

一株高产乙偶姻芽孢杆菌菌株筛选及发酵条件优化

张玲玲, 罗惠波, 黄丹, 张倩, 郑升海, 童文华

(四川轻化工大学酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000)

摘要: 为缓解乙偶姻的生产对石油的依赖, 本研究利用分光光度法从浓香型大曲中筛选得到一株高产乙偶姻 (Acetoin, ACT) 且对酸度、乙醇具有较大耐受性的芽孢杆菌, 经形态学观察、生理生化试验及分子生物学技术鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。对该菌株 pH、温度、装液量、接种量、转速等 5 个发酵条件进行单因素试验和正交试验, 由极差分析可知, 各因素对 ACT 产量的影响大小依次为 pH>温度>装液量>接种量>转速。对影响 ACT 产量前 3 的因素进行响应面试验, 得出最佳发酵条件为: pH 5.46, 温度 37.30 °C, 装液量 49.20 mL, 接种量 5%, 转速 210 r/min。在此条件下菌株摇瓶发酵 ACT 的平均产率为 25.60 g/L, 比优化前菌株 ACT 产率 18.37 g/L 提高了 39.36%。本研究对微生物生产 ACT 的生产策略有一定指导作用, 且筛选所得芽孢杆菌在提升白酒风味方面有巨大应用潜力。

关键词: 大曲; 贝莱斯芽孢杆菌; 筛选; 乙偶姻; 发酵条件优化

文章编号: 1673-9078(2021)05-71-81

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0919

Screening of a *Bacillus* Strain with High Acetoin-producing Ability and Optimization of Its Fermentation Conditions

ZHANG Ling-ling, LUO Hui-bo, HUANG Dan, ZHANG Qian, ZHENG Sheng-hai, TONG Wen-hua

(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to alleviate the dependence of acetoin production on petroleum, a *Bacillus* strain with high yield of acetoin, greater tolerance to acidity and ethanol was screened from Nongxiang Daqu by spectrophotometry in this study. The strain was identified as *Bacillus velezensis* through morphological observations and physiological and biochemical tests and by the molecular biology technique. The single factor tests and orthogonal experiments were carried out on the five fermentation conditions of the strain, including pH, temperature, liquid loading volume, inoculation amount and shaking speed. According to the range analysis, the extent of the influence of each factor on acetoin production was in the order of pH>temperature>liquid loading volume>inoculum amount>shaking speed. Response surface methodology was used to optimize the first three fermentation conditions, and the optimal fermentation conditions were obtained as follows: pH 5.46, temperature 37.30 °C, liquid loading volume 49.20 mL, inoculum amount 5%, and shaking speed 210 r/min. Under these conditions, the average yield of acetoin by shake-flask fermentation of the strain was 25.60 g/L, which was 39.36% higher than that before optimization (18.37 g/L). The research provides guidance on the strategy of microbial production of acetoin, and the selected *Bacillus velezensis* has great application potential in enhancing the flavor of Baijiu.

Key words: Daqu; *Bacillus velezensis*; screening; acetoin; optimization of fermentation conditions

引文格式:

张玲玲, 罗惠波, 黄丹, 等. 一株高产乙偶姻芽孢杆菌菌株筛选及发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 71-81

ZHANG Ling-ling, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Screening of a bacillus strain with high acetoin-producing ability and optimization of its fermentation conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 71-81

收稿日期: 2020-10-08

基金项目: 四川省科技计划项目 (2019YJ0475); 中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金 (2019JJ016); 四川轻化工大学人才引进项目 (2019RC31); 四川轻化工大学研究生创新基金资助项目 (Y2019037)

作者简介: 张玲玲 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酿酒微生物资源开发与利用

通讯作者: 童文华 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 酿酒微生物资源开发与微生物遗传代谢

曲为酒之骨,酒曲质量的好坏直接影响着白酒的质量、产量和风格。中高温大曲是酿造浓香型白酒的糖化发酵剂,含有酵母、霉菌、细菌等多种微生物,这些微生物在浓香型白酒的酿造过程中共酵生成复杂的白酒成分,赋予了浓香型白酒独特的风格特征^[1,2]。中高温大曲在制曲培菌过程中最高品温可达 62℃,由于芽孢杆菌存在利用芽孢应对胁迫环境的特性,因此在大曲制备的高温条件下芽孢杆菌成为其中的优势细菌之一。芽孢杆菌不但能够代谢产生 ACT、2,3-丁二醇以及吡嗪等风味物质作为浓香型白酒的主要呈香物质,还可以代谢产生淀粉酶、蛋白酶等多种酶类,推动大曲及白酒酿造过程中的各种生化反应进行^[3,4]。ACT 学名 3-羟基-2-丁酮 (3-Hydroxy-2-butanone),是一种具有特殊奶油香味的挥发性化合物,有类似蜂蜜的甜味,是酒类调香中一个极其重要的物质,也是白酒风味物质中的重要香味成分,在名优酒中含量尤为突出^[5]。ACT 同时也是一种重要的高附加值化学品,广泛用于食品,烟草,化妆品,洗涤剂,化学合成,植物生长促进剂和生物害虫防治中^[3,6,7]。

近些年 ACT 合成方式的研究越来越受关注,ACT 生产方法主要有化学合成法^[8]、酶转化法^[9]和微生物合成法^[10-12]。由于化石资源日益枯竭、温室效应、污染排放等因素的制约,化学合成法逐步被微生物合成法取代。微生物合成法是根据微生物的生理特性和其自身的代谢特点,以廉价碳源为底物,在一定条件下通过发酵获得 ACT 的一种良好方法,具有安全、经济、绿色、高效、可持续的特点,越来越受到各国研究者的关注。在微生物发酵法中,筛选更高效、稳定的 ACT 生产菌株,优化其发酵工艺,对提高 ACT 产量有至关重要的作用^[13,14]。

自然界中能够自然合成 ACT 的微生物有很多。TIAN 等^[15]从日本传统食品纳豆中分离出枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* SF4-3),使用优化的培养基后 ACT 产量达到 46.2 g/L; TEIXEIRA 等^[16]对有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora guilliermondii*) 的摇瓶发酵条件 (葡萄糖浓度、温度、pH) 进行优化,使得最终 ACT 产量达到 365 mg/L; ZHENG 等^[17]将哈尔滨乳杆菌 (*Lactobacillus harbinensis* M1) 应用于豆浆发酵,使其风味明显改善,经 GC/MS 分析 2,3-丁二醇与 ACT 丰度显著增加; SUN 等^[12]采用辅因子工程提高了粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* H32) 的 ACT 产量,结合补料分批发酵使 ACT 产量达到 75.2 g/L; LIU 等^[18]将 NADH/NAD⁺再生系统引入多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* CJX518),从而调节 ACT 和 2,3-丁二醇之间的分布,使 ACT 最大产量为 57.20 g/L。

近年来对 ACT 的研究更多集中于天然高产 ACT 菌株的选育、代谢通路改造与工程菌的构建。本研究以浓香型大曲为菌株来源,以四川某酒厂大曲为样品,经肌酸比色法获得高产 ACT 的菌株,为天然高产 ACT 的微生物添加新菌株,并利用单因素法和响应面法对其产 ACT 的发酵条件进行了优化,确定了菌株发酵生产 ACT 的最佳发酵条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

大曲样品取自四川某酒厂。

葡萄糖、酵母粉、琼脂、蛋白胨、七水硫酸镁,上海生工生物工程股份有限公司;氢氧化钠、氯化钠、二水氯化钙、磷酸二氢钾、硫酸铵,成都市科隆化学制品有限公司;肌酸,上海麦克林生化科技有限公司;1-萘酚,天津市光复精细化学试剂研究所。

液体富集培养基:葡萄糖 3%、蛋白胨 1%、酵母粉 0.50%、氯化钠 0.05%、酒醅浸提液, pH 6.0, 121℃ 下灭菌 20 min。

分离、纯化培养基:葡萄糖 3%、蛋白胨 1%、酵母粉 0.50%、氯化钠 0.05%、琼脂 1.50%, pH 6.0, 121℃ 下灭菌 20 min。

种子培养基:葡萄糖 3%、蛋白胨 1%、酵母粉 0.50%、氯化钠 0.05%, pH 6.0, 121℃ 下灭菌 20 min。

发酵培养基:葡萄糖 8%、蛋白胨 1%、酵母粉 1%、氯化钠 0.05%、七水硫酸镁 0.03%、二水氯化钙 0.10%、磷酸二氢钾 0.03%、硫酸铵 0.03%, pH 6.0, 在 121℃ 下灭菌 20 min。

1.2 仪器与设备

LS-1201 生化培养箱,美国 Fisher Scientific 公司; ST2100 pH 计,奥豪斯仪器(常州)有限公司; UV-1200 紫外可见分光光度计,上海美谱达有限公司; HHS 电热恒温水浴锅,上海齐欣科学仪器有限公司; ZWYR-D240 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司; LYNX 6000 高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司; XSP-C 生物显微镜,北京瑞宏诚科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 高产 ACT 芽孢杆菌的筛选

1.3.1.1 芽孢杆菌菌株的分离筛选

样品处理:称取大曲 1 g,放入盛有 99 mL 无菌水且含有无菌玻璃珠的三角烧瓶中,振荡使大曲分散

均匀,制备样品悬浮液。悬浮液在 85 ℃ 水浴加热 10 min,淘汰非芽孢细菌,再吸取 1 mL 悬浮液于富集培养基中,过夜富集培养。

分离纯化:在超净工作台中将富集液梯度稀释成 10^{-3} ~ 10^{-8} 的菌液,吸取 0.2 mL 菌液滴于分离培养基平板中央,用涂布棒将菌悬液在培养基上涂抹均匀,在 37 ℃ 培养箱中倒置培养 36 h。根据芽孢杆菌菌落形态特征,选取菌落形态不一致的菌落,用无菌接种环分别于分离培养基平板上划线,37 ℃ 培养箱中培养,直至长出单个菌落,再挑选单菌落进行不断纯化培养。

1.3.1.2 高产 ACT 菌株的筛选

初筛:采用肌酸显色法来筛选能合成 ACT 的菌株。方法为将 1 g 1-萘酚,0.1 g 肌酸与 4 g NaOH 配成 100 mL 肌酸混合液,将从大曲中筛选得到的芽孢杆菌菌株,轻刮一环菌于盛有 1 mL 混合液的试管中,能产 ACT 的菌株能使混合液快速变为红色。

复筛:将初筛获得的菌株接种于 50 mL 种子培养基中,在 37 ℃、180 r/min 条件下摇床培养 12 h,再以 5% 的接种量接种至 50 mL 发酵培养基。在 37 ℃、180 r/min 条件下摇床培养 72 h。发酵结束后 12000 r/min 离心 2 min,取上清液,以比色法测定发酵液的 $OD_{522\text{ nm}}$ 值,从而获得 ACT 产量较高的菌株。将 50% 甘油与菌液按 1:1 混合均匀, -70 ℃ 保藏。

1.3.2 菌株生长曲线的绘制

挑取一环新鲜的斜面菌种,接入 50 mL 种子培养基中过夜培养 12 h,以 5% 接种量接入 50 mL 发酵培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 22 h,在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 h 时取出对应三角瓶,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,每组试验 3 个平行。

1.3.3 目的菌株的鉴定

1.3.3.1 形态学观察及理化鉴定

细菌的生理生化鉴定实验参照《伯杰氏细菌鉴定手册》,对该菌株进行革兰氏染色、芽孢有无运动性、酪蛋白水解、淀粉水解、明胶水解、硝酸盐还原、甲基红试验等生理生化鉴定,细菌大小利用电子显微镜观察。

1.3.3.2 菌株的耐受性研究

菌株对酸度的耐受性:将种子液以 5% 接种量转接到 pH 分别为 3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、9.5 的发酵培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h 后,测定 $OD_{600\text{ nm}}$,每组试验 3 个平行。

菌株对乙醇的耐受性:将种子液以 5% 接种量转接到乙醇含量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6% 发酵培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h 后,测定 $OD_{600\text{ nm}}$,每组试验 3 个平行。

1.3.3.3 16S rRNA 序列分析测定

细菌染色体提取方法用改良 CTAB 法^[19]。以提取的基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 27F: AGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTTPCR, 扩增 16S rRNA 基因。反应体系: 10×Taq buffer 5 μL, dNTP(Mix) 2 μL, DNA 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 上下游引物各 2 μL, 双蒸水补至总体积 50 μL。反应条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72 ℃ 修复延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序后,将测序结果通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库的 BLAST 比对获得鉴定结果,并利用 MEGA5 构建系统发育树。

1.3.4 高产 ACT 菌株发酵条件优化

1.3.4.1 单因素试验

pH、装液量、接种量、转速和温度等因素^[13,16]影响着菌体的生长和代谢,因此选取 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)、温度 (31、34、37、40、43 ℃)、接种量 (3%、5%、7%、9%、11%)、转速 (120、150、180、210、240 r/min)、装液量 (30、40、50、60、70 mL/250 mL) 等 5 个因素做单因素试验,每组试验 3 个平行。

1.3.4.2 正交试验

设计 $L_{18}(7^3)$ 正交试验,考察不同因素对 ACT 产量影响的大小。对 pH、温度、转速、装液量和接种量 5 个因素进行考察,每个考察因 3 个水平进行试验,每组试验 3 个平行。

1.3.4.3 响应面试验设计

用软件 Design Expert 8.0.6 进行 Box-Behnken Design (BBD) 设计响应面试验,以 pH, 温度, 装液量作为变量,以 ACT 产量为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验,每组试验 3 个平行。

1.3.5 检测方法

1.3.5.1 ACT 的标准曲线制作

分别配制浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 g/L ACT 标准溶液。分别吸取 0.1 mL 不同浓度的标准溶液于试管中,加入 4.5 mL 肌酸混合液,振荡混匀,在 30 ℃ 水浴锅中反应 30 min,测定 $OD_{522\text{ nm}}$ 值。每个浓度 3 个平行实验,并准备一个作为空白对照。

1.3.5.2 发酵液中 ACT 含量的测定

吸取 1 mL 发酵液于离心管中,4 ℃、12000 r/min 离心 2 min,上清液适当稀释后,取 0.1 mL 于试管中再加入 4.5 mL 肌酸混合液,振荡混匀,30 ℃ 下反应 30 min,测定 $OD_{522\text{ nm}}$ 值,每组试验 3 个平行。最后

根据 ACT 标准曲线的公式计算出 ACT 产量。

1.3.6 数据分析方法

采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,采用 Origin 进行图表的绘制。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选结果

2.1.1 样品初筛

将分离纯化得到的 30 株芽孢杆菌分别轻刮一环菌于含有 1 mL 肌酸混合液的试管中,能产 ACT 的菌株使混合液 2 min 内迅速变为红色,实验结果显示有 20 株芽孢杆菌可使肌酸混合液变红,其中有 5 株芽孢杆菌(A2、A9、A18、A19、A21)代谢物与肌酸混合液快速反应且呈现深红色(图1)。但此法不能准确判断菌株产 ACT 的能力强弱,需进一步试验。

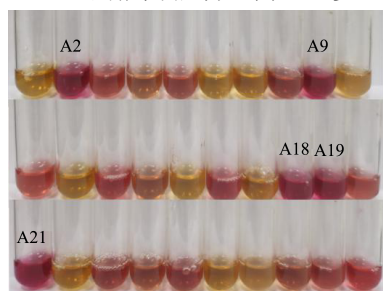


图1 菌株初筛结果

Fig.1 Strain screening results

注: 从上至下依次为 A1~A10, A11~A20, A21~30。

2.1.2 ACT 标准曲线

以 ACT 浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制 ACT 标准曲线。回归方程为 $y = 5.3989x - 0.0444$, 相关系数 $R^2 = 0.9991$, 表明两者之间线性关系良好。

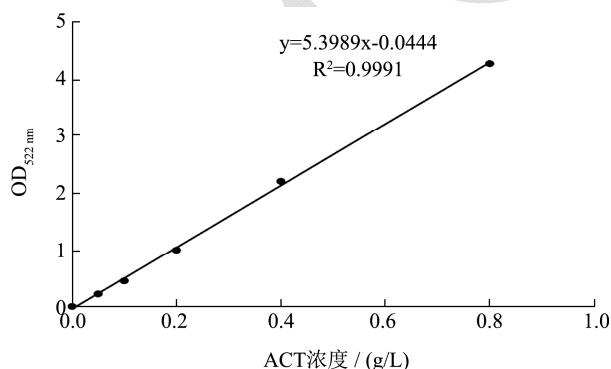


图2 ACT 标准曲线

Fig.2 Standard curve of acetoin

2.1.3 样品复筛

对初筛获得的 5 株芽孢杆菌进行摇瓶发酵复筛实验,发酵结束后离心取上清液,将其与肌酸混合液反应后测吸光值,结果见表 1,筛选得到一株高产 ACT

的菌株 A21。

表 1 菌株复筛结果

编号	菌株	OD _{522 nm}	ACT 产量/(g/L)
1	A2	0.24	8.40±0.25
2	A9	0.41	11.21±0.37
3	A18	0.26	8.87±0.16
4	A19	0.47	15.09±0.31
5	A21	0.58	18.37±0.43

2.2 菌株 A21 的生长曲线

在摇瓶培养的过程中,每隔 2 h 取样测 OD_{600 nm} 值,由图 2 可知,菌株 A21 在 0~4 h 为生长延滞期,菌数增长缓慢;6~12 h 为对数生长期,活菌数以几何级数快速升高;12~18 h 处于稳定生长期,菌群总数保持稳定;18 h 后开始进入衰亡期。

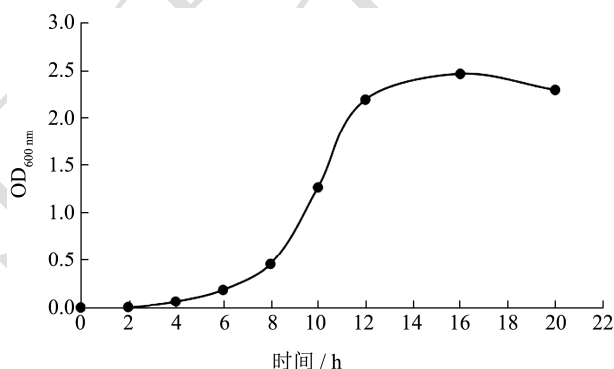


图3 菌株 A21 生长曲线

Fig.3 Growth curve of strain A21

2.3 菌株 A21 的耐受性特征

由图 4a 可知,当 pH 为 3.5 时,OD_{600 nm} 值为 0.1,表明该菌株具有较强的耐酸性能,最低酸耐受 pH 为 3.5,随着 pH 的增大,OD_{600 nm} 值先增大后降低,表明菌株 A21 生物量呈先上升后下降的趋势,在 pH 5~8 时生长良好,其最适生长 pH 为 5.0。由图 4b 可知,随着乙醇体积分数的升高,OD_{600 nm} 值逐渐降低,表明随着酒精度的不断增加,菌株 A21 生长逐渐受到影响,菌株 A21 适合在酒精度较低条件下生长繁殖,当酒精度达到 6%时,OD_{600 nm} 值趋于零,表明菌株 A21 的生长完全受到抑制,乙醇最大耐受 5%。

2.4 菌株 A21 的鉴定

2.4.1 形态观察

菌株 A21 革兰氏染色后呈紫色(图 5a);芽孢染色实验表明该菌株含有芽孢(图 5b),染色后芽孢呈绿色,菌体呈红色;由电镜照片可知,此菌株大小,

宽 0.40 μm ~0.80 μm ，长 2 μm ~3.80 μm （图 5c）。由此判断该菌株为革兰氏阳性短杆状芽孢杆菌。

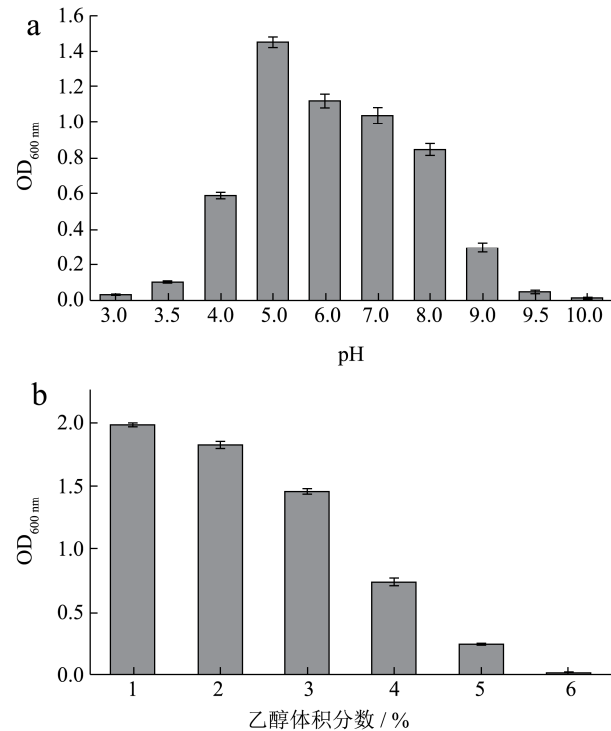


图 4 菌株 A21 对酸度和乙醇的耐受性

Fig.4 Acidity and ethanol tolerance of strain A21

注：a：pH 耐受性；b：乙醇耐受性。

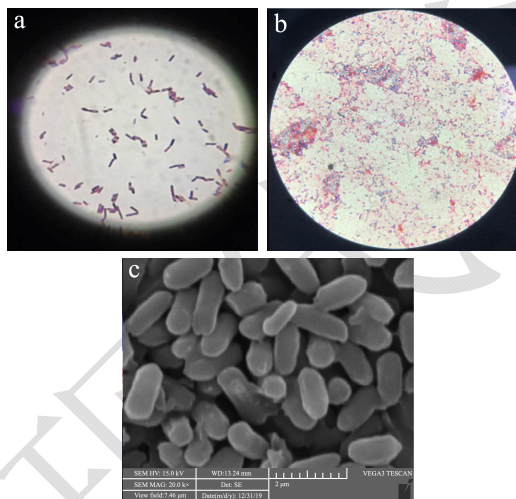


图 5 菌株 A21 的形态学特征

Fig.5 Morphological characteristics of strain A21

注：a：细胞形态；b：芽孢染色；c：电镜照片。

2.4.2 生理生化试验

菌株的生理生化试验结果见表 2。菌株 A21 兼性厌氧，能产酸，有运动性，产蛋白酶、淀粉酶、明胶酶，还可使硝酸盐还原，糖利用实验表明菌株 A21 可以利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉，不能产气，甲基红试验为阴性，对照细菌手册可知菌株 A21 类似于解淀粉芽孢杆菌。

表 2 菌株 A21 生理生化实验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical experiments of strain A21

strain A21			
实验项目	结果	实验项目	结果
厌氧生长	+	甲基红实验	-
蛋白水解	+	蔗糖利用	+
淀粉水解	+	麦芽糖利用	+
明胶液化	+	乳糖利用	+
硝酸盐还原	+	葡萄糖利用	+
产气试验	-	可溶性淀粉利用	+
产酸试验	+	运动性	+

注：+：阳性，-：阴性。

2.4.3 菌株的 16S rDNA 鉴定结果

将测序结果提交 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对，再利用 MEGA5.0 构建系统发育树。结果显示，菌株 A21 与 *Bacillus velezensis* FZB42 在同一分支上（如图 6），且相对置信度为 90，结合细菌形态与理化鉴定结果，确定菌株 A21 为贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*），将其命名为 *Bacillus velezensis* DQA21。在《国际细菌命名法规》中曾一度认为解淀粉芽孢杆菌植物亚种与贝莱斯芽孢杆菌是同物异名，但近年来有研究人员^[20]陆续利用全基因组比较对贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌植物亚种的分类地位进行研究，结果认定贝莱斯芽孢杆菌不是解淀粉芽孢杆菌的同物异名，使其获得在细菌命名法中的地位。

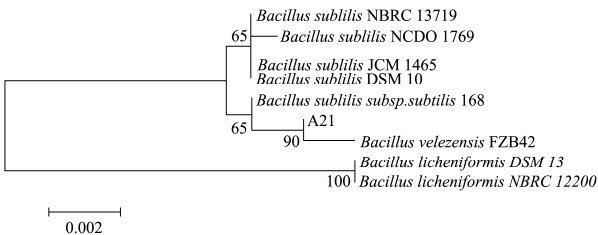


图 6 菌株 A21 系统发育树构建结果

Fig.6 Results of phylogenetic tree construction of strain A21

2.5 *Bacillus velezensis* DQA21 产 ACT 发酵条件优化

2.5.1 单因素试验发酵条件优化

由图 7a 可知，发酵培养基的初始 pH 为 5.5 时 ACT 的产量达到最大值 25.06 g/L，随着 pH 的增加产量快速下降。外界 pH 的变化会改变菌体细胞内的 pH 值，从而影响细菌的代谢反应，进而影响细胞的生物量^[20]。*B. velezensis* DQA21 在 pH 5~7 范围内生长良好，且在酸性条件下，ACT 合成途径中关键酶 α -乙酰乳酸

合成酶活力较强^[22],能积累大量丙酮酸,乳酸脱氢酶活力较低^[23],催化较少的丙酮酸形成乳酸,从而相对多的丙酮酸被转化为 ACT。ZHANG^[24]采取了分段控制 pH 的策略,发酵前 48 h, pH 控制在 6.5,此时乙偶姻还原酶、2,3-丁二醇脱氢酶催化反应向生成 ACT 和 2,3-丁二醇的方向进行;郝飞^[21]在发酵前期(0~16 h)控制 pH 5.5,发酵中后期(16~72 h)控制 pH 4.5,证明酸性条件下更有利于细胞合成 ACT。

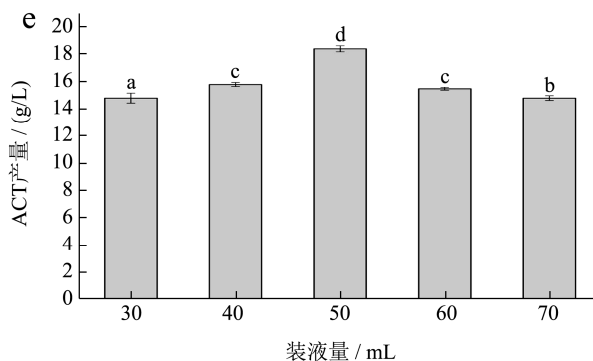
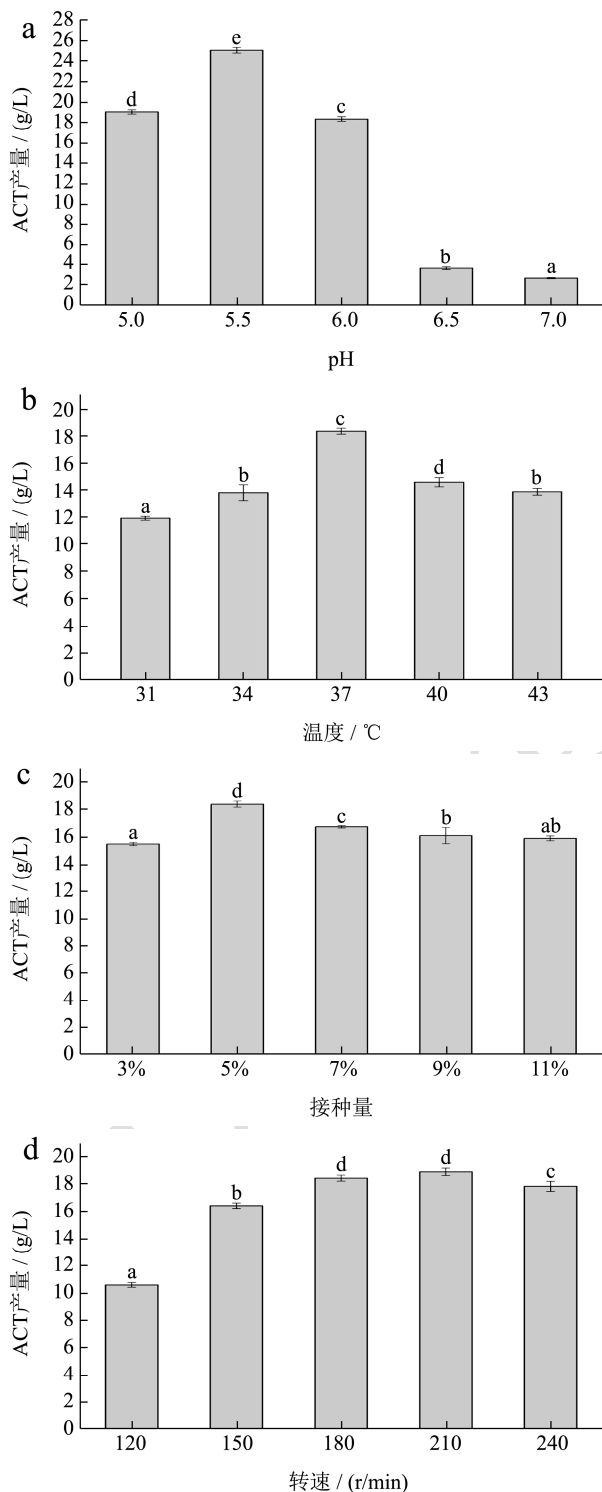


图7 *B. velezensis* DQA21 发酵产 ACT 的单因素实验结果

Fig.7 Single-factor experimental results of ACT production by *B. velezensis* DQA21

注: a: pH 对 ACT 产量的影响; b: 温度对 ACT 产量的影响; c: 接种量对 ACT 产量的影响; d: 转速对 ACT 产量的影响; e: 装液量对 ACT 产量的影响。

由图 7b 可知,当发酵温度从 31 °C 升至 37 °C 时 ACT 产量随之增加,37 °C 时 ACT 的产量达到最大值,可能是由于 *B. velezensis* DQA21 在 37 °C 时最适合其生长繁殖且其关键酶活性亦随之提高。随后 ACT 产量又随温度升高而降低,推测高温下 *B.velezensis* DQA21 代谢酶受到抑制,同时 ACT 在高温下会与氨反应生成四甲基吡嗪,造成 ACT 浓度下降^[25]。由图 7c 可知,ACT 产量随菌株接种量的增大而增加,在 5% 时达到最大,随后有所下降,这是由于接种量过大引起发酵初期比较高的细胞浓度,进而底物大量消耗,造成产物合成阶段营养物质供应不足。由图 7d 可知,ACT 产量随转速增加而增大,当转速为 210 r/min 时 ACT 产量达到最大值,随后开始下降。ACT 的积累需要大量氧气,低转速条件下溶氧较低不利于菌体生长繁殖,但转速过高产生的剪切力会加速菌体衰亡,同时可能会导致副产物 2,3-丁二醇、四甲基吡嗪会加速生成^[26]。由图 7e 可知,ACT 产量随装液量增加而增大,当装液量为 50 mL/250 mL 时 ACT 产量达到最大值,随后开始下降,这是由于装液量也与溶氧有关,装液量过少时,溶氧虽然增加,但发酵后期营养不足,不利于 ACT 积累。

2.5.2 正交试验

在单因素实验的基础上,通过正交试验考察各因素对 *B.velezensis* DQA21 的 ACT 产量影响的大小。正交试验设计方案及结果见表 3,由极差分析可知,各因素对 ACT 产量的影响大小依次为 pH>温度>装液量>接种量>转速。选取对 ACT 产量影响前 3 的因素进行响应面试验,其余各因素选取最优值进行实验,转速 210 r/min,接种量 5%。正交试验方差分析结果

见表4, pH和温度 $p<0.01$, 装液量 $p<0.05$, 接种量和转速 $p>0.05$, 说明pH和温度对ACT产量具有极显著影响, 装液量对ACT产量具有显著性影响, 接种量和转速对ACT产量无显著性影响。

表3 正交试验设计方案及结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

实验号	A: 接种量/%	B: pH	C: 温度/℃	D: 转速/(r/min)	E: 装液量/mL	ACT 产量/(g/L)
1	1(3)	1(5.0)	1(33)	1(180)	1(40)	17.51±0.52
2	1	2(5.5)	2(37)	2(210)	2(50)	24.95±0.64
3	1	3(6.0)	3(40)	3(240)	3(60)	16.53±0.49
4	2(5)	1	1	2	2	18.92±0.32
5	2	2	2	3	3	23.64±0.42
6	2	3	3	1	1	17.70±0.46
7	3(7)	1	2	1	3	20.02±0.64
8	3	2	3	2	1	22.91±0.33
9	3	3	1	3	2	16.46±0.09
10	1	1	3	3	2	18.32±0.10
11	1	2	1	1	3	19.75±0.41
12	1	3	2	2	1	17.94±0.12
13	2	1	2	3	1	20.56±0.23
14	2	2	3	1	2	23.29±0.44
15	2	3	1	2	3	16.07±0.31
16	3	1	3	2	3	18.12±0.19
17	3	2	1	3	1	20.70±0.36
18	3	3	2	1	2	19.53±0.22
K ₁	19.16	18.91	18.23	19.63	19.55	
K ₂	20.03	22.54	21.11	19.82	20.25	
K ₃	19.62	17.37	19.48	19.37	19.02	
R	0.86	5.17	2.87	0.45	1.22	

表4 正交试验方差分析

Table 4 The variance analysis of orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
接种量	2.17	2	1.09	4.03	0.07	
pH	84.35	2	42.18	156.17	0.00	**
温度	24.79	2	12.39	45.89	0.00	**
转速	0.61	2	0.31	1.14	0.37	
装液量	4.45	2	2.23	8.25	0.01	*
误差	1.89	7	0.27			
总和	118.28	17				

注: *差异显著 ($p<0.05$), **差异极显著 ($p<0.01$)。

2.5.3 Box-Behnken 实验结果与分析

2.5.3.1 二次响应面回归模型的建立与分析

根据正交试验结果, 对 pH、温度、装液量做 3 因素 3 水平共 17 个试验 (5 个中心点) 的响应面分析试验, 设计方案及结果见表 5。经多元二次回归拟合后, 建立了 ACT 发酵条件优化模型, 回归方程为:

$$Y=25.42-0.72A+0.40B-0.38C-0.33AB+0.23AC+0.17BC-$$

$$5.57A^2-2.07B^2-2.02C^2。$$

由回归模型方差分析 (表 6) 可知, 模型 $p<0.01$, 达到极显著水平, 说明模型的预测值与实际值非常吻合。失拟项 p 为 $0.32>0.05$, 失拟项差异不显著, 证明模型与实验拟合程度较好, 具有统计学意义。模型中一次项 A、B、C 对 ACT 产量的影响极显著, 一次项影响因子的主次顺序为 pH>温度>装液量, 这与正交

试验的结果吻合。二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对 ACT 产量的影响极显著。交互项 AB 对 ACT 产量的影响极显著， AC 对 ACT 产量影响显著， BC 对 ACT 产量影响不显著。

表 5 响应面试验设计方案及结果

Table 5 Design and results of response surface test				
试验号	因素 1	因素 2	因素 3	响应值
	A: pH	B: 温度/℃	C: 装液量/mL	ACT 产量/(g/L)
1	3 (6.0)	2 (37)	3 (60)	17.08±0.25
2	2 (5.5)	2	2 (50)	25.37±0.56
3	2	2	2	25.45±0.47
4	2	1 (34)	1 (40)	21.50±0.41
5	2	3 (40)	1	22.00±0.35
6	1 (5.0)	3	2	19.25±0.56
7	3	3	2	16.99±0.52
8	1	2	1	19.00±0.33
9	1	2	3	17.93±0.24
10	3	1	2	16.90±0.11
11	2	2	2	25.21±0.65
12	3	2	1	17.31±0.27
13	2	1	3	20.32±0.35
14	2	2	2	25.57±0.36
15	2	2	2	25.36±0.30
16	2	3	3	21.49±0.22
17	1	1	2	17.91±0.21

表 6 回归模型方差分析结果

Table 6 Analysis of variance (ANOVA) for response surface model						
变异来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
模型	187.10	9	20.79	754.01	0.00	**
A	4.20	1	4.20	152.51	0.00	**
B	1.28	1	1.28	46.42	0.00	**
C	1.12	1	1.12	40.80	0.00	**
AB	0.42	1	0.42	15.32	0.00	**
AC	0.20	1	0.20	7.34	0.03	*
BC	0.12	1	0.12	4.44	0.07	
A^2	130.75	1	130.75	4742.17	0.00	**
B^2	18.09	1	18.09	655.94	0.00	**
C^2	17.22	1	17.22	624.68	0.00	**
残差	0.19	7	0.03			
失拟项	0.10	3	0.03	1.59	0.32	
纯误差	0.09	4	0.04			
总离差	187.30	16				

2.5.3.2 各因子交互作用对 ACT 产量影响的分析

响应面图可以直观的反映出试验因素对 ACT 产量的影响，响应面坡度越陡峭，说明响应面值对操作条件的改变越敏感。温度和 pH（图 8a）、装液量和 pH（8b）交互作用的响应曲面坡度均较为陡峭且等高

线密集，呈椭圆形，表明交互作用显著；装液量和温度（图 8c）交互作用的响应曲面坡度均较为平缓，等高线稀疏，接近圆形，表明交互作用不显著，该结果与表 6 方差分析结果一致。

2.5.3.3 最优实验条件 ACT 产量及验证

通过对回归方程模型的分析, *B. velezensis* DQA21 产 ACT 的最佳发酵条件为: pH 5.46, 温度 37.3 °C, 装液量 49.2 mL, 此时 ACT 产量预测值为 25.45 g/L。在此条件下, 重复 5 次摇瓶发酵实验, 得到 ACT 平均产量为 25.60±0.33 g/L, 该结果与预测值十分接近, 证明试验得到的模型可以较好的预测 *B. velezensis* DQA21 发酵后 ACT 产量。

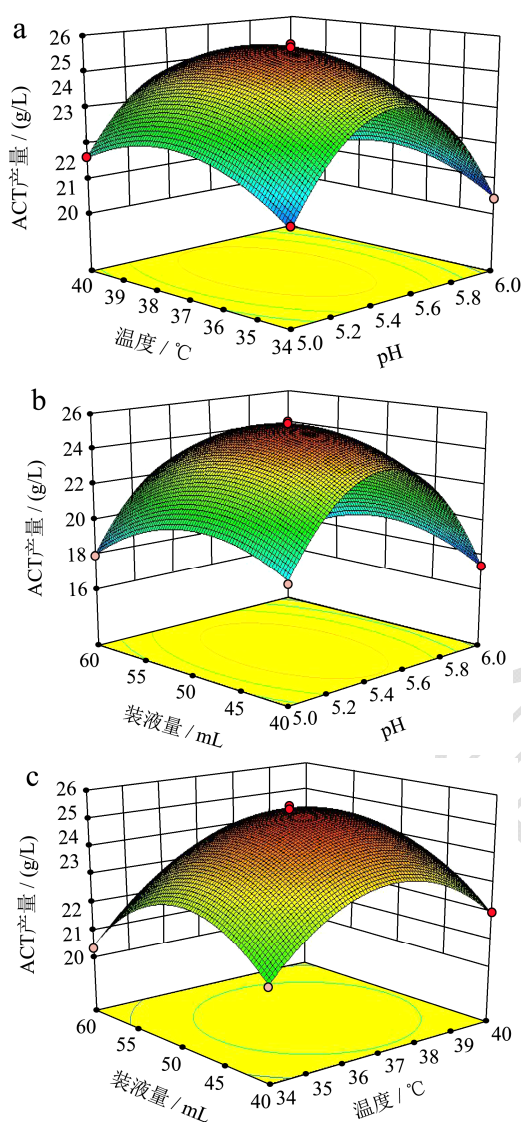


图7 响应面分析因素间交互作用对 ACT 产量的影响

Fig.7 Response surface analysis of the effect of interactions among independent variables on ACT yield

注: a: 温度和 pH 对 ACT 产量的影响; b: 装液量和 pH 对 ACT 产量的影响; c: 装液量和温度对 ACT 产量的影响。

3 讨论

3.1 本研究从浓香型大曲中分离出 30 株芽孢杆菌, 通过肌酸比色法快速判断出其中 20 株菌株可产 ACT, 有 5 株产 ACT 能力较强, 将这 5 株菌摇瓶发酵后测吸光值, 利用 ACT 标准曲线计算出 ACT 产量, 得到

一株高产 ACT 的菌株 A21。经生理生化及 16S rDNA 鉴定, A21 为一株贝莱斯芽孢杆菌, 其 pH 耐受范围为 3.5~9、乙醇最大耐受值为 5%。在单因素试验的基础上进行了正交试验, 由极差分析可知, 各因素对 ACT 产量的影响大小依次为 pH>温度>装液量>接种量>转速。对前 3 因素进行响应面优化试验, 由方差分析可知: pH、温度、装液量对 ACT 产量的影响极显著。*B.velezensis* DQA21 产 ACT 的最佳发酵条件为: pH 5.46, 温度 37.3 °C, 装液量 49.2 mL, 转速 210 r/min, 接种量 5%, 此时 ACT 产量为 25.60 g/L, 比优化前菌株产率 18.37 g/L 提高了 39.13%。

3.2 赵洪源^[13]利用气相色谱法从凉州熏醋中筛选出一株高产 ACT 的醋酸杆菌, 最佳发酵条件为培养温度 31.31 °C、接种量 8.27%、pH 6.55、摇床转速 209 r/min, 最适条件下 ACT 达到 19.04 g/L, 比原始发酵产量高 35.80%; 郝飞^[23]通过两阶段控制 pH: 发酵前期 (0~16 h), 控制 pH 5.5, 发酵中后期 (16~72 h), 控制 pH 4.5, 使菌株合成 ACT 的能力得到进一步提高, ACT 的产量为 32.70 g/L。本研究所得贝莱斯芽孢杆菌的发酵条件与他们有明显差异, 证明不同来源的菌株发酵水平不同。刘延波^[27]、王志山^[28]从大曲中分离筛选出的贝莱斯芽孢杆菌具有高产淀粉酶、蛋白酶的特征; 杨斌^[29]从大曲中获得一株具有高发酵力的贝莱斯芽孢杆菌, 但都未对贝莱斯芽孢杆菌的其余特性进一步探究。现有产 ACT 芽孢杆菌的研究多为枯草芽孢杆菌^[30]、解淀粉芽孢杆菌^[31], 贝莱斯芽孢杆菌产 ACT 的报道较少, 且多应用于生物防治^[32], 未见对大曲中高产 ACT 贝莱斯芽孢杆菌菌株的报道。

3.3 由于 *B.velezensis* DQA21 来源于大曲, 对温度有较大的耐受性, 且在耐酸、耐乙醇等方面表现出较好的特性, 非常利于后期通过代谢工程的手段, 使其 ACT 产量大幅提升, 为 ACT 微生物合成的工业化奠定基础。*B.velezensis* DQA21 可作为强化曲^[33]投入发酵, 也可制成窖泥养护液, 使其定植于窖泥中, 改善窖泥风味, 对提高浓香型大曲酒的风味具有潜在价值, 同时 ACT 作为健康功能因子四甲基吡嗪的前体物质, 也表明该功能菌株在健康营养白酒生产中有非常重要的应用前景^[34]。本研究主要采用摇瓶发酵的方法, 很多因素 (如 pH、溶氧、补糖等) 难以在发酵过程中进行有效控制, 不能充分发掘该菌发酵生产 ACT 的潜力, 对于该菌廉价原料的寻找、ACT 发酵规模的放大及相关酶学性质, 也待进一步研究。

参考文献

[1] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 中高温大曲中一株耐热细菌的分离

- 鉴定及其风味代谢产物分析[J].食品工业科技,2016,37(24): 215-220
- ZHOU Ping, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Separation and identification of *Thermophilic bacteria* strains in medium/high temperature Daqu and the analysis of the flavor metabolites [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(24): 215-220
- [2] WANG Xiao-dan, BAN Shi-dong, HU Bao-dong, et al. Bacterial diversity of Moutai-flavour Daqu based on high-throughput sequencing method [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(1): 138-143
- [3] XIAO Zi-jun, LU Jian R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 492-503
- [4] 林群,董胜,付秋香,等.产香风味枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分离及发酵代谢产物分析[J].酿酒科技,2013,11: 30-32
- LIN Qun, DONG Sheng, FU Qiu-xiang, et al. Isolation of aroma-producing *Bacillus subtilis* and analysis of its fermentation metabolites [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2013, 11: 30-32
- [5] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 2017:288
- SHEN Yi-fang. Baijiu Production Technology Book [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017: 288
- [6] XIAO Zi-jun, XU Ping. Acetoin metabolism in bacteria [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2007, 33(2): 127-140
- [7] YANG Tao-we, RAO Zhi-ming, ZHANG Xian, et al. Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(8): 990-1005
- [8] 张小舟,曾崇余,任晓乾.乙偶姻合成工艺[J].南京化工大学学报:自然科学版,2001,23(4):54-57
- ZHANG Xiao-zhou, ZENG Chong-yu, REN Xiao-qian. Preparation of acetoin from 2,3-butanedione by catalytic reduction method [J]. Journal of Nanjing Tech University (Natural Science Edition), 2001, 23(4): 54-57
- [9] GAO Chao, ZHANG Li-jie, XIE Ying-jian, et al. Production of (3S)-acetoin from diacetyl by using stereoselective NADPH-dependent carbonyl reductase and glucose dehydrogenase [J]. Bioresour Technol, 2013, 137(Complete): 111-115
- [10] XIAO Zi-jun, LU Jian R. Generation of acetoin and its derivatives in Foods [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(28): 6487-6497
- [11] Bae S J, Kim S, Hahn J S. Efficient production of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of 2,3-butanediol dehydrogenase and expression of NADH oxidase [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27667
- [12] Sun J A, Zhang L Y, Rao B, et al. Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase [J]. Bioresour Technol, 2012, 119: 94-98
- [13] 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 Hong-yuan, YUN Jian-min, SHAO Xiao-qing, 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
- [14] 刘芳,廖先清,周荣华,等.响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌CY30 发酵培养基的研究[J].湖北农业科学,2019,58(23): 91-94
- LIU Fang, LIAO Xian-qing, ZHOU Rong-hua, et al. Study on optimization of fermentation medium of *Bacillus velezensis* CY30 by using response-surface method [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(23): 91-94
- [15] TIAN Yan-jun, FAN Yi-xiao, ZHAO Xiang-ying, et al. Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* SF4-3 using statistical methods [J]. Prep Biotechnol, 2014, 44(5): 529-543
- [16] Teixeira R M, Cavalheiro D, Ninow J L, et al. Optimization of acetoin production by *Hanseniaspora guilliermondii* using experimental design [J]. Brazilian Journal Chemical Engineering, 2002, 19(2): 181-186
- [17] ZHENG Yin, FEI Yong-tao, YANG Yue, et al. A potential flavor culture: *Lactobacillus harbinensis* M1 improves the organoleptic quality of fermented soymilk by high production of 2,3-butanedione and acetoin [J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103540
- [18] LEI Liu, XU Qiu-man, CHEN Tao, et al. Artificial consortium that produces riboflavin regulates distribution of acetoin and 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* CJX518 [J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(9): 1039-1049
- [19] 胥振国,蔡玉华,袁星,等.直接用于 PCR 反应的芽孢杆菌基因组 DNA 抽提改良方法的建立[J].中国生物制品学杂志, 2012,25(5):630-632

- XU Zheng-guo, CAI Yu-hua, YUAN Xing, et al. Development of an improved method for extraction of genomic DNA from *Bacillus*, used for PCR directly [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2012, 25(5): 630-632
- [20] 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
- [21] 郝飞,吴群,徐岩.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵生产乙偶姻的 pH 调控策略[J].微生物学通报,2013,40(6):921-927
- HAO Fei, WU Qun, XU Yan. Two-stage pH control strategy of acetoin production by *Bacillus subtilis* CCTCC M 208157 [J]. Microbiology China, 2013, 40(6): 921-927
- [22] Störmer F C. The pH 6 acetolactate-forming enzyme from *Aerobacter aerogenes*. I. kinetic studies [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1968, 243(13): 3740-3741
- [23] 刘永锋.高产乙偶姻地衣芽孢杆菌筛选和摇瓶发酵工艺优化及 2,3-丁二醇脱氢酶初探[D].武汉:华中农业大学,2010
- LIU Yong-feng. Strain isolation and optimization of flask fermentation parameters for efficient production of acetoin by *Bacillus licheniformis* and primary investigation of 2,3-butanediol dehydrogenase [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010
- [24] ZHANG Xian, BAO Teng, RAO Zhi-ming, et al. Two-stage pH control strategy based on the pH preference of acetoin reductase regulates acetoin and 2,3-Butanediol distribution in *Bacillus subtilis* [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91187
- [25] ZHU Bing-feng, XU Yan, FAN Wen-lai. 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
- [26] TIAN Yan-jun, FAN Yi-xiao, LIU Jian-jun, et al. Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3 [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 19: 41-49
- [27] 刘延波,张世凯,赵志军,等.高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J].食品与机械,2020,36(1):65-71
- LIU Yan-bo, ZHANG Shi-kai, ZHAO Zhi-jun, et al. Isolation and identification of amylase bacterial and optimization of enzyme production conditions by response surface [J]. Food & Machinery, 2020, 36(1): 65-71
- [28] 王志山,李苗,陈文浩,等.一株芝麻香型白酒高温大曲细菌 Q2B1 的鉴定及其产酶活性研究[J].中国酿造,2020,2:51-55
- WANG Zhi-shan, LI Miao, et al. CHEN Wen-hao. Identification and enzyme activity of *Bacterium* Q2B1 isolated from high-temperature Daqu of sesame-flavor Baijiu [J]. China Brewing, 2020, 2: 51-55
- [29] 杨斌,周健,明红梅.浓香型大曲中 1 株高发酵力芽孢杆菌的筛选和鉴定[J].酿酒科技,2018,5:17-22,28
- YANG Bin, ZHOU Jian, MING Hong-mei. Screening & identification of a *Bacillus* strain with high fermenting power in Nongxiang Daqu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2018, 5: 17-22, 28
- [30] GUO Ze-wang, OU Xiao-yang, LIANG Shan, et al. Recruiting a phosphite dehydrogenase/formamidase-driven antimicrobial contamination system in *Bacillus subtilis* for nonsterilized fermentation of acetoin [J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(9): 2537-2545
- [31] LV Chuan-juan, GE Yong-sheng, CAO Meng-hao, et al. Metabolic engineering of *Bacillus licheniformis* for production of acetoin [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 125
- [32] Mi L S, Mi-Young Y, Ja C G, et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi [J]. Plant Pathol J, 2017, 33(5): 488-498
- [33] 刘宇,管桂坤,万自然,等.复合功能微生物在酱香型白酒生产中的应用研究[J].酿酒科技,2019,12:98-104,118
- LIU Yu, GUAN Gui-kun, WAN Zi-ran, et al. Application of functional microorganisms in the production of Jiangxiang Baijiu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2019, 12: 98-104, 118
- [34] 刘宇琼,曹荣冰,何松贵,等.人体健康活性成分吡嗪高产菌株的筛选及应用研究[J].酿酒,2019,46(4):50-54
- LIU Yu-qiong, CAO Rong-bing, HE Song-gui, et al. Research on selecting and application on bacterias with prolific pyrazine for human health active ingredients [J]. Liquor Making, 2019, 46(4): 50-54