

茅台大曲中3株芽孢杆菌代谢产物的比对分析

杨帆, 林琳, 王和玉, 王莉, 杨代永, 吕云怀, 季克良

(贵州茅台酒股份有限公司, 贵州 仁怀 564501)

摘要: 从茅台酒生产用大曲中分离纯化得到3株芽孢杆菌, 分别是地衣芽孢杆菌 MTDB-01、地衣芽孢杆菌 MTDB-02 和枯草芽孢杆菌 MTDB-03。在制曲工艺条件下, 对3株芽孢杆菌分别进行纯种固态发酵, 分析比对其代谢产物。结果表明, 其共同的代谢产物为3-羟基-2-丁酮、2,6-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪、四甲基吡嗪、呋喃扭尔、异戊酸、2-甲基-2-丁烯酸、2,3-丁二醇、 β -苯乙醇和苯乙酸。初步明确这3株芽孢杆菌在茅台大曲生产过程中对茅台大曲风味的贡献。

关键词: 微生物; 芽孢杆菌; 固态发酵; 代谢产物; 茅台大曲; 风味

中图分类号: TS261.1; TS261.4; Q93-3

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2011)08-0042-02

Comparative Analysis of the Metabolites of Three *Bacillus* Strains in Maotai Daqu Starter

YANG Fan, LIN Lin, WANG Heyu, WANG Li, YANG Daiyong, LU Yunhuai and JI Keliang

(Guizhou Maotai Co.Ltd., Renhuai, Guizhou 564501, China)

Abstract: Three *Bacillus* strains were isolated from Maotai Daqu and then purified and identified as *Bacillus licheniformis* MTDB-01, *Bacillus licheniformis* MTDB-02, and *Bacillus subtilis* MTDB-03. Then solid fermentation of the three strains was carried out respectively under starter-making technical conditions and their metabolites were compared and analyzed. The results showed that their metabolites in common included 3-hydroxy-2-butanone, 2,6-dimethylpyrazine, pyrazine, tetramethylpyrazine, isopentonic acid, 2-methyl-2-butenolate, 2,3-butanediol, β -phenethyl alcohol, and phenylacetic acid. It was preliminarily revealed that these three strains had made certain contributions to the flavor of Maotai Daqu. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; *Bacillus*; solid fermentation; metabolites; Maotai Daqu Starter; flavor

茅台酒风味独特, 以酱香遐迩于世, 几十年来行业研究者不断探索其风味的组成。虽然至今尚未明确茅台酒的主体香味成分, 但普遍认为其来源于高温大曲^[1]。地衣芽孢杆菌 MTDB-01、地衣芽孢杆菌 MTDB-02 和枯草芽孢杆菌 MTDB-03 是3种在茅台高温大曲中极易分离的细菌, 也是茅台酒生产环境中极易被检测出的3种细菌, 其分别占茅台酒高温大曲中细菌总数的28%、37%和23%左右, 因此, 它们被看作是茅台酒酿造微生物种群中的优势细菌^[2], 其代谢产物是茅台大曲也是茅台酒风味物质的重要组成部分。本文将这3株芽孢杆菌在制曲工艺条件下分别进行纯种固态发酵, 检测其代谢产物并进行比对分析。此外, 还将它们的代谢产物与茅台大曲中的风味物质进行比对分析。

1 材料与方法

1.1 菌株

地衣芽孢杆菌 MTDB-01、地衣芽孢杆菌 MTDB-02

收稿日期: 2011-05-25

作者简介: 杨帆(1983-), 男, 工学硕士。

和枯草芽孢杆菌 MTDB-03, 从茅台酒生产用大曲中分离而得。

1.2 培养基及培养条件

液态富集培养基: 淀粉 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, 磷酸氢二钾 5 g/L, pH 7.0, 121 °C, 20 min。

小麦培养基: 茅台酒制曲用小麦, 121 °C, 20 min。

液态培养富集后分别接入小麦培养基, 按制曲工艺培养, 培养时间同制曲周期。

1.3 分析仪器

Agilent 7890 A-5975 C 气相色谱质谱联用仪 (GC-MS)。

1.4 提取方法^[3]

发酵结束后, 取一定量固态发酵样品, 加入 50% vol 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 分析条件

GC 条件:样品通过毛细管柱 HP-ffap (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm, J&W Scientific) 进行分离。进样口温度 250 °C,载气 He,流速 1.1 mL/min。进样量 1 μL,不分流进样。升温程序为:40 °C(保持 2 min),以 4 °C/min 的速度升温至 70 °C,再以 6 °C/min 的速率升温至 230 °C (保持 10 min)。

MS 条件:离子源温度:230 °C;离子化方式 EI;电子能量:70 eV;扫描范围:35~550 amu。

物质定性分析:将未知物质谱图与 NIST 08a.L Database (Agilent Technologies Inc.)中标准谱图进行比对定性分析。

2 结果与分析

将分别接有 MTDB-01、MTDB-02、MTDB-03 的液态培养基,按各菌株最适培养条件培养后分别接入小麦培养基中,采用制曲工艺培养。固态发酵结束后分别取样品按 1.4 提取浓缩进样进行分析,结果见图 1~图 3。

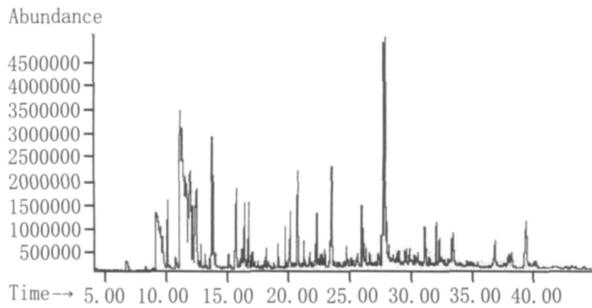


图 1 MTDB-01 以小麦为固态培养基代谢产物的总离子流图

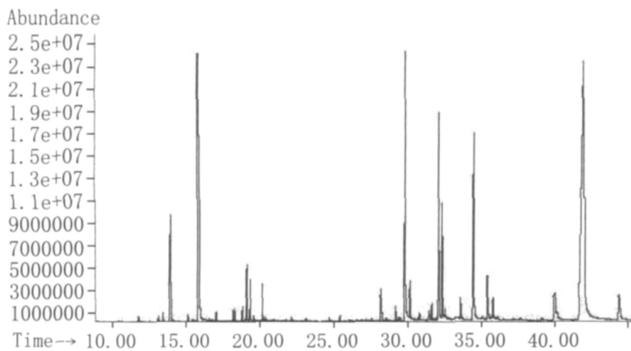


图 2 MTDB-02 以小麦为固态培养基代谢产物的总离子流图

对图 1、图 2 和图 3 中的代谢产物分析总离子流图进行解图,结果表明,这 3 株芽孢杆菌代谢产物有酸、酯、醇、酮、吡嗪类及芳香族化合物等共 70 多种。地衣芽孢杆菌 MTDB-01 的主要代谢产物有:3-羟基-2-丁酮、四甲基吡嗪、3-甲基丁酸、2-甲基-2-丁烯酸、苯乙醇、苯乙酸;枯草芽孢杆菌 MTDB-03 主要代谢产物有:四甲基吡嗪,苯乙酸,3-甲基丁酸,2-甲基丙酸,2-甲基-4-戊烯

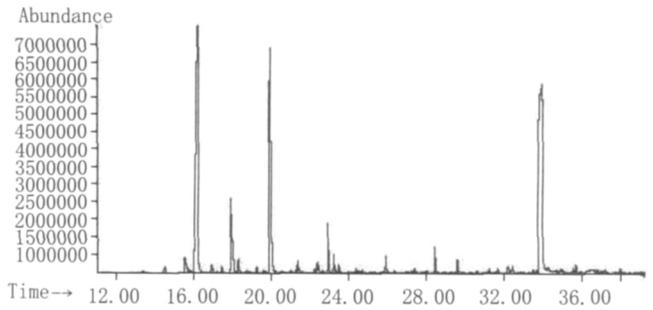


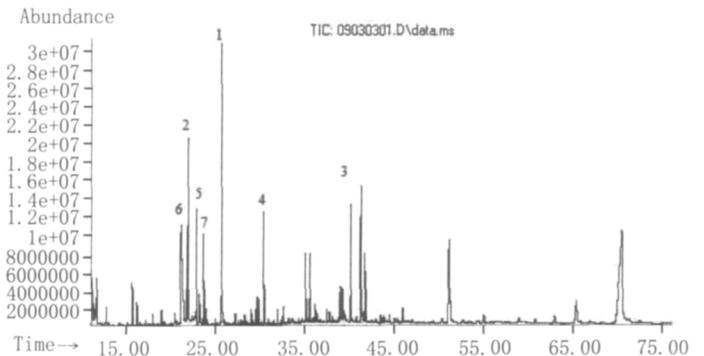
图 3 MTDB-03 以小麦为固态培养基代谢产物分析总离子流图

酸;地衣芽孢杆菌 MTDB-02 主要代谢产物有:2-甲基丙酸,3-甲基丁酸,2-甲基-2-丁烯酸,苯乙醇,苯乙酸。这 3 株细菌的代谢产物中的一些低浓度物质,因阈值低,其对风味的贡献可能不小于高浓度物质。通过气相色谱闻香法,结合气质联用技术可更好地对这些产物进行评价。对这 3 种细菌的挥发性代谢产物进行嗅闻实验,结合国内最新研究报道^[4],可将 3-羟基-2-丁酮、2,6-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪、四甲基吡嗪、呋喃扭尔、异戊酸、2-甲基-2-丁烯酸、2,3-丁二醇、β-苯乙醇与苯乙酸 10 种共同物质确定为这 3 株细菌的重要代谢产物。对这 10 种物质的嗅闻实验结果见表 1。

表 1 3 株产酱香细菌群的共同挥发性代谢产物

序号	化合物	香气描述
1	3-羟基-2-丁酮	奶油味
2	2,6-二甲基吡嗪	坚果香, 烤面包香
3	三甲基吡嗪	坚果香, 焙烤香
4	四甲基吡嗪	焙烤香
5	呋喃扭尔	焦糖味
6	异戊酸	酸臭
7	2-甲基-2-丁烯酸	植物气味
8	2,3-丁二醇	奶油香
9	β-苯乙醇	玫瑰花香
10	苯乙酸	玫瑰花香

将大曲按 1.4 提取浓缩进样分析,其结果见图 4。



1:3-甲基丁酸;2:四甲基吡嗪;3:苯乙酸;4:苯乙醇;
5:2-甲基丙酸;6:乙酸;7:3-羟基-2-丁酮;8:2,3-丁二醇

图 4 大曲挥发性风味物质总离子流图

(下转第 46 页)

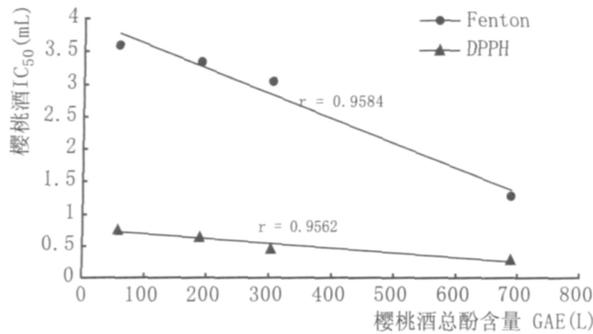


图3 樱桃酒的抗氧化性与总酚之间的相关性

果酒,具有较很大的开发潜力。

参考文献:

- [1] 曹家树,秦岭.园艺植物种质资源学[M].北京:中国农业出版社,2005:128-129.
- [2] 闰国华,张开春,周宇,等.樱桃保健功能研究进展[J].食品工业科技,2008,29(2):313-316.
- [3] Halvorsen B L, Carlsen M H, Phillips K M, et al. Content of redox-active compounds(ie, antioxidants) in foods consumed in the United States[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2006, 84:95-135.
- [4] Kirakosyan A, Seymour E M, Urcuyo Llanes D E, et al. Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products[J]. Food Chemistry, 2009, 115:20-25.
- [5] Jakobek L, Šeruga M, Voca S, et al. Flavonol and phenolic acid

composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks[J]. Scientia Horticulturae, 2009,123: 23-28.

- [6] King R E, Bomser J A, Min D B. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety[J]. Bioactivity of Resveratrol, 2006, 5: 65-70.
- [7] 张艳.中国樱桃果实酿酒工艺及香气成分变化研究[D].雅安:四川农业大学,2008.
- [8] Giovanelli G, Brenna O V. Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 225: 145-150.
- [9] 陈金娥,高虹.不同品种黄酒中多酚含量及抗氧化性研究[J].酿酒科技,2008(4):37-41.
- [10] 李羚,高云涛.橄榄酒清除活性氧及抗氧化作用研究[J].酿酒科技,2007(9):43-45.
- [11] 刘凌,孙慧,周明,等.提取纯化工艺对枸杞多糖抗氧化功能的影响[J].食品与发酵工业,2009,35(7):156-159.
- [12] 李颖畅,孟宪军.蓝裤花色昔抗氧化活性的研究[J].食品与发酵工业,2007,33(9):61-64.
- [13] Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods [J]. Food Chemistry, 2011, 124:1208-1216.

(上接第43页)

大曲中浓度较高的风味物质有:异戊酸、四甲基吡嗪、 β -苯乙醇、苯乙酸、3-羟基-2-丁酮、乙酸、2,3-丁二醇、香兰素、亚油酸、亚麻酸等。将大曲中的挥发性风味物质与3株产酱香细菌的特征性发酵产物进行对比,可以推断该3株产酱香的细菌是大曲中的主要挥发性风味物质的产生菌。因此,可将这3株细菌定义为产酱香风味功能性细菌,表1中的10种物质定义为产酱香风味功能性细菌挥发性特征性发酵产物。以上10种物质在酱香型酒的组成比例以及其所占特征香的比例,有待进一步深入研究。

3 结论

茅台大曲中常见的3株芽孢杆菌,在制曲工艺条件下发酵产生酸、酯、醇、酮、吡嗪类及芳香族化合物等共70多种。它们拥有共同的代谢产物为:3-羟基-2-丁酮、2,6-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪、四甲基吡嗪、呋喃扭尔、异戊酸、2-甲基-2-丁烯酸、2,3-丁二醇、 β -苯乙醇与苯乙

酸,但在代谢产量上存在差异。因此,将这3株细菌定义为产酱香风味功能性细菌,表1中的10种物质定义为产酱香风味功能性细菌挥发性特征性发酵产物。这3株芽孢杆菌占茅台酒高温大曲中细菌总数的近90%^[1],其发酵产生的特征性物质的确定,将为进一步阐明酱香型白酒的生产机理提供极为重要的科学数据支撑。将这一成果进行应用研究,有利于新型酱香型白酒的开发。

参考文献:

- [1] 刘晓光,谢和,屈直.酱香型白酒风味物质的形成与微生物关系的研究现状与进展[J].贵州农业科技,2007,35(2):131-134.
- [2] 杨代永,范光先,汪地强.高温大曲中的微生物研究[J].酿酒科技,2007(5):37-38.
- [3] 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.
- [4] 张荣,徐岩,范文来,等.酱香大曲中地衣芽孢杆菌及其特征风味代谢产物的分析研究[J].工业微生物,2010(3):7-12.