



引用格式:何培新,李聪聪,胡晓龙,等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的浓香型白酒窖泥中可培养 *Clostridium spp.* 挥发性代谢物成分分析[J]. 轻工学报,2017,32(6):1-11.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.001

文章编号:2096-1553(2017)06-0001-11

基于 HS-SPME-GC-MS 的浓香型白酒窖泥中可培养 *Clostridium spp.* 挥发性代谢物成分分析

Component analysis of volatile metabolites of culturable *Clostridium spp.* isolated from pit muds of Luzhou-flavor liquor based on HS-SPME-GC-MS

何培新¹,李聪聪¹,胡晓龙¹,迟雷¹,马兆¹,郭燕凤²

HE Pei-xin¹,LI Cong-cong¹,HU Xiao-long¹,CHI Lei¹,MA Zhao¹,GUO Yan-feng²

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 菏泽学院 农业与生物工程学院,山东 菏泽 274000

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Agricultural and Biological Engineering, Heze University, Heze 274000, China

关键词:

浓香型白酒;窖泥;梭菌;顶空固相微萃取-气质联用;挥发性代谢产物

Key words:

Luzhou-flavor liquor; pit muds; *Clostridium spp.*; HS-SPME-GC-MS; volatile metabolite

摘要:对某酒企窖泥进行分离纯化培养,得到 88 株细菌纯培养物,通过 16S rRNA 基因序列比对和系统发育树分析,其中 75 株细菌被分为 8 个系统发育簇(cluster I—VIII),其最高相似菌分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)对 8 个代表性梭菌菌株的挥发性代谢物进行检测,共检测出 75 种挥发性物质,其中醇类 23 种、酸类 20 种、酯类 14 种、醛类 2 种、酮类 2 种和其他挥发性物质 14 种。通过主成分分析发现,菌株 RL1 (*C. tyrobutyricum*) 和 EL7 (*C. butyricum*) 主要与乙酸和丁酸等化合物的形成有关;EL46 (*C. kluyveri*)、RL20 (*C. acetobutylicum*) 和 RL10 (*C. indolis*) 主要与己酸和己酸乙酯等化合物的形成有关;EL12 (*C. bifermentans*) 和 RL23 (*C. sporogenes*) 主要与硫代醋酸 S-甲酯、1-癸醇和正辛醇有关;而 EL43 (*C. cadaveris*) 主要与多种酯类化合物的合成有关。

收稿日期:2017-08-30

基金项目: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(2017JJ012);郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(2016BSJJ018);郑州轻工业学院研究生科技创新项目(2016030)

作者简介:何培新(1970—),男,河南省民权县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为生物工程。

通信作者:胡晓龙(1984—),男,河南省杞县人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为白酒酿造工程。

Abstract: A total of 88 pure cultures was obtained from the pit muds of one wine corporation following separation and purification culture. The 75 strains of bacteria were assigned into 8 phylogenetic clusters (cluster I – VIII) based on the analysis of 16S rRNA gene sequences and phylogenetic tree. In them, the most similar bacteria were *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifementans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* and *C. kluyveri*, respectively. The volatile metabolites of 8 representative *Clostridium spp.* were analyzed using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 75 volatile metabolites was detected, including 23 alcohols, 20 acids, 14 esters, 2 aldehydes, 2 ketones and other 14 volatile substances. The principal component analysis revealed that the representative strain RL1 (*C. tyrobutyricum*) and EL7 (*C. butyricum*) were mainly related to the generation of acetic acid and butyric acid, and EL46 (*C. kluyveri*), RL20 (*C. acetobutylicum*) and RL10 (*C. indolis*) mainly contributed to the formation of caproic acid and ethyl hexanoate, and EL12 (*C. bifementans*) and RL23 (*C. sporogenes*) were mainly associated with the S-methyl acetate, 1-Decyl alcohol and octanol, and EL43 (*C. cadaveris*) was mainly correlated to the biosynthesis of various esters.

0 引言

浓香型、酱香型、清香型和米香型是我国白酒4大基础香型,其中,浓香型白酒具有芳香浓郁、绵柔甘冽、香味协调、入口甜、落口绵、尾净余长等风格特征,其产销量占全国白酒总产销量的70%左右。浓香型白酒含有成百上千种香气物质,包括有机酸、酯、醇、醛酮、酚、缩醛及硫化物等^[1-2],其种类与含量影响着浓香型白酒的整体风格和品质。在上述香气物质中,对浓香型白酒风味影响较大的香气物质主要包括具有酸味、奶油等香味的己酸、丁酸、3-甲基丁酸等脂肪酸,以及具有果香和花香等香味的己酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、戊酸乙酯等酯类化合物。此外,具有甜味、烟熏味等香味的正己醇、3-甲基丁醇、4-乙基愈创木酚和4-甲基愈创木酚对浓香型白酒风味也有较大的贡献度^[3]。

浓香型白酒中复杂香气成分的形成与其独特的酿造工艺密不可分。浓香型白酒的生产可以简单概括为:以粮谷为原料,泥窖为发酵容器,采用多菌种自发发酵的固态发酵模式,经蒸馏、贮存、勾调等环节制成的高度酒精饮料^[4]。在浓香型白酒酿造过程中,大曲和窖泥是微生物的主要来源。大曲中的优势微生物为好氧和兼性好氧的霉菌、酵母、乳酸菌、芽孢杆菌等,其

在发酵过程中形成多种生物酶(淀粉酶、蛋白酶和酯化酶等),主要参与粮谷糖化及酒精发酵过程,同时形成一些香味物质,如乙酸、乳酸、苹果酸、亮氨酸、甘露醇及N-乙酰谷酰胺等^[5]。窖泥中的优势微生物主要为兼性厌氧和专性厌氧的原核微生物,如厚壁菌门(Firmicutes)中的梭菌属(*Clostridium*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等,拟杆菌菌门(Bacteroidetes)中的普雷沃菌属(*Prevotella*),以及广古菌门(Euryarchaeota)中的甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)等^[6-7]。研究表明,梭菌*Clostridium spp.*是一类能合成多种脂肪酸和醇类物质的微生物类群,如*C. tyrobutyricum*和*C. butyricum*的主要代谢产物为丁酸,同时伴有乙酸的生成^[8-9]; *C. kluyveri*的主要代谢产物为己酸,同时伴有乙酸、丁酸及辛酸的生成^[4]; *C. beijerinckii*能发酵糖类,产生乙醇及丁醇等^[10]。在浓香型白酒酿造过程中,*Clostridium spp.*所产生的脂肪酸和醇类可以直接作为香味物质,同时其在酶促和非酶促反应中还能形成相应的酯类化合物,如丁酸乙酯及己酸乙酯等^[11]。此外,白酒酿造过程中可能会存在一些梭菌属物种,如*C. ghoni*和*C. sordellii*,能产生吡啶和4-甲基苯酚等异嗅物质^[12],影响浓香型白酒的品质。鉴于此,本研

究拟对浓香型白酒窖泥中的 *Clostridium spp.* 进行分离和初步鉴定,并采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)对分离菌株的挥发性代谢产物进行分析,为明晰白酒酿造过程中 *Clostridium spp.* 与浓香型白酒风味之间的联动关系,以及为通过调控白酒酿造过程中 *Clostridium spp.* 的定向生物强化及控制手段来提升白酒品质提供一定的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 样品采集 窖泥样品取自某酒业正常发酵窖池底部的窖泥,取出后迅速装入无菌采样袋,置于冰盒内运输至实验室,4 °C 下保存。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR Master Mix (2 ×) (K0171)、引物 27F/1492R、DNA 分子量标准 Marker E(200—1500 bp)、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;薄荷醇,购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器 DH-400 恒温培养箱,上海鸿都电子科技有限公司产;LX-C50 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司产;2.5 L 厌氧培养罐,日本三菱化学公司产;TGL-16G 离心机,上海安亭科学仪器厂产;DYY-III-5 型稳压电泳仪,北京六一仪器设备有限公司产;C1000 PCR 仪、GelDoc 1000 凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司产;固相萃取头(50/30 μm DVB/CAR/PDMS)及 SPME 手动进样手柄,美国 SUPELCO 公司产;6890N/5973 气质联用仪,美国安捷伦公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的制备 参照 X. L. Hu 等^[4]的方法配制增强梭菌培养基,(RCM 培养基)、乙

醇醋酸钠培养基(ES 培养基),RCM 和 ES 固体培养基在相应的 RCM 和 ES 液体培养基的基础上分别添加质量分数为 2% 的琼脂。

1.2.2 窖泥梭菌的纯化培养 称取 10 g 窖泥样品,加入盛有 100 mL 无菌水和 10 粒玻璃珠($\varphi = 3$ mm)的厌氧瓶中,于 25 °C 的摇床上以 200 r/min 振荡 20 min,使之混匀。将窖泥悬浮液放入 80 °C 水浴锅中热处理 10 min 杀死营养体细胞,以质量分数为 5% 的接种量分别接种于 100 mL RCM 和 ES 液体培养基,37 °C 富集培养 3~5 d。将两种富集培养液采用 10 倍梯度法稀释,分别吸取梯度为 10^{-3} ~ 10^{-6} 的稀释液 200 μL,涂布于梭菌对应类型的 RCM 或 ES 固体培养基,将培养皿置于厌氧盒内 37 °C 培养 3 d,然后对各种不同特征的菌落进行平板划线纯化,以获得单菌落。

1.2.3 纯化菌株的发酵培养 将从 RCM 和 ES 固体培养基中分离到的单菌落再分别接种于 15 mL 对应液体培养基中,37 °C 恒温下厌氧培养 48 h。吸取适量发酵液分别用于细菌基因组 DNA 的提取和其挥发性代谢产物的检测。

1.2.4 DNA 提取、PCR 扩增及测序 菌株 DNA 提取:吸取细菌发酵液 1 mL 置于无菌 EP 管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液。使用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒,提取菌体沉淀基因组 DNA。

PCR 扩增:以 27F/1492R 为 PCR 扩增引物,上述纯菌株的 DNA 为模板,PCR 扩增体系及扩增条件参照张会敏等^[13]的报道。

测序:利用 1% 琼脂糖电泳检测扩增产物,目的片段长度约为 1500 bp。利用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物,并将纯化后的扩增产物送至上海生工公司进行双向测序。

1.2.5 菌株分子鉴定及系统发育树的构建 将测得的每株单菌株的 16S rRNA 基因序列在

NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 比对分析,并分别下载与其同源性最高的物种的 16S rRNA 基因序列.将测定菌株及与其同源性最高的物种的 16S rRNA 基因序列采用 Mega 5.05 软件的 Clustal W 功能进行比对,然后用 Neighbor-Joining (NJ) 构建系统发育树.

1.2.6 梭菌发酵液挥发性代谢物 HS-SPME-GC-MS 分析 取 10 mL 菌株发酵液,于 4 ℃,10 000 r/min 条件下离心 5 min,吸取 8 mL 上清液置于干净无味的顶空瓶中,同时加入 3 g 氯化钠、20 μL 薄荷醇(100 mg/L 内标液)和 1 个磁力转子.采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)萃取发酵液中的挥发性物质,采用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相萃取头,于 50 ℃ 磁力搅拌恒温水浴锅中萃取 30 min,转速 400 r/min.然后将萃取后的固相萃取头插入气相色谱仪进样口热解吸附 5 min,进样口温度 260 ℃.

气相色谱及质谱分析条件:除色谱柱改为 DB-FFAP 色谱柱(60 m × 250 μm × 0.25 μm)外,其余条件均与何培新等^[14]报道的条件相同.

2 结果与讨论

2.1 分离菌株 16S rRNA 基因的系统发育分析

窖泥样品悬液经 RCM 和 ES 液体培养基富集后,分别采用相应的分离平板进行分离纯化培养,共获得 88 株纯培养物.将上述纯培养物的 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 数据库进行在线 BLAST 比对并进行系统发育树分析,发现其中 75 株纯培养物分属于 8 个系统发育簇(cluster I—VIII),分别与梭菌属中 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri* 聚在不同的发育簇,基于窖泥中 75 株纯培养物 16S rRNA 基因序列的系统发育树分

析如图 1 所示.

本研究从窖泥中筛选出菌株的最高相似菌包括 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. sporogenes* 和 *C. kluyveri*,这些梭菌也存在于四川和江苏等地酒企的窖泥中^[4,15-17],这表明上述菌种是不同区域酒企窖泥中共有的梭菌种属.而梭菌 *C. bifermentans* 和 *C. cadaveris* 是第一次在窖泥中分离得到的,表明这两种菌可能是该酒企特有的梭菌种属.本研究进一步丰富了窖泥中梭菌的多样性.尽管通过可培养或免培养技术检测到窖泥中的多种梭菌种属,但关于其所产生的挥发性代谢物多样性的报道较少.为了进一步明晰上述 *Clostridium spp.* 所产挥发性代谢物对浓香型白酒风味的贡献度,本研究在图 1 所示 8 个系统发育簇选取每个发育簇生长性能优良的代表性菌株,对其进行挥发性代谢物检测.每个系统发育簇中的代表性菌株及其最高相似菌见表 1.其中,6 株代表菌株(RL1, EL7, EL12, RL23, EL43 和 EL46)分别与其最高相似菌的 16S rRNA 基因序列的同源性均 ≥ 99%.因此可将这些菌株初步鉴定到种水平^[18],分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*.而菌株 RL10 和 RL20 与其最高相似菌(*C. indolis* 和 *C. acetobutylicum*)的同源性、与库中基因序列的同源性均 < 99%,表明这些菌株可能属于梭菌属中新种的种属^[19],其分类地位需要进一步确证.

2.2 菌株 *Clostridium spp.* 所产挥发性代谢物分析

梭菌代表性菌株发酵液中挥发性物质的 HS-SPME-GC-MS 分析见表 2.由表 2 可知,从上述 8 株代表性梭菌菌株发酵液中共检测到 75 种挥发性物质,其中醇类和酸类化合物种类较多,分别为 23 种和 20 种,而酯类、醛类、酮类和其他挥发性物质分别为 14 种、2 种、2 种和 14 种.

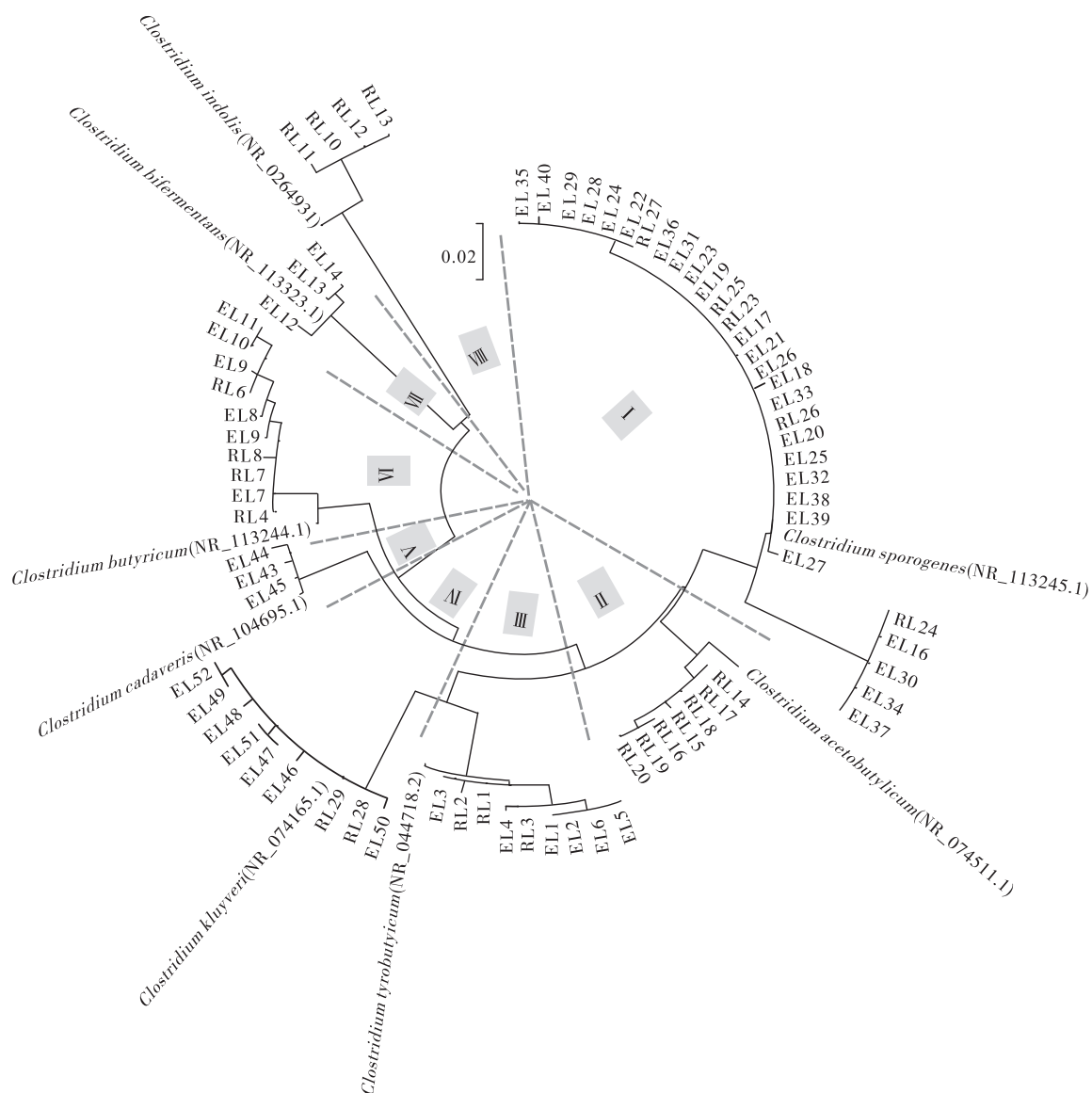


图 1 基于窖泥中 75 株纯培养物 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene sequences of 75 pure cultures isolated from pit muds

表 1 代表性菌株的 16S rRNA 基因序列分析结果

Table 1 Analysis of 16S rRNA gene sequences of representative strains

菌株编号	最高相似菌株	相似度	登录号
RL1	<i>C. tyrobutyricum</i>	99%	NR_044718.2
EL7	<i>C. butyricum</i>	99%	NR_113244.1
RL10	<i>C. indolis</i>	95%	NR_026493.1
RL20	<i>C. acetobutylicum</i>	96%	NR_074511.1
EL12	<i>C. bifermentans</i>	100%	NR_113323.1
RL23	<i>C. sporogenes</i>	99%	NR_113245.1
EL43	<i>C. cadaveris</i>	99%	NR_104695.1
EL46	<i>C. kluveri</i>	99%	NR_074165.1

上述 *Clostridium spp.* 的挥发性代谢物在浓香型白酒中已被检出,且被确认为对浓香型白酒香气贡献度较高的化合物为丁酸、戊酸、己酸、己酸乙酯、3-甲基丁醇等^[1-3]。这也表明 *Clostridium spp.* 不仅是窖泥中一类优势微生物类群^[4,6-7,9,17],而且其在浓香型白酒酿造过程中与呈香化合物的形成也密不可分。

在酿造过程中,醇类化合物主要由微生物利用糖、果胶、氨基酸等物质代谢产生,多具有

表2 代表性菌株发酵液中挥发性物质的 HS-SPME-GC-MS 分析

Table 2 Analysis of volatile compounds in fermentation broth of representative strains using HS-SPME-GC-MS

类别	化合物	RL1	EL7	RL10	RL20	EL12	RL23	EL43	EL46
酯类	己酸乙酯 (V1)	0.01	0.01	0.01	0.07	—	0.02	—	—
	乙酸乙酯 (V2)	—	—	—	—	—	—	0.07	0.03
	丁酸乙酯 (V3)	—	—	—	—	—	—	0.23	—
	乙酸丁酯 (V4)	—	—	—	—	—	—	0.10	—
	丁酸丁酯 (V5)	—	—	—	—	—	—	0.06	—
	乙酸对甲酚酯	0.01	—	—	—	—	—	—	—
	丁酸苯酯	0.02	—	—	—	—	—	—	—
	氯甲酸辛酯 (V6)	—	—	—	—	—	—	0.49	—
	3-苯丙酸乙酯 (V7)	—	—	—	—	0.01	0.01	0.09	—
	3-苯基丙基乙酸酯 (V8)	—	—	—	—	—	—	0.27	—
	二乙基丙二酸二乙酯	—	—	—	—	—	—	—	**
	硫代醋酸 S-甲酯 (V9)	—	—	—	—	—	0.13	—	—
	硫代丙酸甲酯	—	—	—	—	0.02	0.01	—	—
	4-甲基戊酸乙酯	—	—	—	—	**	—	—	—
	醇类	1-癸醇 (V10)	—	—	—	0.01	0.03	0.06	—
3-苯丙醇 (V11)		—	—	**	**	0.04	0.02	4.37	—
异丁醇 (V12)		—	—	—	—	—	—	0.18	—
庚醇 (V13)		—	—	—	—	—	—	0.07	—
4-苯基丁醇 (V14)		—	—	—	—	—	—	0.13	—
5-苯基-1-戊醇 (V15)		—	—	—	—	—	—	0.08	—
丙醇		—	—	—	—	0.02	0.01	—	—
正辛醇 (V16)		—	—	0.10	**	0.32	0.23	—	**
3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇		—	—	—	—	0.01	—	—	—
十一烯醇		—	—	0.02	—	—	0.02	—	—
苯甲醇		—	—	**	—	—	**	—	—
甲基乙酰甲醇		—	—	0.01	—	—	—	—	—
2,3-丁二醇		—	—	0.01	—	—	—	—	—
(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇		—	—	0.02	—	—	—	—	—
香叶醇		—	—	0.01	—	—	—	—	—
3-甲基丁醇 (V17)		—	—	**	—	—	—	0.18	—
4-甲基戊醇 (V18)		—	—	—	—	0.04	0.02	0.53	—
3-甲基己醇 (V19)		—	—	—	—	0.02	0.01	0.47	—
9-癸烯醇		—	—	—	—	0.01	—	0.03	—
苯乙醇		0.01	**	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	—
正丁醇 (V20)		**	0.01	—	0.01	0.03	0.01	3.21	**
正戊醇 (V21)	0.01	—	—	**	—	—	0.64	—	
2-乙基己醇	—	—	—	**	—	—	—	—	
酸类	乙酸 (V22)	0.36	0.26	0.03	0.04	0.05	0.01	0.01	0.03
	丁酸 (V23)	10.61	2.18	0.01	0.57	0.03	0.05	0.45	0.05
	2-丁烯酸	0.03	—	—	—	—	—	—	—
	壬酸	0.01	0.01	—	0.01	0.03	0.01	—	—
	癸酸 (V24)	0.16	0.08	0.01	0.02	0.32	0.08	0.18	—
	4-甲基戊酸 (V25)	—	—	0.01	0.02	1.93	0.93	1.07	0.02
戊酸 (V26)	—	—	—	—	—	—	0.08	—	

续表 2

类别	化合物	RL1	EL7	RL10	RL20	EL12	RL23	EL43	EL46
酸类	十一酸	—	—	—	—	0.01	—	—	—
	3-苯基丙酸	—	—	—	—	—	0.02	—	—
	辛酸 (V27)	0.73	0.21	0.07	0.14	0.07	0.03	—	0.03
	异丁酸	0.01	0.01	—	* *	—	—	—	—
	己酸 (V28)	0.1	0.05	0.02	0.03	0.02	0.01	0.05	1.06
	反-3-癸烯酸	0.04	—	—	—	—	—	—	—
	3-甲基戊酸	0.04	—	—	—	—	—	—	—
	庚酸	0.01	—	—	—	* *	—	—	—
	L-乳酸	—	0.01	—	—	—	—	—	—
	3-甲基己酸 (V29)	—	—	—	—	0.17	0.05	0.21	—
	2-甲基己酸	—	—	—	—	—	0.04	—	—
	4-甲基-2-戊烯酸	—	—	—	—	—	* *	—	—
	十二酸	—	—	—	—	—	0.01	—	* *
醛类	苯甲醛 (V30)	0.07	0.03	0.01	0.02	0.03	—	0.02	—
	2,4,5-三甲基苯甲醛	—	—	* *	—	—	—	—	—
酮类	2-壬酮	—	—	—	—	—	0.02	—	—
	1-巯基-2-丙酮	—	—	—	—	—	* *	—	—
其他类	对甲苯酚	0.03	0.01	* *	* *	0.02	0.02	—	—
	2,4-二叔丁基苯酚 (V31)	0.15	0.16	0.16	0.2	0.14	0.19	—	—
	2,5-二叔丁基苯酚 (V32)	—	—	—	—	—	—	0.16	—
	烯丙苯	—	—	—	—	—	—	0.01	—
	2,3,5,6-四甲基吡嗪	0.01	0.02	—	—	—	—	—	—
	苯并噻唑 (V33)	—	—	0.01	0.08	0.01	0.01	—	—
	二甲基二硫 (V34)	—	—	—	—	—	0.02	0.08	—
	二甲基三硫	—	—	—	—	0.03	0.02	—	—
	吡啶	—	—	—	—	—	* *	—	—
	环辛烷	—	—	0.05	—	—	—	—	—
	4-乙基-2-甲氧基苯酚	—	—	* *	—	—	—	—	—
	2-甲基吡嗪	—	—	—	* *	—	—	—	—
	甲基磺酸酐	0.01	—	—	—	—	—	—	—
2-乙酰基噻唑	—	—	—	0.01	—	—	—	—	

注:表中数字表示相应化合物的相对含量,即其与内标(薄荷醇)峰面积比值;—表示未检测出;* *表示该化合物的相对含量 >0 且 <0.005;V1—V34 表示用于主成分分析的变量

甜味、花香、青草等香味,是酒体中微量香味物质的重要组成部分.由表 2 可知,醇类化合物是上述 8 株代表性梭菌菌株发酵液中挥发性物质最多的一类,包括对浓香型白酒香气贡献度较大的 3-甲基丁醇、2-乙基己醇及正戊醇等^[1,3],也包括在浓香型白酒中很少被报道的醇类,如 9-癸烯醇和 5-苯基-1-戊醇等.不同 *Clostridium spp.* 菌株产生醇类化合物的种类和含量存在明显差异.其中菌株 RL10 (*C.*

indolis), EL12 (*C. bifermentans*), RL23 (*C. sporogenes*) 和 EL43 (*C. cadaveris*) 所产醇类化合物种类较多 (≥10 种),而 RL1 (*C. tyrobutyricum*), EL7 (*C. butyricum*) 和 EL46 (*C. kluyveri*) 仅能产生少数几种醇类化合物 (≤3 种).此外,仅有 3-苯丙醇、正辛醇、苯乙醇和正丁醇 4 种醇类化合物能被 5 种及以上梭菌代表性菌株合成,而 9 种醇类化合物仅能被 1 种梭菌代表性菌株合成,且 EL43 (*C. sporogenes*) 产多种醇类化合

物的能力均高于其他代表性菌株. 这些结果能为通过定向微生物强化来提升浓香型白酒中特定醇类化合物含量提供借鉴.

脂肪酸是所有白酒中含量较高且较为重要的一类化合物,其在白酒中的组成及丰度影响白酒的香型及品质. 例如,脂肪酸可以增加酒的厚重感,削弱或掩盖白酒的邪杂味、爆辣感及苦味等. 此外,脂肪酸也是白酒中重要的呈香物质,是酯类化合物合成的主要前体^[11]. 在浓香型白酒中,具有酸味、奶油味等香味的己酸、丁酸、3-甲基丁酸等脂肪酸对其香气贡献度较高. 由表2可知,上述8株代表性菌株能产生不同碳链长度(C2—C12)的挥发性脂肪酸共20种. 每株代表性菌株均能产生6种以上脂肪酸,且多数脂肪酸(如丁酸、己酸、辛酸、庚酸等)在白酒中均已被检出,这也表明梭菌可能是浓香型白酒酿造过程中产生挥发性脂肪酸的重要来源. 在上述脂肪酸中,乙酸、丁酸和己酸作为浓香型白酒的重要风味成分,可以由上述8株代表性菌株产生. 其中,产己酸最高的为EL46(*C. kluyveri*),其半定量结果为1.06. 目前,梭菌*C. kluyveri*是产己酸梭菌的一个代表菌种,其不同地域产的浓香型白酒中均已被检出^[4]. 产乙酸、丁酸及辛酸能力最高的为RL1(*C. tyrobutyricum*),该梭菌是用于工业发酵产丁酸的主要菌种.

酯类是浓香型白酒中最重要的一类呈香化合物,且大部分酯类化合物沸点较低,经过蒸馏很容易进入基酒中,因此是白酒中含量和数量最多的风味化合物^[20-21]. 由表2可知,本研究共检测到14种酯类化合物,且除EL43(*C. cadaveris*)外,其他梭菌菌株仅形成少数几种酯类化合物(≤4种),表明梭菌对白酒中酯类化合物的形成可能基于间接作用,即主要由醇类和酸类化合物经酶促和非酶促反应中的酯化作用生成.

除上述酸类、醇类及酯类化合物外,上述菌株还产生其他多种挥发性物质,如酚类、醛类和酮类等. 酚类是窖泥中另一类比较重要的化合物,具有芳香气味. 本研究检测到对甲苯酚、2,4-二叔丁基苯酚、2,5-二叔丁基苯酚和4-乙炔基-2-甲氧基苯酚4种酚类物质,其中以RL20(*C. acetobutylicum*)所产2,4-二叔丁基苯酚的含量最高. 除此之外,还检测到苯甲醛和2,4,5-三甲基苯甲醛2种醛类物质,1-巯基-2-丙酮和2-壬酮2种酮类物质,吡啶、2-甲基吡啶、2,3,5,6-四甲基吡啶、苯并噻唑和2-乙酰基噻唑5种苯并杂环化合物,烯丙苯和环辛烷2种烃类化合物,二甲基二硫、二甲基三硫2种含硫类化合物. 其中具有烘烤香气、甜香气的2,3,5,6-四甲基吡啶,有助于丰富白酒的香气^[16]. 具有异嗅味的二甲基二硫、二甲基三硫和吡啶,在一定程度上影响白酒的口感和品质. 因此,明晰不同*Clostridium spp.*所产挥发性代谢物的种类及组成,有助于通过对有益微生物的强化或对有害微生物的控制,实现从白酒酿造源头提升白酒品质.

2.3 主成分分析

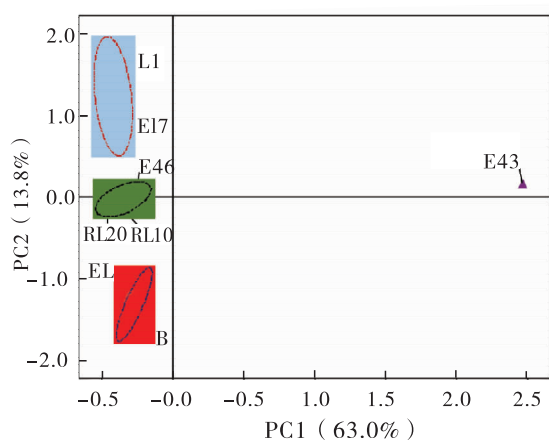
根据表2可知,8株*Clostridium spp.*所产挥发性代谢物的种类和含量存在明显差异. 为了进一步直观反映上述菌株与其挥发性代谢物之间的关联性,选取相对含量大于0.05的挥发性代谢物共34种化合物对这8株*Clostridium spp.*进行主成分分析. 图2为代表性菌株散点图和挥发性代谢物载荷图. 由图2a)可知,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)共23个变量,累计代表上述34个变量76.8%的信息. 从图2b)可以看出,上述8株菌株聚为4类. 从主成分1可知,只有菌株EL43(*C. cadaveris*)处于第一象限,其主要与乙酸乙酯(V2)、丁酸乙酯(V3)、乙酸丁酯(V4)、丁酸丁酯(V5)、氯甲酸辛酯(V6)、3-苯丙酸乙酯(V7)、4-甲基戊醇

(V18)、3-甲基己醇(V19)、3-甲基己酸(V29)和二甲基二硫(V34)10个变量呈正相关关系,而其余7株 *Clostridium spp.* 与另外11个变量呈正相关关系,包括己酸乙酯(V1)、硫代醋酸S-甲酯(V9)、1-癸醇(V10)、正辛醇(V16)、乙酸(V22)、丁酸(V23)、辛酸(V27)、己酸(V28)、苯甲醛(V30)、2,4-二叔丁基苯酚(V31)和苯并噻唑(V33)11种化合物.从主成分2可知,菌株RL1(*C. tyrobutyricum*)和EL7(*C. butyricum*)主要与乙酸、丁酸、辛酸和苯甲醛相关;EL46(*C. kluyveri*)、RL20(*C. acetobutylicum*)和RL10(*C. indolis*)主要与己酸、己酸乙酯、2,4-二叔丁基苯酚及苯并噻唑相关;EL12(*C. bifermentans*)RL23(*C. sporogenes*)主要与硫代醋酸S-甲酯、1-癸醇和正辛醇相关;而EL43(*C. cadaveris*)主要与乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯、丁酸丁酯、氯甲酸辛酯、3-苯丙酸乙酯、4-甲基戊醇、3-甲基己醇和二甲基二硫这9种化合物有关.

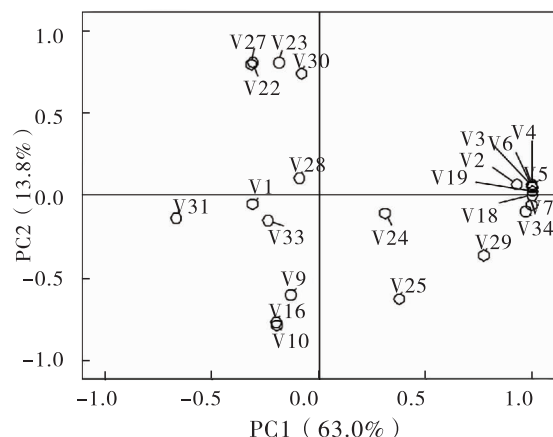
综上所述,基于不同 *Clostridium spp.* 与挥发性代谢物之间的相关性,可以为选择相应的梭菌菌株或种属对浓香型白酒酿造过程中的特定化合物进行微生物定向、强化,提供一定的理论依据.

3 结论

本文从某酒企的浓香型白酒窖泥中分离出88株厌氧细菌,其中75株细菌分属于8个系统发育簇(cluster I—VIII),且不同发育簇的最高相似梭菌 *Clostridium spp.* 分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*. 其中梭菌 *C. bifermentans* 和 *C. cadaveris* 第一次在窖泥中被检出,进一步丰富了窖泥中梭菌的种类.采用HS-SPME-GC-MS法从上述8株代表性梭菌菌株发酵液中共检测到75种挥



a) 8株代表性菌株散点图



b) 挥发性代谢物载荷图

图2 代表性菌株

散点图和挥发性代谢物载荷图

Fig. 2 The scatter diagram of representative strains and loading plot of volatile metabolites

发性物质,包括醇类23种、酸类20种、酯类14种、醛类2种、酮类2种和其他挥发性物质14种,表明 *Clostridium spp.* 在浓香型白酒酿造过程中,与多种挥发性化合物的形成密不可分.通过主成分分析发现,菌株RL1(*C. tyrobutyricum*)和EL7(*C. butyricum*)与乙酸、丁酸、辛酸和苯甲醛的合成相关性较大;EL46(*C. kluyveri*)、RL20(*C. acetobutylicum*)和RL10(*C. indolis*)主要与己酸、己酸乙酯、2,4-二叔丁基苯酚和苯并噻唑的形成相关;EL12(*C. bifermentans*)RL23(*C. sporogenes*)主要与硫代醋酸S-甲酯、1-癸醇和正辛醇相关;而EL43(*C. cadaveris*)主要与多

种酯类、4-甲基戊醇、3-甲基己醇和二甲基二硫的合成有关。

本研究对窖泥中厌氧梭菌的分离、鉴定和其挥发性代谢物的分析结果,为今后定向生物强化白酒风味物质形成、呈香化合物溯源、控制白酒异嗅物质产生,进而提升浓香型白酒品质,提供了理论依据。

参考文献:

- [1] FAN W L, QIAN M C. Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jian-nanchun” liquors by aroma extract dilution analysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (7): 2695.
- [2] ZHENG J, LIANG R, WU C, et al. Discrimination of different kinds of Luzhou-flavor raw liquors based on their volatile features [J]. *Food Research International*, 2013, 56: 77.
- [3] FAN W, QIAN M C. Identification of aroma compounds in Chinese “Yanghe Daqu” liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry [J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, 21 (2): 333.
- [4] HU X L, DU H, XU Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing *bacterium Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116.
- [5] ZHENG X W, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. Daqu—A traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 117 (1): 82.
- [6] HU X, DU H, REN C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (8): 2506.
- [7] TAO Y, LI J, RUI J, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (7): 2254.
- [8] SJÖBLOM M, MATSAKAS L, CHRISTAKOPOULOS P, et al. Production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum*, (ATCC25755) using sweet sorghum stalks and beet molasses [J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 74: 535.
- [9] CAI G, JIN B, SAINT C, et al. Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155 (3): 269.
- [10] LI H G, LI W, GU Q Y, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 254.
- [11] ZHENG J, LIANG R, ZHANG L, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. *Food Research International*, 2013, 54 (1): 660.
- [12] ELSDEN S R, HILTON M G, WALLER J M. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by *Clostridia* [J]. *Archives of Microbiology*, 1976, 107 (3): 283.
- [13] 张会敏, 李天婵, 孙美青, 等. 利用非培养技术初步研究古井贡酒窖泥细菌群落结构 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35 (13): 200.
- [14] 何培新, 李芳莉, 郑燕, 等. 浓香型白酒窖泥梭菌的分离及其挥发性代谢产物分析 [J]. *中国酿造*, 2017, 36 (4): 45.
- [15] WANG M Y, ZHANG W X. Analysis of micro-

- al community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas [J]. *Microbiology China*, 2014, 41 (8): 1498.
- [16] WANG C, CHEN Q, WANG Q, et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes, which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors [J]. *Food Research International*, 2014, 62: 894.
- [17] HU X L, WANG H Y, WU Q, et al. Development, validation and application of specific primers for analyzing the clostridial diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 40.
- [18] STACKEBRANDT E, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards [J]. *Microbiology Today*, 2006, 33(4): 152.
- [19] LIU C, HUANG D, LIU L, et al. *Clostridium swelffunianum sp. nov.*, a novel anaerobic bacterium isolated from the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor production [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(4): 817.
- [20] 肖熙佩, 陈思妘. 白酒中酯类的形成 [J]. *酿酒*, 1981(3): 9.
- [21] 张鹏, 张亮臣, 孙振宇, 等. 浓香型大曲白酒蒸馏过程中四大酯馏出特性的分析 [J]. *食品工程*, 2013 (3): 30.