

# 酒类酒球菌 SD- 2a 营养需求的研究

刘树文, 胡 廷, 常亚维

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 以西北农林科技大学葡萄酒学院优选酒类酒球菌 SD- 2a 为菌种, 对其苹果酸- 乳酸发酵过程中所需的营养物质及其最佳比例进行了研究。结果表明, 酒类酒球菌 SD- 2a 所需的营养物质及其最佳配比为番茄汁 30%, 异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸各 0.03 g/L, 精氨酸、脯氨酸、色氨酸、盐酸半胱氨酸各 0.01 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L、硫酸锰 0.05 g/L。

**关键词:** 微生物; 酒类酒球菌 SD- 2a; 营养需求; 苹果酸- 乳酸发酵

中图分类号: Q93- 3; TS261.1; TS261.4 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 12- 0030- 03

## Study on the Required Nutrition of *Oenococcus oeni* SD- 2a

LIU Shu-wen, HU Ting and CHANG Ya-wei

(College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

**Abstract:** *Oenococcus oeni* SD-2a from Enology College of Northwest A&F University was selected as microbial species for malolactic fermentation. The required nutrition and the best nutrition proportioning in the fermentation process were studied. The results indicated that the best proportioning of the required nutrition for *Oenococcus oeni* SD-2a in the fermentation was 30 % tomato juice, 0.03 g/L isoleucine and methionine and valine and leucine and aspartic acid respectively, 0.01g/L tryptophan and Hcl-cysteine and arginine and proline respectively, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>, and 0.05 g/L MnSO<sub>4</sub>.

**Key words:** microbes; *Oenococcus oeni* SD-2a; required nutrition; Malolactic fermentation

苹果酸- 乳酸发酵 (malolactic fermentation, MLF) 是葡萄酒酿造中非常重要的二次发酵过程, 对酿造优质红葡萄酒来说尤其重要<sup>[1]</sup>。在葡萄酒酿造发达国家, 大都根据乳酸菌的营养需求研制一些促进发酵的营养剂产品, 这些营养剂能产生氨基酸、维生素和酒类酒球菌繁殖所必需的物质, 缩短潜伏期, 从而促使苹果酸- 乳酸发酵更快、更顺利地进行。有关这方面的研究, 国内还未见报道。MLF 能否顺利启动并最终完成受菌种及其环境条件(乙醇含量、pH、SO<sub>2</sub> 浓度及营养条件等)的影响。酒精发酵完成后酒中营养的缺乏会抑制乳酸菌的 MLF, 生产上常常出现 MLF 发酵迟滞甚至接种失败。因此, 有必要在研究了菌种最适的环境条件(乙醇含量、pH、SO<sub>2</sub> 浓度)的基础上, 根据菌种的营养要求, 研制一种发酵促进剂以便顺利地完成 MLF。

酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*) 为化能异养型微生物, 生理代谢不活跃, 培养时需要较复杂的营养条件和培养条件。*O.oeni* 不能合成缺乏的生长因子和氨基酸, 而葡萄醪和葡萄酒中这些营养物质含量比较少, 这可以

说明为什么有时难以进行苹果酸- 乳酸发酵<sup>[2]</sup>。

本研究通过正交实验确定酒类酒球菌 SD- 2a 的营养需求配方, 旨在为今后的发酵助剂产品的研制提供一定的依据。以解决生产中常常出现的 MLF 发酵迟滞、缓慢、甚至接种失败等问题, 从而更好地为生产实践服务。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

菌种: 苹果酸- 乳酸细菌 (*Oenococcus.Oeni* SD- 2a), 由西北农林科技大学葡萄酒学院保存。

ATB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母浸出物 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、硫酸镁 0.2 g/L、硫酸锰 0.05 g/L、盐酸半胱氨酸 0.5 g/L、番茄汁 250 mL, 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 4.8<sup>[3]</sup>。

模拟酒: 酒精度 11.0 %vol, 苹果酸 2.5 g/L, 酒石酸 3.5 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 果糖 1.0 g/L, SO<sub>2</sub> 20 mg/L, pH3.2。

#### 1.2 仪器与设备

岛津高效液相色谱仪, HS 超净工作台, MT- 250B

收稿日期: 2007- 07- 19

作者简介: 刘树文(1965-), 男, 黑龙江北安人, 副教授。

型恒温培养箱, 高压灭菌锅, pH-3B 型精密 pH 计, 电子天平。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 种子的制备

将斜面保存菌种接种活化于液体 ATB 培养基中, 于 25℃ 培养 4 d<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.2 实验过程

加入发酵助剂后, 将 1 mL 上述已培养好的乳酸菌接种到 100 mL 人工模拟酒中, 在 19℃ 下发酵 72 h, 然后终止发酵, 测定样品中苹果酸的浓度, 苹果酸浓度的测定采用高效液相色谱法。

#### 1.3.3 色谱条件

色谱柱: u-bondapak C<sub>18</sub> 柱, 流动相: 2.5% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5), 样品流速: 1 mL/min, 纸速: 0.5 cm/min, 检测波长: 200 nm, 灵敏度: 0.05 AUFS<sup>[5]</sup>。

#### 1.3.4 正交试验

为了减少试验工作量, 可将某些因素组合为复合因素, 安排在正交表中进行试验<sup>[6]</sup>。按照氨基酸的生成密码子相近特性, 将氨基酸分为 5 个组合, 分别为异亮氨酸 / 甲硫氨酸、色氨酸 / 盐酸半胱氨酸、精氨酸 / 脯氨酸、缬氨酸 / 亮氨酸、天门冬氨酸, 加番茄汁为 1 个因素, 共 6 个因素。进行 6 因素 5 水平的试验。复合因素的各水平

取值为两个复合因素的等量加和, 如: 异亮氨酸 / 甲硫氨酸组合取值为 0.02 g/L 时, 则异亮氨酸和甲硫氨酸各取 0.01 g/L。正交设计方案见表 1。

表 1 发酵助剂正交设计方案 (g/L)

项目	水平				
	1	2	3	4	5
A 番茄汁(模拟酒总量的%)	10	20	30	40	50
B 异亮/甲硫氨酸	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
C 色氨酸/盐酸半胱氨酸	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
D 精氨酸/脯氨酸	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
E 缬氨酸/亮氨酸	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
F 天门冬氨酸	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10

#### 1.3.5 其他营养物质的比例

影响试验指标的因素很多, 由于试验条件的限制, 不可能逐一或全面地加以研究, 要根据已有的专业知识及有关文献资料和实际情况, 固定一些因素于最佳水平, 排除一些次要的因素, 而选择一些主要因素<sup>[6]</sup>。所以本试验根据相关资料固定了酒类酒球菌 SD-2a 对两种微量元素镁和锰的需求: 硫酸镁 0.2 g/L、硫酸锰 0.05 g/L。

#### 1.4 检测指标

苹果酸降解率(MAD) =  $\frac{\text{MLF前苹果酸浓度} - \text{MLF后苹果酸浓度}}{\text{MLF前苹果酸浓度}} \times 100\%$

表 2 6 因素 5 水平正交试验结果

实验号	因素							苹果酸降解率(%)
	番茄汁	异亮/甲硫氨酸	色氨酸/盐酸半胱氨酸	精氨酸/脯氨酸	缬氨酸/亮氨酸	天门冬氨酸		
1	1	1	2	4	3	2	45.72	
2	2	1	5	5	5	4	61.96	
3	3	1	4	1	4	1	87.73	
4	4	1	1	3	1	3	87.33	
5	5	1	3	2	2	5	45.48	
6	1	2	3	3	4	4	11.20	
7	2	2	2	2	1	1	31.84	
8	3	2	5	4	2	3	69.60	
9	4	2	4	5	3	5	71.52	
10	5	2	1	1	5	2	64.36	
11	1	3	1	5	2	1	83.31	
12	2	3	3	1	3	3	90.44	
13	3	3	2	3	5	5	87.27	
14	4	3	5	2	4	2	88.28	
15	5	3	4	4	1	4	14.16	
16	1	4	4	2	5	3	14.04	
17	2	4	1	4	4	5	23.48	
18	3	4	3	5	1	2	42.56	
19	4	4	2	1	2	4	77.82	
20	5	4	5	3	3	1	58.00	
21	1	5	5	1	1	5	22.04	
22	2	5	4	3	2	2	36.60	
23	3	5	1	2	3	4	82.63	
24	4	5	3	4	5	1	42.16	
25	5	5	2	5	4	3	60.40	

## 2 结果与分析

### 2.1 6因素5水平正交试验结果

按表1的实验设计,采用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计实施试验。以发酵后苹果酸降解率为指标,6因素5水平正交试验结果见表2,其中苹果酸降解率最大的是第12次实验,72h降解苹果酸2.261g,降解率为90.44%。

### 2.2 6因素5水平正交试验极差分析结果

对表2中的试验结果进行极差分析,结果见表3。

表3 6因素5水平正交试验极差分析结果

项目	A	B	C	D	E	F
k1	35.26	65.64	68.22	68.48	39.59	60.61
k2	48.86	49.70	60.61	52.45	62.56	55.50
k3	73.96	72.69	46.37	65.29	69.66	64.36
k4	73.42	43.18	44.81	39.02	54.14	49.55
k5	48.48	48.77	59.98	63.95	53.96	49.96
优水平	A3	B3	C1	D1	E3	F3
R	38.70	29.51	23.41	29.46	30.07	14.81

从表3可以看出,各因素对苹果酸降解率影响的主次顺序为A>E>B>D>C>F,番茄汁对苹果酸降解率影响最大,其余依次为缬氨酸/亮氨酸、异亮氨酸/甲硫氨酸、精氨酸/脯氨酸、色氨酸/盐酸半胱氨酸和天门冬氨酸。由表3中可以得出最优组合为 $A_3B_3C_1D_1E_3F_3$ 。在25个处理中,苹果酸降解率最大的组合为 $A_2B_3C_3D_1E_3F_3$ 。两者的差别在于因素番茄汁相差1个水平,差距很小。此外因素C的水平也不同,但C因素对苹果酸降解率的影响较小。但仍需将此两种优选出的配比进行验证试验。

### 2.3 验证试验结果

对两个组合再做一次试验,即验证试验。结果是组合 $A_2B_3C_3D_1E_3F_3$ 的降解苹果酸为2.253g,降解率为

90.12%。而 $A_3B_3C_1D_1E_3F_3$ 降解苹果酸为2.288g,降解率为91.52%。所以应该选择 $A_3B_3C_1D_1E_3F_3$ 为最优组合。

## 3 结论

3.1 酒类酒球菌的营养需求较复杂,对氨基酸的需求很广泛,本试验研究结果表明,番茄汁30%,异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸各0.03g/L,精氨酸、脯氨酸、色氨酸、盐酸半胱氨酸各0.01g/L,硫酸镁0.2g/L,硫酸锰0.05g/L,是促进酒类酒球菌进行苹果酸-乳酸发酵的优良配方。

3.2 番茄汁由于营养成分丰富,而且含酒类酒球菌的一种生长因子4-邻-(D-吡喃葡萄糖酰)-D-泛酸,还含有多种维生素。所以能够很好地促进酒类酒球菌生长和进行苹果酸-乳酸发酵,是酒类酒球菌的一种良好的天然营养剂,将其浓缩冻干成粉状再配以氨基酸等其他营养成分将更有利于制成苹果酸-乳酸发酵助剂,从而能够更好地在生产中推广应用。

### 参考文献:

- [1] 李华.葡萄酒工艺学(第2版)[M].西安:陕西人民出版社,2000.
- [2] 高年发.酒类生产技术丛书,葡萄酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [3] 张春晖,夏双梅,李华.酒类酒球菌分离培养基研究[J].食品科学,2003,24(1):28-30.
- [4] 刘芳.优选酒类酒球菌酿酒特性的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2002.
- [5] 刘树文,李华.固定化31DH进行苹果酸-乳酸发酵的研究[J].中国农学通报,2005,(4):86-88.
- [6] 何少华,文竹青,姜涛.试验设计与数据处理[M].北京:国防科技大学出版社,2002.

\*\*\*\*\*  
(上接第29页)

从图5中可以看出,微观图形中颗粒更加明显,颗粒更大且数量较多。显然这是由添加剂的金属离子和白酒色谱骨架化学成分与水和乙醇形成的大分子聚集体,金属离子也参与了微观颗粒的形成。

## 3 讨论

从微观状态的变化可以判断,白酒色谱骨架化学成分是形成AFM扫描图中微观颗粒的主要因素。单独加入金属离子并不能使AFM扫描图产生微观颗粒,但当金属离子与白酒色谱骨架化学成分一起加入到乙醇水溶液中,金属离子参与了微观颗粒的形成。由此,可以推断,图1中白酒的AFM扫描图中微观状态是由白酒所

含有的金属离子和呈香呈味微量化学成分与水、乙醇共同形成的大分子聚集体,这种聚集则形成溶胶。

由于分子聚集需要一定的时间,而这一过程需要比较长的时间,本研究没有对所出现的微观形态作不同时间的考察。

### 参考文献:

- [1] 庄名扬.中国白酒的溶胶特性及其应用原理与方法[J].酿酒科技,2002,(2):27-30.
- [2] 白春礼.扫描力显微镜[M].北京:科技出版社,2000.
- [3] [美]Qwen R.Fennema著,王璋,等译.食品化学[M].北京:中国轻工业出版社,2003.