

# 产酱香功能菌的筛选及其风味物质研究

赵兴秀,何义国,赵长青,方春玉,张静,邹伟  
(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

**摘要:**本实验从四川某酒厂酱香型大曲中分离得到5株形态各异的菌株,分别进行菌落形态观察、革兰氏染色和感官评价筛选出产酱香菌,然后用HS-SPME结合GC-MS对酱香成分进行分析。结果表明,BL-1、BL-2和BL-5三株菌具有产酱香特性,生理生化分析初步判定三株菌都为枯草芽孢杆菌,HS-SPME和GC-MS检测结果显示,三株菌的酱香成分中吡嗪类、酮类种类和含量都较多,BL-1吡嗪类和酮类的相对含量为75.286%,BL-2的吡嗪类和酮类的相对含量为93.803%,BL-5吡嗪类和酮类的相对含量为86.92%,吡嗪和酮类对酱香风味的贡献较大。

**关键词:**枯草芽孢杆菌,酱香,GC-MS

## Screening of sauce flavor producing bacteria and flavor compounds research

ZHAO Xing-xiu, HE Yi-guo, ZHAO Chang-qing, FANG Chun-yu, ZHANG Jing, ZOU Wei

(College of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** Five different forms of strain were isolated from a winery in Sichuan sauce flavor Daqu, colony morphology, Gram stain and sensory evaluation of which were conducted and sauce producing bacteria was screened, and the sauce flavor compounds were analyzed by HS-SPME combined with GC-MS. The results showed that, BL-1, BL-2 and BL-5 could produce sauce flavor, which were *Bacillus subtilis* analyzed by the physiological and biochemical methods. The results detected by HS-SPME and GC-MS showed that the type and content of pyrazine and ketones were more than others among the sauce ingredients of the three strain. The relative content of pyrazines and ketones in BL-1 was 75.286%, and the relative content of pyrazines and ketones in BL-2 was 93.803%, and the relative content of pyrazines and ketones in BL-5 was 86.92%, which showed that pyrazine and ketones were greater contribution on producing sauce flavor than others.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; sauce flavor; GC-MS

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)06-0196-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.06.032

酱香型白酒是我国白酒行业比较典型和有特色的种类之一,其风味具有酱香突出、优雅细腻、醇厚丰满、空杯留香等特点<sup>[1]</sup>, 广受消费者的喜爱。酱香型白酒主体香成分一直是白酒行业的研究热点<sup>[2]</sup>, 高温堆积是酱香型白酒和浓酱结合型白酒普遍使用的重要环节,其目的是使糟醅中的淀粉、蛋白酶解成糖和氨基酸,进行反应而生成香味物质<sup>[3-4]</sup>。胡国栋等认为:酱香型白酒以吡嗪化合物、芳香族化合物和吡嗪化合物为特征性成分<sup>[5]</sup>。庄名扬表示,酱香的特征物质为2,3-2H-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡嗪-4-酮等,酱香型酒最突出的特点是总酸含量高<sup>[6]</sup>。酱香型白酒的主体特征香气成分究竟是什么,是许多学者和酿酒大师一直争论的问题,如果从产酱香细菌的角度来分析酱香型白酒的主要呈香物质,将为酱香型白

酒的主体特征香气成分研究提供一种新的思路和方法。本实验从酱香型大曲中筛选出五株形态各异的菌株,根据形态学特征和感官评价得到三株产酱香的菌株,分别命名为BL-1、BL-2和BL-5,经生理生化反应对其进行鉴定。以小麦固体为培养基采取35、45和55℃升温梯度培养,复合发酵6 d后产生酱香气味,并用HS-SPME结合GC-MS对酱香成分进行分析,探索酱香型白酒发酵过程中最主要的风味物质及其含量,以期对改善酒体质量提供实际指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酱香型大曲 为四川郎酒集团提供。

手动SPME进样器和65 μm PDMS/DVB固相微萃取头 美国Supelco公司; GC-MS (6890N-5973) 美

收稿日期: 2015-07-27

作者简介: 赵兴秀(1977-),女,硕士,副教授,主要从事微生物方面的研究, E-mail: zhaoxingxiu@sohu.com。

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2012-16); 泸州老窖科研奖学金项目(13ljzk05); 四川省教育厅项目(14ZA0206); 绿色催化四川省高校重点实验室项目(LYJ1304); 四川理工学院科研项目(2012PY08, 2015PY02)。

国Agilent;生化培养箱(SHP)北京中兴伟业仪器有限公司;WFJ7200型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 培养基 分离培养基(g/L):蛋白胨10,牛肉膏5,琼脂20,NaCl 5,pH7.0,1×10<sup>5</sup> Pa,121 °C灭菌30 min。

发酵培养基:将小麦麦粒粉碎,加等量水,润浸18 h后,蒸熟、冷却、打散,称取适量于三角瓶中,1×10<sup>5</sup> Pa,121 °C灭菌30 min。

1.2.2 材料预处理 将大曲碾碎后称取25 g溶入到225 mL无菌生理盐水中,充分振荡摇匀,备用。

1.2.3 产酱香菌株的筛选 将处理好的大曲样品制备成10<sup>-2</sup>~10<sup>-6</sup>的菌悬液,涂布在分离培养基上37 °C培养48 h,取其中具有典型特征的菌落进行纯化<sup>[7]</sup>。

复筛:将纯化后的菌落用无菌生理盐水洗脱后,取2 mL接种到25 mL液体培养基中,于37 °C摇床(转速:160 r/min)培养24 h,再取2 mL菌悬液接种到小麦培养基上进行梯度升温培养(0~2 d,培养温度35 °C,相对湿度50%;2~4 d,培养温度45 °C,相对湿度60%;4~6 d,培养温度55 °C,相对湿度70%)。然后对不同菌株培养基褐变(美拉德反应)和产香情况进行感官评定<sup>[7]</sup>,从中筛选出产酱香的菌株。

1.2.4 产酱香细菌的生理生化实验 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)的生理生化实验鉴定,分别对目标菌株进行糖酵解、乙酰甲基甲醇实验、甲基红、柠檬酸盐等实验。

1.2.5 产酱香菌株发酵香味物质HS-SPME和GC-MS分析<sup>[8]</sup> 取3 g发酵6 d的发酵样品于萃取瓶中,用顶空萃取方法,将萃取头插入萃取瓶中,先平衡5 min,再60 °C加热萃取50 min。萃取后将萃取针打入气质联用仪,当出现峰时,可拔出萃取针。

色谱分离条件:进口温度250 °C;氦载气流速1.0 mL/min;色谱柱:HP-5MS 5% Pheny Methyl Siloxance

(30 m×0.25 mm×0.25 μm)。升温程序:柱温50 °C(保留2 min),以5 °C/min升温至280 °C,保持2 min。

质谱条件:离子源为EI,离子源温度230 °C,电离能70 eV,倍增器电压380 V,接口温度280 °C,发射电流34.6 mA,扫描范围10~550 u。

GC-MS图谱中所得各组分及含量由安捷伦工作站分析得出。

## 2 结果与讨论

### 2.1 初筛特征菌株及感官评定

初筛后得到了5株具有典型特征的细菌分别命名为BL-1、BL-2、BL-3、BL-4、BL-5,将其在小麦培养基培养6 d,记录每株功能菌在不同时间的产香情况及培养基褐变情况,如表1、表2所示。

从表1可以看出,BL-1、BL-2和BL-5具备一定的产香能力,其中,BL-1有淡淡的芝麻香味,BL-2有淡淡的酱香味,同时带有油味,BL-5有酱香味,带有酸味。而BL-3和BL-4不具备产酱香能力。一般来说,培养基褐变可视为美拉德反应,美拉德反应能够一定程度上体现培养基发酵产生挥发性香气的情况<sup>[9]</sup>,其中,BL-1、BL-2、BL-3和BL-5有褐变,且都不同程度产生酱香味(BL-3除外),而BL-4无明显褐变,表明BL-4未发生美拉德反应。

从表2可以看出,发酵6 d后,BL-1、BL-2和BL-5的产香能力较发酵4 d有所提高,培养基褐变也更加明显,且表面有大量菌落覆盖,表明美拉德反应对增加酱香有巨大贡献,这与周国红等在美拉德反应对白酒香味的影响中的研究结果相一致<sup>[10]</sup>,而BL-3和BL-4不具备产酱香能力。

### 2.2 复筛菌落特征

经固态发酵复筛后,仅有BL-1、BL-2、BL-5这3株细菌产酱香气味。图1~图3是筛选出产酱香细菌的菌落形态和革兰氏染色后的图像。

BL-1菌落形态:菌落呈圆形,周围光滑,表面湿润,中间凸起,粘稠,易挑取,不透明。正反两面颜色

表1 发酵4 d后培养基褐变及产香情况

Table 1 The browning of medium and flavor producing after 4 days

细菌	产香情况	培养基褐变情况
BL-1	有淡淡芝麻香味(+)	褐变,培养基颜色为棕黄色
BL-2	有淡淡酱香味,同时带有油味(+)	褐变,培养基呈棕黄色
BL-3	腐臭味(-)	褐变明显,颜色呈深棕色
BL-4	烂草味(-)	无明显褐变,颜色呈培养基的黄色
BL-5	有酱香味,带有酸味(+)	部分褐变,颜色分布不均匀,一半黄色,一半棕色

注:将产酱香能力分为3个等级:不产酱香为“-”;产酱香“+”;明显酱香“++”;表2同。

表2 发酵6 d后培养基褐变及产香情况

Table 2 The browning of medium and flavor producing after 6 days

细菌	产香情况	培养基褐变情况
BL-1	酱香,带芝麻香味(+)	褐变,培养基颜色为棕色,粘稠,面铺满菌落
BL-2	明显酱香,少量酸味(++)	发生明显褐变,培养基为深褐色,粘稠,表面光泽,湿润
BL-3	类似饼干味(-)	褐变,培养基表面有少量菌落覆盖,粘稠
BL-4	腐草味(-)	褐变不明显,培养基较干燥,粘稠,颜色为棕黄色,无光泽
BL-5	浓郁酱香味,酱香纯正(++)	褐变明显,培养基表面大量菌落覆盖,粘稠

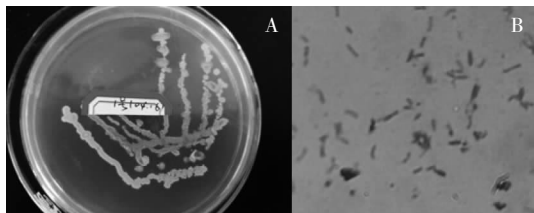


图1 BL-1菌落形态(A)以及革兰氏镜检图片(B)

Fig.1 The colony morphology (A) and gram microscopic examination (B) of BL-1

一致菌落直径1~2 mm; BL-1个体形态: 柱状, 染色均匀, 革兰氏染色呈紫色。

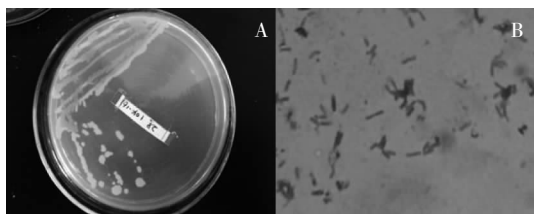


图2 BL-2菌落形态(A)以及革兰氏镜检图片(B)

Fig.2 The colony morphology (A) and gram microscopic examination (B) of BL-2

BL-2菌落形态: 柱状, 两端椭圆, 染色均匀, 革兰氏染色为紫色。

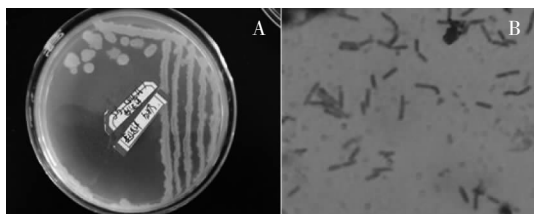


图3 BL-5菌落形态(A)以及革兰氏镜检图片(B)

Fig.3 The colony morphology (A) and gram microscopic examination (B) of BL-5

BL-5菌落形态: 菌落呈圆形, 表面湿润, 正反两面颜色一致, 为乳白色, 菌落易挑取, 革兰氏染色呈紫色。

通过感官评定, 筛选出BL-1、BL-2和BL-5三株产酱香较好的细菌进行后续实验。

### 2.3 功能细菌生理生化反应鉴定结果

参见《伯杰氏细菌鉴定手册》产酱香的BL-1、BL-2、BL-5菌株的生理生化实验结果见表3所示。

从表3中得出: 对于可产酱香气味的BL-1、BL-2和BL-5细菌都可以分解葡萄糖和甘露醇, 同时产酸; 在无氧的情况下, 这3株菌不能生长; 它们可以产生分解酪素、淀粉和明胶的酶类物质; 在乙酰甲基甲醇实验和过氧化氢酶促实验中, 三株菌鉴定均呈阳性; 都能在5%和7%的NaCl的培养基上生长; BL-1和BL-2在甲基红实验中呈阳性, BL-5在甲基红实验中呈阴性。

将上述结果对比《伯杰氏系统细菌分类手册》,

表3 产酱香细菌生理生化反应结果

Table 3 The physiological and biochemical response of the sauce-producing strains

实验项目	BL-1	BL-2	BL-5
葡萄糖发酵	+	+	+
甘露醇发酵	+	+	+
厌氧生长	-	-	-
酪素水解	+	+	+
淀粉水解	+	+	+
V-P试验	+	+	+
甲基红试验	+	+	-
明胶液化	+	+	+
菌膜形成	+	+	+
过氧化氢酶试验	+	+	+
5%NaCl	+	+	+
7%NaCl	+	+	+

注:“-”为阴性;“+”为阳性。

所筛选出的三株菌的生理生化特性与枯草芽孢杆菌几乎符合。仅仅BL-5在甲基红实验中呈阴性这一反应和枯草芽孢杆菌的生理生化反应不一致, 其他生理生化反应和枯草芽孢杆菌一致。结合所观察到的菌落形态以及菌株个体形态特征, 判定BL-1、BL-2和BL-5三株菌为枯草芽孢杆菌, 将在后续实验中通过16s DNA进行分子鉴定。

### 2.4 产酱香菌株发酵产物的GC-MS检测

2.4.1 BL-1菌株发酵液中产挥发性化合物GC-MS图谱及检测 BL-1菌株发酵6 d后, 用固相微萃取及GC-MS检测其发酵液的挥发性物质, 其GC-MS图谱如图4所示, 挥发性成分检测结果如表4所示。

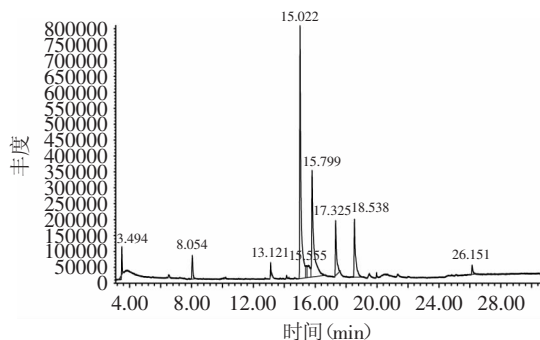


图4 BL-1香气成分GC-MS图谱

Fig.4 The GC/MS spectra of the aroma from BL-1

由表4可知, BL-1菌株发酵液中共检测出12种风味物质, 其中吡嗪类3种, 相对含量为43.175%, 2,3,5,6-四甲基吡嗪的含量最高为30.737%, 吡嗪是白酒中重要的香气化合物, 在酱香、芝麻香等采用高温曲发酵的白酒中普遍存在, 赋予白酒有益健康的功效<sup>[1]</sup>; 酮类2种, 相对含量为32.111%; 醛类1种, 相对含量为19.063%; 醇类2种, 相对含量为0.718%; 2,4,5-三甲基唑的相对含量为2.283%; 剩余三种分别为L-胱氨酸(0.671%)、顺-乌头酸酐(0.501%)和1,3-二甲氧基丙烷(1.007%)。

表4 BL-1发酵液中挥发性物质检测结果  
Table 4 The volatile substances of BL-1 broth

峰序号	保留时间(min)	中文名称	英文名称	相对含量(%)
1	3.133	L-胱氨酸	L-Cystine	0.671
2	3.588	顺-乌头酸酐	Aconitic anhydride (6CD)	0.501
3	7.829	2,3-丁二酮	2,3-Butanedione	9.135
4	13.090	2,4,5-三甲基唑	Oxazole, 2,4,5-trimethyl-	2.283
5	14.986	3-羟基-2-丁酮	3-Hydroxy-2-butanone	22.976
6	15.788	2,5-二甲基吡嗪	2,5-Dimethyl pyrazinel	4.514
7	17.307	2,3,5-三甲基吡嗪	2,3,5-Trimethylpyrazine	7.924
8	18.524	2,3,5,6-四甲基吡嗪	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	30.737
9	19.401	苯甲醛	Benzaldehyde	19.063
10	19.969	环己醇	2-butylcyclohexanol	0.155
11	20.457	1,3-二甲氧基丙烷	1,3-Dimethoxypropane	1.007
12	20.646	2,3-丁二醇	2,3-Butanediol	0.563

表5 BL-2发酵液中挥发性物质检测结果  
Table 5 The volatile substances of BL-2 broth

峰序号	保留时间(min)	中文名称	英文名称	相对含量(%)
1	7.703	2,3-丁二酮	2,3-Butanedione	7.879
2	13.072	右旋萜二烯	(+)-(4R)-Limonene	2.056
3	14.963	3-羟基-2-丁酮	3-Hydroxy-2-butanone	35.463
4	15.757	2,5-二甲基吡嗪	2,5-Dimethyl pyrazine	7.547
5	17.292	2,3,5-三甲基吡嗪	2,3,5-Trimethylpyrazine	9.762
6	18.516	2,3,5,6-四甲基吡嗪	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	33.152
7	19.456	苯甲醛	Benzaldehyde	2.236
8	20.466	2,3-丁二醇	(R,R)-2,3-Butanediol	0.369
9	26.137	石炭酸	Phenol	1.326

2.4.2 BL-2菌株发酵液中挥发性物质GC-MS图谱及检测结果 BL-2菌株发酵6 d后,用固相微萃取及GC-MS检测其发酵液的挥发性物质,其GC-MS图谱如图5,挥发性成分检测结果如表5所示。

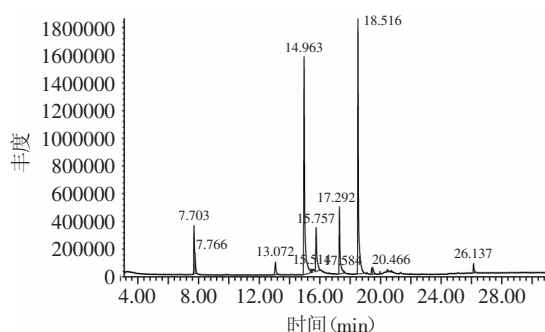


图5 BL-2香气成分GC-MS图谱

Fig.5 The GC/MS spectra of the aroma from BL-2

由表5可知, BL-2菌株发酵液中共检测出9种风味物质,其中吡嗪类3种,相对含量为50.461%, 2,3,5,6-四甲基吡嗪的含量为33.152%;酮类2种,相对含量为43.342%,其中,3-羟基-2-丁酮的含量最高为35.463%;醛类1种,相对含量为2.236%;醇类1种,相对含量为0.369%;其余三种分别为右旋萜二烯(2.056%)、石炭酸(1.326%)和2,3-丁二醇(0.369%)。

2.4.3 BL-5菌株发酵后产挥发性物质GC-MS图谱及检测结果 BL-5菌株发酵6 d后,用固相微萃取及GC-MS检测其发酵液的挥发性物质,其GC-MS图谱如图6,挥发性成分检测结果如表6所示。

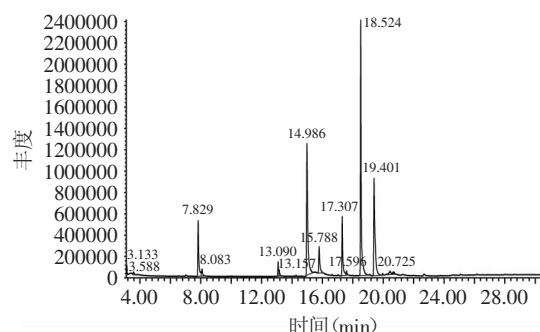


图6 BL-5香气成分GC-MS图谱

Fig.6 The GC/MS spectra of the aroma from BL-3

由表6可知, BL-5菌株发酵液中共检测出10种风味物质,其中吡嗪类3种,相对含量为45.955%, 2,5-二甲基吡嗪的含量为26.902%;酮类1种,3-羟基-2-丁酮的含量为40.965%;酯类1种,相对含量为1.961%;醇类1种,相对含量为4.392%;双乙酰的相对含量为3.059%,其余三种分别为右旋萜二烯(0.851%)、石炭酸(1.297%)和2-氨基丁烷(1.519%)。



表6 BL-5菌种发酵后产挥发性物质检测结果

Table 6 The volatile substances of BL-5 broth

峰序号	保留时间(min)	中文名称	英文名称	相对含量(%)
1	3.494	2-氨基丁烷	sec-Butylamine	1.519
2	8.054	双乙酰	Butane-2,3-dione	3.059
3	13.121	右旋萜二烯	(+)-(4R)-Limonene	0.851
4	15.022	3-羟基-2-丁酮	3-Hydroxy-2-butanone	40.965
5	15.452	甲氧基乙酸乙酯	Ethyl methoxyacetate	1.961
6	15.555	2,3-丁二醇	(S,S)-2,3-Butanediol	4.392
7	15.799	2,5-二甲基吡嗪	2,5-Dimethyl pyrazine	26.902
8	17.325	2,3,5-三甲基吡嗪	2,3,5-Trimethylpyrazine	8.415
9	18.538	2,3,5,6-四甲基吡嗪	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	10.638
10	26.151	石炭酸	Phenol	1.297

### 3 结论

3.1 本实验采用稀释涂布平板法从酱香型大曲中分离筛选出三株菌落形态各异的产酱香香气的细菌,分别定名为BL-1、BL-2、BL-5。产酱香细菌在小麦固体培养基上以梯度升温培养6 d后产生酱香气味,说明升温梯度培养可以促进酱香味的产生。

3.2 从酱香型大曲中筛选出的三株产酱香的细菌,其革兰氏染色都呈阳性,根据其形态学特征并结合生理生化反应初步判定该菌为枯草芽孢杆菌。

3.3 经HS-SPME和GC-MS对酱香成分进行分析,三株菌的酱香成分中吡嗪类和酮类种类和含量都较多,对酱香型白酒风味的贡献较大。其中,BL-1的吡嗪类3种,相对含量为43.175%,酮类2种,相对含量为32.111%;BL-2吡嗪类3种,相对含量为50.461%,酮类2种,相对含量为43.342%;BL-5吡嗪类3种,相对含量为45.955%,酮类1种,相对含量为40.965%。

#### 参考文献

[1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京:中国轻工业出版社,

1998:135-143.

[2] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:20-24.

[3] 张荣. 产酱香功能菌的筛选及其特征风味化合物的研究[D]. 无锡:江南大学,2009:39-45.

[4] 汪玲玲,范文来,徐岩. 酱香型白酒液液微萃取-毛细管色谱骨架成分与香气重组[J]. 食品工业科技,2012,33(19):304-308.

[5] 胡国栋,程劲松. 酱香型白酒吡嗪酮和吡喃酮类化合物的分析研究[J]. 酿酒科技,1997(4):31-34.

[6] 庄名杨. 再论美拉德反应产物与中国白酒的香和味[J]. 酿酒科技,2005(5):34-38.

[7] 曹敬华. 产香风味菌的筛选及对美拉德反应作用的研究[D]. 武汉:湖北工业大学,2011.

[8] 范文来,张艳红,徐岩. 应用HS-SPME和GC-MS分析白酒大曲中微量挥发性成分[J]. 酿酒科技,2007(12):74-78.

[9] 赵维,娜谢,秦京,等. 嗜热芽孢杆菌制曲的美拉德反应与褐变产酱香研究[J]. 贵州农业学报,1992,11(2):83-89.

[10] 周国红,李彩,董士海,等. 美拉德反应对白酒香味的影响[J]. 安徽农业科学,2012,40(3):1461-1462.

(上接第195页)

件研究[J]. 食品科技,2008,33(4):107-109.

[2] Ishii. Structure and function of feruloylated polysaccharides[J]. Plant Science,1997,127(2):111-127.

[3] 曾彩凤. 酶解玉米麸皮制备阿魏酰低聚糖及其抗氧化性质的研究[D]. 齐齐哈尔:齐齐哈尔大学,2012.

[4] Xiaoping Y, Jing W, Huiyuan Y. Feruloyl oligosaccharides stimulate growth of Bifidobacterium bifidum[J]. Anaerobe,2005,11(4):225-229.

[5] 解春艳,吴智艳,杜鹃,等. 阿魏酰低聚糖研究进展[J]. 食品科学,2012,33(7):336-340.

[6] Gudipati Muralikrishna, M V S S T Subba Rao. Cereal non-cellulosic polysaccharides structure and function relationship—an overview[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2007,47(6):599-610.

[7] 孙元琳,崔璨,顾小红,等. 黑小麦麸皮酚酸物质的定性分析与阿魏酸含量测定[J]. 中国粮油学报,2014,29(11):113-117.

[8] Wang Jing, Yuan Xiaoping, Sun Baoguo, et al. On-line separation and structure characterization of feruloylated oligosaccharides from wheat using HPLC-ESI-MNs[J]. Food Chemistry,2009,115(4):1529-1541.

[9] 潘海晓,刘海顺,王静,等. 玉米麸皮中阿魏酰低聚糖的制备[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2011,29(3):33-37.

[10] 盛倩倩,王文侠,宋丽春,等. 米糠阿魏酰低聚糖的纤维素酶法提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(12):197-203.

[11] Bunzel M, Ralph J, Marita JM, et al. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fiber[J]. J Sci Food Agric,2001,81(7):653-660.

[12] 赵阳阳,欧仕益,林奇龄,等. 低聚糖阿魏酸酯含量的快速测定方法[J]. 食品科学,2010,31(18):329-332.

[13] 陈小娥,方旭波. 壳寡聚糖的薄层层析[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2008,27(4):361-365.