

# 饲用枯草芽孢杆菌发酵工艺的优化及菌剂制备

吴东, 刘惠琴, 徐力, 田永强\* (兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要** [目的] 为饲用枯草芽孢杆菌的大规模生产奠定基础。[方法] 通过单因素试验和正交试验, 对发酵培养基配方及其发酵条件进行优化。[结果] 饲用枯草芽孢杆菌的最佳培养基为: 葡萄糖 3%、酵母浸膏 1.5%、磷酸氢二钠 0.2%、磷酸二氢钠 0.1%、硫酸镁 0.1%、酵母浸粉 0.5%。饲用枯草芽孢杆菌的最适发酵条件为: 温度 38 ℃, 初始 pH 7.0~7.2, 摇床转速 180 r/min, 接种量 7%。选择木屑质量与发酵液体积(m/V)的混合比为 3:5, 继续高温发酵 16 h, 芽孢产量可达到  $5.18 \times 10^{10}$  CFU/g。[结论] 该研究可为饲用枯草芽孢杆菌的工业化生产提供了数据支持。

**关键词** 枯草芽孢杆菌; 发酵工艺; 优化; 菌剂; 制备

**中图分类号** S816.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)19-134-04

## Fermentation Process's Optimization of Forage *Bacillus subtilis* and the Preparation of Bacterium Agent

WU Dong, LIU Hui-qin, XU Li, TIAN Yong-qiang\* (School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract** [Objective] The research aimed to lay the foundation for the large-scale production of forage *Bacillus subtilis*. [Method] Using the single factor and orthogonal test, the formula and the fermentation conditions of culture medium were optimized. [Result] The optimum medium for forage *B. subtilis* was as follows: 3% glucose, 1.5% yeast extract, 0.2% sodium dimetallic phosphate, 0.1% disodium hydrogen phosphate, 0.1% magnesium sulfate, 0.5% yeast powder. The optimal fermentation conditions were as follows: temperature of 38 ℃, initial pH of 7.0-7.2, rotation speed of 180 r/min, inoculation amount of 7%. The mixing ratio of wood quality and the volume of fermentation broth was 3:5, the high-temperature fermentation continued for 16 h, the yield of bud can reach  $5.18 \times 10^{10}$  CFU/g. [Conclusion] The research could provide data support for the industrial production of forage *B. subtilis*.

**Key words** *Bacillus subtilis*; Fermentation process; Optimization; Bacterium agent; Preparation

饲用抗生素的使用在我国过去的很多年内对养殖业的发展作出了突出的贡献。但是, 随着社会和科技的发展, 人们对食品安全越来越重视, 抗生素产生一系列负面问题(如耐药性), 引起饲料用药及治疗用药量越来越高, 并且过量使用抗生素容易导致动物生产能力降低<sup>[1]</sup>。枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种, 由于其在自然界广泛分布, 枯草芽孢杆菌产生孢子时能分泌许多种酶类物质和生长因子, 稳定性极好, 具有耐氧化、抗挤压、耐高温、耐酸等特征<sup>[2]</sup>。此外, 枯草芽孢杆菌抗逆性很强, 能够储藏的时间较长, 它在颗粒或粉料中都有较强的稳定性, 也能够很通顺地进入动物的大小肠道生存并且能够大范围繁殖, 是在微生物饲料添加剂中应用最为广泛的益生菌。枯草芽孢杆菌不污染环境, 不破坏生态, 能够抑制许多病原菌<sup>[3-6]</sup>。它还有一个最大的优势就是能够产生内生芽孢, 抗逆性强, 在土壤和植物表面普遍存在, 其芽孢可以制成粉剂和可湿性粉剂等各种生防制剂应用于农业生产, 该制剂具有与化学农药混用而不失活的特性<sup>[7-9]</sup>。制剂中的芽孢含量是影响制剂应用效果的关键因素。通过优化发酵培养基配方及其发酵条件, 提高发酵液中芽孢含量, 以期为大规模工业化生产奠定基础, 有助于降低生产成本和提高制剂的生防效果。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验用培养基

**1.1.1 种子培养基。**LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L<sup>[10-13]</sup>。

**1.1.2 基础发酵培养基。**蔗糖 20 g/L、蛋白胨 15 g/L、酵母浸粉 5 g/L、MgSO<sub>4</sub> 1 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L, 水 1 000 ml, 将 pH 调节至 7.0, 用于枯草芽孢杆菌发酵培养。

**1.2 菌种** 枯草芽孢杆菌 CM0002, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

**1.3 仪器与设备** 控温摇床、高压蒸气灭菌锅、电子天平、pH 测定仪、无菌操作台和紫外分光光度计。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 菌种活化。**将保存的菌种转接到斜面培养基, 30 ℃ 培养 24 h, 活化 3 次, 备用。

**1.4.2 种子液的制备。**将保存的枯草芽孢杆菌接于新鲜培养皿平板, 35 ℃ 条件下培养 24 h, 取培养好的平板菌种再接种于盛有 50 ml 种子培养基的 250 ml 三角烧瓶中, 摇床 35 ℃、160 r/min 培养 20 h。

**1.4.3 生长趋势的测定。**取培养好的斜面种子, 用接种环挑 2 环接种于盛有 50 ml 无菌种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 培养 20 h, 按照 5% 接种于盛有 50 ml 基础发酵培养基的 250 ml 三角瓶中, 按照上述试验确定的最优化的培养基并采用摇瓶发酵培养条件培养 30 h。自接种后每 2 h 取样 1 次测定菌发酵培养基的菌液的 OD<sub>600</sub>, 直至 36 h。用未接种的培养基作为空白对照。

**1.4.4 摇瓶发酵培养。**分别用移液枪移动 2.5 ml 种子液, 接入盛有 50 ml/250 ml 基础发酵培养基的三角瓶中(接种量为 5%, V/V)。置于摇床中, 35 ℃ 条件下振荡培养 22 h, 转速为 160 r/min, 初始 pH 为 7.0。

**1.4.5 活菌生物量的测定。**采用平板菌落计数法计数。

**1.4.6 培养基的单因素试验。**①最佳碳源的筛选。分别用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、牛肉膏采用相同的 2% 的添加量替换

**基金项目** 甘肃省农牧厅项目(213177)。

**作者简介** 吴东(1987-), 男, 甘肃张掖人, 硕士研究生, 研究方向: 工业微生物。\* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事微生物分离、鉴定和应用研究。

**收稿日期** 2015-05-07

蔗糖,接种与培养条件不变,培养 22 h 后测定菌液的  $OD_{600\text{nm}}$ 。用未接种的培养基作为空白对照,以确定最佳的碳源。每个处理 3 个重复,取平均值。②最佳氮源的筛选。分别用胰蛋白胨、酵母浸膏、尿素、硫酸铵采用相同的 1.5% 的添加量替换蛋白胨,培养与处理方法同上。③无机盐的筛选。分别用 0.4% 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.2%) +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.2%)、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CaCO}_3$  等量替代基础发酵培养基中的 0.2%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的与 0.2% 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  的复合盐,培养与处理方法同上,配制培养基进行发酵培养。④发酵培养基营养成分的正交优化。将筛选出的最佳碳源设置 1%、2%、3% 3 个处理,最佳氮源设置 1.0%、1.5%、2.0% 3 个处理,最佳无机盐设置 0.1%、0.2%、0.3% 3 个处理,进行正交试验。接种与培养条件不变,测定发酵液的  $OD_{600}$ 。用未接种的培养基作为空白对照,以确定各主要营养成分在发酵培养基中的添加比例。

**1.4.7 培养条件的单因素优化试验。**采用最适培养基配方和固定摇瓶培养,对发酵时间、温度、初始 pH、转速、接种量及装液量进行逐一优化。①最佳培养温度的优化。按照优化后的培养基配方对枯草芽孢杆菌进行培养,接种量 5%, pH 7.0,将接种后的培养基分别置于 29、32、35、38、41 °C 条件下振荡培养,转速为 160 r/min,22 h 后测定菌液的  $OD_{600\text{nm}}$ 。用未接种的培养基作为空白对照,每个处理 3 个重复,取平均值。②最佳初始 pH 的优化。按照优化后的培养基配方及培养温度对枯草芽孢杆菌进行培养,接种量 5%,初始 pH 分别设置为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,转速 160 r/min 振荡培养。处理方法同上。③最佳接种量的优化。将枯草芽孢杆菌分别以 1%、3%、5%、7% 和 9% 的接种量接种于优化后的培养基中,并按照优化后的培养条件,转速 160 r/min 振荡培养。处理方法同上。④最佳装液量的优化。将培养好的种子液以最优接种量分别接于 30、40、50、60、70 ml 的已优化的基础发酵培养基中,在最优条件下进行培养,测定菌液的  $OD_{600\text{nm}}$ 。用未接种的培养基作为空白对照。⑤最佳摇床转速的优化。按照优化后的培养基配方、接种量、装液量、初始 pH 和培养温度对枯草芽孢杆菌进行培养,转速分别设置为 120、140、160、180 和 200 r/min 振荡培养,处理方法同上。

**1.4.8 枯草芽孢杆菌芽孢制备及干菌粉制备。**①枯草芽孢杆菌芽孢的制备。将枯草芽孢杆菌接种于优化好的发酵培养基中培养完成后,在发酵好的枯草芽孢杆菌发酵液中分别加入等量的经研磨、灭菌的(麻子秸秆粉、青草粉、木屑)放入 40 恒温水浴锅中继续培养 16 h 后将混合有(麻子秸秆粉、青草粉、木屑)的发酵液放入 80 水浴锅中水浴 10 min,取样品 1 g 放入灭菌试管,进行梯度稀释,取稀释液 0.5 ml,倒入 LB 固体培养基中涂布培养 30 h 后计数。②枯草芽孢杆菌干菌粉的制备。将发酵好的枯草芽孢杆菌发酵液中分别加入等量的经研磨、灭菌的(麻子秸秆粉、青草粉、木屑)放入 40 恒温水浴锅中继续培养 16 h 后,取出放入正空恒温干燥箱中干燥,制备干菌粉。

## 2 结果与分析

**2.1 生长曲线的测定**<sup>[14]</sup> 取培养好的平板,用接种环挑 2

环接种于盛有 50 ml/250 ml 无菌种子培养基中,培养 20 h 后按 5% 接种量接入已经最优化的培养基,并采用摇瓶培养发酵培养 30 h。自接种后每 2 h 取样 1 次测定菌液的  $OD_{600}$ ,用未接种的培养基作为空白对照。从图 1 可以看出,发酵培养 0~2 h 为枯草芽孢杆菌的生长延缓期,细菌生长极慢;2 h 以后逐渐进入对数生长期,菌体数量急剧增多;在 17 h 达到生长高峰期,12~17 h 为枯草芽孢杆菌生长的稳定期,菌体生长缓慢。17 h 以后细菌数量开始减少,枯草芽孢杆菌进入生长衰亡期。因此,采用培养 17 h 的菌液作为菌种比较合适,此时枯草芽孢杆菌为对数生长末期,既可保持高的细胞活力,又可获得尽可能多的菌体生物量。

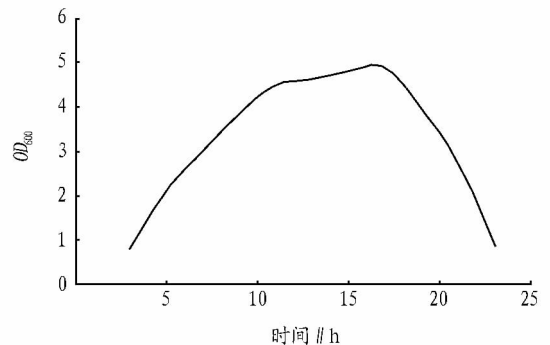


图 1 枯草芽孢杆菌的生长曲线

## 2.2 发酵培养基营养成分的优化

**2.2.1 最佳碳源的筛选。**从图 2 可以看出,以葡萄糖作为碳源时,枯草芽孢杆菌的生物量最大。葡萄糖可以在细胞生长时期作为枯草芽孢杆菌的最佳碳源,同时可以作为细胞合成的前体的物质,因此选择葡萄糖作为最佳碳源。

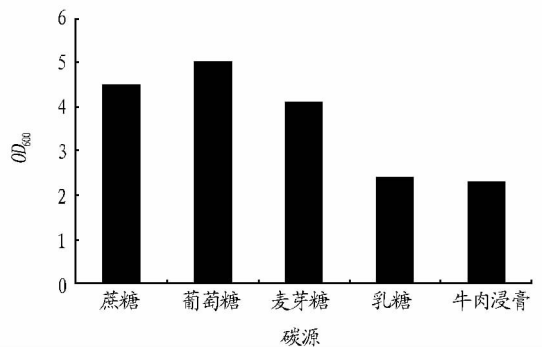


图 2 不同碳源对枯草芽孢杆菌生长量的影响

**2.2.2 最佳氮源的筛选。**从图 3 可以看出,以酵母浸膏作为氮源时,枯草芽孢杆菌的生长量最大。因此,枯草芽孢杆菌的最佳氮源是酵母浸膏。

**2.2.3 无机盐的筛选。**从图 4 可以看出,以  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1:1) 作为无机盐时,枯草芽孢杆菌的生长量最大。因此,枯草芽孢杆菌的最佳无机盐为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (二者比例为 1:1)。

**2.3 发酵培养基营养成分含量的正交优化**<sup>[14]</sup> 由表 1 可知,这 3 种营养成分对枯草芽孢杆菌生长的影响大小顺序为:酵母浸膏 > 葡萄糖 > 无机盐。3 种营养成分经优化后最佳的配比为:3% 葡萄糖、1.5% 酵母膏、0.2% 磷酸氢二钠、

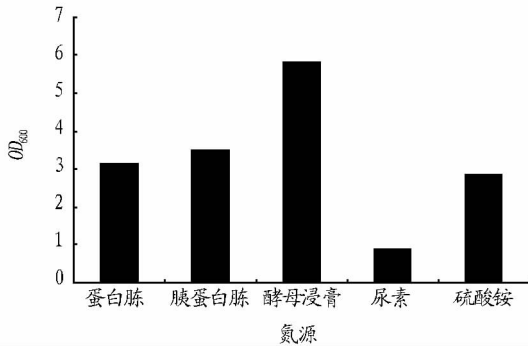


图3 不同氮源对枯草芽孢杆菌生长量的影响

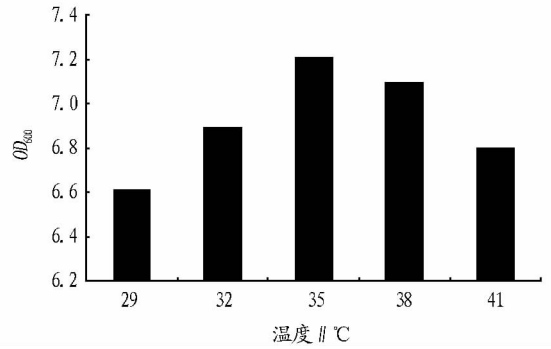


图5 不同温度对枯草芽孢杆菌生长量的影响

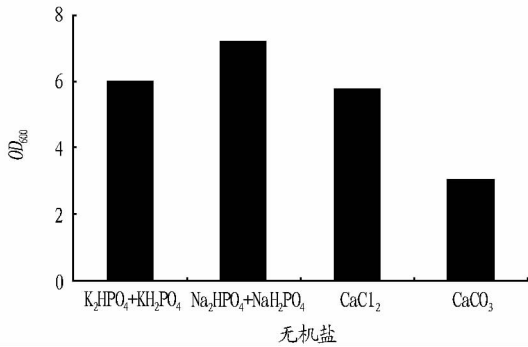


图4 不同无机盐对枯草芽孢杆菌生长量的影响

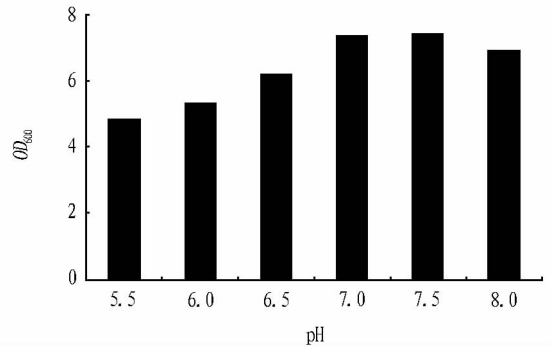


图6 不同pH对枯草芽孢杆菌生长量的影响

表1 正交设计方案及结果

处理	葡萄糖 %	酵母浸膏 %	磷酸氢二钠 %	磷酸二氢钠 %	OD <sub>600</sub>
1	1	1	1	1	2.99
2	1	2	2	2	6.22
3	1	3	3	3	5.89
4	2	1	2	3	4.75
5	2	2	3	1	7.05
6	2	3	1	2	4.59
7	3	1	3	2	5.56
8	3	2	1	3	7.75
9	3	3	2	1	7.96
K1	5.03	4.43	5.11	6.00	
K2	5.46	7.01	6.31	5.46	
K3	7.09	6.15	6.17	6.13	
R	2.06	2.58	1.20	0.67	

0.1%的磷酸二氢钠。

## 2.4 发酵培养条件的优化

**2.4.1 最佳温度的确定。**从图5可以看出,枯草芽孢杆菌的最适培养温度是35℃。

**2.4.2 最佳初始pH的确定。**从图6可以看出,液体发酵培养枯草芽孢杆菌时的最适初始pH应为7.0~7.5。

**2.4.3 最佳接种量的确定。**从图7可以看出,当接种量为7%时,发酵液中枯草芽孢杆菌的活菌数量达到最大,因此最佳的接种量应为7%。

**2.4.4 最佳装液量的确定。**从图8可以看出,当其他条件最优时,最佳的装液量为30ml置于250ml三角瓶中发酵。

**2.4.5 最佳摇床转速的确定。**从图9可以看出,液体发酵培养枯草芽孢杆菌时的最适培养转速应为200 r/min。

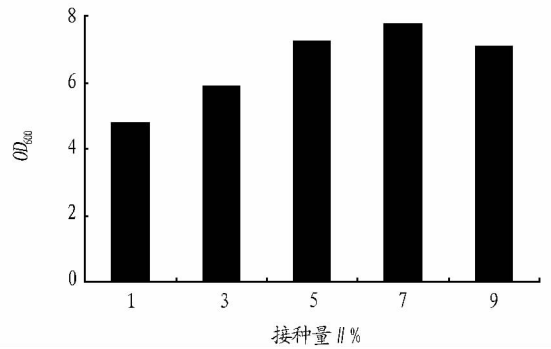


图7 不同接种量对枯草芽孢杆菌生长量的影响

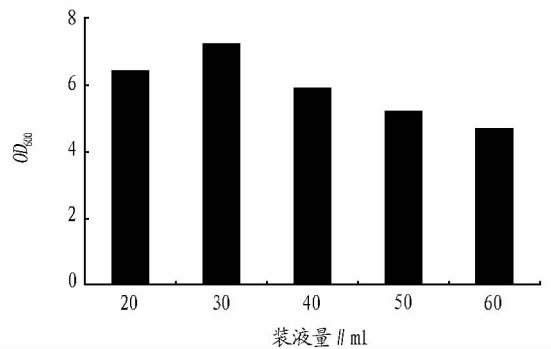


图8 不同装液量对枯草芽孢杆菌生长量的影响

**2.5 枯草芽孢杆菌芽孢的制备** 由表2可知,不同的固相支持物对枯草芽孢杆菌发酵液形成芽孢有较好的促进作用,其中木屑对饲用枯草芽孢杆菌产芽孢率有明显的促进作用,其原因主要可能是发酵液里面的枯草芽孢杆菌菌体能够借助固相支持物本身进行吸附及同时借助固相支持物之间相互形成的空隙阻断营养物质的供应对芽孢形成起到促进作

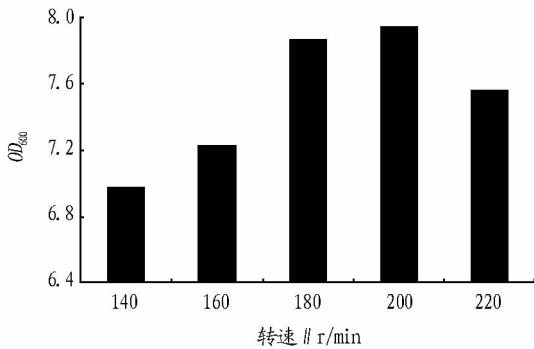


图9 不同转速对枯草芽孢杆菌生长量的影响

用。因此,最后选择木屑质量与发酵液体积的比例为3:5,以提高发酵液芽孢产率。

表2 固相支持物对枯草芽孢杆菌芽孢产率的影响

固相支持物	固相支持物质量/g	发酵体积/ml	芽孢产率/%
麻子秸秆粉	5	25	80.0
麻子秸秆粉	10	25	86.2
麻子秸秆粉	15	25	89.0
青草粉	5	25	74.0
青草粉	10	25	72.0
青草粉	15	25	69.0
木屑	5	25	88.0
木屑	10	25	91.3
木屑	15	25	94.2

**2.6 枯草芽孢杆菌干菌粉的制备** 将发酵好的枯草芽孢杆菌发酵液中分别加入经研磨、灭菌的木屑(与发酵液体积的比例为3:5)放入40℃恒温水浴锅中继续培养。取出目的产物放入正空恒温干燥箱中干燥,等全部的物质干燥完成后研磨制备成干菌粉。

### 3 小结

笔者通过摇瓶发酵对枯草芽孢杆菌培养基和培养条件

进行了初步研究,结果表明不同的培养条件、不同的碳氮源无机盐及不同配比对枯草芽孢杆菌的生物量有很大的影响。培养温度35℃、初始pH7.0~7.5、装液量30ml和接种量7%的基础培养液中振荡培养17h,可以使菌体生物量达到最大值( $7.90 \times 10^9$  CFU/g)。通过正交试验得到枯草芽孢杆菌的最佳培养基为:葡萄糖3%、酵母膏1.5%、磷酸氢二钠0.2%、磷酸二氢钠0.1%。该试验结果仅是在三角瓶培养水平上获得的,但若要实现产业化开发,还需要进行固体反应器条件下的中间放大试验,同时该试验也为其工业化大规模生产微生物农药剂奠定了一定的实践基础。

### 参考文献

- [1] 陈红平,严寒. 微生态制剂及其在动物生产上的作用研究进展[J]. 广东饲料,2002,11(1):35-36.
- [2] 潘康成,杨汉博. 饲用芽孢菌作用机理的研究进展[J]. 饲料工业,1997,18(9):32-35.
- [3] 周庆安,刘文刚,邓留坤,等. 动物微生态制剂及其应用[J]. 饲料博览,2003(4):11-13.
- [4] 李研东. 动物微生态制剂的使用现状及应用前景[J]. 河北畜牧兽医,2005(4):48-50.
- [5] 张根伟. 枯草芽孢杆菌BS-6液体发酵条件的研究[J]. 河北省科学院学报,2005,22(1):54-57.
- [6] 黄秀梨,夏立秋. 微生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2000:8.
- [7] 王进华,戚薇,陈莹,等. 凝结芽孢杆菌芽孢形成液体培养基的研究[J]. 杭州食品科技,2003,71(4):5-10.
- [8] 张水鸥,罗创国. 微生态制剂对生长育肥猪生产性能的影响[J]. 畜牧兽医杂志,2008(27):21-24.
- [9] 崔东良,佟建明,王云山,等. 凝结芽孢杆菌工业化发酵培养基初步研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(12):73-75.
- [10] 张媛媛,赵敏,张宁. 复合益生菌芽孢杆菌发酵培养基及条件的优化[J]. 东北林业大学学报,2012,40(3):93-97.
- [11] 丁翠珍,裘季燕,刘伟成,等. 枯草芽孢杆菌B02产生拮抗物质培养基及培养条件的优化[J]. 中国生物防治,2008,24(2):159-163.
- [12] 孙笑非. 促使芽孢杆菌大量生成芽孢的方法[J]. 饲料研究,2009(6):62-63.
- [13] 秦玉昌,潘宝海,于荣,等. 芽孢杆菌对畜禽生产性能的影响[J]. 中国饲料,2004(16):8-10.
- [14] 张志众,徐海燕,杨军方. 枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化[J]. 饲料博览,2005(9):34-36.

## GB/T 7714-2005

## 电子文献著录格式

主要责任者. 题名;其他题名信息[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 示例:

- [1] PACS-L:the public-access computer systems forum[EB/OL]. Houston, Tex: University of Houston Libraries, 1989[1995-05-17]. <http://info.lib.uh.edu/pacsl.html>.
- [2] Online Computer Library Center, Inc. History of OCLC[EB/OL]. [2000-02-08]. <http://www.oclc.org/about/history/default.htm>.
- [3] HOPKINSON A. UNIMARC and metadata; Dublin Core[EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.