

# 大曲中产香兼性厌氧细菌的筛选及挥发性成分分析

## Screening of facultative anaerobic bacteria from Luzhou-flavor Daqu and determination of its volatile constituents

明红梅<sup>1</sup> 余欢<sup>2</sup> 周健<sup>1</sup> 郭志<sup>1</sup> 许德富<sup>3</sup> 姚霞<sup>1</sup>

MING Hong-mei<sup>1</sup> YU Huan<sup>2</sup> ZHOU Jian<sup>1</sup> GUO Zhi<sup>1</sup> XU De-fu<sup>3</sup> YAO Xia<sup>1</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 重庆邮电大学移通学院, 重庆 合川 401520;  
3. 泸州老窖股份公司, 四川 泸州 646000)

(1. Department of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China; 2. College of Mobile Telecommunications, Chongqing University of Posts and Telecom, Hechuan, Chongqing 401520, China; 3. LuzhouLaojiao Co. Ltd, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**摘要:**从浓香型大曲中分离筛选兼性厌氧细菌,研究该类菌在制曲工艺环境中种群分布的可行性,并进一步探索该类群微生物的产香特性及其挥发性组分,为提高大曲质量奠定基础。采用二氧化碳培养法对大曲样品进行菌株的筛选及分离纯化,最终获得 9 株兼性厌氧细菌。其中编号为 X<sub>3</sub> 菌株产香性能突出,经初步鉴定属于棒状杆菌属。进一步通过顶空固相微萃取—气相色谱—质谱联用分析 X<sub>3</sub> 菌株固态发酵产物的挥发性物质,结果表明,其挥发性物质中的吡嗪类物质、苯乙醇、愈创木酚、苯甲醛等,与浓香型大曲产香物质相符。

**关键词:**浓香型大曲;兼性厌氧细菌;筛选;挥发性成分

**Abstract:** The facultative anaerobic bacteria in Luzhou-flavor Daqu were isolated and screened to study the species distribution of this kind of bacteria in the fermentation environment of Daqu. Then, the screened bacteria were further researched for the formation ability of the flavor components and their volatile constituents in order to improve the quality of Daqu. Through separation and purification of microorganism in the samples of Daqu by Candle jar method, 9 facultative anaerobic bacteria were obtained. Among them, the one which was coded as X<sub>3</sub> provided with the prominent formation ability of the flavor components and was assigned as Corynebacterium with preliminary identification. Through analyzing the volatile components in the products by solid-state fermentation with HS-SPME-GC-MS, it showed that some volatile substances such as pyrazines, phenethyl alcohol, ethyl phenylacetate and guaiacol were be accord

with Luzhou-flavor Daqu.

**Keywords:** Luzhou-flavor Daqu; facultative anaerobic bacteria; screening; volatile constituents

浓香型大曲在白酒酿造中具有提供复合曲香香气、微生物菌体和酶制剂等作用,可概括为产酒、生香剂,被誉为“酒之骨”。随着制曲技术的发展,楼盘式多层立体制曲逐步取代了传统的地面单层平房制曲工艺,不仅扩大了生产规模,实现了四季制曲,也提高了成品曲质量。立体制曲采用曲坯多层垒放,除了保温、保湿作用外,还有利于培菌发酵期微氧环境的形成。“微氧环境”是由于制曲过程中微生物生长繁殖不断消耗氧气,同时释放二氧化碳,温度不断升高也导致曲坯水分蒸发形成水蒸气,曲坯环境氧气浓度显著降低而形成的<sup>[1,2]</sup>。而“微氧环境”中诱导生长繁殖起来的微生物,可能对大曲质量特别是大曲的香味物质生成、积累具有重要作用。

本研究基于泸州酒生产中创建的“微氧环境曲药发酵”理论,对大曲的功能性微生物进行探索。拟通过对浓香型大曲中兼性厌氧细菌的筛选及其产香性能的研究,建立“微氧环境”中特殊的功能菌群与大曲质量和浓香型白酒香型之间的联系,为提高浓香型大曲质量和改善白酒风味奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

#### 1.1.1 大曲样品

泸州老窖制曲生态园曲库中安曲后 10, 30, 60, 90, 120 d 的曲堆中心曲样,分别无菌混合粉碎后过 40 目筛,采用四分法浓缩至 500 g,装于无菌袋 4 °C 冰箱贮存备用。

**基金项目:**四川省高等教育质量工程项目(编号:2011-659);泸州市科技局应用基础项目(编号:2011-S-28);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号:NJ2011-13);泸州老窖科研奖学金项目(编号:13ljk04)

**作者简介:**明红梅(1971—),女,四川理工学院副教授,硕士生导师。  
E-mail:minghongmei999@aliyun.com

**收稿日期:**2015-02-25

### 1.1.2 培养基

细菌筛选培养基、分离纯化培养基、斜面菌种保存培养基:均采用牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[5]</sup>;

小麦固体培养基:取 140 g 适度粉碎的小麦于 250 mL 三角瓶中,调节小麦原料含水量 36%~40%;

种子培养基:蛋白胨 10 g, NaCl 2.5 g, 葡萄糖 5 g, 蒸馏水 500 mL, pH 7.2~7.4。

### 1.1.3 主要仪器

数码显微镜:BA210Digital 型,北京麦克奥迪有限公司;  
恒温恒湿培养箱:G2-250-HIS 型,韶关市广智科技设备有限公司;

洁净工作台:SW-CJ-2F 型,苏州安泰空气技术有限公司;

固相微萃取头:50/30 $\mu$ m DVB/CAR/PDMS 型,美国 Supelco 公司;

气相色谱—质谱联用仪:Agilent 6890N-5975B 型,美国安捷伦公司。

### 1.1.4 主要试剂

氯化钠、对氨基苯磺酸、磷酸氢二钾、盐酸、无水乙醇、氢氧化钾、葡萄糖、乳糖:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

蛋白胨、牛肉膏:生化试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 兼性厌氧细菌的筛选及分离纯化** 无菌称取 1 g 曲样,于 10 mL 无菌水中振荡均匀形成菌悬液。用无菌水将菌悬液进行 10 倍逐级稀释至适当倍数后,准确吸取 0.2 mL 菌悬液在牛肉膏蛋白胨培养基平板上涂布,然后采用二氧化碳培养法—烛缸法进行培养<sup>[4]</sup>,于 37 °C 下倒置培养 2~3 d。待菌落长出后分别从平板上挑取菌落形态不同的菌苔,采用烛缸法在分离纯化培养基上反复划线培养,直至平板上菌落生长较开,形态单一为止,并移接至斜面菌种培养基上保存。

**1.2.2 分离菌株产香性能初探** 从各菌株的斜面菌种上挑取 2 环菌苔接入种子培养基中,于 37 °C 下培养 18 h,调节种子液浓度至 10<sup>8</sup> 个/mL。然后按 10% 接种量接种于小麦固体培养基中,于 37 °C 下发酵 9 d 后对各菌株固态发酵产物进行感官评价。

**1.2.3 产香菌株的初步鉴定** 选取产香性能突出的菌株进行分类鉴定,参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[5]</sup> 与《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[6]</sup> 对纯化菌株的菌落生长特征、个体形态特征以及生理生化鉴定来完成。

### 1.2.4 产香菌株的挥发性成分分析

(1) 固相微萃取条件:精确称取发酵产物 4 g 于 15 mL 顶空瓶中,于 60 °C 水浴中平衡 15 min 后,插入固相微萃取针头萃取 30 min,再将萃取头取出插入 GC—MS 进样口解吸 3 min,进行 GC—MS 分析。

(2) 挥发性成分的 GC—MS 分析:① 气相色谱条件:毛

细管色谱柱为 DB-WAX,规格为(60 m×250  $\mu$ m,0.25  $\mu$ m);手动无分流进样,进样口温度 250 °C;程序升温:初始温度 40 °C,保留 1 min,以 3 °C/min 的速率升至 180 °C,再以 2.5 °C/min 的速率升至 230 °C,保留 10 min;汽化室温度 250 °C;载气 He,流速 1 mL/min。② 质谱条件:EI 电离源,电子能量 70 eV,扫描范围 20~500 U,离子源温度 250 °C;接口温度 230 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 兼性厌氧细菌的分离筛选

采用二氧化碳培养法—烛缸法从大曲样品中筛选出能在二氧化碳含量约 5%~10% 环境中生长的兼性厌氧菌株共 9 株,分别编号为 X<sub>1</sub>~X<sub>9</sub>。

### 2.2 兼性厌氧菌产香性能初探

将分离获得的 9 株兼性厌氧菌接种至小麦固体培养基,经 37 °C 下发酵 9 d 后,对各菌发酵产物进行感官评价,其中有 4 株菌株具有产香特性,各产香菌株的发酵产物感官评价结果见表 1。

表 1 各产香菌株发酵产物感官评价

Table 1 Sensory evaluation

菌株编号	外观评价	气味评价
X <sub>1</sub>	一定程度褐变	略带酱香,香味较浓
X <sub>3</sub>	一定程度褐变	香味浓郁,曲香明显
X <sub>5</sub>	褐变严重	酱香较浓、有明显氨味
X <sub>8</sub>	一定程度褐变	香味淡

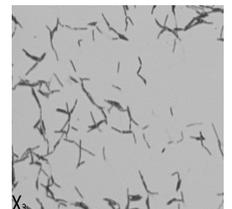
由表 1 可知,菌株 X<sub>1</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>8</sub> 均具有一定的产香性能,其中菌株 X<sub>3</sub> 的发酵产物有一定程度的褐变,曲香明显,产香性能最为突出,做为下一步挥发性成分的研究菌株。

### 2.3 产香菌株的初步鉴定

**2.3.1 菌落形态和镜检** 将产香性能突出的菌株 X<sub>3</sub> 在平板上划线培养后得到单菌落,其菌落形态见图 1(a)。经过革兰氏染色和制片镜检,在显微镜下的形态见图 1(b)。



(a) X<sub>3</sub> 菌落形态图



(b) X<sub>3</sub> 镜检图(10×100)

图 1 X<sub>3</sub> 单菌落形态及镜检图

Figure 1 Colonial and microscopic morphology observation of X<sub>3</sub>

由图 1 可知,菌株 X<sub>3</sub> 为杆状细菌,且长径大于 2 μm。经革兰氏染色发现,菌株 X<sub>3</sub> 为革兰氏阳性菌,不产芽孢,抗酸染色阴性。菌落湿润、较透明、大而平坦、边缘成树根状、不规则形菌落、颜色不一致、产水溶性红色素。

### 2.3.2 菌株 X<sub>3</sub> 的生理生化试验结果

由表 2 可知,菌株 X<sub>3</sub> 不产生氧化酶、纤维素酶、淀粉酶,不能固氮,不能利用柠檬酸盐作为唯一碳源;能发酵葡萄糖产酸、产生过氧化氢酶、液化明胶、还原硝酸盐为亚硝酸盐;

不能发酵乳糖产酸产气;不能将乙醇氧化生成乙酸。

根据形态观察和生理生化试验结果,可初步检索得出菌株 X<sub>3</sub> 属于细菌棒状杆菌属(*Corynebacterium* sp.)。

### 2.4 产香菌株的挥发性成分分析

产香性能突出的菌株 X<sub>3</sub> 经固态发酵后,对其发酵产物进行顶空固相微萃取,萃取样品通过气相色谱—质谱联用仪测定其挥发性物质,得到各挥发性物质的总离子流图见图 2,分析鉴定出的挥发性成分见表 3。

表 2 菌株 X<sub>3</sub> 的生理生化试验结果<sup>†</sup>

Table 2 Results of physiology biochemistry experiment of X<sub>3</sub>

菌株	1	2	3		4		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
			产酸	产气	产酸	产气										
X <sub>3</sub>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-

† 1. 氧化酶试验;2. 过氧化氢酶试验;3. 葡萄糖氧化发酵试验;4. 乳糖发酵;5. 甲基红试验(M·R 试验);6. 乙酰甲基甲醇试验(V·P 试验);7. 乙醇氧化;8. 明胶液化试验;9. 柠檬酸盐利用试验;10. 吲哚试验;11. 淀粉水解试验;12. 固氮能力试验;13. 硝酸盐还原试验;14. 水解纤维素试验;“+”表示结果阳性;“-”表示结果阴性。

表 3 菌株 X<sub>3</sub> 挥发性物质分析结果

Table 3 Volatile constituents in the fermentation product of X<sub>3</sub>

物质名称	保留时间/min	相对含量/%	物质名称	保留时间/min	相对含量/%
乙醇	3.588	0.157	(2S,4S)-(+) - 戊二醇	24.400	0.188
2,3-丁二酮	4.844	0.005	2-甲氧基醋酸戊酯	24.510	0.240
2,4,5-三甲基恶唑	12.986	0.309	异硫氰酸甲氧基甲酯	24.785	0.156
2-甲基吡嗪	15.415	0.116	2,3,-二甲基-5-(2-丙烯基)吡嗪	25.033	0.196
3-羟基-2-丁酮	15.845	1.215	1-甲氧基甲氧基-2-辛炔	25.127	0.230
2,5-二甲基吡嗪	17.161	7.862	乳酸丁酯	25.441	0.130
2,3-二甲基吡嗪	17.861	0.090	糠醇	25.826	0.186
(2DL,4L)-2,4-二甲基己酸甲酯	18.500	0.288	2-十六醇	26.570	0.049
2-壬酮	18.935	0.087	丙位辛内酯	27.193	0.264
十四烷	19.073	0.065	噻唑	27.496	0.103
2-乙基-5-甲基吡嗪	19.178	0.080	苯基丙酮	27.622	0.035
2,3,5-三甲基吡嗪	19.558	19.863	1,7-二氢-1-甲基-6H-6-嘌呤酮	27.677	0.063
甲基辛基甲酮	20.489	0.098	萘	28.080	0.173
3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	20.593	0.127	3-氰基吡啶	28.162	0.096
2-乙基-3,5-二甲基吡嗪	21.062	0.352	苯乙酸乙酯	28.851	0.100
4-异丙基苯甲醚	21.177	0.124	α-甲基苯乙醇	29.743	0.037
2,3,5,6-四甲基吡嗪	21.552	52.444	愈创木酚	30.569	2.410
1-甲基-1H-咪唑-2-甲醚	21.822	0.046	苯甲醇	30.944	0.107
2-十三醇	22.301	0.026	抗氧剂 264	31.533	0.123
2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪	22.411	2.461	苯乙醇	31.754	1.088
苯甲醛	22.687	2.061	3,4-二乙基-2-甲基-1H-吡咯	32.679	0.234
十五烯	22.890	0.127	2-乙酰基吡咯	32.949	0.042
6,10-二甲基-2-十一烷酮	23.193	0.186	苯酚	33.461	1.357
2-癸醇	23.667	0.107	4-乙基-2-甲氧基苯酚	33.985	1.721
3,3'-铋-1H-吡嗪	23.898	0.165	2-乙酰基-1-甲基吡咯	34.657	0.033
2,3-丁二醇	24.025	0.410	3,5-二氨基-2-甲基苯甲酸	35.263	0.041
2,3,5-三甲基-6-丙基吡嗪	24.102	0.207	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	36.298	0.603
(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇	24.246	0.130			

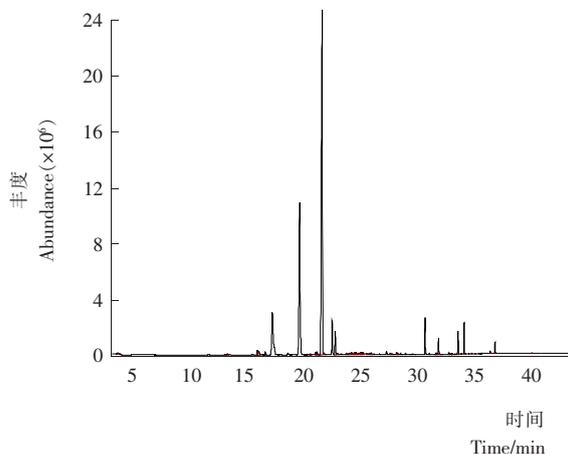


图2 菌株 X<sub>3</sub> 发酵产物中挥发性物质总离子流图

Figure 2 The GC—MS total ion current chromatogram of volatile substance fermented by X<sub>3</sub>

由表3可知,发酵产物中共检测出55种挥发性物质。其中吡嗪类物质含量最高(超过了挥发性物质总量的50%),其余物质还包括醇类、酮类、酚类、酯类、烃类以及其它一些芳香族化合物。菌株 X<sub>3</sub> 挥发性成分中的苯乙醇、2,3,5,6-四甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、愈创木酚、苯甲醛为浓香型大曲的重要香味成分<sup>[7-10]</sup>,2,3-丁二酮,3-羟基-2-丁酮、吡嗪类化合物也是浓香型白酒的特征风味物质<sup>[11-14]</sup>,由此可见,菌株 X<sub>3</sub> 具有产生浓香型大曲香味物质的代谢特性,其部分代谢产物和白酒风味物质之间存有内在联系。

### 3 结论

本研究以浓香型中高温发酵大曲为样品曲,经二氧化碳培养法筛选、分离纯化,得到9株兼性厌氧细菌。对这9株菌进行固体产香发酵试验,发现菌株 X<sub>3</sub> 产香性能较为突出。经初步鉴定该菌株属于棒状杆菌属。进一步通过顶空固相微萃取—气相色谱—质谱联用分析检测菌株 X<sub>3</sub> 固态发酵后的挥发性物质,发现其挥发性物质中的吡嗪类物质、苯乙醇、愈创木酚、苯甲醛等物质为浓香型大曲的重要香味成分。

本研究表明,大曲发酵过程中在微氧环境下栖息着兼性厌氧细菌,该菌群微生物中具有产香性能菌株,其发酵产物的挥发性物质和大曲香味物质之间存一定联系。对于大曲中的兼性厌氧菌群的其它功能特性,还有待研究,以便进一步确定大曲中兼性厌氧菌群对大曲质量的影响及联系,为稳定和提高了大曲质量奠定基础。

#### 参考文献

1 泸州老窖集团有限责任公司. 泸州酒技艺大全[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011.

2 崔利. 酱香型高温大曲的高温多水微氧或缺氧与曲药质量的关系[J]. 酿酒科技,2007(4):76~79.

3 沈萍,范秀容,李广武,等. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社,1999.

4 岳元媛,张文学,刘霞,等. 浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. 酿酒,2007,34(2):251~255.

5 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.

6 RE 布坎南,NE 吉本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所. 第八版. 北京:科学出版社,1984.

7 张春林,敖宗华,炊伟强,等. 固相微萃取—气相色谱—质谱法分析中高温大曲发酵、贮存过程中挥发性风味成分的变化[J]. 食品与发酵工业,2011,37(4):198~203.

8 张春林,敖宗华,炊伟强,等. 顶空固相微萃取—气质联用快速测定大曲中的挥发性风味成分[J]. 食品科学,2011,32(10):137~140.

9 赵东,李扬华,向双全. 顶空固相微萃取气相色谱质谱法测定曲药中的香味成分[J]. 酿酒科技,2006(5):92~94.

10 Felipe San-Juan, Jan Pet'Ka, Juan Cacho, et al. Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometric evaluation of wine aroma[J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 188~195.

11 辛磊. 白酒微量成分与酒体风格特征关系的探讨[J]. 食品与机械, 2004, 20(2): 49~50.

12 孙夏冰,王松涛,陆震鸣,等. 浓香型大曲窖泥中挥发性化合物的测定与分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 54~58.

13 范文来,徐岩. 从微量成分分析浓香型大曲酒的流派[J]. 酿酒科技,2000(5):92~94.

14 Fan Wen-lai, Xu Yan, Zhang Yan-hong. Characterization of pyrazines in some Chinese liquors and their approximate concentrations[J]. J. Agr. Food Chem., 2007, 55(24): 9 956~9 962.

#### 信息窗

### 美国农业部修订枫糖浆等级标准

据美国政府网站消息,1月29日美国联邦公报刊登消息称,美国农业部发布公告,修订美国关于枫糖浆的等级标准。新规定将自2015年3月2日起生效。

美国农业部农产品销售局(AMS)修订并替换了现有的分级标准,新标准要求有新的颜色和风味描述,A级产品要求保持品质。

美国农业部枫糖浆颜色标准将作废,新标准中颜色将采用分光光度计或其他任何能提供等价结果的方法来判定。AMS还将糖浆的拼写由“sirup”改为“syrup”。这些修订将有助于枫糖浆在美国及世界范围内的销售。

(来源:www.foodmate.net)