

大曲中产酱香芽孢杆菌的筛选及其代谢产香探析

罗建超, 谢和

(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 对茅台酒生产各环节所采集的 28 个样品进行了初步分析, 从高温大曲制作过程的不同环节筛选出芽孢杆菌 104 株, 用麦曲模拟升温发酵筛选产香的菌株, 经鉴定分别为枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等, 其中产酱香优良的菌株 25 株, 分为多种香味, 与不产香型的细菌对比, 产酱香的 25 株均能产生二乙酰、乙偶姻、蛋白酶、淀粉酶等, 结合茅台的生产流程分析了其产香的可能机制, 得出结论: 芽孢杆菌在大曲发酵过程中产生蛋白酶和淀粉酶等多种酶类和代谢物质, 进而在高温、偏酸环境下通过美拉德反应产生吡嗪等多种茅台酒特征香味物质。

关键词: 高温大曲; 芽孢杆菌; 酱香; 美拉德反应

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.33; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)05-0035-06

Screening of *Bacillus sp.* from Daqu and Study of Its Metabolites

LUO Jianchao and XIE He

(College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Preliminary analysis of 28 samples collected in each production procedure of Maotai Liquor was carried out, and then 104 *Bacillus sp.* strains were screened out in different step during the preparation of high-temperature Daqu, and wheat starter was used for simulated temperature-rising fermentation to screen aroma-producing strains, and these 25 strains which could produce Maotai flavor were identified as *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* and *Bacillus velezensis*, compared with other *Bacillus sp.* strains not producing Maotai flavor, all the 25 strains could produce diacetyl, acetoin, proteinase and amylase etc. Through the analysis of aroma-producing mechanism of Maotai liquor, we may conclude that those *Bacillus sp.* strains produce varieties of enzymes and metabolites such as protease and amylase etc. at the first step and then those metabolites further produce characteristic flavoring compositions of Maotai liquor such as pyrazine etc. through maillard reaction under high temperature and acidic circumstances.

Key words: high temperature Daqu; *Bacillus sp.*; Maotai-flavor; Maillard reaction

茅台酒是我国大曲酱香型酒的鼻祖, 其酿造工艺独特, 主要特点为高温制曲、高温堆积、高温发酵、高温流酒和长期贮存, 俗称“四高一长”。其发酵所产酒具有酱香突出、幽雅细腻、酒体醇厚、丰满独特的特征。对茅台酒香味成分与风味的关系一直没有定论^[1-2], 但酱香型风味的形成机理和易地生产一直是研究的热点^[3]。1982年, 方心芳^[4]等人在考查茅台的制作工艺后认为“茅台曲可说是一种细菌曲”; 谢和^[5]等人从名优大曲中分离鉴定出产酱香枯草芽孢杆菌; 周恒刚提出随着大曲品温升高, 嗜热芽孢杆菌发酵的熟料产生的大量酸性蛋白酶对酱香白酒香味具有重要贡献^[6]。因此, 芽孢杆菌, 特别是高温大曲中的芽孢杆菌被认定在产酱香风味物质中起重要作用^[7-8]。

影响酒品质的一个重要因素是酒体香味, 用 NMR、GC-MS 等定量分析方法研究结果表明, 吡嗪在酱香型

白酒中含量明显较高^[9], 是酱香型白酒区别于其他香型白酒的一个重要特征。芽孢杆菌代谢不仅能产生大量胞外酶, 包括蛋白酶、淀粉酶等, 从而在发酵前期积累各种多肽、氨基酸和还原糖类, 而且还能产生如乙偶姻^[10-11]、四甲基吡嗪^[12]等物质。这些代谢物质被认为与美拉德反应有关, 因此, 美拉德反应也是研究茅台酒风味物质成因的重点, 特别是从芽孢杆菌代谢与美拉德反应之间关系的角度来解释产酱香机制还有待进一步深入研究。

本研究考查了茅台酒生产中一个生产周期的微生物群落分布规律和环境条件, 从发酵原料及制造工艺的不同时期、不同环节中采集并分析样品 28 个, 重点对制曲工艺的 5 个环节, 采用 2 次富集, 多次筛选方案, 筛选并鉴定出能产生酱香风味物质的芽孢杆菌。对比产酱香菌和不产酱香菌的代谢差异, 结合发酵工艺条件下产酱香

基金项目: 贵州茅台科技联合基金项目(黔科合茅科联字[2009] 7003 微生物生态与茅台酒生产的关系方法学研究)。

收稿日期: 2012-03-14

作者简介: 罗建超, 男, 研究生, 研究方向为资源微生物学。

通讯作者: 谢和, 男, 副教授, 研究方向为资源微生物学和应用微生物学, E-mail: xieheh@163.com。

优先数字出版时间: 2012-04-18; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120418.1442.002.html>。

芽孢杆菌的代谢特点,初步阐明了产酱香芽孢杆菌代谢对美拉德反应和产酱香的关系,对通过调控微生物代谢进而提高酱香型白酒品质具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用菌株:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)168(简称B168),浙江理工大学惠赠;产酱香芽孢杆菌B1⑥和E20、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)由贵州大学生命科学学院微生物学实验室保存,其他菌株均从茅台样品分离纯化所得。所用培养基配方参照文献[13],所用试剂和药品均为分析纯,所用小麦为市售普通小麦。

从茅台酒生产环节中选择28个采样时间点,无菌操作采集样品28份(样品采集地点、样品名称和编号见表1),每份采集3个,固态样品用无菌锡箔袋封装,水样用无菌瓶封装,立即放入保温盒内用冰袋维持0~4℃暂存,运至实验室后4℃保存。

表1 样品名称及编号

样品种类	编号	样品来源
水样	S1	赤水河水
	S2	五车间生产用水
原辅料	S3	旧稻草
	S4	谷壳
窖泥(制酒五车间)	S5	老窖泥
	S6	新窖泥
土壤	S7	老区土壤
空气(制酒五车间)	S8	五车间空气
	S9	母曲
酒曲(制曲一车间)	S10	成型曲坯
	S11	第一次翻仓
	S12	出仓新曲
	S13	成品黄曲
	S14	成品白曲
	S15	成品黑曲
高温堆积发酵醅(制酒五车间)	S16	收堆酒醅
	S17	入窖酒醅顶部
	S18	入窖酒醅中部
	S19	入窖酒醅底部
窖内发酵醅(制酒五车间)	S20	窖面(中央及四周)
	S21	表层窖泥
	S22	顶醅
	S23	中上醅
	S24	中醅
	S25	底醅
	S26	底部窖泥

1.2 常温菌、耐高温菌及大曲芽孢杆菌数量统计

各取10g样品与90mL无菌水于250mL三角瓶中混匀(120r/min,15min)制成 10^{-1} 菌悬液。取1mL菌悬液逐级稀释至 10^{-7} ,每个处理样品选3个梯度适量涂布

于牛肉膏蛋白胨琼脂平板,分别置于37℃和50℃下培养18~36h,每个平板做3个重复,选取平板中CFU在20~200范围的统计计算。另取样品S9~S13制成的 10^{-1} 菌悬液做热处理(80℃,20min),其他同前,37℃培养统计样品中形成芽孢细菌的数量。平板菌落计数后,挑取不同形态的单菌落,用无菌生理盐水适当稀释后划线纯化,4℃保存备用。

1.3 产酱香功能芽孢杆菌的筛选

高温制曲被认为是茅台酒酱香风格形成的重要工艺之一,高温制曲并不直接产酒,但此过程中微生物及其代谢物质对后序工艺乃至酒的香型起决定性作用。模拟大曲制作工艺,参照文献[5]所述采用蒸熟小麦粒(麦粒:麦粉各半,与等量水混合,浸泡过夜、蒸熟)作为大曲发酵培养基。30g大曲发酵培养基装入150mL三角瓶,灭菌(121℃,30min)备用。将从大曲中分离的芽孢杆菌活化后接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养18h(30℃,150r/min),按2%接种于大曲发酵培养基中,按照37℃→45℃→55℃依次调节培养箱温度,每个温度发酵48h,通过与产酱香菌株B1⑥和E20比对,从褐变、香气和粘性等方面做感官评定。

1.4 菌株的形态学和生理生化鉴定

形态学鉴定包括细胞形态、革兰氏染色和芽孢形态观察。生理生化实验参照文献[14]中芽孢杆菌属特征,选择酶生成(氧化酶、接触酶、淀粉酶、酪蛋白酶、酪氨酸酶),糖利用(D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露醇、L-阿拉伯),柠檬酸盐、丙酸盐;耐盐性(2%NaCl、10%NaCl);厌氧实验;生长温度实验(10℃、50℃和55℃);VP实验等试验项目。

1.5 菌株的分子生物学鉴定

分子鉴定参照文献[15]提取DNA,采用细菌通用gyrB(DNA促旋酶B亚基编码基因)扩增引物、反应条件及测序引物按照文献[16]所述,实验中增加B168作为对照。扩增产物经1%琼脂糖电泳分析,目的条带经PCR切胶纯化后由北京擎科双向测序。序列结果分别用NCBI在线工具Blast在GeneBank内与标准菌株比对,用ClustalX2^[17]和MEGA5.0^[18]并选择Kimura 2-parameter^[19]模型构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 常温菌、耐高温和芽孢杆菌的分离和计数

实地考察茅台制曲一车间和制酒五车间,采集样品28份,用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,采用平板菌落计数法分别统计25个样品中的常温菌、耐高温菌数量,结果见表2。

2.2 产酱香功能芽孢杆菌的筛选

常温细菌和耐高温细菌的数量统计结果表明,母曲

表2 常温细菌、耐高温细菌及大曲生产过程中芽孢杆菌数量统计结果 (CFU/g)

编号	30 °C菌落总数	50 °C菌落总数	芽孢杆菌总数
S1	7.0×10 ³	2.0×10 ³	
S2	9.3×10 ⁴	4.0×10 ⁴	
S3	3.6×10 ⁵	4.3×10 ⁵	
S4	ND	ND	
S5	1.0×10 ⁷	9.7×10 ⁶	
S6	ND	ND	
S7	2.5×10 ⁶	5.1×10 ⁵	
S8	1.0×10 ²	1.3×10 ²	
S9	9.0×10 ⁷	5.2×10 ⁷	2.9×10 ⁷
S10	2.6×10 ⁷	1.9×10 ⁷	5.1×10 ⁶
S11	8.5×10 ⁵	5.0×10 ⁵	3.5×10 ⁵
S12	2.2×10 ⁷	4.9×10 ⁶	1.0×10 ⁶
	1.4×10 ⁷	3.0×10 ⁶	
S13	1.3×10 ⁷	1.2×10 ⁷	8.9×10 ⁶
	1.5×10 ⁶	1.0×10 ⁶	
S14	6.1×10 ⁶	6.8×10 ⁶	
S15	6.4×10 ⁶	3.7×10 ⁶	
S16	9.0×10 ⁵	2.5×10 ⁶	
S17	6.6×10 ⁶	7.5×10 ⁶	
S18	3.8×10 ⁶	8.2×10 ⁶	
S19	1.4×10 ⁷	1.0×10 ⁷	
S20	3.5×10 ⁶	4.8×10 ⁶	
S21	1.2×10 ⁷	9.9×10 ⁶	
S22	1.1×10 ⁸	1.1×10 ⁷	
S23	7.1×10 ⁶	7.4×10 ⁶	
S24	4.8×10 ⁶	4.6×10 ⁶	
S25	2.1×10 ⁴	6.0×10 ⁵	

注: 空气样中对应菌落总数均数单位为: CFU/m³。

中常温细菌、耐高温细菌数量均最高, 重点选择来源于制曲过程中的4个不同时期的样品, 从高温大曲制作环节的原辅料及工作场地(母曲、刚成型的曲坯)和中间环节(第一次翻仓、出仓新曲、成品曲)中分离出形成芽孢的细菌104株, 采用模拟大曲发酵过程多次筛选产生茅台特征风味物质的优良菌株25株以及不产生任何香味的菌株2株, 见表3。

2.3 产酱香芽孢杆菌的形态学和生理生化鉴定

用B168、大肠杆菌作对照菌, 对筛选的25株产酱香功能芽孢杆菌以及2株不产香芽孢杆菌进行形态学观察和生理生化鉴定, 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[20], 初步鉴定为芽孢杆菌属, 部分菌株的鉴定结果见表4。

所有产酱香芽孢杆菌均能在50 °C条件下生长, 部分能在55 °C条件下生长, 同时产生大量酶类, 如淀粉酶、蛋白酶, 能将甘油转化为二羟丙酮, 分解多种糖产酸。根据V.P反应结果, 不产香的2株为V.P阴性, 而产酱香的25株均为V.P阳性; 根据文献^[21]分光光度计测定V.P反应液T_{540nm}的值, 对二乙酰和乙偶姻分别定量, 其中不产生酱香风味的2株V.P反应无颜色变化, 筛选出25株芽孢杆菌反应液颜色从淡红到深红色, 测定V.P反应液

表3 模拟大曲发酵环节中筛选出的菌株及细菌颜色和气味的感官评定

编号	菌株号	褐变	香气	粘性 (+/-)	综合评分
	S0901	黄褐色	酱香醇厚	-	10
	S0903	褐色	焦香气	-	10
S9	S0904	黑褐色、明亮光泽	酱香、麦香、奶香	-	10
	S0905	黄褐色、有光泽	酱香	+++	10
	S0909	黄色	酱香、偏酸味	-	10
S10	S1011	黄褐色、明亮光泽	酱香明显	-	10
	S1103	褐色	酱香	+++	10
S11	S1105	黄褐色、明亮光泽	酱香	+++	10
	S1202	黄褐色	酱香醇厚	-	10
	S1204	黑褐色、明亮光泽	酱香、麦香、奶香	-	10
	S1205	黄色、有光泽	酱油香气	++	9
	S1209	黑褐色、明亮光泽	酱香、麦香、奶香	-	10
	S1210	黑褐色、明亮光泽	酱香、麦香、奶香	-	10
S12	S1211	黄褐色、明亮光泽	酱香、奶香	+++	10
	S1213	黑褐色、明亮光泽	酱香、麦香、奶香	-	10
	S1216	黑褐色、明亮光泽	酱香醇厚、奶香	+++	10
	S1218	黄色	酱油香、仁香、醋香	+	10
	S1221	褐色	酱香醇厚	-	10
	S1223	黄色	酱香、略带焦香气	+++	9
	S1224	褐色	酱香纯正	-	9
	S1305	褐色	酱香	+++	10
	S1307	黄褐色、明亮光泽	酱香	+++	10
S13	S1318	褐色	氨味、酱香味	+++	10
	S1320	黄色	酱香	+++	10
	S1323	黄色、明亮光泽	酱香醇厚	+++	9
不产香	S1220	淡黄色	煮熟麦子的香味	-	2
	S0902	淡黄色	煮熟麦子的香味	-	2

注: 综合评分数是重复3次实验综合评价结果, 每次实验做2个重复, 并有3人参加评分。

表4 部分菌株形态学和生理生化实验结果

实验项目	菌株编号					
	S1011	S1202	S1305	S1307	S1320	B168
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+
芽孢圆形或柱形	+	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	-	-	+	+
厌氧生长	-	-	-	+	-	-
V.P反应	+	+	+	+	+	+
V.P培养终点pH值	6.1	5.6	5.4	5.4	5.7	5.7
50 °C	+	+	+	+	+	+
55 °C	-	-	-	+	+	+
pH5.7培养生长	+	+	+	+	+	+
生长NaCl(2~10%)	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+
D-木糖	+	+	+	+	+	+
D-甘露醇	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐	-	-	+	+	+	+
丙酸盐	-	-	-	+	-	-
生成二羟丙酮	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+
酪素(肌)水解	+	+	+	+	+	+
酪氨酸分解	-	-	-	-	-	-

T_{540nm} 值,见表5。推断二乙酰和乙偶姻是产生香味物质的前体之一。

表5 部分菌株 V.P 反应液 T_{540nm} 值

菌株号	V.P 反应 T_{540nm} 值	菌株号	V.P 反应 T_{540nm} 值
S0909	74.7	S1318	72.2
S1011	81	S1320	47.6
S1202	66.9	B168	94
S1204	69.8	S1205	43.6
S1216	67.7	S1211	53.5
S1301	40.9	S0902	100
S1305	57.8	S1220	100
S1307	82.6		

2.4 产酱香芽孢杆菌的分子生物学鉴定

提取的基因组 DNA 由 PCR 引物 UP-1:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCNGGNGGNAARTTYGA-3' 和 UP-2r:5'-AGCAGGGTACGGATGTGC-GAGCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT-3' 扩增后电泳分析,见图1。

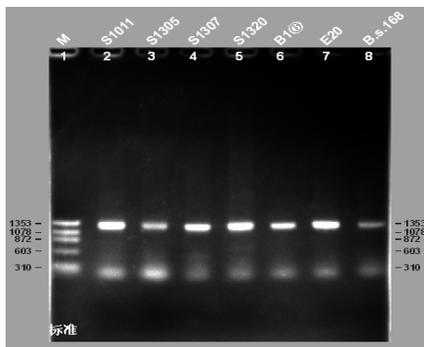


图1 部分菌株 *gyrB* 基因 PCR 电泳结果

采用测序引物 Up-1s:5'-GAAGTCATCATGAC-CGTTCTGCA-3';UP-2rs:5'-AGCAGGGTACGGATGT-GCGAGCC-3' 双向测序,同时以 B168 作对照,其中 B168 与 Gene Bank *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* (AL009126.3) DNA gyrase (subunit B) 的序列相似度为 100%,说明测序准确可靠。从构建的系统发育树(图2)可看出, E_{20} 和 S1320 为枯草芽孢杆菌,S1011 为解淀粉芽孢杆菌,S1307 为地衣芽孢杆菌,S1305 为 *Bacillus velezensis*。

3 讨论

3.1 高温对芽孢杆菌的作用

根据表1中涉及制曲环节的5个样品统计结果可以看出,制曲过程中母曲的种群数量最多,但芽孢杆菌所占比例较小,在翻仓曲中比例大大增加,成品曲时芽孢杆菌的数量约为原来的2倍(图3)。因此,经过高温制曲工艺对芽孢杆菌的筛选作用,有助于在成品曲中富集芽孢杆菌,同时,在高温下芽孢杆菌也会直接产香或产生各种香

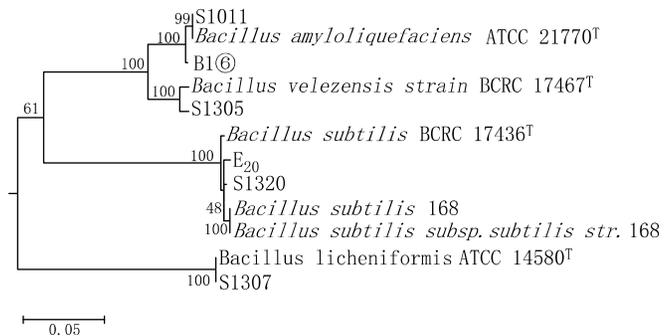


图2 部分菌株 *gyrB* 基因构建系统发育树

味前体物质。

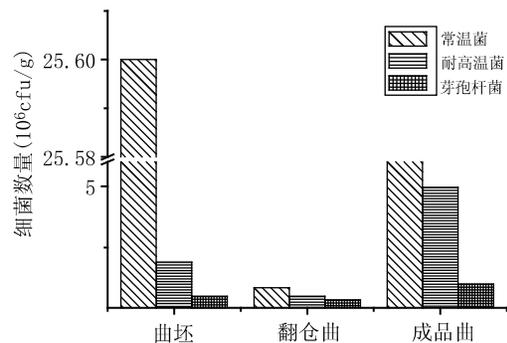


图3 制曲过程中常温菌、耐高温菌和芽孢杆菌数量比较

曲为酒之“母”,在酿酒过程中制曲是关键性的操作步骤之一,直接影响后序工艺——高温堆积。茅台酒的堆积工艺不仅是通过富集网罗空气中的微生物而利于发酵,同时对生成香味物质亦有贡献,其发酵工艺较为特殊,原料(高粱)称之为“沙”。用曲量大,是其他白酒的4~5倍。在高温堆积工艺中,通常要经过蒸酒(或蒸粮)、摊晾、泼凉水、添加曲料等环节,在每次添加新的曲料之前,大部分微生物已经死亡,因此,曲料内和制酒车间空气中的微生物构成了堆积发酵过程中微生物的主要来源。由于大量用曲,多次用曲,曲料中富集的芽孢杆菌得到了进一步繁衍,其数量和对发酵的影响要远比空气微生物大。

3.2 芽孢杆菌产酱香的验证

高温是酱香型白酒与其他香型白酒工艺的主要区别,因而对芽孢杆菌的代谢也有重要影响。在大曲模拟实验中,通过添加淀粉酶和蛋白酶实验,控制温度、pH 值等探讨高温条件下芽孢杆菌代谢与产生特征香味的关系。选择 V.P 阳性菌株嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 作对照菌,挑选3株产酱香芽孢杆菌 S1011、S1307、S1320 作实验菌种。空白对照组为未接种的大曲发酵培养基,其他实验组按2%接种量分别接入4株菌,所用大曲发酵培养基按30 g/150 mL 三角瓶配制,结果见表6。

实验结果表明,用3株产酱香芽孢杆菌和嗜热链球

表6 不同培养处理细菌曲颜色和香气的感官评定

项目	大曲发酵培养基(30 g/150 mL 三角瓶)	菌株			
		S1011	S1307	S1320	嗜热链球菌
空白	37 °C, 发酵 6 d	2	2	2	2
对照	55 °C, 发酵 6 d	2	2	2	2
酶	α 淀粉酶和中性蛋白酶处理后, 于 37 °C、45 °C、55 °C, 每个温度发酵 2 d	ND	ND	ND	4
	37 °C 发酵 2 d 后灭菌, 45 °C、55 °C 每个温度发酵 2 d	5	5	5	ND
温度	37 °C, 发酵 6 d	4	4	4	ND
	55 °C, 发酵 6 d	3	3	3	ND
pH 值	37 °C、45 °C、55 °C, 每个温度发酵 2 d	10	10	10	ND
	37 °C、45 °C、55 °C, 2 d 后测定	6.1	5.4	5.7	ND

注: 综合评分数是重复 3 次实验综合评价结果, 每次实验做 2 个重复, 以曲色及曲香为评定依据, 并有 3 人参加评分。ND 表示未测试。

菌模拟大曲纯种发酵试验中, 不接菌发酵大曲培养基的两个空白对照组没有褐变和生香, 排除了单纯热发酵诱导产香的可能。实验组 55 °C 高温发酵也不能产香, 实际上在 55 °C 时, S1011 生长停滞, 而 S1307 和 S1320 生长受抑制。低温 37 °C 发酵大曲则表现为菌体大量繁殖, 但褐变很弱, 生香也很淡; 而梯度升温发酵则表现为: 褐变逐渐加深, 酱香味愈来愈浓。进一步以这 3 株产酱香菌种混合发酵制成的曲料做母曲, 同时用茅台大曲作对照, 分别升温发酵培养, 得到的大曲在褐变程度和香味上与后者相似, 并且比纯种发酵的香味更复杂, 这进一步说明筛选的产酱香芽孢杆菌在高温制曲工艺中的确发挥了重要作用。

由于乙偶姻、二乙酰是产生香味物质如四甲基吡嗪的重要前体, 虽然嗜热链球菌也可产生二乙酰, 但实验用 α 淀粉酶和中性蛋白酶处理过的大曲发酵培养基发酵产生的香味却很淡, 说明由二乙酰在高温下生成的香味可能只是茅台香味的一部分, 不能根据是否产生二乙酰就断定产生酱香。

3.3 美拉德反应与“四高一长”

茅台酒的制酒工艺不仅是富集网罗空气中的微生物利于发酵, 其高温堆积和窖内发酵的特点对于生成香味物质亦有贡献。从已分离的产酱香功能细菌——枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌——均能产生大量的酶类, 如淀粉酶、蛋白酶、生成二羟丙酮等, 再加上以高粱为发酵基质的堆积工艺, 必然产生大量的香味物质或前体物质。与 B1⑥相比较, 筛选的 25 株产酱香芽孢杆菌在蛋白酶和淀粉酶产生能力上也很强, 而这为高温制曲和高温堆积中发生美拉德反应产香提供了很好的条件。美拉德反应产生的挥发性物质可分为 3 类: ① 由单糖脱水形成的: 呋喃(如羟甲基糠醛)、吡喃酮(如麦芽酚)、醛酮类(如甲基环戊烯醇酮)、羰基化合物(如二乙酰)、酸(如乙酸); ② 相应氨基酸降解生成的: 多种 α -酮酸、多种醛类、多种醇类以及羧酸类和其他; ③ 糖与氨基酸之间生成的: 吡咯、吡啶类、咪唑类、吡嗪类、噻唑类等^[22]。而据杨帆^[8]检测 3 株芽孢杆菌发酵曲中代谢产物有: 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, 推测产酱香芽孢杆菌在发酵过程中产生了大量与美拉德反应相关的耐高温酶类, 这些酶促进了美拉德反应生成各种复合香, 最终形成特有的酱香。影响美拉德反应路径的关键条件就是 pH 值^[23], 测定发酵过程中的 pH 值均偏酸性, 而这种条件下更有利于糖氨缩合以及阿玛多利重排反应, 生成较多风味物质^[22], 如醛、吡嗪类。其他影响美拉德反应的因素还有温度、水活度、高压、胺类及氨基酸等因素^[24]。而温度控制似乎对于茅台工艺而言更重要, 虽然提高温度更有利反应, 但温度过高, 可能导致芽孢杆菌代谢所产生的酶活性降低, 从而过多的产生焦糖化反应, 影响酱香的整体风味, 这样要求酱香型白酒需要长期发酵, 这大概就是形成“四高一长”独特工艺的原因。

因此, 酱香风味的形成必须先有芽孢杆菌的代谢产生的物质, 如水解蛋白产生的多肽和氨基酸、水解多糖产生的大量还原糖、以及大量的酮类、有机酸等, 这些物质就可能在相对温和的条件(堆积发酵温度 45~48 °C)下由相应的酶催化生成二羰基化合物^[25], 比如二乙酰, 而 V. P 反应阳性说明的确产生了二乙酰, 然后这些物质在酸性条件下可能发生类似还原糖或氨基酸与二羰基化合物的反应生成多种香味物质^[22]。根据文献报道^[25-26], 半胱氨酸与二乙酰在 pH 3.5, 25 °C 条件下反应 8 d 后能生成含量高达 8673 $\mu\text{g/L}$ 的四甲基吡嗪, 而在大曲发酵和高温堆积条件下, 这种机制也完全有可能发生。另外, 不同的菌株在相同条件下产酱香风味有差异, 推测不同菌株之间基因的差异是导致代谢的深层次原因。

实地考察高温大曲制作过程以及对一个大生产周期中微生物数量的统计分析, 得出如下结论: ① 从生态因子角度分析, 制曲过程受严格的人工控制, 比如: 高温可以到达 65 °C, 仓内堆积的平均温度在 50~53 °C; 湿度控制在 60%~70%; pH 值基本维持在偏酸性环境中, 维持长达一个月; ② 从微生物菌落的种群结构分析, 成品曲(黑曲、白曲和黄曲)中微生物基本上都是能长期耐受 50 °C

的细菌,真菌数量极少;③耐高温细菌数量在经历前期高温后数量从 10^7 降低到 10^5 水平,大量不耐热的细菌和真菌在这一过程被淘汰,而这些能耐受高温的细菌基本上确定为芽孢杆菌;④从制曲过程中代谢物质转变的角度分析,大曲中的芽孢杆菌产生大量的酶类将小麦分解成各种物质,而这些物质又在酸性或者中性环境下,经历长期的美拉德反应等复杂化学变化,最终生成各种香味物质;⑤已分离并筛选的与香味有关的芽孢杆菌在制曲过程中起主导作用,在模拟制曲模式实验中,添加不同的芽孢杆菌最终会产生不同的酱香香味,而这些香味构成了茅台的“复合香”。这些分离的产酱香芽孢菌株提供了一种可行的途径,即通过分析部分产酱香芽孢杆菌酱香生成机制从而阐明整个制曲过程中酱香风味物质是如何生成的。

采用从大曲中大量分离、筛选、鉴定产酱香的相关功能菌的方法,克服了单纯分子方法由于复杂样品的DNA提取不确定性和混合模板PCR扩增过程中特异性引物所引起的偏差^[27]。实验在筛选、分离的基础上对芽孢杆菌进行生理生化实验,可以更直接地反映菌株代谢差异性。产酱香菌株与不产酱香菌株在生理生化实验中表现出的差异,比如:产蛋白酶实验,产淀粉酶实验,V.P实验与产酱香关系的阐释,能更直接、更准确地说明茅台制曲过程中功能菌株的作用,同时也证明了美拉德反应这一重要过程在制曲过程中发挥着重要作用。不足的是,本实验建立在纯种发酵基础上,多菌株综合作用及相互影响还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 崔利,彭追远,杨大金.酱香型白酒的主香成分是什么?对酱香型酒主香成分的几种主要说法的浅见(下)[J].酿酒,1990(2):11-14.
- [2] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(二) 酱香·茅台篇[J].酿酒科技,2005(4):33-35.
- [3] 蒙琚,肖杰.珍酒:三十年前茅台人创造的另一个奇迹——揭秘“易地茅台”背后不为人知的秘密[J].当代贵州,2010(20):78-79.
- [4] 方心芳.祝《酿酒》成功 兼谈高温酒曲[J].酿酒,1982(3):6-7.
- [5] 谢和,赵维娜.几株产酱香细菌的分离和鉴定[J].贵州农学院学报,1992,11(1):80-84.
- [6] 周恒刚.高温大曲酸性蛋白酶高的原因何在[J].酿酒科技,1996(3):14-17.
- [7] 王和玉,杨帆,林琳,等.地衣芽孢杆菌固态发酵代谢产物分析[J].酿酒科技,2011(9):32-34.
- [8] 杨帆,林琳,王和玉,等.茅台大曲中3株芽孢杆菌代谢产物的比对分析[J].酿酒科技,2011(8):42-43.
- [9] 余晓,尹建军,胡国栋.白酒中含氮化合物的分析研究[J].酿酒,1992(1):71-76.
- [10] Z. Xiao, Ma, C., Xu, P., Lu, J. R. Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium[J]. PLoS One, 2009, 4(5): 5627.
- [11] W. L. Nicholson. The *Bacillus subtilis* ydjL (bdhA) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(22): 6832-6838.
- [12] T. Adachi, Kamiya, H., Kosuge, T. Studies on the metabolic products of *Bacillus subtilis*. 3. Relation between amino acids and tetramethylpyrazine production[J]. Yakugaku Zasshi, 1964, (84): 543-545.
- [13] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007.
- [14] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:科学技术出版社,1986.
- [15] Kate Wilson. Preparation of Genomic DNA from Bacteria[M]. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [16] S. Yamamoto, Harayama, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [17] J. D. Thompson, Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] K. Tamura, Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [19] M. Kimura. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [20] D.H. Bergey, Boone, D.R. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Springer Verlag, 2009.
- [21] W. W. Westerfeld. A Colrimetric Determination of blood acetoin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1945, 161(2): 495-502.
- [22] H.E. Nursten. The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications[M]. Royal Society of Chemistry, 2005: 63.
- [23] J. E. Hodge. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems[J]. J Agric Food Chem, 1953, 1(15): 928-943.
- [24] Sara I. F. S. Martins, Jongen, Wim M. F., Van Boekel, Martinus A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling[J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11(9-10): 364-373.
- [25] S. Marchand, De Revel, G., Vercauteren, J., Bertrand, A. Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(21): 6160-6164.
- [26] Laura Pripis-Nicolau, De Revel, Gilles, Bertrand, Alain, Maujean, Alain. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(9): 3761-3766.
- [27] Erwin G. Zoetendal and Roderick I. Mackie. Molecular method in Microbial ecology[M]. Tannock, G.W. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. Dunedin, New Zealand: Caister Academic Press, 2005.