

特香型酒糟醅及大曲中丙酸产生菌的筛选

吴生文, 曾伟, 黄小晖, 曾婷婷, 肖美兰

(四特酒有限责任公司, 江西樟树 331200)

摘要: 采用常规和燃烧厌氧法分离大曲和窖池中的丙酸产生菌。结果表明, 两种方法均能分离到产丙酸的细菌; 上层糟醅中丙酸乙酯的含量较中下层要高。从上层糟醅及大曲中分离得到的产丙酸细菌较为理想, 产丙酸比较集中, 其中产丙酸量最高的菌株为 2 号, 产量为 0.063 g/L。

关键词: 微生物; 特香型酒; 丙酸; 糟醅; 大曲

中图分类号: Q93-3; TS262.3; TS261.1

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2009)12-0058-04

Separation of Propionic Acid-producing Bacteria from Site Fermented Grains and Daqu

WU Sheng-wen, ZENG Wei, HUANG Xiao-hui, ZENG Ting-ting and XIAO Mei-lan

(Site Liquor Co. Ltd., Zhangshu, Jiangxi 331200, China)

Abstract: Propionic acid-producing bacteria was separated from Site Daqu and pits by combustion anaerobic method and conventional method. The results indicated that propionic acid-producing bacteria could be separated by both the two methods. The content of ethyl propionate in upper layer fermented grains was higher than that in medium and low layer fermented grains. Accordingly, propionic acid-producing bacteria was easily separated from upper layer fermented grains and Daqu because it mainly concentrated in upper layer. Among all the separated bacteria strains, No. 2 strain had the highest propionic acid yield (0.063 g/L).

Key words: microbe; Site liquor; propionic acid; fermented grains; Daqu

特香型酒酿造的关键就在于酿造过程中相关微生物的种类和数量, 随着人们对酿酒微生物研究的深入, 酿造过程中的主要微生物正在逐步被人们揭示^[1-4]。产丙酸菌代谢产生的丙酸与乙醇酯化合成的丙酸乙酯对特香型酒风格风味有着非常重要的作用^[5]。因此, 加大对特香型酒酿造过程中丙酸菌的筛选, 提高丙酸乙酯的含量对提高特香型酒的质量有着非常重要的影响。

本文从大曲及窖池中分别取样, 采用常规平板分离及燃烧法耗氧形成的厌氧平板法, 3 种不同的培养基来分离相关微生物, 并进行相关产物分析, 供后续研究使用。

1 材料与方法

1.1 材料

大曲: 取储存 3 个月、曲香浓郁、断层整齐的曲块粉碎后过筛, 备用。

糟醅: 采用 4 点法取样, 分别取发酵时间为 2 d、5 d、9 d、14 d 和 20 d 的糟醅各 1 份, 然后等份混合, 备用。

分离培养基: MRS 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、丙

酸菌合成培养基。

种子培养基: 乳酸钠 2%, 酵母膏 0.5%, 磷酸氢二钠 0.1%, 葡萄糖 2%, 硫酸镁 0.04%, 甘油 0.1%, 琼脂为 1.5%~2%, pH6.8~7, 于 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 乳酸钠 2%, 酵母膏 0.5%, 磷酸氢二钠 0.1%, 葡萄糖 1%, 硫酸镁 0.04%, 甘油 0.1%, 琼脂为 1.5%~2%, pH6.8~7, 于 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 丙酸菌分离

1.2.1.1 分离方法^[6]

采用平板稀释分离法, 即将被检测样品分别称取 1 g, 在无菌条件下转移到 99 mL 带玻璃珠的无菌水中浸泡 20 min 后于 200 r/min 转速下振荡 30 min, 然后无菌条件下取上清液 1 mL, 注入装有 9 mL 无菌水的试管中, 用上述方法稀释直到 10⁻⁶。再将所需浓度的样品涂布于备用平板上。每个稀释梯度做 6 个重复, 每个样品做 3 个稀释梯度。

1.2.1.2 培养方法

将上述涂布好的平板, 于以下 2 种培养条件下进行

收稿日期: 2009-08-27

作者简介: 吴生文(1965-), 男, 山西人, 硕士, 副总经理, 主要从事研究健康食品及酒类产品的生产技术、新产品开发。

表1 大曲和糟醅中细菌的数量

样品	培养基	不同稀释度的平均菌落数				菌落总数(cfu/g)
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
大曲	牛肉膏蛋白胨	无法计数	20、30	1、0、0	--	1.5×10 ⁵
	MRS培养基	无法计数	2、10、12	--	--	8.0×10 ⁴
	丙酸菌培养基	134、39、108	13、24、5	1、0、0	--	9.3×10 ⁴
	牛肉膏蛋白胨	无法计数	125、124、38	12、45、34	3、4、10	3.03×10 ⁶
	MRS培养基	无法计数	85、91、137	8、12、9	1、2、0	9.7×10 ⁵
	丙酸菌培养基	无法计数	52、12、46	8、9、14	1、0、1	3.7×10 ⁵

注：“-”表示无生长迹象。

倒置培养。

常规培养:将平板于35℃培养48h。

厌氧培养法:采用蜡烛燃烧法好氧,用凡士林将表面密封,即先将酒精灯置于干燥器底部,中间放一层隔板,然后将平板放于隔板上,再将酒精灯点燃,加上涂有凡士林的盖子,待酒精灯熄灭后,即形成无氧环境,最后将干燥器放置于培养箱即可。

1.2.1.3 纯化方法

把分离的细菌经镜检后用划线法,进一步纯化。

1.2.1.4 发酵方法

先将菌种活化备用,取1环培养物于种子培养基中于30℃、150 r/min培养20h,再按3%的接种量接种到发酵培养基中,于30℃、150 r/min培养6d。

1.2.2 样品分析

样品前处理:将培养液于10000 r/min的转速下离心20 min,再用0.22 μm孔径的水相微孔滤膜进行真空抽滤,备用。

样品测定:采用气相色谱(HP5890)程序升温,CP-WAX57CB(0.32 mm×0.25 mm×50 m)柱方法分析。

2 结果与分析

2.1 稀释浓度的确定

在大曲和发酵糟醅中的细菌数量不一,为了得到更好的分离效果,在分离前有必要对2个样品中的细菌数量做一个定性分析。该实验中使用的分离培养基为丙酸菌合成培养基,结果见表1。

由表1可看出,在该培养条件下,大曲中细菌的数量大致在10⁵ cfu/g左右,而糟醅中相对较多一些,为10⁶ cfu/g。因此,以下实验中大曲细菌的分离采用稀释度为10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶,糟醅中细菌的分离稀释度为采用10⁻⁵、10⁻⁶和10⁻⁷。

2.2 取样的范围确定

由于窖池的上部、中部和下部在氧气、酸度等环境上有很大差别,丙酸菌在各部分的分布可能也有很大的差异。现从试验窖池的不同部分取样,测定其中丙酸乙酯的含量,以推测其中丙酸菌的分布,结果见表2。

表2 窖池不同位置糟醅的丙酸乙酯的含量

位置	丙酸乙酯的含量(g/L)
上部(离窖面40~60 cm)	43
中部(离窖面60~110 cm)	16
下部(离窖面110~160 cm)	5

表2结果显示,上层糟醅中丙酸乙酯的含量较中下层要高得多,可能是生成丙酸乙酯的相关微生物在上层糟醅中更为活跃。因此,下面实验将选择上层糟醅并同大曲作为微生物样本来源。

2.3 丙酸菌的分离

丙酸菌发酵是一个古老的工艺,它起始于奶酪和干酪的制作过程,在发酵过程中,丙酸菌起到产酸和生香的作用;丙酸菌还可以用来生产VB₁₂、细菌素、益生菌等,因此在饲料行业中很早就有研究,且形态多样。但在白酒中对丙酸菌的研究很少,且多为黄色、有皱褶,产膜或不产膜,较为单一,为了尽可能少遗漏其他产丙酸的菌株,本次试验采用3种不同的培养基,2种不同的培养方法。培养结果见表3。

表3 不同培养条件下的菌落形态

培养方式	形态类别	菌落形态
常规培养	1	乳白色,近圆形,中心稍凹陷,有的呈同心环,干燥有皱褶
	2	微黄色,近圆形,湿润有光泽,较透明
	3	类白色,菌丝体状,边缘多枝状,干燥不透明
	4	微黄色,圆形,湿润,菌落表面不平整,不透明
	5	灰白色,表面颗粒状,中心皱褶,干燥,边缘波形
	6	无色,透明,菌落很小,有突起
	7	扁平且大,有菌膜,菌膜白色,易挑起
	1	蜡黄色,奶油状,大而突起,湿润,不透明
	2	大而扁平,暗黄色,较难挑起,不透明,有菌膜
	3	类白色,菌丝体状,边缘多枝状,干燥不透明
	4	小而突起,圆形,表面色泽不均匀,中间白,其余暗黄色,较湿润,不透明

从表3中的每个形态各异的菌类中选取若干菌株种,总共选出71株菌种,斜面转接并用甘油管保藏,备用。

2.4 菌种发酵产物测定

表4 不同菌株的产酸情况

(g/L)

菌株号	乙酸	丙酸	丁酸	己酸	菌株号	乙酸	丙酸	丁酸	己酸
1	0.0226	0.038	0.01	0	37	0.032	0	0.085	0.01
2	0.063	0.064	0.034	0.001	38	0.0323	0	0.00866	0.037
3	0.013	0.025	0.04	0.089	39	0.0396	0.0086	0.0045	0.0022
4	0.0212	0	0.013	0.012	40	0.0823	0	0.0257	0.0126
5	0.019	0.024	0.014	0.02	41	0.0131	0.0089	0.095	0
6	0.068	0.056	0.02	0	42	0.076	0	0.056	0.006
7	0.061	0.003	0.014	0.078	43	0.092	0	0.0183	0.0128
8	0.163	0.01	0.024	0.05	44	0.0296	0.053	0.0507	0.0179
9	0.035	0.032	0.026	0	45	0.07	0.0192	0.0225	0.00538
10	0.012	0.047	0.024	0.075	46	0.06	0	0.097	0
11	0.173	0.03	0.023	0	47	0.09	0.0138	0.076	0
12	0.027	0.038	0.03	0	48	0.072	0.00385	0.142	0
13	0.045	0.043	0.03	0	49	0.771	0.006	1.562	0
14	0.132	0.01	0.023	0.063	50	0.0771	0.0176	0.04	0
15	0.174	0.06	0.03	0.068	51	0.0289	0.042	0.0223	0.0099
16	0.037	0.003	0.031	0.13	52	0.0283	0.0382	0.0257	0
17	0.008	0.032	0.025	0	53	0	0	0	0
18	0.009	0.022	0.024	0	54	0.0213	0.035	0.0223	0
19	0.222	0.051	0.012	0.049	55	0.085	0.0173	0.0282	0.001
20	0.05	0.019	0.014	0	56	0.0308	0.0378	0.0288	0.0009
21	0.006	0.035	0.037	0	57	0.0261	0.0108	0.027	0.00188
22	0.012	0.047	0.038	0.005	58	0.0112	0	0.0741	0
23	0.019	0.025	0.032	0	59	0.0239	0.038	0.032	0.018
24	0.122	0.018	0.028	0	60	0.098	0	0.0489	0
25	0.112	0.023	0.021	0	61	0.047	0	0.0459	0
26	0.0242	0.017	0.0597	0	62	0.0186	0.0256	0.0347	0.014
27	0.01999	0	0.084	0	63	0.0371	0.046	0.0245	0.0165
28	0.0242	0.0145	0.055	0	64	0.093	0.0164	0.042	0
29	0.0784	0.0118	0.066	0.0038	65	0.0282	0.0195	0.0248	0.00789
30	0.0112	0.042	0.066	0	66	0.0135	0.0185	0.0336	0.002
31	0.0378	0.0246	0.053	0.003	67	0.033	0.0397	0.0287	0.0113
32	0.0327	0.0156	0.062	0.0014	68	0.027	0.045	0.0369	0.0152
33	0.0391	0.0228	0.0573	0.0015	69	0.028	0.044	0.0306	0.013
34	0.0351	0	0.049	0.00227	70	0.093	0.023	0.0405	0
35	0.0318	0	0.04	0.0005	71	0.025	0.021	0	0.081
36	0.0332	0.0252	0.0204	0.084					

将上述菌种培养过夜活化,然后取1环培养物接种液体种子培养基,16 h后,按3%的接种量接到发酵培养基中,7 d后测定发酵产物中的主要酸,先将部分结果列于表4中。

由表4的测定结果可知,各菌株的产酸情况不一,多数均产乙酸和己酸,产丙酸和丁酸的也较多,但产量不一样。其中,产丙酸最高的为2号菌株,含量为0.063 g/L;产丁酸最高的为49号菌株,含量为1.561 g/L;产己酸量最高的为36号菌株,含量为0.0844 g/L。2号、36号、49号菌株及对照的产酸色谱图见图1。

3 讨论

3.1 产丙酸的菌株有严格厌氧的,也有兼性厌氧的,以丙酸乙酯为特征成分的特香型酒生产中丙酸菌究竟是严格厌氧还是兼性厌氧,一直是个未解之谜。从实验结果可

知,采用常规及厌氧方法均能筛选出产丙酸的菌株,推测特香型酒生产过程中产丙酸的菌应为兼性厌氧菌。

3.2 测定窖池中不同部分糟醅中丙酸乙酯的含量来推测丙酸菌的分布,结果显示,上层糟醅中的丙酸乙酯的含量较其他部分要高出很多,说明上层糟醅中生成的丙酸乙酯含量更多或其他的作用下中层糟醅中的转移到上层中,如果前者成立,则说明生成丙酸乙酯的相关微生物在上层糟醅中更为活跃。因此,从上层糟醅中分离丙酸菌成功的可能性较大。

3.3 采用气相色谱法测定样品中各物质的含量是根据各物质的不同保留时间,有时因基线漂移或其他因素的影响在丙酸乙酯的保留时间附近出现波峰时,对于其定性有较大的难度,因此为了不遗漏有价值的菌株,应将疑是菌株同时作为后续实验材料。

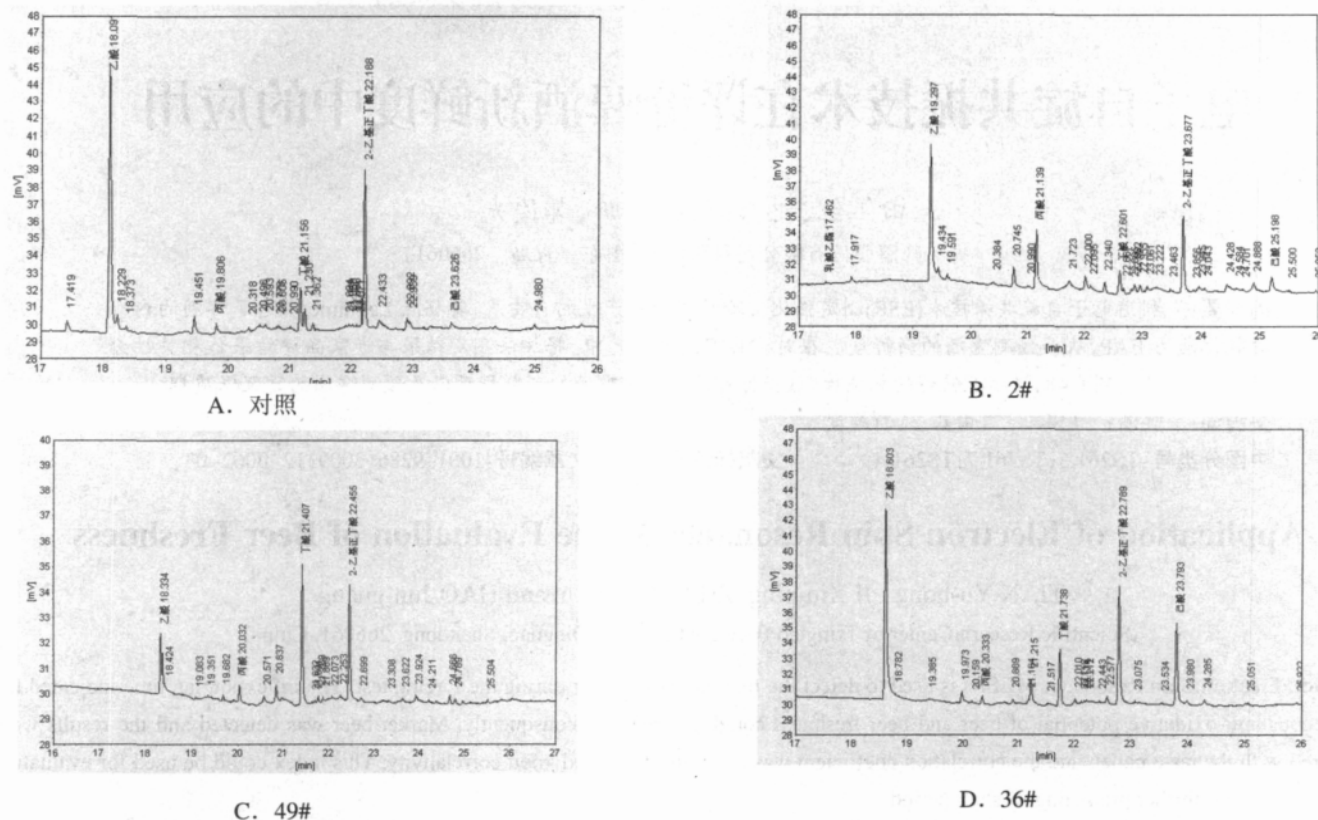


图1 2号、36号、49号菌株的产酸色谱图

3.4 白酒中丙酸乙酯的合成途径一直是一个较为模糊的理论。由于白酒生产发酵是一个多菌种、多酶系的复杂体系,因此对其中的机制的研究显得较为困难,从菌种入手,同时测定发酵产物来反推其代谢途径不失为一捷径。丙酸乙酯是否和己酸乙酯有相似的合成途径,是由丙酸和乙醇酯化后生成丙酸乙酯,随着后续实验的不断深入,相信将会有一个越来越清晰的认识。

参考文献:

[1] 乔宗伟,张文学,张丽莺,等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的

微生物区系分析[J].酿酒,2005,32(1):18-22.

- [2] 罗志腾.大曲发酵酒醅微生物区系的初步研究[J].微生物学通报,1986,(2):59-60.
- [3] 熊昌绪.浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物消长物质变化的研究[J].酿酒科技,1994,(2):25-27.
- [4] 唐玉明,任道群,姚万春,等.酱香型酒糟醅堆积过程温度和微生物区系变化及其规律性[J].酿酒科技,2007,(5):54-58.
- [5] 廖昶.特香型白酒勾兑浅议[J].酿酒科技,2004,(2):44-46.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验(第三版)[M].北京:高教出版社,1999.
- [7] 黄秀梨.微生物学[M].北京:高等教育出版社,1999.

泸州老窖高管到湖北枝江酒业参观交流

本刊讯 2009年11月22日,泸州老窖股份有限公司党委书记王吉蓉带领该公司高管一行20多人莅临湖北枝江酒业股份有限公司参观交流。泸州老窖同行们了解了湖北枝江酒业的历史文化,在湖北枝江酒业党委书记张华、总经理办公室主任蔡兵、工会主席杨家法的陪同下,参观了湖北枝江酒业现代化的灌装包装中心、勾储车间、酿造车间、制曲车间。湖北枝江酒业的曲香、糟香、酒香给他们留下了美好的印象,湖北枝江酒业现代化的高速生产运行、高标准的质量安全控制,以及规范的、人性化的管理及设施,赢得了泸州酒业同仁们的由衷赞誉。

座谈会上,泸州老窖的王书记说,枝江与泸州共饮一江之水,同样拥有悠久的历史,在历史的发展过程中也有很多惊人的相似之处。多年来,两家企业如兄弟一般,一直保持着友好的交流。湖北枝江酒业的高速稳健成长,我们非常高兴,希望枝江与泸州携手起来,共同担起历史赋予大企业的社会责任,同心协力,为打造人们的美好生活,推动民族传统工业的快速发展做出更大的贡献。

据悉,早在20世纪70年代初,枝江就开始派技术人员赴泸州学习,80年代初,泸州老窖技师张树清、赵云清受聘来湖北枝江酒业历时数年跟班传艺。原泸州老窖总工程师、国际酿酒大师赖高怀多次亲临枝江指导,湖北枝江酒业经营者集团蒋红星、谭崇尧及国家级白酒评委时卫平等技术精英都曾受到赖大师的点拨教诲,枝江大曲曾受到赖大师的精心培育。(杨至爱)