

牛栏山二锅头酒醅中 芽孢杆菌分离鉴定及发酵风味分析

杨春霞¹, 廖永红^{1*}, 刘峻雄¹, 胡建华², 胡佳音², 窦 岫¹

(1.北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京市高等学校工程中心, 食品风味化学北京市重点实验室, 北京 100048;

2.北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂, 北京 101301)

摘要:从牛栏山二锅头酒醅中分离筛选出5株产风味物质能力较好的芽孢杆菌, 通过16S rDNA序列分析和构建系统发育树, 5株细菌分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。分别对它们进行发酵风味分析, 其发酵液经固相微萃取和GC-MS分析, 并除去空白培养基中物质, 地衣芽孢杆菌BL-1发酵液共检测到14种风味物质, 蜡样芽孢杆菌BC-1和短小芽孢杆菌BP-1发酵都得到12种风味物质, 枯草芽孢杆菌BS-1好氧发酵共得到16种风味物质, 枯草芽孢杆菌BS-2厌氧发酵共得到19种风味物质。除短小芽孢杆菌外, 其他4株芽孢杆菌都含有较多数量的酯类化合物, 且主要代谢风味物质都是3-羟基-2-丁酮, 而短小芽孢杆菌BP-1则含有数量较多的烃类化合物, 其主要风味物质是苯乙醇。

关键词:风味物质, 酒醅, 固相微萃取, 气相色谱-质谱联用仪, 芽孢

Identification of *Bacillus* from Niulanshan Erguotou fermented grain and analysis of flavor compounds in the fermentation

YANG Chun-xia¹, LIAO Yong-hong^{1*}, LIU Jun-xiong¹, HU Jian-hua², HU Jia-yin², DOU Shen¹

(1.School of Food and Chemical Engineering, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2.Niulanshan Distillery, Beijing Shunxin Agriculture Co., Ltd., Beijing 101301, China)

Abstract: Five strains of bacillus which can produce flavor were screened from Niulanshan Erguotou fermented grain. Using the sequences analysis of 16S rDNA and phylogenetic tree construction, five strains were identified as *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*. The fermentation broth of five bacillus strains were analyzed by solid phase micro-extraction and chromatography-mass spectrometry. Removing the compounds of blank, a total of 14 flavor compounds in fermentation broth of *Bacillus licheniformis* BL-1, 12 flavor compounds in fermentation broth of *Bacillus cereus* BC-1 and *Bacillus pumilus* BP-1, 16 flavor compounds in fermentation broth of *Bacillus subtilis* BS-1, 19 flavor compounds in fermentation broth of *Bacillus subtilis* BS-2. Except *Bacillus pumilus*, the fermentation of other four *Bacillus* strains mainly contained esters compound, and 3-hydroxy-2-butanone was the most important flavor compound. However, the fermentation of *Bacillus pumilus* BP-1 mainly comprised alkynes compound and phenylethyl alcohol was the main flavor compound.

Key words: flavor compounds; fermented grain; solid phase micro-extraction; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); spore

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)09-0069-06

白酒的酿造过程是栖息在酒醅中庞大微生物区系在酒醅固、气、液三相界面复杂的物质代谢过程。

酒醅中微生物区系此消彼长, 各种物质形态不断产生和消失, 通过复杂的物质能量代谢变化, 生成了多种香气物质^[1], 进而形成了白酒独特的风格特征和香型, 微生物区系中具有产风味物质能力的菌株对白酒特征风味的影响更大。近年来, 随着色谱技术的发展, 相关人员对白酒中特征风味物质的研究已经取得了一定的成果。利用气相色谱-嗅闻法(GC-O)、气

收稿日期: 2011-08-01 * 通讯联系人

作者简介: 杨春霞(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目课题(2011BAD23B01, 2011BAC11B06)。

相色谱-质谱联用仪(GC-MS)和全二维气相色谱/飞行时间质谱等色谱技术先后分析了茅台、五粮液、汾酒等国内多种名酒中的风味物质,还对某些特征风味物质做了定量分析^[2-9]。白酒中各种香味成分的含量和相互之间的关系对白酒特征风味的形成至关重要,但是目前对于白酒中一些关键的香味物质的形成机制和酒醅中具有产风味物质能力的菌株发酵代谢机理的研究较少。早期曾有学者对茅台酒曲、酒醅中的微生物进行了分离鉴定,结果表明芽孢杆菌最多,同时还利用所分离的细菌制曲也生成了像茅台大曲的香味。还有学者从酱香型曲中分离出嗜热芽孢杆菌,并且研究得知该菌在酱香味物质的生成过程中起着决定性的作用^[10]。庄名扬等从酱香型白酒大曲中分离鉴定出一株地衣芽孢杆菌,发现它能加速美拉德反应的进行,其发酵液中也检测出白酒中常见香味物质^[11]。张荣从郎酒高温大曲中筛选鉴定得到三株地衣芽孢杆菌,并且对其发酵液采用GC-MS分析,得到3-羟基-2-丁酮、四甲基吡嗪和呋喃扭尔是与酱香香气有关的重要化合物^[12]。赵佳等从汾酒酒醅中分离鉴定出28株产酸细菌,并对其中8株高产酸细菌进行产酸分析研究,对调节汾酒酿造过程控制酒醅发酵提供了理论基础^[13]。本实验对牛栏山二锅头酒醅中产风味物质的芽孢杆菌分离筛选,利用16S rDNA序列分析法分析鉴定芽孢杆菌,然后采用固相微萃取法对产风味物质的芽孢杆菌的发酵液进行萃取,GC-MS分析检测其发酵液中风味物质的组成。通过分析具有产风味物质能力芽孢杆菌的代谢产物,探求各菌与酒中风味物质的关系,进而为研究各菌的代谢主要风味物质及其形成机理奠定基础,为牛栏山二锅头酒中特征风味的研究提供有效的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酒醅样品 来源于北京牛栏山二锅头酒厂发酵地缸,分别于地缸醅料的表层、中层、下层3点混合均匀作为一个分析样品,取样时间发酵10d的酒醅,样品密封后4℃保藏备用;异丙醇、十二烷基硫酸钠、氯化钠 均为分析纯,北京化工厂;Loading Buffer、Taq DNA聚合酶、dNTPs混合液、蛋白酶K、RNaseA、D2000 天根生化科技(北京)有限公司;牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏5g,蛋白胨10g,氯化钠5g,琼脂20g,去离子水1000mL;LB(Luria-Bertani)培养基 蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,琼脂20g,去离子水1000mL;玉米粉液体培养基 玉米粉60g, KH_2PO_4 3g,蔗糖10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g,维生素B₁ 100mg,去离子水1000mL。

6890N-5973i气相色谱-质谱联用仪(GC-MS) 美国Agilent;PC420固相微萃取仪、固相微萃取头(CAR/PDMS 75 μm) 美国SUPELCO;YQX-II厌氧培养箱

上海新苗医疗器械制造有限公司;TC-XP-G PCR仪 杭州博日有限公司;Alphamager紫外凝胶成像仪 美国安莱。

1.2 实验方法

1.2.1 酒醅中芽孢杆菌的分离纯化 采用梯度稀释涂布法分离酒醅中芽孢杆菌,然后以好氧和厌氧两种方式分别培养来筛选不同形态的芽孢杆菌。具体方法见图1。

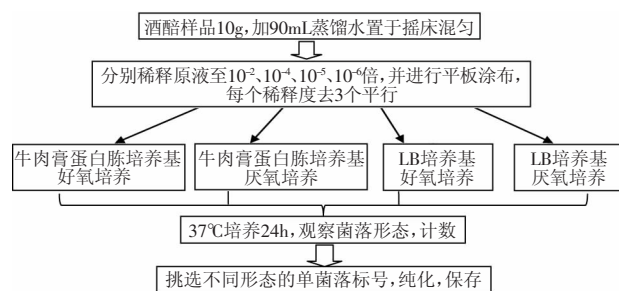


图1 酒醅中细菌的分离纯化

Fig.1 Separation of bacteria from fermented grains

1.2.2 酒醅中产风味物质芽孢杆菌的筛选 将纯化后的菌株以5%的接种量接种到玉米液体培养基上,37℃培养24h后用GC-MS检测各菌株发酵液中风味成分,以未接种的空白培养基作为对照,根据各菌株发酵液中风味成分的数量筛选产风味物质芽孢杆菌。

1.2.3 固相微萃取条件 用CAR/PDMS 75 μm 萃取头(Supelco)进行萃取。在17mL顶空瓶中加入8mL发酵液和3g氯化钠,插入萃取头,60℃预热5min,萃取吸附30min,GC解吸5min(250℃),用于GC-MS分析。

1.2.4 GC-MS分析条件 色谱条件:色谱柱为AB-1701毛细管柱(30m $\times$ 0.25mm,i.d. $\times$ 0.25 μm);升温程序:45℃保持4min,以8℃/min的速度升温至220℃,保持5min;载气He流速1.0mL/min,进样量1 μL ,不分流进样。质谱条件:电子轰击(EI)离子源;电子能量为70eV;离子源温度为230℃;质量扫描范围m/z 35~500。

1.2.5 酒醅中芽孢杆菌的16S rDNA序列分析

1.2.5.1 芽孢杆菌总DNA的提取 接种纯化过的芽孢杆菌于LB液体培养基中,37℃,150r/min摇床培养15h;取2mL芽孢杆菌培养液,室温下12000r/min离心5min,弃去上清液,收集菌体;菌体沉淀中加入567 μL TE Buffer,反复吹打使之重新悬浮,加入30 μL 10% SDS和10 μL 蛋白酶K,混匀后,37℃温育1h;加入100 μL 5mol/L氯化钠,充分混匀,再加入80 μL CTAB/NaCl,混匀后在65℃下温育10min;加入等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1,体积比),混合均匀,12000r/min离心10min;转移上清液至1.5mL离心管中,加入0.6~0.8倍体积的异丙醇,轻轻混合均匀至DNA沉淀下来,12000r/min离心5min;弃去上清液,沉淀用1mL 70%乙醇洗涤,12000r/min离心10min,弃去乙醇;于洁净的超净台上自然干燥后加15 μL TE Buffer,放入-20℃冰箱保存。

1.2.5.2 16S rDNA PCR扩增及PCR产物检测 将上述菌株基因组DNA作为PCR扩增模板,采用100 μL 反应体系进行PCR扩增:10 $\times$ PCR缓冲液10 μL ,dNTPs(10mmol/L)8 μL ,上下游引物各4 μL ,Taq DNA聚合酶(2.5U/ μL)1 μL ,超纯水69 μL ,DNA模板4 μL ,最后以超纯水为阴性对照。PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性1min,50℃退火1min,72℃延伸2min,35个循

环后, 72℃延伸10min。

PCR样品检测: 在1%琼脂糖凝胶上150V电泳30min, 在EB中染色30min, 漂洗后在紫外凝胶成像系统上拍照。

1.2.5.3 16S rDNA序列测定及分析 对PCR扩增产物进行16S rDNA测序。测序工作由北京三博远志公司完成, 将测序结果输入GenBank中, 利用Blast功能组件将测得的基因序列与GenBank数据库中的所有序列进行同源性比较。

1.2.6 芽孢杆菌发酵液风味物质分析 将筛选鉴定完的具有产风味物质能力的芽孢杆菌以1%的接种量分别接种于玉米培养基中, 以未接种的空白培养基为对照, 37℃分别培养36h后, 各发酵液进行风味物质分析。

1.2.6.1 固相微萃取发酵液中风味物质 方法同1.2.3。

1.2.6.2 GC-MS分析条件 色谱条件: 色谱柱为AB-1701毛细管柱 (30m×0.25mm, i.d.×0.25μm); 升温程序: 35℃保持4min, 以5℃/min的速度升温至150℃, 恒温保持4min, 然后以3℃/min的速度升温至220℃, 保持5min; 载气He流速1.0mL/min, 进样量1μL, 不分流进样。质谱条件: 电子轰击(EI)离子源; 电子能量为70eV; 离子源温度为230℃; 质量扫描范围m/z 35~500。

2 结果与讨论

2.1 酒酿中产风味物质芽孢杆菌的分离筛选

经1.2.1中方法, 好氧和厌氧两种培养方式共分离得到48株芽孢杆菌。将48株芽孢杆菌分别按照1.2.2方法发酵培养, 其发酵液经GC-MS定性分析得知, 大部分芽孢杆菌发酵液中风味物质种类很少, 除去空白培养基中物质, 选定5株风味物质种类和含量较多的芽孢杆菌作为主要产风味物质芽孢杆菌, 分别为BL-1、BC-1、BP-1、BS-1和BS-2。

2.2 芽孢杆菌的16S rDNA序列分析

用1%的琼脂糖凝胶对5株产风味物质芽孢杆菌的16S rDNA的PCR扩增产物做电泳检测, 通过凝胶成像分析系统观察, 其PCR扩增的电泳图如图2所示。结果显示在约1500bp处出现荧光条带, 且无明显拖尾现象, 阴性对照无条带, 说明反应体系没有被污染。因此, PCR扩增产物能够满足后续测序的要求。

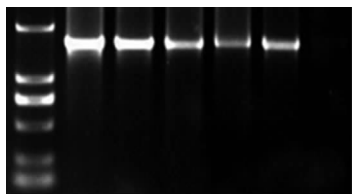


图2 5株芽孢杆菌16S rDNA区域PCR扩增结果

Fig.2 PCR amplification results of five bacillus 16S rDNA

注: 从左自右分别为: D2000 Maker, BL-1, BC-1, BP-1, BS-1, BS-2, 阴性对照。

将测序得到的结果在GenBank上进行16S rDNA序列同源性比较, 调集高同源性典型菌株序列, 用Blast, Clustal X和Mega3.0软件分析, 构建出产风味物质芽孢杆菌的系统发育树, 如图3。结合传统分类方

法与系统发育分析结果, BL-1与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* F1)的同源性最近, BC-1与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的同源性最近, BP-1与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* PLW-J4-4.1)的同源性最近, 好氧菌株BS-1和厌氧菌株BS-2与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* RHH57)的同源性最近, 同源性均能达到99%以上。

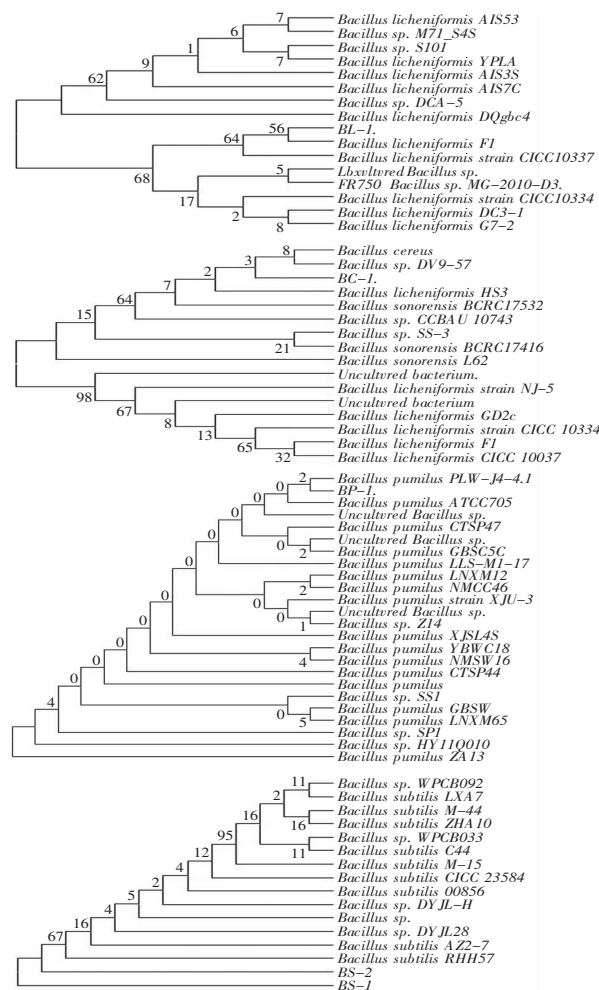


图3 基于16S rDNA序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria bases on the 16S rDNA sequence

注: 左上: BL-1; 右上: BC-1; 左下: BP-1; 右下: BS-2, BS-1。

2.3 芽孢杆菌发酵液风味物质分析

本实验按照1.2.6中方法, 采用顶空固相微萃取法对5株芽孢杆菌发酵液和空白培养基进行选择性的萃取, 然后用GC-MS对发酵液中风味物质进行检测, 与空白培养基中的物质比较, 定性分析出5株芽孢杆菌的发酵代谢产物及其产生风味物质的贡献率。5株芽孢杆菌发酵液GC-MS总离子流色谱图如图4~图9所示。由图4~图9可见, 空白培养基经GC-MS分析后共检测得到14个峰, BL-1发酵液共检测得到22个峰, BC-1发酵液共检测得到16个峰, BP-1共检测得到18个峰, 好氧菌BS-1共检测得到23个峰, 厌氧菌BS-2共检测得到28个峰。

5株芽孢杆菌发酵液中风味物质主要有酯类化合物、烃类化合物、杂环类化合物、醇类化合物、醛酮

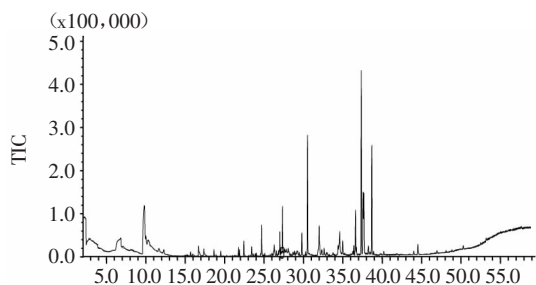


图4 空白培养基的总离子色谱图

Fig.4 GC-MS total ions chromatogram of blank medium

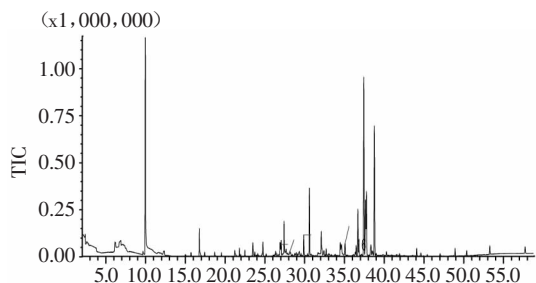


图5 地衣芽孢杆菌BL-1发酵液中风味物质的总离子色谱图

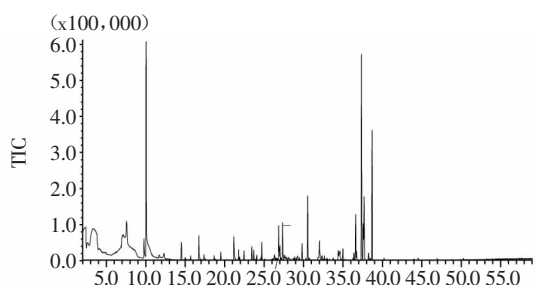
Fig.5 GC-MS total ions chromatogram of flavor compounds in the fermentation of *Bacillus licheniformis* BL-1

图6 蜡样芽孢杆菌BC-1发酵液中风味物质的总离子色谱图

Fig.6 GC-MS total ions chromatogram of flavor compounds in the fermentation of *Bacillus cereus* BC-1

类化合物和含氮化合物等, 这些风味物质与白酒中的呈香化合物基本一致^[14]。结合表1中实验数据和图10可知, 5株芽孢杆菌发酵液剔除空白培养基中物质共检测得到46种风味物质, 其中BL-1发酵液剔除空白培养基中物质共得到14种风味物质, BC-1和BP-1

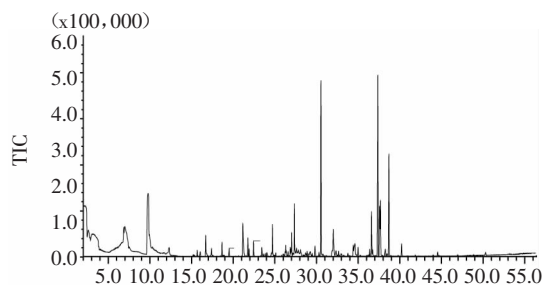


图7 短小芽孢杆菌BP-1发酵液中风味物质的总离子色谱图

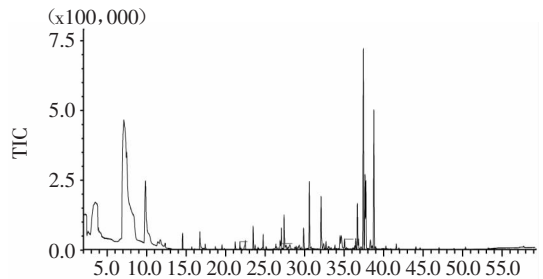
Fig.7 GC-MS total ions chromatogram of flavor compounds in the fermentation of *Bacillus pumilus* BP-1

图8 枯草芽孢杆菌BS-1发酵液中风味物质的总离子色谱图

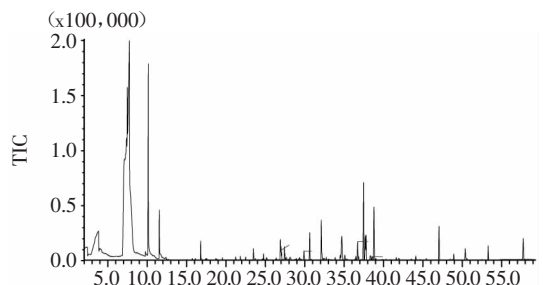
Fig.8 GC-MS total ions chromatogram of flavor compounds in the fermentation of *Bacillus subtilis* BS-1

图9 枯草芽孢杆菌BS-2发酵液中风味物质的总离子色谱图

Fig.9 GC-MS total ions chromatogram of flavor compounds in the fermentation of *Bacillus subtilis* BS-2

发酵都得到12种风味物质, BS-1共得到16种风味物质, BS-2共得到19种风味物质。

由图10可见, 5株芽孢杆菌发酵液中风味物质的数量相差不大, 但是这5株芽孢杆菌各自发酵得到的化合物种类差异较大。地衣芽孢杆菌不产醚类和酸

表1 芽孢杆菌发酵液中风味物质GC-MS分析结果

Table 1 GC-MS results of volatile compounds in the fermentation of bacteria

序号	化合物名称	分子式	分子量	相对含量(%)					
				空白	BL-1	BC-1	BP-1	BS-1	BS-2
酯类									
1	乙酸乙烯基酯	C ₆ H ₆ O ₂	86.04	/	2.07	/	/	/	0.71
2	2,6-双(1,1-二甲基乙基)-4-甲基氨基苯酚甲酸酯	C ₂₈ H ₅₁ NO ₃	449.39	9.13	/	/	12	/	/
3	邻苯二甲酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.09	6.25	/	/	0.62	2.8	1.01
4	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.15	/	0.41	/	0.42	/	/
5	1,2-苯二甲酸酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.15	/	/	/	/	/	1.24
6	亚硫酸异戊酯	C ₉ H ₂₀ O ₃ S	208.11	/	/	/	/	/	0.08
7	2-异己基亚硫酸辛酯	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ S	278.19	/	/	/	/	/	0.19
8	2-乙基异己基亚硫酸己酯	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ S	278.19	0.93	1.34	/	/	/	/
9	1,2-苯二甲酸丁基-2-乙基己酯	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334.45	/	/	/	/	/	0.6
10	DL-丙氨酸乙酯	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	/	/	0.92	/	2.44	/
11	己酸乙酯	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21	/	1.98	1.54	/	0.63	/

续表

序号	化合物名称	分子式	分子量	相对含量(%)					
				空白	BL-1	BC-1	BP-1	BS-1	BS-2
12	苯乙酸乙酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.2	/	/	0.51	/	0.11	/
13	2-苯乙基乙酸酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.2	/	/	0.39	/	/	/
14	1-羟基(2,6-二叔丁基-4-甲基)环丙烷羧酸酯	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304.42	/	0.40	0.42	/	1.99	0.9
15	苯甲酸-2-乙基己酯	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.33	/	0.39	/	/	/	/
16	邻苯二甲酸-6-乙基-3-辛基丁酯	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	362.5	/	0.23	/	/	/	/
烃类									
1	十六碳烷	C ₁₆ H ₃₄	226.27	1.18	0.73	/	1.59	/	/
2	十三碳烷	C ₁₃ H ₂₈	184.22	3.06	/	/	/	/	0.59
3	3,7-二甲基壬烷	C ₁₁ H ₂₄	156.19	2.33	0.53	1.59	0.98	0.61	0.33
4	3-十四烯	C ₁₄ H ₂₈	196.22	2.02	1.46	1.11	/	0.25	0.37
5	3,8-二甲基十一烷	C ₁₃ H ₂₈	184.36	/	0.87	/	/	/	/
6	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	198.39	/	/	2.22	2.69	1.12	/
7	6-甲基-1,3,5-环庚三烯	C ₁₆ H ₁₈	210.31	/	/	7.55	/	/	0.9
8	2,2-二甲基丁烷	C ₆ H ₁₄	86.18	/	/	/	1.61	/	/
9	2,4-二叔丁基-1,3戊二烯	C ₁₃ H ₂₄	180.33	/	/	/	2.9	/	/
10	1,4-环己烷	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21	/	/	/	0.75	/	/
11	5-甲基-5-丙基壬烷	C ₁₃ H ₂₈	184.36	/	/	/	/	0.17	/
12	5-甲基-1-庚烯	C ₈ H ₁₆	112.13	/	/	/	/	/	0.06
13	2,6,10-三甲基十二烷	C ₁₅ H ₃₂	212.25	/	/	/	/	/	0.18
14	十九烷	C ₁₉ H ₄₀	268.52	/	1.79	/	/	/	/
杂环类									
1	苯并噻唑	C ₇ H ₅ NS	135.01	1.02	0.99	1	/	0.85	0.46
2	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.07	/	/	2.8	/	0.23	1.25
3	1,3-二甲基萘	C ₁₂ H ₁₂	156.09	/	/	0.31	/	0.25	/
4	3,5-双(1,1-二甲基乙基)-苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32	/	/	/	/	0.13	0.09
5	2,5-二氢-2,2-二甲基-5-(1-甲基乙烯基)-3-(1-甲基乙基)呋喃	C ₁₂ H ₂₀ O	180.15	4.38	/	/	/	/	/
6	2,2'-5,5'-四甲基-1,1'-联苯	C ₁₆ H ₁₈	210.14	31.69	24.2	28.33	35.39	13.5	5.75
7	1,1'-(1-亚丁烯基)联苯	C ₁₆ H ₁₆	208.13	/	/	/	/	0.42	0.24
8	3,4-二乙基-1,1'-联苯	C ₁₆ H ₁₈	210.14	5.69	0.42	/	8.17	2.5	0.1
9	4,4'-(1-甲基亚乙基)-双-2,6-二甲基苯酚	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	284.18	0.95	/	/	/	/	/
10	2-甲氧基苯酚	C ₇ H ₈ O ₂	124.14	/	0.47	/	/	/	/
11	萘并呋喃	C ₁₂ H ₈ O	168.19	/	/	/	0.79	/	/
12	2,3-二甲基萘	C ₁₂ H ₁₂	156.22	0.29	/	/	/	/	0.19
醇类									
1	正丁醇	C ₄ H ₁₀ O	74.07	/	/	/	/	0.48	/
2	异雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	222.2	1.41	0.87	/	/	0.4	0.08
3	2,3-丁二醇	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.12	/	/	/	/	/	1.53
4	苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	122.16	/	0.49	1.97	3.75	0.28	0.12
5	异辛醇	C ₈ H ₁₈ O	130.23	/	/	/	0.87	/	/
6	2-(1-甲基乙氧基)乙醇	C ₅ H ₁₂ O ₂	104.08	/	/	/	/	/	0.29
7	(S)-(+)-1,2-丙二醇	C ₃ H ₈ O ₂	76.09	/	/	/	/	0.44	/
醛酮类									
1	3-羟基-2-丁酮	C ₄ H ₈ O ₂	88.05	/	3.54	10.91	/	45.4	62.47
2	2,2-二甲基-3-己酮	C ₈ H ₁₆ O	128.21	/	/	0.49	/	/	/
3	2,3-丁二酮	C ₄ H ₆ O ₂	86.09	/	/	/	/	9.88	6.65
4	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	142.24	/	/	/	0.75	/	/
5	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	156.27	/	/	/	1.15	/	/
含氮化合物									
1	2-甲酰胺(2-氨基乙基)-N-甲氧基氮丙啶	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₂	159.19	/	/	/	1.04	/	/
2	L-丙氨酸甲酰胺	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116.16	/	1.01	/	/	/	/
3	L-丙氨酸乙酰胺	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116.09	/	0.47	/	/	/	0.16
4	2-甲基-1-(2-硝基苯基)-3-(苯基甲氧基)苯	C ₁₆ H ₁₅ NO ₄	285.29	/	0.22	/	/	/	/
醚类									
1	4-羟基-3-叔丁基-苯甲醚	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180.12	/	/	/	2.26	/	1.53
酸类									
1	乙醛酸	C ₂ H ₂ O ₃	74.04	/	/	/	/	0.38	/

类化合物;蜡样芽孢杆菌不产含氮化合物、醚类和酸类化合物;短小芽孢杆菌不产酸类物质,与其它4株菌相比,短小芽孢杆菌发酵代谢能得到较多的烃类化合物,含有较少的酯类化合物;2株枯草芽孢杆菌发酵代谢产物基本相同,不同之处在于好氧芽孢杆菌BS-1不产含氮化合物和醚类化合物,而厌氧枯草芽孢杆菌BS-2不产酸类化合物。此外,地衣芽孢杆菌发酵液中含有数量较多的酯类和含氮化合物,占总数的64%;蜡样芽孢杆菌发酵液中含有数量较多的酯类和醛酮类化合物,占总数的58%;短小芽孢杆菌发酵液中含有数量较多的烃类和醇类化合物,占总数的50%;枯草芽孢杆菌发酵液中含有数量较多的酯类和杂环类化合物,占总数的50%左右。

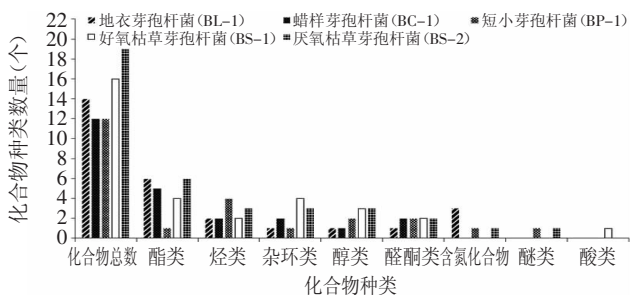


图10 5株芽孢杆菌发酵液中风味物质种类数量对比

Fig.10 Compare the quantity and variety of volatile compounds in the fermentation of *Bacillus* producing flavor

表1中数据显示,BL-1发酵液中主要风味物质有3-羟基-2-丁酮、乙酸乙酯和己酸乙酯;BC-1发酵液中主要风味物质有3-羟基-2-丁酮、6-甲基-1,3,5-环庚三烯和2-甲氧基-4-乙烯基苯酚;BP-1发酵液中主要风味物质有苯乙醇、2,4-二叔丁基-1,3-戊二烯和十四烷;BS-1中发酵液中主要风味物质有3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二酮和DL-丙氨酸乙酯,BS-2中发酵液中主要风味物质有3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二酮和2,3-丁二醇。5株芽孢杆菌中除了短小芽孢杆菌BP-1不产3-羟基-2-丁酮,其他4株芽孢杆菌发酵液中都产生3-羟基-2-丁酮,且是主要的代谢风味物质,尤其是两株枯草芽孢杆菌中3-羟基-2-丁酮,产生风味物质的贡献率可高达50%以上。据文献记载,3-羟基-2-丁酮呈黄油味^[15],对白酒的特征风味产生一定的影响^[6]。张荣在研究产酱香功能细菌代谢产物时发现3-羟基-2-丁酮是该菌发酵液中主要特征性风味化合物之一,推测是另外一个特征风味化合物的前体物质^[12]。短小芽孢杆菌BP-1发酵液中主要风味物质苯乙醇呈玫瑰香和蜂蜜香的清雅香气,口感绵甜清爽,在白酒风味和口感上起着重要作用^[6]。

3 结论

牛栏山二锅头酒醅中分离鉴定得到5株产风味物质能力较好的芽孢杆菌,分别为地衣芽孢杆菌BL-1、蜡样芽孢杆菌BC-1、短小芽孢杆菌BP-1和两株枯草芽孢杆菌BS-1和BS-2。对这5株芽孢杆菌分别进行发酵风味分析,其发酵液经固相微萃取和GC-MS分析,共检测得到46种风味物质,其中酯类化合物13种、烃类化合物10种、杂环类化合物6种、醇类化合物

6种、醛酮类化合物5种、含氮化合物4种、醚类和酸类化合物各1种。除短小芽孢杆菌的主要代谢产物是苯乙醇外,其他4株芽孢杆菌的主要代谢风味物质都是3-羟基-2-丁酮。而研究发现牛栏山二锅头酒中的主要呈香物质是3-甲基-1-丁醇和2-羟基-丙酸乙酯,未检测到3-羟基-2-丁酮,表明4株芽孢杆菌产生的3-羟基-2-丁酮与牛栏山二锅头酒的特征风味没有直接关系。由于牛栏山二锅头酒醅可培养细菌中芽孢杆菌占主要,所以可以推测3-羟基-2-丁酮可能作为酒体风味物质的前体物质,与其他代谢产物共同作用参与酒的特征风味物质形成,这与有关文献中得到的结论类似^[12]。同时也说明了:白酒酿造过程是多菌种混合发酵,各种菌的不同代谢产物相互制约、相互协调、相互作用才能形成酒的独特风味。而短小芽孢杆菌的主要代谢产物苯乙醇在牛栏山二锅头酒中的香气成分检出,具有玫瑰香和蜂蜜香,能够赋予白酒清新爽口的感觉,因此短小芽孢杆菌对酒中苯乙醇的含量具有直接影响。

参考文献

- [1] 曹云刚,胡永钢,马燕红,等. 汾酒酒醅发酵过程中香气成分的变化规律[J]. 食品科学,2010,31(22):367-371.
- [2] Zhu Shukui, Lu Xin, Li Keliang, et al. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatograph/time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597: 340-348.
- [3] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 35-40.
- [4] 李大和. 建国五十年来白酒生产技术的伟大成就[J]. 酿酒, 1999(6): 19-31.
- [5] 范文来, 徐岩. 中国白酒风味物质研究的现状与展望[J]. 酿酒, 2007, 34(4): 31-37.
- [6] 曾祖训. 白酒香味成分的色谱分析[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 3-6.
- [7] 丁云连, 范文来, 徐岩, 等. 老白干香型白酒香气成分分析[J]. 酿酒, 2008, 35(4): 109-113.
- [8] 季克良, 郭坤亮, 朱书奎, 等. 全二维气相色谱/飞行时间质谱用于白酒微量成分的分析[J]. 酿酒科技, 2007, 3(153): 100-102.
- [9] 余乾伟. 传统白酒酿造工艺[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 222.
- [10] 武思齐. 产酱香芽孢杆菌的代谢产物及其研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2009.
- [11] 庄名扬, 王仲文. 酱香型高温大曲中功能菌B3-1菌株的分离、选育及其分类学鉴定[J]. 酿酒, 2003, 30(5): 26-29.
- [12] 张荣. 产酱香功能细菌的筛选及其特征风味化合物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [13] 赵佳, 雷振河, 吕利华, 等. 汾酒产酸细菌的分离鉴定及其产酸条件研究[J]. 食品与工业科技, 2009, 35: 43-46.
- [14] 康明官. 清香型白酒生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 307-315.
- [15] 吴波, 张寒俊, 余珠花. 白酒中痕量挥发性有机物的固相微萃取HS-SPME-GC-MS分析[J]. 中国酿造, 2006(2): 69-73.
- [16] 柳军, 范文来, 徐岩, 等. 应用GC-O分析比较兼香型和浓香型白酒中的香气化合物[J]. 酿酒, 2008, 35(3): 103-107.