研究论文

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

吴建峰[1,2]，　徐　岩[*1]

（1. 江南大学，生物工程学院/工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江苏今世缘酒业股份有限公司，江苏 涟水 223411）

摘要：四甲基吡嗪又名川芎嗪，是白酒中重要的风味成分，但其在白酒酿造过程的形成机制尚不明晰。为了探索白酒固态酿造体系中四甲基吡嗪的合成机制，作者从白酒细菌曲中分离得到一株产四甲基吡嗪菌株 *B. subtilis* S12，并对细菌曲固态培养条件下四甲基吡嗪的合成机制进行了探究。结果表明：固态条件下 *B. subtilis* S12 合成四甲基吡嗪分两步来进行：第一步，在全细胞催化下细菌利用底物合成四甲基吡嗪的前提物质 3-羟基丁酮，同时氨基酸残基在氨基酸脱氢酶作用下生成氨；第二步，3-羟基丁酮和氨在热动力作用下生成四甲基吡嗪。

关键词：*B. subtilis* S12；固态发酵；四甲基吡嗪；合成机制

中图分类号：TS 262.3　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)01—0008—08

Formation Mechanism of Tetramethylpyrazine Produced with *B.subtilis* S12 Under the Fermentation Condition Simulated Bacterial Qu Preparation Used for Chinese Liquor Brewing

WU Jianfeng[1,2]，　*XU Yan*[*1]

（1. School of Biotechnology/Key laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Jiangsu King's Luck Brewer Co.，Ltd.，Lianshui 223411，China）

Abstract：Tetramethylpyrazine (TTMP) also known as 1igustiazine，is a key flavor of Chinese liquor. To clear the formation mechanism of TTMP in Chinese liquor，the formation mechanism of TTMP in bacterial Qu was explored with a single strain of *B. subtilis* S12 under simulated conditions of bacterial Qu preparation. The results revealed that the synthesis of TTMP can be divided into two stages：the 3-hydroxy-2-butanone and ammonia are mainly synthesized by *B. subtilis* S12 firstly；then the acetoin and ammonium ion undertake chemical reaction and produce 2，3，5，6-TTMP under high temperature in the thermal power stage. The results signified that high temperature was favorable for increasing TTMP production.

Keywords：*B. subtilis* S12，solid-state fermentation，tetramethylpyrazine，formation mechanism

收稿日期：2013-11-12

基金项目：国家 863 计划项目(2013AA102108)；江苏省产学研联合创新项目(BY2010116)。

作者简介：吴建峰(1966—)，男，江苏如皋人，生物工程博士研究生，研究员级高级工程师，主要从事酿酒科学研究。E-mail：hylswjf@vip.163.com

*** 通信作者**：徐　岩(1962—)，男，浙江慈溪人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酿酒科学与酶技术研究。E-mail：yxu@jiangnan.edu.cn

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine，TTMP)又名川芎嗪(1igustiazine)，是中药川芎治疗心脑血管疾病的有效成分之一，临床上已广泛应用于治疗缺血性心脑血管疾病及慢性心衰、肾衰等并且取得了良好的疗效。从 1962 年第一次报道通过微生物法生产吡嗪类物质开始[1]，科研工作者就开始了吡嗪类物质合成机制的探索。到目前为止，关于吡嗪类物质的合成机制主要有两种：(1) 对于烘焙食品，吡嗪类物作为风味物质，主要由糖和氨基酸类物质通过美拉德反应形成[2-5]。在烘焙过程中，所用基质中的 pH 环境和不同的氨基酸源对吡嗪类物质的合成与积累有重要的影响[6]；(2)对通过微生物法来合成吡嗪类物质过程，由于发酵状态的不同，其生产功能机制有比较大的差异：对液态发酵生产吡嗪类物质来讲，微生物通过代谢调控积累 3-羟基丁酮和外加铵盐来提高四甲基吡嗪的含量，并提出了四甲基吡嗪的代谢途径[7-9]；而对通过微生物固态发酵生产四甲基吡嗪机制的研究却进展缓慢，虽然有很多传统发酵食品利用固态发酵法提高产品中吡嗪类物质的含量[10]，并且发现发酵后加热温度对吡嗪类物质的含量影响很大[11]，但是对通过发酵法生产包含四甲基吡嗪在内的吡嗪类物质的研究主要集中在通过优化发酵条件来提高产量[8]，对吡嗪类物质的形成机制研究较少，目前研究较清楚的是我国的酿醋工艺，其研究表明加热、煎煮条件下和陈化过程所发生的美拉德反应是香醋中川芎嗪主要来源[12]。

白酒酿造不仅是一个典型的固态发酵过程，而且是一个开放式的高温过程：从制曲、堆积到入池发酵，各个环节都有大量微生物的参与，在工艺上，无论是酱香型酒还是芝麻香型酒，都存在高温制曲和堆积过程，如果此过程温度偏低，酒体中吡嗪类物质含量下降，说明提高温度有利于吡嗪类物质的产生。但是，在制曲过程中，自然状态下最高温度也只有 60 ℃左右，而 Maillard 反应产生吡嗪类物质的的最佳温度在 120~180 ℃[13]。因此，关于白酒中吡嗪类化合物是否通过美拉德反应来产生仍是一个颇有争议的话题[14]。前期研究结果表明：在酿造的不同阶段，细菌曲中 TTMP 含量最高。由于细菌曲是多菌种混合发酵过程，为简化研究模型，作者以细菌曲中分离到的高产四甲基吡嗪菌株 *B. subtilis* S12 为研究对象，通过用单一的 *B. subtilis* S12 模拟细菌曲培养过程，来实现探索 TTMP 合成机制的目的。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

2,3,5,6-四甲基吡嗪(2,3,5,6-tetramethylpyrazine)，3-羟基丁酮 (3-hydroxy-2-butanone)，2-乙酰基吡啶(2-acetylpyridine)，庚酮(heptanone)均为色谱纯，美国 Sigma Aldrich 公司产品；谷氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苏氨酸、乙醇和氯化钠：均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司(上海)产品。

1.2 菌种

B. subtilis S12：作者所在本实验室筛选并保藏。

1.3 培养基

营养肉汤培养基：牛肉膏 5 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，加水至 1 000 mL，pH 调至 7.2，于 121 ℃湿热灭菌 20 min。

斜面培养基：葡萄糖 5 g，蛋白胨 10 g，牛肉膏 5 g，氯化钠 5 g，加水至 1 000 mL，pH 调至 7.2，于 121 ℃湿热灭菌 20 min。

麸皮固体培养基：麸皮 700 g，花生米粉 300 g，加水 1 000 mL，混匀分装后 121 ℃湿热灭菌 20 min。

1.4 培养条件

种子液培养条件：从新鲜斜面上挑取一环菌落至营养肉汤培养基中（每 100 mL 摇瓶装 20 mL 培养基)，于 37 ℃、150 r/min 下培养 24 h。

发酵培养条件：将培养好的种子液，按体积分数 2%的接种量接入麸皮固体培养基(每 250 mL 摇瓶装 50 g 培养基)中，37 ℃下培养 48 h。

1.5 3-羟基丁酮及 TTMP 的提取

称取 5 g 样品，加入 50 mL 体积分数 12%的乙醇，浸泡 10 min，再超声波处理 30 min，离心，收集上清。吸取 5 mL 提取液到 15 mL 顶空瓶中，加入 1.5 g NaCl 和 1 μL 的庚酮(内标)，混匀，50 ℃下萃取 40 min，通过气相色谱-质谱仪进行 3-羟基丁酮和四甲基吡嗪质量分数的测定，每个样品重复 3 次。

1.6 粗酶液的制备

将枯草芽孢杆菌 S12 接种于牛肉膏蛋白胨培养基中，37 ℃、150 r/min 培养。取培养 24 h 的发酵液，8 000 r/min 冷冻离心 15 min，上清液作为胞外粗酶液。收集上述发酵液离心所得的菌体，生理盐水洗涤两次后，将其悬浮于 0.2 mol/L PBS 缓冲(pH 7.2)中，超声波破碎。破碎条件为：功率 300 W，破碎

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时间 8 min,冰水浴环境,工作 2 s 停 4 s。将破碎液 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液作为胞内粗酶液。

1.7 分析方法

1.7.1 3-羟基丁酮和 TTMP 含量测定 3-羟基丁酮和四甲基吡嗪含量采用 GC-MS 进行测定,参照优化后的文献方法[15],进样口温度为 250 ℃,He 为载气,流量为 1 mL/min。程序升温:50 ℃恒温 2 min,以 10 ℃/min 的速度升温至 230 ℃,保持 15 min。EI 电离源,温度为 220 ℃,电子能量 70 eV,扫描范围 50~500。通过建立 3-羟基丁酮和四甲基吡嗪的标准曲线,进行定量分析。

1.7.2 蛋白酶活力测定 蛋白酶活力测定参照文献方法[16]。称取 2.5 g 样品,加入 50 mL 缓冲液(乳酸缓冲液 pH 3.0;磷酸缓冲液 pH 7.5;硼砂缓冲液 pH 10.5),在 40 ℃水浴中浸出 30 min,离心,收集上清液。准确吸取酶浸出液 1 mL,注入 10 mL 离心管中(一式 3 份),在(40 ℃)水浴中预热 5 min,准确加入体积分数 2%酪蛋白溶液 1 mL,计时,保温 10 min,立刻加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯醋酸,以沉淀多余的蛋白质,中止反应。15 min 后离心分离(或过滤)。准确吸取上层清夜 1 mL,注入试管中加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和 1 mL Folin 试剂,摇匀,在 40 ℃水浴加热 20 min 显色。以空白试液为对照,在 680 nm 波长下测定试样的光密度,取 3 次平均值。

酶活力定义为:1 g 绝干样品,在一定温度和 pH 值条件下,1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸为一个酶活力单位。

1.7.3 氨基酸脱氢酶活力测定 L-谷氨酸脱氢酶活力测定[17]:以 NAD^+为辅酶测定 GDH 酶活性测定反应体系为:6 mmol/L NAD^+,100 mmol/L 谷氨酸,160 mmol/L 甘氨酸,1.8 mol/L NaCl,4.2 mmol/L EDTA,pH 9.0。测定 GDH 催化辅酶 NAD^+还原所引起的光吸收值在 340 nm 波长处的变化。每分钟催化 1 μmol NAD^+还原所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。单位酶活=酶活/蛋白浓度。

苯丙氨酸脱氢酶[18]:反应体系为:200 μL 粗酶液加入到 2 mL 20 mmol 磷酸缓冲液(含 0.1 mol 苯丙氨酸,pH 7.0),反应 5 min 后,取 1.5 mL 混合液,加入 1.5 mL 质量分数 1% $FeCl_3$,614 nm 处测定吸光值变化。每分钟催化 1 μmol 苯丙氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.7.4 氨(铵)质量分数的测定 样品中铵(氨)质量分数的测定参照弓晓峰等[19]的方法。称取 1 g 固体样品于三角瓶中,加入质量分数 20% NaCl 溶液 10 mL,振荡 30 min 后,离心。吸取 50 μL 上清液液于 25 mL 比色管中,加水稀释至 20 mL 左右后,加入 1 mL 酒石酸钾钠溶液,1.5 mL 质量分数 20% NaOH 溶液,充分摇动,静置 15 min 后加入 0.5 mL 纳氏试剂,边加边摇动,然后定容至刻度。一段时间后用分光光度计于 390 nm 处测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 固态条件下 Maillard 反应对 TTMP 合成贡献率分析

关于 TTMP 的合成目前有两种机制:(1)葡萄糖和氨基酸通过 Maillard 反应可以产生吡嗪类物质[20];(2)3-羟基丁酮和铵盐通过化学反应能够产生 TTMP,且提高温度利于反应的正向进行[21]。

在细菌曲培养过程中,微生物生长代谢产生大量的热量,如果不进行控温,温度能达到近 60 ℃,而美拉德反应在 60 ℃即可以进行。作者以细菌曲培养模式作为研究对象,以产 TTMP 含量最高的菌株 *B. subtilis* S12 为对照,对固态制曲阶段 TTMP 合成是否主要以 Maillard 反应生成进行研究。实验分为 3 组,第一组在麸皮培养基中添加葡萄糖和氨基酸、第二组在麸皮培养基中添加葡萄糖和磷酸氢二铵,第三组中只接种枯草芽孢杆菌 S12,作为对照。3 组实验分别于 37 ℃(48 h)和 37~60 ℃培养(37 ℃培养 24 h 后,60 ℃继续培养 24 h),测定 TTMP 质量分数,结果如图 1 所示。

根据结果可知,在只加葡萄糖和氨基酸的实验组中 TTMP 质量分数非常低:在 37 ℃和 37~60 ℃两种培养模式下 TTMP 质量分数分别为 1.8 mg/kg 和 2.1 mg/kg;葡萄和磷酸氢二铵实验组 TTMP 质量分数分别为 2.4 mg/kg 和 2.3 mg/kg。而在接种 *B. subtilis* S12 后培养产生的 TTMP 质量分数高达 65.4 mg/kg 和 319.73 mg/kg,分别是葡萄糖和氨基酸组的 36 倍和 152 倍。这表明在此培养过程和温度条件下,通过单纯的 Maillard 反应产生的 TTMP 质量分数很低,即此过程中 TTMP 的合成主要产生途径不是 Maillard 反应的结果。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

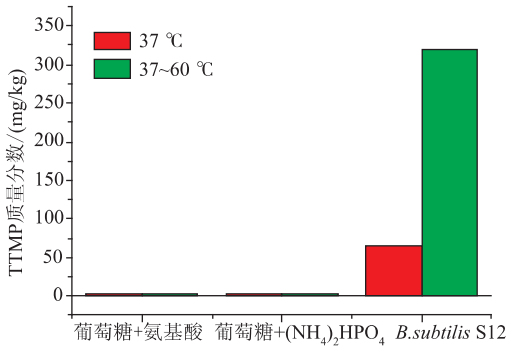


图 1　不同基质对 TTMP 产生的影响

Fig. 1　Effect of ground substance on TTMP synthesis

3–羟基丁酮和铵合成 TTMP 的时主要通过添加外加铵盐的方式来强化四甲基吡嗪的合成[22–24]，这就是目前关于 TTMP 合成的另外一种途径：液态发酵条件下细菌在发酵过程中首先要代谢产生 TTMP 的前体物质 3–羟基丁酮[25]，然后 3–羟基丁酮和铵盐反应生成 TTMP[26–27]。测定了 *B.subtilis* S12 固态培养条件下，随温度和培养时间 3–羟基丁酮质量分数变化情况，结果如图 2 所示。由图 2 可知，随着培养的进行，3–羟基丁酮质量分数逐步上升，在 24 h 左右达到最大值，最高质量分数达到 7.5 g/kg(37 ℃)。此外，不同温度下，37 ℃时 3–羟基丁酮质量分数最大，随着温度的升高，3–羟基丁酮合成量逐渐下降，当温度达到 60 ℃时，细菌基本不生长，几乎检测不到 3–羟基丁酮质量分数变化。值得注意的是：24 h 后℃呈下降趋势，这主要由于一部分 3–羟基丁酮合成了 TTMP，同时 3–羟基丁酮可在 2，3–丁二醇脱氢酶作用下还原成 2，3–丁二醇[28]。因此，如果可以在曲中发现氨(铵离子)，并且能证明 3–羟基丁酮和氨基酸不能反应生成 TTMP，就可以证明细菌曲中 TTMP 的形成应该主要是通过 3–羟基丁酮和氨(铵盐)缩合而形成。

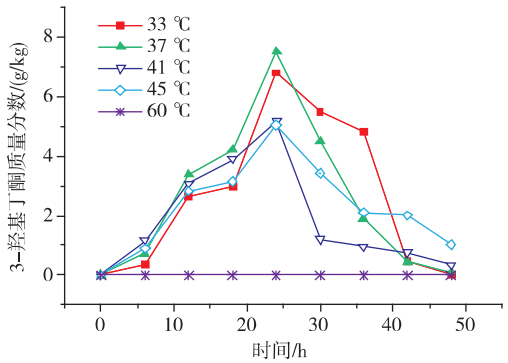


图 2　不同培养温度下 3–羟基丁酮质量分数变化

Fig. 2　Content of 3 –hydroxy –2 –butanone at different temperature

2.2　制曲过程中 TTMP 合成时曲中 N 源的存在形式及其来源

前期我们对酿酒各阶段中吡嗪类物质的变化规律发现，同一培养温度下，多粮曲中四甲基吡嗪含量明显高于纯小麦曲，推测这主要是多粮曲中添加了豌豆，提高氮质量分数的结果。Besson 和 Larroche 等人[29–30]通过在培养基中外加氨基酸和铵盐的方式来提高发酵产吡嗪类物质的含量。为了研究 TTMP 合成中 N 的掺入方式，以 3–羟基丁酮为底物(20 mg/mL)，分别与氨基酸和铵盐(磷酸氢二铵)(30 mg/mL)作用，在 37 ℃和 60 ℃下反应 1 h，检测 TTMP 质量分数。

图 3 显示，在 37 ℃和 60 ℃条件下，3–羟基丁酮和氨基酸反应后几乎检测不到 TTMP，3–羟基丁酮和铵盐反应后 TTMP 吡嗪质量分数分别为 17.8 μg/mL 和 516.7 μg/mL，这说明在此温度条件下，3–羟基丁酮和氨基酸反应不能产生四甲基吡嗪，而是和铵盐(磷酸氢二铵)反应产生 TTMP。

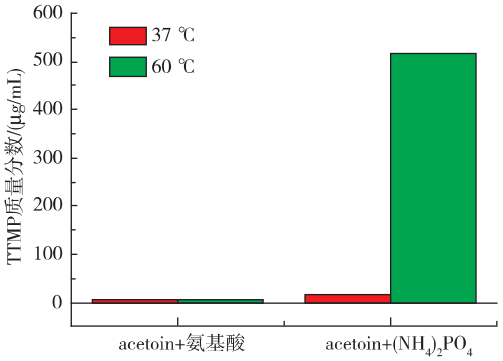


图 3　氮源对 TTMP 合成的影响

Fig. 3　Effect of nitrogen source on the synthesis of TTMP

从图 4 可知，随着曲堆积时间的增加，曲中氨的浓度逐渐增加，在 37 ℃条件下，氨质量分数高达 12 g/kg，但是 60 ℃条件下最高质量分数在 25 h 左右获得，质量分数为 4.5 g/kg。该结果表明：曲中存在高质量分数的氨物质。在制曲过程中没有添加外源的氨源，因此氨的来源只能由细菌代谢产生。

因此，作者提出一个假设：细菌应该是以氨基酸为底物通过脱氨作同获得氨，然后游离态氨与 3–羟基丁酮反应进而合成 TTMP。这就需要验证两个过程的存在：(1)*B. subtilis* S12 固态培养过程中将蛋白分解为氨基酸残基；(2) 氨基酸残基在 *B. subtilis* S12 合成的脱氨酶的作用生成氨。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

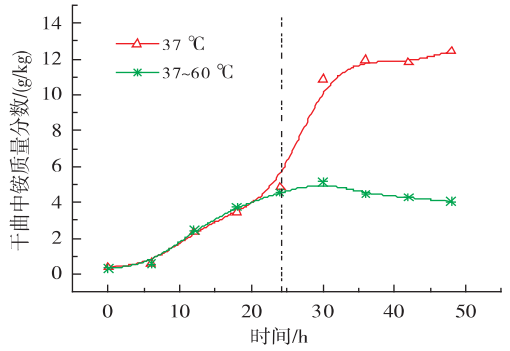


图 4　枯草芽孢杆菌 S12 培养过程氨质量分数变化

Fig. 4　Changing profile of ammonia in bacterial qu cultured with *B.subtilis* S12

为验证以上假设的正确性，作者对 *B.subtilis* S12 的蛋白酶及氨基酸脱氢酶的酶活性进行了测定。*B.subtilis* S12 的蛋白酶活性的分析结果结果如图 5 所示。从图 5 可知，在 37 ℃条件下，*B. subtilis* S12 的碱性蛋白酶活力最高，每克样品中活力达到 464.36 U，其次是中性蛋白酶(383.04 U/g)，酸性蛋白酶活力最低(114.76 U/g)。这表明 *B. subtilis* S12 固态培养过程中存在着高浓度的蛋白酶，用于实现将蛋白和肽段水解成氨基酸残基。此外，与 37 ℃相比，经 60 ℃作用后，蛋白酶活力明显降低，碱性蛋白酶活力仅为 37 ℃下的 21.9 %，中性和酸性蛋白酶活力也相应的降低。这说明 60 ℃高温下，*B. subtilis* S12 的蛋白酶活性受到抑制。

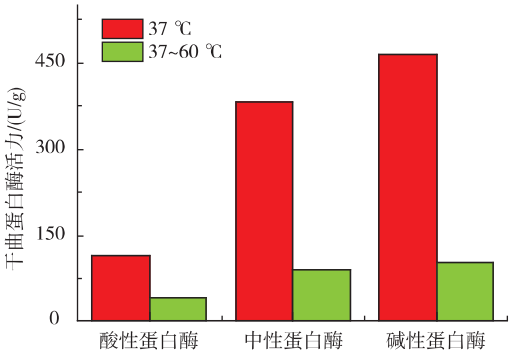


图 5　枯草芽孢杆菌 S12 蛋白酶活力

Fig. 5　Protease activity of *B.subtilis* S12

由于在对培养基中氨基酸质量分数进行测定时发现苯丙氨酸和谷氨酸质量分数较高，因此，作者主要测定了苯丙氨酸和谷氨酸脱氢酶活性，结果如图 6 所示。根据实验结果可知，37 ℃下谷氨酸脱氢酶和苯丙氨酸脱氢酶活性分别为 209 U/mg 和 161 U/mg，而 60 ℃下脱氢酶活性很低，说明高温下酶的活性受到抑制。此外，通过测定 *B. subtilis* S12 培养过程中铵(氨)质量分数发现，前期铵(氨)积累很少，18 h 后开始大量合成，当 24 h 后改为 60 ℃培养，铵(氨)质量分数变化不大，这主要是酶活受到抑制所致。

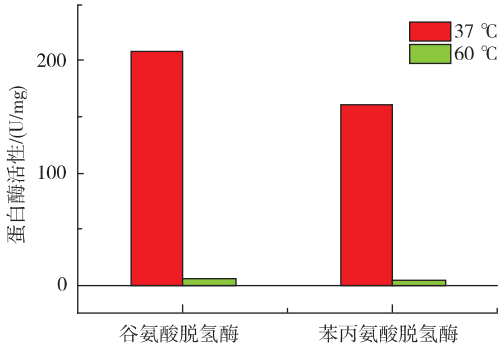


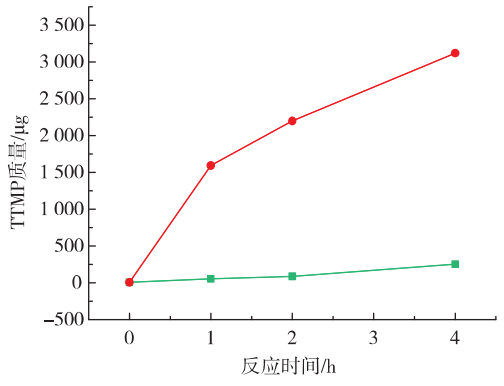
图 6　不同温度下氨基酸脱氢酶活性

Fig. 6　Activity of amino acid dehydrogenase at 37 ℃ and 60 ℃

结果证明：*B. subtilis* S12 固态培养过程中首先将蛋白分解为氨基酸残基，然后在 *B. subtilis* S12 分泌的脱氢酶作用下将氨基酸脱氢生成氨，进而为 TTMP 的合成提供了充足的 N 源。

2.3　TTMP 合成热反应研究

上述研究结果发现，*B. subtilis* S12 固态培养过程中四甲基吡嗪是微生物代谢产物 3-羟基丁酮和氨缩合反应而成。但是可以明显地发现：高温能明显强化 3-羟基丁酮和氨缩合产生 TTMP，这是否表明：3-羟基丁酮和氨的缩合反应是化学缩合反应，而不是微生物及酶参与的酶催化反应呢。为此，以 3-羟基丁酮和铵为底物，分别在不同温度下反应，研究温度对 TTMP 含量的影响，结果如图 7 所示。



(a)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

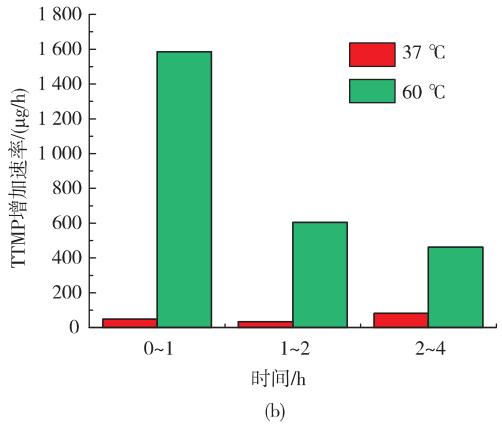


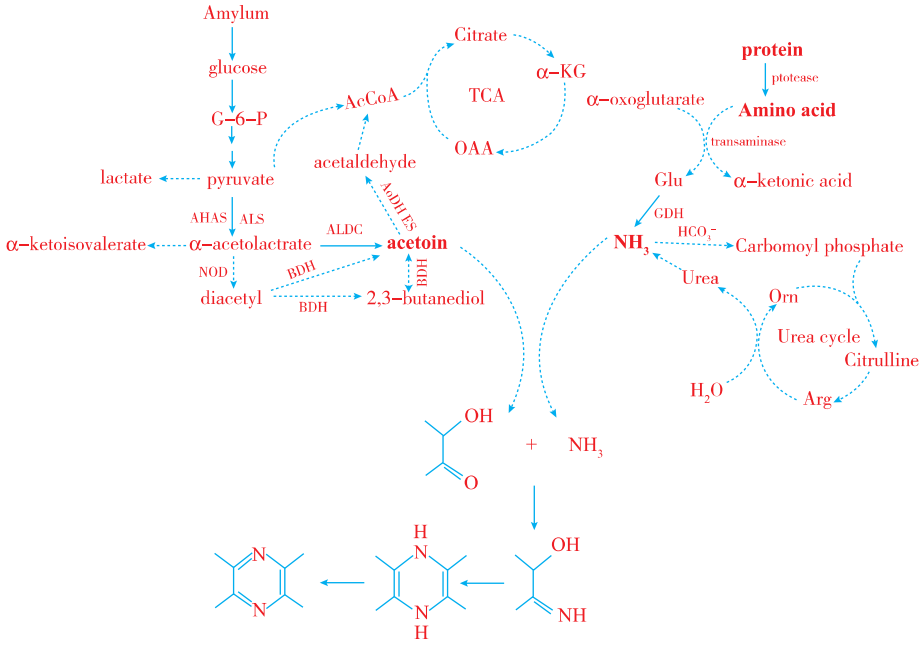
图 7　温度对 TTMP 合成的影响

Fig. 7　Effect of temperature on TTMP synthesis

由图 7 可知,随着时间的延长,TTMP 质量分数呈增加趋势。37 ℃时,TTMP 质量分数增加很慢,4 h 后质量分数增加了 245.34 μg;60 ℃作用下,TTMP 反应速率很快,1 h 后达到 1 594.28 μg,随后反应速率逐渐下降,反应 4 h 后四甲基吡嗪质量分数是 37 ℃下的 12 倍,说明 3-羟基丁酮和铵离子通过非酶反应就可以合成 TTMP,且高温下合成速率加快。

以上结果表明:在 *B. subtilis* S12 固态培养过程中,葡萄糖和氨基酸不能直接通过 Maillard 反应合成 TTMP,需经微生物的代谢,在酶的作用下产生前体物质 3-羟基丁酮和氨,再进一步缩合反应生成 TTMP,缩合反应是一热力学反应。

因此,*B. subtilis* S12 发酵中 TTMP 的合成是由酶与热动力学反应联合作用的结果,即:第一阶段,微生物生长代谢过程中,在一系列酶的作用下产生 3-羟基丁酮和氨;第二阶段,3-羟基丁酮和氨进一步缩合生成四甲基吡嗪,此阶段为热力学反应,高温利于反应的进行。根据该结论,作者对 TTMP 的合成途径进行了构建如图 8 所示。



ALS/AHAS:乙酰乳酸合成酶;NOD:非酶催化的氧化脱羧作用;ALDC:乙酰乳酸脱羧酶;BDH:2,3-丁二醇脱氢酶;AoSD ES:3-羟基丁酮脱氢酶系统;GDH:谷氨酸脱氢酶

图 8　TTMP 的酶/热动力学耦合催化合成过程

Fig. 8　Synthesis of TTMP base on enzyme and thermo-kinetics coupling

2.4　*B. subtilis* S12 产 TTMP 的原位反应验证

上述结果显示:3-羟基丁酮质量分数在 24 h 达到最大值,同时氨质量分数在 18~24 h 也有明显的增加。因此在 *B. subtilis* S12 培养过程中,选择前 24 h 为 37 ℃培养用于实现前体物质的积累;24 h 后提高温度,用于加快前体物质的缩合反应,结果如图 9 所示。由图 9 可知:前 24 h TTMP 质量分数变化很少,24 h 后 TTMP 开始逐步合成;且温度越高,TTMP 生成速度越快,合成量越多;60 ℃下 TTMP 质量分数为 307.99 mg/kg,是 37 ℃下的 5 倍。在前期对菌株的生理生化实验发现,*B. subtilis* S12 在 60 ℃时不能生长,如果 3-羟基丁酮到 TTMP 合

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成是酶促,60 ℃下 TTMP 质量分数应该较 37 ℃低。因此,这也进一步说明了 *B. subtilis* S12 培养过程中,3-羟基丁酮和氨缩合成 TTMP 过程为非酶反应。

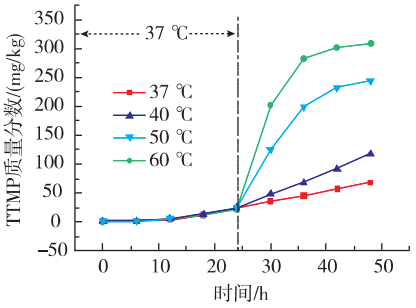


图 9 温度对 *B. subtilis* S12 中 TTMP 合成的影响

Fig. 9 Effect of temperature on TTMP production of *B. subtilis* S12

3 结 语

研究表明 *B. subtilis* S12 固体培养温度下,以葡萄糖和氨基酸为底物通过 Maillard 反应不能产生四甲基吡嗪,3-羟基丁酮和氨基酸不能合成四甲基吡嗪,只有 3-羟基丁酮和氨相互作用才能合成四甲基吡嗪。

在固态发酵条件下,*Bacillus subtilis* S12 代谢产生 3-羟基丁酮,分泌蛋白酶将蛋白质降解为氨基酸,并在氨基酸脱氢酶(如谷氨酸脱氢酶和苯丙氨酸脱氢酶)将氨基酸脱氢得到氨,实现氨基酸到氨的转化,氨和 3-羟基丁酮通过缩合作用合成四甲基吡嗪,因此氨基酸脱氢酶是合成 TTMP 的关键酶。

固态条件下四甲基吡嗪的合成为两阶段酶/热力学联合作用过程:在第一阶段在全细胞催化下细菌利用底物合成四甲基吡嗪的前提物质 3-羟基丁酮,在氨基酸脱氢酶作用下生成氨;第二阶段 3-羟基丁酮和氨在热动力作用下生成四甲基吡嗪。其中温度对第二阶段 TTMP 合成影响很大,高温利于反应的进行。

参考文献:

[1] Kempler G. Production of flavor compounds by microorganisms[J]. **Adv Appl Microbiol**,1983,29:29-51.

[2] Koehler P E,Mason M E,Newell J A. Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acid model systems [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1969,17(2):393-396.

[3] Amrani-Hemaimi M,Cerny C,Fay L B. Mechanisms of formation of alkylpyrazines in the Maillard reaction [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1995,43(11):2818-2822.

[4] Koehler P E,Odell G V. Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-aminereactions [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1970,18(5):895-898.

[5] Bemis-Young G L,Huang J,Bernhard R A. Effect of pH on pyrazine formation in glucose-glycine model systems [J]. **Food Chemistry**,1993,46(4):383-387.

[6] Wong J M,Bernhard R A. Effect of nitrogen source on pyrazine formation [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1988,36(1):123-129.

[7] ZHU B F,XU Y. 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.

[8] ZHU B F,XU Y. A feeding strategy for tetramethylpyrazine production by Bacillus subtilis based on the stimulating effect of ammonium phosphate[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**,2010,33(8):953-959.

[9] Selamat J,Harun S M. Formation of methyl pyrazine during cocoa bean fermentation [J]. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**,1994,17(1):27-32.

[10] Rodriguez-Campos J,Escalona-Buendía H,Contreras-Ramos S,et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa[J]. **Food Chemistry**,2012,132(1):277-288.

[11] 贺铮怡,敖宗华,吴珏,等. 镇江香醋中川芎嗪的测定及生成机理的研究[J]. 中国调味品,2004,2:36-39.
HE Z Y,AO,Z H,WU Y,et al. Study on the mensuration of tetramethylpyrazine in zhenjiang vinegar and its generant mechanism[J]. **China Condiment**,2004,2:36-39. (in Chinese)

[12] Müller R,Rappert S. Pyrazines:occurrence,formation and biodegradation [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,85(5):1315-1320.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[13] 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.
ZHUANG M Y,WANG Z W,SUN D M. Maillard reaction and Maotai flavor liquor [J]. **Liquor Making**,1999,4:42-47. (in Chinese)

[14] 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,2011,7:37-39.
XU Y,WU Q,FAN W L. The discovery & verification of the production pathway of tetramethylpyrazine (TTMP) in Chinese liquor[J]. **Liquor Making Science & Technology**,2011,7:37-39. (in Chinese)

[15] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 中国轻工业出版社,1998.

[16] 张影陆,范文来,姜文广,等. 顶空固相微萃取法测定果酒中的挥发性成分[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(6):115-120.
ZHANG Y L,FAN W L,JIANG W G,et al. Determination of volatile compounds in fruit wine by Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2008,27(6):115-120. (in Chinese)

[17] 陈丽丽,潘玉兰,张建华. 纳豆芽孢杆菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆,表达及酶活性测定[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2010,1:18.
CHEN L L,PAN Y L,ZHANG J H. Gene cloning expression and enzyme activity assay of a Glutamate Dehydrogenase from Bacillus Subtilis Natto[J]. **Journal of Shanghai Jiaotong University:Agriculture Science**,2010,1:18. (in Chinese)

[18] Massad G,Zhao H,Mobley H. Proteus mirabilis amino acid deaminase:cloning,nucleotide sequence,and characterization of aad [J]. **Journal of Bacteriology**,1995,177(20):5878-5883.

[19] 弓晓峰,张静,张振辉,等. 纳氏试剂比色法测定土壤铵态氮的研究[J]. 环境科学与技术,2006,29(1):43-44.
GONG X F,ZHANG J,ZHANG Z H,er al. Measurement of NH3 -N in Soil with Nessler's Reagent Colorimetry [J]. **Environmental Science & Technology**,2006,29(1):43-44. (in Chinese)

[20] Rizzi G P. The Strecker degradation and its contribution to food flavor. In:Flavor chemistry:Springer,1999:335-343.

[21] Rizzi G P. Formation of pyrazines from acyloin precursors under mild conditions [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1988,36(2):349-352.

[22] CHEN J C,CHEN Q H,GUO Q,et al. Simultaneous determination of acetoin and tetramethylpyrazine in traditional vinegars by HPLC method[J]. **Food Chem**,2010,122(4):1247-1252.

[23] Aungpraphapornchai P,Sangobpun N,Sopha P. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods Which Have Potential for Tetramethylpyrazine Production[J]. **Srinakharinwirot Science Journal**,2007,23(1):94-108.

[24] Hao F,Wu Q,Xu Y. Precursor supply strategy for tetramethylpyrazine production by bacillus subtilis on solid-state fermentation of wheat bran[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2013,169(4):1346-1352.

[25] Montville T J,Hsu A H-M,Meyer M E. High-efficiency conversion of pyruvate to acetoin by Lactobacillus plantarum during pH-controlled and fed-batch fermentations[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1987,53(8):1798-1802.

[26] ZHU B,XU Y,FAN W. Study of tetramethylpyrazine formation in fermentation system from glucose by Bacillus subtilis XZ1124 [J]. **New Biotechnology**,2009,25:S237.

[27] HUANG T C,FU H Y,HO C T. Mechanistic studies of tetramethylpyrazine formation under weak acidic conditions and high hydrostatic pressure[J]. **J Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1996,44(1):240-246.

[28] XIAO Z,QIAO S,MA C,et al. Acetoin production associated with the increase of cell biomass in Bacillus pumilus ATCC 14884 [J]. **Afr J Biotechnol**,2010,18:1997-2003.

[29] Besson I,Creuly C,Gros J,et al. Pyrazine production by Bacillus subtilis in solid-state fermentation on soybeans [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,1997,47(5):489-495.

[30] Larroche C,Besson I,Gros J-B. High pyrazine production by Bacillus subtilis in solid substrate fermentation on ground soybeans [J]. **Process Biochemistry**,1999,34(6):667-674.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net