

枯草芽孢杆菌利用不同基质所产代谢物的分析对比

王和玉 杨帆 姚翠屏 林琳 王莉 吕云怀 季克良

(贵州茅台酒股份有限公司技术中心, 贵州 仁怀 564501)

摘要: 从茅台酒生产环境中分离纯化得到一株耐高温枯草芽孢杆菌。分别以小麦和高粱作为培养基采用制曲工艺条件进行固态发酵培养, 利用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)对其代谢产物进行分析对比。结果表明, 该菌利用 2 种培养基均能代谢生成酱香型白酒中含量较高的 4-甲基吡嗪, 其中以小麦为培养基所产 4-甲基吡嗪含量达 1.86 mg/kg 小麦。

关键词: 微生物; 枯草芽孢杆菌; 小麦; 高粱; 制曲工艺; 代谢产物分析

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.3; TS261.4

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2009)12-0093-03

Analysis and Comparison of the Metabolites Produced by A Strain of *Bacillus subtilis* by Use of Two Different Mediums

WANG He-yu, YANG Fan, YAO Cui-pin, LIN Lin, WANG Li, LU Yun-huai and JI Ke-liang

(Technical Centre of Maotai Co.Ltd, Renhuai, Guizhou 564501, China)

Abstract: A strain of *Bacillus subtilis*, with high-temperature resistance, was isolated from the production environment of Moutai Liquor. It was cultured by using wheat and sorghum as mediums respectively, and its metabolites were analyzed and compared by GC-MS. The comparison results suggested that *Bacillus subtilis* could produce tetramethyl pyrazine by use of both the two mediums. Among the two mediums, it was found that the strain in wheat medium had a higher pyrazine tetramethyl content (1.86 mg/kg wheat).

Key words: microbe; *Bacillus subtilis*; wheat; sorghum; starter-making techniques; metabolites analysis

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种重要的工业微生物^[1], 主要运用于酶制剂生产。对该菌的研究主要集中在液态发酵各种蛋白质的表达上, 而在传统多菌种固态发酵行业特别是在白酒行业中, 该菌利用酿酒原料采用制酒、制曲工艺条件纯种固态发酵所产代谢物的研究尚未开展。该菌大量存在于茅台酒生产环境中, 在酿造过程中发挥着重要作用, 是微生物种群中的优势菌之一^[2], 对其纯种固态发酵所产代谢物的研究是研究茅台酒风味物质成因研究的重要组成部分。小麦是茅台酒大曲的主要原料, 高粱是茅台酒酿制的主要原料。茅台酒的制曲工艺特点是高温制曲, 高温制曲被认为是茅台酒酱香风格形成的重要工艺之一^[3]。本文以一株从茅台酒生产环境中分离纯化得到的耐高温枯草芽孢杆菌为研究对象, 先通过液态培养富集再将其分别接入小麦和高粱原料中, 采用制曲工艺条件进行纯种固态发酵培养, 考察其所产代谢物, 探索该菌在茅台酒酿造过程中所发挥的作用。这一研究填补该菌在传统固态发酵领域的研究空白, 有利于推动白酒产业特别是酱香型白酒产业更好更快地发展。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)

1.2 培养基及培养条件

液态培养基: LB。

小麦培养基: 茅台酒制曲用小麦, 121 °C, 20 min。

高粱培养基: 茅台酒制酒用高粱, 121 °C, 120 min。

液态培养富集后分别接入小麦和高粱培养基放入曲房培养, 培养时间与制曲周期同步。

1.3 分析仪器

Agilent GC 7890A-5975 C Mass selective detector (MSD)。

1.4 提取方法

发酵结束后, 取一定量的固态发酵样品, 加入一定量 50 %乙醇溶液浸提, 浸提结束后采用乙醚进行液液萃取, 再将萃取液氮吹浓缩, GC-MS 分析检测。

1.5 GC-MS、定性分析条件

GC 条件: 样品通过毛细管柱 HP-ffap (30 m×0.25 mm

收稿日期: 2009-09-27

作者简介: 王和玉(1973-), 男, 工程师。

i.d. $\times 0.25\ \mu\text{m}$, J&W Scientific) 进行分离。进样口温度为 $250\ ^\circ\text{C}$, 载气 He, 流速 $2.2\ \text{mL/min}$ 。进样量 $1\ \mu\text{L}$, 不分流进样。升温程序: $40\ ^\circ\text{C}$ (保持 2 min), 以 $4\ ^\circ\text{C/min}$ 的速度升温至 $70\ ^\circ\text{C}$, 再以 $6\ ^\circ\text{C/min}$ 的升温速率升温至 $230\ ^\circ\text{C}$ (保持 10 min)。

MS 条件: 离子源温度: $230\ ^\circ\text{C}$; 离子化方式 EI; 电子能量: $70\ \text{eV}$; 扫描范围: $35\sim 550\ \text{amu}$ 。

物质定性分析: 是将未知物质图谱与 NIST05a.L Database (Agilent Technologies Inc.) 中标准图谱进行比对。

外标法定量 4-甲基吡嗪。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌利用小麦固态发酵代谢产物分析

将未接有枯草芽孢杆菌的液态培养基接入小麦固态培养基中, 采用制曲工艺培养, 作为空白对照。将固态发酵结束后的空白样品按照 1.4 方法提取浓缩进样分析, 其结果见图 1。

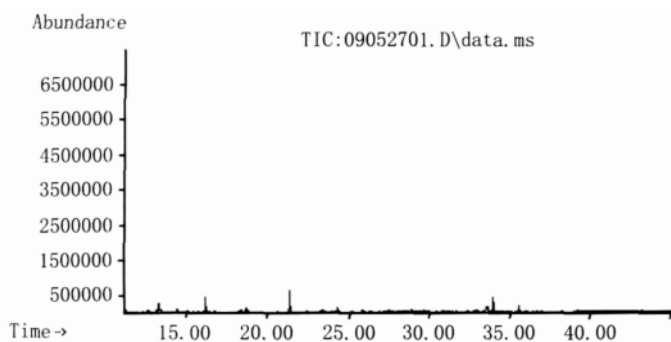


图 1 小麦固态培养基物质的总离子流图

将接有枯草芽孢杆菌的液态培养基, 按该菌最适培养条件培养后接入小麦培养基中, 采用制曲工艺培养。将固态发酵结束后样品按照 1.4 方法提取浓缩进样分析, 其结果见图 2。

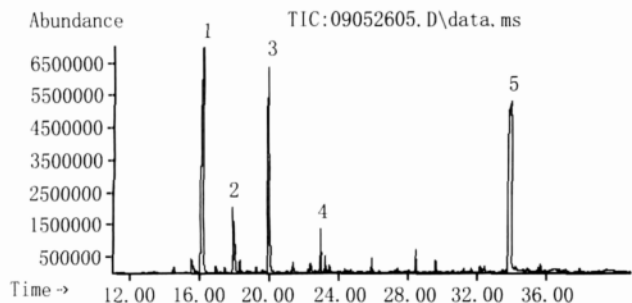


图 2 枯草芽孢杆菌以小麦为固态培养基代谢产物的总离子流图

对比图 1 图 2 可知, 按现有提取方法, 枯草芽孢杆菌所产代谢产物有吡嗪类、酸、酯、醇、酮及芳香族化合物等。在这几类物质中含量较高的有: 4-甲基吡嗪、苯乙酸、

3-甲基丁酸、2-甲基丙酸、2-甲基-4-戊烯酸, 将这 5 种物质看作该菌的主要代谢产物。其中, 4-甲基吡嗪含量最高, 其含量达 $1.86\ \text{mg/kg}$ 小麦。推断枯草芽孢杆菌是茅台酒中这 5 种物质的主要产生菌株之一。该菌的其他低产量的代谢产物对茅台酒风味贡献的评估, 将采用气相色谱闻香法、结合气质联用技术进行更深入的研究。

2.2 枯草芽孢杆菌利用高粱固态发酵产代谢产物分析

将未接有枯草芽孢杆菌的液态培养基接入高粱固态培养基中, 采用制曲工艺培养, 作为空白对照。将固态发酵结束后空白样品按照 1.4 方法提取浓缩进样分析, 结果见图 3。

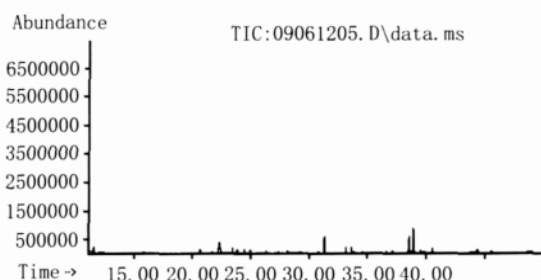


图 3 高粱固态培养基物质的总离子流图

将接有枯草芽孢杆菌的液态培养基, 按该菌最适培养条件培养后接入高粱固态培养基中, 采用制曲工艺培养。将固态发酵结束样品按照 1.4 方法提取浓缩进样分析, 结果见图 4。

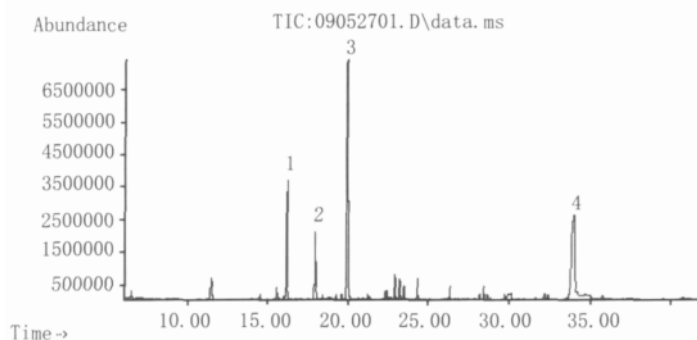


图 4 枯草芽孢杆菌以高粱为固态培养基代谢产物的总离子流图

对比图 3 图 4 可知, 按现有提取方法, 枯草芽孢杆菌所产代谢产物有吡嗪类、酸、酯、醇、酮及芳香族化合物等。在这几类物质中含量较高的有: 4-甲基吡嗪、苯乙酸、3-甲基丁酸、2-甲基丙酸, 将这 4 种物质看作该菌的主要代谢产物。

对比图 2 与图 4 可知, 虽然利用的培养基物质不同, 但运用相同的培养条件, 枯草芽孢杆菌所产代谢产物有 20 种物质相同, 占其产物种类近 50%。对比该菌利用 2 种培养基所产主要代谢产物可知, 4-甲基吡嗪和苯乙酸在小麦培养基中代谢明显高于高粱培养基。其中, 通过对

4-甲基吡嗪定量分析,可知以高粱为培养基所产的量为 0.68 mg/kg 高粱,是以小麦为培养基所产的量的 36.6%。2-甲基丙酸在 2 种培养基中的产量基本相同;3-甲基丁酸在高粱培养基中代谢明显高于小麦培养基。2 种培养基中所代谢的低浓度物质的差异比较,仍需用气相色谱闻香法、结合气质联用进行下一步的研究。

3 结论

3.1 枯草芽孢杆菌在制曲工艺培养条件下利用小麦培养基所产代谢产物中含有多种风味物质。在这些产物中还含有有益于人体身体健康的 4-甲基吡嗪,且含量高达 1.86 mg/kg 小麦。2,3,5,6-4-甲基吡嗪又名川芎嗪,具有扩张血管、抗血栓、抗血小板凝集、改善微循环等多种生理活性,临床用于治疗缺血性心脑血管疾病效果显著,近年也用于治疗糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性周围神经病变等糖尿病并发症^[4]。

3.2 枯草芽孢杆菌在制曲工艺培养条件下,利用高粱培

培养基所产代谢产物中亦含有多种风味物质,但种类与含量低于利用小麦培养基所代谢的产物,如 4-甲基吡嗪含量为 0.68 mg/kg 高粱,是以小麦为培养基产量的一半。

3.3 从实验结果可知,微生物利用小麦为培养基所代谢产物种类与含量较高粱更丰富更多。这充分说明,以小麦为制曲原料采用高温制曲工艺是形成茅台酒风格特征的重要成因之一。

参考文献:

- [1] 罗俊成. 浓香型白酒糟醅中芽孢杆菌属细菌的分类鉴定和 16SrDNA 序列系统发育分析[D]. 四川:四川大学,2007.
- [2] 范光先,王和玉,崔同弼. 茅台酒生产过程中的微生物研究进展[J]. 酿酒科技,2006,(10):75-77.
- [3] 庄名扬. 再论美拉德反应产物与中国白酒的香与味[J]. 酿酒科技,2005,(5):34-38.
- [4] 庄名扬. 酱香型白酒中微量成分的生理活性[J]. 酿酒,2006,(6):109-110.

第二届全国清香型白酒高峰论坛在豫宝丰召开

本刊讯 第二届全国清香型白酒高峰论坛于 2009 年 11 月 16~17 日在豫宝丰召开,全国著名白酒专家沈怡方、高景炎、高月明、曾祖训等,华北 5 省市区、直辖市、河南省的酿酒、酒业协会领导,及 31 个白酒企业的主要领导共 100 余人参加会议,平顶山市市长李恩东及相关部门领导、宝丰县的四大班子及相关部门领导出席会议并做了热情洋溢的讲话。会议由河南省酒协会长熊玉亮主持,他首先介绍了与会专家和领导,并宣布高峰论坛开始。全国清香型白酒企业合作组织组长单位山西杏花村汾酒厂股份有限公司总经理韩建书致开幕词,并介绍了汾酒厂股份有限公司取得的骄人业绩,指出“清香型白酒前途光明,路途遥远”,只要做好该做的事,美好的明天一定会到来。宝丰酒业有限公司董事长王杰士致欢迎词,介绍了宝丰酒业走过来的路,他们在 3 年的时间里投入 4 亿多元的资金,加大投资力度,使宝丰酒业走上快速发展之路。平顶山市市长李恩东发表了热情洋溢的讲话,介绍了平顶山市的悠久历史,认为造酒历史悠久,仪狄是其鼻祖,并认为清香型白酒是一大优势,清香型白酒醉得慢,醒得快,促进了当地经济的发展。

著名白酒专家沈怡方、高景炎、高月明、曾祖训等分别做了专题报告,王元太做了书面发言,有 10 多个企业的老总在会上做了交流发言。著名白酒专家高景炎指出了清香型白酒的优势:(1) 消费者的消费倾向向清香型白酒转变,带动了饮酒习惯的转变;(2) 清香型白酒更适合年轻的消费者,可以根据自己的爱好自由勾调;(3) 技术进步促进了清香型白酒的发展;(4) 清香型白酒更适合国际化,接近伏特加风格。著名白酒专家沈怡方对香型做了详尽的诠释:(1) 清香型白酒是大家族,很多香型是在此基础上发展起来的;(2) 浓香的崛起与清香下滑是有根源的,①产业政策导向,低度化、固液结合、色谱分析技术的广泛应用、品尝和勾兑技术的提高都是因素;②全国评酒会的引导,特别是第三届评酒后,送评酒样以浓香酒居多,在第五届评酒会上,浓香酒就占了半壁以上的河山;③科技进步的引导;④体制创新的结果。(3) 清香型白酒的展望,关键在消费者的认知度,要研究市场。①研究饮酒方法;②解决味的问题;③以清香酒为基酒,开发保健酒。著名白酒专家曾祖训阐释了白酒组合新概念,对乳酸和乳酸乙酯重新认识,对奇数碳酯的研究,对琥珀酸乙酯的研究及氨基酸盐类的研究非常重要。徐岩教授做了题为“清香型白酒风味与微生物研究”的报告,报告了在三大香型白酒中检测到的微量风味物质,以及微生物研究取得成果。著名白酒专家高月明重点阐述了白酒行业的挑战:“简言之内外税安喝”,内竞争激烈,外洋酒进入,消费税改变,安安全问题,喝喝酒理念。

会议期间,与会的 20 多名国家评委对送会的 28 个酒样进行了感官鉴评,与会代表修改并通过了章程,参观了宝丰酒业,留下深刻印象。

本届会议特点:①规格高、内容丰富、成果多;②修改并通过章程;③一致通过成立秘书处和专家组;④邀请台湾代表参会。会议完成各项议程,圆满结束。(小雨)



高峰论坛会场