

# 微生物生长法检测生物素含量方法的研究

王丽丽<sup>1</sup>, 仪宏<sup>1</sup>, 王瑞果<sup>2</sup>, 沙惠琴<sup>2</sup>

(1. 河北科技大学 生物科学与工程学院, 石家庄 050018;

2. 石家庄珍极酿造集团有限责任公司, 石家庄 050000)

**摘要:**利用生物素营养缺陷型菌株的特点,建立了简便检测天然有机物中生物素含量的微生物方法。当生物素浓度在 1~4 $\mu\text{g/L}$ ,与平板生长圈直径大小呈直线相关。用此方法检测了玉米浆、酵母膏、甜菜糖蜜中生物素的含量分别为 747,248,1707 $\mu\text{g/kg}$ 。

**关键词:**生物素;谷氨酸;营养缺陷型;检测;玉米浆

中图分类号:TS201.2 文献标识码:B 文章编号:1000-9973(2008)02-0058-03

## Microorganism growing method for detecting biotin content

WANG Li-li<sup>1</sup>, YI Hong<sup>1</sup>, WANG Rui-guo<sup>2</sup>, SHA Hui-qin<sup>2</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, HeBei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018 China; 2. Shijiazhuang Zhenji Brew Group Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:** A simple microorganism growing method is established to detect biotin content in nature organic materials by biotin nutrition-defective strain. The biotin content is linearity related to the bacteria growing circle diameter when the biotin content is at the range of 1 $\mu\text{g/L}$  to 4 $\mu\text{g/L}$ . The biotin content identified by the method at the corn slurry, yeast extractive, sirup is 747,248,1707 $\mu\text{g/kg}$ , respectively.

**Key words:** biotin; glutamic acid; nutrition-defective; detect; corn slurry

生物素(Biotin)又名维生素 H,是一种水溶性、含硫维生素,分子式为  $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 。生物素作为生物体内一种辅酶,参与机体多种主要的新陈代谢活动,如促进羧化或脱羧作用反应,促进不饱和脂肪酸的合成,是人类和动物的一种必需的维生素,是重要的饲料添加剂<sup>[1]</sup>。

生物素也同样是微生物的生长因子,培养基中生物素含量的高低成为谷氨酸发酵合成重要的调节因子<sup>[2]</sup>,发酵液中生物素含量处于亚适量(3~6 $\mu\text{g/L}$ )的条件下,才能大量积累分泌谷氨酸。朱明军<sup>[3]</sup>(2003)报道,发酵液中维持 2 $\mu\text{g/L}$  生物素含量可提高 30% 虾青素的产量,杨毅<sup>[4]</sup>(2005)报道,发酵液中生物素含量在 40 $\mu\text{g/L}$  时可明显提高缬氨酸在胞外的累积,因此高灵敏度检测发

酵原料中生物素的含量对多种发酵生产都有重要指导意义。

微生物检测法是利用营养缺陷型菌株对某一种营养因子的依赖性建立起来的生物检测方法,本研究采用生物素营养缺陷型菌株(北京棒杆菌 AS 1.299),探讨生物素与菌体生长量的直接对应关系,免去样品的预处理步骤,建立简易检测生物素含量的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

检测菌:北京棒杆菌 AS 1.299,本研究室保存;菌种活化培养基:固体牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[5]</sup>;固体平板检测培养基:葡萄糖、磷酸氢二钾、

硫酸镁、硫酸铵、琼脂;待测样品:玉米浆(42% w/w)、糖蜜(60% w/w)、酵母膏(70% w/w);仪器设备:精密电子天平、电热恒温培养箱、灭菌锅、鼓风干燥箱、微量移液枪、冰箱、超净工作台及玻璃器皿。

1.2 方法

1.2.1 检测菌的培养

冰箱斜面菌种,固体平板活化 24h,茄子瓶中扩大培养 24h,无菌水洗下制成 100mL 菌悬液,4℃ 冰箱保存备用,保存期 15d。

1.2.2 固体平板检测方法

取 4℃ 冰箱保存的菌悬液 1mL,30℃ 保温 10min,与 50℃ 左右的无菌固体平板检测培养基 20mL 混匀,倒平板,凝固后放入直径 50mm 的圆滤纸片,并在圆滤纸片上加入 45μL 的标准生物素溶液或待测样品稀释液,35℃ 培养 24h,测定生长圈直径。

2 结果与讨论

2.1 检测菌生长培养基成分的确定

要进行生物素含量的测定,培养基中不应含有任何形式的生物素,因此需要设计适于检测菌生长的组合培养基。

表 1 几种组合固体培养基成分对检测菌生长的影响(10g/mL)

序号	葡萄糖	磷酸氢二钾	硫酸镁	尿素	硫酸铵 %	复合氨基酸 %	复合微量元素	维生素 B <sub>1</sub>	生长情况
1	2.0	0.1	0.04	0.6					-
2	2.0	0.1	0.04		0.6				+++
3	2.0	0.1	0.04		0.6	0.5	0.005	0.005	+++

注:均加入纯生物素 20μg/L,琼脂 1.8%,pH6.8,自来水配制“-”表示不生长,“+++”表示生长很好。

由表 1 看出,当以尿素作为氮源时,1 号培养基检测菌不生长,经检测发现尿素经高温灭菌后分解产氨,使培养基 pH>8.5,菌体不生长。当用硫酸铵替代尿素后,灭菌后培养基 pH 基本不变,菌体生长良好,见图 1。

当培养基中补加 18 种复合氨基酸、微量元素和维生素 B<sub>1</sub> 后,菌体生长与 2 号培养基生长状况相似,因此认为 2 号培养基成分可以满足测定需要。

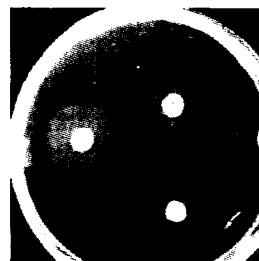


图 1 检测菌的平板生长情况

2.2 固体平板生长圈与生物素含量的关系

将标准浓度的生物素逐级稀释后,分别取 45μL 加入到平板的滤纸片上,每个稀释度重复 3 次,35℃ 培养 24h,测定生长圈直径,去平均值,见表 2。

表 2 固体平板生长圈直径与生物素含量的关系

序号	生物素的浓度 (μg/L)	平板生长圈平均直径(cm)
1	0	0
2	0.01	0
3	0.1	0
4	0.5	0.6
5	1	0.76
	2	1.60
6	3	2.15
7	4	2.50
8	5	2.80
9	8	3.05
10	15	3.15

注:通过以上数据作图,绘制标准曲线。

由图 2、图 3 可知生物素含量在 1~4μg/L 时与生长圈直径呈良好的直线关系,并且灵敏度较高,生物素浓度太低或太高时,生长圈直径大小与生物素浓度关系误差较大。由于菌株生长受环境的影响较大,因此实际检测未知样品时要同时检测标准生物素的生长圈大小,及时校正回归方程。一般检测样品时,选择平板生长圈直径大小在 1~2.0cm 为适宜样品稀释浓度。

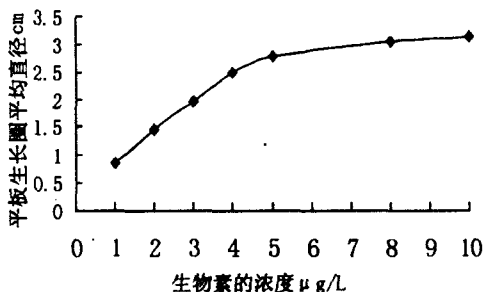


图 2 生物素浓度与生长圈直径之间的关系

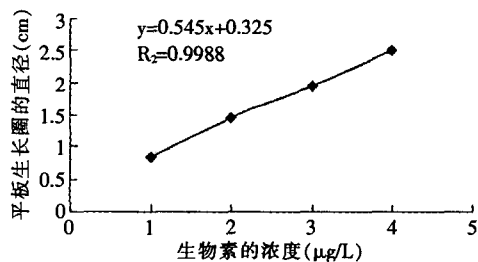


图 3 1~3 $\mu\text{g/L}$  生物素浓度与生长圈直径之间的线性关系

### 2.3 几种有机样品生物素含量的测定

表 3 几种有机样品中生物素含量的测定

序号	标准生物素 /( $\mu\text{g/L}$ )及玉米 浆稀释样品	生长圈 直径平均 值/(cm)	生物素 含量/ ( $\mu\text{g/kg}$ )
1	0	0	$y = 0.654x + 0.125$ $R_2 = 0.9974$
2	1.0	0.75	
3	2.0	1.45	
4	3.0	2.14	
5	4.0	2.70	
6	玉米浆稀释 200 倍	2.68	781.3
7	玉米浆稀释 400 倍	1.35	749.2
8	玉米浆稀释 500 倍	1.10	745.4
9	玉米浆稀释 800 倍	0.80	825.7
10	酵母膏稀释 50 倍	2.30	166.3
11	酵母膏稀释 75 倍	2.10	226.5
12	酵母膏稀释 100 倍	1.75	248.4
13	酵母膏稀释 200 倍	0.83	215.6
14	糖蜜稀释 200 倍	2.30	665.1
15	糖蜜稀释 400 倍	2.20	1269.1
16	糖蜜稀释 600 倍	1.95	1674.3
17	糖蜜稀释 800 倍	1.55	1743.1
18	糖蜜稀释 1000 倍	1.24	1704.9
19	糖蜜稀释 1200 倍	0.85	1330.3

玉米浆、酵母膏、甜菜糖蜜均为粘稠的浆状营养氮源,成分复杂,色泽酱黄或酱黑,是工业微生物发酵常用的有机营养物,含有丰富的生物素。样品按重量(10g)称取后,按体积进行逐级稀释作为被测样品,并以标准浓度的生物素为对照,同时校正回归方程,每个样品做 3 个平行,测量生长圈的平均值。

由表 3 的结果可见,几种有机样品经过不同倍数稀释后,测定的生物素含量有较大差异,但生长圈直径在 1~2.0cm 范围内,生物素的含量相对比较稳定,由此方法计算出生物素含量为:

玉米浆中生物素的含量平均为:  $(749.2 + 745.4) \div 2 = 747 \mu\text{g/kg}$

酵母膏中生物素含量平均为:  $248 \mu\text{g/kg}$

甜菜糖蜜的生物素含量平均为:  $(1674.3 + 1743.1 + 1704.9) \div 3 = 1707 \mu\text{g/kg}$

### 3 结论

由以上结果表明,用微生物生长圈法可以成为检测复杂有机样品中生物素含量的一种简便方法,结果表明:(1)普通玉米浆中生物素的平均含量为  $747 \mu\text{g/kg}$ ;(2)试剂级酵母膏中生物素平均含量  $248 \mu\text{g/kg}$ ;(3)甜菜糖蜜中生物素的含量为  $1707 \mu\text{g/kg}$ 。余林梁等<sup>[6]</sup>(2003)采用高效液相色谱测定饲料中生物素的含量,检出限为  $1 \text{mg/kg}$ ;肖晶等<sup>[7]</sup>(2006 年)采用高效液相色谱法测定了保健品中的生物素含量,最低检出量为  $0.5 \text{mg/kg}$ 。显然微生物生长检测法具有操作简单、重复性好、灵敏度高,不需要对样品进行烦琐的预处理,检出极限为  $1 \sim 5 \mu\text{g/kg}$ ,适用于复杂天然有机物中的生物素检测,对于谷氨酸等发酵生产有重要的指导意义。同时操作过程中也需注意:被检测样品的酸碱度、样品稀释准确性、平板培养基加量一致性以及标准生物素的校正,特别是菌体生长圈直径大小要控制在  $1 \sim 2.0 \text{cm}$  为适宜生物素浓度,检测最准确。

#### 参考文献:

- [1]吴琼,孙文志,白兆鹏.生物素及其在动物生产中的应用[J].饲料博览,2004(6):46-47.
- [2]王岁楼,张一震,李志.谷氨酸高产菌TZ-310的诱变选育及其发酵的研究[J].中国调味品,1997(9):16-19.
- [3]朱明军,梁世中.生物素对红发夫酵母生长和虾青素积累的影响(英文)[J].华南理工大学(自然科学版),2003,31(6):80-84.
- [4]杨毅,张志兰,姜绪林,等.生物素和VB<sub>1</sub>在谷氨酸棒杆菌过量合成缬氨酸中的作用[J].食品与生物技术学报,2005,24(4):57-60.
- [5]黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000:114.
- [6]余林梁,黄晓兰,吴惠勤.饲料中生物素的高效液相色谱测定[J].分析测试学报,2003,22(5):102-104.
- [7]肖晶,杨大进,张馨之.高效液相色谱法测定保健食品中的生物素[J].中国食品卫生杂志,2006,18(3):234-236.