

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2023.01.003

# 高温大曲中一株高产酸细菌的筛选与生物学特性分析

蒋泽元<sup>a</sup>, 周明茂<sup>a</sup>, 李欢<sup>b</sup>

(茅台学院 a. 酿酒工程系; b. 旅游管理系, 贵州仁怀 564507)

**摘要:**产酸菌是高温大曲中的一类重要细菌微生物,其主要作用是在酿酒过程中通过发酵为白酒提供香味成分和增加白酒口感风味,目前对高温大曲中产酸菌特性的研究较少。用高温大曲通过富集培养、钙平板分离纯化获得酱香大曲细菌菌株 7 株;通过定性定量试验,发现命名为 RS-6 的菌株产酸量最高,达到 2.13 g/L;通过耐乙醇、耐乙酸、耐盐和耐高温试验进一步对 RS-6 菌株进行研究,发现该菌株的最高乙醇耐受质量分数为 7%,最高乙酸耐受质量分数为 3%,最高盐耐受质量分数为 0.8%,最适生长温度为 30 °C。研究表明,从高温大曲中筛选到一株产酸量高、乙醇耐受性高和耐盐性高的产酸细菌。

**关键词:**大曲;产酸菌;分离纯化;生物特性

中图分类号:TS261.13 文献标志码:A 文章编号:1673-1891(2023)01-0011-06

## Screening and Biological Characteristics Analysis of a High Acid Producing Bacterium in High-Temperature Daqu

JIANG Zeyuan<sup>a</sup>, ZHOU Mingmao<sup>a</sup>, LI Huan<sup>b</sup>

(a. Department of Brewing Engineering; b. Department of Tourism Management, Moutai Institute, Renhuai, Guizhou 564507, China)

**Abstract:** Acid producing bacteria are a kind of important bacteria and microorganisms in high-temperature Daqu. Their main role is to provide flavor components for liquor and increase liquor flavor through fermentation in the process of liquor brewing. However, there are few studies on the characteristics of acid producing bacteria in high-temperature Daqu. In this study, 7 strains were obtained by preliminary screening through enrichment culture and calcium plate from High-temperature Daqu. Through qualitative and quantitative experiments, it was found that RS-6 strain had the highest acid production, reaching 2.13 g/L. The strain RS-6 was further studied by ethanol resistance, acetic acid resistance, salt resistance and high temperature resistance experiments. It was found that the strain had the quality of 7% ethanol resistance, 3% acetic acid resistance, 0.8% salt resistance and its optimum growth temperature was 30 °C. The study indicated that a strain of acid producing bacteria with high acid production, high ethanol tolerance and high salt tolerance was screened from high temperature Daqu.

**Keywords:** Daqu; acid bacteria; separation and purification; biological characteristics

### 0 引言

在白酒发酵过程中,大曲作为酿酒微生物菌源,不仅提供了大量的微生物,还为发酵过程提供了相关酶和一些风味成分的前体物质<sup>[1]</sup>。大曲中含有的微生物种类非常复杂,主要包括 3 大类:酵母菌、霉菌和细菌<sup>[2]</sup>。大曲中的产酸细菌主要有醋酸菌、芽孢杆菌、乳酸杆菌等,其菌落形态一般较小、分布较广、繁殖速度也快,在新酒曲的细菌种类中,

醋酸菌较多<sup>[3]</sup>。大曲中的醋酸菌多呈杆状,是典型的好氧细菌,其主要作用是氧化葡萄糖生成乙酸和少量乙醇,并抑制酵母菌的生长<sup>[4]</sup>。

目前,学者们从多方面对醋酸菌进行了研究。李学思等<sup>[5]</sup>分析研究了浓香大曲中醋酸菌随着培养时间的延长而变化,并从宋河大曲中分析得出大曲中曲皮与曲心微生物的总体变化趋势一样,少部分会因曲皮和曲心的环境不同而产生差别;侯小歌等<sup>[6]</sup>对宋河大曲中的醋酸菌进行分离鉴定并研究了

收稿日期:2022-07-07

基金项目:茅台学院高层次人才科研启动基金(mygccrc[2022]015)。

作者简介:蒋泽元(1986—),男,贵州盘州人,副教授,博士,主要研究方向:微生物学。

其耐乙醇和产酸特性,一共分离得到 7 株醋酸菌,并分析得出宋河大曲中主要的醋酸菌是氧化葡萄糖杆菌和醋化杆菌;孙鹏飞<sup>[7]</sup>从衡水老白干酒中筛选出高产乙酸的巴氏醋酸杆菌,并通过单因素试验和正交试验对产酸菌的培养条件和培养基进行了优化,确定了产酸菌的最适产酸条件和培养基的最优成分组成。醋酸菌作为重要的产酸细菌,本研究首次对酱香型白酒高温大曲中产酸细菌进行分离筛选和生物特性分析,以期对酱香型白酒生产提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料、主要试剂和仪器

材料:高温大曲,2021 年 9 月采自茅台镇某酒厂。

主要试剂:(1)0.85% 无菌生理盐水;(2)醋酸菌富集培养基:葡萄糖 1 g,酵母膏 1 g,磷酸二氢钾 0.5 g,去离子水 97 mL,pH 5.5,121 °C 灭菌 30 min,然后冷却至 70 °C 时添加 3 mL 无水乙醇;(3)钙平板分离培养基:葡萄糖 3 g,酵母浸粉 3 g,碳酸钙 3 g,琼脂 4.5 g,去离子水 93 mL,115 °C 灭菌 30 min,然后冷却至 70 °C,加入 9 mL 无水乙醇;(4)基础培养基:葡萄糖 1 g,酵母浸粉 1 g,去离子水 97 mL,pH 5.5,115 °C 灭菌 30 min,然后冷却至 70 °C 时,加入 3 mL 无水乙醇;(5)发酵培养基:葡萄糖 7 g,酵母浸粉 3.5 g,磷酸二氢钾 0.42 g,硫酸镁 0.28 g,去离子水 700 mL,pH 5.5,115 °C 灭菌 30 min。

主要仪器:培养箱(SHP-250 型,上海森信实验仪器有限公司);摇床(HZQ-C 型,常州上特仪器制造有限公司);离心机(TD5Z 型,南北仪器公司);水浴锅(HH-6 型,常州润华电器有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 产酸菌富集与分离纯化

取 100 mL 三角瓶一只,加入 0.85% 无菌生理盐水 90 mL,然后加入待试高温大曲 10 g,每 5 min 振荡一次,浸泡 30 min 后,振荡均匀吸取上清液 5 mL 加入另一只 100 mL 三角瓶(已装有 95 mL 醋酸菌富集培养基)中,在培养箱中 37 °C 培养 36 h。取富集培养基溶液 1 mL 加入试管中,然后依次进行 10 倍梯度稀释,制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-7}$  倍数的稀释液。根据前期试验,分别取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍数的稀释液 0.2 mL 在钙平板分离培养基上进行涂布,每种稀释液做 3 个平行样本,于 30 °C 恒温倒置培养 4 d。将获得的菌株在钙平板分离培养基

上进行多代划线培养纯化。

#### 1.2.2 产酸定性分析

将 1.2.1 分离得到的菌株接种到装有 50 mL 的产酸定性培养基中,于摇床中 30 °C、150 r/min 培养 3 d,将培养液转移至 50 mL 的离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取 5 mL 上清液至另一支离心管中,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液中和至 pH 7,滴加 5% 的  $\text{FeCl}_3$  溶液 5~6 滴后,4 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至另一支试管中,于沸水中煮 5 min,形成红褐色絮状沉淀者可判定为该菌能产酸<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.3 产酸定量分析

将 1.2.2 获得的产酸细菌用无菌水配置成细菌浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL 的菌悬液,分别取 200  $\mu\text{L}$  接种于 50 mL 的基础培养基中,于摇床中 30 °C、150 r/min 培养 3 d,将培养液 4 000 r/min 离心 10 min,取适量上清液于干净的 100 mL 三角瓶中,用 0.1 mol/L NaOH 溶液进行滴定测定其总酸量(以乙酸计)<sup>[9]</sup>。产酸量的计算公式如式(1)所示。

$$W = [(V_1 - V_0) \times C_{\text{NaOH}} \times 60] / V_2 \quad (1)$$

式中:W 为产酸量,g/L; $V_1$  为培养液滴定消耗的 NaOH 体积,mL; $V_0$  为空白液滴定消耗的 NaOH 体积,mL; $C_{\text{NaOH}}$  为滴定用的 NaOH 浓度, $C_{\text{NaOH}} = 0.1 \text{ mol/L}$ ; $V_2$  为样品体积, $V_2 = 10 \text{ mL}$ 。

选取产酸量最高的菌株作为目标菌株,进行后续分析。

#### 1.2.4 目标菌株形态鉴定

将 1.2.3 产酸量最高的菌株(目标菌株)培养液依次进行 10 倍梯度稀释,根据前期试验,取  $10^{-5}$  倍数(较适稀释倍数)的稀释液 100  $\mu\text{L}$  涂布到固体培养基上,在 37 °C 的恒温培养箱中培养 2 d,显微镜下观察菌落特征,挑取产透明圈的单菌落进行革兰氏染色,观察菌落形态特征<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.5 目标菌株耐乙醇性能试验

将目标菌株接种于 100 mL 液体培养基中,于摇床上 30 °C、120 r/min 培养 2 d 后,获得种子液<sup>[11]</sup>。分别测定种子液的 pH、 $\text{OD}_{600}$  值、产酸量作为初始值对照。然后将种子液按 10% 接种量转入乙醇质量分数分别为 3%、5%、7% 的发酵培养基中,30 °C 静置培养 5 d 后测量菌液的 pH、 $\text{OD}_{600}$  值、产酸量,试验设 3 个平行和 1 个对照,取 3 个平行样的平均值。以灭菌的空白培养基做调零管,以对照组做酸碱滴定的空白液。

#### 1.2.6 目标菌株耐乙酸性能试验

按 1.2.5 的方法将目标菌株进行种子液培养,测

定种子液的 $OD_{600}$ 值作为初始值对照。然后将种子液按10%接种量转入乙酸质量分数分别为1%、2%、3%的发酵培养基中,30℃静置培养5d后测量菌液的 $OD_{600}$ 值,试验设3个平行和1个对照,取3个平行样的平均值<sup>[12]</sup>。

### 1.2.7 目标菌株耐盐性能试验

按1.2.5的方法将目标菌株进行种子液培养,分别测定种子液的pH、 $OD_{600}$ 值、产酸量作为初始值作为对照。然后将种子液按10%接种量转入氯化钠质量分数分别为0.6%、0.8%、1%的发酵培养基中,30℃、150 r/min摇床培养5d后测量菌液的pH、 $OD_{600}$ 值、产酸量,试验设3个平行和1个对照,取3个平行样的平均值。

### 1.2.8 目标菌株耐高温性能试验

按1.2.5的方法将目标菌株进行种子液培养,测定种子液的pH、 $OD_{600}$ 值、产酸量作为初始值作为对照。将种子液分别在30、40、50、60℃的恒温水浴中处理10 min后接种于发酵培养基中,30℃静置培养5d后测量菌液的pH、 $OD_{600}$ 值、产酸量,试验设3个平行和1个对照,取3个平行样的平均值<sup>[13]</sup>。

### 1.2.9 数据分析

使用GraphPad Prism9.0软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用单配对 $t$ 检验(双尾)和单因素方差分析(ANOVA)。所有的数据统计图都使用GraphPad Prism9.0软件程序生成。

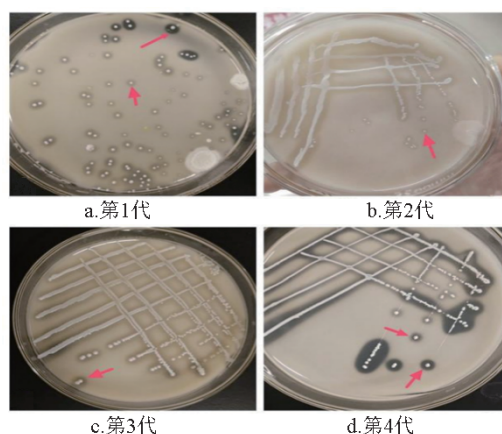
## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化及初步筛选

经过富集培养后,部分菌落能在钙平板分离培养基上产生透明圈(图1a),说明该菌既能够产酸又能降解碳酸钙,可初步判定为产酸菌。进一步纯化得到第2代(图1b)、第3代(图1c)和第4代(图1d),第4代获得透明圈直径较大的单菌落,从中选取7个单菌落(分别命名为RS-1、RS-2、RS-3、RS-4、RS-5、RS-6和RS-7)进行深入研究。

### 2.2 产酸定性分析结果

为了进一步确定上述初筛获得的7株菌株的产酸性,将其按1.2.2进行产酸定性分析,结果表明,RS-1、RS-2和RS-3菌株没有产生明显的沉淀,说明此3株菌不是产酸菌;RS-4、RS-5、RS-6和RS-7菌株都产生了明显的红褐色沉淀(图2),可判断它们是产酸菌,故选择RS-4、RS-5、RS-6和RS-7菌株进行后续相关定量试验。



注:红色箭头指示透明圈。

图1 分离纯化过程

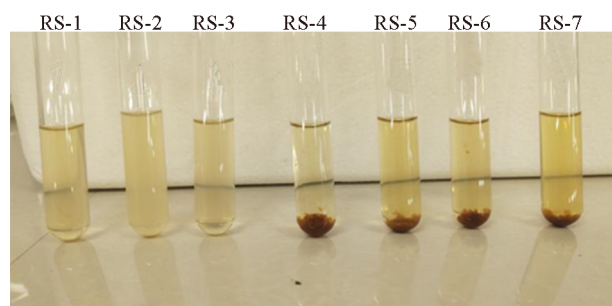


图2 产酸定性分析试验结果

### 2.3 产酸定量分析结果

将RS-4、RS-5、RS-6和RS-7菌株按1.2.3进行产酸定量分析,结果表明,RS-6菌株的产酸量最高,达到2.1 g/L(图3),故选择RS-6菌株进行后续的生物特性分析。

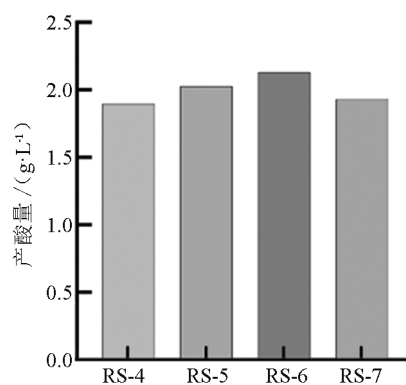
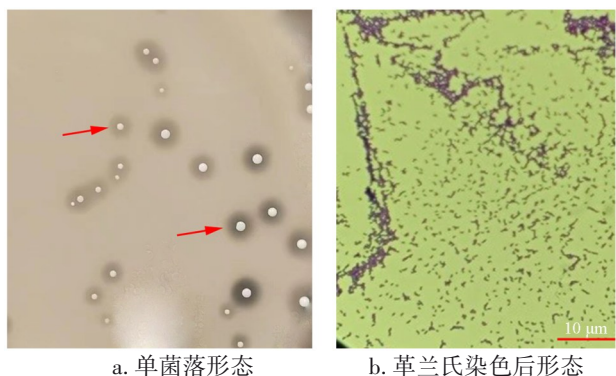


图3 RS-4、RS-5、RS-6和RS-7菌株的产酸量

### 2.4 目标菌株形态鉴定结果

RS-6菌株按1.2.4培养后的菌落表面光滑且圆润,呈一颗一颗的乳白色圆点,菌落形态较小,能降解碳酸钙产生透明圈(图4a);将RS-6菌株进行革兰氏染色,其显微结构形态为短杆或椭圆状,单生或成链生长,被革兰氏染液染成紫红色(图4b),表

明 RS-6 菌株是革兰氏阴性菌。



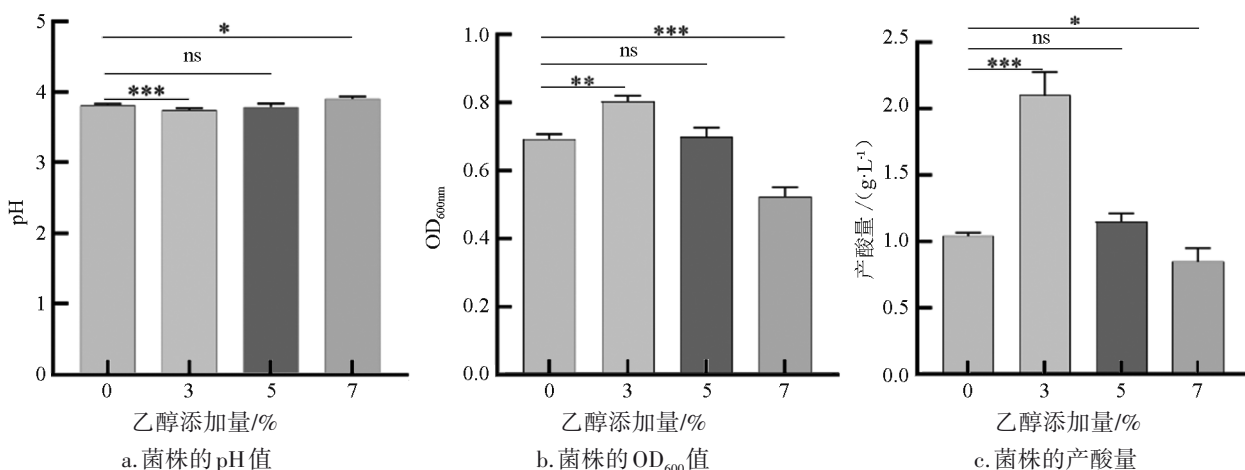
a. 单菌落形态 b. 革兰氏染色后形态

注:红色箭头指示透明圈。

图4 RS-6菌株形态

### 2.5 目标菌株耐乙醇性能测试结果

将 RS-6 菌株按 1.2.5 进行耐乙醇性能试验,结果表明:当乙醇添加量为 3% 时,RS-6 菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值、产酸量与对照(乙醇添加量为 0)相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且生长情况和产酸量都达到最佳状态;当乙醇添加量为 5% 时,各指标与对照相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明该乙醇质量分数处理下菌株的生长情况和产酸量基本不受影响;当乙醇添加量为 7% 时,各指标与对照相比差异有统计学意义( $P < 0.10$ ),且菌株的生长情况和产酸量均比对照的低(图 5),说明此时菌株生长和产酸均受到了抑制,故该菌株的乙醇耐受范围为 5%~7%。



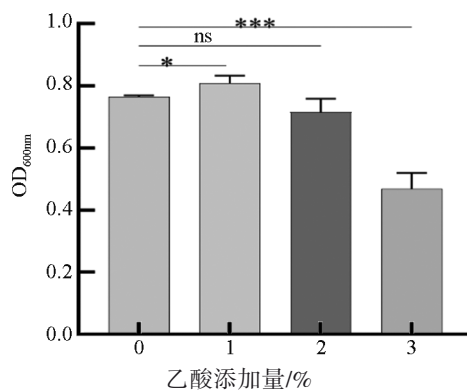
注:“\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.10$ );“\*\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );“\*\*\*”表示两组数据间差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ );“ns”表示两组数据间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

图5 不同乙醇质量分数处理下 RS-6 菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值和产酸量

### 2.6 目标菌株耐乙酸性能试验

为了探究人为添加乙酸是否会影响 RS-6 菌株的生长及其乙酸耐受值,将 RS-6 菌株按 1.2.6 的方法进行耐乙酸性能试验,结果表明:当乙酸添加量为 1% 时,RS-6 菌株的 OD<sub>600</sub> 值比对照(乙酸添加量为 0)的大,且差异有统计学意义( $P < 0.10$ ),说明培养基中乙酸质量分数为 1% 时能促进 RS-6 菌株的生长;当乙酸添加量为 2% 时,菌株的 OD<sub>600</sub> 值与对照相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明在该乙酸质量分数处理下菌株的生长并不受影响;当乙酸添加量为 3% 时,菌株的 OD<sub>600</sub> 值远低于对照组,且差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ )(图 6),说明此乙酸质量分数处理下菌株的生长严重受到抑制。综上可知,在一定质量分数范围内人为地添加乙酸会对目标菌株的生长起促进作用,而乙酸质量分数太高(> 3%)又会抑制 RS-6 菌株的生长,故该菌株的耐乙酸

质量分数范围为 2%~3%。



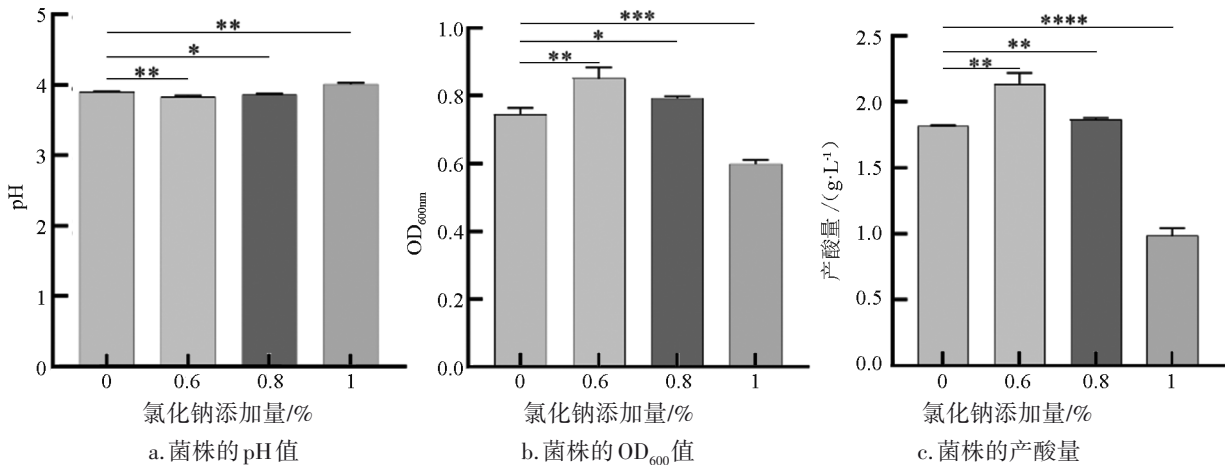
注:“\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.10$ );“\*\*\*”表示两组数据间差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ );“ns”表示两组数据间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

图6 不同乙酸质量分数处理下 RS-6 菌株的 OD<sub>600</sub> 值

## 2.7 目标菌株耐盐性能试验

为了探究 RS-6 菌株的生长情况是否受盐(氯化钠)质量分数的影响,将 RS-6 菌株按 1.2.7 进行耐盐性能试验,结果表明:当氯化钠添加量为 0.6% 时,菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值、产酸量与对照(氯化钠添加量为 0)相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且菌株的生长和产酸量都达到最佳状态;当氯化钠添加量为 0.8% 时,菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值、产酸量与对照相

比,差异有统计学意义( $P < 0.10$ ),但该菌株的生长和产酸量均高于对照而低于氯化钠添加量为 0.6% 时;当氯化钠添加量为 1% 时,菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值、产酸量与对照相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且菌株的生长和产酸量均比对照的低(图 7),说明此时菌株的生长和产酸量已经受到抑制,故该菌株的耐氯化钠质量分数为 0.8%。



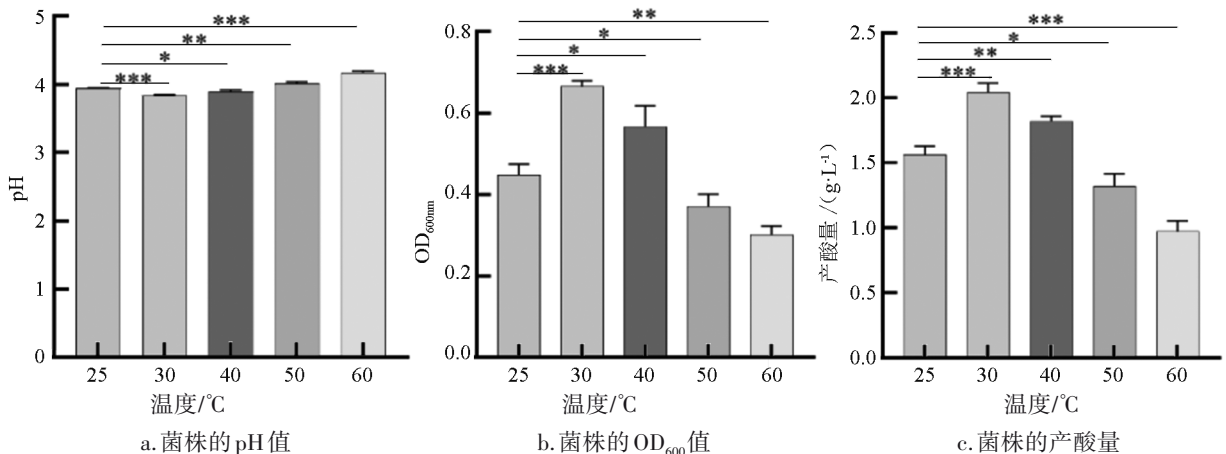
注:“\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.10$ );“\*\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );“\*\*\*”表示两组数据间差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ );“\*\*\*\*”表示两组数据间差异有高度统计学意义( $P < 0.001$ )。

图 7 不同氯化钠质量分数处理下 RS-6 菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值和产酸量

## 2.8 目标菌株耐高温性能试验

为了探究 RS-6 菌株的温度耐受性,按 1.2.8 的方法进行耐高温性能试验,结果表明:当处理温度为 30 °C 时,RS-6 菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值、产酸量与对照(温度为 25 °C)相比,差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ ),且菌株的生长情况和产酸量均达到最优状

态;当处理温度为 40 °C 时,菌株的生长和产酸量高于对照,且差异有统计学意义( $P < 0.10$ );处理温度为 50 °C 时,菌株的各指标与对照相比,差异有统计学意义( $P < 0.10$ ),且菌株的生长和产酸量均低于对照(图 8),表明此时的菌株已经受到抑制。以上结果表明,该菌株的最适温度为 30 °C。



注:“\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.10$ );“\*\*”表示两组数据间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );“\*\*\*”表示两组数据间差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ )。

图 8 不同温度处理下 RS-6 菌株的 pH 值、OD<sub>600</sub> 值和产酸量

### 3 结论与讨论

本研究以酱香型白酒高温大曲为原料,通过富集培养和分离纯化,在钙平板分离培养基上初筛选出 7 株产透明圈直径较大的菌株。通过产酸定性试验,发现命名为 RS-4、RS-5、RS-6 和 RS-7 的菌株都产生了红褐色絮状沉淀<sup>[8]</sup>,表明 RS-4、RS-5、RS-6、RS-7 菌株是产酸细菌;将这 4 株菌分别进行产酸定量试验,通过与氢氧化钠滴定反应,发现 RS-6 菌株的产酸量最高,为 2.13 g/L;对 RS-6 菌株培养液稀释

涂布培养后进行革兰氏染色,结果显示 RS-6 为革兰氏阴性细菌;对该菌株进行耐乙醇、耐乙酸、耐盐和耐高温试验,结果表明该菌株对乙醇的耐受量为 5%~7%,乙酸的耐受量为 2%~3%,盐的耐受量是 0.8%,最适生长温度为 30 ℃。

本研究由于未进行分子生物学鉴定,故暂不能确定该菌的种属,后期将进行分子鉴定确定种属;该研究设置的温度梯度间距较大,后期将精细化温度对 RS-6 菌株影响,以期为酱香型白酒生产提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 周涛,刘峰,何霜,等.中温大曲制曲过程中金属元素的变化规律研究[J].食品工业科技,2017,38(17):230-234.
- [2] 肖东光,赵树欣,陈叶福,等.白酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2011:157-160.
- [3] 聂凌鸿,樊璐,季方.大曲培养过程中微生物数量的变化[J].安徽农业科学,2011,39(35):21757-21759.
- [4] 陈洋.耐乙醇醋酸菌特性研究及应用[D].武汉:湖北工业大学,2016.
- [5] 李学思,刘新田,李绍亮,等.浓香大曲在培养及贮存过程中主要功能菌的变化规律探索与研究[J].酿酒,2017,44(5):25-28.
- [6] 侯小歌,杜红阳,李学思,等.宋河大曲中醋酸菌的分离鉴定及产酸特性[J].中国酿造,2011(4):112-115.
- [7] 孙鹏飞.衡水老白干酒中产酸微生物的分离鉴定及特性研究[D].石家庄:河北科技大学,2016.
- [8] 谭才邓,廖延智,司徒满泉,等.高产醋酸的醋酸菌筛选及菌种鉴定[J].食品科技,2014,39(7):36-40.
- [9] 石庆叠,何星,卢红梅,等.赤水晒醋醋醅中醋酸菌的筛选和发酵特性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(14):223-228.
- [10] 邓丽丽,刘亚男,喻道军,等.发酵猕猴桃果醋用醋酸菌的筛选与鉴定[J].沈阳医学院学报,2019,21(6):536-539.
- [11] 周滢晴,刘婷,周婉婷,等.高产酸果醋醋酸菌的筛选鉴定及其耐醇和耐温性探究[J].食品与发酵工业,2021,47(10):72-78.
- [12] QIU X M, ZHANG Y, HONG H S. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism[J]. AMB Express, 2021, 11(1):1-15.
- [13] MATSUMOTO N, OSUMI N, MATSUTANI M, et al. Thermal adaptation of acetic acid bacteria for practical high-temperature vinegar fermentation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85(5):1243-1251.