

一株酯化酶细菌的分离、鉴定及代谢产物特征

黄丹, 方春玉, 储玉龙, 尚志超, 杨伟

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 研究不同培养条件下酯化酶细菌的代谢产物特征。从浓香型大曲中分离得到一株产酯化酶细菌, 用 Biolog 微生物自动分析系统进行鉴定, 改变发酵时间、发酵初始 pH 值和培养温度等培养条件, 用乙醇对发酵液进行萃取, 并用气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 对其进行鉴定分析。结果表明: 该菌株为嗜热葡糖苷酶芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidasius*)。随着培养时间的延长, 甲醇及各种高级醇逐渐减少甚至消失, 而酯类物质则逐渐增加; 随发酵初始 pH 值的增加, 酸类物质有所减少, 在 pH 为 7.5 时, 产生了较多的酯类物质, 但乙酸、3-羟基-2-吡酮、乙醛和 3-甲基-1-醇等代谢产物不会随发酵初始 pH 值变化而变化; 随着培养温度的升高, 酸类物质和醇类物质的种类有所增加, 当培养温度为 35℃ 时, 产生更多的酯类物质。

关键词: 浓香型大曲; 酯化酶; 细菌; 鉴定; 代谢产物

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

白酒的主要成分是酒精和水 (占总量的 98% - 99%), 但决定白酒质量和风格的却是众多微量 (占总量的 1% - 2%) 的呈香呈味有机化合物。白酒中香气成分除来自于粮食、糟醅和窖香外, 还有一个重要来源就是大曲。在大曲的生产过程中, 微生物群落发生了复杂的演替和变化, 这些微生物除了分泌各种各样的酶系以催化窖内的多种反应外, 还直接产生许多芳香性物质, 这些芳香性物质对酒的香气成分必然有所贡献^[1]。可见大曲微生物复杂的代谢产物构成了曲香, 并经蒸馏进入酒体, 从而影响到白酒品质。

大曲微生物种类繁多, 其中酯化酶产生菌对浓香型大曲而言是一类重要的功能菌, 所产生的酯化酶能将己酸 (窖泥功能菌代谢) 与乙醇 (糟醅体系代谢) 缩合生成己酸乙酯 (泸型大曲酒主体香味物质), 同时它还直接产生一些复杂的代谢产物经蒸馏进入酒体, 影响到白酒风味及品质。因此研究酯化酶产生菌不同培养条件下的代谢产物特征, 有助于了解其各种有益成分和有害成分的产生条件和机制, 有利于进一步提高白酒品质。而目前对泸型大曲酯化酶产生菌的研究主要局限在其种群以及产酶条件的了解, 所以, 对其代谢产物进行研究, 具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大曲

浓香型大曲, 由四川某浓香型酒厂提供。

1.1.2 培养基

分离培养基^[2]: 牛肉膏 3g 蛋白胨 10g NaCl 15g 琼脂 20g 水 1000mL, 三丁酸甘油酯 0.4%, pH 7.4-7.6

发酵培养基: 葡萄糖 1g 蛋白胨 1g K_2HPO_4 0.1g $MgSO_4$ 0.05g $FeSO_4$ 0.001g KCl 0.05g $MnSO_4$ 0.03g pH 7.4-7.6

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

将大曲研细成粉, 称取 25g 于 225mL 无菌生理盐水中, 用玻璃珠打散, 浸泡 30min, 取 1mL 上清液加入 9mL 无菌生理盐水中, 配制成 10^{-2} 菌悬液。依次类推, 配制成 10^{-3} 、 10^{-4} 、……、 10^{-7} 菌悬液。分别吸取 $0.2mL 10^{-3}$ - 10^{-7} 稀释度菌悬液, 均匀涂布于已冷却至室温的分离培养基平板上, 将接种好的平板置于 37℃ 恒温培养箱中培养 48h, 观察菌落周围出现的透明圈大小, 并测量透明圈直径 (D) 与菌落直径 (d) 之比。选择其比值大且菌落

收稿日期: 2010-03-02

基金项目: 四川省科技厅项目 (09R02); 泸州老窖科研奖学金资助项目 (08ljk11)

作者简介: 黄丹 (1968-), 女, 四川自贡人, 副教授, 主要从事食品工程方面的研究。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

直径也比较大的细菌菌落进行菌株纯化,于筛选平板上划线分离至纯种。

1.2.2 粗酶液的制备

将经摇床发酵培养 48h(37℃, 150r/min)的发酵培养基取出,经 6000r/min 离心 20min 去沉淀,上清液即为粗酶液,置于 4℃冰箱中保存。

1.2.3 酯化酶活力测定^[3]

取 10mL 环己烷、3.65mL 乙醇、6.25mL 己酸(所有试剂每 500mL 加入 30g 无水硫酸钠)以及 0.2mL 酶液,酯化反应在密闭 100mL 锥形瓶中进行,反应温度为 36℃,24h 后,取上清液 0.5mL 于 50mL 锥形瓶中,加入 5mL 水,2 滴酚酞,用 0.05mol/L NaOH 滴定至终点,测定己酸的消耗量。同时采用质谱仪确定所合成的酯类物质。

酶活力单位定义^[4]:在测定条件下每分钟消耗 1 μ mol 己酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.4 菌种分离鉴定:

1.2.4.1 形态鉴定

用放大镜观察菌落的生长、颜色、表面形态、质地和边缘形状等,并对其进行革兰氏染色及芽孢染色。

1.2.4.2 触酶试验

取洁净的载玻片 1 张,用接种环挑取供试细菌,加 3% H₂O₂ 1-2 滴,立即观察结果,若立即出现大量气泡为阳性(好氧或兼性厌氧菌),无气泡为阴性(厌氧菌)。

1.2.4.3 用 Biolog 微生物自动分析系统进行鉴定^[5]

根据革兰氏染色、芽孢染色及触酶试验选择合适的培养基及培养条件进行试验。

Biolog 软件将读取的 96 孔微平板反应结果按照与数据库的匹配程度列出 10 个结果,如果鉴定结果与数据库匹配良好,将显示鉴定的结果在绿色状态栏上;如果鉴定结果不可靠,结果栏为黄色,显示“NO ID”,但仍列出最可能的 10 个结果。每个结果均显示 3 种重要的参数,即可能性(PROB),相似性(SM)和位距(DIS)。DIS 和 SM 是最重要的 2 个值,DIS 值表示测试结果与数据库相应数据条的位距,SM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。Biolog 系统规定:细菌培养 4h-6h 其 SM 值 ≥ 0.75 培养 16h-24h 时,SM 值 ≥ 0.50 系统自动给出的鉴定结果为种名,SM 值越接近 1.00 鉴定结果的可靠性越高;当 SM 值小于 0.5 但鉴定结果中属名相同的结果的 SM 值之和大于 0.5 时,自动给出的鉴定结果为属名。

1.2.5 不同培养条件下分离菌株的代谢产物特征

研究不同培养条件下分离菌株的代谢产物特征。发酵时间为 3d 以培养温度为 36℃,研究不同发酵初始 pH 值(5.5, 7.5, 9.5)下分离菌株的代谢产物;发酵初始 pH 值为 7.5 培养温度为 36℃,研究分离菌株在不同发

酵时间(3d, 6d, 9d)的代谢产物;发酵时间为 3d 发酵初始 pH 值为 7.5 研究不同培养温度(25℃, 35℃, 45℃)下分离菌株的代谢产物。

1.2.5.1 代谢产物样品制备

将菌株活化后接种于液体发酵培养基(30mL)中,150r/min 恒温振荡培养 24h 后,待发酵结束后向发酵液中加入为发酵液 2 倍的 95% 乙醇溶液,在 60℃ 的条件下蒸馏,流出液供 GC-MS 分析。

1.2.5.2 样品的 GC-MS 分析

美国 Agilent GC6890 气相色谱·质谱联用仪,色谱柱:R&W 122-7062 60.0m \times 0.25mm \times 0.25 μ m, 色谱条件:进样口温度 180℃,起始温度 60℃,保留 1.0min,以 5℃/min 升温至 180℃,保留 5min,载气 He 分流比 50:1, 质谱条件:电离方式 EI 电离电压 70eV,恒压 10Pa 连接杆温度 230℃。

2 结果与分析

2.1 菌种分离

通过分离培养基稀释涂布培养,得到了 5 株透明圈较大的不同的细菌菌株,其中透明圈最大的一株其 D/d 可达 2.33 对该菌株进行进一步研究。

2.2 酯化酶测定

经测定,该菌株的酯化酶活力为 11.46U/mL,可见,该菌株为酯化酶产生菌。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌株形态学特征

通过革兰氏染色,确定该菌株为革兰氏阳性芽孢杆菌,呈连杆状排列,培养 2d 后菌落初呈乳白色,菌落表面折皱,显粘稠状,并有一层菌膜。培养 3d 后,开始产生淡红色色素,菌落较大。培养 5d 后,菌落周围产生大量的红色色素,菌落显扁平状。

2.3.2 触酶试验

载玻片液体表面出现大量的气泡,可知该菌株能产生 H₂O₂ 酶。故可以初步断定该菌株属于好氧菌或兼性厌氧菌。

2.3.3 Biolog 微生物自动分析系统鉴定结果

根据革兰氏染色、芽孢染色及触酶试验,确定分离菌株为革兰氏阳性芽孢杆菌,为好氧菌或兼性厌氧菌。故选用 BUG+M+T 培养基(M 为 0.25% 麦芽糖,T 为 7.66% 巯基乙酸钠溶液)对其进行富集培养,培养时间为 12h-24h 培养温度为 30℃ 或 35℃。培养 24h 后,用 GN/GP-IF 接种液,制备菌悬液,并用 28% T/GP-ROD SB 浊度标准品调节菌悬液的浊度为 28%,将其接种于 GP 微平板的 96 孔中,接种量为 150 μ L/孔。再将接种好了的 GP 微平板放于 30℃ 或 55℃ 的培养箱中培养,培养 16h-24h 后,其 SM 值 = 0.505, PROB = 88%, 则 SM \geq

0.505, 故系统自动给出的鉴定结果的种名为: *Geobacillus thermoglucosidasius* 嗜热葡糖苷酶芽孢杆菌。

2.4 不同培养条件下分离菌株代谢产物特征

2.4.1 不同发酵时间对分离菌株代谢产物的影响

初始 pH 值为 7.5 于 36℃, 150 r/min 恒温培养, 蒸馏发酵液, 并用气质联用色谱仪测定其代谢产物, 其结果见表 1。

表 1 不同发酵时间对菌株代谢产物的影响

代谢产物	3(d)	6(d)	9(d)
醇类	3- 甲基丁醇	1. 2. 4- 三羟基丁三醇 甲醇	
酸类	乙酸	2- 甲基丙酸	2- 甲基丙酸 3- 甲基戊酸
酯类	乙酸乙酯		4. 6- 二甲基庚酸甲酯 2. 4- 二甲基戊酸甲酯
醛类	乙醛		
酮类	3- 羟基 - 2- 丁酮		

由表 1 可看出, 培养过程中, 该菌株除产生酯类物质外, 还会产生甲醇以及 3- 甲基丁醇、1. 2. 4- 三羟基丁三醇等高级醇, 但随着培养时间的延长, 甲醇以及 3- 甲基丁醇、1. 2. 4- 三羟基丁三醇等高级醇消失, 同时出现较复杂的酸和酯。高级醇的含量过高会使白酒带有较重的苦涩味, 如果缺少高级醇, 则使酒的味道淡薄。故了解白酒生产过程中高级醇的生成途径和变迁对控制白酒品质具有重要意义。

2.4.2 不同发酵初始 pH 值对分离菌株代谢产物的影响

改变发酵的初始 pH 值, 分别调节初始 pH 值为 5.5、7.5 和 9.5 于 36℃, 150 r/min 恒温培养 3 天, 蒸馏发酵液, 并用气质连用色谱仪测定其代谢产物, 其结果见表 2。

表 2 不同发酵初始 pH 值对菌株代谢产物的影响

代谢产物	发酵初始 pH 值		
	5.5	7.5	9.5
醇类	3- 甲基丁醇	3- 甲基丁醇 丙醇	3- 甲基丁醇 丙醇
酸类	乙酸 2- 甲基丙酸 3- 甲基丁酸	乙酸	乙酸
酯类	乙酸乙酯	乙酸乙酯 戊酸甲酯 甲酸乙酯	1- 羟基 - 2- 甲基 - 丙酸甲酯
醛类	乙醛	乙醛	乙醛
酮类	3- 羟基 - 2- 丁酮	3- 羟基 - 2- 丁酮	3- 羟基 - 2- 丁酮

由表 2 可看出, 随 pH 值的增加, 酸类物质有所减少, 在 pH 在为 7.5 时, 产生了较多的酯类物质, 但乙酸、3- 羟基 - 2- 丁酮、乙醛、3- 甲基丁醇等代谢产物不会

随 pH 的值变化而变化。同时也可初步判断 pH 为 7.5 时, 该菌株产酯化酶能力较强。所以, 在发酵过程中, 可控制 pH 为 7.5 来增加酯化酶的合成。

2.4.3 不同培养温度对分离菌株代谢产物的影响

发酵初始 pH 值为 7.5, 分别于 25℃, 35℃, 45℃下, 150 r/min 恒温培养 3 天, 蒸馏发酵液, 并用气质连用色谱仪测定其代谢产物, 其结果见表 3。

表 3 温度对菌株代谢产物的影响

代谢产物	25(℃)	35(℃)	45(℃)
醇类	丙醇	丙醇	丙醇 3- 甲基丁醇 庚醇
酸类	乙酸	乙酸	乙酸 2- 甲基 - 丙酸
酯类		乙酸乙酯 甲酸乙酯	2. 4- 二甲基戊酸甲酯
醛类	乙醛		
酮类	3- 羟基 - 2- 丁酮	3- 羟基 - 2- 丁酮	3- 羟基 - 2- 丁酮

由表 3 可以看出, 随着培养温度的升高, 酸类物质和醇类物质的种类有所增加, 但是丙醇、乙酸和 3- 羟基 - 2- 丁酮则不会随培养温度的变化而变化。另外, 当培养温度为 35℃ 时, 所产生的酯类物质更多, 故可初步判断 35℃ 是该菌株产酯化酶的较适温度。

3 结论

(1) 从泸州大曲中, 分离得到了 5 株透明圈较大的不同的细菌菌株, 其中透明圈最大的一株其 D/d 可达 2.33, 经过酯化酶活力的测定, 得出其酶活力为 11.46 IU。并对其进行鉴定, 经镜检鉴定出该菌为好氧型 G⁺ 芽孢杆菌, 经微生物鉴定出其种名为: *Geobacillus thermoglucosidasius* 嗜热葡糖苷酶芽孢杆菌。

(2) 通过对不同培养条件下分离菌株的代谢产物进行研究, 可知该菌株的主要代谢产物包括醇类、酸类、酯类、醛类和酮类等物质在内的如: 乙酸、3- 甲基丁酸、2- 甲基丙酸、丙醇、庚醇、3- 甲基丁醇、乙酸乙酯、甲酸乙酯、戊酸甲酯、2. 4- 二甲基戊酸甲酯、乙醛和 3- 羟基 - 2- 丁酮等。不同的培养时间、不同的 pH 值和不同的培养温度下其代谢产物有所不同。随着培养时间的延长, 甲醇及各种高级醇逐渐减少甚至消失, 而酯类物质则逐渐增加; 随 pH 值的增加, 酸类物质有所减少, 在 pH 在为 7.5 时, 产生了较多的酯类物质, 但乙酸、3- 羟基 - 2- 丁酮、乙醛和 3- 甲基 - 丁醇等代谢产物不会随 pH 的值变化而变化; 随着培养温度的升高, 酸类物质和醇类物质的种类有所增加, 当培养温度为 35℃ 时, 产生更多的酯类物质。

(下转第 327 页)

- [3] 李亚蕾, 杨波, 李文霞, 等. 抗噬菌体保加利亚乳杆菌突变菌株 *L. actobacillus burglarius-23UN* 的选育 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(8): 16-20
- [4] 赵铭钦, 李晓强, 王豹祥, 等. α -淀粉酶和蛋白酶高产

- 菌株的诱变选育 [J]. 烟草科技, 2008, (8): 53-57
- [5] 邓毛程, 宋炜, 张远平. γ -聚谷氨酸高产菌株的选育和发酵培养基的初步优化 [J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2006, 19(3): 47-51.

Research on Caproic Acid Bacteria Isolation from Fermentation Pit Mud and Its Induced Mutation Breeding

XIONG Li, HU Yang, LIU Jun, YUAN Jie, GAO Jiao

(School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000, China)

Abstract Caproic acid is one of the major aromatic component precursor of Luzhou-flavor liquor. A high caproic acid-producing strain GS₅ was screened from the old cellar mud by means of isolation and purification. Then GS₅ was used as the initial strain by means of mutation under the ultraviolet radiation treatment with the power of ultraviolet lamp being 15 W, exposure distance being 30 cm and exposure time being 3 min. A mutant strain GSUT₃ was screened with the yield being 12% higher than that of the original one. The higher caproic acid-producing ability of the mutant was inherited after several subcultures. And the growth principles of strains and the change rules of acid-producing were detected to be coincident between the mutant strain GSUT₃ and the original one, as well as between the first generation and the eighth one of GSUT₃.

Key words caproic acid bacteria, fermentation pit mud, isolation and purification, ultraviolet radiation mutation, growth characterization

(上接第 323 页)

参考文献:

- [1] 王瑞明. 白酒勾兑技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
- [2] 刘光桦, 卢世珩, 黄德英, 等. 红曲霉胞外脂酶催化己酸乙酯合成研究 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 288-290
- [3] 王耀, 范文来, 徐岩, 等. 浓香型大曲中酯化酶测定方

- 法的研究 [J]. 酿酒, 2003, 30(2): 18-20
- [4] 郭勇. 酶工程原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005
- [5] 姚栗, 程池, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54

Isolation and Characterization of Bacteria Producing Esterifying Enzyme

HUANG Dan, FANG Chun-yu, CHU Yu-long, SHANG Zhi-chao, YANG Wei

(School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000, China)

Abstract The characterization of bacterial producing esterifying enzyme of different culture conditions were studied. A bacterial strain producing esterifying enzyme was isolated from Luzhou-flavor Daqu and it was identified by Biolog Microbes automated identification System. Culture conditions such as fermentation time, initial pH of fermentation and culture temperature were changed. The fermentation broth were extracted by ethanol and analyzed by GC-MS. The results show that the strain is *Geobacillus thermophilus*. When incubation time was prolonged, methanol and various higher alcohols were gradually decreased and even disappeared, but the ester were gradually increased. When the initial pH of fermentation was increased, the acid were decreased. When pH was 7.5, more ester were produced, but the metabolites were not changed with the initial pH of fermentation such as acetic acid, 3-Hydroxy-2-butanone, acetaldehyde and 3-Methylbutyl alcohol etc. When the culture temperature increased, the kinds of the acid and alcohol slightly increased. When the culture temperature was 35°C, more ester were produced.

Key words Luzhou-flavor Daqu, esterifying enzyme, bacterial identification, metabolite