

泸州大曲酒窖泥中微生物的生态分布和嫌气发酵特征*

吴衍庸 齐义鹏 徐成基 郭世则 鲁新洁

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

在泸州大曲酒新窖老熟的研究方面, 我们对酒窖窖泥中细菌的生态分布及嫌气性细菌的代谢活动作了一些探讨, 本文主要报道这方面

工作的初步结果。

* 参加此项工作的还有: 龚秋纯; 泸州大曲酒厂的罗章美, 李其昌同志。

材 料 和 方 法

酒窖分为窖墙和窖底二部分,老窖又有黄色表层和黑色内层之分。分别取新、老窖不同部位及老窖的不同层次的窖泥做为实验材料。

细菌分离培养基由肉膏、蛋白胨、琼脂(常规)组成,平板计数。嫌气芽孢杆菌的分离分为液体试管淘汰和固体平板纯化两个步骤。所用淘汰培养基有三种:肉膏、蛋白胨(常规);葡萄糖、豆芽汁(常规);巴氏培养液^[1],其组成为(克/升): K_2HPO_4 5.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3, $FeSO_4$ 0.02, 酵母膏 5.0, $CaCO_3$ 2.0, 95% 乙醇 10 (体积/体积), 5% Na_2CO_3 20 (体积/体积), 1% Na_2S 10 (体积/体积), pH 6.8—7.0; 纯化培养基有二种:(1) 酒糟琼脂[泸州大曲酒酒糟浸出液 50% (体积/体积), 95% 乙醇 2.0% (体积/体积), $CaCO_3$ 2.0% (重量/体积), 琼脂 2.0% (重量/体积), pH 6.8—7.0], (2) 改良巴氏琼脂培养基(克/升): 酵母膏 2.0, 95% 乙醇 10 (体积/体积), 醋酸钠 5.0, 葡萄糖 2.0, 琼脂 20, $CaCO_3$ 20, pH 6.8—7.0。嫌气发酵培养基用马铃薯、豆芽汁培养基(常规)。以上培养基均在 15 磅 30 分钟条件下灭菌。

嫌气分离培养用化学吸氧法,即用 10% NaOH: 焦性没食子酸=10:1 (体积/重量) 的溶液吸收氧气;液体试管培养用套管法,固体平板用套皿法。也用金属嫌气罐及玻璃真空干燥器配合化学吸氧法,抽真空至 20 毫微米汞柱。嫌气发酵用液体培养,35℃ 培养一定时间。应注意防止气泡产生而冲开瓶塞。

检验嫌气程度用美蓝氧化还原指示剂。其方法是用 0.015% 的美蓝液、0.06 N NaOH 溶液和 6% 葡萄糖液等体积混合,取一定量注入试管内,加热褪色后,再放入嫌气培养器内。

嫌气芽孢杆菌的分离:在装有 10 毫升淘汰培养液的试管中,接种样品 1.0 克,加热 100℃ 1.5 分钟或 80℃ 10 分钟,然后于 30—35℃ 培养 3 天,取出再加热 80℃ 10 分钟,吸 3 毫升于新的装有培养基的试管中,照上法培养,如此反复淘汰三次,无芽孢细菌均被杀死,只有嫌气芽孢

杆菌存在。然后用纯化培养基制得平板,30—35℃ 培养 5—6 天,挑选菌落,在葡萄糖、豆芽汁斜面上于嫌气状态下保存。

有机酸的纸层析分析是取发酵液离心 10 分钟,用上清液在 Watman 1 号滤纸上点样,层析溶剂为乙醇:氨水(比重 0.88):水=35:2:13 (体积/体积),加入 0.05% 的百里酚蓝作指示剂,室温一次上行层析 4—5 小时,取出于浓盐酸蒸气中显色。

实 验 结 果

一、不同酒窖窖泥中微生物的分布

分别取特曲、头曲和三曲窖池的窖泥中分离得到的好气细菌、嫌气细菌、嫌气和好气芽孢杆菌计数,结果见表 1。

表 1 新、老窖窖泥中细菌的分类计数

细菌名称 及比值	窖名			
	特曲 (老窖)	头曲 (中龄窖)	三曲 (新窖)	老窖/ 新窖
细菌总数	104.1	39.3	33.7	3.1
好气细菌数	17.3	11.0	12.1	1.4
嫌气细菌数	86.8	28.3	21.6	4.0
嫌气细菌/好气细菌	5.0	2.6	1.8	
芽孢细菌总数	46.1	21.6	20.5	2.3
好气芽孢菌数	9.9	5.2	6.5	1.5
嫌气芽孢菌数	36.2	16.4	14.0	2.6
嫌气芽孢菌/好气芽孢菌	3.6	3.1	2.1	

* 多处取样点的混合样品,计算单位为万个/克干土。

从表 1 看出,老窖和新窖窖泥微生物的数量和类型有显著差异,老窖泥的细菌总数超过新窖泥的 2 倍多,而且主要表现在嫌气细菌方面。老窖窖泥中的嫌气细菌总数超过新窖的 3 倍,嫌气芽孢杆菌超过 1.6 倍。而好气细菌,仅略有差异。头曲窖窖泥中的细菌分布数量介于二者之间,但接近于新窖窖泥。

在同一窖中,嫌气菌数量多于好气菌。如特曲窖窖泥中的嫌气菌总数超过好气菌总数的 4 倍,嫌气芽孢杆菌是好气芽孢杆菌的 3.6 倍,头曲窖和三曲窖中的细菌数也有相同的趋势。

因此,泸州老窖是嫌气细菌,特别是嫌气芽孢杆菌的主要栖息地,这是泸州老窖窖泥中独

特的微生物学特征。

二、酒窖中不同部位的微生物分布

分别取窖墙，窖底以及黄色表层，黑色内层的窖泥样品进行微生物的分离计数，结果见表2。

表 2 酒窖中不同部位窖泥的微生物分类计数

不同窖位	实验结果*	细菌名称	细菌总数	好气菌数	嫌气菌数	芽孢杆菌总数	好气芽孢菌数	嫌气芽孢菌数
特曲窖	窖 墙		76.0	3.52	72.5	46.2	9.9	36.2
	窖 底		21.1	3.22	22.9	30.3	12.7	17.3
	表 层		18.4	2.83	15.6	—	—	—
	内 层		139.0	2.39	136.6	—	—	—
	窖墙/窖底		2.9	1.1	3.2	1.5	-1.2	2.0
三曲窖	窖 墙		70.3	4.6	65.7	20.5	6.5	14.0
	窖 底		6.6	2.6	3.9	14.0	5.2	8.7
	窖墙/窖底		10.7	1.8	16.7	1.5	1.2	1.6
老窖/新窖	窖 墙		1.1	-1.3	1.1	2.2	1.5	2.4
	窖 底		4.0	1.2	5.8	2.2	2.4	2.0

* 计算单位为万个/克干土。

从表2结果看出，特曲窖与三曲窖窖墙的好气细菌数和嫌气细菌数没有显著差异。窖底的嫌气细菌却有明显的不同。特曲窖窖底嫌气细菌比三曲窖多4.8倍。如果以芽孢杆菌而言，

则新窖和老窖的窖墙和窖底都有不同。特曲窖中的芽孢杆菌超过三曲窖的1.2倍，其中又以嫌气芽孢杆菌差别更大，同一窖中，窖墙和窖底的好气菌（包括芽孢杆菌）相差较少，主要差别还是在嫌气细菌上。特曲窖的嫌气菌和嫌气芽孢杆菌，其窖墙与窖底的比值分别是3.2和2.0，三曲窖的比值分别是16.7和1.6。而且特曲窖的嫌气细菌主要栖息在窖泥的黑色内层，数量超过窖泥黄色表层的7.7倍。

因此，在泸州大曲酒特曲窖中，窖墙泥和窖底泥的黑色内层中的独具一格的优势微生物群落是嫌气芽孢杆菌，在同一窖中的微生物窖墙多于窖底，不同窖间，窖底的差异大于窖墙。

三、特曲窖中的优势芽孢杆菌群落

我们将特曲窖窖泥的样品，经过三次分离，根据菌落形态的不同，挑选了35个菌落，进行芽孢染色和显微观察，确定其个体形态。凡是芽孢膨大，菌体成鼓锤形的确定为梭状芽孢杆菌属，芽孢不膨大的为芽孢杆菌属或其它孢子杆菌属。结果见表3。

从表3看出，共分离到芽孢杆菌35株，其中鼓锤形杆菌23株，占65.7%，非鼓锤形的其它芽孢杆菌12株，占34.3%。第三次在分离的

表 3 特曲窖中芽孢杆菌的类型

菌株编号	菌落(或斜面)的主要特征	形态	来源	菌株编号	菌落(或斜面)的主要特征	形态	来源
C ₁₀₁	大小中等,皮肤色	鼓锤形		C ₃₁₉	大,薄,不规则,无光泽	鼓锤形	表层
C ₁₀₂	小,斜面不成条纹	鼓锤形		C ₃₂₀	同上	鼓锤形	表层
C ₁₀₃	大,白色	鼓锤形		C ₃₂₁	细小,突起	鼓锤形	内层
C ₁₀₄	大小中等,白色	鼓锤形		C ₃₂₂	大而突起	鼓锤形	内层
B ₁₀₅	大小中等,淡黄色	杆 状		C ₃₂₃	梅花状	鼓锤形	内层
C ₂₀₆	小,淡黄色	鼓锤形		C ₃₂₄	紧密突起	鼓锤形	表层
C ₂₀₇	CaCO ₃ 溶解圈特大	鼓锤形		C ₃₂₅	光滑突起	鼓锤形	内层
C ₂₀₈	透明条纹	鼓锤形		C ₃₂₆	粗糙形	鼓锤形	内层
C ₂₀₉	白色条纹	鼓锤形		B ₃₂₇	针尖状	杆 状	内层
C ₂₁₀	产酸,产气	鼓锤形		B ₃₂₈	水泡状	杆 状	表层
B ₂₁₁	不产酸,不产气	杆 状		B ₃₂₉	水泡状透明	杆 状	表层
C ₂₁₂	不产酸,不产气	鼓锤形		B ₃₃₀	小,透明,光滑	杆 状	表层
B ₃₁₃	小,光滑边缘整齐	杆 状	表层	B ₃₃₁	针尖状,光滑	杆 状	内层
C ₃₁₄	同 上	鼓锤形	内层	B ₃₃₂	大,不规则,米黄色	杆 状	内层
B ₃₁₅	大,薄,不规则	杆 状	内层	C ₃₃₃	细小,光滑	鼓锤形	内层
B ₃₁₆	小,光滑边缘整齐	杆 状	表层	C ₃₃₄	粗糙,皱褶	鼓锤形	内层
B ₃₁₇	大,无光泽	杆 状	表层	C ₃₃₅	针尖,光滑	鼓锤形	表层
C ₃₁₈	小,圆型,突起	鼓锤形	表层				

13个鼓锤形杆菌中,由黑色内层窖泥得到9株,占69.2%,黄色表层窖泥得到5株,占38.5%。

四、梭状芽孢杆菌的主要代谢产物

泸酒的主体香味成分是己酸乙酯,估计在粮食入窖后的长期发酵过程中(三曲窖40天,头、特曲窖60天),窖泥中的梭状芽孢杆菌在代谢过程中产生己酸、丁酸、醋酸并经酯化而使泸酒具有独特的香型。

我们进行了部分菌株的单株和混合菌株的发酵,它们发酵的不同特点见表4。

表4 芽孢杆菌的发酵情况*

菌株及其组合	始发酵期 (小时)	盛发酵期 (小时)	终发酵期 (小时)	特点
C ₁₀₁	16	24	48	发酵缓慢平稳
C ₁₀₂	16	24	48	
其他单株	18—20	24	48	
C ₂₀₆ + C ₂₀₇	7	12	26	发酵旺盛产气量大冲开瓶塞
C ₁₀₁ + C ₁₀₂ + C ₂₀₆ + C ₂₀₇ + B ₁₀₅	5	10	—	

* 发酵程度以产气多少为标准。

从表4及观察可知,一般菌株发酵都在18—20小时就开始有气泡产生。菌株C₁₀₁和菌株C₁₀₂稍有提前,菌株混合培养能加快发酵速度,发酵至10—12小时就产生大量气泡而冲开瓶塞,初发酵期的时间可缩短一半便进入盛发

酵期。

全部菌株的发酵至产气终止后继续培养一定时间,测定代谢产物,每次试验均以2%标准酸作对照,结果见表5,表6。

表6 梭状芽孢杆菌混合培养时的代谢产物测定结果*

混合菌株编号	代谢产物的 R _f 值	
	发酵 33 小时	发酵 144 小时
C ₁₀₁ + C ₁₀₂	0.84, 0.72	0.84, 0.73, 0.55, 0.39
C ₁₀₁ + C ₂₀₆	0.82, 0.71	
C ₁₀₂ + C ₂₀₇	0.82, 0.71	
C ₂₀₆ + C ₂₀₇	0.83, 0.79	0.82, 0.71, 0.57, 0.38
C ₁₀₁ + C ₁₀₂ + C ₂₀₇	0.71	0.85, 0.73, 0.58, 0.41
C ₁₀₁ + C ₁₀₂ + C ₂₀₆ + C ₂₀₇ + B ₁₀₅	0.81, 0.69, 0.34	0.84, 0.71, 0.59, 0.39

* 培养基组分为马铃薯、豆芽汁, pH6.8—7.2; 标准酸 R_f 值: 己酸 0.82—0.845, 丁酸 0.76—0.78, 醋酸 0.66—0.69, 乳酸 0.62。

从表5、表6看出,在马铃薯、豆芽汁培养基中,大部分菌株在单独培养6—12天时,只产生丁酸和醋酸,而二个菌株的混合培养,即使在始发酵期,也可产生微量己酸和醋酸,培养到第六天,有较多量的己酸和醋酸产生,并产生二种低分子的未知酸,菌株C₁₀₁菌株C₁₀₂单独培养到第十二天,也能产生己酸、醋酸和二种未知酸。

讨 论

关于泸州大曲酒窖内微生物的生态学的研究,尚未见报道。根据我们的研究,其窖泥中重要的微生物群落是鼓锤形的梭状芽孢杆菌。

目前,我国已有不少学者认为^[2-4]: 在窖泥中产己酸的梭状芽孢杆菌起了特别重要的作用,它们使这一名酒具有独特的香味和风格。有人分离出产己酸的细菌,在进行单独发酵后添加^[2,3],或用窖泥的人工培养液添加^[4]进去,也收到了提高普通液体发酵生产的白酒品质的效果,这也间接证明了嫌气性梭状芽孢杆菌在这种名酒发酵中的作用。我们利用上述分离菌株的混合培养物和老窖泥的人工培养液,接种于生黄泥培养成“香泥”,用于改窖和培窖。经多次试验可使新窖老熟,提高泸酒质量。试验窖

表5 梭状芽孢杆菌单株培养时的代谢产物测定结果*

菌株编号	代谢产物的 R _f 值	
	发酵 144 小时	发酵 288 小时
C ₁₀₁	0.77, 0.67	0.84, 0.69
C ₁₀₂	0.97, 0.68	0.88, 0.70, 0.47, 0.37
C ₁₀₄	0.74	0.71, 0.61
C ₂₀₆	0.72, 0.64	0.76, 0.62
C ₂₀₇	0.72	0.76
C ₃₁₉	0.77, 0.63	0.72, 0.62
C ₃₂₀	0.73, 0.64	0.73, 0.63
C ₃₂₃	0.64	0.62
C ₃₂₄	0.76, 0.64, 0.52	0.63
C ₃₃₃	0.71, 0.60	0.61
C ₃₃₄	0.72, 0.60	0.73, 0.62
C ₃₃₅	0.75, 0.63	0.75, 0.63

* 见表6注。

(新挖窖)一次出酒经尝评即可达到泸酒头曲水平,具有泸酒固有风格,也证明了窖泥细菌与泸酒香型的密切关系。

根据有关资料^[6],产丁酸的细菌都属于梭状芽孢杆菌属,少数种能产生少量己酸,如:威氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium welchii*),生芽孢梭状芽孢杆菌 (*Cl. sporegenes*),糖丁酸梭状芽孢杆菌 (*Cl. saccharobutyricum*),巴氏固氮梭状芽孢杆菌 (*Cl. pasteurianum*),醋酪酸梭状芽孢杆菌 (*Cl. acetobutyricum*),酪酸梭状芽孢杆菌 (*Cl. butyricum*)。此外,不形成孢子的丁酸杆菌也可以转化丁酸为己酸。只产生己酸的菌株在文献中记载不多,对己酸发酵的研究也较少, Prenat^[5] 和 Barker^[1] 所报道的是两株产己酸的梭状芽孢菌,前者报道的是能发酵糖类的菌,可产生己酸、醋酸、CO₂ 和 H₂,而后者报道所涉及的菌,不能发酵糖,但能将酒精和乙酸转化成己酸和丁酸^[5,6]。

我们分离的大部分鼓锤形梭状芽孢菌,在马铃薯、豆芽汁中单独培养产生丁酸和醋酸,这

是典型的丁酸发酵。而混合培养以及 C₁₀₁, C₁₀₂ 菌株,延长培养时间就有己酸产生,并且此时总是伴随着丁酸消失,醋酸出现这一情况。用 Barker 的乙醇-乙酸培养基试验得不到同样结果。根据这些事实,可以初步认为,我们分离菌株的己酸发酵机制类似于己酸梭状芽孢杆菌而与库氏芽孢梭状杆菌不同。

参 考 文 献

- [1] Barker, H.A.: *Bacterial fermentation*, 28. New York, John Wiley & Sons, Inc. London Chapman & Hall. Ltd. 1956.
- [2] 沈怡方: 微生物学通报, 4(4): 31—32, 1977.
- [3] 内蒙古自治区轻工研究所: 微生物学通报, 4(3): 16—18, 1977.
- [4] 江西食品发酵工业研究所: 微生物学通报 4(3): 18—19, 1977.
- [5] Wood, W. A.: *Fermentation of carbohydrates and related compounds*, IV. Organic Acid fermentations, The Bacteria, Vol. 2: Metabolism (Edi. by Gunsalus, I. C., R. Y. Stanier), Academic press, New York and London, 1961, pp. 131—134.
- [6] Thimann, K. V.: *The Life of Bacteria*. The Macmillan Company. 陆定安, 李季伦译, 细菌的生活, 科学出版社, 北京, 1966, 第 364, 861 页。