

浓香型古井桃花曲中产香功能菌的研究

王志强^{1,2}, 李兰^{1,2}, 汤有宏^{1,2}, 李晓欢^{1,2}, 姜利^{1,2}

(1. 安徽古井贡酒股份有限公司, 安徽亳州 236820; 2. 安徽省固态发酵工程技术研究中心, 安徽亳州 236820)

摘要 [目的] 评估分析浓香型古井桃花曲中的特色产香功能菌株。[方法] 从浓香型古井桃花曲中筛选出 28 株芽孢杆菌, 以固态培养基为底物进行单菌产香试验, 并进行闻香评价。[结果] 试验得出有 6 株芽孢杆菌发酵后能够产生浓郁的香味, 采用顶空固相萃取-气相色谱-质谱联用技术对这 6 株芽孢杆菌的发酵产物进行挥发性成分检测, 并与古井贡酒中呈香物质进行对比分析, 结果表明这些风味物质与白酒中呈香化合物基本一致。[结论] 该研究为寻找浓香型古井桃花曲特色产香功能菌及提高白酒质量提供了理论依据。

关键词 古井桃花曲; 筛选; 产香微生物; 挥发性成分

中图分类号 TS262.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)19-0090-02

The Study of Aroma-producing Functional Microorganisms in Gujing Liquor Peach Blossom Daqu

WANG Zhi-qiang^{1,2}, LI Lan^{1,2}, TANG You-hong^{1,2} et al (1. Anhui Gujing Distillery Co. Ltd., Bozhou, Anhui 236820; 2. Anhui Solid-state Fermentation Engineering Technology Research Center, Bozhou, Anhui 236820)

Abstract [Objective] To evaluate aroma-producing functional microorganisms in Gujing liquor peach blossom daqu. [Method] Twenty-eight strains of bacillus that produce flavor compounds were screened out from Gujing liquor peach blossom daqu. Solid state fermentation experiments of these types of bacillus were studied. They were cultured and tested for single-strain aroma production by smelling the fragrance. [Result] The results indicated that six strains of bacillus were observed to produce rich flavors post-fermentation by sensory analysis. The volatile components in fermentation products of the six strains were identified by headspace solid phase micro extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS), and then were compared with the flavor compounds in Gujingong strong-flavor liquor. The results showed that these flavor compounds were basically the same with those in strong-flavor Gujingong liquor. [Conclusion] This study provides a theoretical basis for the application of aroma-producing functional microorganisms in Gujing peach blossom daqu and improvement of the quality of Gujing-gong liquor.

Key words Gujing liquor peach blossom daqu; Screening; Aroma-producing microorganisms; Volatile components

大曲的增香功能是由大曲中的产香微生物决定的, 为了深入了解浓香型白酒的香味形成机理, 进一步提高浓香型白酒的香气品质, 就必须对大曲中的产香微生物进行考察^[1-3], 确定浓香型白酒的香味化合物主要由哪些菌种产生, 在制曲过程中又代谢产生了哪些香味前体物质^[4-5]。

近年来科研工作者们对大曲的研究逐渐聚焦到对产香菌的研究上, 并取得了较好的成果。朱德文等^[6]从酱香型大曲中分离鉴定出一株产香芽孢杆菌; 张春林^[7]从泸州老窖大曲中分离鉴定出产香细菌; 明红梅等^[8]从浓香型大曲微生物分离出能产生浓郁香味的 X19 和 J3 菌株。该研究选择浓香型古井桃花曲中分离的 28 株芽孢杆菌类细菌进行固态发酵试验, 由技术人员进行感官分析, 根据其香味不同, 对其进行分类, 并对具有特殊发酵味道的菌种进行气质分析, 以期评估古井桃花曲中的特色产香功能菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料 小麦固态培养基^[8]: 干燥小麦麦粒破碎为麦沙、麦粉各半, 加等量水, 浸润 18 h 后, 蒸熟、冷却、打散, 称取 70 g 于 250 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 20 min。营养琼脂培养基, 马铃薯培养基 (PDA 培养基)。

主要仪器: CP-WAX 50CB (50.00 m × 0.25 mm × 0.20 μm) 毛细管柱, SX-70 高压灭菌锅 (日本, TOMY), MaxQ 485HP 振荡培养箱, Agilent 7890A-5975C 气相质谱联用仪 (GC-MS, 配有电子轰击源 EI), Agilent PC420 固相微

萃取仪, CAR/PDMS 75 μm 顶空固相萃取头。

1.2 方 法

1.2.1 菌种固态发酵气相色谱分析的前处理。 固态发酵产物: 取固态发酵产物 10 g, 加入 70% 无水乙醇 50 mL 浸泡 30 min。在低温条件下离心, 转速 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液先进行粗过滤再用微孔膜过滤, 得滤液, 用 10 mL 移液管准确吸取 10 mL 滤液, 加入 0.1 mL 内标混标 (叔戊醇、乙酸正戊酯、2-乙基丁酸), 振荡摇匀, 倒入进样小瓶, 准备进样。

1.2.2 菌种固态发酵气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 分析的前处理。 固态发酵产物前处理同“1.2.1”, 吸取发酵液 50 mL, 在低温条件下离心, 转速 5 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 用移液管吸取滤液 8 mL 加入到顶空瓶中, 称取氯化钠 3.0 g 加入到顶空瓶中, 并加入一颗搅拌磁子, 设置磁力搅拌器温度为 50 °C, 转速 400 r/min, PDMS 萃取头顶空萃取 30 min。

1.2.3 菌株的代谢产物分析方法。

1.2.3.1 气相色谱分析方法。 气相色谱分析条件: 色谱柱温度 35 °C 保持 3 min, 然后以 5 °C/min 程序升温至 100 °C, 不保持, 再以 10 °C/min 升温至 195 °C, 保持 18 min; 载气为氮气, 纯度 ≥ 99.999%, 流速 1.0 mL/min; 进样量 1 μL; 进样口温度 230 °C; 进样方式为分流进样, 分流比 60:1。

1.2.3.2 气相色谱质谱联用仪分析方法。 不分流, 流速 0.9 mL/min; 进样口温度 230 °C; 升温程序: 35 °C 保持 4 min, 以 2 °C/min 升温到 60 °C, 不保持, 以 6 °C/min 升温到 180 °C, 保持 15 min。

1.2.4 菌种的固态发酵试验。酵母菌选用 YPD 培养基、细菌选用营养琼脂培养基分别进行接种活化,分别置于 28、35 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 ~ 48 h。从新鲜斜面上取 2 环菌种,接种到液体试管(每支试管装液 10 mL)中,28 或 35 °C 静态培养 36 h,制成种子液。取细菌种子液接种于固态培养基中,35 °C 培养箱培养 24 h,之后温度上升至 45 °C 培养 24 h,温度继续上升至 55 °C 培养 72 h。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的功能菌种。

2 结果与分析

选择芽孢杆菌类的 28 株细菌进行固态发酵试验。将菌株活化后,接种于小麦固态培养基,放入 35 °C 培养箱培养 24 h,之后温度上升至 45 °C 培养 24 h,温度继续上升至 55 °C 培养 72 h。培养结束后由技术人员进行感官分析。根据感官分析结果,选择有类似大曲香味的发酵样进行气相色谱质谱分析。

选择芽孢杆菌类的 28 株细菌进行固态发酵试验。55 °C 培养 120 h 时取出,由技术人员进行感官分析。根据其香味不同,将其分为 8 类:①DAL10、BAL36、DAL01 酸味,其中 DAL10 和 DAL01 酸味更重些。②BAL44、BAL03、BAL13、BAL12 小麦味,味淡。③BAL16、BAL04、BAL41 酸味加霉味, BAL16 更重些。④BAL17、BAL43 酸味更重,霉味淡些,但比第 3 类味重。⑤DAL07、DAL09 馊茶叶味,比 4 类重, DAL07 有臭味。⑥BAL14、BAL18、BAL47、BAL29、BAL30、BAL46、BAL48、BAL33、BAL25、BAL11、BAL40 为一类,味道比其他类重,有糊味,较臭, BAL48 糊味更重。⑦BAL22、BAL49 与第 6 类相似,但有酸味。⑧DAL06 与其他不同,有曲香味,但较淡。

发酵感官分析结束后,挑选具有特殊发酵味道的 DAL06、BAL48、BAL16、BAL17、BAL14、BAL22 进行了气质分析。结果见表 1~6。

表 1 DAL06 固态发酵气质分析结果

Table 1 Analysis results of DAL06 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage %
23.903	2-羟基丁酮	78~83	33.92
28.465	乙酸	91	6.27
29.072	十五烷	93	—
30.302	丙酸	86	—
30.557	2,3-丁二醇(左旋)	90	11.52
31.025	十六烷	94	—
31.258	2,3-丁二醇(内消旋)	90	16.79
31.955	丁酸	72~83	—
35.330	己酸	87	7.20
35.666	2-甲氧基苯酚	87	含量少
38.440	辛酸	72~83	1.43

菌种固态发酵产物气质分析结果表明, DAL06 具有明显的类似大曲发酵过程中的香味, 2-羟基丁酮、2,3-丁二醇含量较高, 这 2 类物质约占总香味成分的 62.23%; 而 BAL48

表 2 BAL48 固态发酵气质分析结果

Table 2 Analysis results of BAL48 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage %
23.798	2-羟基丁酮	78	—
25.173	2,6-二甲基吡嗪	—	—
26.658	2-壬酮	91	—
27.540	三甲基吡嗪	91	8.18
28.120	2-癸酮	90	0.90
28.454	乙酸	90	1.85
28.817	3-乙基-2,5-二甲基嘧啶	94	—
29.087	十五烷	94	—
29.200	四甲基吡嗪	91	4.99
29.908	2,3,5-三甲基 6-乙基嘧啶	87	0.79
30.549	2,3-丁二醇(左旋)	90	1.46
30.841	乙甲基丙酸	90	1.25
31.055	十六烷	93	1.25
31.254	2,3-丁二醇(内消旋)	78	0.35
32.288	2-酮基十二烷	90	0.93
32.641	3-甲基丁酸	78~87	7.41
32.742	十七烷	94	0.55
35.501	2-酮基十四烷	94	3.39
35.670	2-甲氧基苯酚	97	2.64
38.148	4-乙基-2-甲氧基苯酚	90	1.36
41.263	2-甲氧基-4-乙基苯酚	87	1.20
41.836	十六酸乙酯	81	—

表 3 BAL16 固态发酵气质分析结果

Table 3 Analysis results of BAL16 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage %
8.610	乙酸	100	48.94
23.663	2-羟基丁酸	78	7.09
25.507	2-甲基丙酸乙酯	72	0.42
27.498	三甲基吡嗪	91	3.14
29.282	四甲基吡嗪	91	27.16
30.763	2,3-丁二醇	91	—
31.115	2-甲基丙酸	91	—
31.557	2,3-丁二醇	90	—
36.506	己酸	78	0.38
36.880	2-甲氧基苯酚	97	0.23
45.274	2-甲氧基-4-乙基苯酚	90	0.89
48.606	邻苯二甲酸二丁酯	97	3.20

具有焦糊味和酸味,且味道特别大,其分析结果显示种类较多,与 DAL06 差异很明显,主要的物质是嘧啶类、烷烃类和苯酚类。BAL16 固态发酵产物中乙酸、四甲基吡嗪含量较高,这 2 类物质分别占总香味成分的 48.94%、27.16%; BAL17 发酵产物中主要含 3-羟基-2-丁酮、四甲基吡嗪、2,3-丁二醇等物质,其含量分别占总香味成分的 20.96%、51.08%、6.40%。

3 结论

大曲是白酒酿造过程中重要的微生物、酶类、香气物质和香气前提物质的主要来源,其质量直接关系到白酒的酒质



图5 国家气象公园园徽(黑白版,左)和世界气象公园园徽(彩色版,右)

Fig. 5 The logos of National Meteopark (black and white version, left) and World Meteopark (colorful version, right)

一旦获得世界气象组织的正式认可,在“世界气象公园委员会”指导下,各国气象主管部门根据需要相继成立“(国家)世界气象公园委员会”,与分布在世界各地荣获“世界气象公园”及“国家气象公园”称号的景区一起,精诚合作,相互借鉴,彼此联络,有望共同组成完整的世界气象公园体系。

参考文献

[1] 魏遐,祁黄雄. 地质公园与自然保护体系[J]. 水土保持研究,2005,12(3):168-172.

- [2] 后立胜. 国家地质公园的发展及其阶段性[J]. 当代经济管理,2005,27(1):63-65.
 [3] 熊继红. 关于国家地质公园可持续发展对策研究[J]. 国土与自然资源研究,2009(1):55-56.
 [4] 阎林山. 趣味天气气象辞典[M]. 上海:上海辞书出版社,1995:400-537.
 [5] 胡尔克. 奇趣大自然[M]. 北京:兵器工业出版社,2000:63-140
 [6] 赖七星. 黄河断流与 El Nino 事件的遥相关[J]. 气象科学,2005,25(6):594-608

(上接第91页)

表4 BAL17 固态发酵气质分析结果

Table 4 Analysis results of BAL17 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage
15.408	2-甲基丙醇	78	—
20.799	三甲基恶唑	97	—
23.633	3-羟基-2-丁酮	86	20.96
21.219	2-戊基呋喃	72	—
25.091	2,5-二甲基吡嗪	87	—
26.677	2-壬酮	90	—
26.797	十四烷	74	—
27.483	三甲基吡嗪	91	5.21
28.165	2-葵酮	87	—
28.487	乙酸	87	—
28.866	2,6-二乙基吡嗪	91	—
29.267	四甲基吡嗪	91	51.08
30.047	2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪	94	2.85
30.732	2,3-丁二醇	90	4.78
31.108	2-甲基丙酸	83	—
31.550	2,3-丁二醇	90	6.40
36.697	2-酮基十四烷	90	—
36.873	2-甲氧基苯酚	95	—
39.790	苯酚	87	—
44.891	4-甲氧基-N-甲基苯	83	—
45.278	2-甲氧基-4-乙基苯酚	90	3.97

表5 BAL14 固态发酵气质分析

Table 5 Analysis of BAL14 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage %
23.625	3-羟基-2-丁酮	78	9.78
37.983	苯乙醇	87	—
38.691	2-酮基十五烷	93	—
39.782	苯酚	76	—
40.363	2-甲氧基-4-丙基苯	90	—
41.075	2-酮基十六烷	90	—
25.084	2,5-二甲基吡嗪	91	4.63
45.270	2-甲氧基-4-乙基苯	83	4.57
27.486	2,3,5-三甲基吡嗪	91	3.80
29.248	四甲基吡嗪	91	4.46
31.55	2,3-丁二醇	72	2.56
32.79	2-酮基十二烷	83	3.68
33.203	3-甲基丁酸	83	2.93
36.686	2-酮基十四烷	96	6.84
36.873	2-甲氧基苯酚	95	1.98

表6 BAL22 固态发酵气质分析结果

Table 6 Analysis results of BAL22 solid-state fermentation

出峰时间 Appearance time//min	名称 Name	匹配度 Matching degree//%	含量百分比 Percentage %
23.651	3-羟基-2-丁酮	78	7.92
25.092	2,5-二甲基吡嗪	91	16.75
27.488	三甲基吡嗪	91	12.94
28.166	2-壬酮	94	5.76
29.252	四甲基吡嗪	91	7.06
32.788	2-十二酮	94	13.12
36.689	2-十四酮	94	6.97
36.873	愈创木酚	97	4.13

和出酒率。该研究以浓香型古井桃花曲中的28株功能菌为研究对象,以小麦固体培养基为底物对功能菌进行单菌产香试验,经闻香评价,共分为8类,从中挑选具有特殊发酵香气的DAL06、BAL48、BAL16、BAL14、BAL17、BAL22进行了固相微萃取和气相色谱-质谱分析,其产生的风味物质主要有2-羟基丁酮、2,3-丁二醇、嘧啶类、烷烃类、苯酚、乙酸、四甲基吡嗪类等,将各菌株风味物质分别与古井贡酒股份公司白酒中风味进行比对,这些风味物质与白酒中呈香化合物基本一致。该研究寻找出了古井桃花曲的特色产香功能菌,为实现功能菌的应用及提高古井贡酒质量提供了理论基础。

参考文献

- [1] 周庆伍,李红歌,李安军,等. Biolog ECO 解析不同产地大曲微生物群落功能多样性特征[J]. 食品与发酵科技,2014(3):53-56.
 [2] 汤有宏,李红歌,李晓欢. 基于 Biolog ECO 技术对贮存过程中大曲微生物多样性变化规律的研究[J]. 酿酒,2015,42(1):75-78.
 [3] 汤斌,刘金英,周庆伍,等. 免培养技术对浓香型白酒大曲中细菌多样性的影响[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):36-40.
 [4] 郭志. 浓香型大曲中产香微生物的分离筛选及其产香条件的优化[D]. 自贡:四川理工学院,2014.
 [5] 吕云怀,王莉,汪地强,等. 不同香型白酒大曲风味物质与其产品风格特征关系的分析[J]. 酿酒科技,2012(7):72-75.
 [6] 朱德文,蒋英丽,高鸿,等. 酱香型大曲中一株产香芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 酿酒科技,2014(6):39-41.
 [7] 张春林. 泸州老窖大曲的质量、微生物与香气成分关系[D]. 无锡:江南大学,2012.
 [8] 明红梅,郭志,周健,等. 浓香型大曲中产香微生物的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技,2015(4):186-193.