

# 己酸菌的选育与应用研究

崔世亮, 杨玉珍, 节秀娟

(内蒙古河套酒业集团股份有限公司, 内蒙古 杭锦旗 015400)

**摘要:** 己酸菌是一种能够在培养液中积累己酸的功能菌。以优质大曲发酵池的窖泥为材料, 采用厌氧培养分离方法筛选出己酸菌, 进行耐热、耐酒精、耐pH及厌氧培养试验。可将选育出的己酸菌用于人工窖泥、窖池泥养护、翻沙材料及灌窖工艺中。(孙悟)

**关键词:** 微生物; 己酸菌; 选育; 培养; 应用

中图分类号: TS261.1; TS262.3

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2003)04-0038-02

## Breeding Selection of Caproic Acid Bacteria and Its Application

CUI Shi-liang, YANG Yu-zhen and JIE Xiu-juan

(Hetao Liquor Industry Group Co. Ltd., Hangjinhouqi, Inner Mongolia 015400, China)

**Abstract:** Caproic acid bacteria, a kind of functional bacteria that could accumulate caproic acid in culture fluid, was prepared by anaerobic culture and separation of pit mud of quality Daqu fermentation pits. And quality caproic acid bacteria was obtained through tests of temperature resistant, alcohol resistant, pH resistant, and anaerobic culture. The selected caproic acid bacteria could then be used in the maintenance of artificial pit mud and the operation of sand cast technique and pit irrigation technique. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** microbe; caproic acid bacteria; breeding selection; culture; application

白酒生产中菌种质量的优劣及数量的多少对白酒的产、质量影响较大。现在在浓香型白酒酿造中对窖泥功能菌——己酸菌的选育、培养与应用情况介绍如下。

### 1 己酸菌的选育

己酸菌(梭状芽孢杆菌)是一种能够在培养液中积累己酸的功能菌。我公司一直使用引入菌。近年来,公司技术工作者又在老窖窖池中分离到1株更加优良的己酸菌,该菌粗壮、体长,产己酸量更高,更适合北方地区的生存环境及培养条件,已作为很好的替换菌种在使用。

#### 1.1 己酸菌的分离、纯化

##### 1.1.1 材料

样品:本厂优质大曲酒发酵池的窖泥。

培养基:乙醇醋酸盐培养基(醋酸钠8g,氯化镁200mg,氯化铵500mg,硫酸镁2.5mg,硫酸钙10mg,硫酸亚铁5mg,钼酸钠2.5mg,生物素5 $\mu$ g,对氧基苯甲酸100 $\mu$ g,蒸馏水1000ml。自然pH, 121 $^{\circ}$ C灭菌20min,冷却后无菌加入乙醇25ml)。

器皿:容量瓶、平皿。

##### 1.1.2 方法与步骤

1.1.2.1 称取优质窖池泥1~2g放入装有少量液体培养基的容量瓶中,在80 $^{\circ}$ C水浴锅中处理6~8min,冷却至30~40 $^{\circ}$ C,在无菌条件下继续添加液体培养基至细颈口部,再加2~3滴无水乙醇,塑料布包扎封口,31~33 $^{\circ}$ C培养10~15d<sup>[1]</sup>。

1.1.2.2 挑选出产气较早、较多的容量瓶,放入80 $^{\circ}$ C水浴锅中处理6~8min,冷却后以15%的接种量转接种于事先备好的装有新鲜液体培养基的容量瓶中,添满容量瓶并包扎封口。以后操作同上。

31~33 $^{\circ}$ C培养7~10d,按此法连续传代3~4次。

1.1.2.3 镜检初步确定己酸菌的菌体活跃健壮,营养细胞呈杆状,芽孢囊膨大,呈梭状,革兰氏染色阴性。

1.1.2.4 厌氧分离(在厌氧培养箱中操作),将选出的培养瓶进行80 $^{\circ}$ C水浴热处理,然后以10倍稀释法适当稀释。

取后3个稀释度的稀释液分别从中吸取0.5ml加入空皿中,每一稀释度作2个平皿。然后融化经灭菌的固体培养基,待冷却至50~55 $^{\circ}$ C时分别倾入上述各皿,每皿约20ml,迅速摇匀。整个过程在厌氧培养箱中操作,待培养基凝固后,将培养皿置于厌氧培养箱,恒温33 $^{\circ}$ C培养5d,挑选出生长良好的单菌落接种于盛放新鲜液体培养基的细颈试管中,厌氧条件下33 $^{\circ}$ C恒温培养7~10d,再次镜检细胞形态,鉴定己酸菌的形体及健壮与否。

1.1.2.5 己酸的鉴别:取发酵液1ml于小试管中,加入2%硫酸铜溶液1ml,有云雾状深蓝色沉淀,再加入0.5ml乙醚,充分摇匀,静置10min后已分层,在乙醚层呈蓝色即证明有己酸存在。颜色越深含量越高。再经分光光度计测定己酸含量。

#### 1.2 己酸菌的培养条件

1.2.1 热处理 己酸菌孢子有耐热性,而其营养细胞是不耐热的,所以菌种纯化大多采用热处理法。

己酸菌种经热处理后,菌数大幅度减少,所以培养过程中培养时间需要延长,以使健壮纯化菌逐步繁殖,产酸量增加。一般来说热处理时间6~8min,效果较好。

己酸菌孢子的耐热性与热处理过程中的pH有关。一般pH为7时耐热性最高,随着pH的降低或升高,发芽率逐步下降,酸性条件下比碱性条件下下降率更为显著。

收稿日期:2002-12-28

作者简介:崔世亮(1970-),男,内蒙古人,大专,工程师,获专利1项,获盟、自治区科技进步奖1项,发表论文数篇。

1.2.2 酒精浓度 培养基中酒精浓度是影响己酸产酸量的重要因素之一。我公司目前使用的窖泥分离纯化菌种,最适宜的酒精浓度为2%~3%,1%或4%时产己酸量减少。

1.2.3 pH的影响 窖泥分离纯化菌种在pH4以下时,不产己酸,在pH5~7范围内,均能产己酸,pH6.5~6.8产己酸量最高。

1.2.4 厌氧条件对产己酸的影响 己酸菌是一种兼性厌氧梭状芽孢杆菌,故适宜在真空或有微量氧气的条件下生长。

1.2.5 接种量的影响 己酸菌发酵十分缓慢,发酵周期太长不利于生产,故适当地加大接种量,有利于提高菌种的利用效率。当扩大培养接种量为5%时,发酵缓慢,一般产己酸到最高峰需13~15d或更长时间,当接种量提高到10%时,产己酸更快一些,产己酸到最高峰需11d左右。若利用己酸菌菌体下沉到沉淀物中的特性,将发酵己酸上清液倾出,剩下的菌体沉淀物全部作种子,使接种量更大,再加入一定量的新鲜培养基,则培养9d左右己酸产量即可达到最大值。因此,在生产上,己酸菌扩大培养接种量不宜低于10%,在己酸发酵阶段,也可将菌体沉淀物全部作为种子,直至发酵产己酸能力下降时再换新种,己酸发酵上清液可供生产使用<sup>[2]</sup>。

## 2 己酸菌的生产培养

### 2.1 试管、三角瓶己酸菌种子培养

巴氏培养基:醋酸钠0.5%,硫酸铵0.05%,磷酸氢二钾0.04%,硫酸镁0.02%,碳酸钙0.5%~1.0%,酵母膏0.1%~0.2%。乙醇2%(灭菌后加),121℃灭菌30min。

培养方法:首先将保藏的己酸菌菌种活化,即热处理。将保藏菌种按1:4的比例接入无菌水,80℃水浴中处理6min后,接入试管培养液中,在31~33℃培养10d,待培养液变浑浊并有小气泡上升时,即可进行逐代扩大培养,接种量为15%,培养温度为31~33℃,培养时间可逐步缩短,由初始的10d变为7d,5d,以保证菌种在繁殖旺盛期接种,由试管逐代扩大培养至5000ml三角瓶,再扩大到种子缸,至此,种子扩大培养阶段结束。各培养阶段的己酸菌数及己酸含量情况见表1。

表1 三角瓶种子不同扩培阶段培养液的己酸菌数及己酸含量对照

容量(ml)	己酸菌数(万个/ml)		己酸含量(mg/100ml)	
	河酒1#	引入菌	河酒1#	引入菌
150	3585	978	820	745
250	1181	670	1230	675
500	1575	2155	665	500
3000	2450	1356	1600	590
5000	1844	906	1530	715
平均	2127	1213	1169	645

### 2.2 大缸己酸菌的培养

进入普缸种子阶段,为了降低生产成本,一般不使用巴氏培养基,而改用固态发酵的酒糟为原料的培养基。常用的配方为:鲜酒糟5%,黄土2%,豆饼粉1%,乙醇2%,碳酸钙1%,醋酸钠0.5%。

具体操作:大缸用水冲洗干净,按比例加入配料,并加少量80℃以上的水,处理10~15min。然后加水到需要量,冷却到36℃左右,并用碱调整酸度至pH6.5~6.8,接入10%~15%的种子液,加入酒精,搅匀后,封口,在34~36℃的环境中培养10~13d,供车间使用。结果见表2。

## 3 己酸菌的应用

### 3.1 在人工窖泥培养中的应用

表2 大缸培养液不同发酵天数己酸菌数及己酸含量对比(3个样平均值)

培养时间(d)	河酒1#		引入菌	
	己酸菌数(万个/ml)	己酸含量(mg/100ml)	己酸菌数(万个/ml)	己酸含量(mg/100ml)
7	1850	695	1900	840
11	1450	1450	1142	930
13	1015	1320	927	700

在浓香型白酒的生产中,窖泥是基础,是多功能性微生物生长繁殖活动的场所,是微生物的载体物质。尤其是己酸菌的生长、繁殖。因此,我们在培制人工窖泥时,就是把窖泥当作己酸菌的培养基。根据己酸菌的营养需求及其生长特性,配制好培养基后,以10%~15%的接种量接入己酸菌液,尽可能地创造一个适合己酸菌生长、繁殖的良好环境,使之活泼、健壮地生长。保持窖泥中营养及一定量的己酸菌,能提高浓香型白酒的主体香成分己酸乙酯的含量。同一窖池在不同排次发酵过程中菌数与所产酒质量的关系见表3。

表3 同一窖池不同排次菌数及所产酒质量情况对照

项目	第一排	第二排	第三排
细菌总数( $\times 10^8$ 个/g)	4.6	3.4	3.8
己酸菌总数( $\times 10^7$ 个/g)	0.3	0.6	0.5
己酸乙酯(mg/100ml)	263.7	351.5	310.4
乳酸乙酯(mg/100ml)	137.9	287	153.2
乙酸乙酯(mg/100ml)	130.5	217.2	208.3
丁酸乙酯(mg/100ml)	26.3	45	36
出酒率(%)	61.1	68.3	67.5

### 3.2 在窖池泥养护中的应用

由于北方地区土质、气候等实际情况较南方地区差,窖池泥如保护不当或保养不及时,很容易造成窖泥老化。在实际生产中,将配制好的ANB营养液淋洒于打孔后的窖池四壁,使营养液及其中的功能菌更彻底地渗入窖池泥中。最后把四壁抹平,把此项工作做好是保养窖泥,防止、延缓窖泥退化的一项重要措施,并已纳入生产工艺中。

在ANB营养液的配制中,根据该窖池泥的化验结果,遵循“缺什么补什么”的原则,进行了有针对性的营养补加及酸碱度调节,为己酸菌的生长、繁殖创造了良好环境。在窖池泥的保养中,及时补充水分、营养物及健壮活菌体(接入了大量的己酸菌、酵母菌及

表4 同一窖池经养护后不同排次菌数及所产酒质量情况对照

项目	第一排	第二排	第三排	第四排
细菌总数( $\times 10^8$ 个/g)	4.7	2.6	3.7	2.6
己酸菌总数( $\times 10^7$ 个/g)	0.3	0.5	0.4	0.6
己酸乙酯(mg/100ml)	205.6	251	224	317
乳酸乙酯(mg/100ml)	133.5	301	132	259
乙酸乙酯(mg/100ml)	115.6	132	201	194
丁酸乙酯(mg/100ml)	22.9	42	28	36
出酒率(%)	56.5	54.2	66.5	68.3

老窖泥所富集的一些其他功能菌),能极大地延缓窖池泥老化速度,从而保持浓香型大曲酒的质量。经试验,同一窖池经养护后不同排次发酵过程菌数及产酒质量情况见表4。

### 3.3 在翻沙材料中应用

为达到提高酒质,促进有益微生物增长和酸、酯、醇、醛等有益香味成分的生成,我公司结合北方地区实际气候状况,采用了“翻沙”发酵措施。翻沙发酵实际上是集酒醅的二次发酵、回酒发酵、延

(下转第42页)

到伤害。来酿后, 酿水很少, 糖度很高, 酵母无法生长, 这样的酿缸不采取措施, 很容易造成酸败。这是由于酿醅糖分高, 酵母少, 发酵不占优势造成, 我们称之为“甜酸”。小曲液化力强, 酿醅水大, 则糖分适中, 容易与酵母匹配起发。

其三酶系丰富, 口感好。黄酒是酿造酒, 口感好风味佳是黄酒的特点。传统小曲能做到酶系丰富, 纯种小曲同样能做到, 这就是多菌种培养小曲。选育优良的根霉菌株、酵母菌种, 多菌种混合培养黄酒小曲, 同样能达到酶系丰富的目的。

其四有适度的产酸能力。小曲产酸太低, 不一定适宜酿制黄酒。适当的产酸能力, 不但能给酿醅良好的口感, 而且调节了酿醅的pH值, 有利酵母的生长, 压制杂菌繁殖。笔者认为将川黔型根霉与上海型根霉混合制曲, 利用双方优点, 可培养出更适合黄酒生产的优秀小曲。

其五合适的保存期。麸皮制曲有其方便、容易制作的优点, 但其保存期短, 特别是对在冬天酿制黄酒的浙江厂家, 因来酿时间长, 造成酿缸不易管理, 是麸皮小曲的不足之处(指麸皮纯种根霉存放一段时间往往比新鲜时来酿推迟几个小时)。小曲是作种为主, 要求菌体健壮好传代, 培养在米粉上的根霉菌生长良好, 米粉

(上接第39页)

长发酵周期3项措施于一体的技术措施。在具体的生产应用中, 把一定量的大曲、酒精或原酒、己酸菌液等泼洒于翻沙酒醅中, 拌匀后发酵, 可使浓香型大曲酒的优质酒比例大为提高。

泼洒己酸菌液与不泼洒己酸菌液对照窖池所产酒质量情况见表5(取翻沙酒与糙子酒的混合样)。

表5 泼洒己酸菌液与对照窖池产酒质量情况 (mg/100 ml)

组分	试验1#	试验2#	对照1#	对照2#
己酸乙酯	308	376	248	276
乙酸乙酯	264	312	189	162
乳酸乙酯	251	286	243	136
丁酸乙酯	42	45	24	37
产量(kg)	465	438	440	426
出酒率(%)	66	62	57	54

#### 3.4 在灌窖中应用

在浓香型大曲酒的生产中, 前期为产酒阶段, 约15 d, 后期为产酯阶段, 即酒的香味物质生成阶段。如在酒醅入窖时加入己酸菌液等物质, 将有碍于淀粉的糖化发酵, 反而使出酒率下降。等糖化发酵阶段结束后, 再加入己酸菌液等物质就不会影响到出酒率。在操作中, 根据淀粉糖化发酵要释放热量的原理, 在测窖温升至顶火再推迟1~2 d后开始灌窖。表6为用己酸菌液灌窖与对照窖池(不灌窖)所产酒质量情况(取翻沙酒与糙子酒的混合样)。

块曲保存期长, 来酿快, 这一点制曲的前辈已有结论。所以笔者认为我们的祖先以米为原料制造小曲, 以小麦为原料制大曲有其实际的科学性。因此黄酒专用小曲还是以大米为原料制曲为好。

#### 6 小结和建议

6.1 黄酒专用小曲宜采用多菌种混合培养, 选用优秀根霉菌种分别制曲种, 混合大生产培养, 丰富小曲酶系, 提高黄酒风味。

6.2 黄酒专用小曲的酵母必须以黄酒酵母为主, 适当搭配风味好的酒精酵母, 互为补充, 相互协调, 才能适应黄酒生产。

6.3 黄酒专用小曲以早籼米粉或早谷粉为原料制作为好。实践证明, 用早籼米粉制作的小曲来酿快, 酿水大, 适应大米黄酒生产。同时米粉块曲已实行机械化生产, 卫生状况比麸皮散曲好, 生产成本只比麸皮散曲略高, 而每100 kg大米搭酿缸只需300 g左右, 厂家可接受。

6.4 希望黄酒生产厂家重视黄酒专用小曲的科技生产研究。黄酒是我国特有的酒种, 民间小曲是微生物的宝库, 继承和挖掘祖先留给我们的宝贵遗产, 选育适合各厂的优秀菌种, 制作各厂各具特色的小曲, 酿造具有地方特色的黄酒产品, 于国于民于厂均有利。●

表6 己酸菌液灌窖与对照样窖池产酒质量对照 (mg/100 ml)

组分	试验1#	试验2#	对照1#	对照2#
己酸乙酯	285.4	304.7	254	226
乙酸乙酯	115.2	218.4	106	141
乳酸乙酯	143.3	137.4	236	93
丁酸乙酯	47	37.8	24	33
产量(kg)	451	434	413	437
出酒率(%)	58	61	54	51

#### 4 小结

以上是我公司已酸菌的具体应用, 通过近年来的生产摸索, 在不同的应用方面, 己酸菌液的培养周期也不同。在窖泥中应用培养周期较短, 菌数较多, 菌体活泼健壮的己酸菌液; 而在翻沙、灌窖时则用培养周期较长、己酸含量较高的己酸菌液。经生产试验表明, 近年来我公司老窖原酒的质量逐年提高, 优质酒产出率也呈上升趋势, 取得了较好的效果。

在以上试验工作的开展过程中, 得到了集团总工程师罗维及技术中心主任许聪及老窖车间同事们的大力支持、配合, 在此深表谢意。

#### 参考文献:

- [1] 杜连祥, 等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 科学技术出版社, 1992.
- [2] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

## “首届制曲专业化发展趋势研讨会”在泸州举行



首届制曲专业化发展趋势研讨会会场

本刊讯:“首届制曲专业化发展趋势研讨会”于2003年4月25日在四川泸州市胜利召开。会议由四川省食品工业协会主办,《酿酒科技》杂志社、《酿酒》杂志社、《糖酒快讯》杂志社和泸州老窖生物工程有限责任公司承办。沈怡方、高月明、梁邦昌、曾祖训、胡永松、庄名扬、赖登焯、杨明、黄平、赵彤等白酒界专家及学者出席了会议。会议由四川省食品工业协会副会长魏夕和主持, 泸州老窖股份有限公司副总经理、泸州老窖生物工程有限责任公司董事长沈才洪致词。

会上, 就“制曲专业化发展趋势”, 沈怡方、梁邦昌、高月明、曾祖训、李跃、胡永松、庄名扬、黄平等专家做了精辟的学术报告。

会议收到学术论文10多篇, 部分与会代表分别做了题为“试论大曲内在品质”、“久香牌大曲在北方酿酒中应用的研究”、“专业化制曲的优势剖析”、“告别作坊生产意识, 顺应酿酒工业化潮流”等的大会交流发言。

会议认为, 制曲专业化已成为发展趋势, 是社会进步的需要, 是工业化进程的必然。现全国已有数十家规模不等的专业化制曲厂, 包括大曲、小曲、生料曲、生香曲等。因此, 会议倡议全国专业制曲厂家联手起来, 成立“全国制曲协会”, 互相协作, 共同发展, 为全国酿酒行业做出新的贡献。

会议顺利完成各项议程, 取得预期效果, 圆满结束。(永光, 单雨)