 h,以 0.04 % 溴甲酚紫乙醇液(用 NaOH 调节至紫色),均匀喷雾使显色,在同一张层析纸上设置乳酸标准对照和培养基对照。采用 0.1 %~1 % 梯度标准乳酸溶液制备标准显色斑,作为发酵液样品中乳酸含量的定量标准量。

1.6.2 液体发酵产物分析

发酵液样品于 5000 r/min 离心 10 min 后,取上清液 1 mL,加甲酸至 3 %,直接进样法作气相色谱分析,测定发酵液中的挥发性成分,采用保留时间定性。气相色谱条件为:HP5890 色谱仪,FID 检测器,HP-FFAP (30 m×0.32 mm×0.25 μm)毛细管柱;进样口温度为 250 ℃,检测器温度为 280 ℃;柱箱升温程序为 60 ℃保持 4 min,以 40 ℃/min 升温至 120 ℃,以 15 ℃/min 升温至 200 ℃保持 5 min;柱流量为 0.6 mL/min,分流比为 30 mL/min;进样量 1 μL。

1.6.3 固体发酵产物分析

参照张文学等的方法^[2]。酒糟样品 10 g 在 100 mL 煮沸过的蒸馏水中,经常温 4000 r/min 震荡离心 15 min,10 min 后,取上清液 5 mL,-20 ℃保存,待进行 GC 分析。水溶性抽提物用酸碱滴定法测总酸,以乳酸表示总酸量。

1.6.4 液体发酵的细胞量测定

采用烘干称重法,发酵液于 5000 r/min 离心 10 min 后,取沉淀,80 ℃、24 h 烘干,称量计算细胞干重^[1]。

2 结果与分析

2.1 降乳菌的分离及分布

在 Lu 培养基上划线接种、培养,将陆续获得的菌株在 Lu 平板上纯化。菌株全部改为常压下培养时,均生长良好。除大曲中分离到一种生长迅速的霉菌外,其他样品均只分离到细菌,尽可能挑出所有类型,共 16 株(见表 1)。

表1 降乳菌分离纯化

样品	培养条件	出现菌落种类	菌株编号
黄水	真空 0.08MPa	5	ZA8~ZA12
	常压	3	ZA13~ZA15
出窖糟醅	真空 0.08MPa	1	ZA16
	常压	0	—
窖泥	真空 0.08MPa	0	—
	常压	0	—
大曲	真空 0.08MPa	数种	ZA17~ZA19
	常压	数种	ZA20~ZA22、ZA27

比较同一样品的两种分离培养条件,在降低氧浓度时,从黄水和出窖糟醅中可分到更多菌株,而在菌体转接后,在常压下各菌均能生长良好,这可能与耐氧菌对氧气的承受能力有关,纯化和转接过程中生物量的提高也有利于菌体繁殖。

2.2 降乳菌的发酵特性

发酵采用乳酸钠作为唯一碳源,硫酸铵为氮源,在培养基中加入酵母膏以利于部分微生物生长。液体静止培养条件下,不同菌株生长量和对氧的喜好不同,好氧菌主要在液面生长,兼性菌在液面及液体中生长导致浑浊。发酵 6 d 后比较生长量及发酵液 pH。由于乳酸利用,发酵液多数由弱酸(pH6.5)转为弱碱性(pH7.5),结果见表 2。

表2 降乳菌在Lu培养液中的发酵及产物

菌株号	生长量(g/L*)	乳酸利用率(%)	表面/液内生长	无 YE 时生长	特殊产物**
ZA8	1.99	100	浑浊,液面有膜	++	乙醇
ZA9	1.07	100	浑浊,液面有膜	—	—
ZA10	2.66	100	仅液面有膜	++	乙醇
ZA11	0.57	100	仅液面有膜	++	乙醇
ZA12	4.23	80	浑浊,液面有膜	—	—
ZA13	1.33	40	浑浊,液面有膜	—	—
ZA14	1.27	80	浑浊,液面有膜	—	—
ZA15	1.50	60	浑浊,液面有膜	—	—
ZA16	0.90	100	仅液面有膜	++	ND
ZA17	2.93	100	仅液面有膜	++	乙醇
ZA18	0.57	100	仅液面有膜	++	丙酸、异丁酸、己酸、乙醇
ZA19	0.83	100	仅液面有膜	++	ND
ZA20	0.60	100	仅液面有膜	++	异丁酸、异戊酸
ZA21	2.06	100	浑浊,液面有膜	++	乙醇
ZA22	2.66	100	仅液面有膜	++	异丁酸、异戊酸
ZA27	0.50	20	仅液面有膜	+	ND

* 菌体干重,** 无酵母膏 YE 时的重要产物,+ 生长,- 不生长,ND 无特殊产物。

发酵液中乳酸盐残留量测定结果说明不同菌株在有氧条件下具有不同降解效率。采用不含酵母膏的培养基(Lu-YE),在 30 ℃下静止发酵 6 d,从外观比较生长差异,16 株中 5 株基本不能生长,真菌 ZA27 生长微弱。

2.3 产物鉴定

对 Lu-YE 液体培养基中容易生长的 11 株发酵菌离心,上清液用甲酸酸化后直接进样做 GC 分析,检测发酵产物,结果如表 2。其中,菌株 ZA8、ZA10、ZA11、ZA17、ZA21 产生乙醇,而 ZA18 则产生异丁酸、丙酸、乙醇及己酸,ZA20 和 ZA22 产生异丁酸和异戊酸等呈味成分,同样的现象在 Lu 培养基中也同样出现(略)。ZA17、ZA18、ZA20 及 ZA22 均来自大曲,都能从乳酸和无机氮合成一些香味产物,显示大曲细菌对白酒正常发酵的重要作用,可以发挥降解乳酸和产生香味成分的作用。

2.4 部分降乳菌的分类鉴定

在进行革兰氏染色、芽孢形态、接触酶、高温生长等实验结果基础上,采用 VITEK 鉴定系统对部分菌株进行鉴定。除 ZA22 外,其他菌均为芽孢杆菌属细菌。接触酶均为阳性。

表3 降乳菌的分类鉴定

菌株号	形态	鉴定
ZA8	端生椭圆芽孢, 杆菌	<i>Bacillus racemilacticus</i>
ZA9	端生球状芽孢, 杆菌	<i>Bacillus sphaericus</i>
ZA10	椭圆芽孢, 杆菌, 染色不匀	<i>Bacillus subtilis</i>
ZA11	椭圆芽孢, 杆菌, 染色不匀	<i>Bacillus apiariue</i>
ZA16	椭圆芽孢, 杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>
ZA18	椭圆芽孢, 杆菌	<i>Bacillus coagulans</i>
ZA19	椭圆芽孢, 杆菌, 染色不匀	<i>Bacillus subtilis</i>
ZA20	椭圆芽孢, 杆菌	<i>Bacillus amyloliquefaciens/subtilis</i>
ZA21	椭圆芽孢, 杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>
ZA22	杆菌	?

2.5 降乳菌对固体厌氧发酵乳酸残留量的影响

本研究中采用的模拟固体发酵在试管中进行, 所有发酵都未加入己酸菌。前述能良好利用乳酸盐的 10 株菌用于固体发酵的降乳研究。在 30 d 的恒温 30 °C 发酵过程中, 除少数试管由于装填不匀导致部分区域大曲霉菌的明显生长, 多数试管发酵正常, 发酵完成后具有与出窖酒糟相似的香气, 分析总酸及乳酸残留结果见表 4。

表 4 乳酸利用菌对模拟固体发酵产酸的影响

试验菌株	乳酸含量 (%)	总酸 (%)	乳酸占总酸 (%)
ZA8	2.0	2.19	91.3
ZA9	2.0	2.30	87.0
ZA10	1.5	2.27	66.1
ZA11	1.5	2.34	64.1
ZA16	1.0	2.13	46.9
ZA18	1.0	1.60	62.5
ZA19	1.0	1.88	53.2
ZA20	1.0	1.64	61.0
ZA21	1.0	2.20	45.5
ZA22	2.0	2.51	79.7
CK	2.0	2.55	78.4

由于发酵条件不同, 发酵产物与真实生产过程差异明显, 产酸总量较生产过程总酸水平(3.5 %左右)明显较低。部分菌株显示明显的降乳作用, 在发酵前加入降乳菌的样品, 较(不加入降乳菌的)对照样总酸含量降低, 乳酸含量也下降。但部分处理样品的乳酸含量占总酸比例上升, 推测测试菌株在复杂营养条件下影响了其他酸成分

的含量, 有待进一步研究。

3 结论

3.1 分离纯化了枝江大曲优质窖池的大曲、出窖糟醅、黄水、窖泥中的降乳菌, 显示大曲和黄水中存在较多的乳酸菌种类, 从窖泥中未分离到降乳菌。使用乳酸和铵盐为碳氮源进行有氧静止发酵。采用纸层析法对乳酸盐利用率进行分析, 纸层析法检出限在 0.1 %左右, 但大部分菌株发酵后已不能检出乳酸盐, 说明这些菌株对乳酸盐的分解利用效率很高, 与前人报道有差异^[3], 可能与不同酒厂工艺条件有关。

3.2 部分降乳菌将乳酸转化为白酒的正常风味物质, 其中大曲中的降乳菌将乳酸转化为异丁酸、异戊酸、己酸等特殊产物, 这些有机酸沸点较高, 存在于产品中, 对口味持久性影响很大, 说明大曲的使用和用量对发酵过程的重要性。少量文献报道了丙酸菌用于增己降乳的实践效果, 说明在糟醅中添加乳酸菌有利于降低乳酸乙酯, 减少生成周期, 也说明乳酸降解菌在白酒酿造中的重要作用, 但是降乳菌的发酵产物对产品的影响及降乳菌对其他微生物发酵的影响有待研究。孙前聚等采用辽宁大学的降乳菌, 在河南宋河酒厂进行了成功试验, 并提出在大曲中进行生物强化, 以加强大曲中降乳菌的数量^[4]。

3.3 本研究的实验结果也证实, 大曲中存在大量乳酸利用菌, 这对指导优化大曲生产工艺条件, 控制窖池发酵的乳酸水平具有实际意义。同时, 也发现, 采用乳酸盐为唯一碳源筛选降乳菌种类较多, 是否在实际发酵中真正能起到降乳作用还难以确定。

3.4 本实验结果显示, 多数乳酸利用菌在固体发酵中降乳作用并不明显, 这与微生物能否在实际发酵环境下能否生存及发挥作用有关。

参考文献:

- [1] Michael L.Shuler and Fikret Kargi,,Bioprocess engineering:Basic Concepts, 2nd , publishing as Prentice Hall PTR. published by Pearson Education,Inc, 2002,110.
- [2] 张文学,岳元媛,向文良,杨瑞,等.浓香型白酒酒醅中化学物质的变化及其规律性[J].四川大学学报(工程科学版),2005,37(4):44-48.
- [3] 张国政,谭五丰,郝晶心,徐卫峰.乳酸降解菌的选育及其发酵特性的研究[J].酿酒科技,1998,(5):18-22.
- [4] 孙前聚,田以清,关其才,陈卫东.降乳菌在浓香型白酒生产中应用的探讨[J].酿酒,1991,(2):21-24.

欢迎 订 阅 《 酿 酒 科 技 》