

浓香型大曲发酵过程中细菌消长情况初探

潘明¹,侯华²,谢仁有¹,洪玉程¹

(1. 四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000; 2. 四川江口醇酒业(集团)有限公司,四川 巴中 636400)

摘要:试验研究了浓香型大曲发酵过程中细菌的消长情况,并从大曲及其生产环境中分离纯化鉴定出21株细菌。在大曲培养各阶段中细菌理化指标的变化呈一定规律性。乳酸菌的消长和其酸度呈显著相关。芽孢杆菌的消长与淀粉含量的变化呈显著相关。同时温度和水分含量变化对好氧细菌有显著影响,温度对芽孢杆菌和乳酸菌菌落的消长无显著相关。湿度对好氧细菌、芽孢杆菌和乳酸菌菌落的消长没有显著影响。

关键词:浓香型大曲;细菌;消长;理化指标;相关性

中图分类号:TS261.1

文献标识码:A

引言

大曲白酒是我国白酒的一大类产品^[1],大曲是大曲白酒的糖化剂和发酵剂^[2],其培养、保存及应用方法是我国劳动人民智慧和经验的结晶,至今仍有其理论价值和实用价值。大曲是大曲酒酿造生产中的重要物质,是酿酒生产的糖化、发酵、酒化和生香剂,含有多种微生物及其产生的多种酶类,其品质对曲酒的出酒率和酒质都有极大的影响,常有“曲是酒之骨”之称^[3]。大曲中的微生物主要有霉菌、酵母及细菌。分离纯化并鉴定大曲细菌是了解大曲菌系及酶系的基础,具有重要意义。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源和处理

“久香”牌包包曲,由泸州老窖生物工程有限责任公司提供。

1.1.2 空气微生物的采样

曲厂之外,分为四个方向,每个方向布3个点,每隔

500 m布两个点,每个方向整体呈S型随机布点;厂区之内随机布点:制曲车间和曲房布点时采取对角线布点,每条对角线取五点布点。采用平皿落菌法:取不同的培养基制成平板,在测定环境中选择具有代表性的5个点,揭开皿盖,分别暴露于待测空气中5 min。

1.1.3 实验试剂和设备

Biolog微生物自动鉴定仪(美国Biolog公司),显微成像系统(日本NIKON公司),KD23B-DE电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),BCM-1000A生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),YX-280B手提式灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂),JA2003电子天平(上海衡平仪器仪表厂),MJ培养箱(上海和羽电子科技有限公司)。

1.1.4 细菌分离培养基

好氧细菌培养基:牛肉膏3 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,琼脂15~20 g蒸馏水1000 mL,pH 7.0~7.2。

芽孢杆菌的培养基:牛肉膏6 g,蛋白胨20 g,NaCl 10 g,琼脂15~20 g蒸馏水1000 mL,pH 7.0~7.2。

乳酸菌的培养基:蛋白胨1 g,牛肉膏1 g,酵母浸膏0.5 g,葡萄糖2 g,Tween80 0.1 mL,K₂HPO₄ 0.2 g,醋酸

收稿日期:2012-05-04

基金项目:四川省应用基础项目(2008JY0091);四川省教育厅重大培育项目(07ZZ018)

作者简介:潘明(1966-),女,湖北麻城人,教授,博士,主要从事食品生物技术方面的研究,(E-mail)panming106@163.com

钠 0.5 g,柠檬酸铵 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02 g, 琼脂 1.8 g, 1.6% 溴甲酚绿酒精溶液 0.007 mL, 蒸馏水 100 mL, pH6.2~6.6。

水琼脂平板:琼脂粉 2 g, 蒸馏水 100 mL, 灭菌 0.10 Mpa 15 min。

1.1.5 细菌 Biolog 鉴定培养基

BUG + B 培养基, BUG + M + T^[4]。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养基的筛选

通过不同的乳酸菌培养基,芽孢杆菌培养基分离微生物数量和种类的多少以及单离效果的比较,筛选出最佳各类细菌的培养基。

1.2.2 分离计数效果分析

主要从菌落数量、形态类别、单离效果等指标进行判断。

1.2.3 细菌鉴定

细菌先以革兰氏染色做初步的形态鉴定,再根据生理生化测定结果对照中国科学院《常见细菌鉴定手册》鉴定,最后用 Biolog 微生物自动鉴定仪鉴定^[4]。

1.2.4 理化测定

对分离细菌理化指标检测参照文献^[5]。

1.2.5 数据分析

利用 SPSS 软件分析试验数据的相关性^[6]。利用 Mintab15 分析回归方程^[7]。

2 结果与分析

2.1 空气和原料中的细菌种类分布

如表 1 所示,空气中的细菌数量以制曲车间最多,厂区的为最少,这与空气的流动和潮湿的车间有关。空气和原料中的细菌种类较为广泛:葡萄球菌属、杆菌属、芽孢菌属。杆菌分别属于醋酸杆菌属、乳酸杆菌属和芽孢杆菌属。

表 1 空气中细菌的数量和种类

	厂区	制曲车间	曲房
数量 (cfu/m ³)	133.3	357.6	266.6
主要种类	乳酸菌居多	芽孢杆菌居多	芽孢杆菌居多

注:空气细菌菌落总数 (cfu/m³) = 50000N/AT, A 代表平板面积 (cm²), T 代表平板暴露时间 (min), N 代表平均菌落数 (cfu/平板)。

2.2 细菌的初步鉴定

通过细菌形态的镜检和初步的生理生化试验,把细菌初步分类为革兰氏阴性和革兰氏阳性两大类^[8],分别为阳性: X-2, X-3, X-4, X-6, X-7, X-8, X-9, X-21; 阴性: X-1, X-5, X-10, X-11, X-12, X-13, X-14, X-15, X-16, X-17, X-18, X-19, X-20。

2.3 细菌的 Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定结果及分析

2.3.1 Biolog 微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定

本试验从大曲及其生产环境中分离纯化鉴定出 21 株细菌^[9]: X-1、X-5、X-10、X-11、X-12、X-13、X-14、X-15、X-16、X-17、X-18、X-19、X-20 分别为阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*), 深红沙雷氏菌 (*Serratia rubidaea*), 阪多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida ss multocida*), 鸟博德特菌 (*Bordetella avium*), 栖冷克吕沃尔氏 (*Kluyvera cryocrescens*), 维罗纳气单胞菌 (*Aeromonas encheleia*), 鳃鱼气单胞菌 (*Aeromonas veronii DNA group 10*), 丁香假单胞菌向日葵致病变种 (*Pseudomonas syringae pv helianthi*), 亨氏普罗威登斯菌 (*Pasteurella pneumotropica*), 达可马巴斯德氏菌 (*Pasteurella dagmatis*), 荚壳伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia glumae*), 侵肺巴斯德氏菌 (*Providencia heimbachae*), 乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus/ genospecies 1*)。X-2、X-3、X-4、X-6、X-7、X-8、X-9、X-21 分别为藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*), 玫瑰红 (紫红) 红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*), 松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*), 耳炎短杆菌 (*Brevibacterium otitidis*), 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*), 乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici/ parvulus*)。

2.3.2 培养期的细菌种类的分布

(1) 乳酸菌的变化和分析

乳酸菌在大曲中生长繁殖,分解碳水化合物,在代谢过程中不断的生成乳酸及其转化而成的乳酸乙酯^[10]。从图 1 中可以看出,发酵期间的酸度值和乳酸菌菌落的走势基本一致,而微生物新陈代谢产生的有机酸被消耗或转化成了别的物质,参与其它化学反应,故而开始走势偏缓,到七天后乳酸菌的数量下降很快,酸度下降也很快,到成熟期乳酸菌和酸度比较平稳。

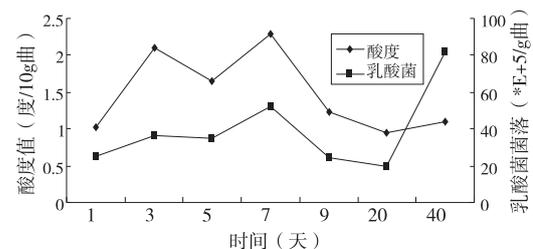


图 1 酸度和乳酸菌变化趋势图

发酵过程中,大曲的酸度和乳酸菌菌落数呈强正相关性,相关系数为 0.941 ($P < 0.05$) (表 2)。同时还有短杆菌、链球菌和白地霉等具有一定的产酸能力^[11],还需要进一步的探明它们的数量变化是否对产酸、产酸物

质的影响,对各种酯类的形成的研究提供科学依据和来源。通过 Minitab15 对乳酸菌回归拟合得到拟合方程:
 $Y = 21.10 - 8.276X + 0.8466X^2$ 。

表2 酸度与乳酸菌菌落数相关性

	菌落数 X	酸度值 Y
菌落数 X:pearson correlation	1	0.941 **
Sig. (2 - tailed)	0	0.02
N	7	7
酸度值 Y:pearson correlation	0.941 **	1
Sig. (2 - tailed)	0.02	0
N	7	7

注: ** correlation significant at the 0.01 level

(2) 培养期芽孢杆菌变化图

在大曲的发酵过程中,芽孢杆菌的存在主要产淀粉酶、蛋白酶和己酸乙酯^[11],其数量的多少将直接影响淀粉的分解、小麦中蛋白质的分解和己酸乙酯的产生。如图2所示,该三种芽孢杆菌在培养前期均是缓慢的上升,枯草芽孢杆菌在堆积转化期有一个较大的上升,在储藏期开始下降,短小芽孢杆菌在储藏期开始下降,而巨大芽孢杆菌在堆积转化期以前增加缓慢,在堆积转化期增长开始加快。

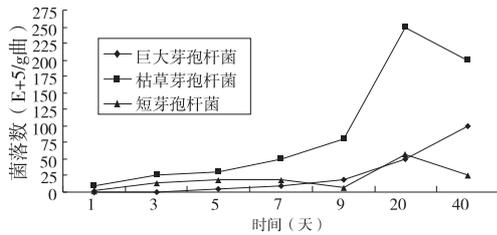


图2 培养期芽孢杆菌变化

2.3.3 温度变化与细菌菌落消长规律

从温度与细菌的相关性角度分析可知(表3): sig = 0.036,温度与好氧细菌菌落数的相关性非常显著,也说明了温度对好氧细菌的消长影响显著,但是温度对芽孢杆菌和乳酸菌菌落的消长并不显著。通过 Minitab15 温度对好氧细菌回归拟合得到拟合方程: $Y = 647 + 21.5X$ 。

表3 温度与细菌菌落数的相关性

	好氧细菌 Y	芽孢杆菌	乳酸菌
温度 X: Pearson correlation	0.785 **	-0.456	0.062
Sig. (2 - tailed)	0.036	0.304	0.895
N	7	7	7

注: ** correlation significant at the 0.01 level, * correlation significant at the 0.05 level(2 - tailed)

2.3.4 湿度变化与细菌菌落消长规律

从湿度与细菌的相关性角度分析可知(表4): sig = 0.312,湿度与好氧细菌菌落数之间没有非常显著的关系,也不和芽孢杆菌和乳酸菌有显著的相关性。

表4 湿度与细菌菌落消长的相关性

	好氧细菌	芽孢杆菌	乳酸菌
湿度 pearson correlation	-0.449	-0.448	-0.040
Sig. (2 - tailed)	0.312	0.314	-0.933
N	7	7	7

注: ** correlation significant at the 0.01 level, * correlation significant at the 0.05 level(2 - tailed)

2.3.5 水分变化与好氧细菌消长规律

如图3所示,随着水分含量的减少,好氧细菌的数量逐渐上升,在堆积转化期的水分变化较大,细菌的数量在该阶段有一个较大幅度的上升。

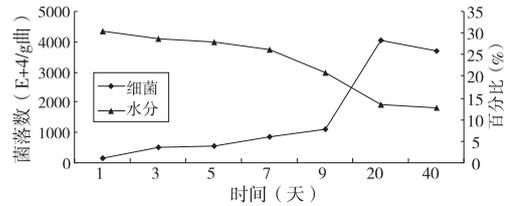


图3 细菌数量和水分趋势

从表5可以得知,大曲水分含量与乳酸菌的消长变化呈现正相关性,和好氧细菌和芽孢杆菌呈现强的负相关性,且显著性很强。水是生命活动的重要成分,微生物的生长离不开水分,在制曲的不同阶段,对水分的要求亦不同,制曲用水一个重要作用就是调节品温^[10]。通过 Minitab15 对水分回归拟合得到拟合方程:

乳酸菌与水分含量的拟合方程:

$$Y_1 = 0.767 + 0.4174X + 0.008412X^2$$

好氧细菌与水分含量的拟合方程:

$$Y_2 = 62.11 - 8.899X + 0.4379X^2 - 0.006808X^3$$

芽孢杆菌与水分的拟合方程:

$$Y_3 = 909.2 - 54.72X + 0.8478X^2$$

表5 水分含量与细菌消长的相关性分析

	乳酸菌 Y ₁	好氧细菌 Y ₂	芽孢杆菌 Y ₃
Pearson correlation	0.762 *	-0.494 **	-0.973 **
Sig. (2 - tailed)	0.046	0.001	0.000
N	7	7	7

注: ** correlation significant at the 0.01 level, * correlation significant at the 0.05 level(2 - tailed)

2.3.6 芽孢杆菌菌落消长与淀粉含量变化

芽孢杆菌在发酵过程中的作用及产物主要是产生 α 淀粉酶,蛋白质和己酸乙酯,期间 α - 淀粉酶会对小麦的淀粉充分的分解如图4所示^[11-12],随着芽孢杆菌菌落数的上升,淀粉含量逐渐下降,在堆积转化期芽孢杆菌急剧上升,但是淀粉含量变化较小,需进一步研究其中的原因。

如表6相关性表所示, sig = 0.045,芽孢杆菌菌落的消长对淀粉有非常显著的相关性。通过 Minitab15 对

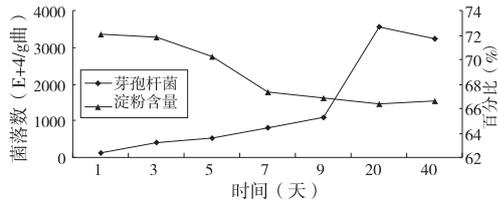


图 4 芽孢杆菌菌落的消长对淀粉的影响

水分回归拟合得到芽孢杆菌与淀粉含量的拟合方程: $Y = 73.65 - 0.08X + 0.00017X^2$ 。

表 6 芽孢杆菌与淀粉含量的相关分析

	芽孢杆菌 X
淀粉 Y: pearson correlation	-0.765 *
Sig. (2 - tailed)	0.045
N	7

注: * Correlation is significant at the 0.05 level (2 - tailed).

3 结束语

经过最佳培养基培养出 21 株优势菌株,革兰氏阴性菌分别为阪崎肠杆菌,深红沙雷氏菌,阪多杀巴斯德氏菌,鸟博德特菌,栖冷克吕沃尔氏,维罗纳气单胞菌,鳗鱼气单胞菌,丁香假单胞菌向日葵致病变种,亨氏普罗威登斯菌,达可马巴斯德氏菌,荚壳伯克霍尔德氏菌,侵肺巴斯德氏菌,乙酸钙不动杆菌;革兰氏阳性菌分别为藤黄微球菌,玫瑰红(紫红)红球菌,松鼠葡萄球菌,耳炎短杆菌,巨大芽孢杆菌,枯草芽孢杆菌,短芽孢杆菌,乳酸片球菌。

乳酸菌在前七天缓慢的增加,其每一个测定阶段增幅不一,一直到储藏期之前一直处于下降,相应的酸度也开始下降,到储藏期又开始上升,其酸度和乳酸菌菌落的消长的相关性是非常显著的。芽孢杆菌在培养前期增加缓慢,到堆积转化期有较大的增幅,枯草和短小芽

孢杆菌在储藏期开始下降,其消长对淀粉含量的变化构有显著的相关性。同时温度和水分含量变化对好氧细菌有显著的影响,但是温度对芽孢杆菌和乳酸菌菌落的消长没有显著的相关性,水分含量变化则有。湿度均对好氧细菌、芽孢杆菌和乳酸菌菌落的消长没有显著的影响。

参考文献:

- [1] 唐玉明,沈才洪,任道群,等.酒曲理化品质指标相关性探讨[J].酿酒科技,2006(7):37-41.
- [2] 武化新.大曲发酵力、酯化力检测和曲质综合分析[J].酿酒,1997(4):19-20.
- [3] 唐玉明.酒曲理化品质指标相关性探讨[J].酿酒科技,2006(7):37-41.
- [4] 程池.Biolog 微生物自动分析系统—酵母菌鉴定操作规程的研究[J].食品与发酵工业,2006(5):50-55.
- [5] 蔡定域.酿酒工业分析出版社[M].北京:轻工业出版社,1988.
- [6] 郝林.食品微生物学试验技术[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [7] 周恒刚.制曲原料[J].酿酒,1997(1):1-9.
- [8] 黄秀丽.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [9] 潘明,张强,于海光,等.酒曲中霉菌的分类统计[J].化学与生物工程,2010,27(3):73-76.
- [10] 周恒刚.制曲水分[J].酿酒科技,2004(6):23-25.
- [11] 李云英,李能树.大曲酒微生物区系的初步研究[J].生物学杂志,2006(3):19-21.
- [12] 黄丹,尚志超,袁先铃,等.曲中根霉固态发酵产糖化酶条件研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(3):9-13.

Exploration of Changes of Bacteria During Luzhou-flavour Daqu

PAN Ming¹, HOU Hua², XIE Ren-you¹, HONG Yu-cheng¹

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China;

2. Sichuan Jiangkouchun Group, Bazhong 636400, China)

Abstract: Through the screening raise purification and Biolog, appraise 21 superiority bacterium strains were found from Luzhou-Daqu. The change of physical and chemical indexes of bacteria in various phases is a certainly regularity. The increase and decrease of acidity and the lactobacillus have the extremely remarkable relevance to colony. The bacillus' increase and decrease have the remarkable relevance to the starch content change. At the same time, the change of the temperature and the moisture has a remarkable influence to the good oxygen bacterium, but the bacillus and lactobacillus colony increase and decrease have no remarkable relevance with temperature. Humidity has no remarkable influence to good oxygen bacterium, bacillus and lactobacillus colony.

Key words: Luzhou-Daqu; bacterium; growth and decline law; physical and chemical index; relevance