复合微生物菌群在白酒酿造副产物中的应用

甘广东,朱 超,杨 勇,周 红,王永伟,赵星辉
(江苏洋河酒厂股份有限公司,江苏 宿迁 223800)

摘 要: 采用微生物富集、驯化的方法,得到一组以利用酿造副产物为原料并高效产酸的菌群,发酵 7 d 后,乙酸、丁酸和己酸的含量分别为 1304.98 mg/100 mL、1330.70 mg/100 mL 和 257.51 mg/100 mL。在此基础上进行培养条件的单因素优化,结果表明,初始酒精度对己酸生成的影响不大,最适酵母膏添加量 0.5 %,NaAC 为 0.6 %,最适 pH 值在 6.20～6.86 之间,黄水:废水为 1:6。在此优化的基础上,添加 0.25 %的复合酶,经过 7 d 发酵,乙酸、丁酸、己酸和总酸的含量分别达到 586.39 mg/100 mL、283.77 mg/100 mL、971.12 mg/100 mL 和 1341.15 mg/100 mL,乙酸、丁酸分别转化了 718.59 mg/100mL 和 1046.93 mg/100 mL,己酸的合成提高了 714.01 mg/100 mL。

关键词: 微生物; 富集; 有机废水; 代谢途径; 气相色谱
中图分类号:Q93-3;TS261.4;TS261.9;X797 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-9286(2013)01-0077-05

Application of Complex Microbial Communities in Liquor-making By-product

GAN Guangdong, ZHU Chao, YANG Yong, ZHOU Hong, WANG Yongwei and ZHAO Xinghui
(Yanghe Distillery Co. Ltd., Suqian, Jiangsu 223800, China)

Abstract: A group o f microbial communities was obtained through microbiological enrichment and domestication. Then it was used for liquor-making by-product fermentation to produce acids. After 7 d fermentation, the content of acetic acid, butyric acid and caproic acid reached up to 1304.98 mg/100 mL, 1330.70 mg/100 mL and 257.51 mg/100 mL respectively. On this basis, culture conditions were optimized by single factor test. The results suggested that initial alcohol content had little effects on acids yield, the best addition level of yeast extract and NaAC were 0.5 % and 0.6 % respectively, the best pH value was within 6.20～6.86, and the ratio of yellow water and waste water was 1:6. Then on this basis, 0.25 % compound enzyme was added, after 7 d fermentation, the content of acetic acid, butyric acid, caproic acid and total acid reached up to 586.39 mg/100 mL, 283.77 mg/100 mL, 971.12 mg/100 mL and 1341.15 mg/100 mL respectively. Compared with previous experimental data, it was clear that the degradation of acetic acid and butyric acid were 718.59 mg/100 mL and 1046.93 mg/100 mL respectively, and caproic acid con tent increased by 714.01 mg/100ml.

Key words: microorganism; enrichment; organic waste water; metabolic pathway; GC

古往今来,上至王侯将相,下到黎民百姓,很少是为了饮酒而饮酒,即便是形态层面的饮酒,也多是以精神层面为主旨。白酒文化伴随人类社会走过了几千年的历程,已经渗透到社会的各个阶层,对社会生活产生了深远的影响,酒也真正成了人们表达感情,寄托理想,增进友谊,扩大交往,调节生活所不可缺少的精神灵物[1-3]。

近年来,随着生活水平的显著提高,以及人们对交流与文化的更高层次追求,白酒产业得到了迅猛的发展。全国各大酒厂纷纷扩建,增加产量,以满足市场的需求,但随之而带来的是环境的破坏。酿酒生产过程中会排放出大量的有机废水,其中含有还原糖、淀粉和蛋白质以及有机酸、醇类和无机盐等有用物质,如直接排放到江河中会使水富营养化,污染环境;而建立污水处理厂会增加企业的生产和运营成本,减少经济效益。因此,白酒工业的扩大与资源环境的矛盾也日趋尖锐,群众对环境污染问题的反应也越来越强烈,白酒发展无疑遇到了环境问题的"瓶颈"[4-5]。利用微生物发酵技术,最大化利用废水中的营养物质,代谢生产白酒生产中所需要的调味液,使其得以循环利用,实现经济、生态和社会的"三赢"。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料

酒醅:取自洋河酒厂。

菌种:己酸功能菌系、复合酶由公司实验室培养制得,科氏梭菌 8022 和异常汉逊酵母 1295 购于中国工业微生物菌种保藏中心,巴氏醋杆菌 AS1.41 购于中科院微生物菌种保藏室。

收稿日期:2012-08-29
作者简介:甘广东(1982-),男,河南驻马店人,硕士研究生,从事微生物及发酵工程的研究,E-mail:ggd_2008@163.com。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.2 试剂

肉汤提取物,L-半胱氨酸盐酸盐,脱纤维羊血,酵母膏,$CaCO_3$,NaAC,硫酸镁等。

1.1.3 仪器

厌氧培养箱,自动定氮仪,冷冻离心机,旋转蒸发仪,气相色谱仪等。

1.1.4 培养基

①功能菌液:乙酸钠改良培养基[6]。

②科氏梭菌 8022:CM0172 己酸细菌培养基。

③异常汉逊酵母 1295:CM0077。

④巴氏醋杆菌 AS1.41:G10 %,酵母提取物 1 %,碳酸钙 2 %,琼脂 1.5 %,pH6.86。

1.1.5 富集培养基

培养基:0.1 %酵母膏、0.1 %NaAC 添加到黄水比有机废水为 1:8 的溶液中,120 ℃、20 min 灭菌后加 3 %vol 乙醇。

1.2 实验方法

1.2.1 有机废水的检测分析

采用化学分析方法对黄水和废水所含淀粉、还原糖、酒精度和总氮进行检测,以分析其中有用物质的含量。

1.2.2 外加菌富集[7-8]培养、驯化

取不同窖池的 10 g/100 mL 酒醅浸提液 10 mL 至 1000 mL 富集培养基中,同时加入培养结束的己酸功能菌系 5 %、巴氏醋杆菌 1 %、科氏梭菌 5 %和异常汉逊酵母 0.1 %,37 ℃厌氧培养 7 d,以 10 %接种量添加到含乙醇 2 %的富集培养基中,37 ℃厌氧培养 7 d,如此重复,连续培养 5 代。

1.2.3 培养条件影响因素

以有机废水的比例、NaAC、乙醇、酵母膏添加量和初始 pH 值为单因素条件进行培养。

1.2.4 气相色谱分析

GC 条件:柱子型号是 CP-WAX 57CB (规格 50 m 长,内径 0.25 mm,膜厚 0.2 mm);初温 35 ℃,保持 6 min,以 4 ℃/min 升温至 75 ℃,保持 10 min,再以 25 ℃/min 升温至 175 ℃,保持 2 min,最后以 10 ℃/min 升温至 215 ℃,保持 24 min。分流比为 35:1,进样量为 1 μL,载气为 N_2。内标共 3 个,分别是叔戊醇 、乙酸正戊酯和 2-乙基正丁醇。

2 结果与分析

2.1 有机废水分析

有机废水理化指标分析结果见表 1。从表 1 中可以看出,黄水中总糖、还原糖和总氮含量较高,营养较丰富,并含有有利于有机酸代谢的一些生长因子,与其他废水按照一定比例进行配比,再添加一些必须的营养成分,可以满足微生物生长、繁殖和代谢的需求。

表 1 有机废水化学分析结果

项目	样品	
	黄水	废水(底锅水+丢糟水+车间沉降池水)
总糖(g/100 mL)	2.5875	0.14625
还原糖(g/100 mL)	2.3	0.0265
酒精度(%vol)	3.50454	0.376741
总氮(g/L)	4.32	0.125

2.2 富集培养

酒醅中含有大量有利于有机酸代谢的有益菌种,补加功能菌主要是为了使其尽快在富集培养中形成优势菌群。微生物富集培养与 GC 分析结果见表 2。

从表 2 中可以看出,当短杆菌或球菌多时,主要产乙酸;长杆菌较多时,丁酸含量就高,发酵液臭味大,并且大部分发酵液发黑,这可能是因为在生产过程中部分铁离子流入到有机废水中,与发酵液中硫结合生成 FeS,同时己酸的生成也受到抑制。7# 培养液呈黄色,有硫化氢的气味,并且在发酵过程中产气较多,发酵提取液经气相色谱分析得出乙酸、丁酸的量较高,己酸得到部分转化。

图 1 镜检中总菌数为 3.5×10^9 个,其中芽孢杆菌数量较多,主要以鼓槌状为主,还包含有部分梭状,并且外加菌占明显优势,可以选此菌群作下一步的研究。

2.3 酵母膏添加量对发酵的影响

酵母膏的添加量分别为 0、0.25 %、0.5 %、0.75 %、1.0 %和 1.25 %,配制一定比例的培养液,在 37 ℃下培养 7 d,提取分析。结果见图 2。

表 2 微生物富集培养与 GC 分析结果 (mg/100 mL)

富集培养液	感官	镜检分析	乙酸	丁酸	己酸
1#	黄色,硫化氢味	菌瘦小,芽孢少	478.06	887.95	85.68
2#	黄色,酸味	菌瘦小,球菌多	221.50	482.92	20.11
3#	黄色,酸臭味	菌瘦小,短杆菌多	753.95	259.28	18.97
4#	黑色,硫化氢味	菌瘦小,球菌多	712.13	175.93	18.81
5#	黑色,硫化氢味	有芽孢,长杆菌多	230.55	1201.11	224.46
6#	黑色,硫化氢味	芽孢很少,长杆菌多	636.56	1028.33	216.41
7#	黄色,硫化氢味	芽孢稍多,球菌和少量长杆菌	1304.98	1330.70	257.51
8#	黄色,酸臭味	短杆菌多	907.46	83.86	54.51
9#	黄色,泡沫呈黑色,硫化氢味	球菌、长杆菌多,粗壮,芽孢少	1102.75	1095.67	16.28

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

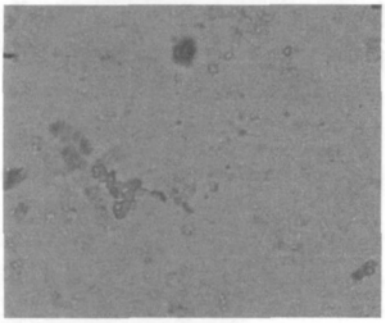

图 1　7# 富集培养液显微镜检图

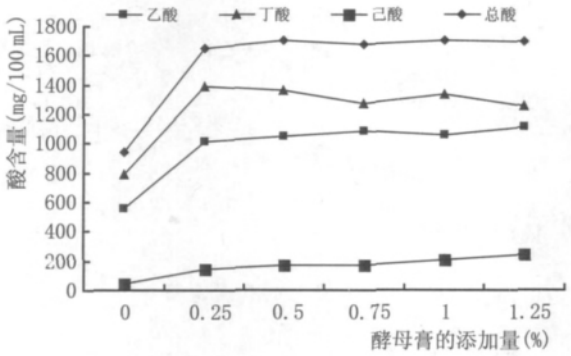

图 2　酵母膏添加量对发酵产酸的影响

从图 2 中可以看出，随着酵母膏添加量的增加，丁酸呈缓慢降低趋势，乙酸变化不大，己酸缓慢增加，但整体而言，变化都不太明显；当不添加酵母膏时，酸含量下降都较明显，这可能是因为酵母膏中含有对氨基苯甲酸和生物素等生长因子，这些物质的缺少会导致酸的合成受到阻碍。总酸随着酵母膏添加量的增加呈现不规律的变化，从工业经济角度分析，选择酵母膏添加量 0.5 %为佳。

2.4　NaAC 的添加量对发酵的影响

NaAC 的添加量分别为 0.05 %、0.1 %、0.2 %、0.4 %、0.5 %、0.6 %和 0.7 %，NaAC 添加量对发酵产酸的影响结果见图 3。

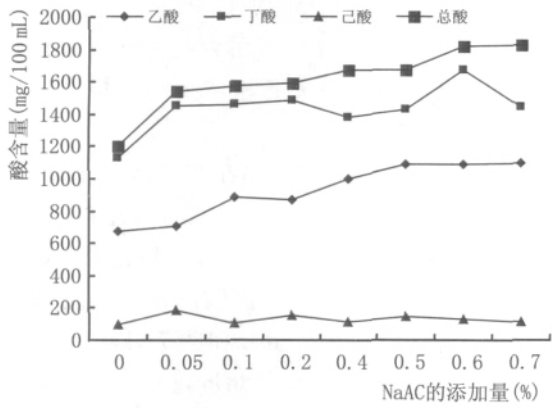

图 3　NaAC 添加量对发酵产酸的影响

由图 3 可以看出，随着 NaAC 添加量的提高，乙酸的含量也逐渐提高，在 0.5 %时达到最大，随后稳定；而己酸的含量在 NaAC 的添加量为 0.05 %最高，随后降低，并趋于平缓；丁酸的变化没有规律性，在 NaAC 的添加量为 0.6 %时最高，这可能是因为混合菌群中，菌种太多，影响因素复杂，几种酸之间相互转化时有一个动态平衡的过程。

添加量在 0.1 %～0.7 %时，总酸的含量逐渐增加，在 0.7 %时达到最大，为 1830 mg/100 mL，但 NaAC 在 0.6 %与 0.7 %时所对应的总酸含量相差无几，因此，选择 NaAC 的添加量为 0.6 %较好。

2.5　酒精含量对发酵的影响

灭菌后的原料初始酒精度为 1.16 %vol。从图 4 中分析得出，初始酒精度对己酸的影响不是很大，而总酸和乙酸随酒精度的增加有下降的趋势。这可能是废水本身中含有一定的淀粉和还原糖，在菌群所产酶的作用下代谢产生能被合成乙酰辅酶 A 的酸或醇，进而参与酸的合成。因此有机酸发酵可以不添加酒精，也能取得较为理想的效果。

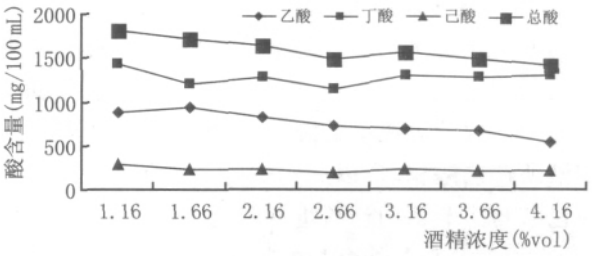

图 4　初始酒精浓度对发酵的影响

2.6　初始 pH 值对发酵的影响

初始 pH 值对 3 种酸及总酸的影响结果见图 5。图 5 中可以看出初始 pH 值从 5.62 到 6.20，乙酸、丁酸的量逐渐增加，而己酸先降低后趋于平缓；pH 值由 6.20 到 6.66，乙酸、丁酸的量降低，己酸先增加后趋于稳定；pH6.86 时，乙酸、丁酸的量有所增加，而己酸的量基本不变；pH 值由 5.62 到 6.05 时总酸的量逐渐增加，在 pH6.05 时则达到最高值，为 1726 mg/100 mL，随后逐渐降低；当 pH 值为 6.66 时则降至最低值，为 1452 mg/100 mL。这也表明，对混合菌群来说，pH 值在 5.62～6.20 之间适合乙酸与丁酸的合成，而在 6.20～6.86 之间则利于己酸的合成。

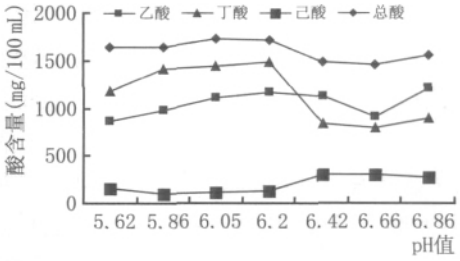

图 5　初始 pH 值对 3 种酸及总酸的影响

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 实验设计

实验编号	黄水：废水	培养条件
1#	1：2	无外加有机氮源
2#	1：4	无外加有机氮源
3#	1：6	无外加有机氮源
4#	1：8	无外加有机氮源
5#	1：4	初始发酵液，直接提取分析
6#	自来水	0.5 %酵母膏
7#	1：4	0.5 %酵母膏
8#	1：4	0.5 %酵母粉

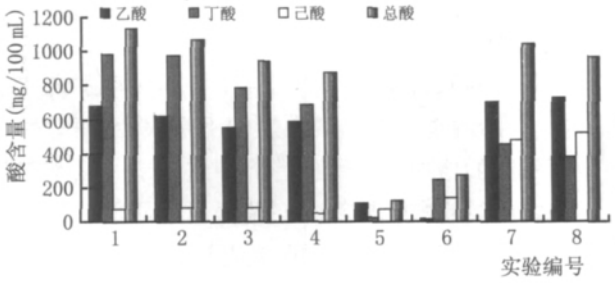

图 6 不同比例废水、营养成分的添加对发酵产酸的影响

2.7 废水比例对发酵的影响

随着黄水与废水比例的下降，总酸的含量有所降低，这主要是因为黄水中的有用营养物质比废水含量高，比例的增加导致营养浓度的降低，产酸的量也跟着下降。3# 发酵液所产己酸稍多，以此比例再外加有机氮源，发酵结束时乙酸与丁酸都向己酸进行转化，己酸的含量也得到较大的提高，并且添加酵粉的效果更好。这可能是因为在酵母膏中所含的适合己酸菌生长的物质没有同质量酵母粉高；但用自来水代替黄水与废水进行培养时，3 种酸以及总酸的含量都大大降低，这是因为黄水与废水中营养丰富，适合菌群的生长与代谢，而用自来水则达不到营养要求。

2.8 复合酶系对产酸的影响

从图 7 中可以看出，己酸的生成是一种从 $C_2 \rightarrow C_6$ 的生物合成代谢，并且每次以 2 个碳原子(来自丙二酸单酰 ACP)进行延长，每增加 2 个碳原子需要 2 个 NADPH 和 1 个 ATP。合成过程需要 ATP、NADPH、复杂的酶系和小分子前体物质(乙醇、乙酸或丙酮酸)[9]，其中 ATP 来自 EMP 途径和 TCA 循环，NADPH 和 H^+ 来自 EMP 和 PPP 途径，小分子前体物来自培养外添加或大分子的分解。复合酶是由淀粉酶、糖化酶、蛋白酶和脱氢酶等酶构成的复杂酶系及一些生长因子组成。丁酸是合成己酸的中间产物，酶系的缺少导致丁酸的积累或只有小部分转化，此时提取出来的样品中有不和谐的气味。图 8 中分析得出，添加复合酶后更能有利于营养物质的转化及己酸的合成，从 0 %～0.25 %，己酸的生成逐渐增加，而丁酸都得到大大转化。当添加的复合酶为 0.25 %时，乙酸、丁酸、己酸和总酸的含量分别为 586.39 mg/100 mL、283.77 mg/100 mL、971.12 mg/100 mL 和 1341.15 mg/100 mL，并且其他低于 8 个碳原子的酸兼有。因为是纯自然发酵，口感好，提取出来的样品闻起来有浓郁的老窖香味，因此可以应用到白酒生产当中。

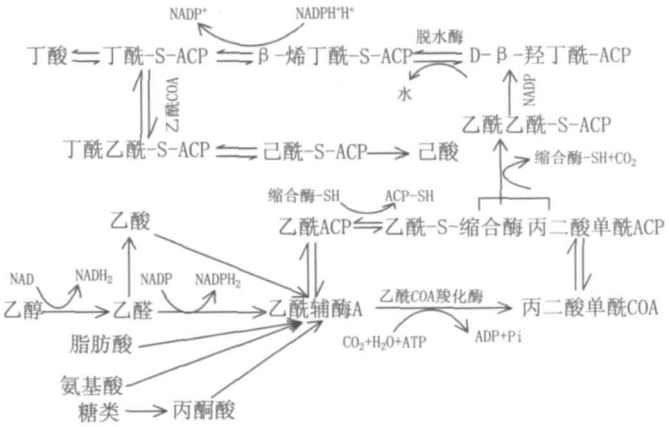

图 7 己酸的代谢途径

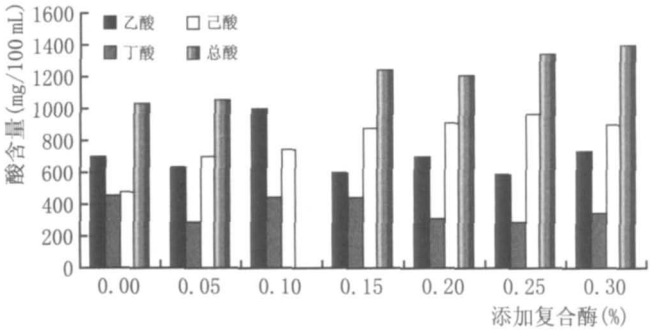

图 8 外添加复合酶对发酵产酸的影响

3 结论

3.1 在长期的酿酒实践中，人们发现很多重要生化反应仅靠单株微生物不能完成或只能微弱地进行，必须依靠 2 种或多种微生物共同培养来完成。因为菌株所需的营养物质与发酵条件存在差异，所以利用微生物互生、共生及拮抗的关系，通过一定的发酵调控方法可以使各菌种间达到“微生态”平衡，并朝着所需要的目标产物进行代谢。

①结合镜检与色谱分析，富集出以废水为培养液、高产酸的菌群，其中芽孢杆菌较多，还有大量的球菌、短杆菌和少量长杆菌，并且发酵液呈黄色，闻起来有硫化氢的气味，发酵 7 d 后乙酸、丁酸和己酸的含量分别为1304.98 mg/100 mL、1330.70 mg/100 mL 和 257.51 mg/100 mL。

②从经济效益和酸的产量角度进行分析，酵母膏与 NaAC 添加比例分别为 0.5 %、0.6 %时较好；初始酒精度对己酸的影响较小，而总酸和乙酸随酒精度的增加有下降的趋势。这是因为废水中含有一定的淀粉和还原糖，在

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌群所产酶的作用下代谢产生能被合成乙酰辅酶 A 的酸或醇,进而参与酸的合成,因此从工业的角度考虑,可以不添加酒精;pH 值在 5.62～6.20 之间时适合乙酸与丁酸的合成,而在 6.20～6.86 之间则有利于己酸的合成。黄水与废水的比例为 1:6 时效果较好,并且添加酵母粉比酵母膏更适合己酸代谢;但只用自来水进行培养时,3 种酸和总酸的含量都大大降低。

③加入复合酶系后,菌群能有效利用培养基中的营养物质,并且丁酸能有效向己酸转化。当添加的复合酶为 0.25 %时,乙酸、丁酸、己酸和总酸的含量分别为 586.39 mg/100 mL、283.77 mg/100 mL、971.12 mg/100 mL 和 1341.15 mg/100 mL,并且其他低于 8 个碳原子的酸兼有。

3.2　富集的菌群能有效利用白酒生产过程中的副产物,合成以三大酸为主的风味香料,其应用正在进一步研究。

参考文献:

[1] 张国豪,武振业,蔡玉波.中国白酒文化的剖析[J].酿酒科技,2008(2):121–124.

[2] 杜莉.关于己酸菌的培养及其应用[J].酿酒科技,1998(4):15–23.

[3] 钟国辉,邹海晏.弘扬中华酒文化、传承华夏文明(Ⅰ)—浅谈新法白酒研究回顾与展望[J].酿酒,2011,38(2):3–5.

[4] 张欣.我国白酒废水治理技术研究进展[J].酿酒,2008,35(6):12–15.

[5] 周建丁,周健.白酒工业废水处理现状及展望[J].四川理工学院学报,2008,21(6):74–77.

[6] 沈怡方.我国白酒废水治理技术研究进展[J].酿酒,2008,35(6):12–15.

[7] 张红莲,夏立群,刘贻秉,等.富集光合细菌培养基的优化研究[J].水产科学,2005,24 (7):23–25.

[8] 杨绍斌,廉大海,祝莹,等.光合细菌富集培养技术及在北方养鱼中的应用[J]. 水产养殖,2005,26 (1):22–23.

[9] 饶家权,杨徐才.浓香型新窖酒乙酸和乙酸乙酯偏高的原因[J].酿酒科技,2011(11):87–91.

贵州茅台酒厂集团技术开发公司乔迁暨20 周年庆典举行

本刊讯:贵州茅台酒厂集团技术开发公司乔迁暨 20 周年庆典于 2012 年 12 月 25 日在贵州省仁怀市隆重举行,贵州省政协、贵州省经济和信息化委员会等单位的领导,原贵州省轻工业厅的老领导,仁怀市市委、市政府、市人大、市政协的领导,仁怀市有关职能部门的领导,中国贵州茅台酒厂(集团)有限责任公司董事长、党委副书记袁仁国等集团公司的领导出席庆典活动。

中国贵州茅台酒厂(集团)有限责任公司副总经理吕云怀宣布庆典开幕,贵州茅台酒厂集团技术开发公司支部书记周思一致欢迎词,茅台集团总经理助理、茅台集团技术开发公司董事长胡本均以“开拓创新、锐意进取,继续推动企业跨越式发展”为题做了庆典演讲,回顾了茅台技术开发公司走过的 20 年艰辛历程和取得的辉煌成就,从白手起家到如今步入跨越式发展轨迹,既有各级领导部门和集团公司的关心和支持,也有公司员工的努力拼搏,还有经销商的信赖和执着,如今销售额接近 5 亿元,累计实现税收 6 亿元。

庆典仪式上,公司对 20 名杰出员工颁发了“突出贡献奖”,对 20 名优秀经销商颁发了金银奖。优秀经销商代表天朝上品酒业运营管理有限公司董事长黄永毅发表了演说,他认为:“白酒行业竞争激烈,品牌太多,真正能被消费者记住的品牌有限。将继续在技术开发公司的带领下,用 3～5 年时间,把拉升品牌价值作为企业发展目标。做好品牌,面对更加激烈的竞争”。

贵州省白酒专家代表黄平代表贵州省轻工业科学研究所和出席庆典活动的各位专家向“贵州茅台酒厂集团技术开发公司乔迁暨 20 周年庆典”表示热烈的祝贺!贵州茅台酒厂集团技术开发公司自 1992 年成立以来,已走过 20 年历程。20 年来,在各级政府的关心和支持下,在贵州茅台酒厂集团有限责任公司的领导下,取得了不菲的业绩,是贵州茅台酒厂集团有限责任公司的骄傲,也是贵州白酒行业的骄傲。技术开发公司坚持“秉承传统酿造工艺,传承国酒文化”的经营理念,对传统酿酒工艺不断改进和创新,其研发能力走在白酒研究的前沿。从 2008 年起,公司加快了白酒新品的研发步伐,在产品工艺、口感上下功夫,注重口感柔和舒适,柔雅协调,研制出了“柔和酱香、柔雅浓香”两款新产品,为公司的跨越式发展注入了新的活力。分析了白酒行业的市场竞争方式,认为市场竞争方式取决于消费市场的发展模式。白酒业要获得健康快速的持续发展,最重要、最迫切的任务就是“抓住消费者、扩大消费者、培育消费者!”这就需要我们顺应现代消费方式,满足消费者的价值需求和文化需求。

仁怀市市长王茂才发表重要讲话,充分肯定了贵州茅台酒厂集团技术开发公司对仁怀市地方经济社会做出的贡献,希望贵州茅台酒厂集团技术开发公司在新的时期,在新的起点上,再接再厉,为实现省委、省政府提出的“把茅台酒打造成世界蒸馏酒第一品牌”、把茅台镇打造成“中国国酒之心”、把仁怀市打造成“中国国酒文化之都”的“一看三打造”和“未来十年、中国白酒看贵州”的宏伟目标做出新的贡献。

中国贵州茅台酒厂(集团)有限责任公司董事长、党委副书记袁仁国以“优化企业的责任、创新等意识以及企业的社会责任”为主题,对茅台集团技术开发公司 20 年来取得的成绩给予充分肯定和高度评价,公司累计实现税收 6 亿元左右。希望公司按照茅台集团“三步走、三跨越”战略部署和“十二五”发展规划要求,坚持以人为本,优化产业结构,大力弘扬国酒文化,以增强产品核心竞争力和持续发展力为目标,依靠体制创新和科技创新,做强以白酒制造为核心的主业,为茅台实现千亿元目标、为仁怀经济建设做出新贡献。(小雨)

茅台技术开发公司领导团队

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net