

# 产酱香细菌对白酒酿造环境的适应性研究

张春娇<sup>1</sup> 唐贤宝<sup>2</sup>

1.眉山市食品药品检验检测中心 四川眉山 620000;

2.眉山市彭山区人民政府江口街道办事处 四川眉山 620000

**【摘要】**为探究产酱香细菌在白酒酿造环境中的适应性,对分离自浓香型白酒酿造环境中的19株产酱香细菌进行不同环境因素下生长情况研究。结果表明:90%产酱香细菌在温度范围33℃~45℃,PH值8.0~6.0,酒精度5%以下,都能较好生长。有12株能在45℃~55℃高温下生长,14株能在PH6.0~5.0,乙醇浓度5%~7%范围内生长;甚至有4株能耐受55℃高温,2株能耐受PH3.5,1株能耐受酒精度9%。实验表明,这19株产酱香细菌能很好的适应白酒酿造环境并在发酵过程中起着重要作用。

**【关键词】**浓香型白酒;产酱香细菌;酿造环境;适应性

Adapadability of Maotai-producing bacteria to liquor brewing environment

Zhang Chunjiao 1, Tang Xianbao 2

1. Meishan Food and Drug Inspection and Testing Center, Sichuan Meishan 620000;

2. Jiangkou Sub-district Office of Pengshan District People's Government, Meishan, Sichuan 620000

**【Abstract】**In order to explore the bacillus in liquor-making environment adaptability, isolated from Luzhou-flavor brewing in the environment of 19 strains of Bacillus were under different environmental factors on the growth of. The results show that: 90% bacillus in the temperature range of 33 °C ~45 °C, PH, 8.0~6.0, alcohol 5% degrees below, can better growth. There are 12 strains can grow in 45 °C ~55 °C, 14 strains in PH6.0~5.0, ethanol concentration in the range of 5%~7% growth; and 4 strains can tolerate high temperature of 55 °C, 2 strains of tolerance to PH3.5, 1 strains of alcohol tolerance of 9%. Experiments show that, these 19 strains of Bacillus is well suited for liquor-making environment and plays an important role in the process of fermentation.

**【Key words】**Luzhou-flavor liquor; Bacillus; brewing environment; adaptabil

## 第一章 研究背景与意义

白酒是我国传统的发酵食品,历史悠久。白酒酿造环境中微生物菌群复杂繁多且分布广泛,一般有广义与狭义之分;从广义上讲,微生物来源于空气、原料、用水、窖泥、糟醅、曲房、曲药、窖池、工具、人等;从狭义上讲,主要来源于窖泥、大曲、糟醅、窖池<sup>[1]</sup>。白酒生产过程,其实就是各类微生物的代谢过程,对微生物的研究水平影响着白酒的生产技术,从而影响白酒的质量、微生物群落结构,尤其是风味微生物菌群的结构;这对白酒产量和质量起着决定性

作用<sup>[2]</sup>。目前,对酱香型白酒中产香细菌研究的报道很多,但对浓香型环境中产香细菌的研究却很少。因此,开展对浓香型白酒酿造环境中产香细菌的研究显得尤为重要。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 供试菌剂

19株供试菌株保存于发酵资源与应用四川省重点实验室。

表2-1 19株产酱香细菌编号及来源

编号	模式菌株	样点	编号	模式菌株	样点
H9B-19	Bacillus aryabhattai	曲药	Z2B'-10	Bacillus thuringiensis	糟醅
J2B-75	Bacillus stratosphericus	曲药	G9B-43	Lysinibacillus sphaericus	糟醅
J9B-7	Bacillus cereus	曲房	Z2B'-16	Rummeliibacillus pycnus	糟醅
S433B'-69	Bacillus anthracis	曲房	W9B-8	Bacillus cereus	糟醅
W8B-45	Bacillus cereus	曲房	Z2B-21	Bacillus cereus	糟醅
S12B'-177	Staphylococcus saprophyticus	曲房	Z9B-55	Bacillus methylotrophicus	窖泥
J9B-57	Bacillus cereus	曲房	W9B-18	Pseudomonas korensis	窖房

G7B'-61	Bacillus methylotrophicus	曲房	W8B-51	Enterobacter hormaechei	窖房
W9B-29	Bacillus tequilensis	糟醅	W8B-61	Paracoccus chinensis	窖房
Z4B-5	Bacillus licheniformis	糟醅			

### 2.1.2 主要仪器和试剂

试剂：琼脂、蛋白胨、NaCl、牛肉膏、NaOH、HCl、无水乙醇等。

仪器：LRH-1CU 恒温培养箱（上海齐欣科学仪器有限公司）、JJ-CJ-1CU 超净工作台（吴江市净化设备总厂）、LDZX-75KBS 高压蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）、DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱（上海齐欣科学仪器有限公司）、高速离心机（德国艾本德股份公司）、紫外分光光度计（北京赛多利斯仪器系统有限公司）。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 培养基

NA 固体培养基<sup>[3]</sup>、NA 液体培养基

#### 2.2.2 菌株活化

灭菌后的物品放置于超净工作台，紫外杀菌；培养基冷却至 55℃左右倒平板，划线接种；液体冷却后直接接种，置于 37℃恒温箱培养 24h。

#### 2.2.3 产酱香细菌生长条件的研究

##### 2.2.3.1 温度

NA 液体培养基分装到三角瓶（30mL/50mL），灭菌后冷却；接种后分别在 33℃、35℃、37℃、39℃、41℃、45℃、50℃、55℃、60℃的温度梯度下培养 24h。用移液器吸取 1.5ml 菌悬液于离心管离心 3~5min（转速 3000 r/min），去除上清液，用无菌生理盐水漂洗菌 3 次收集到待测液。以无菌生理盐水作空白对照，在波长 600nm 处测定待测液吸光度值。

##### 2.2.3.2 PH 值

用 HCl 调节 NA 液体培养基 PH 值为 8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5，灭菌后接种活化后的菌种；在 37℃培养 24h 得到浓度均一的菌悬液。以空白培养液在相同条件处理后作对照，测定其吸光度值。

##### 2.2.3.3 乙醇浓度

活化后的菌株分别接种至乙醇浓度梯度为 1%、3%、5%、7%、9%（按体积比）的 NA 液体培养基，在 37℃条件下培养 24h 得到浓度均一的菌悬液。以空白培养液在相同条件处理后作对照，测定其吸光度值。

## 第三章 结果与分析

### 3.1 产酱香细菌的生态分布

19 株产酱香细菌分别分离自曲药（2 株）、曲房（6 株）、窖房（3 株）、窖泥（1 株）、糟醅（7 株）。分离自糟醅的产酱香细菌占比最大。一是糟醅营养丰富，湿度大，适宜好氧细菌和兼性厌氧菌的附着、生长<sup>[4]</sup>；二是糟醅在生产过程中富集了其他样点的大量细菌。其次是在曲房中，产酱香细菌

对浓香型白酒香味风格的形成起一定作用。窖泥中最少，可能是由于窖泥中成分复杂、营养成分来自糟醅和黄水，很难富集某一类细菌；另外，窖泥环境波动较小，某些高酸兼性厌氧菌、甲烷菌等经过长期驯化形成了相对稳定的菌落关系；很难通过平板分离出来。

### 3.2 种属与产酱香细菌的关系

产酱香细菌分布 4 个种属，其中 Bacillus 芽孢杆菌属（15 株）、Paracoccus 球菌属（2 株）、Pseudomonas 假单胞菌属、Enterobacter 肠杆菌属各 1 株。芽孢杆菌属细菌占产酱香细菌数最大，为 78.9%。由此可以得出，白酒的酱香味的形成与芽孢杆菌属细菌有一定的相关性<sup>[5]</sup>。特别是高温大曲中芽孢杆菌被认为对酱香风味的物质形成起主要作用<sup>[6、7]</sup>。另外，其他种属细菌也表现出产酱香。

### 3.3 最适生长条件的探究

#### 3.3.1 最适温度的探究

表 3-1 产酱香细菌最适温度的探究

最适温度	33℃	35℃	37℃	39℃	41℃	45℃	50℃	总计
曲药				2				2
曲房			1		3	2		6
窖房			2	1				3
窖泥			1					1
糟醅		3		2	2			7
总计		3	4	5	5	2		19

注：表中数据代表产酱香细菌菌株数，未列出的代表零株；下同。

实验表明，菌株最适温度主要集中在 37~41℃之间（表 3-1）。说明适当的高温有利于产酱香细菌的生长，对浓香型白酒酱香味的形成有一定的帮助。其中，曲药中产酱香细菌最适温度在 39℃，曲房中产酱香细菌最适温度大多为 41、45℃，可能由于大曲制作过程中细菌经过长期的驯化适应了中高温，能够生长最旺盛。酿造环境中糟醅一般在温度 35~40℃，从糟醅分离出的产酱香细菌在 35~40℃温度范围内可能促进浓香型白酒酱香味的形成。实验表明，产酱香细菌最适生长温度的不同与菌株的来源有一定的相关性。

根据李卓佳<sup>[8]</sup>等人对几株芽孢杆菌对温度、PH 的耐受性研究方法，OD 值在 0.1 及以下为不生长。根据在实验中测定 OD 值和平板观察可得出 OD 值在 0.2-0.5 范围内生长良好，OD 值在 0.5-1.0 范围内生长旺盛。图 3-1 中产酱香细菌在温度 33℃-45℃的范围生长旺盛。由表 3-4 和图 3-1 可知，12 株产酱香细菌在温度 45℃-55℃范围内 OD 值在

0.1-0.3,说明大多数产酱香细菌在此温度范围生长不是很旺盛,但同样能生长良好。由此可知适当的高温有利于产酱香细菌的生长繁殖,但过高的温度又会抑制其生长;总的来说,产酱香细菌能很好的适应白酒酿造环境。

### 3.3.2 最适 PH 值的探究

表 3-2 样点对产酱香细菌最适 PH 的影响

最适 PH 样点	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	总计
曲药				2				2
曲房				3	2	1		6
窖房		1		1	1			3
窖泥					1			1
糟醅		1		5	1			7
总计		2		11	5	1		19

由表 3-2 可得,产酱香细菌最适 PH 大多数在 7.0-7.5,少数在 6.0 和 8.0。说明产酱香细菌可能适宜在稍微偏碱的环境下生长。一般浓香型白酒的酿造过程中,刚开始酒醅的 PH 会迅速升高,但之后会逐渐降低<sup>[9]</sup>。在酸性环境中,少数产酱香细菌经过长期驯化,形成了稳定的菌落关系,慢慢适应了酸性环境。

产酱香细菌在 PH7.5-7.0 范围内(OD 值大致在 0.2-0.9 之间)生长旺盛,表明产酱香细菌适宜在稍微偏碱的环境下生长。但在 PH6.5-5.0 范围内(OD 值大致在 0.1-0.5 之间)产酱香细菌仍能生长,说明这些产酱香细菌也能适应稍微偏酸的环境。这可能是由于产酱香细菌长期处于窖内环境中,经过驯化后从而体现出能够适应这种酸性环境的特征。实验说明,产酱香细菌在发酵后期可能存在,并且为后期白酒的生香提供前体物质;对白酒品质的提高起着重要作用。

### 3.3.3 产酱香细菌对乙醇浓度的适应性

产酱香细菌生长趋势随着乙醇浓度的增加而下降。通常

情况下,白酒酿造环境内可能达到的乙醇浓度最高为 7%~8%,而窖内环境主发酵结束后乙醇浓度在 5.2~5.5%<sup>[10]</sup>。实验表明,产酱香细菌可以很好的适应窖内的乙醇浓度环境,有几株甚至可以耐受 7%乙醇浓度。说明产酱香细菌很可能在窖内发酵后期存在并且发挥作用,从而增加白酒的风味。

由以上实验数据发现 1 株产酱香细菌(H9B-19)能在温度为 50℃,PH 为 4.5,乙醇浓度为 7%的条件下生长;1 株产酱香细菌(W9B-29)在温度为 55℃,PH 为 3.5,乙醇浓度为 9%的条件下生长。体现出这 2 株细菌在高酸高温高酒精环境中有很好的适应性,在白酒生产上具有潜在的应用价值。

## 第四章 结论与讨论

为探究 19 株产酱香细菌的生理特性,分别在不同温度、PH、乙醇浓度进行了探究实验;初步得出以下结论:

1、大多数(90%)产酱香细菌在温度范围 33℃~45℃,PH 值 8.0~6.0,酒精度 5%以下,都能较好生长。有 12 株能在 45℃~55℃高温下生长,14 株能在 PH6.0~5.0,乙醇浓度 5%~7%范围内生长;甚至有 4 株能耐受 55℃高温,2 株能耐受 PH3.5,1 株能耐受酒精度 9%。实验表明,这 19 株产酱香细菌能很好的适应白酒酿造环境并在发酵过程中起着重要作用。

2、一株产酱香细菌 W9B-29 能耐受 55℃、PH3.5、乙醇浓度 9%(v/v),1 株产酱(H9B-19)能耐受温度 50℃,PH4.5,乙醇浓度 7%的生长环境;具有极高的应用价值。

3、19 株浓香型白酒酿造环境中分离的产酱香细菌,其中分离自曲房和糟醅的产酱香细菌比例高,Bacillus 属占产酱香细菌比例最高。

## 参考文献

- [1]沈怡方.白酒生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998.29-32.
- [2]赵爽,杨春霞,廖永红,等.白酒生产中酿酒微生物研究进展[J].中国酿造,201231(4):5-10
- [3]周德庆.微生物学教程(第二版),高等教育出版社
- [4]周瑞平,陈云宗,唐代云.多粮浓香型白酒厂内细菌多样性及分布的研究[J].食品科学,2010(13):210-212
- [5]李贤柏.郎酒高温大曲产酱香细菌的研究.重庆师范学院学报(自然科学版),1997(4):21-23.
- [6]王和玉,杨帆,林琳,等.地衣芽孢杆菌固态发酵代谢产物分析[J].酿酒科技,2011(9):32-34.
- [7]杨帆,林琳,王和玉,等.茅台大曲中 3 株芽孢杆菌代谢产物的比对分析[J].酿酒科技,2011(8):42-43.
- [8]李卓佳,陈康德,陈永青,等.几株芽孢杆菌对温度、制粒工艺及 PH 值的耐受性[J].湛江海洋大学学报,2003(6):17-20.
- [9]周瑞平,陈云宗,唐代云.多粮浓香型白酒厂内细菌多样性及分布的研究[J].食品科学,2010(13):210-213.
- [10]方军,张宿义.浓香型白酒发酵过程中各因子动态变化研究[J].酿酒科技,2012(1):47-50.