

增香细菌 HD-7 的鉴定及香气成分分析

吴丽君¹, 梁开朝², 王帆³, 高锐¹, 王毅¹, 段如敏¹, 刘好宝², 张海波³, 白晓莉^{1*}

¹云南中烟工业有限责任公司, 昆明 650202; ²中国烟草总公司海南省公司海南雪茄研究所, 海口 571100;

³中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101

摘要: 产香微生物的研究对天然香料的绿色生产具有深远的意义。本文从醇化中期的烟叶上分离得到一株细菌 HD-7, 根据形态学、生理生化以及 16S rRNA 基因序列等特征, 对产香菌株 HD-7 进行了初步鉴定, 并利用气相色谱-质谱(GC-MS) 联用技术分析其发酵液的成分。结果表明, 菌株 HD-7 初步被鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*); 其 GC-MS 检测出的物质中含有较多的香气物质, 主要的增香成分有丙酸乙酯, 乙酸, 乙酸丙酯及 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)等, 其含量分别占 25.56%, 12.68%, 6.80%, 4.86%。其中丙酸乙酯及 3-羟基-2-丁酮等都是广泛使用的香料。产香细菌 HD-7 在生产香料上具有很大的研究价值。

关键词: 产香细菌; 短小芽孢杆菌; 气相色谱-质谱(GC-MS) 联用技术; 香气物质; 天然香料

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.012

Identification and Key Aroma Compounds Analysis of Strain HD-7

WU Li-jun¹, LIANG Kai-chao², WANG Fan³, GAO Rui¹, WANG Yi¹, DUAN Ru-min¹,

LIU Hao-bao², ZHANG Hai-bo³, BAI Xiao-li^{1*}

¹R&D center of China tobacco Yunnan industrial Co., Ltd, Kunming 650202, China; ²Hainan Cigar

research Institute Hainan Provincial Branch of China National Tobacco Corporation, 571100, China; ³CAS Key Laboratory

of Biobased Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China

Abstract: Aroma-producing microorganisms have considerable promise for producing natural flavors and fragrances in an environment-friendly way. In this study, morphological characterization, physiological and biochemical test, and 16S rDNA sequence analysis were performed to identify aroma-producing strain HD-7. Additionally, the aroma compositions from aroma-producing strain HD-7 fermentation were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The result showed that the strain HD-7 was a *Bacillus pumilus*. A large number of aroma compositions were detected by GC-MS, and the main components included ethyl propionate, acetic acid, n-Propyl acetate, 3-hydroxy-2-Butanone with the contents of 25.56%, 12.68%, 6.80%, 4.86%, respectively, among which the ethyl propionate and 3-hydroxy-2-Butanone were widely used as flavors and fragrances. The aroma-producing strain HD-7 is of great application value for production of natural flavors and fragrances.

Key words: aroma-producing bacteria; *Bacillus pumilus*; gas chromatography-mass spectrometry; aroma compounds; natural flavors and fragrances

如今, 香料香精在食品、饮料^[1], 化妆品^[2], 烟草^[3], 洗涤剂^[4] 和药品^[5] 等诸多领域被广泛应用, 而大多数这些香料分子是通过化学合成或从植物中提取来的。可由于消费者对天然产品的偏爱及人们对环境友好型加工过程的追求, 天然香料行业市场迅猛发展, 也有许多研究者将研究重点放在了天然香料其他生产方法的研发, 如微生物产生天然香料。

近些年来研究较多的产香微生物有酵母菌、细菌、及一些真菌等。申光辉等^[6] 从传统白酒酒曲中分离筛一株异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*), 可产浓郁的果香气味, 经 GC-MS 分析得出其发酵后主要香气成分为苯乙醇、乙酸香叶酯和乙酸异戊酯。林群等发现枯草芽孢杆菌^[7] 及地衣芽孢杆菌^[8] 均可以产生风味物质, 从它们的发酵代谢产物检测出 30 多种致香物质如 2,3-丁二醇、3-羟基-2-丁酮、四甲基吡嗪、1,3-丁二醇、乙酸、丁酸、3-甲基丁酸、丁二酮、愈创木酚等。毛霉属的真菌^[9,10] 也可

以发酵产生多种致香化合物,如 3-羟基-2-丁酮、3-(1,1-二甲基乙基)-噻吩、3,4-二氢-8-羟基-3-甲基异香豆素、1,2-苯甲酸丁基二甲酯等。本研究分别采用形态学观察、生理生化特征表征以及分子生物学鉴定对本实验室分离得到的菌株 HD-7 进行了鉴定,并通过发酵分析了其产香能力。

1 材料与方法

1.1 研究菌株

本研究所用菌株 HD-7 为本实验室从醇化中期的烟叶中分离得到并保藏。

1.2 培养基

LB 固体培养基^[11];LB 液体培养基;发酵培养基(20 g/L 葡萄糖,5 g/L 烟叶粉末,pH 自然)

1.3 产香细菌的初步鉴定

1.3.1 形态特征

菌株形态特征包括群体形态特征及个体形态特征,群体形态特征研究为将菌株 HD-7 接种到 LB 固体平板上,37 °C 倒置培养 12 h 后,观察菌落的大小、形态、颜色、光泽度、粘稠度、隆起形状、透明度、边缘特征;是否产生水溶性色素及菌落的质地、迁移性等。个体形态特征研究为将菌株在 LB 固体平板上培养 12 h 后的菌株染色^[12]后,在显微镜下测量菌体的大小,观察菌体的形状、排列方式或分支情况,观察有无鞭毛及鞭毛着生的部位及数目,有无芽孢和荚膜,有芽孢的细菌需要注意观察芽孢的形状、着生的位置及形成芽孢后芽孢囊膨大与否,观察细菌的革兰氏染色反应及抗酸性染色特性等^[13]。

1.3.2 生理生化特性

菌株的生理生化特性从菌株对碳源和氮源的利用,菌株代谢产物的测定以及菌株在牛乳培养基中生长的反应三个方面展开研究,其主要包括的实验有:过氧化氢酶的测定;动力测试;硝酸盐还原试验,溶菌酶耐性;苯丙氨酸脱氨试验;葡萄糖利用(厌氧);甲基乙酰甲醇(V-P)试验;甘露醇发酵试验;明胶水解试验;淀粉水解试验;石蕊牛乳试验^[12,13]。

1.3.3 分子生物学鉴定

细菌基因组提取应用细菌基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京),并以细菌基因组为模板进行聚合酶链式反应(PCR),PCR 扩增体系(25 μ L):rTaqmix 12.5 μ L,引物 1(27F)0.5 μ L,引物 2(1492R)0.5 μ L,模板 DNA 1.0 μ L,ddH₂O 10.0 μ L。PCR 扩增程序:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性

30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 5 min。其中,PCR 反应所用引物为 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCA-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')并将 PCR 产物,送去华大基因公司测序。

1.4 香气成分提取及 GC-MS 分析

1.4.1 香气成分提取

将增香菌株 HD-7 接种至发酵培养基中 37 °C,180 rmp 振荡培养 5 d 后,将发酵液 5000 rmp 离心 15 min,并分离上清液和沉淀物。上清液用等体积乙酸乙酯萃取,萃取液 35 °C 旋蒸浓缩。取 1 mL 旋蒸后的样品,经无水硫酸钠除水后,过滤并用 GC-MS 检测。

1.4.2 香气成分 GC-MS 分析

香气成分采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析,仪器为美国 Agilent 气相色谱-四级杆质谱联用仪(型号:7890A-5975C)。色谱条件:HP-INNOWAX 毛细管柱(30 mm \times 0.25 mm \times 0.25 μ m),起始柱温为 40 °C,保持 5 min,首先以 5 °C/min 速率升温至 100 °C,再以 13 °C/min 的速率升温至 230 °C,载气为高纯氦气,柱流量为 1.0 mL/min,进样口温度 250 °C,进样量 1 μ L,分流比为 10:1。质谱条件:电离方式为 EI,电子能量 70,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,质量范围 40 ~ 500,定性采用 NIST08.L 标准谱库检索。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株形态特征

将菌株 HD-7 接种到 LB 固体平板上,37 °C 倒置培养 12 h 后,观察其菌落形态:菌落较小,圆形,乳白色,表面凸起且有光泽,半透明,边缘不整齐,不产生色素,质地不均匀。菌株染色后,革兰氏染色阳性,菌体杆状,大小为 0.4 ~ 0.6 μ m \times 1.0 ~ 1.6 μ m,有芽孢,芽孢椭圆形,中生,芽孢囊膨大。

2.1.2 菌株生理生化特征

本研究从三个方面研究了菌株 HD-7 的生理生化特性,结果如表 1 所示。

2.1.3 菌株分子生物学鉴定

根据 16S rRNA 基因序列测序结果(1407 bp),从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中比对出相似性最高(均为 99%)的 100 株菌的相关序列,并且这 100 株菌均为芽孢杆菌属。从 GenBank 数据库中导出相似性高的不同芽孢杆菌属的菌株序

表1 菌株 HD-7 的生理生化特征

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of HD-7

特征 Characteristics	菌株 HD-7 Strain HD-7
革兰氏染色 Gram stain	+
过氧化氢酶 Catalase test	+
动力 Kinetic test	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction test	-
溶菌酶耐性 Lysozyme test	+
葡萄糖利用(厌氧) Glucose utilization test	-
甘露醇利用 Mannitol utilization test	+
V-P 试验 V-P test	+
苯丙氨酸脱氨 Phenylalanine deaminase test	-
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
淀粉利用 Starch utilization test	-
石蕊牛奶 Litmus milk test	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

列,并利用软件 MEGA7.0,以距离依靠法中的邻接法(引导值 > 50%)构建该菌株基因序列系统进化树(图1)。结果表明菌株 HD-7 最相近的菌株是短小芽孢杆菌 3-N-48 (*Bacillus pumilus* strain 3-N-48),结合其形态学特征和生理生化特征,初步判断 HD-7

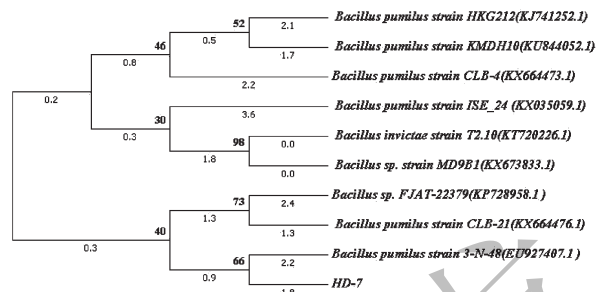


图1 菌株 HD-7 与相关菌种的 16S rRNA 基因序列系统进化树(邻接法)

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of HD-7 and its closest relative species (Neighbor-Joining). Bootstrap values (1,000 replications) > 50%.

为短小芽孢杆菌属的一种。

2.2 香气成分

菌株发酵液经乙酸乙酯萃取后,经 GC-MS 分析,在分离出的化合物中,筛选获得 29 个对香气有贡献的成分(表 2),峰面积百分比占总成分的 61.95%,其主要的增香成分有丙酸乙酯(菠萝香味),乙酸(酸味),乙酸丙酯(柔和水果香)及 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻,奶香味)等,其含量分别占 25.56%,12.68%,6.80%,4.86%。

表2 菌株发酵液中对香气有贡献的化合物

Table 2 The aromatic components produced by HD-7

保留时间(分) Retention time (min)	化合物 Compounds	峰面积百分比 % Area percentage (%)
2.321	Ethanol;乙醇	2.37
2.447	Propanoic acid, ethyl ester;丙酸乙酯	25.56
2.559	n-Propyl acetate;乙酸丙酯	6.80
2.616	2-Pentanone;2-戊酮	0.13
2.65	Acetic acid, 1-methylpropyl ester;乙酸仲丁酯	0.42
3.236	Butanoic acid, ethyl ester;丁酸乙酯	0.07
3.387	1-Propanol;正丙醇	0.07
3.925	Acetic acid, butyl ester;乙酸丁酯	0.43
4.359	1-Propanol, 2-methyl-;2-甲基-1-丙醇	0.28
8.33	1-Butanol, 3-methyl-, formate;甲酸异戊酯	1.14
10.653	2-Butanone, 3-hydroxy-;3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)	4.86
11.156	Acetic acid, methyl ester;乙酸甲酯	0.06
13.979	Octanoic acid, methyl ester;辛酸甲酯	0.04
15.83	Acetic acid;乙酸	12.68
18.153	2,3-Butanediol;2,3-丁二醇	0.43

续表 2(Continued Tab. 2)

保留时间 (分) Retention time (min)	化合物 Compounds	峰面积百分比 % Area percentage (%)
18.782	Propanoic acid, 2-methyl-; 异丁酸	0.25
19.805	Butanoic acid; 正丁酸	0.26
20.061	Triethyl phosphate; 磷酸三乙酯	0.20
20.252	2-Furanmethan; 糠醇	0.06
20.39	Butanoic acid, 3-methyl-; 异戊酸	0.91
21.613	Oxime-, methoxy-phenyl-; 甲氧基苯肼	0.15
21.821	Pentanoic acid, 3-methyl-; 3-甲基-戊酸	0.22
22.593	Benzyl Alcohol; 苯甲醇	0.80
22.901	Phenylethyl Alcohol; 苯乙醇	1.40
23.278	(+)-(Z)-Longipinane; 长叶蒎烷	0.07
24.284	2-Coumaranone; 2-氯杀鼠灵酮	0.18
25.311	Hexadecanoic acid, methyl ester; 十六酸甲酯	0.13
27.466	3-Hydroxy-. beta. -damascone; 3-羟基-β-二氢大马酮	0.77
27.652	Benzeneacetic acid; 苯乙酸	1.21

3 讨论

本研究从醇化中期的烟叶中分离出一株细菌 HD-7。分子生物学鉴定其与 100 多种芽孢杆菌的相似度都可高达 99%，进一步通过系统进化树分析表明，HD-7 与短小芽孢杆菌 3-N-48 (*B. pumilus* strain 3-N-48) 的亲缘性最高，并结合 HD-7 革兰氏染色阳性，菌体杆状，大小为 0.4 ~ 0.6 μm × 1.0 ~ 1.6 μm，有芽孢，芽孢椭圆形，中生，芽孢囊膨大等形态学特征，以及其不水解淀粉，不还原硝酸盐为亚硝酸盐等生理生化特性^[13]，初步鉴定 HD-7 是短小芽孢杆菌的一种，其确切的种属有待进一步实验研究。

芽孢杆菌可以产生香气物质的报道屡见不鲜，其可产生的香气物质也较为丰富。钟姝霞等^[14]从酱香型酒醅中筛选出包括蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、泛酸枝芽孢杆菌 (*Virgibacillus pantothenicus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 5 株芽孢杆菌，通过 GC-MS 分析了这五株菌的发酵产物，结果表明其主要香气物质为 3-羟基-2-丁酮，另外还有一些的 2,3-丁二醇和酯类等芳香物质。同样 Gu^[15] 等人将两株芽孢杆菌 (*Bacillus vanillea* XY18 和 *B. subtilis* XY20) 接种到香草豆上发酵后，发现其比不接这两种菌的发酵香草豆中的香草醛高

出很多倍，而且还发现接种两株芽孢杆菌的发酵香草豆中丁酸及 2,3-丁二醇的含量也会提高。菌株 HD-7 可利用烟叶产生 10 余种已知的日化和食用香精香料物质，其中丙酸乙酯，乙酸，乙酸丙酯及 3-羟基-2-丁酮含量较高，约占总挥发性成分的 50%，这几种物质是该菌产生的主要香气物质。其中丙酸乙酯为国标规定允许使用的食用香料，广泛用于配制朗姆酒、白酒以及果味和奶油等香味，烟用香精也可用之，亦可用于化妆品和日用化学品等香精中。同样 3-羟基-2-丁酮 (乙偶姻) 也为国标中允许使用的食用香料，其具有奶香味，主要用于配制奶油、乳品、酸奶和草莓等型香料，也可直接用于奶制品中，在酒类产品的调香中也用的比较广泛^[16]。丙酸乙酯以及乙偶姻等广泛使用的香料，现主要合成方式为化学合成法，因此，产香菌株 HD-7 在微生物发酵生产天然混合香料方面具有极大的研究前景，可进一步研究利用。

参考文献

- Li CY (李春燕), Feng AG (冯爱国). Research progress and application of edible natural spices [J]. *Agricultural Engineering* (农业工程), 2014, 4 (3): 81-81.
- Wang D (王丹), Xie XL (谢小丽), Hu X (胡璇), et al. Application of natural fragrance in cosmetics [J]. *Progress in Modern Biomedicine* (现代生物医学进展), 2013, 13: 6189-

- 6193.
- 3 Xue Y (薛云), Bai JF (白家峰), Yan J (严俊), *et al.* Overview of tobacco flavor [J]. *Light Industry Science and Technology* (轻工科技), 2015, (10): 11-13, 21.
 - 4 Li M (李明), Wang PY (王培义), Tian HX (田怀香). Flavors and fragrances application base (香料香精应用基础) [M]. Beijing: China Textile and Apparel Press, 2010: 169-175.
 - 5 Fang SF (方善芬). The development of natural flavors [J]. *Ningbo Chemical Industry* (宁波化工), 1995, (1): 31-34.
 - 6 Shen GH (申光辉), Li M (黎梅), Wang Y (王玥), *et al.* Screening and identification of aroma-producing yeast strains for low-alcohol watermelon wine and characterization of aromatic compounds [J]. *Food & Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 2016, 42: 103-108.
 - 7 Lin Q (林群), Dong S (董胜), Fu QX (付秋香), *et al.* Isolation of aroma-producing *Bacillus subtilis* and analysis of its fermentation metabolites [J]. *Liquor-Making Sci Tech* (酿酒科技), 2013, (11): 30-32.
 - 8 Lin Q (林群), Xiao ZT (肖之陶), Fu QX (付秋香), *et al.* Isolation of aroma-producing *Bacillus licheniformis* and analysis of its fermentation metabolites [J]. *Liquor-Making Sci Tech* (酿酒科技), 2013, (12): 49-52.
 - 9 Wang LJ (王丽娟), Liu SM (刘苏萌), Chu MZ (楚明忠). Isolation and identification endophytic fungi from *Lilium Siberia* and analysis of volatile components [J]. *Food Industry* (食品工业), 2013, 34: 203-205.
 - 10 Wang LJ (王丽娟), Tao J (陶静), Chen YL (陈玉龙). Isolation and identification endophytic fungi from ginger and analysis of volatile components [J]. *China Condiment* (中国调味品), 2012, 37: 99-102.
 - 11 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (分子克隆实验指南) [M]. Beijing: Science Press Co. Ltd., 2002: 1595.
 - 12 Dong XZ (东秀珠). *Taxonomic Outline of Common Bacteria* (常见细菌系统鉴定手册) [M]. Beijing: Science Press Co. Ltd., 2001: 353-387.
 - 13 Zhang JZ (张纪忠). *Microbial Taxonomy* (微生物分类学) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1990: 93-109.
 - 14 Zhong SX (钟姝霞), Deng J (邓杰), Wang WP (汪文鹏), *et al.* Isolation, identification, and metabolite analysis of aroma-producing *Bacillus spp.* from maotai-flavor fermented grains [J]. *Modern Food Science and Technology* (现代食品科技), 2017, 4 (33): 89-95.
 - 15 Gu F, Chen Y, Fang Y, *et al.* Contribution of *Bacillus* isolates to the flavor profiles of vanilla beans assessed through aroma analysis and chemometrics [J]. *Molecules*, 2015, 20: 18422-18436.
 - 16 Zhen DS (甄德帅). On the Current Chemical Synthesis Techniques of Acetoin Flavor [J]. *J Qiannan Normal Coll National* (黔南民族师范学院学报), 2015, 4: 121-124.

(上接第 285 页)

- 11 Xiang YY (向玉勇), Liu KZ (刘克忠), Yin PF (殷培峰), *et al.* The biological characteristics of Honeysuckle Geometrid in Anhui province [J]. *J Chuzhou Uni* (滁州学院学报), 2010, 12(5): 35-37.
- 12 Ni YX (倪云霞), Liu XT (刘新涛), Liu YX (刘玉霞), *et al.* Pesticide control to *Heterolocha jinyinhuaephaga* Chu [J]. *J Henan Agri Sci* (河南农业科学), 2006, 12: 78-79.
- 13 Li RF (李润丰), Diao HJ (刁华娟), Peng YS (彭友舜), *et al.* Study on the antioxidant activity of polysaccharide from chestnut [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2011, 32(8): 21-25.
- 14 Zhao AY (赵爱云), Hu BL (胡博路), Hang H (杭瑚), *et al.* The primary study on antioxidant activity of some plants [J]. *Nat Pro Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(3): 42-44.
- 15 De Camargo AC, Vieira TMFDS, Regitano-D' Arce MAB, *et al.* Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants [J]. *Inter J Mole Sci*, 2012, 13: 3073-3084.
- 16 Sun YJ (孙玉军), Chen Y (陈彦), Wang SH (王松华), *et al.* Study on antioxidant activity of polysaccharide from carrot (*Daucus carota var. sativa*) *in vitro* [J]. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 2011, 32: 403-406.
- 17 Bhattacharya U, Mukhopadhyay S, Giri AK. Comparative anti-mutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins [J]. *Nutri Cancer*, 2011, 63: 1122-1132.
- 18 Ye H (叶辉), Yu JP (郁建平). The Preliminary studies on antioxidation of three kinds of flavonoids from *Litsea coreana* [J]. *Chin Med* (中药材), 2004, 27: 113-115.
- 19 Liu JH (刘锦红). Effects of gledge tea to blood sugar and blood fat of rats [J]. *Chin J Prac Chin Mode Med* (中华实用中西医杂志), 2003, 16: 2057-2058.
- 20 Chinese Pharmacopoeia Commission (中华人民共和国卫生部药典委员会). *Pharmacopoeia of People's Republic of China* [M]. Beijing: The People's Medical Press, 1990: 190.