

# 己酸菌发酵条件研究

戴 群<sup>1</sup>, 赵光鳌<sup>2</sup>, 王宁波<sup>1</sup>

(1. 江苏教育学院 生物系, 江苏 南京 210013)

2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

[摘要] 己酸乙酯是浓香型白酒区别于其它香型白酒的主要香味成分. 适量的己酸乙酯是决定浓香型白酒质量的一个重要指标, 也是曲酒优质率的主要限制因素. 己酸乙酯的产生需要很长的时间, 而发酵时间有限, 故可用己酸乙酯的一个重要前体—己酸作为间接指标. 本文利用从洋河酒厂股份有限公司窖泥中分离得到的一株己酸菌—J7 菌株, 在实验室条件下模拟了其生长环境, 通过测定己酸的含量来寻找适合 J7 菌株产酸的发酵条件. 经实验表明, J7 菌株的最适生长 pH 为 7.5 它可利用葡萄糖生成少量的己酸, 利用丙酸、丁酸可合成较多的己酸, 其最适的碳源组成是 2% 的乙醇和 2% 的乙酸钠.

[关键词] 己酸菌, 发酵, 己酸乙酯, 己酸, 窖泥

[中图分类号] TQ92 [文献标识码] B [文章编号] 1672-1292(2005)03-0076-03

## Study on the Fermentation of *Cl klugveri*

DAI Qun<sup>1</sup>, ZHAO Guangao<sup>2</sup>, WANG Ningbo<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Jiangsu Institute of Education, Jiangsu Nanjing 210013, China)

2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Jiangsu Wuxi 214036, China)

**Abstract** Ethyl capriate is the main fragrance that distinguishes *Luzhou-dagu Baijiu* and other types of alcohol. Caproic acid is regarded as not only an important index of determining the quality of fragrance alcohol, but also a main restricted factor of the quality of *Luzhou-dagu Baijiu*. During the fermentation of microbe, the condition of fermentation not only has an impact on germ, but also influences the synthesis of metabolic products. Different conditions lead to different products in the course of metabolic reaction. In this paper, the author tries to find out the proper conditions of growth and investigate the parameters of the fermentation with the J7 strain of *Cl. klugveri*. The research shows that the J7 strain's best pH is 7.5. 2% ethanol and 2% acetic-natrium are the best carbon sources.

**Key words** *Cl. klugveri*, fermentation, ethyl capriate, caproic acid, bodega mud

## 0 引言

白酒是我国传统的蒸馏酒, 根据其香型可分为浓香型、酱香型、清香型、米香型等. 目前普遍认为己酸乙酯是浓香型白酒的主体香. 浓香型白酒己酸乙酯含量要比其他香型的白酒含量高的多, 是浓香型白酒区别于其他香型白酒的主要香味成分, 是决定浓香型白酒质量的一个重要指标, 也是曲酒优质率的主要限制因素, 保持浓香型白酒中己酸乙酯为主的风味物质的含量是浓香型白酒生产的一个关键问题.

目前国内一些白酒厂面临部分窖池的窖泥老化、退化. 其主要症状是: 窖泥板结, 上半部有白色

针状结晶析出. 己酸菌属土壤细菌, 对土壤有亲和性, 在其生长过程中可产生己酸. 己酸是形成己酸乙酯的前体物质. 窖泥是己酸菌的生存环境. 窖泥一旦板结, 泥中的梭状芽孢杆菌的生长、繁殖受到极大的影响, 不能自由地进入窖池, 窖池中的梭状芽孢杆菌也不能再返回窖泥, 这样, 窖泥中的梭状芽孢杆菌就越来越少, 致使酒中主体香味淡薄, 己酸乙酯含量下降, 制约了原酒质量的进一步提高.

己酸乙酯生产需较长时间, 发酵时间有限, 故可以用己酸乙酯的一个重要前体—己酸作为己酸乙酯含量的一个间接指标.

收稿日期: 2005-03-28

作者简介: 戴群 (1971-), 女, 讲师, 主要从事微生物发酵等方面的教学与研究. E-mail: njldaiqun@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株 J7(本实验室分离得到 ).

1.1.1 主要试剂及原料

葡萄糖: 分析纯, 华北制药康欣有限公司; 麦芽糖: 生化试剂, 中科院上海生化所; 乳糖、蔗糖: 分析纯, 上海试剂二厂; 淀粉: 分析纯, 湖州食品化工联合公司; 甲酸: 分析纯, 中国医药上海化学试剂站; 丙酸、丁酸: 分析纯, 上海试剂一厂; 乙酸钠、乙醇、醋酸铜: 分析纯, 上海振兴化工厂.

1.1.2 主要仪器

天平, 隔水式电热恒温培养箱, 电热干燥箱, 721型分光光度计, TGL-16G 台式高速离心机.

1.1.3 培养基

培养基 I<sup>[1,2]</sup> ( % ):  $K_2HPO_4$  0.04  $(NH_4)_2SO_4$  0.05  $CH_3COONa$  0.5  $MgSO_4$  0.02 酵母膏 0.1  $CaSO_4$  1(干热灭菌后分置于试管中一起灭菌 ), 95% 乙醇 2(接种后加入试管 ) 调 pH 至 7.0

培养基 II( % ): 牛肉膏蛋白胨培养基  $CaSO_4$  1(干热灭菌后分置于试管中一起灭菌 ), 95% 乙醇 2(接种后加入试管 ).

1.2 方法

1.2.1 液态发酵过程中的变化

通过对发酵液的闻感、产气情况、浑浊度以及显微镜观察来观察己酸菌液态发酵液随时间发生

的变化.

1.2.2 各种因素对己酸产量的影响

(1) 两种常用培养基对己酸的影响: 菌株用培养基 I 与培养基 II 分别恒温培养 7 天后, 比较己酸产量.

(2) 初始 pH 对己酸产量的影响: 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 0.1 mol/L 的 HCl 溶液调培养基 pH 到 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 液态培养 7 天后测定己酸含量.

(3) 碳源对己酸产量的影响: 以酵母膏 (含量 0.1% ) 和硫酸铵 (含量 0.05% ) 为氮源, 以去碳素基础培养基为基质, 分别加入 8 种不同碳源, 测定己酸含量.

(4) 不同乙醇和乙酸钠对己酸产量的影响: 以酵母膏 (含量 0.1% ) 和硫酸铵 (含量 0.05% ) 为氮源, 以去碳素基础培养基为基质, 分别加入不同用量的乙醇和乙酸钠, 用醋酸铜比色法<sup>[3]</sup>测定己酸含量.

2 结果

2.1 液态发酵过程中的变化

液态发酵过程中的变化如表 1 所示. 分析此表可知, 进行液态发酵时, 初期发酵液产生乙酸、丁酸、己酸, 可能会有一定的特殊臭味, 到 10 天以后会有少量的酯生成, 产生香味, 因此发酵液逐渐变香.

表 1 液态发酵过程中的变化

时间 ( h )	闻感	产气	浑浊	显微镜观察
24	酒精气味	振荡有气泡冒出	清	菌体稀少, 分散
48	微弱的特殊有机酸酸臭味, 类似汗臭	气泡偶尔冒出	较清	有些菌体呈长链状, 较分散
72	轻微的特殊有机酸酸臭味	气泡连续冒出	较清	菌体链状, 有少数单独杆状
96	有明显的有机酸臭味	气泡不断上升, 产气较旺盛	较清	菌体成对, 也有单独杆菌
120	有机酸臭味较浓	产气旺盛	开始浑浊	大部分单独存在, 开始形成芽孢
144~ 192	臭味减弱	产气旺盛	浑浊度加大	芽孢数目增加
192~ 288	产生轻微的酯香味	产气减弱	浑浊	芽孢较多
288以后	有白酒香味	产气基本停止	澄清	芽孢脱落

2.2 各种因素对己酸产量的影响

2.2.1 两种常用培养基对己酸的影响

培养基 I 与培养基 II 是国内较常见的两种培养基<sup>[4]</sup>, 其对己酸的影响如表 2 所示. 从结果来看, 使用培养基 I 己酸的产量高于使用培养基 II

表 2 两种常用培养基对己酸的影响

培养基	己酸产量 / ( $\times 10^{-6} \cdot g \cdot L^{-1}$ )	pH 值
培养基 I	1 062	6.0
培养基 II	629	6.5

2.2.2 初始 pH 对己酸产量的影响

图 1 显示了 8 个不同初始 pH 对己酸产量的影响. 同多数细菌一样, 己酸菌不宜在偏酸环境下生长, 中性或微碱性环境是己酸菌产酸量最高的生长环境.

2.2.3 不同碳源对己酸产量的影响

表 3 所示为不同碳源对己酸产量的影响. 由表 3 可以看出菌株可以利用葡萄糖生成少量的酸, 利用丙酸、丁酸生成相对较多的己酸, 不利用其他碳源.

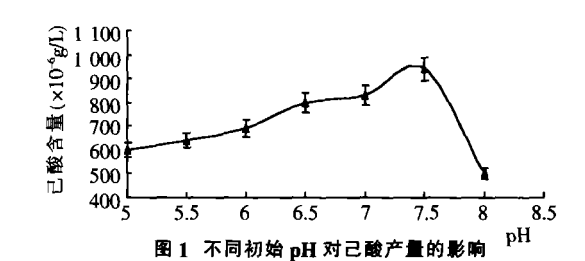


图 1 不同初始 pH 对己酸产量的影响

表 3 不同碳源对己酸产量的影响

碳源	己酸产量 ( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	pH 值
葡萄糖	72	6.5
蔗糖	0	7.0
麦芽糖	0	7.0
乳糖	0	7.0
淀粉	0	7.0
甲酸	0	7.0
丙酸	370	6.5
丁酸	483	6.5

2.2.4 乙醇和乙酸钠浓度对己酸产量的影响

乙醇和乙酸钠是己酸菌得以生长产酸的重要营养成分,不同乙酸和乙酸钠浓度对己酸产量的影响如表 4 所示。从表 4 的结果来看,2% 的乙酸和 2% 的乙酸钠是最适合的碳源组成。

表 4 乙醇和乙酸钠浓度对己酸产量的影响

乙醇浓度 (%)	乙酸钠浓度 (%)	己酸产量 ( $\times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
1	1	652
2	0.5	512
2	1	799
2	2	1010
2	3	987
3	1	787
4	1	573
5	1	456
6	1	215

3 讨论

浓香型白酒老窖泥中的己酸菌不同于微生物学上所称的己酸菌,微生物中的己酸菌是一种单一菌种,属于梭状芽孢杆菌属;而窖泥中所称的己酸菌可以看作是工业名称或习惯名称。窖泥中的己酸菌一般是梭状芽孢杆菌与甲烷菌的共栖中,而不是单一纯种。两种共栖提高己酸生成量,单一种反而产酸率低,因而称其谓窖泥己酸菌以示区别。

己酸是合成己酸乙酯的关键物质。己酸乙酯是一类短链脂肪酸酯,呈天然水果香味,是香精香料的重要成分,广泛应用于食品、饮料、饲料、化妆品及医药等生活用品中。目前工业上有两种合成己酸乙酯的途径<sup>[5]</sup>,但利用己酸菌作为生产己酸

乙酯的间接手段,与工业上合成相比,具有周期短、产量高、无污染等优点。

相对其它细菌而言,己酸菌生长周期较长,在生长过程中,己酸产量随细胞密度增加而增加,并有大量气体产生,但由于在其发酵过程中,营养成分被消耗的同时,生长环境也会发生相应的改变,变得不再适合其生活下去,大大影响了代谢产物的形成,因此必须辅以人工手段来维持其生长条件。

同时,在国内白酒厂家中,用不同的培养条件作为己酸菌种子液,也会影响己酸菌的数量。有的用窖泥直接作为其培养条件,有的用培养基 I 也有用培养基 II,还有用其它培养基的,但比较统一的是碳源都是乙醇和乙酸钠,但比例又不尽相同。通过大量实验,找到了一些比较适合己酸菌进行发酵产酸的条件,pH 为中性偏微碱性时菌株比较适合生长,但窖泥的 pH 较低,使窖泥中己酸菌生长繁殖受到极大的影响,酒中主体香味淡薄,己酸乙酯的含量下降,制约了原酒质量的进一步提高。本文供试菌株为实验室提供,在将来的工作中可以筛选适合酸性环境生长的菌株,来强化窖泥,提高窖泥中己酸乙酯的含量,提高白酒质量。

通过本次实验,可以看出己酸乙酯的产量与己酸菌的数量及生活环境有密切的联系:接种量大,培养条件适宜时,一般达到产酸量的高峰期所需时间较短,产酸量较多;接种量少,产酸高峰期将推迟,产酸量也会降低。同时从一系列实验可以看出,培养基 I 在相同条件下产酸时效果比培养基 II 好;在其它条件相同时,pH 为 7.5 时产酸量较高;丁酸作为碳源时相对其他碳源产酸量比较高,也能利用丙酸和葡萄糖;2% 的乙醇和 2% 的乙酸钠用作碳源产酸量也较高。

[参考文献]

[1] 梁家驊,苏京军,程光胜,等. 产己酸菌研究 [J]: 富集和培养. 酿酒科技, 1994(4): 67-68

[2] 吴衍庸. 己酸菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 1980, 7(3): 108-112

[3] 吴根福,陈佩华. 比色法定量测定己酸含量的初步研究 [J]. 酿酒科技, 1995(6): 35-36

[4] 乔林. 己酸菌的特点及其培养 [J]. 酿酒, 1997(2): 27-28

[5] 杨鹏举. 窖泥微生物菌群及其代谢模式 [J]. 酿酒科技, 1995(2): 14-15

[责任编辑: 严海琳]