

汾酒大曲中高产四甲基吡嗪菌株的筛选与鉴定

Screening and identification of strains for tetramethyl pyrazine producing from Daqu for light fragrant Chinese-liquor making

李晓霞 李晶晶 张秀红

LI Xiao-xia LI Jing-jing ZHANG Xiu-hong

(山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004)

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China)

摘要:从汾酒大曲中分离出 15 株可以产生 TTMP 的芽孢杆菌。通过观察菌落形态的基本特征和细胞的显微形态图对其进行纯种确认,采用气相色谱法筛选出 3 株高产 TTMP 的芽孢杆菌,并利用 16S rDNA 序列测定法进行菌种鉴定,得出 3 株高产 TTMP 的芽孢杆菌中 2 株为枯草芽孢杆菌、1 株为弯曲芽孢杆菌,该结果增加了 TTMP 高产菌株的类型范围,为 TTMP 的生产实践应用提供了依据。

关键词:汾酒;四甲基吡嗪;气相色谱;16S rDNA;筛选

Abstracts: Total 15 strains of *Bacillus* were isolated from Daqu for light fragrant Chinese liquor brewing. Their micro-morphology and clone characterize were observed. Three strains with higher TTMP yield were selected by gas chromatography, and identified as two *Bacillus subtilis* and one *Bacillus flexus*, and numbered as B76, B83 and B64, respectively, by molecular method. It broadens the strains for TTMP producing, laid a foundation for TTMP practical application in the future.

Keywords: Fen jiu; TTMP; GC; 16S rDNA; screening

近年来,人们的饮酒日趋理性,对白酒的安全健康功效更加关注,也刺激学术及企业界对白酒健康功能的研究^[1-2]。以茅台、剑南春等为代表的白酒企业对白酒与人类的健康状况的关系进行了研究,发现长期适量饮用白酒可以增强免疫系统,降低血脂,扩张血管,减轻动脉硬化,改善微循环等^[3]。通过对白酒成分的分析可知白酒中的主要成分是水 and 乙醇,约占总量的 98% 左右,其余的微量成分约占

2%,包括有机酸、酯类、醛类、吡嗪类、醇类、酚类及其它芳香族化合物。白酒中的微量成分虽然含量极少却决定着酒的香气、口味和风格^[4]。其中,四甲基吡嗪(TTMP)多年来受到人们的广泛关注,该物质在制曲、堆积发酵等过程均会在不同程度上有所产生,并通过蒸馏作用进入白酒中,在中国主要白酒种类中有很高的含量,是一种对人体健康有益的香味物质。目前关于白酒中 TTMP 的相关研究,已成为研究白酒对人体健康作用的重要方向^[5-7]。

TTMP 广泛存在于采用高温曲发酵的白酒中(酱香、芝麻香型白酒),且呈现焙烤的香味^[8]。当前学术界认为 TTMP 的产生方式有两种:第一种是通过糖和氨基酸发生美拉德反应^[9];第二种则是通过微生物合成,主要分为两步:① 芽孢杆菌利用底物合成 TTMP 的前体 3-羟基丁酮;② 3-羟基丁酮与氨反应生成 TTMP^[10]。学者^[11]研究证实中国白酒中的 TTMP 不是纯粹地由美拉德反应生成,而是功能菌株降解产生 pyruvic acid,两分子的 pyruvic acid 经过缩合反应生成 α -乙酰乳酸, α -乙酰乳酸发生脱羧反应产生 3-羟基丁酮,3-羟基丁酮和氨(主要由氨基酸转化而来的)再经过美拉德反应生成 TTMP。Clare 等^[12]阐述了微生物利用生长过程中产生的 3-羟基丁酮与外加的铵盐反应可以提高代谢产物中四甲基吡嗪的含量。

从目前市场看,浓香、酱香等香型白酒都检出一定浓度的 TTMP,清香型白酒中 TTMP 则比较低。作为主要香型之一的清香型白酒,在改善风味的同时,也需要增加健康因子。目前对白酒中 TTMP 的研究大多集中在酱香型和浓香型白酒中,而对于清香型白酒中 TTMP 的研究相对较少,且如何进一步提高 TTMP 的产量还未见报道。本研究通过增加清香型汾酒大曲中有益菌种的含量来进一步提高清香型汾酒中 TTMP 的产量,增加汾酒保健功能。本研究拟从清香型汾酒大曲中分离纯化芽孢杆菌,采用气相色谱法筛选出高产 TTMP 的芽孢杆菌,通过显微观察其菌落形态和细胞形态,并利用 16S rDNA 测定同源性,对高产 TTMP 的芽孢

基金项目:山西省自然科学基金(编号:2012011034-5);山西省高等学校科技创新项目(编号:2013122);国家级大学生创新项目(编号:201410118003);山西省大学生创新项目(编号:2014153);山西师范大学创新项目(编号:SD2014CXXM-02)

作者简介:李晓霞,女,山西师范大学在读硕士研究生。

通讯作者:张秀红(1970—),女,山西师范大学教授,博士。

E-mail:cwm_ming@163.com

收稿日期:2015-10-22

杆菌进行鉴定,旨在为菌株的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

3 种不同类型的清香大曲:山西汾酒厂股份有限公司;
正己烷、磷酸氢二铵:分析纯,天津市光复科技发展有限公司;
无水硫酸钠:分析纯,天津市光复科技发展有限公司;
DNA 凝胶回收试剂盒:上海桑尼生物科技有限公司;
TaqDNA 聚合酶:0.5 U/g,上海桑尼生物科技有限公司;
培养基:牛肉膏蛋白胨培养基,发酵培养基;葡萄糖 30 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,磷酸二氢钾 4 g,加水到 1 000 mL。

1.2 仪器

气相色谱仪:GC-2010 型,配有 FID 检测器,台州市盛凯计量仪器有限公司;
PCR 仪:9700 型,郑州南北仪器设备有限公司;
离心机:AXTG16G 型,上海赵迪生物科技有限公司;
电子天平:LQ-A6002 型,瑞安市安特称重设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大曲中芽孢杆菌的分离纯化 将大曲 5 g 加入 45 mL 蒸馏水煮沸后,取上清液,分别稀释 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,进行平板涂布,每个浓度对应 3 个平行,37 ℃ 下培养 2 d,观察菌落形态,将形态不同的单菌落挑出重新划线接至固体平板上 37 ℃ 下培养 2 d,多次重复,直至分离纯化得到单菌落,再进行镜检,确认得到的为不同的菌株且都为纯种,然后将菌种编号冷藏。

1.3.2 高产四甲基吡嗪的芽孢杆菌的筛选 将纯化的菌株接至牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37 ℃ 振荡培养,活化 15~18 h,后按 3% 的接种量接入 100 mL 的发酵培养基中,37 ℃ 下振荡培养 24 h;然后将发酵液直接蒸馏得到 20 mL 蒸馏液,用 5 mL 的正己烷萃取,步骤为:将蒸馏液倒入分液漏斗中,取 5 mL 的正己烷,轻轻振荡混匀,排出气体,静置 10 min,可明显看到分层,将下层液体从下方流出,上层液体从上方倒出,再将下方倒出的液体再次倒入分液漏斗中,重复上述步骤,则得到 10 mL 萃取液,然后用气相色谱仪测定其 TTMP 的含量。

1.3.3 菌株的显微观察 将筛选出的 3 株菌进行显微形态观察。

1.3.4 菌株的鉴定 利用 16S rDNA 法对上述 3 种菌株进行进一步鉴定。通过测定 DNA 序列得出同源性,当 16S rDNA 序列同源性高于 97% 时,可以认为是属内的同种。

1.3.5 TTMP 含量的测定 色谱柱:PEG20M(25 m×0.20 mm×0.33 μm);流动相:氮气;恒压模式:127.4 kPa;进样量:1 μL;分流比:20:1;进样器:230 ℃;检测器:300 ℃;程序升温:40 ℃ 保持 3 min,15 ℃/min 的速度升温至 200 ℃,保持 20 min。

2 结果与分析

2.1 大曲中四甲基吡嗪高产菌株的筛选

从汾酒大曲中共分离纯化得到 15 株芽孢杆菌,将这 15 株芽孢杆菌液态发酵正己烷萃取 TTMP 后,用气相色谱分析。在建立标准曲线之前先对样品及 TTMP 标品进行全波段扫描,确定其吸收对应波长,如图 1 所示,278 nm 处有典型吸收峰。确定 TTMP 检出波长为 278 nm。在此波长处,对各样品 TTMP 测定,结果见图 2,其中,菌株 B76、B83、B64 3 株菌的 TTMP 的含量最高超过 200 μg/mL,即通过初筛共得到 3 株高产四甲基吡嗪的芽孢杆菌,其 TTMP 的含量均远远大于酱香型白酒和浓香型白酒中的。

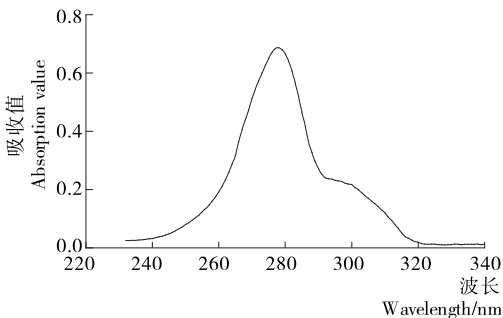


图 1 TTMP 不同波段扫描图

Figure 1 Spectrum scan of TTMP at different nanometre

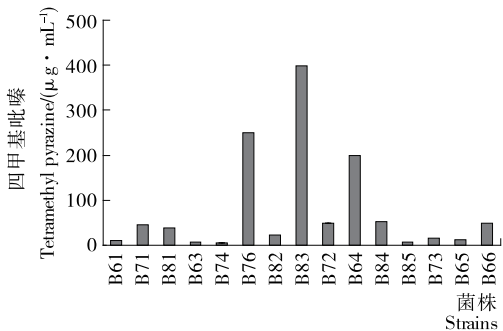


图 2 不同菌株 TTMP 产量

Figure 2 TTMP yield of different strains

2.2 菌落形态及细胞形态的显微观察

将 3 株菌接种到牛肉膏蛋白胨培养基中培养后,观察其显微及菌落特征,分别见图 3、4。由图 3 可知,B64 和 B83 的菌落特征较为相似,污白色,菌落大小为 3 mm 左右,圆形,边缘不整齐,不透明,干燥。B76 的菌落呈微黄色,略大一点,约 4 mm,圆形,边缘同样不整齐,略感湿润。由图 4 可知,B64 和 B83 比 B76 更早形成芽孢,菌体略为粗短,芽孢几乎为柱状;B76 菌体则稍细长一点,明显链状排列,因此,初步判断 B64 和 B83 更为相似。

2.3 菌株分子生物学鉴定

将 3 株高产 TTMP 的芽孢杆菌进行 16S rDNA 序列测定后,与 GenBank 数据库比对,挑选亲缘关系较近的菌株用 MEGA 软件制作进化树,见图 5。由图 5 可知,菌株 B64 和 B83 与几株枯草芽孢杆菌 16S rDNA 相似度高达 99% 以上,故可鉴定为 *Bacillus subtilis*。而菌株 B76 则与弯曲芽孢杆

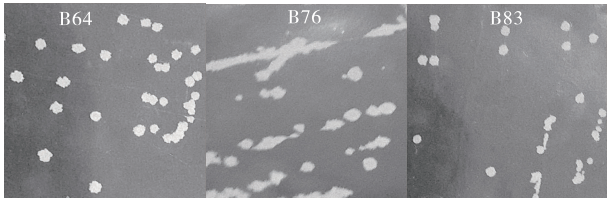


图 3 高产 TTMP 菌株的菌落形态

Figure 3 Colonial morphology of 3 strains *bacillus* with high TTMP producing

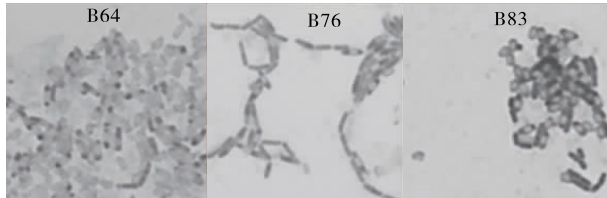


图 4 高产 TTMP 菌株的显微形态

Figure 4 Micro-morphology of 3 strains *bacillus* with high TTMP producing

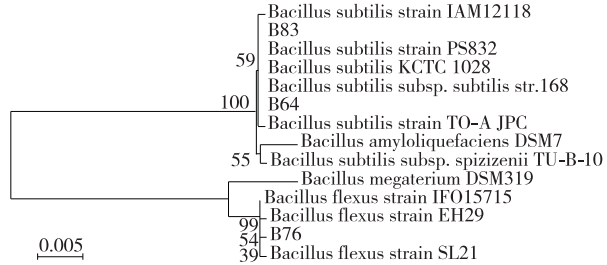


图 5 基于 16S rDNA 基因序列同源性构建的系统发生树

Figure 5 The phylogenesis tree based 16s rDNA gene sequences

菌更为接近,相似度达到了 97%,应属于 *Bacillus flexus*,而 B76 属于目前发现的新菌株,扩大了菌株种类,为后期研究提供基础。

3 结论

清香白酒由于使用低温大曲,清蒸二次清的工艺,使其成品酒中 TTMP 的浓度较低甚至检测不到。为了提高清香白酒的保健功能,本试验从清香大曲分离到高产 TTMP 的芽孢杆菌,清香大曲中来源的芽孢杆菌易适应清香白酒的酿

造环境而应用到实际生产中。与其它研究相比,高产 TTMP 的芽孢杆菌多为枯草芽孢杆菌,本试验也分离到 2 株枯草芽孢杆菌,同时,本试验还筛到 1 株弯曲芽孢杆菌,扩大了高产 TTMP 的菌种类型,为高产 TTMP 菌株的优化及实际应用提供优良的菌株。本试验的不足之处在于未将筛选得到的菌株进一步扩大培养,应用于实践生产,后期拟将分离筛选得到的 3 株芽孢杆菌制成芽孢杆菌制剂,先在实验室进行小型的模拟发酵试验,并同时在不影响汾酒生产其他环节的情况下初步应用于汾酒的实践生产中,检测成品酒中 TTMP 的含量,以进一步提高汾酒品质。

参考文献

[1] 黄发琳,王化斌. 谈中国白酒与健康的关系[J]. 酿酒, 2013(9): 14-19.

[2] 范文来,徐岩,黄永光. 白酒对健康有益还是有害[J]. 酿酒科技, 2014(11): 1-5.

[3] 沈怡方. 白酒中四大乙酯在酿造发酵中形成的探讨[J]. 酿酒科技, 2003(5): 28-31.

[4] 吴建峰. 中国白酒中健康功能性成分四甲基吡嗪的研究综述[J]. 酿酒, 2006(33): 13-16.

[5] 张温清,王永军,饶志明,等. 宣酒芝麻香型白酒中吡嗪类健康功能因子的分析研究[J]. 酿酒科技, 2014(8): 37-42.

[6] 吴志刚. 川芎嗪的药理学进展[J]. 武汉华工学院学报, 2003(1): 29-33.

[7] 任学坤,殷微微,徐文平. 气相色谱法测定白酒功能性成分四甲基吡嗪[J]. 酿酒科技, 2011(10): 95-97.

[8] 徐岩,吴群,范文来,等. 中国白酒中四甲基吡嗪的微生物产生途径的发现与证实[J]. 酿酒科技, 2011(7): 37-40.

[9] 庄名扬,王仲文,孙达孟,等. 美拉德反应与酱香型白酒[J]. 酿酒, 1999(4): 42-47.

[10] 徐岩,吴群,范文来,等. 中国白酒中四甲基吡嗪的微生物产生途径的发现与证实[J]. 酿酒科技, 2011(7): 93-95.

[11] 吴建峰,徐岩. 白酒细菌酒曲固态培养条件下 *B.subtilis* S12 产四甲基吡嗪的合成机制[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(1): 8-15.

[12] CLARKE T D. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(8): 815-821.

信息窗

不爱吃水果？或因甜味剂

孩子不喜欢吃水果?英国营养学家警告说,这可能是因为他们从小习惯了零食中人造甜味剂阿斯巴甜的味道。

阿斯巴甜上世纪 80 年代开始获准使用,甜度是蔗糖的大约 200 倍,但由于几乎不含卡路里,被广泛用于数以千计种类的食品和饮料,包括无糖饮料、燕麦片、口香糖等。牛津大学饮食与人口健康专业教授苏珊·杰布说,不少家长为了避免孩子摄入过多卡路里,总是选择那些用甜味剂代替糖

的无糖饮食,“这相当于训练他们认可甜味剂就是食物的本味”,而再甜的水果也比不上阿斯巴甜的甜度,以至于孩子挑剔水果。杰布为此建议食品生产商减少甜味剂的使用。威斯敏斯特大学肥胖学专家吉米·贝尔建议自己的孩子和学生宁可多吃点糖分高的天然食物,也尽量不吃添加阿斯巴甜的食物。

(来源:www.foodmate.net)