

一株丙酸菌应用特性的初步研究

陈 鹏 赵树欣 王世超 孙凤云

(教育部工业微生物重点实验室,天津市工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要: 为了将谢氏丙酸杆菌 TS-10 应用于特型酒生产中,起到“增丙降乳”的效果,对该菌的一些特性进行了研究。结果表明,在 pH5.0 环境中,TS-10 可以完全降解 2%乳酸;在液态发酵体系中,TS-10 可以耐受 2%乙醇;在乳酸与葡萄糖同时存在的情况下,TS-10 优先利用乳酸,乳酸平均降解速率约为葡萄糖的 3 倍。

关键词: 微生物; 丙酸菌; 生长特性; 白酒

中图分类号:TS262.7;TS261.4;TS261.7;Q93-3

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2013)04-0040-03

Preliminary Study on the Application Characteristics of a Propionibacteria Strain

CHEN Peng, ZHAO Shuxin, WANG Shichao and SUN Fengyun

(Key Lab of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology,

Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The properties of *P. Shermanii* TS-10 were studied in order to use it in Specific-type liquor production to achieve the effects of increasing ethyl propionate content and decreasing ethyl lactate content. The experimental results suggested that as pH value was 5.0, *P. Shermanii* TS-10 could degrade completely 2% ethyl lactate; in liquid fermentation system, *P. Shermanii* TS-10 could tolerate 2% ethanol; and as lactic acid and glucose coexisted, *P. Shermanii* TS-10 gave priority to the use of lactic acid and the average degrading rate of lactic acid was 3 times of that of glucose.

Key words: microbe; *Propionibacteria*; growth characteristic; liquor

四特酒是江西产的优质白酒,因其风味独特而在我国众多白酒中独树一帜,被单独划分为“特香型”白酒。经研究发现,特型酒香味组分有以下几个主要特征^[1-2]:一是富含奇数碳脂肪酸乙酯(包括丙酸乙酯、戊酸乙酯等);二是含有较高量的正丙醇,它的含量与丙酸乙酯和丙酸之间具有极好的相关性;三是高级脂肪酸和高级脂肪酸乙酯含量高。从中不难推测,前两个特征都与酒醅中的丙酸菌有关,通过丙酸菌液灌窖的方式来提高特型酒酒醅中的丙酸和丙酸乙酯含量,将会使成品酒“特香型”风味更突出。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:谢氏丙酸杆菌(*P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* TS-10),由天津科技大学现代酿造技术实验室提供。

种子培养基(%):胰蛋白胨 1,酵母粉 1,乳酸钠 2,硫

酸镁 0.04,磷酸氢二钠 0.1, pH7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基 I(%):乳酸钠(2、3、4、5、6),酵母粉 1,胰蛋白胨 1,磷酸氢二钠 0.1,硫酸镁 0.04, pH5.0。

发酵培养基 II(%):乳酸钠 8,酵母粉 1,胰蛋白胨 1,磷酸氢二钠 0.1,硫酸镁 0.04,乙醇(0%vol、2%vol、5%vol), pH 7.0。

发酵培养基 III(%):乳酸钠 2,葡萄糖 2,酵母粉 1,胰蛋白胨 1,磷酸氢二钠 0.1,硫酸镁 0.04, pH 5.0。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵方法

取 100 mL 细颈平底烧瓶,装液量占其容积 95%以上,置于 30 °C 培养液箱中静置发酵。

1.2.2 发酵液生物量测定方法

取适量发酵液以 1 mol/L HCl 溶液稀释 10 倍,以蒸馏水为空白溶液,在波长 600 nm 下测量吸光度,以 OD 值表示生物量。

1.2.3 乳酸和葡萄糖含量的测定

基金项目:江西省项目(20122BDH80017)。

收稿日期:2012-12-18

作者简介:陈鹏(1988-),男,硕士,研究方向:现代酿造技术。

通讯作者:赵树欣,女,教授,硕士生导师, E-mail: zsx999@tust.edu.cn。

优先数字出版时间:2013-03-06;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130306.1430.004.html>。

乳酸和葡萄糖含量用 SBA-40 生物传感仪进行测量。

1.2.4 诱变方法

以大气压低温等离子体诱变育种装置 (ARTP) 对菌株进行诱变, 诱变条件为: 电源功率 100W, 照射距离 2 mm, 产生的等离子体温度 $<40^{\circ}\text{C}$, 氦气流速为 10 L/min, 处理时间 60 s; 样品处理: 菌悬液吸光度调为 1.0, 取 10 μL 样品进行诱变处理。

2 结果与讨论

2.1 实验用菌株 TS-10 与原菌株比较

天津科技大学曾筛选出 1 株丙酸菌津轻-10^[3-4], 但该菌的耐酸性较差, 致使其在实际生产中应用的效果还不够显著。此次实验是以津轻-10 为出发菌株, 经等离子诱变和抗性筛选 (方法另文发表), 得到 1 株突变菌株 TS-10。

采用发酵培养基 I, 通过二者的生长情况来比较两株菌的耐酸性, 菌株生长和乳酸利用情况, 结果见图 1。

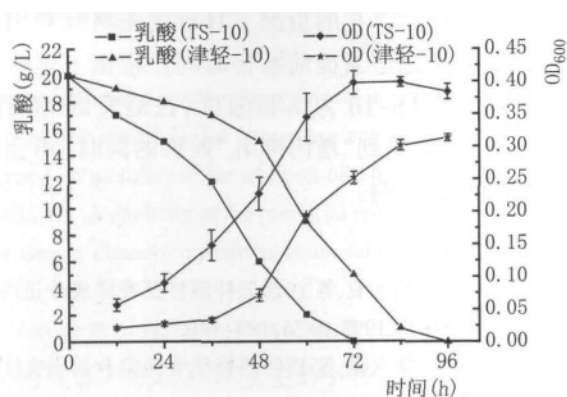


图 1 TS-10 与津轻-10 发酵对比实验

从两株菌的生长情况上来看, 突变菌株 TS-10 在发酵 36 h 后即进入对数生长期, 出发菌株 TQ-10 相对滞后约 12 h, 稳定期也相对延迟约 12 h, 突变菌株 TS-10 生物量更大, 比出发菌株约高 22.6%; 从乳酸降谢情况来看, 两株菌都能将乳酸全部利用, TS-10 代谢乳酸速率更快, 底物降解速率达到 $0.278\text{ g/h}\cdot\text{L}$, TQ-10 底物降解速率仅为 $0.208\text{ g/h}\cdot\text{L}$ 。综上所述, TS-10 比出发菌株更适应酸性环境, 可能更适合应用于白酒生产中。

2.2 TS-10 应用特性研究

2.2.1 乳酸浓度的影响

白酒酒醅入窖时的 pH 值一般为 4~5, 发酵进行后, 乳酸等有机酸的生成使酒醅 pH 值进一步降低。由于在酸性环境中, 乳酸会对丙酸菌生长代谢产生强烈的抑制, 这就需要考察在酸性环境中, 乳酸浓度对 TS-10 生长代谢的影响。

采用发酵培养基 I, 将实验分为 5 个小组, 各组发酵

培养基中乳酸浓度分别为 1%、1.5%、2%、2.5%、3%, 各组培养基初始 pH 值都为 5.0, 分别编为 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号。按照 1.2 的方法进行发酵, 各组发酵液中菌体的生长情况见图 2。

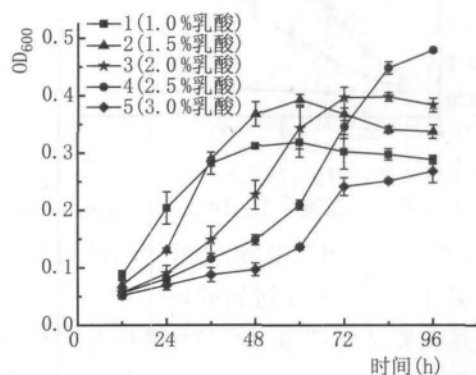


图 2 乳酸浓度对 TS-10 生长的影响

从图 2 可以看出, 当乳酸浓度为 1% 时, 丙酸菌快速进入对数生长期, 48 h 就进入稳定期; 由于底物浓度较低, 其总生长量不大; 乳酸浓度为 1.5% 时趋势相似, 总生物量有所提高。乳酸浓度为 2.0% 时显示生长明显滞后, 最大生物量在 72 h 到达; 乳酸浓度 2.5% 时初期的抑制更加明显, 但在菌株适应后, 由于有较高的底物浓度, 在 96 h 时达到最大生物量。而再提高乳酸浓度, 则菌株生长受阻。

表 1 丙酸菌在不同乳酸浓度中生长代谢情况

项目	实验组编号				
	1	2	3	4	5
最大 OD 值	0.319	0.394	0.398	0.48	0.269
乳酸利用效率	0.032	0.026	0.02	0.019	0.009
平均生长速率 (g/h)	0.015	0.015	0.013	0.013	0.006

从表 1 中数据可以看出, 随着乳酸浓度的增高, 乳酸利用效率不断降低。

2.2.2 乙醇浓度的影响

考虑到丙酸菌可代谢酒醅中的还原糖, 为了保证出酒率, 丙酸菌液灌窖时间一般选择在发酵中后期, 此时酒醅中已积累了大量乙醇, 所以研究乙醇对 TS-10 生长代谢的影响很有必要。

采用发酵培养基 II, 将实验分为 3 个小组, 各组发酵培养基中乙醇浓度分别为 0%vol、2%vol、5%vol, 分别记为 1、2、3。各组发酵液中菌体的生长情况见图 3。

从图 3 可以看出, 1 号组在 72 h 时就进入稳定期, 2 号组延迟了 36 h, 而 3 号组丙酸菌几乎没有生长。由以上结果可以看出, 2%vol 乙醇浓度就开始对菌体生长产生抑制, 当乙醇浓度达到 5%vol 时, TS-10 停止生长。由于本实验是在液态环境中进行, 而乙醇和水有良好的互溶性, 可能会使乙醇对丙酸菌的抑制更强烈, 而在实际生产

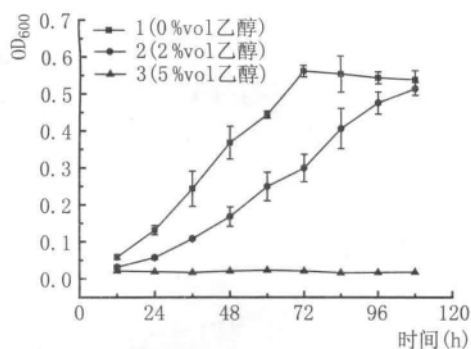


图3 乙醇对TS-10生长的影响

中,由于白酒发酵为固态发酵,乙醇对丙酸菌的生长抑制效果还需要在实际生产中进行验证。

由上述实验结果可知,乙醇和乳酸都会对丙酸菌生长产生抑制。在前人的研究中,丙酸菌灌窖都是在酒精发酵将近完成之后进行的,此时酒醅中乙醇和乳酸都积累了一定含量,这无疑会对丙酸菌液生长代谢产生抑制。过早用丙酸菌液灌窖会影响出酒率;过晚会达不到“增丙降乳”的效果,这就需要在保证出酒率与“增丙降乳”两个目标中找到一个折中点,选择适宜的灌窖时间。

2.2.3 丙酸菌对出酒率的影响预测

酒醅入窖粮糟中约有2%还原糖,随着发酵的进行,酵母等微生物开始利用还原糖,而酶类也在不断水解粮糟中的淀粉而生成还原糖,所以在淀粉水解完成或酒精发酵终止之前,酒醅中还原糖含量会一直维持在一定的范围内。

本实验研究了丙酸菌TS-10在葡萄糖和乳酸同时存在的情况下生长和利用的情况。采用发酵培养基III,菌体的生长情况以及碳源降解情况见图4。

图4可看出,TS-10在乳酸和葡萄糖同时存在的情况下,会优先降解乳酸,发酵24h后才开始降解葡萄糖,60h后乳酸被完全降解,在0~60h,葡萄糖平均降解速率为0.067 g/h·L,乳酸平均降解速率为0.183 g/h·L,约

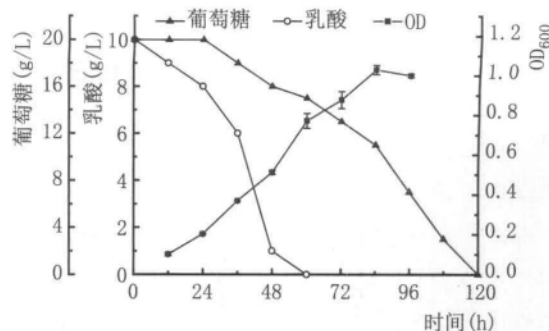


图4 混合碳源中TS-10生长代谢情况

为葡萄糖降解速率的3倍。综上所述,可以预测TS-10灌窖之后菌体会快速利用酒醅中的乳酸,缓慢降解酒醅中还原糖,只要控制好灌窖的时间,菌体在“增丙降乳”的同时,不会对出酒率产生明显的影响。

3 结论

为了不影响灌窖后的丙酸菌体的生长代谢,灌窖时酒醅中乳酸和乙醇的浓度都不宜过高;又因为TS-10在乳酸和葡萄糖同时存在的情况下具有优先高效利用乳酸的特性,可以考虑适当提前灌窖时间。根据上述研究结果,可以预测以TS-10为实验菌株,在适宜的时间内以菌液进行灌窖,在达到“增丙降乳”效果的同时,不会对出酒率产生明显的影响。

参考文献:

- [1] 袁菊如,陈全庚,徐国良,等.江西四特酒特征香味成分正丙醇的剖析[J].江西科学,1992,10(3):183-186.
- [2] 胡国栋,蔡心尧,陆久瑞,等.四特酒特征香味组分的研究[J].酿酒科技,1994(1):9-17.
- [3] 程志娟,邹海晏,赵树欣,等.丙酸菌在浓香型白酒生产中的应用(第三报)-丙酸菌津轻-10发酵特性的研究[J].酿酒科技,1988(4):2-5.
- [4] 张付旺,田以清,翟公先,等.利用丙酸菌实现浓香型白酒增己降乳的研究[J].酿酒科技,1995(4):24.

(上接第39页)

微生物技术、强化曲、酯化酶技术,取得了丰硕的成果,对全国浓香型白酒优质品率的提高作出了重要贡献。如今,浓香型白酒优质品率提高仍存在很大的发展空间。本研究运用郑坚^[4]等采用的富集培养法从糟醅分离、培养出己酸菌,更有回归自然的生态学意义;配合酯化酶作用开发一套以微生物菌体提高母糟活力,增强己酸发酵的生物技术,在理论和实际应用方面皆具有重大意义。

综上所述,本次试验效果较为明显,但目前还处于小试阶段,对大规模生产是否能取得同样效果,尚需进一步验证。

参考文献:

- [1] 吴衍庸,卢世珩,刘光烨,薛堂荣,侯明贞,江跃林.利用窖泥甲烷菌与己酸菌二元发酵技术提高泸型曲酒质量的研究[J].食品与发酵工业,1990(6):44-46.
- [2] 吴衍庸.红曲酯化酶新技术在中国白酒上的应用[J].食品科学,2004(z1):249-250.
- [3] 吴衍庸.泸酒老窖资源对泸型酒发展的影响[J].酿酒科技,2005(10):110-112.
- [4] 郑坚,吴衍庸.用好氧平板法从浓香型曲酒糟中分离己酸细菌[J].工业微生物,1991(3):35-36.