

高温大曲曲房空气中可培养细菌的 分离鉴定及产酶特性

Isolation, identification and enzyme production characteristics of culturable
bacteria in the air of high-temperature Daqu fermentation room

黄治国¹ 刘 娜¹ 卫春会¹ 邓 杰¹

HUANG Zhi-guo¹ LIU Na¹ WEI Chun-hui¹ DENG Jie¹

钟姝霞² 陈 波³ 任志强¹

ZHONG Shu-xia² CHEN Bo³ REN Zhi-qiang¹

(1. 四川轻化工大学酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000;

2. 四川健能制药有限公司, 四川 自贡 643000; 3. 四川郎酒股份有限公司, 四川 古蔺 646523)

(1. *Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin, Sichuan 644000, China*; 2. *Sichuan Jewelland Pharmaceutical Co., Ltd., Zigong, Sichuan 643000, China*; 3. *Sichuan Langjiu Co., Ltd., Gulin, Sichuan 646523, China*)

摘要:以高温大曲曲房空气中可培养细菌为研究对象,对其进行分离鉴定及产酶特性研究;将得到的优势功能细菌进行高粱汁液态发酵,利用气相色谱—质谱联用法分析其代谢产物。结果表明:从高温大曲曲房空气中共分离出 8 种菌株,分别为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、*Pedobacter suwonensis*、血红鞘氨醇单孢菌(*Sphingomonas sanguinis*)、*Massilia* sp.、*Delftia* sp.和 *Sphingobacterium* sp.;经产酶试验筛选得到 3 株优势功能菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),均具有纤维素分解能力、淀粉和蛋白水解能力;3 株菌的生长曲线表明液体培养 4 h 达到对数生长期,在高粱汁液态发酵 48 h 后,优势代谢产物为 3-羟基-2-丁酮,且四甲基吡嗪含量也较高,并代谢产生少量高级醇、酚类、酯类等芳香物质。

关键词:高温大曲;曲房空气;分离鉴定;产酶特性

Abstract: Taking the cultivable bacteria in the air of high-temperature Daqu fermentation room as the research objects to study the characteristics of separation, identification and enzyme production. The cultivable bacteria were used to take liquid state fermentation in sorghum mash, and the metabolites were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Results: 8 strains were isolated from the air in the high-temperature Daqu fermentation room, and they were: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pedobacter suwonensis*, *Sphingomonas sanguinis*, *Massilia* sp., *Delftia* sp. and *Sphingobacterium* sp.. After the enzyme production tests, three dominant functional bacteria, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Bacillus cereus*, which all had the capacity of decomposition for cellulose, starch and proteins. The growth curve of 3 strains showed that liquid culture reached logarithmic growth phase for 4 h. After 48 hours of fermentation in the sorghum mash medium, the dominant metabolite was mainly 3-hydroxy-2-butanone, and the content of tetramethylpyrazine was also high, and it metabolizes to produce a small amount of higher alcohols, phenols, esters and other aromatic substances. It hopes to provide a theoretical basis for studying the correlation between Daqu bacteria and air bacteria.

Keywords: high temperature Daqu; the air of Daqu fermentation room; separation and identification; enzyme production characteristics

基金项目:四川省科技厅重点研发项目(编号:2018JY0509);四川省科技厅应用基础研究项目(编号:2019YJ0462);中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(编号:2018JJ008, 2018JJ011);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(编号:NJ2018-04)

作者简介:黄治国,男,四川轻化工大学教授,博士生导师,博士。

通信作者:卫春会(1980—),女,四川轻工业大学高级实验师,硕士研究生导师。E-mail:147516753@qq.com

收稿日期:2020-10-13

大曲培养发酵过程中,空气中栖息着大量微生物,其种类、浓度以及群落结构直接影响大曲中微生物的群落结构及大曲质量,进而影响大曲酒的生产^[1]。同时,因不同的地理气候环境,不同产地的大曲中微生物群落结构也有所差异,通过对曲房空气中微生物的研究可为大曲中微生物的群落结构提供一定的理论基础^[2-3]。

酱香型白酒独特的酱香味是众多微生物交织在一起共同作用的结果,很难确切地描述单个微生物在酿造过程中不同时间的具体作用。大曲生产的主要场所是制曲车间,曲的质量会直接影响酒的质量、风格和出酒率。目前,大曲的生产工艺大多沿用自然接种的传统方式,其中微生物主要来源于环境空气、制曲原料和制曲用水,而空气微生物对曲的质量有重要影响^[4]。生产实践^[5]表明在传统工艺下,老曲房制曲效果较新曲房更佳,这是由于老曲房中的有益微生物种类及数量较新曲房更丰富。

高温大曲在酱香型白酒生产中既作为糖化发酵剂,也是发酵原料。发酵过程中,曲房空气微生物对酿制酱香型白酒具有重要作用,能将酿酒原料中的淀粉、蛋白质分解为糖和氨基酸,并产生一些高级醇、醛、酸、酚类、酯类等,进而形成天然的酱香风味^[6-7]。文章拟以高温大曲曲房空气中的微生物为研究对象,对其进行筛选分离,同时采用分子生物学的方法对纯种微生物进行鉴定,并对菌株的产酶特性进行分析,由此得到优势功能微生物;测定生长曲线后进行高粱汁液态发酵,利用 GC-MS 分析技术分析其代谢产物,以期得到更完善的曲房优势菌的功能性,为进一步指导酿酒用曲提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品

采自川南某酱香型白酒厂曲房,用 Coriolis μ 型空气生物采样器在曲房空气中进行多点取样,4℃保藏,同一生产阶段的曲房空气取 3 个平行。

1.2 药品与试剂

干酪素、NaCl、淀粉等:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、Tris-饱和酚、十二烷基硫酸钠(SDS)等:分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

琼脂糖:生化试剂,北京索莱宝科技有限公司;

dNTPs、TaqDNA polymerase、TaKaRa TaqTM、DL2000TM DNA Marker 等:生化试剂,宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 仪器与设备

空气生物采样器:Coriolis μ 型,法国 Bertin 公司;

水平电泳仪:JY600+型,美国 Bio-rad 公司;

PCR 仪:MyCycler 型,美国 Bio-rad 公司;

显微照相机:DM3000 型,德国 Leica 公司;

全自动菌落分析仪:Scan1200 型,上海智理科学仪器有限公司;

气相色谱—质谱联用仪:7890A-5975B 型,美国 Agilent 公司。

1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,琼脂粉 15~20 g,NaCl 5 g,pH 7.4~7.6;

产淀粉酶培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,琼脂 15~20 g,可溶性淀粉 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.2;

产蛋白酶培养基:牛肉膏 10 g,干酪素 10 g(先取用并加入少量 NaOH 助溶),琼脂 15~20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.6~7.8;

产纤维素酶培养基:羧甲基纤维素钠 10 g,硫酸铵 4 g,NaCl 1.25 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂 15~20 g,蒸馏水 1 000 mL;

耐酸培养基:牛肉膏蛋白胨液体培养基,用 5 mol/L 的乙酸调节 pH 至 4.0;

耐乙醇培养基:牛肉膏蛋白胨液体培养基,冷却后加入 7%的无水乙醇备用。

1.5 试验方法

1.5.1 空气中微生物的分离纯化与形态观察 采用平板稀释涂布法和革兰氏染色法^[8]。

1.5.2 微生物的鉴定

(1) DNA 的提取:采用改良的 CTAB 法^[9-10]。

(2) PCR 扩增:选用细菌通用引物 27F-1492r 对 DNA 进行扩增,采用 25 μ L 体系(2.5 μ L 10 $\times$ buffer、2 μ L dNTP、1 μ L 27F 引物、1 μ L 1492r 引物、0.5 μ L Taq、1 μ L 模板、17 μ L ddH₂O),其 PCR 反应程序为 Touch Down PCR,94℃维持 3 min;30 个反应循环;94℃维持 15 s,56℃维持 30 s,72℃维持 90 s;72℃维持 10 min;4℃保温。取 5 μ L PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶上电泳,再取 5 μ L DL2000TM DNA Marker 作对照,160 V 下电泳 30 min,通过凝胶成像仪观察。将 PCR 扩增产物送至成都擎科测序,测序结果在 NCBI 上进行比对并记录。

(3) 上游引物 27F:5'-AGAGTTTGATCATGGCT-CAG-3'。

(4) 下游引物 1492r:5'-ACGGTTACCTTGT-TACGACTT-3'。

1.5.3 微生物特性研究

(1) 耐受性能:将分离纯化后的菌株接种至特定培养基上,培养 48 h 后于 600 nm 处测定培养液 OD 值,以判断其耐酸与耐乙醇能力。

(2) 产酶特性:将分离纯化后的菌株接种至特定培养基上,培养 24~48 h,观察并记录透明圈直径(D)和菌落直径(d),根据 D/d 分别进行菌株蛋白酶活力^[8,11]、淀粉

酶活力^[12]以及纤维素酶活力^[13]测定。

1.5.4 优势菌株发酵产物研究

(1) 生长曲线:根据产酶特性筛选出性能优良菌株,将其活化并按体积分数 10% 接种至液体培养基中,37 ℃,160 r/min 摇床培养,每 2 h 取样,以未接种的培养基作为空白,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 并绘制生长曲线。

(2) 高粱汁液态发酵液:高粱粉与水按 $m_{\text{高粱}}:V_{\text{水}}=1:5$ (g/mL) 配制,水浴加热 2 h,加入质量分数为 2% 的液化酶(2 000 U/g),60 ℃ 水浴液化 1 h,再加入质量分数为 2% 的糖化酶(50 000 U/g)保温糖化 1 h;糖化结束后取一滴与碘液反应,不显蓝色即为反应彻底,过滤、澄清,取上清液,灭菌备用。菌体培养 4 h 后(对数期)按体积分数 10% 接入至高粱汁发酵液中。

(3) 发酵产物研究:发酵 48 h 后,取 2 mg/mL 的乙酸丁酯 10 μL 作为内标,利用固相顶空萃取^[14]、CG-MS 对发酵液进行检测^[15-16],分析其代谢产物。

(4) GC-MS:

① 色谱条件:DB-WAX 60.0 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm 毛细管色谱柱;进样口温度 230 ℃;分流比 20:1;程序升温:40 ℃ 保持 1 min,5 ℃/min 升温至 200 ℃,保持 3 min;载气为 99.999% 氦气,载气流速 1 mL/min。

② 质谱条件:电离电压 70 eV;离子源温度 230 ℃;四极杆温度 150 ℃;电离方式为 EI;质量扫描范围 m/z 20~500;溶剂延迟 3 min。

1.5.5 数据分析

(1) 利用 SPSS 19.0 软件的一般线性模型单因素 DunCan 法对数据进行方差分析,检测结果用 $\bar{x} \pm Se$ 表示,采用 Oringin 8.0 软件作图。

(2) 测序结果在 GenBank 中运用 BLAST 进行比对,

找出相似序列并下载,用 DNAMAN 软件进行序列比对并进行人工修正。根据 Kimura 模型运用 MEGA6.0 软件进行系统发育树的分析与构建。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离纯化

通过对高温大曲曲房空气细菌进行分离与纯化,根据其形态特征不同共筛出 13 株菌,并依次编号为 S-1、S-2、...、S-13。通过形态观察、分子生物学鉴定出 8 种菌,分别为 S-1 血红鞘氨醇单孢菌(*Sphingomonas sanguinis*)、S-3 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、S-5 *Massilia* sp.、S-7 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、S-8 *Sphingobacterium* sp.、S-11 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、S-12 *Pedobacter suwonensis* 和 S-13 *Delftia* sp.,其菌落图及菌落形态特征分别见图 1 和表 1,革兰氏染色结果见图 2。

2.2 细菌鉴定

2.2.1 PCR 扩增 通过手提法提取菌株基因组 DNA,采用核酸蛋白微量检测仪检测 DNA $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为 1.70~1.90,表明 DNA 质量较好,可用于 PCR 扩增。由图 3 可知,1 500 bp 处出现清晰可见的荧光条带,表明产物可用于分析和测序。

2.2.2 菌株的系统发育树 纯化的 PCR 产物经测序后,将其 16S rDNA 序列在 Gen-Bank 核酸序列数据库中进行同源性比较,结果表明其与 Gen Bank 数据库中已知菌的 16S rDNA 序列具有 100% 相似性,结合形态学特征可以判断为同种。将相似性较高的 13 株菌构建系统发育树,结果如图 4 所示,其中芽孢杆菌属最多,与何明国等^[17-19]的研究结果一致,这是由于空气中缺乏水分和营

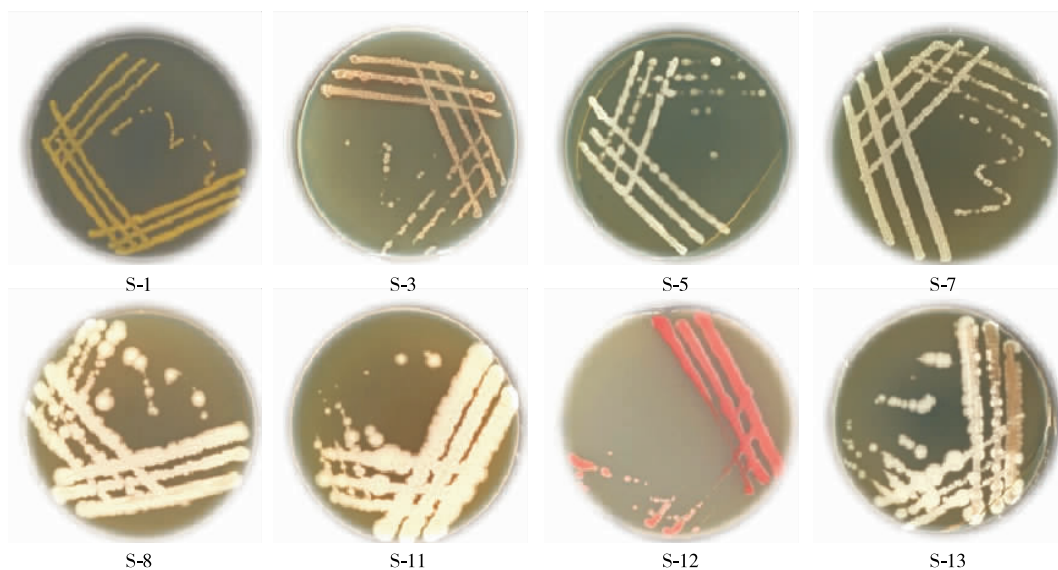


图 1 曲房空气中细菌群落形态图

Figure 1 The pictures of bacterial colony isolated from the air of Daqu fermentation room

表 1 曲房空气中细菌的菌落形态特征

编号	形态
S-1	单菌落直径大小为 2~3 mm,淡黄色,菌落边缘整齐,正反面颜色一样,较光滑湿润,不易挑取
S-3	单菌落直径大小为 2~3 mm,菌落表面粗糙不透明,污白色,在液体培养基中常形成褶皱,易于挑取
S-5	单菌落直径大小为 1~2 mm,浅白色,菌落大,扁平,圆形,边缘整齐,易于挑取
S-7	单菌落直径大小为 1~2 mm,白色或浊白色,扁平,干燥,无光泽,表面的层膜状物形成褶皱,易挑取
S-8	单菌落直径大小为 2~3 mm,乳白色,扁平,湿润,菌落表面光滑,易挑取
S-11	单菌落直径大小为 2~3 mm,菌落呈圆形或近似圆形,质地软,稍有光泽的白色菌落,易挑取
S-12	单菌落直径大小为 2~3 mm,菌落呈红色,菌落表面湿润,易挑取
S-13	单菌落直径大小为 2~3 mm,灰白色,菌落中间颜色较浅,边缘颜色较白,较光滑湿润,不易于挑取

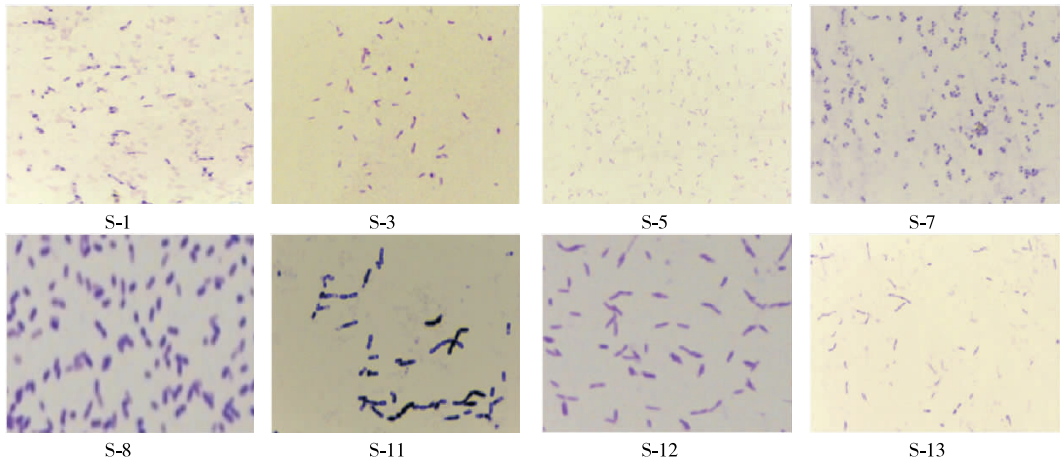


图 2 曲房空气中细菌革兰氏染色镜检图

Figure 2 The bacterial Gram staining microscopy chart from the air of Daqu fermentation room (100×)

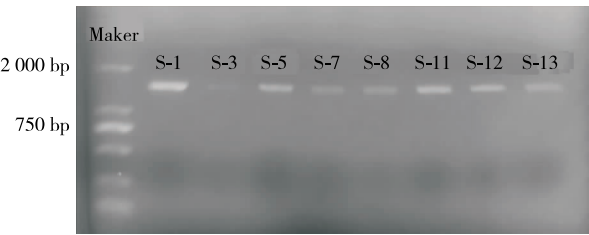


图 3 菌株 PCR 扩增产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis of PCR amplification products of strains

养物质因而不利于微生物生长,芽孢杆菌属的菌株可以产生芽孢,具有极强的抗逆性,对恶劣的环境有较强的适应性。此外,张明春等^[20-21]对大曲微生物进行了分析,发现芽孢杆菌属在大曲中为绝对优势属,其优势细菌主要为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌等,其在酿酒环境中普遍存在,对白酒发酵及风味形成都具有重要影响。另一方面,在曲房空气中分离出大量具有良好酿造性能的细菌,也表明经过长期的生产,曲房空气中细菌群落与大曲生产密切相关^[22]。

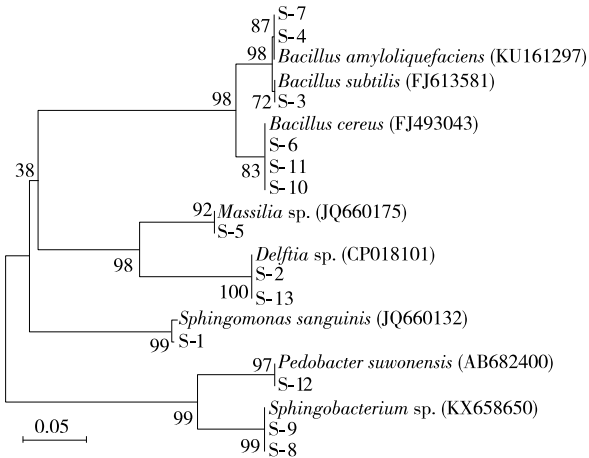


图 4 高温大曲曲房空气中细菌 16S rDNA 系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA sequence and other relative species from the air of Daqu fermentation room

高温大曲曲房空气中分离出的 8 种菌株,其中,S-13 *Delftia* sp.能够利用 *L*-苯丙氨酸、乳糖、葡萄糖、蔗糖等^[23],其在增塑剂和除草剂等的生物降解方面也有重要

作用^[24];S-11 蜡样芽孢杆菌能分解碳水化合物且不产气,在葡萄糖肉汤中厌氧培养产酸^[25];S-7 解淀粉芽孢杆菌会影响酱香型白酒风味物质的生产,可以通过发酵代谢产生四甲基吡嗪、2-戊基呋喃和庚醇等多种香味物质成分^[26]。

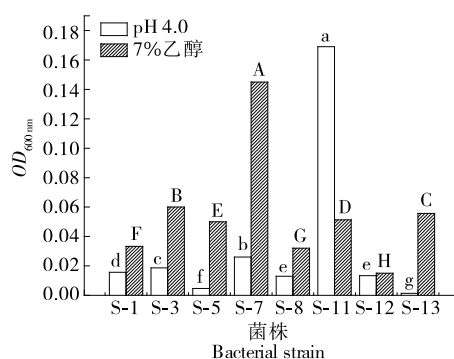
2.3 细菌特性分析

2.3.1 耐受性能 前期试验发现,高温大曲曲房空气中分离得到的细菌在 $\text{pH} > 4.0$ 时均能很好地生长,且其最大耐乙醇浓度为 7%,故根据细菌的生长繁殖情况,选取 $\text{pH} 4.0$ 、7%乙醇浓度条件下对比研究 8 种菌的耐酸性和耐乙醇能力,其结果见图 5。

由图 5 可知,高温大曲曲房空气中分离的 8 种细菌在 $\text{pH} 4.0$ 条件下,其耐受性能均较差,S-13 的耐受能力最低,但 S-11 的耐酸能力显著高于其他菌株($P < 0.05$)。7%乙醇浓度下,8 株菌的耐受性能均较差,但 S-7 耐受能力显著高于其他菌株($P < 0.05$),且其他菌株均有一定的耐受能力。

2.3.2 产酶特性 分离纯化后的细菌分别接种至产纤维素酶、产淀粉酶和产蛋白酶的培养基中,其产酶菌落图见图 6。

由图 7 可知,同时具有纤维素分解能力、淀粉和蛋白水解能力的菌株为 S-3(枯草芽孢杆菌)、S-7(解淀粉芽孢杆菌)、S-11(蜡样芽孢杆菌);具有纤维素分解能力和淀粉水解能力的菌株为 S-5(*Massilia* sp.);仅具有淀粉水解能力的菌株为 S-13(*Delftia* sp.)。这些菌株有待进一步研



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 5 高温大曲曲房空气中细菌的耐受性

Figure 5 The bacteria tolerance research in the air of high temperature Daqu fermentation room

究以探讨其在制曲及酿酒中应用的可能性,与王涛等^[18]的研究结果相似。产纤维素的 4 株菌不仅形成菌落,而且还有明显的透明圈,表明其产纤维素酶能力较强,可对其进行进一步研究;产淀粉酶的 5 株菌中有 4 株的透明圈与菌落面积的比值为 1.0~2.0,且 S-13 菌的比值达 5.1,说明这株菌高产淀粉酶,有进一步研究的价值;产蛋白酶的 3 株菌透明圈与菌落面积的比值为 1.5~3.0,其中 S-7 菌的比值最大为 2.77,表明 S-7 菌对蛋白质的水解能力显著强于其他细菌($P < 0.05$)。

颜林春^[27]通过高温大曲中微生物产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等特性,以透明圈法从分离到的芽孢杆菌中筛

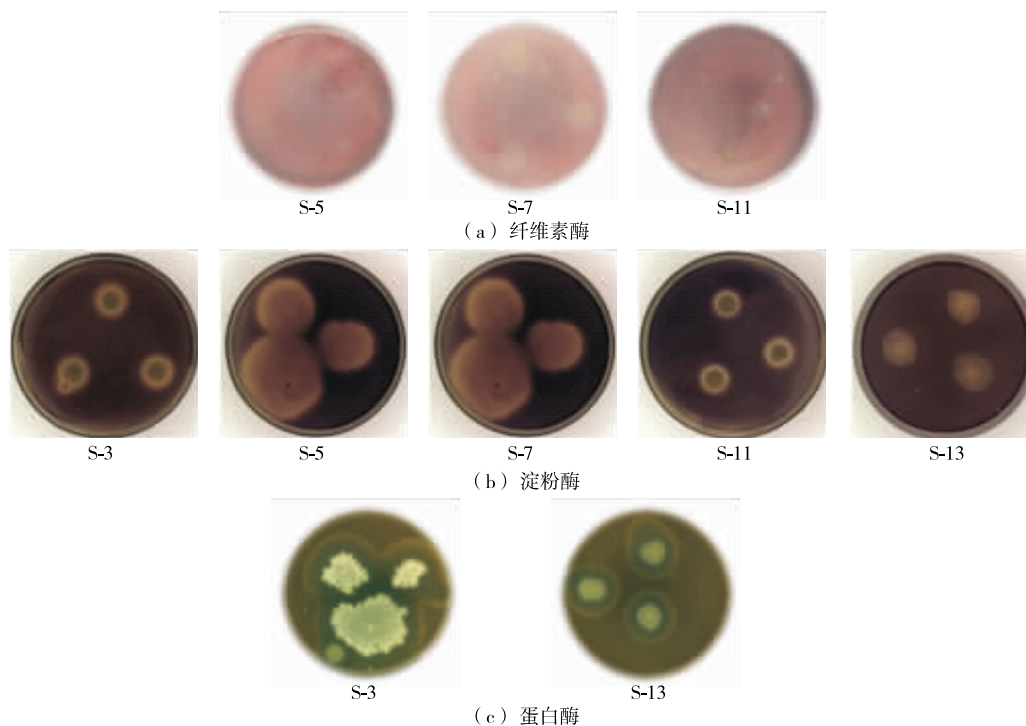
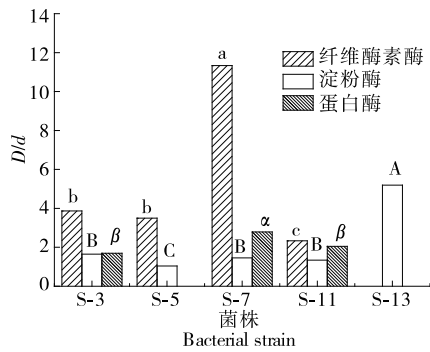


图 6 产酶菌落图

Figure 6 Enzyme-producing colony diagram



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 7 高温大曲曲房空气细菌的产酶特性

Figure 7 The bacteria enzyme production features research in the air of high temperature Daqu fermentation room

选出产特定酶类(纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶等)酶活性高的芽孢杆菌。通过耐热性、抑制性和拮抗性试验表明,产特定酶类且酶活性高的芽孢杆菌菌株均能应用于强化高温大曲制作。产酶试验发现,从酱香型大曲曲房空气微生物中分离得到的芽孢杆菌大多能分泌高活性的胞外产物酶,如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶。此外,通过菌株部分酿造性能分析发现,有些菌株具备 2 种以上的酿造特性,如 S-3 菌株同时具备纤维素利用、淀粉水解和 pH 4.0 耐受能力较好;S-11 菌株同时具备蛋白质分解、纤维素分解、淀粉水解且 7%乙醇耐受能力较好。

2.4 优势菌株发酵产物分析

根据产酶特性筛选出 3 株优势菌株,分别为 S-3(枯草芽孢杆菌)、S-7(解淀粉芽孢杆菌)、S-11(蜡样芽孢杆菌),其生长曲线见图 8,发酵产物分析结果见表 2。由图 8 可知,3 株菌均能在牛肉膏蛋白胨培养基上良好生长,前期生长速率快,4 h 后进入对数生长期,培养 20 h 时的 OD 值达最大,随后进入平缓期。

由表 2 可知,3-羟基-2-丁酮是这些菌的优势产物,且均会产生一些吡嗪类物质,如 2-甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪,还含有少量酚类、酯类等芳香类物质。菌株 S-3 共产生 7 种风味产物,其中 3-羟基-2-丁酮、2-甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪含量较高,其他醇类、酚类物质含量较少;菌株 S-7 共有 10 种代谢产物,其主要代谢产物除 3-羟基-2-丁酮、2-甲基吡嗪和 2,3,5,6-四甲基吡嗪外,还含有大量的 2,3-丁二醇,其他酚类物质含量较少;菌株 S-11 产生的风味物质种类较多(共 13 种),3-羟基-2-丁酮含量 $>4.000\text{ }\mu\text{g/mL}$,并产生大量己酸,其他酚类种类较多。3-羟基-2-丁酮又名乙偶姻,具有甜香、奶制品香,并带有脂肪风味;3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二醇是产生香味物质四甲基吡嗪的前体物质^[28],四甲基吡嗪又名川穹嗪,是许多食品的风味物质,同时也是其他香味物质的前体,具有焙

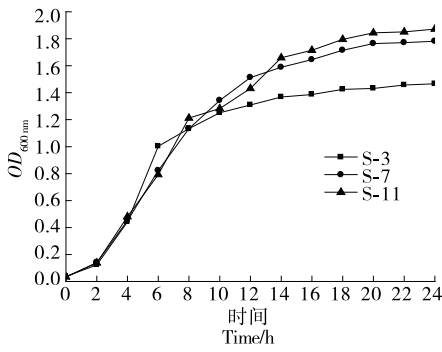


图 8 S-3、S-7、S-11 生长曲线

Figure 8 S-3, S-7, S-11 Growth curve

表 2 优势菌株发酵产物分析[†]

Table 2 Analysis of fermentation products of dominant strains $\mu\text{g/mL}$

名称	S-3	S-7	S-11
乙酸乙酯	4.000 0	4.000 0	4.000 0
2-甲基吡嗪	0.236 9	0.112 9	0.303 2
3-羟基-2-丁酮	2.379 0	1.472 0	4.341 0
乙酸	—	—	0.244 8
2,3,5,6-四甲基吡嗪	0.255 5	0.104 3	0.194 6
癸醛	—	—	0.108 2
2-乙酰基呋喃	—	—	0.055 3
2,3-丁二醇	—	1.305 0	0.064 2
1-辛醇	—	—	0.088 8
糠醇	0.444 4	0.208 7	0.612 2
己酸	—	—	0.073 8
甲基儿茶酚	0.309 7	0.115 3	0.448 4
苯乙醇	0.099 9	0.086 3	0.157 0
正己酸乙酯	—	0.064 5	—
辛酸乙酯	—	0.042 5	—

[†] “—”表示没有,S-3 为枯草芽孢杆菌,S-7 为解淀粉芽孢杆菌菌株,S-11 为蜡状芽孢杆菌菌株。

烤香,是中国白酒特有的功能性成分。黄永光等^[29]从酱香型大曲中筛选出枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌及解淀粉芽孢杆菌,其代谢产物有乙偶姻、吡嗪等物质。

3 结论

(1) 以川北某酱香型酒厂高温大曲曲房空气微生物为原料,经分离、纯化培养得 13 株菌,通过形态观察、分子生物学鉴定出 8 种菌,分别为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、*Pedobacter suwonensis*、血红鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas sanguinis*)、*Massilia* sp.、*Delftia* sp.和 *Sphingobacterium* sp.。

(2) 对 8 株菌进行产酶特性试验,发现芽孢杆菌的耐受性较强,并且芽孢杆菌大多能分泌高活性的胞外产物

酶,如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌均能产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶,可以加速酿酒原料中的蛋白质、淀粉等转变为糖、氨基酸等。

(3) 由产酶特性得到的 3 株优势功能菌株分别为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。按体积分数 10% 接种至高粱汁发酵液中,运用 GC-MS 技术分析其代谢产物,结果发现 3-羟基-2-丁酮是这些菌的优势产物,且四甲基吡嗪含量较高。在利用现代分子技术解析酱香型大曲细菌的基础上,后续可进一步对真核微生物区系及其相互协同制约的代谢机制进行分析和探讨。

参考文献

- [1] 信春晖, 赵纪文, 张锋国, 等. 浓香白酒酿造的科学性、健康性、艺术性[J]. 酿酒, 2018, 45(2): 30-34.
- [2] 车路萍, 邓杰, 卫春会, 等. 基于 PLFA 分析不同地域浓香型大曲及曲房空气细菌群落相关性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 33-39.
- [3] 肖辰. 泸型酒中温大曲微生物群落的演替及其对酒醅发酵的贡献[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 34-39.
- [4] 黄静, 严唯玮, 刘书亮, 等. 食醋大曲功能微生物菌群与品质解析研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 322-328.
- [5] 罗惠波, 唐玉明, 卓毓崇. 制曲车间空气微生物及其对曲药质量的影响研究[J]. 中国酿造, 2004(8): 19-22.
- [6] 王小平, 黄永光, 周文美. 酱香型白酒大曲细菌菌群结构及功能研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 19-25.
- [7] 王春晓, 唐佳代, 吴鑫颖, 等. 酿酒小曲中功能微生物的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 309-316.
- [8] 钟姝霞, 邓杰, 汪文鹏, 等. 酱香型酒醅产香芽孢杆菌的分离鉴定及其代谢产物分析[J]. 现代食品科技, 2017(4): 1-8.
- [9] LIPTHAY J R D, ENZINGER C, JOHNSEN K, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36(10): 1 607-1 614.
- [10] MARYAM M, SOFLAEI S S, ATEFEH B, et al. A method for improving the efficiency of DNA extraction from clotted blood samples [J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2019, 33(2): e22892.
- [11] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 中高温大曲中一株耐热地衣芽孢杆菌耐受性及产酶特性的初步研究[J]. 食品科技, 2016, 41(11): 14-20.
- [12] 刘延波, 张世凯, 赵志军, 等. 高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 65-71.
- [13] 李永博, 黄治国, 赵阳, 等. 窖泥中产纤维素酶菌株的筛选鉴定及产酶特性的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 9-14.
- [14] TANG Li, YANG Hao-wei, HE Liang, et al. Direct analysis of free-base nicotine in tobacco leaf by headspace solid-phase micro-extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry[J]. Accreditation and Quality Assurance, 2019, 24(5): 341-349.
- [15] ALINE G, ELENILSON G, LORENA A, et al. Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC-MS, UPLC-HRMS, and NMR[J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126874.
- [16] DIMITRIOS E, ATHANASIOS M, EFSTATHIOS Z, et al. A volatiles approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis[J]. Meat Science, 2019, DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.01.003.
- [17] 何明国, 聂骊锬, 王诚武, 等. 五粮浓香型白酒窖房和曲房空气细菌相关性的初步研究[J]. 酿酒科技, 2012(2): 61-64.
- [18] 王涛, 游玲, 赵东, 等. 中高温大曲和曲房细菌群落的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(1): 8-14.
- [19] 潘明, 侯华, 谢仁有, 等. 浓香型大曲发酵过程中细菌消长情况初探[J]. 四川理工学院学报(自科版), 2012, 25(4): 10-13.
- [20] 张明春, 曹敬华, 向苇, 等. 白云边酿酒大曲微生物分析研究[J]. 酿酒科技, 2010(2): 65-67.
- [21] 孟镇, 熊正河, 钟其顶, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析白酒大曲细菌群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2010(10): 159-162.
- [22] 余婷婷, 赖世强, 曹文涛, 等. 高温大曲中产酱香优势细菌的分离及耐受特性研究[J]. 酿酒科技, 2013(10): 10-12.
- [23] GONZÁLEZ A J, GALLEGÓ A, GEMINI V L, et al. Degradation and detoxification of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by an indigenous *Delftia*, sp. strain in batch and continuous systems[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 66(1): 8-13.
- [24] SHAKIBAIE M, AMIRI-MOGHADAM P, GHAZANFARI M, et al. Cytotoxic and antioxidant activity of the biogenic bismuth nanoparticles produced by *Delftia* sp. SFG[J]. Materials Research Bulletin, 2018, DOI:10.1016/j.materresbull.2018.04.001.
- [25] 金德才, 吴学玲, 梁任星, 等. 一株 DMP 降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 32(9): 1 318-1 323.
- [26] 曾德勇, 方镒, 刘涛, 等. 酱香型高温大曲中高产蛋白酶细菌的分离及鉴定[J]. 酿酒科技, 2015(3): 27-30.
- [27] 颜林春. 高温大曲的细菌菌群结构分析和酿酒功能菌的选育及强化大曲的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2012: 69-77.
- [28] 罗建超, 谢和. 大曲中产酱香芽孢杆菌的筛选及其代谢产香探析[J]. 酿酒科技, 2012(5): 35-40.
- [29] 黄永光, 杨国华, 张肖克, 等. 产酱香风味芽孢杆菌类菌株发酵代谢产物及其酶分析研究[J]. 酿酒科技, 2013(1): 41-45.