

己酸菌筛选新途径及工艺参数正交试验

李 泉,徐开成,胡学玲

(山东兰陵美酒股份有限公司,山东 苍山 277731)

摘 要: 采用加大琼脂用量制成固体斜面培养基,以稀释分离、真空培养的方法进行己酸菌分离纯化,并采用正交试验法对己酸菌的生长繁殖条件进行了探讨,其影响因素依次为酒度、pH值、培养时间、培养温度及热处理温度,优化因子为pH6,酒度2%,热处理温度80℃,培养温度30℃,培养时间6 d。

关键词: 己酸菌; 分离纯化; 斜面试管; 真空培养; 正交试验

中图分类号: TS261.1 Q93-33 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2002)06-0034-02

New Approaches to Caproic acid-producing Bacteria Screening & Orthogonal Tests of Technical Parameters

LI Quan, XU Kai-cheng and HU Xue-ling

(Shandong Lanling Meijiu Co. Ltd., Changshan, Shandong 277731, China)

Abstract: The solid slant culture medium, prepared by increasing the use level of agar; the separation and purification of caproic acid-producing bacteria, processed by the techniques of separation by dilution and vacuum culture; then the growth and proliferation conditions of caproic acid-producing bacteria were investigated by orthogonal tests. The results indicated that the sequence of the influencing factors were alcohol content, pH values, culture time, culture temperature, and thermal treatment temperature. Generally, the pH value of optimized genes was 6, alcohol content was 2%, thermal treatment temperature at 80℃, culture temperature at 30℃, and culture time was 6 days. (Tran. by YUE Yang)

Key words: caproic acid-producing bacteria; separation and purification; slant tube; vacuum culture; orthogonal tests

己酸菌的分离,应用通常的方法似乎难以达到理想的效果,经过2~3次的筛选仍无法获得性征相同的菌株,需经多次的纯化才能达到纯种效果。己酸菌的纯化多采用液体培养方式,因此分离出的菌株难以固体保存,只好液态培养后再用砂土管保藏。本试验采用固体斜面培养基的方式,克服了上述缺陷,开辟了厌氧菌分离的一条实用途径。

1 培养基的制作

1.1 乙酸钠改良培养基

乙酸钠5 g,酵母膏1 g,2%硫酸镁-5%硫酸铵10 ml,4%磷酸氢二钾10 ml,0.5%硫酸钙20 ml,5 mg/L(5 ppm)生物素1 ml,自来水1000 ml,pH6.0~6.5,于0.1 MPa灭菌30 min,接种前加乙醇20 ml。

1.2 固体乙酸钠改良培养基

配制液体培养基,添加2%琼脂于沸腾的培养液中,融化后过滤分装于小三角瓶中,于0.1 MPa灭菌30 min,使用前加乙醇2%。

1.3 固体斜面试管制作

配制液体培养基,加琼脂4%,加热融化后过滤分装至小试管各10 ml,包扎后于0.1 MPa灭菌30 min,放无菌室冷却至60℃左右时加入2%酒精,趁热摆放斜面,待凝固后置真空干燥器中抽真空至0.08 MPa以上,于33℃恒温培养3 d,取出观察斜面染菌状况,如有染菌加以剔除。

2 己酸菌分离纯化

2.1 富集培养

用无菌吸管吸取己酸菌种子液5 ml加入细颈试管中,用乙酸钠改良培养基填充至细颈处,80℃热水浴处理5 min,迅速冷却后于33℃培养箱中培养5 d。

2.2 平板分离

在无菌室中用无菌吸管吸取己酸菌液1.0 ml,放入盛有9 ml无菌水的试管中,依次用10倍法稀释至 10^{-7} ,取 10^{-5} ~ 10^{-7} 稀释度各1 ml加入无菌空皿中,倒入融化保温的固体培养基,待凝固后放入真空干燥器中,抽真空至0.08 MPa于33℃培养3 d。

2.3 斜面转接

在无菌室中挑取培养皿内形态规则的菌落,在酒精灯火焰附近转接于斜面,从试管底部划直线,抽出接种环于火焰灭菌,填好编号,将试管置真空干燥器中,抽真空于33℃培养3~5 d。

2.4 初筛

斜面试管真空培养几天后,菌落呈乳黄或乳白色,凝脂状,平薄地铺在斜面培养基表面,用灭菌的接种针挑取菌落少许,置于滴有无菌水的载玻片上,置显微镜下观察,从中选择游动活泼、长杆状或缺杆状、最好带有鼓锤状芽孢的菌管作为初筛菌株。

2.5 复筛

在无菌细颈试管内充满乙酸钠改良培养液至细颈处,用接种环挑取菌落一环于培养液中,于33℃培养5 d,采用血球计数板及制倒平板法两种方式测定己酸菌细胞数。继续培养至7~10 d,用DDC显色法测定己酸含量,从中挑选细胞数在1亿个/ml以上、己酸

收稿日期: 2002-07-02

作者简介: 李泉(1969-),男,湖北人,大学本科,工程师,发表论文数篇。

含量在8000 mg/L以上的菌株为复筛菌株^[1]。

2.6 DDC显色法

先将己酸发酵液用2 N硫酸调pH至2~3 ,取稀释10倍后的该酸化液2 ml置于分液漏斗中 ,再加入铜试剂3 ml ,然后加入氯仿5 ml ,抽提2 min ,静置分层 ,接着用水洗氯仿层 ,待分层后倾去水 ,用4000 r/min离心5 min ,取离心后的氯仿层5 ml ,加DDC溶液0.5 ml ,混匀后于450 nm波长下比色 ,由工作曲线计算己酸钠含量。

2.7 工作曲线的绘制

取0.1000 g己酸 ,用氯仿溶解定容至100 ml ,吸取该标准己酸氯仿液0.2 ml ,0.4 ml ,0.6 ml ,0.8 ml ,1.0 ml分别加入铜试剂3 ml (同上述操作) ,补足氯仿5 ml ,抽提2 min ,静置分层后水洗 ,分层后倾去水 ,离心5 min ,取离心后的氯仿层5 ml ,加DDC溶液0.5 ml ,混匀后于450 nm下比色 ,将所得数据绘制成标准曲线^[2]。

2.8 计算公式

己酸量 (mg/1000 ml)=所得毫克数×100/2×10
=所得毫克数×500

3 正交法选择工艺参数

3.1 正交表的选择

为探讨己酸菌的最适培养条件 ,利用正交试验是一条捷径 ,从方便操作和多选择参数两方面考虑 ,选用L16 (4⁵)正交表。

3.2 因素水平选择

选择因素有培养基pH值、酒度、热处理温度、培养温度及时间5个因素 ,因素水平对照如表1。

表 1 因素水平对照					
水平	pH 值	酒度 (% ,v/v)	热处理温度 (℃)	培养温度 (℃)	培养时间 (d)
1	4	0	100	28	4
2	5	2	90	30	5
3	6	4	80	33	6
4	7	6	不处理	35	7

3.3 正交试验操作

配制乙酸钠改良培养液 ,取4瓶分别用6 N硫酸调节pH4 ,pH5 ,pH6 ,pH7 ,于0.1 MPa压力下灭菌30 min。将3支细颈试管己酸菌液倒入无菌三角瓶中 ,混合均匀 ,各吸取5 ml菌液加入细颈试管中 ,共16支 ,分别编号。按各自对应pH值倒入大半培养基 ,按试管容积的2% 4% 6%加入所需酒精 ,稍加振荡 ,继续用培养液加满。将细颈试管按编号分组于100℃ 90℃ 80℃处理2 min ,到时时后迅速投入凉水中冷却 ,分别放置于28℃ 30℃ 33℃ 35℃的恒温培养

表 2

正交试验结果

试验号	列号					
	A (pH 值)	B (酒度)	C (热处理温度)	D (培养温度)	E (培养时间)	己酸菌数 (亿个/ml)
1	1(pH4)	2(2 %)	3(80℃)	2(30℃)	3(6 d)	1.13
2	3(pH6)	4(6 %)	1(100℃)	2	2(5 d)	0.44
3	2(pH5)	4	3	3(33℃)	4(7 d)	0.05
4	4(pH7)	2	1	3	1(4 d)	0.275
5	1	3(4 %)	1	4(35℃)	4	0.05
6	3	1(0 %)	3	4	1	0.665
7	2	1	1	1(28℃)	3	0.345
8	4	3	3	1	2	0.2
9	1	1	4(不处理)	3	2	0.025
10	3	3	2(90℃)	3	3	0.76
11	2	3	4	2	1	0.3
12	4	1	2	2	4	0.365
13	1	4	2	1	1	0.02
14	3	2	4	1	4	1.035
15	2	2	2	4	2	0.215
16	4	4	4	4	3	0.04
I	0.306	0.35	0.278	0.4	0.315	总和
II	0.228	0.664	0.34	0.559	0.22	=5.955
III	0.725	0.328	0.511	0.278	0.569	平均
IV	0.22	0.138	0.35	0.243	0.375	=0.372
R	0.505	0.526	0.233	0.316	0.349	
最优	3(pH6)	2(2 %)	3(80℃)	2(30℃)	3(6 d)	

箱中 ,培养至4d 5d 6d 7d时分别进行己酸菌计数。

3.4 正交试验结果 (见表2)

3.5 结果分析

己酸菌生长繁殖的影响因素依次为酒度、pH值、培养时间、培养温度及热处理温度 ,其中酒度和pH值影响最大。较理想的试验号为1# ,14# ,最优量化因子为A3 (pH6) ,B2 (2%) ,C3 (80℃热处理) ,D2 (30℃)和E3 (6d)。

4 问题与讨论

4.1 己酸菌斜面试管因采用真空培养 ,如采用2%琼脂 ,会出现松散、剥离现象 ,故琼脂使用量加大一倍。

4.2 己酸菌短时间热处理由于传热慢 ,不能完全杀死营养细胞 ,意在激活己酸菌 ,促其生长 ,对低温保存菌种尤为适用。

4.3 己酸菌计数可采用血球计数板与制倒平板法。相对误差基本一致 ,其中血球计数板测定数据稍高 ,其操作简便 ,测定及时 ,可优先采用。

参考文献 :

[1] 康明官.白酒工业新技术 (第1版) [M].北京 :中国轻工业出版社 ,1996.152-174.
[2] 康明官.白酒工业手册 (第1版) [M].北京 :中国轻工业出版社 ,1996.142-143.

贵州鸭溪酒业公司举行新产品品评会

本刊讯 :贵州鸭溪酒业公司于2002年9月13日在遵义市举行了新产品发布暨品评会 ,省市县有关部门130个单位的领导、专家及各界人士300余人参加了品评会。此次推出的新品为46度铁盒精装鸭溪酒王和46度精品鸭溪窖酒 ,与会人士认为 ,这两款新品酒质纯净 ,包装新颖 ,市场前景看好。

省市县有关领导在会上做了热情洋溢的讲话 ,指出鸭溪酒有着悠久的历史 ,素有“二茅台”、“酒中美人”之称 ,有着得天独厚的自然条件 ,为贵州酒业曾经创造过辉煌。新品的推出 ,是新的领导班子依靠广大科技人员 ,根据市场需求 ,结合自身优势 ,瞄准市场热点所采取的重大举措 ,将成为鸭溪酒业的新亮点。并希望鸭溪酒业带着新的闪光开拓新的市场 ,再铸辉煌 ,为贵州酒业的发展做出新的贡献。(单雨)