

SGAS2004.0001 酯化菌的分离及其应用

唐现洪,谢玉球,钟 雨,谢 旭,靳宝常,余永柱

(江苏双沟酒业股份有限公司, 江苏 泗洪 223911)

摘 要: 采用透明圈等方法,结合酯化能力、耐酒能力、耐酸能力试验,最后筛选出 SGAS2004.0001 和 SGAS2004.0002 两株酯化菌,并将 SGAS2004.0001 用于酿酒生产和制曲生产。结果表明,所产基础酒的己酸乙酯含量平均提高了 25~35 mg/100 mL;用 SGAS2004.0001 菌株制成的麯曲用于双轮底、多轮底酒生产,能使双轮底、多轮底调味酒的己酸乙酯含量提高 40~65 mg/100 mL,而且产酒的口味更加醇厚、幽雅,窖香更浓,味更长。

关键词: 微生物; 制曲; SGAS2004.0001 酯化菌种; 分离; 应用

中图分类号: TS261.1; TS262.4; TQ925.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2006)05-0049-03

Isolation & Application of SGAS2004.0001 Esterifying Strain

TANG Xian-hong, XIE Yu-qiu and ZHONG Yu et al.

(Jiangsu Shuang'gou Liquor Industry Co. Ltd., Sihong, Jiangsu 223911, China)

Abstract: Two esterifying bacteria strains including SGAS2004.0001 and SGAS2004.0002 were obtained by transparent circle method coupled with the test of esterifying capability, alcohol resistant capability, and acid resistant capability. In addition, SGAS2004.0001 was used in liquor-making and starter-making experiments. The results suggested as follows: ethyl caproate content in produced base liquor increased by 25~35 mg/100 mL in average, and the use of bran starter (produced by SGAS2004.0001) in the production of liquor by double bottom fermentation or by multiple bottom fermentation could increase ethyl caproate content by 40~65 mg/100 mL in blending liquor and the produced liquor had better taste with elegant pits flavor. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; starter-making; SGAS2004.0001 esterifying bacteria; isolation; application

酯化菌并不是微生物分类学上的名称,而是按其代谢产物命名的一种称谓,它是具有酯化功能的所有微生物的统称。很多专家、学者很早就对酯化微生物进行了应用性研究,结果表明,其具有酯化功能的微生物种类很多,研究较多的有酵母、霉菌、细菌等,特别是产酯酵母类。人们对酯化菌进行研究的目的是利用微生物的代谢能力,得到其代谢产物,因而在此课题的研究中,为了分离到符合生产需要的酯化菌种,我们进行了大范围的采样,集中对样本进行了分离。

1 SGAS2004.0001 酯化菌株的分离、培养条件及性能测试

以酯化曲、翻沙曲、包包曲、酱香曲以及红曲酯化酶、我公司的生产大曲为样本,进行酯化微生物菌种的分离。

1.1 菌悬液的制备

称取曲粉 1 g 左右置于空培养皿中,紫外线照射约

10 min(去除杂质表面菌),无菌操作,加入有玻璃珠的三角瓶中(内有 50 mL 无菌水),于 32 °C, 200 r/min 振荡 4 h,无菌操作,用 4 层纱布过滤,依次稀释成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 和 10^{-6} 。

1.2 单株菌种分离、筛选

固体平皿斜面 PDA 培养基: 20 % 的土豆汁,加 2 % 的葡萄糖,2 % 琼脂。

液体培养基: 20 % 的土豆汁,2 % 的葡萄糖,0.8 % 的玉米粉。

1.2.1 单株菌分离培养

依次吸取上述菌悬液各 100 μ L,加入装有 PDA 培养基的平皿中,涂均匀后,倒置于 32 °C 培养箱中培养 2~3 d,挑取单菌落转接于斜面上,32 °C 培养 3~4 d 即可。通过微生物的分离,得到单菌株 1000 余株,并采用透明圈法,确定其中的 1#, 2#, 3#, 4#, 5#, 6#, 7#, 8#, 9# 和 10# 这 10 株作为复选对象。

收稿日期: 2006-02-21

作者简介: 唐现洪(1946-),男,江苏南京人,高级工程师,总工程师,发表论文 10 余篇。

1.2.2 菌种的筛选(透明圈法)

在灭菌、冷却后的液体培养基中接入斜面菌种, 于 32℃, 200 r/min 振荡培养 48 h, 1000 r/min 再离心 5 min, 取上清液备测。

1.2.3 菌种的复选(透明圈法)

用 3%聚乙烯醇溶液制备含 100 g/L 三丁酸甘油酯的乳化液。在 225 mL 三羟甲基氨基甲烷- 盐酸的缓冲液 (pH 8.0) 中加放三丁酸甘油酯的乳化液 25 mL 和 2.0% 的琼脂, 121℃, 20 min 灭菌, 倒平面, 凝固后, 加入直径 7 mm 的小钢圈, 注入 100 μL 的上清酶液, 正放于 32℃培养箱中培养 48 h, 测定透明圈。取圈大、透明清晰的菌落进行复筛。通过复选, 利用选出的 10 株菌, 进行酯化能力测定。

1.3 复筛预备实验——酯化条件的选择

为了摸清菌株的酯化能力, 针对公司酿酒生产的实际条件, 把分离的菌株制成种曲, 进行酯化性能筛选, 筛选出耐酸、耐酒精能力比较强的菌种。

酯化条件的确定: 4%曲、无水乙醇、己酸按表 1 的量加入, 于 32℃保温 10 d, 其培养及结果见表 1。

表 1 酯化条件及其产己酸乙酯情况 (mg/100 mL)

乙醇 (%)	己酸量 (%)		
	0.5	1.0	1.5
1	8.9	25.8	12.9
2	17.1	48.2	29.9
3	22.9	59.3	28.2
4	30.1	87.6	49.6

从表 1 可以看出, 1%的己酸有利于己酸乙酯的生成, 过高或过低均不利于酯化作用, 因此确定己酸的添加量为 1%; 选取酒精 4%, 己酸 1%, 曲用量为 4%, 进行复筛实验。

1.4 对已分离得到的 10 株具有酯化能力的菌种进行复筛

以制成麸曲进行实验。麸曲培养基的制备: 麸皮与水按 1:1 的比例拌和, 充分搅拌, 使麸皮充分吸水, 121℃, 60 min 灭菌, 冷却后, 接入斜面(或液体种子), 接种量 10%, 32℃培养 4 d, 取出 50℃烘干, 备用。

对酯化菌株进行酯化能力筛选。酯化条件确定: 己酸 1%, 无水乙醇 4%, 曲 4%, 32℃保温 7 d, 对发酵液的己酸乙酯含量进行测定, 不同菌株的酯化能力结果见表 2。

表 2 不同菌株的酯化能力结果 (mg/100 mL)

菌株	己酸乙酯含量	菌株	己酸乙酯含量
1#	31.7	11#	60.9
5#	4.1	12#	45.0
6#	23.2	13#	51.4
8#	38.5	14#	54.9
10#	24.7	15#	63.0

从表 2 可看出, 11#, 13#, 14# 和 15# 4 株菌的酯化能力较高, 其中 11#, 15# 2 株菌最强, 分别把这 2 株菌命名为: SGAS2004.0001 和 SGAS2004.0002; 并以这 2 株菌进行酯化条件的选择实验。

1.5 酯化能力的选择实验

为了摸清这 2 株菌的耐酒精能力及酯化性能, 分别对其酯化力进行测试。酯化条件: 己酸 1%, 曲 4%, 酒精梯度分别设为 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%和 10%, 32℃保温发酵 10 d, 再按 1.4 进行浓缩, 并对浓缩液的己酸乙酯含量进行测定。2 株菌的酯化能力、耐酒精的测试结果见表 3。

表 3 SGAS2004.0001 和 SGAS2004.0002 的酯化能力、耐酒精测试结果

酒精量 (%)	己酸乙酯含量 (mg/100 mL)	
	SGAS2004.0001	SGAS2004.0002
4	134.7	172.5
5	198.6	144.2
6	214.2	170.8
7	256.3	248.0
8	244.0	251.3
9	279.2	244.3
10	320.8	296.6

从表 3 的测试结果可看出, 随着酒精用量的增加, 己酸乙酯含量也增加, 以酒精用量 10%为最高用量, 不能完全反映出其菌株及酶的最佳酒精度。且可以肯定的是该菌株满足生产需求, 而且 SGAS2004.0001 的酯化效果明显优于 SGAS2004.0002, 因此确定 SGAS2004.0001 作为生产试验的原始出发菌种。

1.6 培养基的选择

为了得出 SGAS2004.0001 合适的培养条件, 找出该菌株的合理培养基, 对原来种子用麸皮、模拟土豆汁琼脂培养基及不同发酵周期对其酯化能力的影响, 进行对比试验。

原麸皮培养基和模拟土豆汁琼脂培养基(其他条件不变, 种子培养好后, 按 10%的量接入麸皮中, 麸曲的生长周期为 3~7 d): ①模拟 PD 培养基配方: 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 0.2 g, 氯化钾 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.8 g, 谷氨酸单钠盐 3.0 g, 微生物素 B₁ 1 mg, 硫酸亚铁 0.5 mg, 硫酸锌 2.5 mg, 硫酸铜 4 mg, 加水到 1000 mL。②酯化条件为: 己酸 1%; 无水乙醇 10%, 曲 4%, 32℃保温发酵 10 d, 发酵液按 1.3 浓缩, 浓缩液的测定结果见表 4。

表 4 培养浓缩液己酸乙酯含量的测定结果 (mg/100 mL)

生长 周期(d)	己酸乙酯含量		生长 周期(d)	己酸乙酯含量	
	麸曲	模拟 PD		麸曲	模拟 PD
3	215	170	8	271	208
4	203	183	9	285	214
5	216	190	10	297	221
6	226	196	11	301	229
7	240	200			

从表 4 可看出,己酸乙酯的含量随发酵时间的延长而不断增加,而且在培养期内,不像其他的菌酶复合物,当己酸乙酯含量达到一定浓度和一定的时间后,出现酯的分解现象,该菌株在 11 d 的发酵周期内,没有出现酯的分解现象;麸曲培养基明显优于模拟土豆汁琼脂培养基,因此确定选用麸曲培养基。

1.7 SGAS2004.0001 最佳酯化能力测试

当酯化能力从 4 % 提高到 10 % 后,发现随酒精含量的增加,己酸乙酯的含量仍在增加,因而在 10 % 的基础上又进行试验。酯化条件:水 50 g,曲 2 g,己酸、乙醇按比例加入,32 °C 保温 5 d,发酵液按 1:3 浓缩测定,发酵液的酯化结果见表 5。

表 5 发酵液的酯化结果 (mg/100 mL)

己酸加量 (%)	乙醇用量 (%)					
	10	12	14	16	18	20
1.0	140.4	158.8	194.3	184.3	191.8	221.4
0.8	108.1	91.9	134.4	152.8	173.5	172.6
0.6	66.4	65.0	78.1	85.0	99.8	79.6

从表 5 可看出,随乙醇用量的增加,己酸乙酯含量也增加;随己酸用量的增加,己酸乙酯含量也增加,以乙醇用量为 14 % 最佳;己酸以 1 % 为最佳。乙醇浓度高于 18 %,其效果不明显。从而说明筛选出的 SGAS2004.0001 酯化菌种培养的麸曲酯化酶的最佳酯化条件为己酸 1.0 %,乙醇为 14 %。

2 SGAS2004.0001 酯化菌在酿酒生产中的应用

2.1 SGAS2004.0001 菌种用于制曲生产中

将 SGAS2004.0001 菌种培养成麸曲,接种于制曲原料中,为了不影响公司产品的主体风格特性,其接种量的比例设定为:0.1 %,0.2 %,0.3 %,0.4 %和 0.5 %几个梯度,进行同室同条件培养,通过 45 d 制曲周期的培养,对曲质进行理化分析、感官分析,并经生产性能试验,根据出酒率、酒的感官指标、己酸乙酯等四大酯的理化指标,确定 0.3 % 作为制曲生产用量,并进行扩大生产,用于酿酒生产中,用曲量按正常生产的用曲量,在投料量为 350 kg 的 10 口窖池中连续发酵 45 d,进行对比试验,结果见表 6。

从表 6 可看出,利用接种 0.3 % 的麸曲种生产的 5 口窖池,产酒的己酸乙酯的平均含量达到 164 mg/100 mL,乳酸乙酯的含量为 112 mg/100 mL,平均出酒率为 39.7 %;使用正常大曲生产的 5 口窖池,平均出酒率为 39.5 %,酒的己酸乙酯含量平均为 132 mg/100 mL,乳酸乙酯含量为 98 mg/100 mL。经公司评委品尝,利用新菌种生产的酒与正常生产的酒比较,口味更加舒适,较醇甜、柔和、味净。从试验结果可以看出,无论是己酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯和乙酸乙酯,其酯含量都有所增加,其分别提高了 24 %,14 %,44 %和 23 %。

表 6 扩大生产试验结果 (mg/100 mL)

窖号	方案	己酸 乙酯	乳酸 乙酯	丁酸 乙酯	乙酸 乙酯	出酒率 (%)
12125	试验	158	117	34	100	40.1
12126	对照	141	97	25	79	38.9
12127	试验	166	109	36	99	39.9
12128	对照	132	102	27	85	39.5
12129	试验	171	111	38	97	40.2
12130	对照	128	95	23	82	40.4
12131	试验	168	115	32	101	38.9
12132	对照	131	95	28	78	39.3
12133	试验	159	110	35	96	39.4
12134	对照	129	101	22	83	38.9
试验混合样		164	112	39	99	39.7
对照混合样		132	98	27	80.6	39.5

2.2 SGAS2004.0001 菌种在多层底中的应用

把 SGAS2004.0001 菌种培养成麸曲,分别按 1000 g,2000 g,3000 g,4000 g 和 5000 g 的用量,接入正常生产的双轮底中,经过两排生产,根据对产酒的感官指标、理化指标、出酒率等因素的分析,为了不影响传统工艺,确定 3000 g 的用量作为双轮底生产调味酒的用量,在池发酵时间为 90 d,其试验结果见表 7。

表 7 双轮底生产调味酒的试验结果 (mg/100 mL)

窖号	方案	己酸 乙酯	乳酸 乙酯	丁酸 乙酯	乙酸 乙酯
12115	试验	498	274	45	237
12116	对照	465	266	36	176
12117	试验	527	278	41	219
12118	对照	432	248	38	193
12119	试验	508	269	53	206
12120	对照	409	256	39	182
12121	试验	496	278	46	210
12122	对照	451	253	36	184
12123	试验	495	272	47	174
12124	对照	433	245	40	156

通过 10 口窖池的对比试验,在回同等质量、数量和接同等数量、质量的酒的条件,正常工艺生产的 5 口窖池的双轮底酒的平均己酸乙酯含量为 438 mg/100 mL,乳酸乙酯的平均含量为 252 mg/100 mL,丁酸乙酯的平均含量为 47 mg/100 mL,乙酸乙酯的平均含量为 175 mg/100 mL;而采用酯化种曲的 5 口试验窖池的双轮底酒的平均己酸乙酯含量为 503 mg/100 mL,乳酸乙酯的平均含量为 276 mg/100 mL,丁酸乙酯的平均含量为 38 mg/100 mL,乙酸乙酯的平均含量为 206 mg/100 mL;己酯乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸乙酯的含量分别提高了 14.8 %,9.5 %,23.6 %和 17.9 %,而且使用该菌种生产的酒经公司评委组的品尝鉴定,与对照样相比,口味更加醇厚、窖香更浓,味更长、幽雅细腻。

3 结论

(下转第 54 页)

最佳酯化条件为: 时间 30 d, 温度 35 ℃, pH3.5, 酒精度 10 %(v/v)。同时, 还可看出酯化时间越长, 酯化效果越明显, 但考虑经济效益和综合分析, 一般选 30 d 为宜。

3 红曲霉 M- 6 在酿酒生产中的试用

3.1 红曲霉 M- 6 在液态发酵中的小试

为确保酯化红曲霉 M- 6 在西凤浓香调味酒生产中的试用万无一失, 先在实验室用浓缩果汁为原料, 在液态发酵中使用红曲霉 M- 6 制成的麸曲, 对比己酸乙酯生成情况。

3.1.1 发酵液的制作

将浓缩果汁调整到糖度 10 Bx, pH 值 3.5。作成 3 个卡氏罐, 记为 1#, 2#, 3#。1# 罐作对照。

3.1.2 酯化小试方法及结果

在 1#, 2#, 3# 卡氏罐中分别加入 2 %大曲粉, 发酵培养 12 d 后, 再分别加入 5 %乙醇, 1 %己酸。然后在 2#, 3# 罐中加入制作的麸曲, 1# 罐作对照。密封发酵, 17 d 后蒸馏。蒸馏时取 500 mL 发酵液蒸出 100 mL 酒样。对蒸馏液作色谱分析, 结果见表 4。

表 4 蒸馏液色谱分析结果 (mg/100mL)			
试验号	己酸乙酯	乙酸乙酯	乳酸乙酯
1#	55.64	30.16	6.99
2#	105.63	17.92	4.18
3#	89.52	15.30	6.80

由表 4 可看出, 加入由红曲霉 M- 6 制作的麸曲, 发酵酯化效果明显优于对照样, 己酸乙酯增加了 2 倍多。由此可见, 红曲霉 M- 6 菌株具有较高酯化能力。

3.2 红曲霉 M- 6 菌在西凤浓香调味酒生产中的试用

白酒酿造是集糖化、发酵、酯化为一体的生化代谢过程。酿造前期主要生成各种酸类和醇类物质, 中后期酸与醇在酯化酶的作用下, 在适当的条件下进行生化反应, 逐步生成各种酯类, 形成白酒的独特风格, 尤其是酯化红曲更具有促进己酸乙酯合成的功能。

基于上述结果, 并在 3.1 中液态小试实验结果的基础上, 在制酒三车间的两个质量相对较差的 4# 和 43#

窖的主发酵的中后期添加红曲霉 M- 6 麸曲培养液, 揭窖后对其新产酒的己酸乙酯值与上一排进行对比, 结果见表 5。

表 5 添加红曲霉 M-6 麸曲培养液的试验窖 4#, 43#产酒与上排的对比结果 (mg/100mL)					
窖别	分段摘酒	上排对照	本排	增加值	目标值
4#	前段酒	147.8	245.6	0.978	0.5
	中段酒	223.3	302.2	0.789	
	后段酒	102.6	143.9	0.413	
43#	前段酒	193.0	278.5	0.855	
	中段酒	173.9	229.6	0.557	
	后段酒	109.9	122.2	0.123	

表 5 结果表明, 试验窖所产酒己酸乙酯值均有提高, 特别是所产酒的前段酒、中段酒的己酸乙酯提高值均超过目标值 0.5 g/L, 甚至达到了 0.978 g/L。

4 结论

4.1 从 20 多个大曲、酒醅中分离、纯化得 7 株红曲霉菌种, 再经酯化力筛选, 获得了具有较高酯化性能的红曲霉 M- 6。

4.2 红曲霉 M- 6 最佳酯化条件确定为: 时间 30 d, 温度 35 ℃, pH 3.5, 酒精度 10 %(v/v)。

4.3 红曲霉 M- 6 在酿酒生产中的试用阶段, 液态小试是成功的, 加入红曲霉麸曲的比对照所产酒己酸乙酯高 2 倍之多。在西凤浓香酒生产中试用后效果也是比较明显的, 所产酒己酸乙酯增高, 品尝口感也优于对照样, 达到了立项目标。

4.4 红曲霉 M- 6 在酿酒生产中的试用, 用的是红曲霉培养液, 菌体占优势, 而红曲霉发挥酯化性能主要是以酶体状态。所以应制作酯化红曲, 将红曲霉 M- 6 制成酶体占优势状态的麸曲, 并改进使用方法, 在西凤调味酒生产中作进一步试验。

4.5 红曲霉嗜酸, 在弱酸性环境中能以乳酸为碳源, 繁殖发酵, 同时产生酯化酶促进己酸与乙醇生成己酸乙酯, 从而起到增己降乳的作用。●

(上接第 51 页)

3.1 分离出的SGAS2004.0001 菌种, 其耐酸能力 (己酸) 为 1 %, 最佳酯化能力达到 10 %(v/v) 以上, 以 14 % 为最佳; 并利用该菌株制成麸曲, 用于我公司的双轮底酒生产和公司的制曲生产中, 通过试验得出: 双轮底酒的己酸乙酯含量平均增加 65 mg/100 mL, 用 SGAS2004.0001 菌种接种的大曲生产, 产酒的己酸乙酯的平均含量增加了 32 mg/100 mL。

3.2 采用分离得的酯化菌种在酿酒生产中应用, 所产酒与原工艺产酒相比, 特别是在感官质量上提高较明

显, 酒的风味特征更向香浓、味长、幽雅方向转化。用于勾兑酒, 酒的口感更加细腻、绵软, 消费者更容易接受。

3.3 分离得的 SGAS2004.0001 和 SGAS2004.0002 酯化菌株, 培养条件要求较高, 此菌的培养是在公司的净化微生物实验室完成的, 粗放培养条件容易染菌。

3.4 采用麸曲培养, 在种曲的干燥上, 必须严格控制干燥温度, 不能过高, 干燥温度在 25~35 ℃之间, 否则会影响微生物的生物活性和酶活性。●