

贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 生物合成 TTMP 相关基因分析 及其发酵调控

白丽君¹, 兰箫松¹, 张旭旭¹, 鲁紫瑶¹, 方海宇¹, 刘君^{1,2}, 禹艳春^{2,3}, 蒋雪薇^{1,2*}

¹长沙理工大学食品与生物工程学院 长沙 410114

²湖南省调味品发酵工程技术研究中心 长沙 410600

³加加食品集团股份有限公司 长沙 410600

摘要 为解析芽胞杆菌四甲基吡嗪(TTMP)生物合成途径,对筛选自高盐稀态酱醪的贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 全基因组进行注释,结合固态发酵研究其 TTMP 的生物合成途径及调控特征,结果显示:COG、GO 及碳水化合物活性酶注释发现 CS1.13 参与氨基酸代谢及转运、碳水化合物代谢及转运,编码糖苷水解酶基因丰富,KEGG 注释发现 CS1.13 具有完整的 TTMP 关键底物——乙偶姻的代谢通路。固态发酵过程研究发现,发酵 72 h 还原糖及氨基酸态氮含量分别升高 53.63、8.28 g/kg, TTMP 积累 159.86 mg/kg,证明 CS1.13 具有良好的碳氮代谢能力及 TTMP 合成潜力。根据 TTMP 合成通路,选择苏氨酸、醋酸、丙酮酸及 2,3-丁二醇等关键物质研究 TTMP 生物合成的调控,分别添加上述物质 2、0.2、0.2 mg/g 和 0.8 mg/g 时,TTMP 积累量达到最大值,较对照样分别提高了 32.82%、10.30%、222.46%、160.93%。随着添加物含量的增加,TTMP 积累量下降。除氨基供体苏氨酸外,碳架供体醋酸、丙酮酸或 2,3-丁二醇在较低浓度时更利于 3 种吡嗪(TTMP、2,5-二甲基吡嗪及 2,3,5-三甲基吡嗪)的积累。过多的碳架供体反而有利于丁二酮系化合物的积累,说明氨基供体和碳架供体对 TTMP 的合成具有调控作用。TTMP 生物合成相关基因分析结合发酵调控,为贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 高效积累 TTMP 探索了 1 条有效途径,也为其在酱香食品中快速增香的应用奠定基础。

关键词 贝莱斯芽胞杆菌; 四甲基吡嗪; 基因注释; 发酵调控

文章编号 1009-7848(2024)10-0037-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.004

四甲基吡嗪(2,3,5,6-Tetramethylpyrazine, TTMP)又名川芎嗪,最早是从中草药川芎的根茎中分离出来的一种生物活性成分,是可可豆或大豆发酵食品中检测到的主要吡嗪之一^[1],具有令人愉快的焙烤、坚果、可可等香气^[2-3],可以赋予食品特殊的风味,也是构成发酵食品酱香的重要物质基础^[4-5]。此外,TTMP 具有扩张血管,改善微循环及抑制血小板积聚^[6],降低脑萎缩伤害^[7],防止肝纤维化等功效^[8],能赋予食品健康功能。目前,TTMP 作为构成酱香风味的重要成分,受到食醋、白酒、酱油等发酵食品研究人员的广泛关注,其在发酵过程中的积累及其机制成为研究热点^[9-11]。有研究

发现中国白酒中 TTMP 的产生与微生物的代谢密切相关,而非过去认为的美拉德反应^[12]。积累 TTMP 的微生物以及其生物合成机制成为研究重点。

芽胞杆菌是发酵食品中常见的微生物。近年来,Zhu 等^[13]从酱香型白酒高温大曲中筛选出 1 株枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)XZ1124,经优化其 TTMP 积累量达 4.08 g/L。吴博华等^[14]从高盐稀态酱醪中筛选出 3 株具有吡嗪类物质积累能力的菌株,发现贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)合成 TTMP 的能力最强。可以看出,芽胞杆菌对发酵食品中 TTMP 的积累具有良好的促进作用。贝莱斯芽胞杆菌是近几年在发酵食品中筛选发现的具有 TTMP 积累潜力的菌种,其在酱油^[15]、豆瓣酱^[16]、醋^[17]中均被发现具有提升酱香风味的作用。然而,贝莱斯芽胞杆菌是 2016 年才获得种的地位^[18],对其在发酵食品中的基础研究及相关代谢机制还不明晰,阻碍了其在发酵食品中增进酱香的应用。随着测序技术的发展,基因组学研究特别是功能基

收稿日期: 2023-10-18

基金项目: 湖南省重点研发项目(2023NK2035);湖南省自然科学基金青年科学基金项目(2023JJ40017);湖南省教育厅优秀青年项目(23B0306);湖南省大学生创新训练计划项目(S202210536119)

第一作者: 白丽君,女,硕士生

通信作者: 蒋雪薇 E-mail: jxw_72@sina.com

基因组研究在发掘菌种功能特性^[19]、注释代谢途径及调节机制上发挥了较大的作用^[20],为优良菌种的利用奠定了良好的理论基础。Chandrima等^[21]通过对阿氏芽胞杆菌(*Bacillus aryabhatai* AB211)的全基因组测序、注释和分析,预测出AB211的部分代谢能力并得到验证,这说明贝莱斯芽胞杆菌利用基因信息来指导TTMP的生物合成具有可行性。本研究对筛选自高盐稀态酱醪的贝莱斯芽胞杆菌CS1.13开展基因组学研究,注释生物合成TTMP相关基因,结合发酵试验分析TTMP的合成通路及影响其积累的关键物质。通过添加代谢通路中的关键物质对TTMP积累实施调控,为有效提升发酵食品的酱香风味,增进健康功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种与原料 菌种:贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)CS1.13,分离自湖南某酱油厂的高盐稀态酱醪,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。原料:蒸煮豆粕、焙炒小麦(炒麦),湖南某酱油厂。

1.1.2 主要药品与试剂 2-甲基-3-庚酮(色谱纯),德国Dr. Ehrenstorfer公司;TTMP(98%),上海麦克林生化科技有限公司;乙偶姻(Acetoin, ACT)(97%),上海麦克林生化科技有限公司;2,5-二甲基吡嗪(2,5-Dimethylpyrazine, 2,5-DMP)(98%),上海麦克林生化科技有限公司;2,3,5-三甲基吡嗪(2,3,5-Trimethylpyrazine, 2,3,5-TMP)(99%),上海麦克林生化科技有限公司;2,3-丁二醇(分析纯级),西安天茂化工有限公司;2,3-丁二酮(双乙酰)(98%),上海麦克林生化科技有限公司;氢氧化钠(分析纯级),广东光华化学厂有限公司;甲醛(分析纯级),湖北奥生新材料科技有限公司;丙酮酸(98%),上海麦克林生化科技有限公司;醋酸(分析纯级),上海埃彼化学试剂有限公司;其它药品与试剂均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基 种子培养基:蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 3 g/L、NaCl 5 g/L, pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min;

发酵培养基:蒸煮豆粕:炒麦:水以 10:5:4 质量比混匀后取 30 g 装入 250 mL 锥形瓶,自然 pH, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 仪器与设备

436GC/EVOQ TQ/PAL 气相色谱-质谱联用仪,美国 Bruker Daltonics 公司;DB-5MS 色谱柱,美国 Agilent 公司;PE28 pH 计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;50/30 μm DVB/CAR/PMDS 固相微萃取针,美国 Supelco 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;LRH-250 型生化培养箱,上海一恒科技有限公司;SW-CT-2F 型无菌操作台,上海博讯实业有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基因注释 贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 基因序列已上传至 NCBI SRA 数据库(SRR23959637),采用 Glimmer 对基因组中的编码序列(CDS)进行预测。采用 BLAST、Diamond、hmmscan 等软件对 Glimmer 预测结果进行 GO(Gene ontology)注释、COG(Clusters of orthologous groups of proteins)注释、KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)注释和碳水化合物活性酶(CAZyme)注释。

1.3.2 种子培养 将保藏的贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 斜面活化并转接至种子培养基中,37 °C, 180 r/min 培养 14 h,用无菌生理盐水离心洗涤菌液 3 次,制成浓度为 10⁸ CFU/mL 的种子悬液,备用。

1.3.3 TTMP 固态发酵 将制备好的种子悬液以 8% 的接种量接入 TTMP 发酵培养基中,40 °C 恒温发酵 72 h,分别取培养 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 h 的发酵样测定其生物量、pH 值、还原糖、总糖、氨基酸态氮、总酸含量及 TTMP 的积累量。

1.3.4 发酵调控试验 向灭菌后的 TTMP 发酵培养基中接种 8% 的种子悬液,在发酵前分别添加关键物质:质量浓度为 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/g 的苏氨酸;0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/g 的醋酸、丙酮酸和 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/g 的 2, 3-丁二醇,于 40 °C 恒温发酵 72 h。取 72 h 发酵样,测定生物量及 TTMP 生物合成途径中关键挥发性物质含量。

1.4 分析方法

1.4.1 CS1.13 生物量的测定 生物量测定采用倾

注倒平板法^[22]。选择 1.00 g 样品,用生理盐水梯度稀释,选择合适的稀释菌液 1.00 mL 于无菌平皿中,倒入融化后冷却至 45 °C 的牛肉膏蛋白胨培养基,混合均匀,待凝固后于 37 °C 培养箱倒置培养 24 h,计数,结果以 CFU/g 样品(干质量)计。

1.4.2 发酵培养基 pH 值的测定 取 1.00 g 样品加入 30 mL 去离子水研磨,充分混匀后测定 pH 值。

1.4.3 发酵培养基还原糖、总糖、氨基酸态氮及总酸的测定 还原糖:参照《食品中还原糖的测定》(GB 5009.7-2016)的直接滴定法^[23];总糖:参考武平等^[24]的 3,5-二硝基水杨酸法测定;氨基酸态氮:参照《食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235-2016)的甲醛滴定法;总酸:参照《食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235-2016)的氢氧化钠滴定法^[25],结果均以 g/kg 样品(干质量)计。

1.4.4 TTMP 及关键挥发性物质的测定(外标法)

1) 样品处理 准确称取 1.00 g 固态发酵样于 50 mL 离心管中,加水稀释 16 倍,振荡混匀后 4 000 r/min 离心 10 min,取上清 2 mL 于 20 mL 顶空瓶中,加入质量分数为 30% 的 NaCl,最后添加 5 μL 质量浓度为 0.816 μg/μL 的 2-甲基-3-庚酮作为内标物。

2) 样品分析 采用 SPME-GC-MS 方法测定。进样条件:振荡器温度 50 °C,样品加热振荡 10 min,吸附萃取 20 min,解析 5 min;色谱条件:进样口温度 250 °C,传输线温度 250 °C,柱温箱起始温度 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 1.0 mL/min,无分流。质谱条件:EI 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。

3) 标准曲线 以不同浓度 TTMP、2,3,5-TMP、2,5-DMP、ACT、2,3-丁二醇、双乙酰标准品的质量浓度为横坐标,以上述物质与内标物 2-甲基-3-庚酮的峰面积之比为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线的回归方程,分别为:TTMP: $y = 0.9323x + 1.8649$ ($R^2 = 0.9993$);2,3,5-TMP: $y = 0.925x + 1.7342$ ($R^2 = 0.9991$);2,5-DMP: $y = 1.1176x + 1.8329$ ($R^2 = 0.9990$);ACT: $y = 0.9123x - 0.8568$ ($R^2 = 0.9987$);2,3-丁二醇: $y = 0.9381x -$

1.3055 ($R^2 = 0.9982$);双乙酰: $y = 0.8483x + 0.1314$ ($R^2 = 0.9984$),结果以 mg/kg 样品(干质量)计。

1.5 数据分析

采用 Origin 2022 绘图;挥发性物质含量数据经标准化处理,用 TBtools 软件绘制热图。

2 结果与分析

2.1 CS1.13 碳氮代谢能力及合成 TTMP 相关基因分析

2.1.1 CS1.13 代谢能力基因组学分析 TTMP 是含 2 个对称氮原子的六元杂环化合物,其生物合成需要充足的碳源及氮源。对贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 的前期研究表明其具有良好的淀粉和蛋白质的水解能力^[13],为 TTMP 的合成提供了丰富的小分子碳源及氮源。为进一步发掘其 TTMP 的积累潜力,采用 COG 注释及 GO 注释从基因组水平对其进行碳、氮代谢能力的研究,结果见图 1 和图 2。

由图 1 可知,COG 数据库共注释到 3 004 个基因,占所预测基因总数的 72.19%。去掉 COG 基因注释中功能未知的基因数量,对剩余基因进行功能分类,注释到 CS1.13 参与氨基酸代谢及转运(Amino acid transport and metabolish)的相关基因 292 个,碳水化合物代谢及转运(Carbohydrate transport and metabolish)的相关基因 224 个,转录(Transcription)相关基因 236 个。除未知功能基因外,上述 3 类已知功能基因位居注释基因数量的前三,分别占 12.98%,9.96%,10.49%,表明 CS1.13 具有较完善的碳水化合物及氨基酸代谢途径,能够提供充足的碳源和氮源,具有 TTMP 生物合成的基础能力。

由图 2 可知,GO 数据库共注释到 2 765 个基因,占预测基因总数的 66.45%。其中归类为膜的整体组成(Integral component of membrane)、ATP 结合(ATP binding)、氧化-还原过程(Oxidation-reduction process)、细胞质(Cytoplasm)、DNA 结合(DNA binding)和细胞质膜(Plasma membrane)的基因数量最多,分别为 837,322,302,280,262,196 个基因,占注释基因总数的 72.19%,7.74%,7.26%,6.73%,6.30%,4.71%,说明 CS1.13 在物质跨膜运输、维持胞内渗透压平衡等功能上有明显

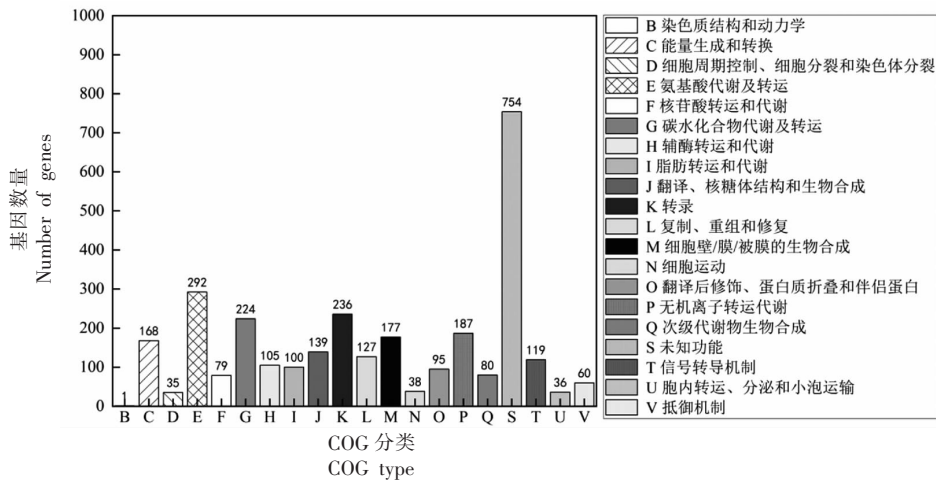


图1 COG注释分类统计图

Fig.1 COG annotation classification statistics chart

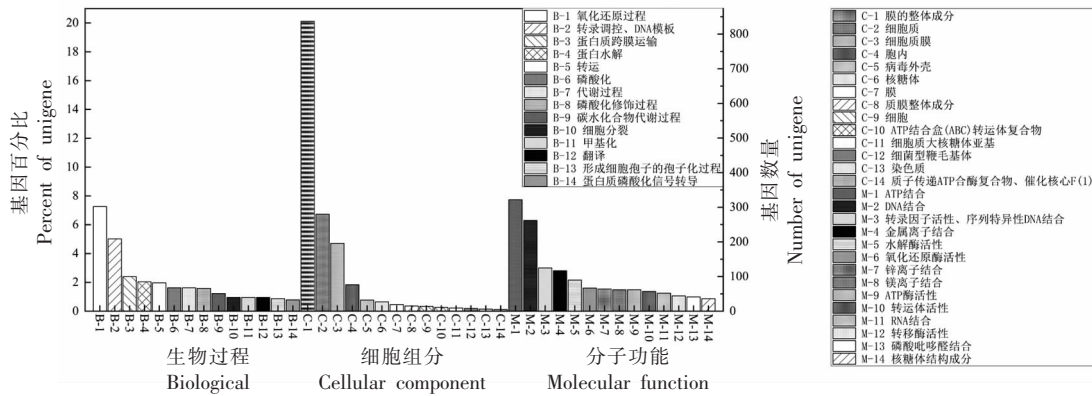


图2 GO注释分类统计图

Fig.2 GO annotation classification statistics chart

优势。加之能分泌大量胞外淀粉酶及蛋白酶,其作用产生充足的小分子碳源及氮源能顺利进入胞内,为TTMP生物合成提供底物。

2.1.2 CS1.13 碳水化合物活性酶基因组学分析
CAZy 数据库是关于合成或分解复杂碳水化合物和糖复合物的一个酶类数据库,为了更详细了解贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 的碳水化合物降解能力,利用 CAZy 数据库对 CS1.13 编码的碳水化合物活性酶基因进行注释,结果见表 1。CS1.13 编码碳水化合物活性酶基因共 122 个,其中编码糖苷水解酶基因数量最丰富,其次是糖基转移酶和碳水化合物酯酶,这 3 种基因分别占碳水化合物活性酶基因总数的 36.07%,31.15%,23.77%。糖苷水解酶作用于碳水化合物之间的糖苷键,将大分子多糖水解为小分子糖,为 CS1.13 提供可发酵性糖,从

表 1 碳水化合物活性酶注释详情表

Table 1 Table of details of carbohydrate-active enzyme annotation

分类	基因数量/个
辅助氧化还原酶	7
碳水化合物结合模块	1
碳水化合物酯酶	29
糖苷水解酶	44
糖基转移酶	38
多糖裂合酶	3
合计	122

而更有利于 TTMP 的合成。

2.1.3 CS1.13 合成 TTMP 通路分析 KEGG 数据库中丰富的通路信息有助于从系统水平了解 CS1.13 合成 TTMP 相关基因的生物功能。使用 Di-

amond 比对软件对 CS1.13 合成 TTMP 通路相关基因进行对比注释,结果见图 3(方框内为基因注释到的 TTMP 合成相关通路)。从图 3 可以看出,CS1.13 的丁酸代谢途径中被注释到完整的 TTMP 关键底物——ACT 的代谢通路。其中 24 个基因参与丁酸代谢,包括与 ACT 合成直接相关的乙酰乳酸合酶基因(*IlvB*)和乙酰乳酸脱羧酶基因(*AlsD*),以及代谢支路中可能影响 ACT 产量的丁二醇脱氢酶基因/双乙酰还原酶基因(*ButB*)。通过 KEGG 注释可以预测贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13ACT 的代谢途径是由葡萄糖经糖酵解生成丙酮酸,再由乙酰乳酸合成酶缩合合成乙酰乳酸,最后通过乙酰乳

酸脱羧酶脱羧形成 ACT。该合成途径为 CS1.13 在氨/铵及质子供体存在下缩合 ACT 形成 TTMP 提供了物质基础。除此外,基因信息还注释到 2,3,5-TMP 及 2,5-DMP 的前体物质氨基丙酮的合成通路。从图 3 可以看出 L-苏氨酸经苏氨酸脱氨酶生成 L-2-氨基乙酰乙酸,L-2-氨基乙酰乙酸通过非酶促反应可直接生成氨基丙酮,这为 CS1.13 合成 2,3,5-TMP 及 2,5-DMP 提供了理论基础。在 CS1.13 注释到的 L-苏氨酸代谢通路中还发现苏氨酸脱氨酶,L-苏氨酸经苏氨酸脱氨酶生成 α -酮丁酸,并产生 TTMP 合成所需要的氨,证明氨基酸代谢可为 TTMP 合成提供氨基供体。

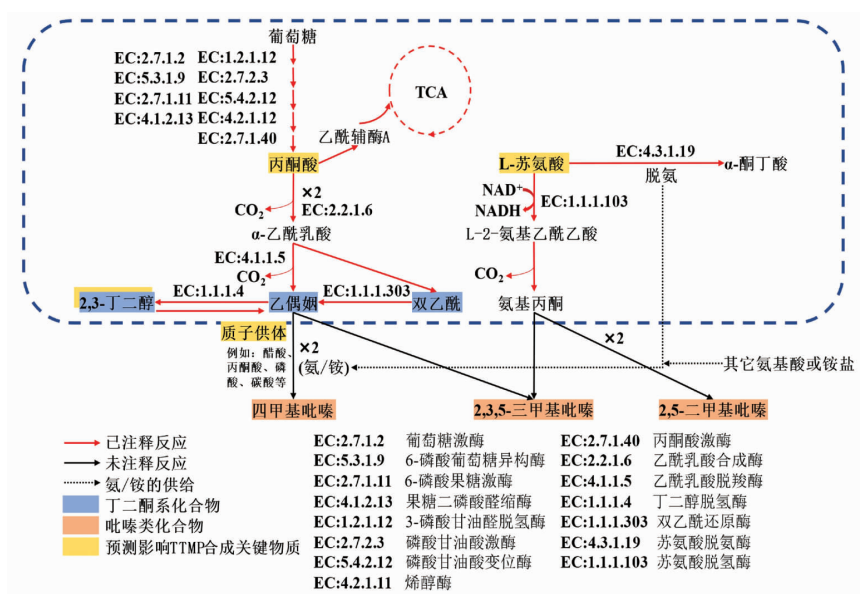


图 3 菌株 CS1.13 中 KEGG 注释的 ACT 生物合成通路

Fig.3 ACT biosynthetic pathway of KEGG annotation in strain CS1.13

2.2 CS1.13 发酵过程参数变化及 TTMP 合成情况分析

TTMP 是氮杂环化合物,其合成需要充足的碳源及氮源。结合菌株 CS1.13 具有良好的碳氮代谢能力及 TTMP 合成基础的基因注释特征,选择富含蛋白质的豆粕和富含淀粉的小麦作为原料对菌株 CS1.13 进行 TTMP 发酵研究,其发酵过程参数变化及 TTMP 的积累见图 4 和图 5。

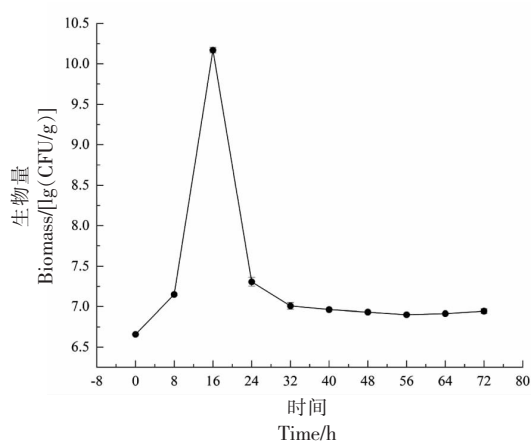
由图 4 可知,发酵 0~16 h 时生物量快速升高,最高达 1.48×10^{10} CFU/g;发酵 16~32 h 时,生物量快速降低,pH 也从开始的 6.69 降至 5.92,推测

可能是酸性环境不利于 CS1.13 的生长;发酵 32~72 h 时,pH 变化较小,维持在 5.80 左右,生物量维持在 10^7 CFU/g 左右。总酸含量在整个发酵过程中持续升高,不仅利用部分碳源,而且造成 pH 值降低。过酸的环境不利于 TTMP 的合成,豆粕中氮源丰富,充足的氮源降解生成氨基酸,而氨基酸脱氨作用产生的氨既为 TTMP 的合成提供了氮源,又中和了部分酸性物质,缓和碳源降解过程中形成的有机酸导致 pH 值下降带来的不利影响,从而保证菌株 CS1.13 积累产物所需的生物量。

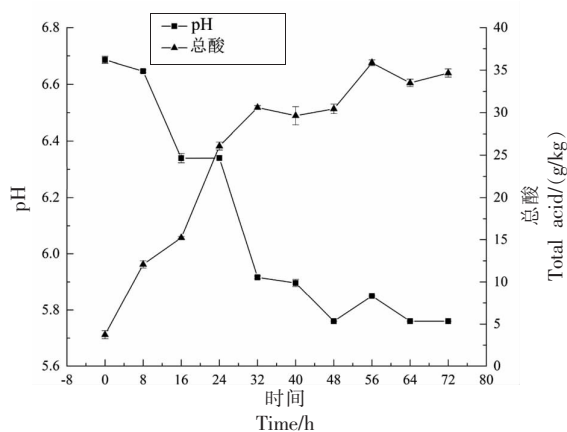
由图 5a 可知,发酵 0~16 h 时,还原糖从

12.16 g/kg 快速升至最高值 141.99 g/kg,分析原因是 CS1.13 快速增殖,产生大量的胞外淀粉酶,促进淀粉的分解;发酵 16~72 h 时,还原糖开始波动并趋于稳定,这主要是由于还原糖的生成和消耗达到动态平衡的结果;总糖含量则由发酵开始时的 528.90 g/kg 降至 416.99 g/kg,说明 CS1.13 将原料中的淀粉水解成可发酵性糖并利用可发酵性糖,CS1.13 碳代谢的通畅为 TTMP 合成提供了碳

架供体,同时也证实基因注释的结果。由图 5b 可知,发酵 0~72 h,氨基酸态氮含量一直上升,最高达 11.87 g/kg。氨基酸态氮的不断积累为 TTMP 的生成提供了部分氨基供体,因此发酵过程中 TTMP 处于持续积累状态,72 h 时产量最高,为 159.86 mg/kg。可以看出,CS1.13 的氮代谢能力对 TTMP 积累起良好的支撑作用,证实基因注释的氮代谢特征。



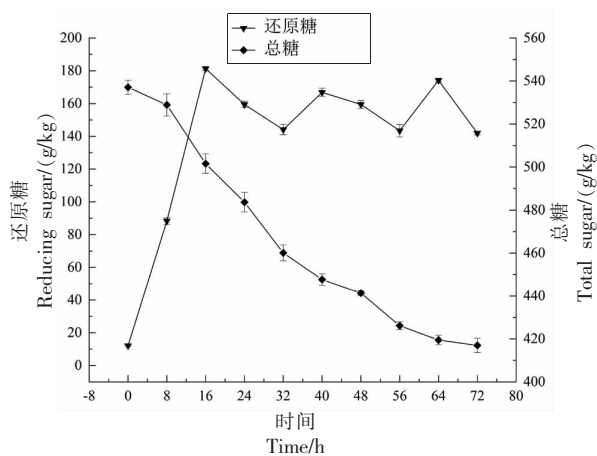
(a) 发酵过程中生物量变化



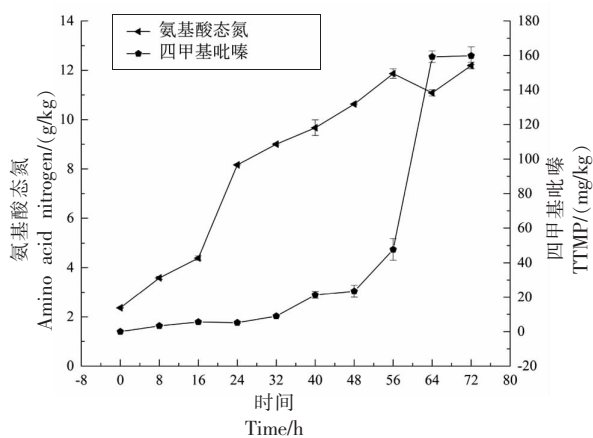
(b) 发酵过程中 pH 及总酸变化

图 4 发酵过程中生物量、pH 及总酸变化

Fig.4 The changes of biomass, pH and total acid during fermentation



(a) 发酵过程中还原糖、总糖含量变化



(b) 发酵过程中氨基酸态氮、TTMP 含量变化

图 5 发酵过程中还原糖、总糖、氨基酸态氮及 TTMP 含量变化

Fig.5 The changes of reducing sugar, total sugar, amino acid nitrogen and TTMP content during fermentation

2.3 CS1.13 TTMP 生物合成的发酵调控

根据 KEGG 注释到的 TTMP 合成通路 (见图 3), 可以发现苏氨酸不仅是 2,5-DMP 及 2,3,5-TMP 合成的前体——氨基丙酮的重要供体物质,

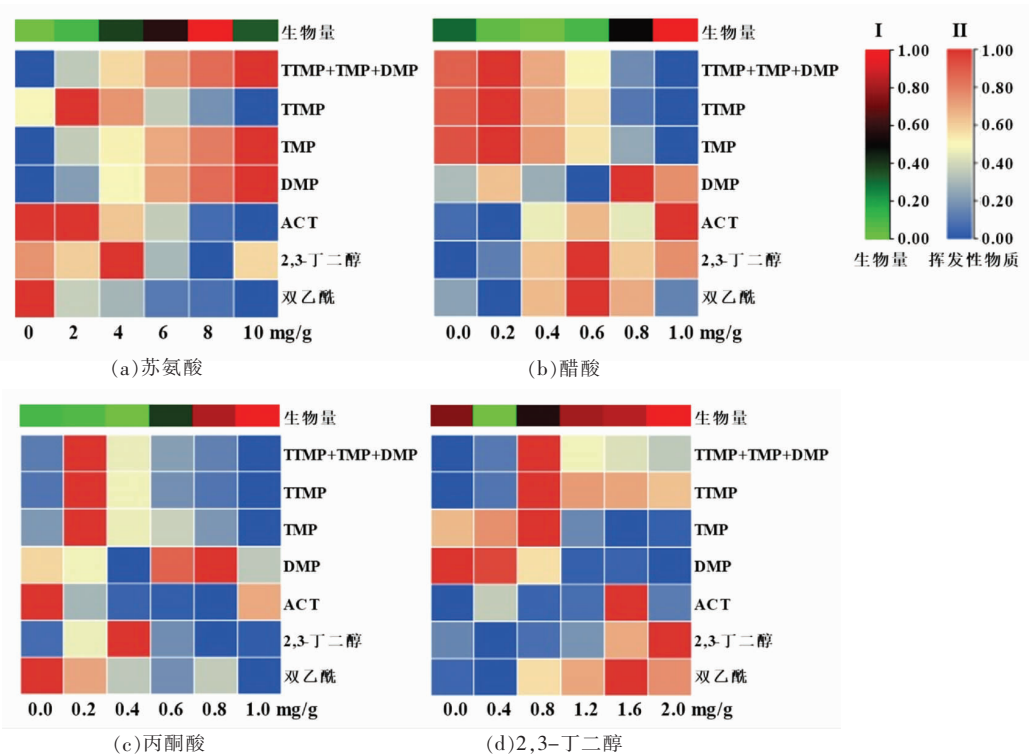
而且苏氨酸可以通过苏氨酸脱氨酶为 TTMP 供给氨基,促进 TTMP 的合成。有文献报道^[26-27],ACT 和氨基进一步反应生成 Schiff 碱(氨基酮)的过程需要质子供体参与,可以选择常见的质子供体——醋酸、

丙酮酸来探索其对 TTMP 生成的促进作用。此外, KEGG 注释到丙酮酸还可作为 α -乙酰乳酸的前体, 促进 ACT 的生成, 从而提高 TTMP 的积累量。从 KEGG 注释到的 CS1.13 ACT 合成通路中发现, 2,3-丁二醇可通过 2,3-丁二醇脱氢酶与 ACT 互相转化, 进而影响 TTMP 的合成。综上, 选择苏氨酸、醋酸、丙酮酸及 2,3-丁二醇作为发酵调控物质来探究其对 TTMP 积累的影响。

添加苏氨酸的发酵结果如图 6a 所示。随着苏氨酸添加量的增多, TTMP 含量增加, 当添加量为 2 mg/g 时, TTMP 含量达最高值 370.10 mg/kg, 较对照组提高了 32.82%, 其原因可能是由于苏氨酸通过苏氨酸脱氢酶作用生成氨, 2 分子 ACT 在氨存在下缩合生成 TTMP, 促进 TTMP 的积累。随着苏氨酸添加量的增多, TTMP 含量开始下降, 而 2,5-DMP 及 2,3,5-TMP 含量持续增加, 最高分别达 1029.57 mg/kg 和 542.89 mg/kg, 分析原因是苏氨酸通过苏氨酸脱氢酶作用生成 *L*-2-氨基乙酰乙酸, 进一步

生成氨基丙酮, 氨基丙酮可以自发脱水缩合生成 3,6-二氢-2,5-二甲基吡嗪, 后者很容易被氧化生成 2,5-DMP^[28-29], 这时 2,5-DMP 积累量上升; 同时, 氨基丙酮也可与 ACT 生成的 2-氨基-3-丁酮经脱水缩合成 2,3,5-TMP, 从而提高 2,3,5-TMP 产量。由于较多的 ACT 及氮源被 2,5-DMP 与 2,3,5-TMP 所利用, 最终影响 TTMP 的合成, 导致 TTMP 含量降低。随着苏氨酸添加量的增加, 3 种吡嗪积累量之和与 CS1.13 生物量也随之增加, CS1.13 的生物量由 5.70×10^9 CFU/g 增至 1.20×10^{10} CFU/g, 说明适量添加苏氨酸有利于 CS1.13 的生长及吡嗪类物质的积累。

添加醋酸的发酵结果如图 6b 所示。当醋酸添加量为 0.2 mg/g 时, TTMP 含量最高达 307.34 mg/kg, 较对照组提高了 10.30%, 可能是由于添加少量醋酸, 提供了质子供体, 促进 ACT 和氨反应, 同时醋酸为发酵培养基增加了碳源, 从而提高了 TTMP 的积累量。随着醋酸添加量的增多, TTMP



注: 标尺 I 表示通过 0-1 标准化 ($\frac{X-X_{\min}}{X_{\max}-X_{\min}}$) 后的生物量 [lg(CFU/g)], 标尺 II 表示通过 0-1 标准化 ($\frac{X-X_{\min}}{X_{\max}-X_{\min}}$) 后的挥发性物质含量 (mg/kg)。

图 6 关键物质添加对 TTMP 生物合成途径中生物量及各物质产量的影响

Fig.6 Effects of key substances addition on the biomass and yield of substances in TTMP biosynthesis pathway

含量降低,3种吡嗪积累量之和也随之降低,生物量呈持续增加,主要是因为酸性环境不利于 TTMP 生成,而从生物量的变化情况看,酸性环境未造成 CS1.13 生物量下降。

添加丙酮酸的发酵结果如图 6c 所示。当丙酮酸添加量为 0.2 mg/g 时,TTMP 含量最高达 781.69 mg/kg,较对照组提高了 222.46%,其原因是由于丙酮酸是 α -乙酰乳酸的前体,其促进乙酰乳酸和 ACT 的合成,同时丙酮酸也为 TTMP 的合成提供质子供体,从而提高了 TTMP 的积累量。随着丙酮酸添加量的增多,TTMP 含量降低,3种吡嗪积累量之和也随之降低,生物量持续增加,再次说明酸性环境对 CS1.13 TTMP 的合成不利。

添加 2,3-丁二醇的发酵结果如图 6d 所示。随着 2,3-丁二醇添加量的增多,TTMP 含量增加,当添加量为 0.8 mg/g 时,TTMP 产量最高达 632.54 mg/kg,较对照组提高了 160.93%,其原因是 2,3-丁二醇脱氢酶催化 2,3-丁二醇与 ACT 的可逆平衡反应,少量添加 2,3-丁二醇促进平衡,利于 ACT 的积累,进而提高了 TTMP 的积累量。随着 2,3-丁二醇添加量的增多,TTMP 产量开始降低,然而,较对照组仍有所提高,此时 ACT 积累,反馈调节了乙酰乳酸合成 ACT 的途径,过量的 ACT 则流向双乙酰的合成,导致双乙酰含量增加,而 3 种吡嗪积累量之和也呈先升后降的趋势。适量添加 2,3-丁二醇有利于增加 CS1.13 的生物量。

3 结论

在完成贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 全基因测序的基础上,对其进行 COG、GO、碳水化合物活性酶注释,结果发现 CS1.13 参与氨基酸代谢及转运、碳水化合物代谢及转运,编码糖苷水解酶基因丰富,结合发酵过程中还原糖、总糖、氨基酸态氮及 TTMP 含量等变化,说明 CS1.13 具有良好的碳源及氮源代谢能力及 TTMP 合成潜力。KEGG 注释 TTMP 关键前体物质 ACT 的代谢通路,预测 CS1.13 生物合成 TTMP 及其相关产物的途径,筛选苏氨酸、醋酸、丙酮酸及 2,3-丁二醇等关键物质,并研究其 TTMP 生物合成的调控,结果发现随着上述物质添加量的增加,CS1.13 的 TTMP 积累量呈先升后降的趋势,除氨基供体苏氨酸外,碳架供体

醋酸、丙酮酸或 2,3-丁二醇在较低浓度下更利于 3 种吡嗪 (TTMP、2,5-DMP 及 2,3,5-TMP) 的积累,过多的碳架供体反而有利于丁二酮系化合物的积累。基因注释与发酵试验的结合证实贝莱斯芽胞杆菌 CS1.13 的 TTMP 生物合成途径及其部分调控特征,这为进一步提高菌株 TTMP 等吡嗪类物质积累提供了一条可行的途径。随着代谢组学方法的发展,将进一步明晰 TTMP 的生物合成途径,为其高效积累提供更为系统的调控方案。

参 考 文 献

- [1] FANG Y M, LI R, CHU Z, et al. Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(8): 4121-4133.
- [2] XIAO Z J, HOU X Y, LYU X, et al. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 106.
- [3] MULLER R, RAPPERT S. Pyrazines: Occurrence, formation and biodegradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(5): 1315-1320.
- [4] XU Y Q, WU M Q, NIU J L, et al. Characteristics and correlation of the microbial communities and flavor compounds during the first three rounds of fermentation in chinese sauce-flavor Baijiu[J]. Foods, 2023, 12(1): 207.
- [5] ZHANG X L, ZHANG X R, YAN Y H, et al. Relationship between flavor compounds and changes of microbial community in the solid fermented vinegar[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2022, 86(11): 1581-1589.
- [6] GUO S K, CHEN K J, QIAN Z H, et al. Tetramethylpyrazine in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. Planta Medica, 1983, 47(2): 89.
- [7] LIAO S L, KAO T K, CHEN W Y, et al. Tetramethylpyrazine reduces ischemic brain injury in rats[J]. Neuroscience Letters, 2004, 372(1): 40-45.
- [8] BHARDWAJ P, KHANNA D. Green tea catechins: Defensive role in cardiovascular disorders[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(4): 345-353.
- [9] ZHOU Z L, JIAN D Z, GONG M, et al. Charac-

- terization of the key aroma compounds in aged Zhenjiang aromatic vinegar by gas chromatography–olfactometry–mass spectrometry, quantitative measurements, aroma recombination and omission experiments[J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109434.
- [10] SHI X S, ZHAO S M, CHEN S X, et al. Tetramethylpyrazine in Chinese baijiu: Presence, analysis, formation, and regulation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1004435.
- [11] 冯云子, 周婷, 吴伟宇, 等. 酱油风味与功能性成分研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(4): 14–28.
- FENG Y Z, ZHOU T, WU W Y, et al. Research progress on flavor and functional components of soy sauce[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(4): 14–28.
- [12] 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.
- XU Y, WU Q, FAN W L, et al. The discovery & verification of the production pathway of tetramethylpyrazine (TTMP) in Chinese liquor[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2011(7): 37–40.
- [13] 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 & Biotechnology*, 2010, 37(2): 179–186.
- [14] 吴博华, 蒋雪薇, 张金玉, 等. 促酱醪发酵芽胞杆菌的筛选及应用[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.
- [15] SONGHEE M, YEONJIN P, INCHEOL K, et al. Isolation and characterization of *Bacillus velezensis* SS360–1 from seed soy sauce[J]. *The Korean Journal of Community Living Science*, 2018, 29(1): 49–58.
- [16] LING H Z, SHI H L, CHEN X C, et al. Detection of the microbial diversity and flavour components of northeastern Chinese soybean paste during storage[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131686.
- [17] JIANG Y J, LV X C, ZHANG C, et al. Microbial dynamics and flavor formation during the traditional brewing of *Monascus vinegar*[J]. *Food Research International*, 2019, 125: 108531.
- [18] 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.
- [19] KIM Y, KOH I, LIM M Y, et al. Pan-genome analysis of *Bacillus* for microbiome profiling [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10984–10989.
- [20] 张和平, 于洁. 乳酸菌基因组学研究新进展[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(2): 1–8.
- ZHANG H P, YU J. New progress on the genomics of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(2): 1–8.
- [21] CHANDRIMA B, UTPAL B, IVY M, et al. Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 411.
- [22] 沈萍, 陈向东. 微生物学试验[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2018: 104–106.
- SHEN P, CHEN X D. *Microbiology experiments*[M]. 5th edition. Beijing: Higher Education Press, 2018: 104–106.
- [23] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定: GB 5009.7–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National standard for food safety determination of reducing sugar in foods: GB 5009.7–2016[S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2016.
- [24] 武平, 赵文婧, 徐晓娇, 等. 测定葡萄酒中总糖方法的探讨[J]. *中国酿造*, 2011(1): 163–165.
- WU P, ZHAO W J, XU X J, et al. Methods for determination of total sugar content in wine[J]. *China Brewing*, 2011(1): 163–165.
- [25] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定: GB 5009.235–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National standard for food safety determination of

- amino acid nitrogen in food: GB 5009.235-2016 [S]. Beijing: China Quality and Standards Press, 2016.
- [26] HUANG T C, FU H Y, HO C T. Mechanistic studies of tetramethylpyrazine formation under weak acidic conditions and high hydrostatic pressure [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(1): 240-246.
- [27] HUANG T C. Combined effects of a buffer and solvent on tetramethylpyrazine formation in a 3-hydroxy-2-butanone/ammonium hydroxide system [J]. *Bio-science Biotechnology and Biochemistry*, 1997, 61(6): 1013-1015.
- [28] 曹艳丽, 张丽杰, 徐岩. 以 *L*-苏氨酸为发酵底物的 2,5-二甲基吡嗪高产菌株构建 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(1): 1-10.
- CAO Y L, ZHANG L J, XU Y. Biosynthesis of 2, 5-dimethylpyrazine from *L*-threonine by a metabolically engineered strain [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(1): 1-10.
- [29] ROBACKER D C, ALUJA M, BARTELT R J. Identification of chemicals emitted by calling males of the sapote fruit fly, *Anastrepha serpentina* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2009, 35(5): 601-609.

Analysis of TTMP Biosynthesis Relation Genes in *Bacillus velezensis* CS1.13 and Its Fermentation Regulation

Bai Lijun¹, Lan Qingsong¹, Zhang Xuxu¹, Lu Ziyao¹, Fang Haiyu¹, Liu Jun^{1,2}, Yu Yanchun^{2,3}, Jiang Xuwei^{1,2*}

¹School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114

²Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for Condiment Fermentation, Changsha 410600

³Jiajia Food Group Co. Ltd., Changsha 410600)

Abstract In order to characterize the biosynthetic pathway of 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine (TTMP) in *Bacillus* spp., the whole-genome information of *Bacillus velezensis* CS1.13 screened from high-salt liquid-state moromi was annotated, and its TTMP biosynthetic pathway and regulatory characteristics were studied in combination with solid-state fermentation. The results show that CS1.13 is rich in genes involved in amino acid metabolism and transport, carbohydrate metabolism and transport and coding glycoside hydrolase by COG, GO and carbohydrate active enzyme annotations. And KEGG annotation reveals that CS1.13 has a complete metabolic pathway of Acetoin, a key substrate of TTMP. The solid-state fermentation process revealed that the reducing sugar and amino acid nitrogen contents increased by 53.63 g/kg and 8.28 g/kg, respectively, and TTMP accumulated 159.86 mg/kg at 72 h of fermentation, which proved that CS1.13 has good carbon and nitrogen metabolism ability and TTMP synthesis potential. According to the TTMP synthesis pathway, the key substances such as threonine, acetic acid, pyruvic acid and 2,3-butanediol were selected to study the regulation of TTMP biosynthesis. The maximum accumulation of TTMP was achieved when threonine 2 mg/g, acetic acid 0.2 mg/g, pyruvic acid 0.2 mg/g and 2,3-butanediol 0.8 mg/g were added respectively, which increased 32.82%, 10.30%, 222.46% and 160.93% compared with the control sample. The accumulation of TTMP decreased as the content of the above additive increased. In addition to the amino donor threonine, the accumulation of the three pyrazines (TTMP, 2,5-dimethylpyrazine and 2,3,5-trimethylpyrazine) was favored by the lower concentrations of carbon skeleton donors acetate, pyruvic acid or 2,3-butanediol, and the accumulation of butanedione family compounds was favored by excessive carbon skeleton donors instead, suggesting that the synthesis of TTMP was regulated by the amino donor and carbon skeleton donor. The analysis of TTMP biosynthesis relation genes combined with fermentation regulation explored a feasible and effective way for *Bacillus velezensis* CS1.13 to accumulate TTMP efficiently, which will also lay the foundation for its application in rapid aroma enhancement in Jiang-flavor foods.

Keywords *Bacillus velezensis*; tetramethylpyrazine; gene annotation; fermentation regulation