

泸州梭菌己酸发酵应用的理论与实践

吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 总结浓香型曲酒生产中, 泸州梭状己酸菌与己酸发酵从理论到实践的专题研究过程, 对泸州己酸菌的分离、生态学意义、窖内发酵机理以及生产上的创新应用的经验作了初步的介绍。

关键词: 微生物; 泸州梭菌; 己酸发酵; 浓香型白酒

中图分类号: Q93- 3; TS261.1; TS262.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001- 9286(2007) 11- 0131- 02

Applied Theory & Practice of Lu- type Clostridium Lushun Fermentation

WU Yan-yong

(Chengdu Biology Research Institute of CAS, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: The applied theory and practice of Lu-type Clostridium Lushun fermentation in the production of Luzhou-flavor liquor were summarized. Besides, the experience in the separation of Lu-type Clostridium Lushun, its ecological significance, its fermentation in pits, and its innovative application was also introduced in the paper. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; Clostridium Lushun; capronic acid fermentation; Luzhou-flavor liquor

己酸发酵在浓香型白酒中具有十分重要的意义, 泸州己酸菌早已应用于浓香型曲酒生产, 对浓香型酒在全国得到推广作出了巨大贡献, 而对泸州己酸菌发酵理论与实践, 创新经验尚未作出专题报道。

1 浓香型曲酒己酸菌与己酸发酵

1.1 己酸菌的研究历史

通过微生物作用产生己酸的最早记载是 1868 年贝强普氏(Bechamp)发现土壤细菌能够产生己酸; 1937 年美国巴克(Baker)研究奥氏甲烷杆菌中, 发现该菌在以乙醇、碳酸为基质的培养基中仅生成少量乙酸, 而主要生成的是己酸和丁酸, 因而偶然发现了产己酸的细菌, 它们能与奥氏甲烷菌共栖生长, 1942 年这种产己酸的菌被正式命名为克拉瓦氏梭菌(*Clostridium ktwyveri*); 1948~1951 年间, 日本北原觉雄等先后以“关于己酸发酵”为题发表过一些研究报告, 但因为发酵周期长、产酸量低没有工业生产前途而停止了研究, 北原觉雄分离的产己酸菌称为巴氏梭菌(*Clostridium Barkeri*)。

在国内, 1986 年方心芳先生在为吴衍庸编著的“浓香型曲酒微生物技术”一书所作的序言中提到伯杰手册虽是权威著作只记录了克氏梭菌(*Clostridium ktwyveri*)和臭气梭菌(*Clostridium scatologenes*)2 种, 对巴氏梭菌

(*Clostridium Barkeri*)也未列入其中, 认为吴衍庸研究的泸州梭状己酸菌与日本北原觉雄研究的己酸菌相似, 泸州梭状菌已用于浓香型白酒的生产, 泸州梭状菌(*Clostridium Lushun*)的命名得到了方心芳先生的认可^[1]。日本酒协前会长秋山裕一曾来信索取 1986 年出版的“浓香型曲酒微生物技术”一书, 来信中称老窖为生态窖, 对泸州梭状菌应用于中国酒颇感兴趣。

1.2 泸州梭状菌分离源及特性

产己酸的泸州梭状菌分离源均来自泸州老窖泥底, 泸州梭状菌为梭状芽孢杆菌属, 笔者及共同工作者共分 3 次从老窖底泥中分离到该菌, 1964 年从泸州曲酒厂(现泸州老窖酒厂)营洪车间的 400 年以上老窖泥中分离, 通过纸上层析、薄层层析技术筛选出 10 余株产己酸的菌; 并应用于窖泥培养, 新近窖和旧窖的改造列题“新窖老熟”试验首次获得成功, 新窖出酒即达到优质曲酒水平。

1984 年以后, 再次从泸州老窖酒厂营洪车间国窖窖泥中分离出泸州梭状高产菌株。产酸量高达 20 g/L。“泸州老窖己酸菌分离特性及产酸条件的研究”的论文发表在 1986《食品与发酵工业》第 5 期^[2]首页上。同时, 又从五粮液酒厂城区车间老窖泥中分离筛选到己酸菌 w-1, 论文“己酸菌 w-1 的分离特性及产酸条件的研究”发表在 1988 年《食品与发酵工业》第 4 期^[3]首页上, 该研究与五粮液酒厂科研所

收稿日期: 2007- 08- 08

作者简介: 吴衍庸(1926-), 男, 成都市人, 大学, 研究员, 硕士生导师, 微生物学家, 著名白酒研究专家, 第二、第三届国际酒文化研讨会学术委员, 国务院政府津贴首批获得者。从事泸州酒理论及应用研究 44 年, 获国家自然科学基金理论成果奖 1 项, 省市重大科技成果奖多项, 完成国家自然科学基金白酒微生物研究项目 3 项, 创新白酒微生物技术 3 项, 发表论文 100 余篇, 出版专著 1 部。指导白酒微生物硕士研究生 8 名。

合作得到国家自然科学基金资助。以上 3 次分离菌株经细菌学鉴定均与克氏梭菌(*Clostridium ktwyveri*)的生理生化特性很不相同,均表现为沪型梭菌(*Clostridium Lushun*)特性。

1.3 分离菌株己酸发酵机制

分离菌株代谢过程推测为分解淀粉得到葡萄糖。通过糖的 EMP 途径再进行丁酸发酵。产生丁酸和醋酸,进一步代谢产生己酸、醋酸、二氧化碳和氢,考察这些菌株的生长需要利用淀粉、嫌气培养,最适温度为 30~40℃。确证窖内存在着己酸发酵,产己酸菌存在于老窖泥中,分离具有高产特性的己酸菌,老窖泥成为最佳分离源。

2 己酸菌与丁酸菌在浓香型曲酒中所起的作用^[4]

2.1 对己酸菌与丁酸菌的识别

己酸菌与丁酸菌同属于厌氧梭状芽孢杆菌,它们在显微镜下观察形态完全相同,无法区别,因此得从微生物生态、生理代谢上去加以区别。

2.1.1 从微生物生态学上区别

己酸菌具有其特异性,老窖泥是己酸菌特殊的栖息地,其窖龄愈老己酸菌数量愈多,而丁酸菌在自然界到处可以找到,在新窖泥中极易分离。

表 1 新、老窖中己酸菌、丁酸菌数量差异

梭菌	老窖泥	中龄窖泥	新窖窖泥
己酸菌	8.10×10^7	6.80×10^6	3.98×10^3
丁酸菌	6.70×10^4	5.12×10^4	2.18×10^4

己酸菌对浓香型曲酒具有特别的生态性能,成为极具重要的功能菌,丁酸菌是筑窖新土的土著菌类,对酒窖产优质酒的生产性能不具特殊意义,由于己酸菌发酵除产己酸外也产丁酸,在老窖中丁酸菌产酸功能可为己酸菌代替,这一论点对指导人工培养优质窖泥方面有实际意义。

2.1.2 从微生物生理代谢上区别

分离己酸菌、丁酸菌可选择专性培养基,己酸菌培养基乙酸钠为重要成分,丁酸菌用一般豆芽汁培养基即可分离到,己酸菌还需要依靠对代谢产物的检测,己酸菌主要产己酸,丁酸菌主要产丁酸,过去用纸谱层析方法,薄层层析方法,现今用色谱分析方法检测,一般实验室常用简易化学方法,以硫酸铜溶液呈色反应生成蓝色来识别。

2.2 利用己酸菌培养优质窖泥

培养优质窖泥应用己酸菌应有生态学观点,即不能脱离老窖生态环境来考虑,培养新窖泥的配方而言,就是要就地取材,选活性黄泥,加入一定量耕作土、酒尾、黄水、酒糟、酒曲等,达到富集己酸菌的目的。窖泥配方不当,若在培养新泥上添加其他更多外源物质,如添加过多的塘泥、污泥、屠宰场的肠衣水、烂苹果等,这样达不到富集己酸菌。

控制丁酸菌的过程不严格,而将更多地引起其他杂菌繁殖、非功能菌的侵入,使窖泥发臭,用这种窖泥建成的新窖将达不到生产优质酒的水平要求,拖延“新窖老熟”时日。

若考虑甲烷菌与己酸菌共栖生长有利己酸发酵,培养优质窖泥时,可少量加进塘泥、沼气池底渣等。总之,培养新泥其成熟窖泥要带有酯香味,我们称它为“香泥”。若发臭的窖泥用于改窖、逾窖,不利于优质酒生产,得待新窖向老窖转变后方能生产优质酒。

3 己酸菌与其他功能菌的相互关系

己酸菌与甲烷菌的二元发酵能提高己酸产量,也能提高甲烷产量,己酸菌与乳酸菌的混合培养,己酸产量明显增加,乳酸明显下降,己酸菌与硫酸盐还原菌的混合培养,己酸产量有所提高。己酸菌与其他功能菌的互营培养效应结果见表 2。

表 2 己酸菌与其他功能菌互营培养效应

细菌组合培养	己酸产量 (mg/L)	甲烷产量 (μmol)	乳酸产量 (mg/L)
己酸菌、甲烷菌	9845	104.60	—
己酸菌、乳酸菌	5807	—	784
己酸菌、硫酸盐还原菌	4237	—	—
己酸菌单菌	3084	—	—
甲烷菌单菌	—	62.49	—
乳酸菌单菌	—	—	2014

生产上总结出的“增己降乳”,提高优质酒措施十分重要,我们认为重要的还在己酸菌的功能发挥上,降乳问题将不存在,这样“增己降乳”的其他措施将会变为次要^[5]。

4 窖内己酸发酵及己酸乙酯的合成

己酸乙酯的生物合成理论与实践是浓香型曲酒一项重要成果,它是将酶学研究引入到白酒发酵,提升白酒发酵理论的认识,揭示了己酸与乙醇生物的合成机理,这在 20 世纪 80 年代后期,经过对酯化菌的分离和对酯化反应的研究,己酸和乙醇酶催化生物合成己酸乙酯这一奥密才被揭示,理论上的创新最早的论文“浓香型己酸乙酯合成的生物学研究”发表在 1990 年《食品与发酵工业》第 5 期^[6]首页上,开创了浓香型酒研究的新领域,学科上使发酵工程进入到酶学工程的研究,由于理论上创新到技术上的创新,进而进入实用阶段,实现了脱离窖内发酵己酸乙酯的生物合成,20 世纪 90 年代末,中科院成都生物研究所与山东兰陵酒厂的合作,酯化酶生产工艺已达到工业化生产水平^[7]。

5 结束语

己酸菌、甲烷菌、酯化酶 3 项微生物技术已进入实用阶段,本报告主要针对己酸菌及相关应用问题,提出一些原则和经验方面的介绍,在今天虽然己酸菌、己酸发酵早已应用于生产,但为适应当今市场变化,众多酒厂都瞄准创品牌上,在高档酒上求发展,重视生产高档基础酒,为适应市场发展的需要,己酸菌、己酸发酵的应用仍显得十分重要。

参考文献:

[1] 方心芳,吴衍庸.浓香型曲酒微生物技术序言[M].成都:四川

(下转第 135 页)

准,这就大大降低了该污泥直接施用或制成商品有机肥后施用的风险。再从各国农用污泥标准看,我国农用污泥标准重金属较其他国家严格,且划分的标准更细,考虑到了土壤酸碱性对重金属有效性的影响。

迄今为止,制定非农用地污泥标准的国家很少,我国亦尚未制定非农用地污泥标准。若城市绿地施用啤酒污泥时参考美国非农用地污泥标准,则样品污泥中重金属元素的含量显著低于该标准相应指标值。因此可以认为,啤酒污泥用于城市绿地,其重金属元素的含量相对来说是安全的。因此,为了防止重金属的污染,在将污泥作为肥料施用时,应该作一些具体的规定。如规定土壤的 pH 值,规定污泥中的重金属允许含量及每年施肥次数。这样在一定程度上可以减少重金属的污染。

2.2 污染评价

为了深入了解污泥重金属污染状况,需要判定重金属元素的污染指数。根据单项污染指数评价结果可以确定主要的污染重金属元素,样品单因子污染指数及综合污染指数见表 3。

表 3 样品单因子污染指数及综合污染指数

监测项目	二级标准(mg/kg) 土壤 pH<6.5	单因子污染指数	污染等级	综合污染指数	污染等级
汞	0.30	3.90	重污染	7.29	重污染
镉	0.30	9.87	重污染		
铬	150	0.59	未污染		
铜	50	2.55	重污染		
锌	200	0.81	未污染		
铅	250	0.07	未污染		

从表 3 可知,以国家土壤环境质量二级标准为评价标准,镉、汞和铜 3 种重金属的单项污染指数都大于 1,污染等级为重污染;从污染指数来看,镉>汞>铜,其指数分别为 9.87、3.90 和 2.55。而铬、锌和铅 3 种重金属的污染指数均小于 1,处于未污染等级,其中铅的单因子污染指数最低,只有 0.07。上述可以说明啤酒污泥中主要污染元素是镉、汞和铜,严重超过国家的二级标准。

单项污染指数只能反映污泥中某一重金属元素的污染状况,而污泥是一个十分复杂的体系,只有通过综合污染指数才能较具体地评判和表明其重金属的污染情况,突出高浓度重金属元素对环境质量的影响。从表

3 中通过内梅罗污染指数法计算可知,6 种重金属的综合污染指数为 7.29,达到重污染水平;结果还显示啤酒污泥污染是由镉等 3 种以上重金属元素的复合型污染。由此可见,啤酒污泥、废水等复合型重金属污染源的控制已十分必要。

3 结论

从以上分析结果可以看出,虽然啤酒污泥中的重金属含量均在国家有关控制标准以内,表明污泥作农肥施用,安全系数较大。但从其污染指数看,镉、汞和铜 3 种元素属于重污染,是啤酒污泥中的主要污染元素,应该加以密切注意。因此,要实现啤酒污泥安全有效的利用,需要在施用于土壤前去除污泥中重金属或降低其含量,如进行堆肥化处理,不仅能改变重金属的形态,降低重金属的生物有效性,而且还能杀死污泥中其他的致病菌、虫卵等有害物质。对于其他的环境问题,建议在严格控制施用量的同时优先考虑施用于园林绿地、高速公路绿化带等与食物链不直接相连的地方。

但是,到目前为止,啤酒污泥中重金属的形态、农业利用后重金属对作物的生物有效性及其在土壤中的富集情况等科学问题均需要开展更加系统、深入的田间试验研究,同时进行生态风险评价。

参考文献:

- [1] 杨观中,蒋培森,陈廷登.啤酒污泥综合利用初探[J].浙江工业大学学报,2000,28(2):154-159.
- [2] 陈茂林,胡忻,王超.我国部分城市污泥中重金属元素形态的研究[J].农业环境科学学报,2004,23(6):1102-1105.
- [3] 鲍士旦.土壤农化分析(第三版)[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [4] 刘凤枝.农业环境监测应用手册[M].北京:中国标准出版社,2001.
- [5] 张从.环境评价教程[M].北京:中国环境科学出版社,2002.
- [6] GB18918-2002,城镇污水处理厂污染物排放标准[S].
- [7] 乔显亮,骆永明.我国部分城市污泥化学组成及其农用标准初探[J].土壤,2001,(4):205-209.
- [8] 陈同斌,黄启飞,高定,等.中国城市污泥的重金属含量及其变化趋势[J].环境科学学报,2003,23(5):561-569.
- [9] 吴光程.城市绿地施用污泥堆肥中的重金属污染与控制[J].河北化工,2006,9(6):58-60.

(上接第 132 页)

- 科技出版社,1986.
- [2] 吴衍庸,易伟庆.泸州老窖己酸菌分离特性及产酸条件的研究[J].食品与发酵工业,1986,(5):1-5.
 - [3] 薛堂荣,陈昭蓉.己酸菌 w1 的分离特性及产酸条件的研究[J].食品与发酵工业,1988,(4):1-6.
 - [4] 吴衍庸,郭世则,卢世珩,等.己酸乙酯酯化菌及酶学研究新

- 进展[J].酿酒科技,1996,(2):16-18.
- [5] 吴衍庸.提高中国白酒质量的酶工程技术.2003.5
 - [6] 吴衍庸,卢世珩.浓香型酒己酸乙酯合成的生物学研究[J].食品与发酵工业,1990,(5):1-6.
 - [7] 吴衍庸.红曲酯化酶新技术及在中国白酒上的应用[J].食品科学,2004,(增刊)