

# 地衣芽孢杆菌固态发酵代谢产物分析

王和玉 杨帆 林琳 王莉 杨代永 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1株细菌 MTDB-02, 经16S rDNA 测序比对, 最终将 MTDB-02 定性为地衣芽孢杆菌。将该菌在制曲工艺、堆积工艺以及兼性条件下分别进行纯种固态发酵, 利用 GC-MS 对其代谢物进行检测解析。结果表明, 该菌纯种固态发酵能代谢产生70多种物质。这些物质中有多种是食品中的风味物质和风味前体物质, 亦是茅台酒呈香呈味物质中的一个组成部分。

**关键词:** 微生物; 地衣芽孢杆菌; 固态发酵; 代谢产物; 茅台酒风味

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.33 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2011)09-0032-03

## Analysis of the Metabolites of *Bacillus licheniformis* by Solid Fermentation

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

(Technology Center of Moutai Co.Ltd, Renhuai, Guizhou 564501, China)

**Abstract:** MTDB-02, was easily isolated from the production environment of Moutai Liquor. MTDB-02 was identified as *Bacillus licheniformis* by 16S rDNA identification. Then pure solid fermentation of MTDB-02 was carried out under starter-making conditions, stacking conditions, and facultative conditions respectively and GC-MS was applied to analyze its metabolites. The results showed that MTDB-02 could produce more than 70 metabolites by pure solid fermentation. Most of these metabolites were flavoring compounds and flavoring precursors for food, and also an integral part of aroma-producing & flavoring-producing substances in Maotai Liquor.

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

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是一种在茅台酒生产环境中极易分离得到的细菌,且数量较大<sup>[1]</sup>。它被认为是茅台酒酿造微生物种群中的优势菌之一<sup>[2]</sup>,积极参与了茅台酒的酿造过程。在茅台酒酿造过程中,制曲与制酒阶段是微生物代谢活动最为活跃的两个时期,微生物在此期间大量繁殖并代谢多种物质,这些代谢产物就是茅台酒的风味物质或风味前体物质。本文以1株从茅台酒生产环境中分离纯化得到的地衣芽孢杆菌为研究对象,选用茅台酒生产过程中两个特色工艺——制曲工艺和堆积工艺为培养条件进行纯种固态发酵。此外,还以高粱与小麦混合培养基,在兼性条件下进行纯种固态发酵。考察地衣芽孢杆菌在上述条件下所产代谢物,探索该菌在茅台酒酿造过程中对茅台酒风味的贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

地衣芽孢杆菌 MTDB-02。

### 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,pH7.0,121 °C 灭

菌 20 min。

小麦培养基:茅台酒制曲用小麦,121 °C 灭菌 20 min。

高粱培养基:茅台酒制酒用高粱,121 °C 灭菌 120 min。

液态培养富集后分别接入小麦培养基和高粱培养基,并分别按制曲工艺和堆积工艺培养,培养时间与制曲周期、堆积周期同步。

液态培养富集后接入小麦培养基,37 °C 培养 2 d,再接入高粱培养基,按堆积工艺培养,培养时间与酒糟堆积时间同步,堆积培养结束后接入窖工艺条件培养与酒糟窖内发酵时间同步。

### 1.3 菌种鉴定

#### 1.3.1 基因组提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增

取新鲜培养的细菌,9000×g 离心 5 min,收集沉淀;重悬于 1 mL buffer Z。混匀后,转移到加有 0.3 g 玻璃珠(直径 0.1 mm)的螺帽管中,加入 150 μL 苯酚,Beadbeater 细胞破碎仪以最大速度击打 4 min。然后,加入 110 μL 10% SDS,轻轻混匀,冰浴 10 min,每 5 min 轻轻颠倒摇匀。加入 150 μL 氯仿:异戊醇(24:1)溶液,轻轻混匀,15000×g 离心 10 min,收集上清液,加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠。15000×g 离心 10 min,收集上清液。2 倍体积冰乙

醇-20℃沉淀,12000×g离心15min,弃上清液。将沉淀真空冷冻干燥后溶于30μL无菌水中,琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像。

引物:27F;5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'  
1492R;5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

PCR反应条件:94℃、3min;94℃、30s,55℃、45s,72℃、2min,34个循环;72℃、10min。

采用1%琼脂糖凝胶对PCR产物电泳检测。

### 1.3.2 16S rDNA 测序及比对

将PCR产物送交上海生工测序,测序获得的16S rDNA序列运用DNASTar剪切拼接,所得DNA序列在www.ncbi.nlm.nih.gov中运用BLAST软件进行同源性分析,初步判断MTDB-02的分类学地位。

### 1.4 分析仪器

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

### 1.5 提取方法<sup>[3]</sup>

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。

### 1.6 GC-MS分析条件

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

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

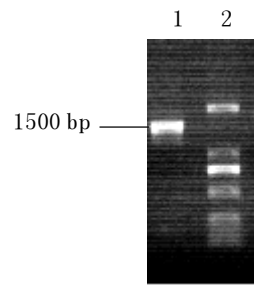
物质定性分析:将未知物质谱图与NIST 08a.L Database(Agilent Technologies Inc.)中标准谱图进行比对定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定

以菌株MTDB-02基因组DNA为模板,PCR产物电泳鉴定结果见图1。

由图1可知,泳道1为菌株MTDB-02的16S rDNA扩增产物,扩增出保守序列片段长度为1.5kb,与报道的16S rDNA分子量一致,确认以上片段即为所需的片段,将扩增产物送交上海生工测序。测序获得菌株MTDB-02的16S rDNA序列长度为1350bp,通过与美国国立生物技术信息中心中的菌种信息进行比对,菌株MTDB-02的16S rDNA与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheni-*



1.菌株MTDB-02 16S rDNA PCR产物;2.DL-2000分子量标准

图1 16S rDNA PCR扩增产物电泳图

*formis*)的16S rDNA序列碱基排序的相似性为100%,认为MTDB-02为地衣芽孢杆菌。

### 2.2 MTDB-02利用小麦培养基控制曲工艺发酵分析代谢产物

将未接菌株MTDB-02的小麦固态培养基控制曲工艺发酵,作为空白对照。将固态发酵结束后的空白样按1.5方法提取浓缩进样分析,结果见图2。

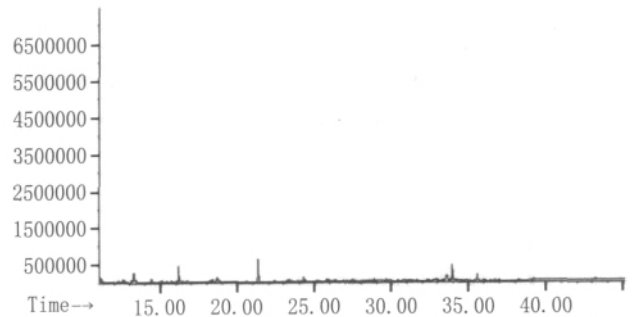
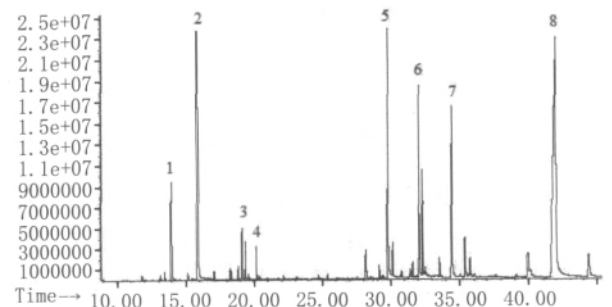


图2 小麦空白培养基物质分析总离子流图

将培养后菌株MTDB-02的液态培养基接入小麦培养基控制曲工艺培养。将培养后的样品提取浓缩进样分析,其结果见图3。



1.2-甲基丙酸;2.3-甲基丁酸;3.2-甲基-2-丁烯酸;4.苯乙醇;5.苯乙酸;6.十五烷酸;7.软脂酸;8.亚油酸

图3 地衣芽孢杆菌MTDB-02代谢产物分析总离子流图

对比图2、图3可知,地衣芽孢杆菌MTDB-02代谢产物有酸、酯、醇、酮、吡嗪类及芳香族化合物等共70多种。其中含量较高的有:2-甲基丙酸,3-甲基丁酸,2-甲基-2-丁烯酸,苯乙醇,苯乙酸,十五烷酸,软脂酸,亚油酸,以上8种物质是该菌在制曲工艺条件下,纯种固态发

醇的主要代谢产物。推断地衣芽孢杆菌是茅台酒中这8种风味物质的主要产生菌株之一。将气相色谱闻香法与气质联用技术结合,可评估该菌的其他相对较低产量的代谢产物对茅台酒的风味贡献,以进行更深入的研究。

### 2.3 MTDB-02 利用高粱培养基按堆积工艺发酵产代谢产物分析

将未接种 MTDB-02 菌液的固态高粱培养基按堆积工艺培养,作为空白对照。对其发酵醅进行提取浓缩进样分析,其结果见图 4。

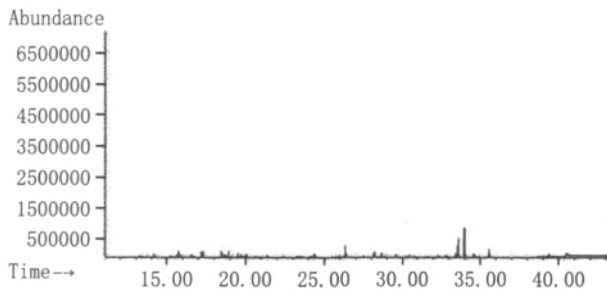
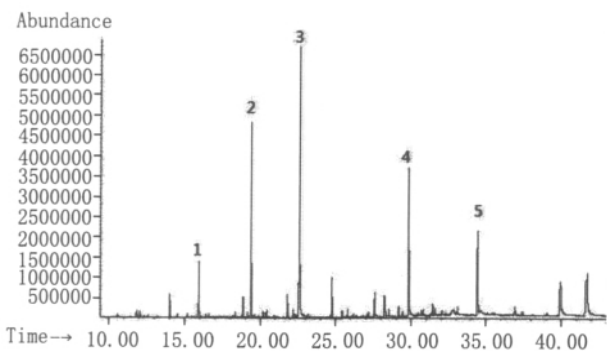


图4 高粱按堆积工艺发酵产风味物质分析总离子流图

将培养后的 MTDB-02 菌液接种入固态高粱培养基中,按堆积工艺培养发酵。对发酵醅进行提取浓缩进样分析,其结果见图 5。



1. 3-甲基丁酸;2. 2-甲氧基-苯酚;3. 未定性的呋喃酮类或吡喃酮类;4. 苯乙酸;5. 软脂酸

图5 MTDB-02 按堆积工艺发酵产代谢产物分析总离子流图

对比图 4、图 5 可知,地衣芽孢杆菌 MTDB-02 代谢产物有 40 余种。其中含量较高的有:3-甲基丁酸,2-甲氧基-苯酚,苯乙酸,软脂酸以及一种尚未定性的呋喃酮类或吡喃酮类物质,这 5 种物质是该菌在堆积工艺条件下,纯种固态发酵的主要代谢产物。推断地衣芽孢杆菌 MTDB-02 是茅台酒中这 5 种物质的主要产生菌之一。其中尚未定性的呋喃酮类或吡喃酮类在茅台酒中亦被检出,且枯草芽孢杆菌 MTDB-03 与地衣芽孢杆菌 MTDB-01 所产主要代谢产物中并未发现该物质<sup>[3]</sup>,就目前研究结果表明,该地衣芽孢杆菌 MTDB-02 是茅台酒中该物质的主要产生菌株。对比图 3、图 5 发现,地衣芽孢杆菌 MTDB-02 以小麦为培养基在制曲工艺条件下,所

产代谢物中未发现这个尚未定性的呋喃酮类或吡喃酮类物质,也可推断该物质是该菌以高粱为培养基所产生的特有代谢产物。

### 2.4 MTDB-02 利用混合培养基在兼性条件下产代谢产物分析

将未接种 MTDB-02 的固态混合培养基按 1.2 方法培养,作为空白对照。将发酵结束醅按 1.5 方法提取浓缩进样分析,结果见图 6。

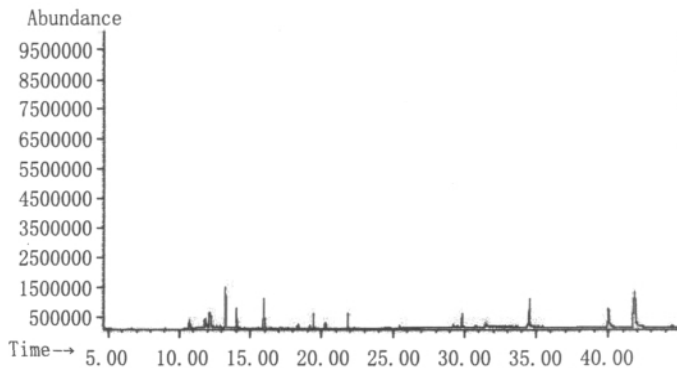


图6 混合基质入窖培养空白样分析总离子流图

将培养的 MTDB-02 菌液接入固态混合培养基,在兼性条件下培养。将发酵结束后样品醅按 1.5 方法提取浓缩进样分析,结果见图 7。

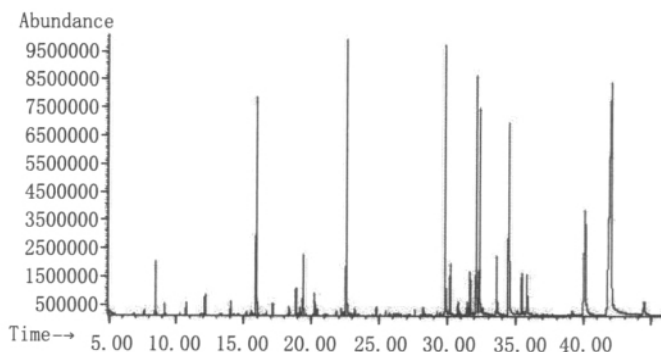


图7 MTDB-02 利用混合基质发酵样品总离子流图

对比图 6、图 7 可知,地衣芽孢杆菌 MTDB-02 代谢产物有 70 余种。在这几类物质中含量较高的有:3-甲基丁酸,2-甲基-2-丁烯酸,2-甲氧基-苯酚, $\beta$ -苯乙醇,苯乙酸,十五烷酸,软脂酸,亚油酸以及一种尚未定性呋喃酮类或吡喃酮类物质,将这 9 种物质看作该菌在兼性条件下的主要代谢产物。将图 7 与图 5、图 3 对比发现,地衣芽孢杆菌 MTDB-02 利用混合培养基,在兼性条件下发酵产代谢物的种类,涵盖了该菌在制曲工艺与堆积工艺下所产代谢物的种类。

## 3 结论

通过采用不同培养基与培养条件,对地衣芽孢杆菌 MTDB-02 进行纯种固态发酵所得代谢产物进行分析,

(下转第 37 页)

表3 青稞清酒理化指标分析

| 酒精度<br>(%vol) | 固形物<br>(%) | 总酸<br>(g/100 mL) | 残糖<br>(g/100 mL) | 氨基酸<br>(g/100 mL) |
|---------------|------------|------------------|------------------|-------------------|
| 15.8          | 2.4        | 0.26             | 1.4              | 0.032             |

表4 青稞清酒得率和出糟率

| 投麦<br>(kg) | 清酒得率<br>(%) | 出酒量<br>(kg) | 出糟率<br>(%) | 出糟量<br>(kg) | 糟粕水分<br>(%) |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 80         | 176         | 140.8       | 32         | 25.6        | 72.5        |

得 15.8 %vol 青稞清酒约 140.8 kg, 酒糟 25.6 kg, 出酒率 176 %, 出糟率达 32 %, 出酒率适中, 出糟率略高, 可能是青稞麦麸量较高所致。

表5 青稞清酒感官品评结果

| 项目 | 感官品评                   |
|----|------------------------|
| 口感 | 口味纯正, 绵柔爽口, 酸甜适度, 酒度适宜 |
| 滋味 | 酒体丰满, 风味独特             |
| 香气 | 具有青稞甜醇香和醇香             |
| 色泽 | 清澈透明, 淡黄色              |

通过现代生产工艺酿造的青稞清酒, 酒液透明, 酸甜爽口, 醇厚优雅, 酒度适宜, 以酸、甜、苦、涩、辣等口味均衡调和为特色, 为地方经济发展提供一个经济增长的新

(上接第 34 页)

发现该菌的代谢产物中含有多种食品中的风味物质及其前体物质。其主要代谢产物有: 2-甲基丙酸, 3-甲基丁酸, 2-甲基-2-丁烯酸, 苯乙醇, 苯乙酸, 十五烷酸, 软脂酸, 亚油酸, 2-甲氧基-苯酚以及一种尚未定性的呋喃酮类或吡喃酮类物质。尚未定性的呋喃酮类或吡喃酮类物质, 是该菌以高粱为培养基所产生的特有代谢产物。这些主要代谢产物中有一些物质是茅台酒的色谱骨架成分。值得关注的低浓度代谢产物有: 乙偶姻, 二甲基吡嗪, 三甲基吡嗪, 四甲基吡嗪, 呋喃扭尔等, 这些物质与酱香味相关。其中吡嗪类物质除了呈现坚果香气外, 还具有生理活性, 是某些药物的主要成分<sup>[4-5]</sup>。对地衣芽孢杆菌 MTDB-02 固态发酵代谢产物的分析, 初步明确该菌在

品种。

### 3 结论

3.1 生产青稞清酒选用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 2146 或 3800 为糖化剂, 酒母选用清酒酵母 (*sake yeast*) 1296, 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 2146 或 3800 具有发酵速度快、残糖少、出酒率高、出糟率相对较低, 而且酒的口感好, 可以降低生产成本, 提高酒的质量等优点。

3.2 采用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 2146 或 3800 为糖化剂进行边糖化边发酵的复式发酵法, 在发酵中采取多次投料, 可显著提高糖化效果。

3.3 青稞清酒的出酒率平均为 176 %, 通过更新滤酒设备, 可以保证出酒率进一步提高, 并能获得稳定的品质。

### 参考文献:

- [1] 滕晓天. 醇香的青稞醪馏酒[J]. 中国土族, 2010, 27(2): 27.
- [2] 汪建国. 日本清酒与我国喂饭黄酒酿造工艺初探[J]. 浙江食品工业, 1993(1): 31-35.
- [3] 李兰. 干甜糯米清酒的研制[J]. 酿酒, 2000(2): 107-109.
- [4] 焦迎春, 郑晓冬. 浅析影响青稞清酒非生物稳定性的因素及预防[J]. 酿酒, 2002(5): 49-50.

茅台酒酿造过程中对茅台酒风味的贡献, 是酱香型白酒风味物质的形成与微生物关系理论的重要组成部分, 为酱香型白酒工业的发展提供了理论支持。

### 参考文献:

- [1] 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.
- [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] 王和玉, 杨帆, 姚翠萍, 等. 枯草芽孢杆菌利用不同基质所产代谢物的分析对比[J]. 酿酒科技, 2009(12): 93-95.
- [4] 肖旭辉. 抗菌药伦氨苄西林盐酸盐合成[J]. 精细化工中间体, 2004(6): 35-36.
- [5] 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.

## 山东济宁任城酒厂

高级浓香调味酒

专业生产: 芝麻香调味酒 及优质基础酒

五粮调味酒

地 址: 山东省济宁市任城区长沟镇工业园 1 号

电 话: (0537)2588199 手 机: 13793772185