

己酸菌固定化与窖泥培养

马加军

(山东名人酒业, 山东 微山 277600)

摘要: 以琼脂为固定化材料,将己酸菌种子包埋固定,制成固定化己酸菌块。大缸培养基中接种量1.5%~2%,将固定化己酸菌块悬挂于己酸菌大缸培养基中,33~35℃培养6 d即成熟。固定化己酸菌细胞繁殖快,己酸产量高,产酸稳定性好,可连续发酵,连续使用5~6个轮次。将固定化己酸菌发酵液用于人工老窖泥的培养,窖泥质量优,曲酒生产第3轮次产的酒,窖香浓郁,总酯、总酸、己酸乙酯接近2~3年老窖酒的水平。(陶然)

关键词: 白酒; 己酸菌固定化; 人工老窖泥; 己酸菌液

中图分类号: TS262.3; TS261.4; TS261.1; Q93-335 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)01-0037-03

Immobilization of Caproic Acid Bacteria and Culture of Pit Mud

MA Jia-jun

(Mingren Liquor Industry, Weishan, Shandong 277600, China)

Abstract: Agar as immobilization materials was used for the immobilization of caproic acid bacteria germ to produce immobilized caproic acid bacteria mass (ICABM). The inoculation quantity in culture medium in jar was 1.5%~2%, then the ICABM was hung in the culture medium, after 6 d culture at 33~35℃, it matured. Immobilized caproic acid bacteria cells propagated rapidly and it had high output of caproic acid and acids produced had excellent stability. Besides, it could be used for continuous fermentation (continuous application for 5~6 times fermentation). The application of the fermentation liquid of immobilized caproic acid in the culture of manmade aged pit mud would produce quality pit mud. The liquor produced by the third turn had dense pit flavor and its total ester content, total acids content and ethyl caproate content were close to the levels of the liquor of 2~3 years storage time. (Tran. by YUE Yang)

Key words: liquor; caproic acid bacteria immobilization; manmade aged pit mud; caproic acid bacteria solution

固定化技术是20世纪60年代发展起来的一项新技术,最初主要研究酶的固定化,集中于各种制备方法研究,后来转向固定化酶工业化应用的研究,并取得许多重要成果。固定化细胞是在固定酶的基础上发展起来的,广泛地应用于发酵工业、化学合成工业。己酸菌是人工老窖微生物的主要来源,过去游离态的己酸菌培养操作繁琐、成本高、易染菌,随着固定化细胞技术(固定化酵母)的成熟及在发酵工业的应用,我们根据己酸菌生理特性将己酸菌种子以固定化材料为载体包埋,形成了具有特点的己酸菌培养路线。

1 己酸菌固定化技术

1.1 固定化材料的选择

常用的包埋剂:海藻酸钠、琼脂、卡拉胶、明胶等。将游离态的己酸菌分别包埋在海藻酸钠、琼脂、卡拉胶、明胶4种载体上进行己酸菌大缸培养,通过对固定化己酸菌己酸生成、己酸菌的活菌数的检测,发现海藻酸钠、琼脂固定己酸菌发酵状态及产酸效果好,另外两种次之,同时又考虑成本等因素,选择了琼脂包埋法固定己酸菌。

1.2 固定液的制备

将普通琼脂1:14~16加水受热融化,成一定浓度的凝胶液,置于一定体积的不锈钢器具中,放在中型蒸汽压力锅内,在0.1 MPa蒸汽压力下,灭菌15~20 min备用。

1.3 己酸菌的固定化

在无菌条件下,种子与趁热(90~95℃)的琼脂固定液均匀混合并置于钢制浅盘中凝固(无菌棒迅速搅拌),混合温度在40~45℃,在20~25℃的温度下静置30~45 min凝块,用酒精浸泡的手术刀将其切成0.2~0.5 cm³琼脂菌块,即为己酸菌固定化。大缸培养基中接种量1.5%~2%(对种子而言),琼脂的使用量为整个固定化液体的2.5%~3.0%(据琼脂质量而定)。

1.4 己酸菌的培养(大缸培养)

1.4.1 培养基的配方

小麦粉1%,高粱粉0.5%,生香酵母0.5%~1.0%,(NH₄)₂SO₄ 0.5%,NaAC 0.3%~0.5%,1:4的香糟浸出液25%~35%,pH6.5~6.8(可用氨水调整),常压煮沸60 min左右,塑料布封口降至35~37℃。

1.4.2 己酸菌的固定化培养

间歇式培养法:固定化菌块装入纱布菌袋扎好,悬挂于己酸菌大缸培养基中,33~35℃培养6~7 d(第一轮由于受琼脂冷热影响,菌体钝化,培养时间8~10 d)。

1.5 己酸菌固定化技术的评定

1.5.1 己酸菌发酵状态跟踪检测

1.5.1.1 产气:10~24 h产气不明显,48 h后产气剧烈并从袋子的周围似波向外辐射,72 h气泡由小到大并有较强己酸气味。

1.5.1.2 发酵温度:己酸菌的繁殖与代谢产生部分热量使液体温度上升,一般升温2~3℃(受气温变化影响)。

收稿日期:2003-05-21;修回日期:2003-07-22

作者简介:马加军(1964-),男,山东人,大专,总工程师,发表论文30余篇,多篇论文获奖。

1.5.1.3 与游离己酸菌相比,固定化细胞繁殖快,己酸产量高,己酸菌数 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml,己酸含量在4.5~5.0 g/L。

1.5.2 固定化细胞己酸菌的特征

1.5.2.1 固定化己酸菌产酸稳定性好,在4℃储存60 d或短暂空气接触产酸活性基本不变。

1.5.2.2 固定化己酸菌的固液界面增加,培养基周围己酸菌的活菌数增多,对抵抗污染的能力增强。

1.5.2.3 连续发酵,连续使用,寿命在5~6个轮次,每次发酵完毕用2.0%~2.5%生理盐水冲洗2~3遍,然后悬于另一培养基中。

2 己酸菌固定化与窖泥培养

2.1 培养窖泥遵守的原则

2.1.1 正确的菌种来源。窖泥功能菌包括己酸菌、甲烷菌、放线菌、丙酸菌、产酯酵母等,菌种的来源广泛,主要“纯种”己酸菌,老窖泥富集自然种、活性污泥、窖皮泥、老窖泥,另外还有黄水、香糟等。窖泥培养实质上以粘土为载体,选择使用营养成分以己酸菌为主体窖泥功能菌的富集及代谢产物的积累。过去,在窖泥培养过程中使用烂苹果、阴沟泥、肠衣水,虽然它们营养丰富,含有多量的窖泥功能菌,但同时带入相当的腐败菌。所以,正确的菌种来源是窖泥培养的先决条件。

2.1.2 优选合理窖泥配方,也就是满足窖泥功能菌营养要求。窖泥配方的设计首先考虑配方中C.N比,然后根据窖泥功能菌生理、生活特性确定加入K、P源以及对腐殖质的需要。己酸菌碳源主要来源于淀粉、NaAC、酒精。氮源来源广泛。有机氮源:豆饼、大曲粉、生香酵母;无机氮:氢铵(氨水)、尿素,另外,功能菌对钾磷有要求,来源于 K_2HPO_4 、骨粉(磷、钙元素丰富),腐殖质是功能菌主要营养物质,主要靠肥土、藕塘泥、窖皮泥、植物的发酵物等提供,合理搭配各种营养成分是窖泥培养的基础。

2.1.3 接近于窖内发酵状态环境(pH、T、 H_2O 、厌氧条件等)

窖泥微生物生活在特定的环境中,同时,又表现出对外部环境的适应性。窖泥微生物(指“纯种”)多数来源于窖泥,经过微生物分离、纯化的复杂过程,微生物性能发生或多或少的变异,培养条件发生微妙的变化,所以,我们在窖泥培养过程中尽可能贴近窖内发酵条件,模拟窖内环境,使老窖微生物逐渐适应环境。通过对老窖窖泥理化成分检测及发酵环境研究,在满足pH、T、 H_2O 厌氧等条件下建立窖内发酵体系。

2.2 窖泥配方的设计

2.2.1 窖泥培养材料及要求

2.2.1.1 菌源:固定化己酸菌发酵液,老窖泥富集复合菌液,另外,还有黄水、香糟、老窖泥、窖皮泥等微生物来源。

窖泥培养就是尽快形成以己酸菌、甲烷菌共栖为主体菌系的老窖模式。

2.2.1.2 发酵载体:黄粘土,粘性好,纯洁干净,持水性好,能持续稳定吸附营养物质,它是人工老窖培养的一种天然的粘合剂。

菜园土、活性污泥或藕塘泥、窖皮泥,营养物质全面,含有大量的有机物质,富集着大量的窖泥功能指示菌。

2.2.1.3 窖泥功能菌营养水平

氮源:有机氮,主要由大曲、豆饼、生香酵母等提供。大曲中含有大量酿酒微生物及代谢产物水解酶类,有机氮主要以小分子结构形式存在,成分相对稳定;豆饼中氮素主要以高分子——蛋白质结构存在,发酵过程中稳定性较差,需要较长时间降解。所以在有机氮源选择上力求多用大曲少用豆饼。

无机氮:尿素、氨水(或氢铵)在窖泥发酵过程中作用快,不持久。

磷(钾)源:窖泥中P的含量主要由其中的速效P反映出来,磷素参与细菌细胞原生质的合成,K素是酶及辅酶的激活剂。老窖泥中速效P的含量1.10~2.80 g/100 g干土,窖龄愈长,含量愈高,与酒质关系密切。人工窖泥K、P素的来源以磷酸盐形式加入,主要是 K_2HPO_4 、 $CaHPO_4$,不用或少用 $CaHPO_4$, Ca^{2+} 的存在与窖泥或糟醅中乳酸的结合是造成窖泥板结与老化的重要因素。

碳源:是窖泥微生物菌系的能量来源,主要由大曲、香糟、酒尾、NaAC、小麦或高粱提供,是窖泥培养基础物质。

腐殖质的来源:腐殖质的含量是窖泥理化分析的一个重要指标,窖龄长、质量好的窖泥腐殖质的含量高。腐殖质是植物经微生物作用形成的低分子物质,是窖泥微生物的主要营养物质。菜园土、藕塘泥、活性污泥、老窖泥、香糟等是腐殖质的重要来源。香醅中含粗蛋白、粗脂肪、无氮浸出物、残余淀粉、多种氨基酸、矿物质,这些均是功能菌微生物细胞组成的基础物质。藕塘泥、活性污泥、老窖泥中腐殖质的含量丰富,并富集着与功能菌共栖的微生物区系,不仅是窖泥微生物营养物质的来源,同样又是功能菌的重要来源之一。

pH调节剂:窖泥功能菌喜于窖内微酸性环境,在窖泥功能菌的培养和驯化过程中,模拟窖内环境,使微生物尽快适应环境条件。因此,需对培养基质进行pH调整。黄水是微生物的全营养剂和基质pH的调节剂,黄水作为固态法白酒生产的副产物,富含营养的同时,又是窖内微生物的来源,黄水质量的优劣是白酒质量的体现,可以说没有黄水就没窖内良好的发酵环境,就没有人工窖泥老熟。

疏松剂:香糟或酒糟,除具有上述作用外,还起着调节基质疏松度的作用。窖泥培养是多菌系的共同发酵,在富集嫌气微生物的同时,还要培养兼气部分微生物,这些微生物的参与为功能菌提供营养因子和协调功能菌生命活动。

2.2.2 窖泥配方设计

黄粘土85%~90%,窖皮泥10%~15%(或腐殖质培养物),或15%~20%藕塘泥、菜园土,大曲粉2.0%~2.5%,豆饼0.5%~1.0%,小麦粉0.5%~1.0%,骨粉0.1%,生香酵母0.5%,优质香糟5%,酒糟5%, K_2HPO_4 0.1%,NaAC 0.5%~0.8%,尿素0.1%,老窖泥富集菌液(培养基营养要求、培养条件、方法同己酸菌)5%,己酸菌培养液5%,黄水(80℃热处理10~15 min)3%~5%,尾酒(30度)1.5%~2.0%。

2.2.3 窖泥培养操作要求

2.2.3.1 和泥操作:将黄粘土曝晒10~15 d,锤式粉碎机粉碎成细小颗粒状,据发酵的体积大小,先将固体即大曲、豆饼、香糟(酒糟)、小麦粉等与发酵载体混合物混合,将料堆先一分为二,再合二为一,翻拌均匀,并拉成面状,随后加入液体材料,浸润3~4 h,待液体浸渍完后,倒堆2次,入和泥机过2遍。要求入池材料油滑、无颗粒状,水分适中(45%~50%)。材料入池要迅速,防止过多接触空气,装料系数90%~95%,表面洒水混封10~15 cm,保持厌氧环境。

入池条件:水分45%~50%,温度25~30℃,pH6.5~6.8,发酵周期35~40 d。

2.2.3.2 发酵管理

2.2.3.2.1 品温变化:24 h升温1.5℃左右,48~96 h品温不断上升,7~10 d可达35~37℃,14~16 d旺盛期已过,品温逐渐下降。

2.2.3.2.2 上涨幅度:48~96 h液面上升5~10 cm,部分封水溢出,7~

10 d后液面变化不大。

2.2.3.2.3 产气情况 24 h开始产气，气泡小，48~72 h产气剧烈并形成大的气泡，边界效应明显，气泡猛烈发出“扑扑”的响声。

2.2.3.2.4 气味变化 48~72 h酒精黄水味明显，96 h后己酸气味明显，随着发酵时间延长，表面散发出浓郁的己酸气味。

2.2.3.2.5 发酵材料颜色的转变 9~10 d材料由黄转灰白色，15~20 d材料颜色加重呈灰色。

3 人工老窖泥质量指标

3.1 感官指标

色：灰乌，光泽、色泽均匀一致。

气味：窖香气味纯正、浓郁、持久。

手感：细腻、柔熟、润湿、质地均匀、松软油滑。

镜检：以梭状、杆菌为主，菌体健壮。

3.2 理化指标 (见表1)

表 1 人工老窖泥理化指标			
项目	指标	项目	指标
H ₂ O(%)	42~45	K(%)	0.09~0.10
pH	6.3~6.5	腐殖质(%)	11.5~12.0
N(mg/100 g)	160~180	己酸菌(×10 ⁴)	860~900
P(mg/kg)	530~580	酵母菌(×10 ⁴)	600~700

4 人工老窖泥使用效果评价

4.1 筑窖

4.1.1 新窖以粘黄土材料夹板夯实，并根据投料量多少确定窖容，挂泥前窖壁四周插进竹签，竹签呈“品”型，并网落麻绳。

4.1.2 根据发酵泥的含水多少，适当补充黄水和尾酒柔熟，挂泥量以每窖 ⑧~10 m³)1.2~1.5 m³为宜。

4.2 固态法酒发酵试验

4.2.1 固态法大曲酒工艺特点：续糟混蒸、高温大曲、“原出原入”、“五粮共酵”、“二高一低”、“双轮增香”、“回酒(糟)发酵”、“长期发酵”。

4.2.2 通过对曲酒生产3个轮次酒质理化、色谱及感官鉴评表明，曲酒质量随着排次增加，各质量指标提高，第三轮次的酒体窖香较浓郁、绵甜、较爽净，总酸、总酯、己酸乙酯近于2~3年的老窖酒水平，己乳比基本协调，见表2。

表 2 理化、色谱分析及感官鉴评结果 (g/L)			
项目	一	二	三
理化分析	总酸	0.6~0.7	0.8~0.9
	总酯	3.5~3.7	4.2~4.5
色谱分析	己酯	1.2~1.3	1.5~1.6
	乳酯	2.0~2.3	2.0~2.1
	乙酯	1.8~2.1	1.5~1.7
	丁酯	0.23~0.25	0.17~0.19
感官鉴评	有窖香、泥臭味，入口醇甜，尾子欠净	有窖香，入口绵甜，较协调，尾子较净	窖香较浓郁，入口甜，尾子较净

注：各轮次酒样均为混合样，数据来自山东孔府宴酒厂检测中心。

总之，己酸菌固定化人工老窖技术遵循了老窖自然成熟的规律，揭开了只有老窖产好酒的秘密，它是现代微生物技术与传统工艺结合的典范，将有利于浓香型白酒技术创新并推动我国白酒行业的发展。

本文承蒙邹海晏老师指导，在此表示感谢。

参考文献：

[1] 周恒刚，徐占成.白酒生产指南[M].北京：中国轻工业出版社，2002.

[2] 沈怡方.关于己酸菌培养及其应用[J].酿酒科技，1998.(4)：15.

国酒茅台迎来双喜

本刊讯 2003 年 12 月 8 日下午，国酒茅台年产万吨暨公司获全国质量管理奖庆祝大会在贵州省省委礼堂举行。至此，45 年前，伟人毛泽东“茅台酒要搞到 1 万吨，要保证质量”的重托，今天终于变成现实。贵州省省委书记、省人大常委会主任钱运录发来贺信，省长石秀诗到会讲话，省政协主席王思齐出席大会。

茅台集团总经理袁仁国宣布：到目前为止，国酒茅台的产量已经突破万吨大关。而在此之前的一周，从北京传来喜讯，茅台公司荣获 2003 年全国质量管理奖，该奖项是我国首次等同采用被全球企业界公认为质量管理“珠峰”的美国“马尔科姆·波多里奇国家质量管理奖”模式标准进行评选的，这意味着国酒茅台已进入或接近了世界先进企业管理水平。

钱运录在贺信中说，欣闻国酒茅台实现了年产万吨目标，并荣获全国质量管理奖，特致信表示热烈祝贺，并向为公司改革发展付出辛勤劳动的新老职工致以亲切的问候！伴随着社会主义建设和改革开放的步伐，茅台酒厂不断成长壮大，为贵州赢得了荣誉，为国家增添了光彩。茅台酒厂的发展，得到了毛泽东、周恩来等几代党和国家领导人的亲切关怀。历届省委、省政府都十分重视茅台酒的发展。在有关方面的大力支持和酒厂全体职工共同努力下，终于实现了万吨目标。茅台酒产量上万吨和全国质量管理奖的获得，表明了公司的发展在“质”和“量”两方面跨上了一个新台阶，也充分说明了国有企业改革和发展的光明前景。

钱运录希望公司领导和全体职工百尺竿头，更进一步，以“三个代表”重要思想为指导，认真贯彻落实党的十六大和十六届三中全会精神，进一步解放思想，实事求是，与时俱进，大力深化改革，切实加强管理，努力开拓市场，不断提高效益，坚持“以人为本、以质求存、恪守诚信、团结拼搏、继承创新”的核心价值观，发扬“爱我茅台、为国争光”的企业精神，把企业做大、做强、做优，保持企业持续快速健康发展，更好地满足广大消费者的需要，为贵州改革开放和经济建设做出新的更大的贡献。

石秀诗在讲话中说，茅台酒是中国的国酒，同时也是贵州人民的骄傲。经过几代茅台人的艰苦努力，茅台集团终于实现了毛泽东同志生前提出的“茅台酒要搞 1 万吨”的夙愿。这一成绩的取得，凝聚了历届中央领导人的亲切关怀，凝聚了国家有关部门的关心和支持，凝聚了历届省委、省政府、各级领导、全省各族人民的关怀和支持，凝聚了茅台集团广大干部职工的智慧和心血，标志着茅台事业的发展进入了一个新的阶段。他要求茅台集团要确保产品质量，进一步强化质量管理；保护周边环境，搞好市场营销，坚持以市场为中心、以顾客为中心、以服务为中心，同时加大对制假售假的打击力度；发挥龙头作用，在带动全省白酒行业加快发展和促进周边农民脱贫致富方面发挥更大的作用。

1978 年茅台酒的产量首次超千吨；改革开放，为茅台酒厂的腾飞创造了前提条件，1992 年，茅台酒产量终于突破 2000 吨；1997 年以后，茅台集团全面由计划体制投身市场经济海洋，在连续 5 年实现跳跃式发展的同时，产量也节节上升；2000 年，茅台集团启动了新万吨工程。茅台在扩大产量的同时，始终把质量放在首位，在质量与速度、效益、产量发生矛盾时始终服从于质量。

茅台集团党委书记、董事长季克良说，茅台酒一万吨的发展历史是企业大发展、机制大转换、改革大深化、品牌大扩张的过程。现在，企业总资产和经济效益分别是建厂之初的 50 万倍；企业机制从工厂制到公司制，从国有独资公司到股份制，企业经营机制不断改进和创新，保持了企业机体的活力，带来一个又一个的发展机遇，形成集酱香酒、浓香酒、保健酒、红酒、啤酒于一体的大型综合性酒业集团，并开始涉足高科技领域。（赵拴，江砂）