

## 酱醪贝莱斯芽胞杆菌四甲基吡嗪高产菌的选育及其发酵优化

万雨薇<sup>1</sup>, 林琛<sup>1</sup>, 闫子恒<sup>1</sup>, 王洁丽<sup>1</sup>, 刘俊良<sup>1</sup>, 韦现鹏<sup>1</sup>, 周尚庭<sup>2,3</sup>, 蒋雪薇<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

<sup>2</sup>湖南省调味品发酵工程技术研究中心 长沙 410600

<sup>3</sup>加加食品集团股份有限公司 长沙 410600

**摘要** 为获得四甲基吡嗪(TTMP)高产发酵菌株,以酱醪中筛选的贝莱斯芽胞杆菌 CS1.11 为出发菌株,进行紫外诱变,以酪素平板水解圈直径及乙偶姻显色反应为指标进行初筛,以蒸煮豆粕和焙炒小麦为原料固态发酵 TTMP 进行复筛,得到 3 株突变株。蛋白酶、淀粉酶活力及乙偶姻合成能力研究表明,其中 2 株突变株 CS1.11-32、CS1.11-33 更优,其 TTMP 的积累量较出发菌株分别提升了 47.64%、78.89%,适用于酱油发酵体系。对影响 TTMP 积累的炒麦添加量、加水量、接种量、发酵温度及搅拌次数进行 2 株菌的对比发酵研究,CS1.11-33 显示出更优的 TTMP 积累能力。响应面试验优化得出 CS1.11-33 固态发酵积累 TTMP 的最佳发酵条件为:炒麦添加量 44%,加水量 29%,发酵温度 37℃,接种量 8%,发酵过程中不进行搅拌,在此条件下 TTMP 积累量最大达到 1 895.08 mg/kg 干基,是其优化前的 2.6 倍。酱醪贝莱斯芽胞杆菌 TTMP 高产株的选育及其发酵研究将为提高酱油中 TTMP 浓度、快速增强酱香及促进 TTMP 的功能性应用奠定基础。

**关键词** 四甲基吡嗪; 贝莱斯芽胞杆菌; 选育; 酱醪; 响应面优化

**文章编号** 1009-7848(2023)08-0175-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.019

吡嗪是一类含 2 个对称氮原子的六元杂环化合物,天然存在于可可豆或大豆发酵食品中,因具有易挥发、香味阈值低、对其它香味有显著的烘托和叠加作用的特点,常被作为香料添加剂广泛应用于食品中<sup>[1]</sup>。四甲基吡嗪(2,3,5,6-Tetraethylpyrazine, TTMP),又名川芎嗪,是中药川芎中的活性生物碱,具有扩张小动脉,活血化瘀及改善微循环的作用,也是治疗心脑血管疾病的有效成分<sup>[2-3]</sup>。TTMP 常存在于各种发酵食品中,如酱香型白酒<sup>[4]</sup>、醋<sup>[5]</sup>和纳豆<sup>[6]</sup>等,发酵大豆中 TTMP 的香气阈值为 10 mg/kg,其焙烤、坚果香气有助于酱香风味的形成,此外,TTMP 还能赋予发酵食品一定的健康保健功能<sup>[7]</sup>。

发酵食品中 TTMP 的产生与微生物作用密切相关。吴建峰等<sup>[8]</sup>研究了枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)在固态发酵条件下 TTMP 的合成机制,结

果表明:该菌能利用底物合成乙偶姻,同时微生物分泌的氨基酸脱氢酶作用于氨基酸残基生成氨,乙偶姻和氨通过自发反应生成 TTMP。外源添加乙偶姻对 TTMP 产量的提高有显著促进作用,然而,前体物乙偶姻浓度过高会对细胞产生毒害作用,导致乙偶姻利用率不高,因此筛选内源性乙偶姻积累菌株更有利于生物发酵合成 TTMP<sup>[9-10]</sup>。钟桂芳等<sup>[11]</sup>通过初步筛选产乙偶姻的菌株,进而复筛 TTMP 的产生菌株,得到 2 株可应用于提升原酒中 TTMP 产量的芽胞杆菌。Zhang 等<sup>[12]</sup>从高温大曲中筛选 1 株高产 TTMP 的解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),经单因素和响应面优化,得到功能麸曲制备工艺,TTMP 最高产量达到 1.28×10<sup>3</sup> mg/kg。

酱油中最常见的吡嗪类化合物包括 2-甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪(2,6-Dimethylpyrazine, 2,6-DMP)、2,5-二甲基吡嗪(2,5-Dimethylpyrazine, 2,5-DMP)、2-乙基-6-甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪(2,3,5-Trimethylpyrazine, 2,3,5-TMP)<sup>[13]</sup>。吡嗪类物质虽在酱油中含量不高,但香气阈值低,其对酱油香气形成至关重要<sup>[14-15]</sup>。芽胞杆菌是酱醪发酵阶段比较重要的细菌。吴博华等<sup>[16]</sup>从高盐稀态酱醪中分离 3 株具有吡嗪类物质积累能力的芽胞

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30700);  
湖南省教育厅重点项目(21A0197);长沙市科技计划重点研发项目(kq2004072, kh2005095)

第一作者: 万雨薇,女,硕士生

通信作者: 蒋雪薇 E-mail: jxw\_72@sina.com

杆菌,其中贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)为最具 TTMP 积累潜力的菌株。贝莱斯芽胞杆菌因最早分离自西班牙南部贝莱斯河而得名,曾被命名为解淀粉芽胞杆菌的植物亚种,随着基因组测序的发展,2016年贝莱斯芽胞杆菌重新获得细菌命名法中的地位<sup>[17]</sup>。近年来,贝莱斯芽胞杆菌因在自然界中分布广、生长快、性能稳定、对人类和动物无害且代谢产物丰富而受到重视,其在发酵食品中的作用及应用也备受关注。Jiang等<sup>[18]</sup>通过分析红曲醋酿造过程中微生物动态变化与风味代谢物的相关性,发现贝莱斯芽胞杆菌与醇类、酯类风味物质呈强正相关;He等<sup>[19]</sup>向大曲中接种枯草芽胞杆菌和贝莱斯芽胞杆菌,TTMP和苯乙醇的含量显著增加,改善了大曲风味特征。本文以高盐稀态发酵酱醪中筛选的具有TTMP产生能力的贝莱斯芽胞杆菌CS1.11为出发菌株,诱变并定向选育TTMP积累优势菌,结合TTMP积累机理分析,设计并优化其固态发酵条件,以期获得TTMP积累高产株,为酱醪发酵增进酱香及健康功能因子、实现酱油品质提升奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种、材料与试剂 出发菌株:贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)CS1.11,分离自高盐稀态酱醪,由湖南省调味品发酵工程技术研究中心(长沙理工大学分中心)保藏;炒麦、豆粕,取自湖南某酱油厂;2-甲基-3-庚酮(色谱纯级),德国Dr.Ehrenstorfer公司; $\alpha$ -萘酚(分析纯级),上海埃彼化学试剂有限公司;无水肌酸(98%)、乙偶姻(97%)、四甲基吡嗪(98%)、福林酚(生化试剂),上海麦克林生化科技有限公司;L-酪氨酸(生化试剂),上海博奥生物科技有限公司;其它试剂均为分析纯级,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基、LB培养基、葡萄糖蛋白胨水培养基配制参考文献[20]。酪素培养基配方如下:干酪素4 g/L,蛋白胨10 g/L,牛肉膏3 g/L,琼脂20 g/L,NaCl 5 g/L,pH 7.0。固态发酵培养基配方如下:蒸煮豆粕75 g,炒麦25 g,混匀后装入250 mL锥形瓶,加入25 mL水,自然pH值。

### 1.2 仪器与设备

722S可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;ZWY-2102C恒温振荡培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;436GC/EVOQ TQ/PAL三重四级杆气质联用仪,美国Bruker Daltonics公司;DB-5MS色谱柱,美国Agilent公司;50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS固相微萃取针,美国Supelco公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 产TTMP菌株的选育

1.3.1.1 诱变育种及产蛋白酶突变株筛选 将菌种接种至LB液体发酵培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min培养14 h,取菌液用无菌生理盐水离心洗涤3次后制备成浓度为 $10^8$ 个细胞/mL的菌悬液;吸取10 mL菌悬液于功率15 W紫外灯下,距离30 cm照射90 s后经梯度稀释涂布于酪素培养基平板上,37  $^{\circ}$ C培养36 h,挑选平板上水解圈与菌落直径比( $D/d$ 值)大于2.20的突变株。

1.3.1.2 乙偶姻优势突变株初筛 将 $D/d$ 值大于2.20的突变株,接种于葡萄糖蛋白胨水培养基中,37  $^{\circ}$ C静置培养48 h。培养结束后,取发酵液在4 000 r/min下离心10 min,取上清液0.4 mL加入4.6 mL显色试剂( $\alpha$ -萘酚10 g/L,无水肌酸1 g/L,氢氧化钠40 g/L),振荡混匀,于37  $^{\circ}$ C条件下反应40 min,以不接种的培养基为对照,在波长522 nm处测定吸光度,选取吸光度大于0.70的菌株进入复筛。

1.3.1.3 产TTMP优势突变株复筛 将初筛得到的菌株接种到牛肉膏蛋白胨培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min摇床培养,制备成浓度为 $10^8$ 个细胞/mL的菌悬液,以接种量2%接入固态发酵培养基中制曲72 h,按曲:盐水质量比为1:2加入167 g/L盐水继续发酵72 h,分别测定TTMP在制曲及盐卤发酵阶段的积累量。

1.3.2 菌株性能测定 按1.3.1.3节的方法将芽胞杆菌菌悬液接种于制曲培养基中,37  $^{\circ}$ C恒温培养84 h,分别取培养12,24,36,48,60,72,84 h的发酵样测定蛋白酶、淀粉酶活性和乙偶姻的积累量。

1.3.3 单因素实验 以制曲培养基为基础,接种量为2%、温度为37  $^{\circ}$ C、搅拌次数为每日1次,考

察炒麦添加量分别为豆粕质量的 40%、50%、60%、70%、80% 时对 TTMP 积累量的影响;以炒麦添加量为 50%, 考察加水量分别为豆粕炒麦总质量的 10%、20%、30%、40%、50% 时对 TTMP 积累量的影响;以炒麦添加量为 50%、加水量为 20%, 考察接种量分别为 2%、4%、6%、8%、10% 时对 TTMP 积累量的影响;以炒麦添加量为 50%、加水量为 20%、接种量为 8%, 考察发酵温度分别为 32、36、40、44、48 °C 时对 TTMP 积累量的影响;以炒麦添加量为 50%、加水量为 20%、接种量为 8%, 发酵温度为 40 °C, 考察每日搅拌次数(0, 1, 2, 3, 4 次)对 TTMP 积累量的影响;发酵时间均为 72 h。

1.3.4 响应面优化试验 在单因素研究的基础上, 选取炒麦添加量、加水量、发酵温度 3 个因素为自变量, 以 TTMP 积累量为响应值, 应用 Box-Behnken 设计原理进行响应面优化试验, 因素与水平编码见表 1。

表 1 试验因素水平表

Table 1 Experimental factors and levels table

因素	水平		
	-1	0	1
炒麦添加量(A)/%	40	50	60
加水量(B)/%	10	20	30
发酵温度(C)/°C	36	40	44

### 1.3.5 分析方法

1.3.5.1 蛋白酶活力测定 蛋白酶活力参照 GB 1886.174-2016 《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》<sup>[21]</sup>测定, 蛋白酶酶活计算公式如式(1)所示。

$$\text{蛋白酶酶活 (U/g 干基)} = \frac{A \times K}{10} \times 4 \times N \times \frac{1}{1-W} \quad (1)$$

式中: A——波长 680 nm 处测得的吸光度; K——吸光常数, 97.91; 4——酶反应总体积, mL; N——稀释倍数; 10——反应时间, min; W——曲的水分百分含量, 61.65%。

1.3.5.2 淀粉酶活力测定 淀粉酶活性参照 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定<sup>[22]</sup>, 淀粉酶酶活计算公式如式(2)所示。

$$\text{淀粉酶酶活 (U/g 干基)} = \frac{A \times N}{10 \times K} \times \frac{1}{1-W} \quad (2)$$

式中: A——波长 540 nm 处测得的吸光度; K——葡萄糖标准曲线斜率, 0.7994; N——稀释倍数; 10——反应时间, min; W——曲的水分百分含量, 61.65%。

1.3.5.3 乙偶姻的测定 利用肌酸比色法测定乙偶姻占曲中干物质的含量<sup>[23]</sup>, 乙偶姻含量计算公式如式(3)所示。

$$\text{乙偶姻含量 (g/kg 干基)} = \frac{A}{K} \times N \times \frac{1}{1-W} \quad (3)$$

式中: A——波长 522 nm 处测得的吸光度; K——乙偶姻标准曲线斜率, 0.7994; N——稀释倍数; W——曲的水分百分含量, 61.65%。

1.3.5.4 外标法测定 TTMP 稀态发酵样过滤取滤液, 固态发酵样加水稀释后过滤取滤液; 取 2 mL 滤液加入到 20 mL 顶空瓶中, 调整 NaCl 质量浓度至 300 mg/mL, 添加 5 μL 质量浓度为 0.816 μg/μL 的 2-甲基-3-庚酮作为内标物。

TTMP 标准曲线采取外标内标比的方法进行: 以不同浓度 TTMP 标准品与内标物 2-甲基-3-庚酮峰面积之比为纵坐标, TTMP 浓度为横坐标, 得到标准曲线的回归方程为:  $y = 1.2663x - 0.3991$  ( $R^2 = 0.9997$ )。不同浓度 TTMP 标准品及发酵样品中 TTMP 的分析采用 SPME-GC-MS 进行, SPME 条件: 振荡器 50 °C, 将样品加热振荡 5 min, 吸附萃取 20 min, 解析 5 min; GC 条件: 进样口温度 250 °C, 程序升温, 40 °C 保持 4 min, 以 5 °C/min 升温至 120 °C, 保持 2 min, 再以 15 °C/min 升温至 230 °C, 保持 4 min, 载气为高纯氦气, 流速为 1.2 mL/min, 分流比为 10:1; MS 条件: EI 离子源。电子能量 70 eV, 发射电流 200 μA, 离子源温度 250 °C, 质量扫描范围  $m/z$  30~500。

## 2 结果与讨论

### 2.1 出发菌株紫外诱变及初筛

蛋白酶分泌能力强的菌株不仅能够促进发酵原料的降解, 提高原料利用率, 还能分解蛋白质产生氨基酸, 为 TTMP 氮杂环的形成提供氮素来源。将紫外诱变处理后的悬液稀释涂布于酪素平板上, 酪素水解圈直径  $D$  与菌落直径  $d$  比值 ( $D/d$ ) 越大表明菌株分解酪素的能力越强, 蛋白酶活性越高。诱变处理后筛选出 218 株直径比 ( $D/d$ ) 大于

CS1.11 的菌株,以  $D/d$  值大于 2.20 为指标从中进一步挑选得到 47 株菌进行乙偶姻代谢能力测试。乙偶姻是 TTMP 合成的前体物,在碱性条件下乙偶姻能与肌酸中的胍基作用产生粉红色的复合物,颜色越深表明乙偶姻浓度越高<sup>[24]</sup>。将 47 株菌接入葡萄糖蛋白胍水培养基中,取发酵液加入显色剂,利用分光光度计测得显色反应的吸光度,结果如表 2。从表 2 可以看出,突变株 7#、23#、24#、32#、33# 吸光度大于 0.70,说明这 5 株菌 TTMP 积累途径中关键物质——乙偶姻的积累较好,有 TTMP 积累的潜力,因此,选择这 5 株菌进入复筛。

## 2.2 产 TTMP 菌株复筛

酱油主要是以豆粕为蛋白原料,辅以炒麦为淀粉原料,经过制曲固态发酵阶段后加入盐水进行盐卤发酵压榨形成,为得到适用于酱油发酵体系的 TTMP 积累菌株,将初筛所得的 5 株菌,模拟酱油发酵,分别比较各菌株在制曲阶段和盐卤发酵阶段 TTMP 的积累量。如图 1 所示,芽胞杆菌在制曲阶段 TTMP 的积累量高于盐卤发酵阶段,这是由于盐水的加入导致发酵体系中溶氧量下降、渗透压增加,不利于芽胞杆菌的生长,因此芽胞杆菌更适合用于制曲阶段积累 TTMP。对各菌株在制曲阶段 TTMP 的积累量大小进行比较,菌株 23# 的积累量小于出发菌株 CS1.11,说明该菌株降解原料的能力弱,不适合用于酱油发酵体系;菌株 7#、32#、33# 为 TTMP 积累能力较强的 3 株菌,积累量分别达到了 546.45,608.73,737.57 mg/kg 干基,较 CS1.11 提高了 32.53%,47.64%,78.89%,具有应用于酱油发酵体系,促进 TTMP 积累的潜力。

## 2.3 突变株的性能

发酵原料中的蛋白质及淀粉需经过蛋白酶、淀粉酶的作用分解成氨基酸、可发酵性糖等物质,为菌体生长代谢提供营养,而经蛋白酶作用产生的氨基酸也是吡嗪环中氮元素的来源,淀粉酶作用产生的糖能经代谢能够形成乙偶姻,乙偶姻作为前体物直接参与了 TTMP 碳架的构成,因此,作为 TTMP 高产株应具有蛋白酶、淀粉酶活力强且在发酵过程中乙偶姻积累良好的特征。对复筛得到的突变株 7#、32#、33# 制曲阶段蛋白酶、淀粉酶、乙偶姻随时间的变化进行考察,其结果见图 2。由图 2a 可知,发酵 60 h 时,3 株菌的蛋白酶活

表 2 产乙偶姻突变株初筛结果

Table 2 Screening results of acetoin-producing strains

菌株	OD <sub>522nm</sub>	菌株	OD <sub>522nm</sub>
CS1.11	0.112	24#	0.719
1#	0.165	25#	0.421
2#	0.071	26#	0.315
3#	0.073	27#	0.134
4#	0.099	28#	0.154
5#	0.243	29#	0.185
6#	0.197	30#	0.128
7#	0.898	31#	0.263
8#	0.235	32#	0.918
9#	0.066	33#	0.928
10#	0.101	34#	0.177
11#	0.129	35#	0.129
12#	0.177	36#	0.197
13#	0.087	37#	0.277
14#	0.153	38#	0.360
15#	0.140	39#	0.185
16#	0.127	40#	0.133
17#	0.097	41#	0.149
18#	0.198	42#	0.105
19#	0.140	43#	0.135
20#	0.128	44#	0.160
21#	0.480	45#	0.252
22#	0.144	46#	0.202
23#	0.732	47#	0.439

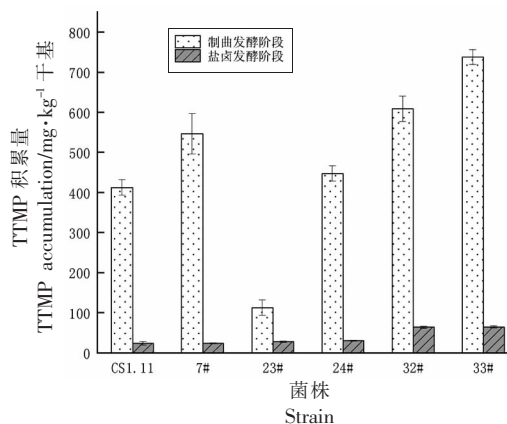


图 1 产 TTMP 突变株筛选结果

Fig.1 Screening results of TTMP-producing strains

性值达到最大,其中菌株 32# 的蛋白酶活性值最高为 2469.47 U/g 干基;由图 2b 可知 3 株菌的淀粉酶活性在发酵 72 h 时达到最大,其中菌株 32#

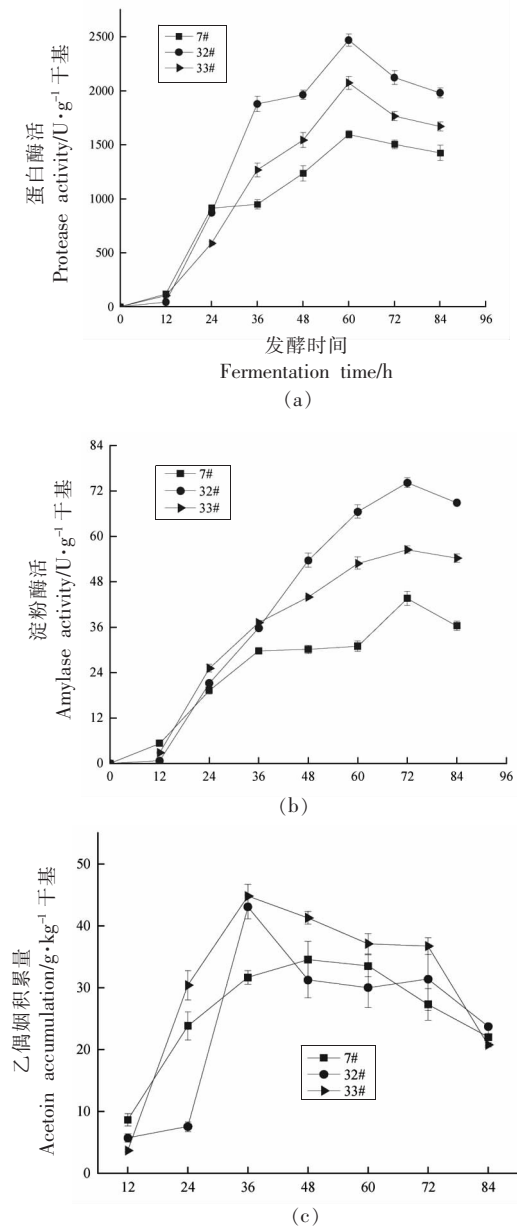


图 2 突变株性能比较结果

Fig.2 The results of mutant strains performance comparison

淀粉酶活性最高达到了 74.18 U/g 干基, 菌株 32# 在产淀粉酶和蛋白酶方面均有优势。菌株 7# 的蛋白酶、淀粉酶活性较低, 使其在该发酵体系下 TTMP 的积累量也低于其它菌株, 验证了将蛋白酶活性作为初筛依据的合理性。制曲阶段乙偶姻积累量随时间变化结果如图 2c 所示, 发酵 36 h, 菌株 33# 发酵产物中乙偶姻的积累量最高达到了 43.79 g/kg 干基, 高于其它菌株发酵物中乙偶姻的

积累量, 这可能与葡萄糖合成乙偶姻途径上其它的关键酶活性有关, 如  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶能催化乙酰乳酸脱羧形成乙偶姻<sup>[25]</sup>。虽然菌株 33# 的淀粉酶、蛋白酶活性略低于菌株 32#, 但菌株 33# 乙偶姻合成能力强, 因此发酵物中 TTMP 的积累量高。突变株性能研究表明菌株 32#、33# 更适合用于酱油发酵体系作为 TTMP 的生产菌株, 将其分别命名为 CS1.11-32、CS1.11-33。

## 2.4 酱醪贝莱斯芽胞杆菌 TTMP 发酵突变株固态发酵影响因素研究

### 2.4.1 炒麦添加量对 TTMP 积累的影响

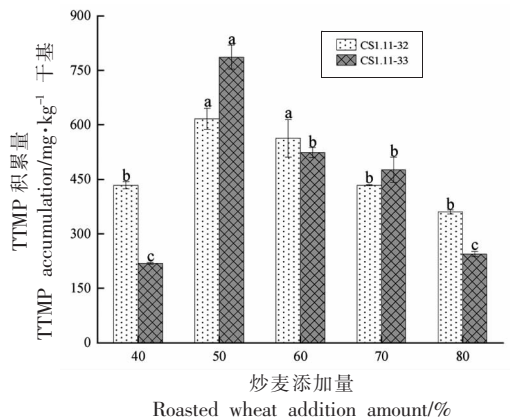
为了提高芽胞杆菌固态发酵过程中 TTMP 的积累量, 选取经诱变筛选得到的产 TTMP 优良菌株 CS1.11-32、CS1.11-33, 以制曲培养基为初始培养基, 对固态发酵下影响 TTMP 生成的单因素进行研究。碳氮的组成能够影响代谢产物的流向, 通过调整炒麦的添加量, 调节培养基的碳氮比组成, 由图 3 可知菌株 CS1.11-33 在炒麦添加量为豆粕量的 50% 时, TTMP 的积累量最大, CS1.11-32 在炒麦添加量为 50% 和 60% 时 TTMP 积累量无显著差异。培养基的组成对芽胞杆菌的生长和 TTMP 的积累有着重要影响, 酱醪发酵体系中氮源的占比大, 从中筛选的芽胞杆菌能够适应高氮环境, 而过高的蛋白水平会抑制菌株的生长, 因此选择炒麦添加量为 50%。

### 2.4.2 加水量对 TTMP 积累的影响

培养基中水分含量会影响微生物的酶系作用及各类生化反应速率。如图 4 所示, 当加水量为 20% 时, 菌株 CS1.11-32 和 CS1.11-33 TTMP 的积累量最高, 随着水分的增加 TTMP 的积累量逐渐降低。培养基中水分含量过低会造成许多生化反应的速率较低, 芽胞杆菌的生长和发酵活动较慢; 适量的水分添加有助于原料中的蛋白发生一定程度的变性, 淀粉糊化, 利于微生物分解利用, 过多的水分会造成原料黏稠结块, 导致与氧气的接触面积变小不利于发酵, 因此选择加水量为 20%。

### 2.4.3 接种量对 TTMP 积累的影响

接种量的大小能够影响原料初始发酵程度。如图 5 所示, 接种量小于 6% 时随着接种量增加, TTMP 的积累量逐渐增加; 菌株 CS1.11-33 的接种量 6%~10% 之间时 TTMP 积累量无显著差异, 菌株 CS1.11-32 接



注:不同小写字母表示差异性显著( $P<0.05$ ),下同。

图3 炒麦添加量对 TTMP 积累的影响

Fig.3 The effect of different roasted wheat addition amount on TTMP accumulation

种量在6%~8%时 TTMP 的积累量无显著差异。通常接种量越大,种子液中包含的水解酶越多,更利于基质的分解利用,使菌体迅速增长,而接种量过多容易移入代谢废物,综合考虑选择接种量为8%。

2.4.4 发酵温度对 TTMP 积累的影响 发酵温度会影响芽胞杆菌的生长代谢。如图6所示,当发酵温度从32℃上升到40℃时,随着发酵温度的升高菌株 CS1.11-32、CS1.11-33 发酵产 TTMP 量也逐渐增加,温度达到40℃时 TTMP 的积累量最大;当发酵温度为44℃时,菌株 CS1.11-32 TTMP 的积累量与发酵温度40℃相比无显著差异,而菌

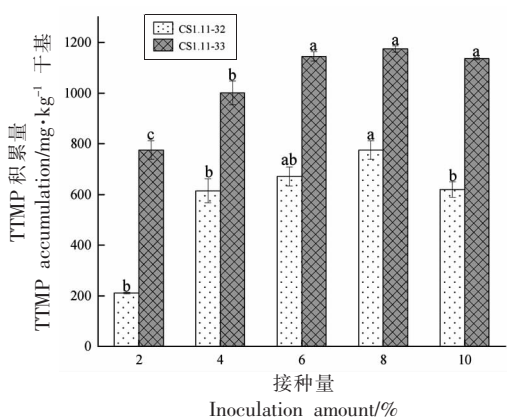


图5 接种量对 TTMP 积累的影响

Fig.5 The effect of inoculation amount on TTMP accumulation

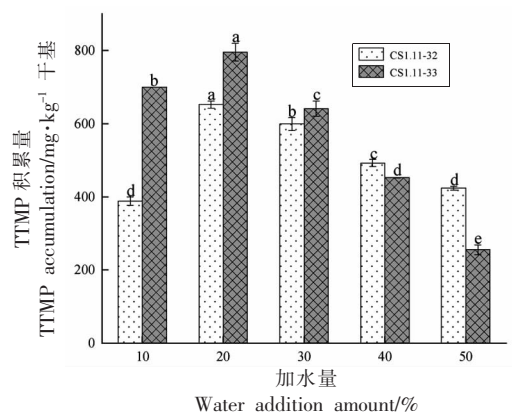


图4 加水量对 TTMP 积累的影响

Fig.4 The effect of different water addition amount on TTMP accumulation

株 CS1.11-33 TTMP 积累量下降明显,说明菌株 CS1.11-33 对温度较为敏感。研究表明固态发酵条件下 TTMP 的生成分为2个阶段:第1阶段在微生物作用下细菌分解底物产生 TTMP 的前提物质乙偶姻和氨,第2阶段由乙偶姻和氨自发反应形成 TTMP,温度升高能促进该反应进行<sup>[8,26]</sup>。适当提高发酵温度不仅有利于菌株生长、提升酶反应速率,还能促进第2阶段的反应;当温度过高时,微生物细胞内酶系易因过热而失去活性,TTMP 前体物的合成受到抑制,导致积累量下降。因此,选择发酵温度为40℃。

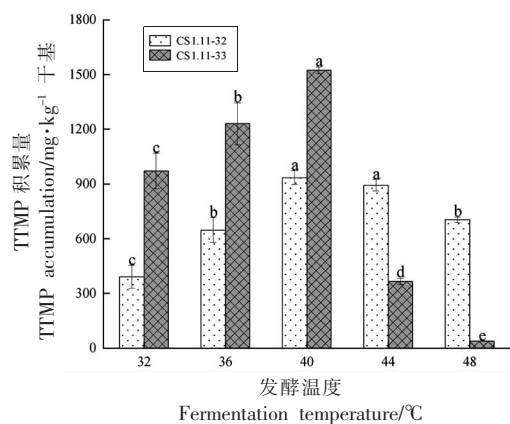


图6 发酵温度对 TTMP 积累的影响

Fig.6 The effect of fermentation temperature on TTMP accumulation

2.4.5 搅拌次数对 TTMP 积累的影响 氧气的供应会影响菌种的生长及 TTMP 的生成<sup>[27]</sup>。通过调整搅拌次数能够调节发酵体系中的物料与氧气的接触,结果如图 7 所示,菌株 CS1.11-33 随着搅拌次数的增加 TTMP 积累量逐渐降低,说明随着搅拌次数的增加,加速了乙偶姻和 TTMP 的挥发,不利于 TTMP 的积累。菌株 CS1.11-32 TTMP 积累量随着搅拌次数的增加先增加后降低,且 TTMP 的积累量低于前期发酵水平,这是由于该菌株发酵过程中生成了较多的 2,3,5-三甲基吡嗪,消耗了前体物质,搅拌次数的变化影响了菌株 CS1.11-32 的代谢方向。CS1.11-33 在单因素实验中 TTMP 的积累量一直高于菌株 CS1.11-32,且性能稳定,并未因不搅拌影响菌体生长,同时还积累了较多的 TTMP,因此,更适合作为 TTMP 的生产菌,该菌株在单因素优化后 TTMP 的最高积累量为 1 838.48 mg/kg 干基。

## 2.5 酱醪芽胞杆菌 TTMP 固态发酵的响应面优化

选取菌株 CS1.11-33,以炒麦添加量(A)、加水量(B)、发酵温度(C)为自变量,TTMP 积累量为响应指标,基于 Box-Behnken 设计三因素三水平试验 17 组,结果见表 3。

对表 3 结果进行回归分析,得到回归方程为  $Y = 1873.56 - 126.79A - 24.30B - 243.32C + 6.11AB + 80.27AC - 331.75BC - 147.22A^2 - 108.23B^2 - 441.53C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果如表 4,所得模型极显著( $P=0.0009<0.01$ ),失拟项不显著( $P=0.0890>0.05$ ),说明模型拟合较好,符合实际情况。一次项 C、二次项  $C^2$ 、交互项 BC 对 TTMP 积累量的影响极显著( $P<0.01$ )。一次项 A、二次项  $A^2$  对 TTMP 积累量的影响显著( $P<0.05$ )。

由图 8a 可知,炒麦添加量与加水量对交互作用曲面的弯曲程度无明显差别,两者交互作用不显著。图 8b 显示炒麦添加量一定时,TTMP 积累量随着发酵温度增加呈先升高后降低的趋势,发酵温度的变化幅度大于炒麦添加量,说明发酵温度比炒麦添加量对 TTMP 的积累量影响大。图 8c 中等高线成椭圆形,曲面图陡峭,表明温度与加水量交互作用显著。对上述模型求极大值,得到菌株 CS1.11-33 的最佳发酵产 TTMP 条件为炒麦添加

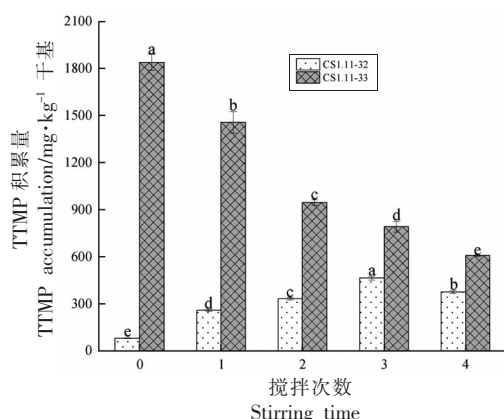


图 7 搅拌次数对 TTMP 积累的影响

Fig.7 The effect of stirring times on TTMP accumulation

量 44.08%、加水量 28.85%、发酵温度 37.35 °C,该条件下理论预测最大值为 1 980.94 mg/kg 干基,依据实际情况调整最佳条件为炒麦添加量 44%、加水量 29%、发酵温度 37 °C 进行 3 次验证试验,得到 TTMP 平均积累量为 1 895.08 mg/kg 干基,与理论值偏差 4.33%,说明优化结果可靠,响应面优化后的积累量约为单因素优化前的 2.6 倍。

表 3 响应面试验设计方案及结果

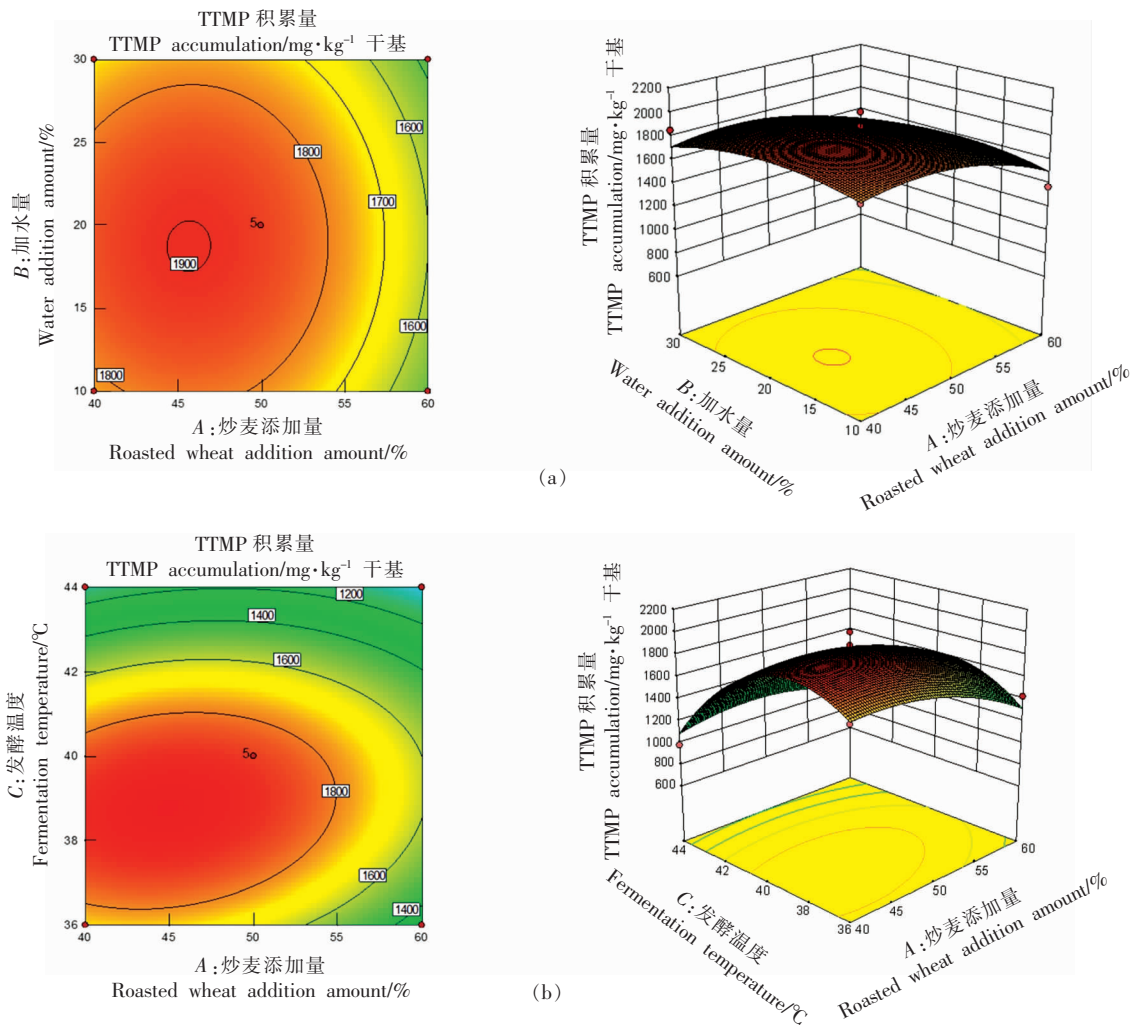
Table 3 Design and results for response surface analysis

试验号	炒麦添加量 (A)/%	加水量 (B)/%	发酵温度 (C)/°C	TTMP 积累量 / mg·kg <sup>-1</sup> 干基
1	1	1	0	1 482.95
2	-1	-1	0	1 765.49
3	1	-1	0	1 373.86
4	0	0	0	1 846.92
5	0	-1	-1	1 288.53
6	0	0	0	1 820.00
7	-1	0	1	981.24
8	0	1	-1	1 757.98
9	-1	0	-1	1 716.12
10	0	-1	1	1 553.11
11	1	0	1	1 014.03
12	0	0	0	1 882.58
13	0	0	0	2 000.24
14	0	1	1	695.55
15	-1	1	0	1 850.12
16	0	0	0	1 818.06
17	1	0	-1	1 427.83

表4 回归模型方差分析  
Table 4 Analysis of variance for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2 101 000.00	9	233 400.00	14.57	0.0009	**
A	128 600.00	1	128 600.00	8.03	0.0253	*
B	4 723.61	1	4 723.61	0.29	0.6040	
C	473 600.00	1	473 600.00	29.56	0.0010	**
AB	149.47	1	149.47	0.01	0.9258	
AC	25 772.60	1	25 772.60	1.61	0.2452	
BC	440 200.00	1	440 200.00	27.48	0.0012	**
A <sup>2</sup>	91 259.64	1	91 259.64	5.70	0.0484	*
B <sup>2</sup>	49 323.41	1	49 323.41	3.08	0.1228	
C <sup>2</sup>	820 900.00	1	820 900.00	51.24	0.0002	**
残差	112 100.00	7	16 021.26			
失拟项	89 362.35	3	29 787.45	5.23	0.0719	
纯误差	22 786.49	4	5 696.62			
总和	2 213 000.00	16				

注:\*表示差异显著(0.01<P<0.05),\*\*表示差异极显著(P<0.01)。





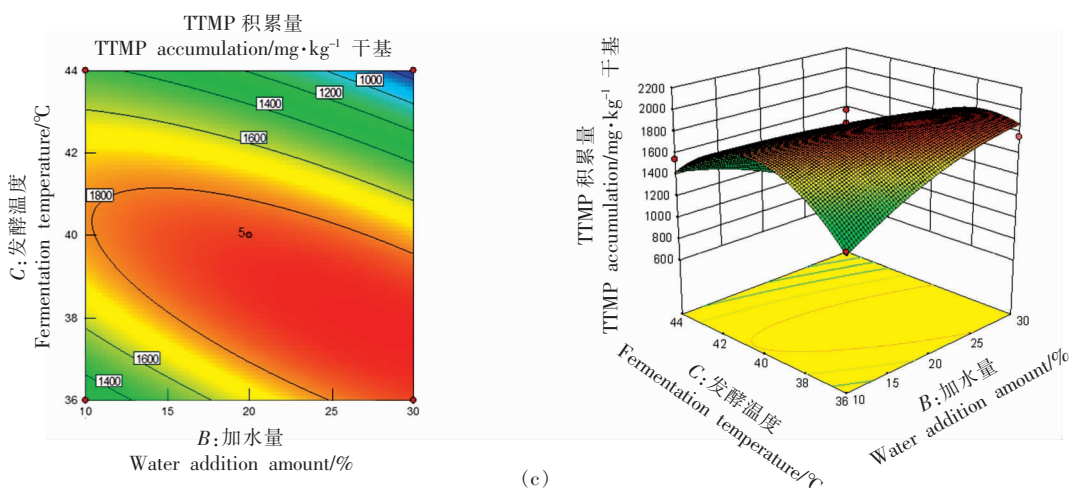


图 8 各因子交互作用的等高线图 and 曲面图

Fig.8 Contour maps and surface maps for each factor interaction

### 3 结论

本文以筛选自酱醪的贝莱斯芽胞杆菌 CS1.11 为出发菌株,经紫外诱变选育了 3 株突变株,以酱油制曲工艺进行固态发酵复筛,3 株菌 TTMP 积累量较出发菌株分别提高了 32.53%、47.64%、78.89%, 适合以酱油发酵原料为基础进行 TTMP 积累。3 株菌株 TTMP 积累相关基础发酵性能研究显示复筛中 TTMP 积累最优菌产乙偶姻能力强,能为 TTMP 的形成提供充足的前体,将其命名为 CS1.11-33;TTMP 积累次优菌产蛋白酶、淀粉酶能力强,能促进发酵原料降解,将其命名为 CS1.11-32;2 株突变株均具有 TTMP 高产的潜力。对影响 TTMP 积累的炒麦添加量、加水量、接种量、发酵温度及搅拌次数进行 CS1.11-32 和 CS1.11-33 的对比发酵研究,CS1.11-33 显示出更优的 TTMP 积累能力,以单因素实验为基础进行响应面试验优化得出 CS1.11-33 固态发酵积累 TTMP 的最佳发酵条件为:炒麦添加量 44%、加水量 29%、发酵温度 37 °C、接种量 8%、发酵过程中不进行搅拌,在此条件下 TTMP 积累量最大达到 1 895.08 mg/kg 干基,是其优化前的 2.6 倍,发酵物呈典型酱香香气,说明突变株贝莱斯芽胞杆菌 CS1.11-33 具有应用于酱油发酵提升酱香风味的潜力。从酱醪中选育在酱油发酵体系中积累 TTMP 的优良菌株,在增强酱香风味的同时,还能促进 TTMP 的功能性应用,这将为提升酱油品质、推动酱油健康化发展提供

了一条新的途径。

### 参 考 文 献

- [1] MORTZFELD F B, HASHEM C, VRANKOVA K, et al. Pyrazines: Synthesis and industrial application of these valuable flavor and fragrance compounds[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(11): 2000064.
- [2] GUO M, LIU Y, SHI D Z. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tetramethylpyrazine (active component isolated from *Rhizoma Chuanxiong*): Roles and mechanisms[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 2430329.
- [3] GAO H J, LIU P F, LI P W, et al. Ligustrazine monomer against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regeneration Research*, 2015, 10 (5): 832-840.
- [4] ZHAO X X, LIU Y H, SHU L, et al. Study on metabolites of *Bacillus* producing soy sauce-like aroma in Jiang-flavor Chinese spirits[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(1): 97-103.
- [5] 王瑞, 彭晓光, 黄登宇. 食醋中川芎嗪成分研究进展[J]. *中国调味品*, 2015, 40(6): 137-140.  
WANG R, PENG X G, HUANG D Y. Research progress of tetramethylpyrazine in vinegar[J]. *China Condiment*, 2015, 40(6): 137-140.
- [6] LIU Y, SU H, SONG H L. Comparison of four extraction methods, SPME, DHS, SAFE, Versus SDE, for the analysis of flavor compounds in Natto

- [J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(2): 343-354.
- [7] 丁海龙, 敖灵, 邓波, 等. 中国白酒微量健康成分分析[J]. 中国酿造, 2018, 37(2): 11-14.  
DING H L, AO L, DENG B, et al. Analysis of trace healthy components of Chinese Baijiu[J]. China Brewing, 2018, 37(2): 11-14.
- [8] 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.  
WU J F, XU Y. Formation mechanism of tetramethylpyrazine produced with *B. subtilis* S12 under the fermentation condition simulated bacterial Qu preparation used for Chinese liquor brewing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(1): 8-15.
- [9] BESSON I, CREULY C, GROS J B, et al. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(5): 489-495.
- [10] ZHU B F, XU Y, FAN W L. High-yield fermentative preparation of tetramethylpyrazine by *Bacillus* sp. using an endogenous precursor approach[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(2): 179-186.
- [11] 钟桂芳, 张帆, 郭辉祥, 等. 高温大曲中产四甲基吡嗪细菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 107-111.  
ZHONG G F, ZHANG F, GUO H X, et al. Screening and identification of tetramethylpyrazine-producing strains from high-temperature Daqu[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 107-111.
- [12] ZHANG W Q, SI G R, RAO Z M, et al. High yield of tetramethylpyrazine in functional Fuqu using *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Food Bioscience, 2019, 31: 100435.
- [13] FENG Y Z, CAI Y, SU G W, et al. Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 126-134.
- [14] 童佳, 赵国忠, 赵建新, 等. 米曲霉发酵高盐稀态酱油过程中典型挥发性风味物质的形成[J]. 中国酿造, 2017, 36(5): 22-29.  
TONG J, ZHAO G Z, ZHAO J X, et al. Formation of typical volatile flavor compounds in soy sauce with high salt liquid state fermentation by *Aspergillus oryzae*[J]. China Brewing, 2017, 36(5): 22-29.
- [15] 张丽杰, 张怀志, 徐岩. 枯草芽孢杆菌 Nr.5 和底物添加促进酱油中吡嗪类物质合成[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 1-8.  
ZHANG L J, ZHANG H Z, XU Y. Promotion of pyrazine-like components formation by addition of *Bacillus subtilis* Nr.5 and substrates during soy sauce fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 1-8.
- [16] 吴博华, 蒋雪薇, 张金玉, 等. 促酱醪发酵芽孢杆菌的筛选及应用[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 134-141.  
WU B H, JIANG X W, ZHANG J Y, et al. Screening and application of *Bacillus* spp. promoting moromi fermentation[J]. Food Science, 2021, 42(6): 134-141.
- [17] DUNLAP C A, KIM S J, KWON S W, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1212-1217.
- [18] JIANG Y, LV X, ZHANG C, et al. Microbial dynamics and flavor formation during the traditional brewing of *Monascus* vinegar[J]. Food Research International, 2019, 125: 108531.
- [19] HE G, DONG Y, HUANG J, et al. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*[J]. LWT, 2019, 111: 1-8.
- [20] 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-247.  
CHEN X D. Microbiology experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241-247.
- [21] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂食品工业用酶制剂: GB 1886.174-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-9.  
National Health and Family Planning Commission. National standard for food safety food additives enzyme preparations for the food Industry: GB 1886.174-2016[S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2016: 1-9.
- [22] 曹丹, 彭浩, 兰阿峰, 等. 一株  $\alpha$ -淀粉酶产生菌的

- 分离, 鉴定及产酶条件研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(6): 169-174.
- CAO D, PENG H, LAN A F, et al. Isolation, identification and enzyme production conditions of an  $\alpha$ -amylase producing strain[J]. Food Research and Development, 2020, 41(6): 169-174.
- [23] 任潇, 纪晓俊, 孙世闻, 等. 肌酸比色法快速测定发酵液中3-羟基丁酮的含量[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 260-263.
- REN X, JI X J, SUN S W, et al. Creatinine colorimetric assay of acetoin in fermentation broth[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(8): 260-263.
- [24] 赵洪源, 负建民, 邵晓庆, 等. 凉州熏醋酿造中高产乙偶姻醋酸菌菌株筛选及其发酵条件优化[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 98-104.
- ZHAO H Y, YUN J M, SHAO X Q, et al. Isolation of acetic acid bacterium with high acetoin-producing ability from aerobic solid-fermentation culture of Liangzhou fumigated vinegar and optimization of its fermentation conditions[J]. Food Science, 2015, 36(15): 98-104.
- [25] DOLIN M I, GUNSALUS I C. Pyruvic acid metabolism II: An acetoin-forming enzyme system in *Streptococcus faecalis* [J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(2): 199-214.
- [26] SHU C K. Pyrazine formation from amino acids and reducing sugars, a pathway other than Strecker degradation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(4): 1515-1517.
- [27] 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(6/7): 667-674.

### Breeding and Fermentation Optimization of Tetramethylpyrazine Producing Strain of *Bacillus velezensis* Screened from Moromi

Wan Yuwei<sup>1</sup>, Lin Chen<sup>1</sup>, Yan Ziheng<sup>1</sup>, Wang Jieli<sup>1</sup>, Liu Junliang<sup>1</sup>,  
Wei Xianpeng<sup>1</sup>, Zhou Shangting<sup>2,3</sup>, Jiang Xuewei<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114

<sup>2</sup>Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Condiment Fermentation, Changsha 410600

<sup>3</sup>Jijia Food Group Co. Ltd., Changsha 410600

**Abstract** In order to obtain a high-yield fermentation strain of 2,3,5,6-tetramethylpyrazine (TTMP), *Bacillus velezensis* CS1.11 screened from moromi was mutated by ultraviolet radiation. The diameter of casein plate hydrolysis ring and the intensity of acetoin color reaction were used as indicators for preliminary screening. The solid-state fermentation of TTMP from steamed soybean meal and roasted wheat was rescreened, and three mutant strains were obtained. Study on protease, amylase activity as well as acetoin synthesis ability showed that two mutant strains CS1.11-32 and CS1.11-33 were better than another, and their TTMP accumulation increased by 47.64% and 78.89%, respectively, compared with the original strain, which were suitable for soy sauce fermentation. The effects of roasted wheat addition amount, water addition amount, inoculation amount, fermentation temperature, and stirring times on the accumulation of TTMP were studied and CS1.11-33 showed better TTMP accumulation ability compared with CS1.11-32. The optimal fermentation conditions for solid-state fermentation of CS1.11-33 to accumulate TTMP were obtained by response surface methodology as follows: Roasted wheat addition of 44%, water addition of 29%, fermentation temperature of 37 °C, inoculation amount of 8%, and no stirring during fermentation. Under these conditions, the maximum accumulation of TTMP reached 1 895.08 mg/kg dry basis, 2.6 times that before optimization. Breeding and fermentation research of *Bacillus velezensis* TTMP high-yield strain in moromi will lay the foundation for increasing TTMP concentration in soy sauce, rapidly enhancing Jiang-flavor, and promoting the functional application of TTMP.

**Keywords** tetramethylpyrazine; *Bacillus velezensis*; breeding; moromi; response surface optimization