

枯草芽孢杆菌液态培养条件优化及其代谢产物分析

姚翠萍,王和玉,杨帆,林琳,王莉

(贵州茅台酒股份有限公司技术中心,贵州仁怀 564501)

摘要: 从茅台酒生产环境中分离纯化得到 1 株枯草芽孢杆菌,对该菌株培养基的小麦粉浓度、初始 pH 值、培养温度三因素进行正交实验,确定其最适培养条件,并分析在该培养条件下所产代谢物。实验确定的最适培养条件为:小麦粉 1.5%,初始 pH 7.0,培养温度 35℃,培养时间 12 h,蛋白胨 1%,酵母膏 0.5%,氯化钠 1%,磷酸氢二钾 0.5%。利用气质联用色谱仪分析其代谢产物,检测到 30 多种物质,主要为酸、酯类物质。

关键词: 微生物;茅台酒;枯草芽孢杆菌;正交实验;优化;代谢产物;分析

中图分类号: TS261.1;Q93-3;TS262.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2010)08-0043-03

Optimization of Liquid Culture Conditions for *Bacillus subtilis* and Analysis of Its Metabolites

YAO Cui-ping, WANG He-yu, YANG Fan, LIN Lin and WANG LI

(Technical Center of Guizhou Maotai Co.Ltd, RenHuai, GuiZhou 564501, China)

Abstract: A *Bacillus subtilis* strain was isolated from the production environment of Maotai liquor. In order to determine its optimum culture conditions and analyze its metabolites, orthogonal experiments of three factors including wheat power content, initial pH value, and culture temperature of the culture medium were carried out. The optimum culture conditions were determined as follows: 1.5 % wheat power, initial pH 7.0, culture temperature at 35 °C, culture time 12 h, peptone 1 %, yeast extract 0.5 %, NaCl 1 %, and K₂HPO₄ 0.5 %. More than thirty kinds of metabolites mainly including acids and lipids were detected by GC analysis.

Key words: microbe; Maotai-flour; *Bacillus subtilis*; orthogonal experiment; optimization; metabolites; analysis

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种重要的工业微生物^[1]。它大量存在于茅台酒生产环境中,在茅台酒酿造过程中发挥着重要作用,是茅台酒酿造微生物种群中的优势菌。曾报道枯草芽孢杆菌与酱香的产生有着密切关系^[2],而对其在茅台酒发酵过程中具体代谢产物,对茅台酒风味物质贡献尚无文献描述。因此,本实验从茅台酒生产环境中分离出 1 株枯草芽孢杆菌,研究其在优化液态培养条件下的代谢产物,了解它对茅台酒风味物质成分的贡献,同时,对该菌株代谢产物分析也是研究茅台酒风味物质成因的重要组成部分。本文主要通过优化该菌株的液态培养条件,了解该菌株的一些生长特性,分析其代谢产物,是研究枯草芽孢菌对茅台酒风味物质成分贡献的重要开端。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌,从茅台大曲中分离得到。

1.2 培养基

基础培养基:蛋白胨 1%,酵母膏 0.5%,氯化钠 1%,磷酸氢二钾 0.5%。

1.3 菌体称重

将干离心管称重并记录,量取 10 mL 发酵液,于 4000 r/min 离心 10 min,去上清液,烘干,称重并记录,计算干菌体重。

1.4 发酵液吸光度测定

将枯草芽孢杆菌发酵液稀释 100 倍,以空白培养基为空白对照,在波长 600 nm 处测定其吸光度。

1.5 分析仪器

Agilent GC 7890A-5975 C mass selective detector (MSD)。

1.6 提取方法

培养结束后,取一定量液态发酵样品,加入一定量 50 %vol 乙醇溶液冷冻 24 h,采用乙醚进行液液萃取,再将萃取液氮吹浓缩,进入仪器 GC-MS 分析检测。

1.7 仪器条件

气相色谱分离条件:柱温的初始温度为 40℃,以

收稿日期:2010-05-24

作者简介 姚翠萍(1985-),女,助理工程师。

6 °C/min 的升温速率升至 230 °C, 停留 20 min; 柱流量 1.6 mL/min, 采用恒压模式; 进样口温度 230 °C; 进样量 1 μ L, 采取不分流进样方式, 进样 1 min 后分流阀打开。

质谱条件: 电子电离电压为 70 eV; 四极杆温度为 150 °C; 离子源温度 230 °C; 采用全扫描方式(scan), 使用 35~550 amu 的质量范围; 溶剂延迟 5 min。

物质定性分析: 将未知物质图谱与 NIST05a.L Database(Agilent Technologies Inc.)中标准图谱比对。

2 结果与分析

2.1 液态培养条件优化

2.1.1 小麦粉含量对枯草芽孢杆菌液态培养的影响

在培养基中加入不同浓度的小麦粉, 分别为 0.5 %、1.0 %、1.5 % 和 2.0 %, 其他组分为: 蛋白胨 1.0 %, 酵母膏 0.5 %, 磷酸氢二钾 0.5 %, 氯化钠 1.0 %, pH 7.0, 培养时间 24 h, 考察不同小麦粉浓度对菌体富集的影响, 在不同小麦粉浓度下称量干菌体重量, 结果见图 1。

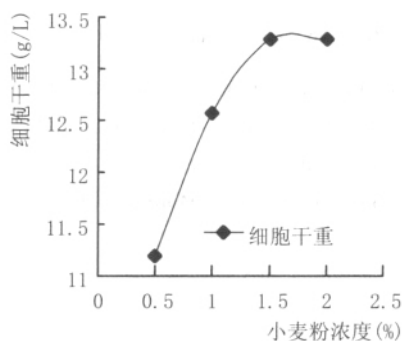


图1 小麦粉浓度对枯草芽孢杆菌富集的影响

由图 1 可知, 当小麦粉浓度低于 1.5 % 时, 细胞含量随淀粉浓度增加而增加, 在浓度为 1.5 % 时, 发酵 24 h 的枯草芽孢杆菌细胞干重达峰值 13.29 g/L。

2.1.2 初始 pH 值的确定

环境的酸碱度对微生物的生命活动有很大的影响, 不同的细菌最适 pH 值不同。当培养基成分: 小麦粉浓度 1.5 %, 蛋白胨 1.0 %, 酵母膏 0.5 %, 磷酸氢二钾 0.5 %, 氯化钠 1.0 %。调节培养基不同的初始 pH 值, 培养 24 h, 称量干菌体重量, 结果见图 2。

由图 2 可知, 培养基初始 pH 值在 6.5~7.5 之间, 细胞干重随 pH 值上升而逐渐增加, 过碱抑制枯草芽孢杆菌的生长。

2.1.3 枯草芽孢杆菌在不同温度下的生长情况

温度影响微生物的生长繁殖速度, 不同温度条件下细菌的最适培养时间不同。当培养基成分为: 小麦粉浓度 1.5 %、蛋白胨 1.0 %、酵母膏 0.5 %、磷酸氢二钾 0.5 %、氯化钠 1.0 %、pH 7.0 培养条件下。称量各温度条件下不同时间段的菌体干重, 结果见图 3。

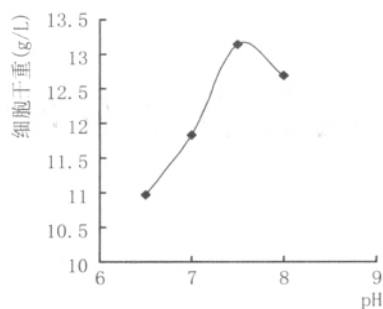


图2 培养基初始 pH 值对枯草芽孢杆菌富集的影响

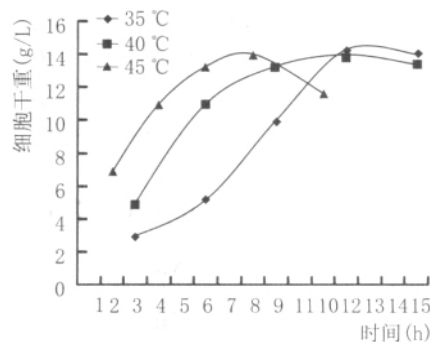


图3 枯草芽孢杆菌在不同温度下的生长情况

对比枯草芽孢杆菌在各温度下的生长情况, 在 35 °C 时, 该菌在前期生长相对缓慢, 当达 12 h 处, 细胞干重为 14.21 g/L, 确定该温度下最适培养时间为 12 h。同样在 40 °C 条件下, 确定培养时间为 12 h; 在 45 °C 时, 培养时间为 8 h。

2.1.4 枯草芽孢杆菌培养条件正交实验

在上述各实验中, 只能得到培养基初始 pH 值、小麦粉浓度、培养温度等单因素对枯草芽孢杆菌生长的影响程度, 不能得到三者综合因素对枯草芽孢杆菌生长的影响。因此, 需做正交实验来确定其最佳生长条件, 实验各因素及水平取值见表 1, 正交表及实验结果见表 2。

表 1 培养条件各因子及水平

因子	水平		
	1	2	3
初始 pH 值	7.0	7.5	8.0
小麦粉浓度 (%)	0.5	1.0	1.5
培养温度 (°C)	35	40	45

极差反映因素对指标的影响大小, 由表 2 结果可知, 在所选水平范围内, 各因素对枯草芽孢杆菌生长的影响大小顺序为: 小麦粉浓度 > 培养温度 > 初始 pH 值, 培养基的初始 pH 值对枯草芽孢杆菌的生长影响相对较小。

表 2 中 I、II、III 值分别反映水平 1、2、3 对指标的影响大小, 由水平之和可知, 各因素理论最佳搭配水平组合为 pH 7.0 (I=28.1); 小麦粉浓度 1.0 % (II=34.2); 培养温度 35 °C (I=33.1)。但正交列表中未出现该组合, 故须搭配进行实验, 实验得到该条件下枯草芽孢杆菌发酵液吸

表2 正交列表及实验结果

试验号	因子			结果 OD ₆₀₀
	1	2	3	
1	1	3	1	12.8
2	2	2	1	12.0
3	3	3	1	8.3
4	3	2	2	11.4
5	1	2	2	10.8
6	2	3	2	9.0
7	1	1	3	4.5
8	3	1	3	4.4
9	2	1	3	5.3
I	28.1	14.2	33.1	
II	26.3	34.2	31.2	
III	24.1	30.1	14.2	
R	1.33	6.67	6.30	

注: I—水平 1 之和, II—水平 2 之和, III—水平 3 之和, R—极差。

光度为 9.2, 该最佳理论组合吸光度小于组合 pH 7.0、小麦粉浓度 1.5 %、培养温度 35 °C (OD₆₀₀=12.8) 的实验值。

因此, 当蛋白胨 1 %, 酵母膏 0.5 %, 氯化钠 1 %, 磷酸氢二钾 0.5 %, pH 7.0, 小麦粉浓度 1.5 %, 培养温度 35 °C, 培养时间 12 h, 为该株枯草芽孢杆菌的较优液态培养条件。

2.2 运用液液萃取方法对枯草芽孢杆菌发酵液中代谢产物的分析

在优化液态培养条件下, 该菌株所得发酵液经乙醚萃取, N₂ 吹浓缩, 将浓缩液过滤进 GC-MS 分析检测, 结果见图 4。并以未接种枯草芽孢杆菌的优化液态培养基作空白对照, 结果见图 5。

检测到该菌株的代谢产物有 30 多种, 为酸、酯、醛、酮、醇及芳香族化合物等, 其主要代谢产物为: 3-甲基丁酸、2-甲基丙酸、3-羟基丁酮、苯乙醇、13-甲基-十四酸乙酯、十六酸乙酯, 这些物质均为茅台酒中重要的风味物质成分。

3 结论

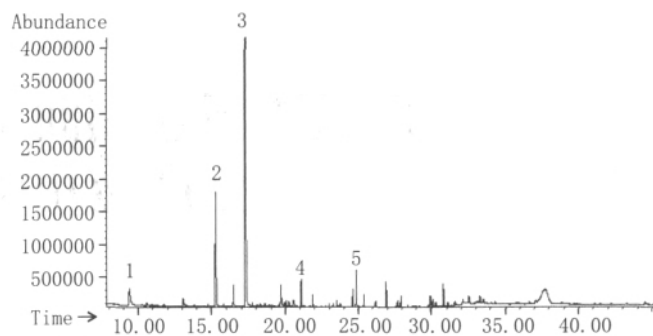
3.1 对枯草芽孢杆菌培养条件单因素分析, 能大致了解各因素对菌株生长情况的影响, 而通过正交实验进行多因素分析, 能得到该菌株比较合理的培养条件组合。由多因素分析结果可知, 单因素培养的最佳值组合, 不一定为培养的实际最佳条件 (由于各因素间相互的交叉影响),

(上接第 42 页)

[J]. 中国酿造, 2006, (11): 28-30.

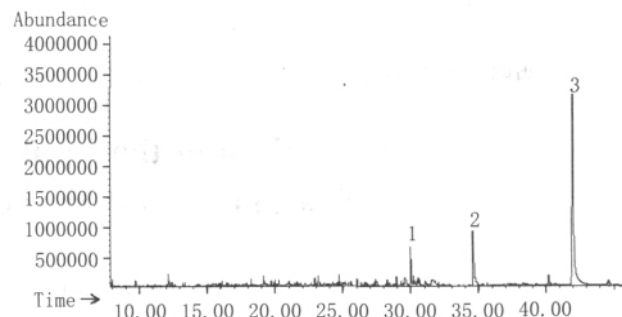
- [5] ES-SAFIN, CHEYNIER V, MOUTOUNET M. Interaction between cyanidin-3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color change [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 5586-5595.

- [6] 王志东, 张军翔, 王琨, 等. 不同酵母及果胶酶对红葡萄酒综合



1.3-羟基丁酮, 2.2-甲基丙酸, 3.3-甲基丁酸, 4.苯乙醇, 5.13-甲基-十四酸乙酯

图4 枯草芽孢杆菌液态发酵产物图谱



1.香草醛, 2.十六酸, 3.亚油酸

图5 枯草芽孢杆菌液态发酵产物空白对照图谱

研究分析中需要进行多因素的正交实验确定其最佳培养条件。实验最后确定 pH 7.0、小麦粉浓度 1.5 %、培养温度 35 °C、培养时间 12 h 为该菌株较理想的培养条件。

3.2 分析枯草芽孢杆菌的液态发酵产物, 主要为酸、酯类, 其中主要代谢产物 3-甲基丁酸 (异戊酸)、2-甲基丙酸、3-羟基丁酮等为茅台酒中的重要物质成分, 可了解该菌株在茅台酒生产过程中起到某些功能性作用。

参考文献:

- [1] 范光先, 王和玉, 崔同弼. 茅台酒生产过程中的微生物研究进展[J]. 酿酒科技, 2006, (10): 75-77.
- [2] 邵元龙, 谢和. 两株枯草芽孢杆菌蛋白酶的提取及产酱香研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 2005, (3): 51-53.
- [3] 霍虹, 姚丽华. 大豆粕残油的影响因素及正交实验[J]. 中国油脂, 2005, (5): 29-31.
- [4] 秦颖. 正交实验设计法在造纸实验中的应用[J]. 龙江造纸, 2006, (1): 42-43.

理化指标的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2007, (2): 18-20.

- [7] ROGER B B 等著, 赵光整, 等译. 葡萄酒酿造学——原理及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [8] GUERRAND D, GERVAIS J P, 郭永亮, 等. 优质红葡萄酒酿造中浸提多酚物质最有效的工具[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003, (2): 41-44.