

窖泥中己酸菌的分离纯化及产酸的初步研究

曹文涛, 廖忠明

(贵州工业大学轻工系, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 从湄潭酒厂老窖泥中分离出一株己酸菌, 经初步鉴定与克鲁氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium kluyveri*) 的特性有所不同, 暂将其定为 MD 菌。经对 MD 菌株产酸条件的初步研究, 证实该菌属于兼气性厌氧菌, 有较好的产酸能力。

关键词: 浓香型白酒; 窖泥; 己酸菌; 分离

中图分类号: TS262. 31; Q93- 331 文献标识码: B

文章编号: 1001- 9286(2001) 04- 0042- 02

Study on Separation & Purification and Acid- production of Hexanoate Bacteria in Pit Mud

CAO Wen- tao and LIAO Zhong- ming

(Light Industry Department of Guizhou Industrial University, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: New hexanoate bacterial strain, separated from aged pit mud in Meitan Distillery, the properties of which are different from that of *Clostridium kluyveri* by preliminary identification, it was named MD strain temporarily. And the study on acid- production conditions of MD strain has proved that it belongs to anaerobe species and it has good acid- production power. (Tian. by YUE Yang)

Key words: Luzhou- flavour liquor; pit mud; hexanoate bacteria; separation

0 前言

己酸菌是白酒生产中非常重要的产酸微生物, 由它代谢产生的己酸与发酵产生的酒精生成己酸乙酯, 是浓香型大曲酒的主要香气成分。己酸菌还可应用于液态发酵法白酒, 培养人工老窖, 淋窖或灌窖以提高酒质^[1]。现从微生物学方面, 对己酸菌的形态特征和生理特征做初步的研究, 以期对生产上有一定的参考指导作用。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集自贵州湄潭酒厂车间老窖泥。

1.1.2 集富培养基^[1]: 乙醇 20ml(灭菌后, 接种前添加), 乙酸钠 5g, 硫酸铵 0.5g, 磷酸氢二钾 0.4g, 硫酸镁 0.2g, 酵母膏 1.0g, 碳酸钾 10.0g(灭菌后, 接种前加), 水 1000ml, 调节 pH 值 7.2 左右。

1.1.3 分离培养基: 在富集培养基中增加 2% 的琼脂作固体培养基进行分离培养。

1.2 实验仪器

电热恒温培育箱; 恒温水浴锅; 洁净工作台; 电冰箱; 高压蒸汽灭菌锅(用于培养基的灭菌); 气相色谱仪(测定己酸); 酸度计(测定氧化还原电位和 pH 值)。

1.3 实验方法

首先将样品进行集富培养, 获得一定数量的优势菌株, 80℃、30min 加热处理淘汰非芽孢菌及营养体细胞; 用厌氧培养平板和涂布法进行纯种分离, 再结合划线法进行多次反复的分离纯化。菌株的纯化与发酵产物己酸的测定同时进行。最后, 菌株经过多次平板分离得到单个纯种菌落, 在光学显微镜下作形态观察。采

用革兰氏染色法检查为 G- 菌后, 再作鉴定。

2 结果分析

2.1 MD 菌株的形态特征

2.1.1 形态特征: 细胞呈杆状, 大小(0.57~ 0.92) $\mu\text{m} \times 4.8 \mu\text{m} \times 7.3 \mu\text{m}$; 芽孢椭圆形, 大小 1.4 $\mu\text{m} \times 1.6 \mu\text{m}$, 顶端生, 使芽孢囊膨大成鼓槌状。革兰氏染色为阴性, 淀粉粒阳性, 周生鞭毛。

2.1.2 菌落特征: 菌落圆形或椭圆形, 乳白色、光滑粘稠、平坦、不透明, 边缘较整齐。在固体培养基上培养 48h, 菌落直径达 1.5~ 2.0mm。

2.2 生理生化特征

兼性厌氧菌, 能发酵酒精和乙酸盐, 产生己酸。不利用果糖、核糖及纤维二糖, 不能分解碳水化合物及氨基酸。不水解明胶, 不能凝固和胨化牛奶, VP 及甲基红试验呈阴性, 不产生吲哚, 硫化氢生成试验为阳性, 硝酸盐还原试验为阴性。

2.3 MD 菌株产酸条件的研究

2.3.1 己酸菌 MD 的生长和己酸发酵试验

将 MD 菌株分别进行深层液态培养和抽真空培养, 都能满足其生长, 经定性测定其结果, 能较好地地产己酸。

以接种量分别为 10%、5% 的 10L 血清瓶和 100 ml 厌氧瓶进行己酸发酵。产酸曲线以 A、B 分别代表, 结果如表 1 和图 1。从图 1 的产酸曲线分析来看, 接种量为 5% 的 B 曲线, 由于接种量少, 己酸量出现的最高峰比 A 曲线晚了 3 天, 并且产己酸的量也有所降低。接种量为 10% 的 A 曲线产己酸的最高峰在第 12 天, 且产己酸量比接种量为 5% 的 B 曲线高。由此说明在 MD 菌株的己酸发酵中接种量大, 有利于提前产酸, 并且产酸量也大。

收稿日期: 2001- 03- 19

作者简介: 曹文涛(1967-), 男, 湖南人, 大学本科, 讲师, 从事微生物学教学与科学实验研究工作, 参加省级科研项目 3 项, 发表论文数篇。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表1 MD菌株不同接种量的己酸发酵结果 ($\times 10^{-6}$)

| 发酵时间 (天) | 接种量 | | 发酵时间 (天) | 接种量 | |
|-------------|--------|-------|-------------|--------|-------|
| | A(10%) | B(5%) | | A(10%) | B(5%) |
| 1 | 631 | 397 | 9 | 8993 | 3514 |
| 2 | 1841 | 525 | 10 | 9286 | 4260 |
| 3 | 4735 | 690 | 11 | 9611 | 4927 |
| 4 | 6955 | 1004 | 12 | 9842 | 5581 |
| 5 | 7274 | 1240 | 13 | 7562 | 6323 |
| 6 | 7837 | 1395 | 14 | 5337 | 6924 |
| 7 | 8100 | 1883 | 15 | 4680 | 7198 |
| 8 | 8651 | 2750 | 16 | 4139 | 6413 |

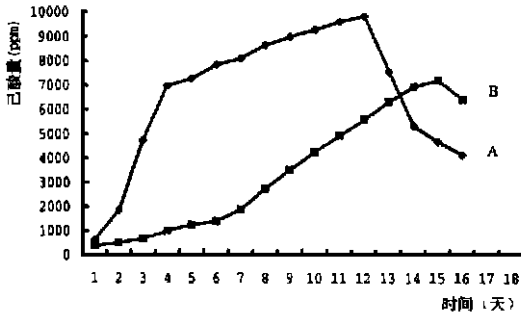


图1 MD菌株己酸发酵曲线

2.3.2 对MD菌株发酵过程中氧化还原电位及pH值的测定
在10L血清瓶的连续发酵过程中,每天测定一次发酵液的氧化还原电位和pH值,结果见图2和图3。

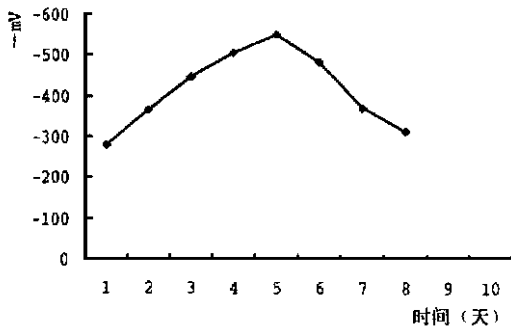


图2 氧化还原电位的测定

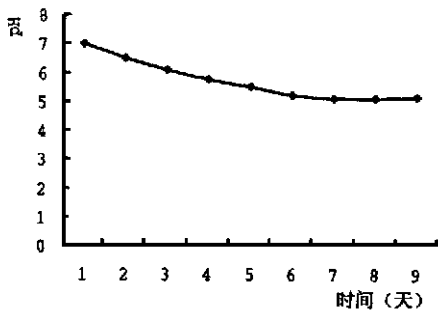


图3 pH值的测定

从图2看出,MD菌株发酵到第5天时氧化还原电位最低,为 $-5.3 \times 100\text{mv}$ 。从图3看出,发酵到第8天时,pH值最低为5.63,以后不再下降。

2.3.3 温度及pH值对产酸情况的影响

本试验采用 $17 \times 170\text{mm}$ 的厌氧管进行,温度控制在 $20 \sim$

50°C 之间,间隔单位 5°C ,进行恒温培养,结果如图4。从图4看出,MD菌株在 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ 范围内都可产酸,而产酸差异大,最适温度为 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 。再控制温度在 $30 \sim 35^\circ\text{C}$,间隔单位为 1°C 进行恒温培养,结果表明,最适产酸温度为 32°C 。

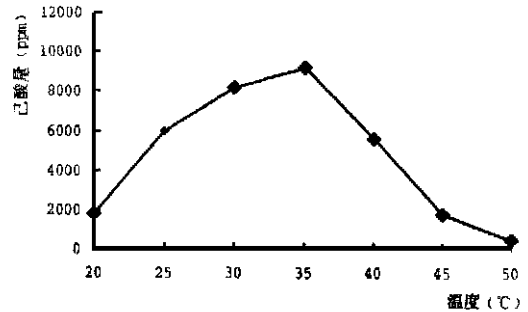


图4 温度对菌株产己酸的影响

pH值试验范围4.5~8.5,间隔0.5个单位,结果如图5,可知MD菌株最适产酸值7.2左右。

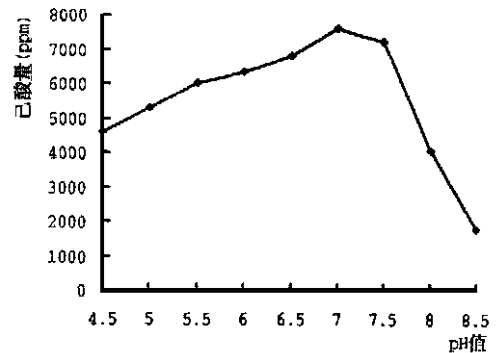


图5 pH对MD菌株产己酸的影响

2.4 MD菌株对基质的利用情况

2.4.1 主要基质乙醇、乙酸钠对菌株产酸的影响

通过单加乙醇,单加乙酸钠,乙醇和乙酸钠都加3组产酸情况的结果得表2。

表2 乙醇、乙酸钠对MD菌株产酸的影响

| 主要基质 | | 乙酸钠量($\times 10^{-6}$) | |
|------|---|--------------------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| 乙醇 | 有 | 1187.0 | 1603.0 |
| 乙酸钠 | 无 | 995.0 | 1224.0 |
| 乙醇 | 有 | 9834.0 | 9512.0 |
| 乙酸钠 | 有 | | |

从表2看出,MD的生产和产酸离不开乙醇和乙酸钠,两者缺一不可。

2.4.2 乙醇、乙酸钠的不同用量对菌株产己酸的影响

本试验采用1.0%、2.0%、3.0%的乙醇和1.0%、2.0%、3.0%的乙酸钠,结果见表3。

从表3看出,当乙醇和乙酸钠的浓度都为2.0%时,产己酸情况最好。

3 讨论

(下转第41页)

表3 植酸添加量处理的不同酒度西凤酒色谱分析结果 (mg/100ml)

| 酒样 | 植酸添加量 (%) | 乙醛 | 甲醇 | 乙酸乙酯 | 正丙醇 | 仲丁醇 | 乙缩醛 | 异丁醇 | 正丁醇 | 丁酸乙酯 | 异戊醇 | 乳酸乙酯 | 己酸乙酯 | 正己醇 |
|------|-----------|------|----|-------|------|-----|-----|------|------|------|------|-------|-------|-----|
| 1# 样 | 空白 | 35.2 | / | 116.1 | 28.3 | 5.1 | / | 24.8 | 21.6 | 3.2 | 33.4 | 144.2 | 48.2 | 3.6 |
| | 0.10 | 34.4 | / | 115.6 | 28.6 | 4.9 | / | 25.7 | 23.0 | 4.0 | 36.5 | 161.2 | 43.5 | 1.9 |
| | 0.15 | 30.1 | / | 121.3 | 30.1 | 5.2 | / | 25.5 | 22.2 | 3.3 | 35.4 | 154.1 | 43.5 | 2.2 |
| | 0.20 | 32.8 | / | 107.1 | 25.8 | 4.4 | / | 23.1 | 20.5 | 3.2 | 31.5 | 133.1 | 36.5 | 1.9 |
| | 0.25 | 34.2 | / | 115.3 | 27.0 | 4.3 | / | 23.9 | 21.0 | 3.3 | 33.0 | 138.8 | 47.1 | 3.2 |
| | 0.30 | 34.1 | / | 110.5 | 27.1 | 4.4 | / | 23.4 | 20.4 | 3.4 | 32.4 | 140.4 | 46.0 | 1.7 |
| 2# 样 | 空白 | 26.1 | / | 130.8 | 27.8 | 4.1 | / | 10.2 | 11.9 | 8.7 | 31.9 | 148.6 | 130.8 | 0.9 |
| | 0.10 | 33.3 | / | 161.1 | 36.2 | 5.7 | / | 22.3 | 14.6 | 10.1 | 38.3 | 176.3 | 155.8 | 1.2 |
| | 0.15 | 29.1 | / | 135.9 | 29.9 | 4.1 | / | 18.0 | 10.9 | 8.3 | 28.5 | 157.4 | 146.3 | 1.4 |
| | 0.20 | 24.8 | / | 131.5 | 24.8 | 3.6 | / | 14.9 | 9.5 | 7.0 | 22.8 | 135.2 | 120.5 | 1.3 |
| | 0.25 | 28.2 | / | 135.9 | 30.5 | 4.8 | / | 11.4 | 13.3 | 7.3 | 29.0 | 156.5 | 129.5 | 1.0 |
| | 0.30 | 20.0 | / | 125.6 | 27.6 | 4.4 | / | 18.0 | 12.6 | 9.0 | 30.2 | 196.3 | 139.2 | 2.9 |

在植酸添加量为0.25%时,1#和2#酒中固形物含量均降低至最低点。用1%活性炭处理的2#酒,固形物含量由0.564g/L降至0.250g/L,降幅为55.7%;而未用活性炭处理的1#酒,固形物含量由0.568g/L降至0.295g/L,降幅为48.1%。这说明用活性炭处理有利于提高酒中固形物含量的降低幅度。另外,植酸添加量为0.20%时,1#和2#酒中固形物含量分别为0.302g/L和0.294g/L,相差不多。从大生产中植酸添加量应尽量少用这一原则,可以考虑不用活性炭处理而直接用植酸处理,但还需对酒体稳定性作进一步实验。

1.1.3 取55度西凤酒(1#)和45度西凤酒(2#)做植酸添加实验。对酒体进行理化分析,结果分别见表3和表4。

表4 不同植酸添加量西凤酒的总酯和总酸测定结果 (g/L)

| 植酸添加量 (%) | 1# 样 | | 2# 样 | |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | 总酸 | 总酯 | 总酸 | 总酯 |
| 空白 | 0.4752 | 2.3577 | 0.6508 | 3.2818 |
| 0.10 | 0.6198 | 2.3349 | 0.7902 | 3.2098 |
| 0.15 | 0.6740 | 2.3501 | 0.8522 | 3.2250 |
| 0.20 | 0.7541 | 2.3539 | 0.8935 | 3.2253 |
| 0.25 | 0.7850 | 2.3577 | 0.9529 | 3.2629 |
| 0.30 | 0.8315 | 2.3614 | 1.0226 | 3.2364 |

由上述分析结果看,添加植酸对白酒的总酯含量没有影响,总酯及四大酯含量相对较稳定。而总酸则随植酸添加量的增大而增大。通过对添加植酸后的白酒感官品评发现,添加植酸后,酒体相对柔和、平顺,香味谐调,余味长。

1.1.4 冷冻实验:取未用植酸处理的45度西凤酒,加入不同量的活性炭摇匀,放置两天后过滤,作冷冻实验,结果见表5。

表5 不同活性炭添加量对酒体冷冻实验结果

| 温度 (°C) | 活性炭添加量 (%) | | | | | | |
|---------|------------|------|------|------|------|------|------|
| | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 0 |
| 5 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| 0 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -5 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -10 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -15 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -20 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -22 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 |
| -25 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 稍微失光 |
| -27 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 失光 |
| -30 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 清亮透明 | 失光 |

通过冷冻实验可以看出,对于中低度西凤酒来说,仅用植酸进行除浊处理还不够,它不能彻底除浊,保证酒体稳定,应与0.1%的活性炭同时使用。

2 讨论

通过以上实验分析,可得出以下结论:

- 植酸在西凤白酒中的添加量应小于或等于0.4‰,超过这个量会直接影响酒体外观。
- 要使白酒中固形物降至最低点,固形物含量不同,植酸添加量也不同,且植酸添加量随酒中固形物含量增大而增大。
- 植酸对白酒来说,其本身就是一种固形物,其添加量过量时,植酸就会留在酒中,给白酒带入新的固形物,使酒内固形物含量增大,因而在使用植酸时应采用尽量少用的原则。
- 添加植酸对白酒总酯含量无较大影响,但可以增大总酸含量,使酒体口感相对柔和、平顺,香味谐调,余味延长。
- 对中低度白酒来说,只用植酸进行除浊和降低固形物还是有一些问题,应用少量活性炭同植酸混合使用为宜。●

(上接第43页)

表3 不同基质用量的己酸产量 (×10⁻⁶)

| 乙醇 (%) | 乙酸钠 (%) | 产己酸量 | | | |
|--------|---------|--------|---------|------|------|
| | | 乙醇 (%) | 乙酸钠 (%) | 产己酸量 | 产己酸量 |
| 1 | 1 | 5861 | 2 | 3 | 7014 |
| 1 | 2 | 7439 | 3 | 1 | 6725 |
| 1 | 3 | 7106 | 3 | 2 | 7291 |
| 2 | 1 | 8033 | 3 | 3 | 5417 |
| 2 | 2 | 9727 | | | |

3.1 由于时间有限没能进行大型发酵罐试验和生产性能的测

定,可能存在实际的不稳定性,有待今后进一步试验确定。

3.2 重要基质对MD菌株产酸影响的试验不够,如对氮源的要求,酵母膏及无机盐的影响等,仍需再试验测定。

3.3 从MD菌株产己酸情况看,效果并不理想,还应对不同酒厂的窖泥再进行分离、纯化、测试,有必要可对产己酸菌株进行诱变选育,从中获取高产稳定的生产菌株。

参考文献

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.