

1 株益生蜡样芽孢杆菌发酵培养基优化研究

黄秀敏, 李学优, 叶俊豪, 夏枫耿, 曹丁 (广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要 [目的]通过优化蜡样芽孢杆菌的发酵培养基,提高蜡样芽孢杆菌的生物量。[方法]在初始发酵培养基的基础上,通过单因素试验和正交试验确定蜡样芽孢杆菌发酵培养基的最适碳氮源和碳氮比。[结果]优化后的发酵培养基为:葡萄糖 15.00 g/L,可溶性淀粉 40.00 g/L,蛋白胨 10.00 g/L,玉米浆干粉 30.00 g/L,硫酸铵 3.00 g/L,磷酸氢二钾 5.00 g/L,磷酸二氢钠 5.00 g/L,硫酸镁 1.25 g/L,硫酸锰 0.60 g/L,氯化钙 2.00 g/L。优化后蜡样芽孢杆菌在 50 L 不锈钢发酵罐中的发酵液活菌数达 1.6×10^{10} cfu/mL,较优化前提高了 1 个数量级。[结论]优化后的蜡样芽孢杆菌发酵培养基大大提高了该菌的生物量,为工业化放大生产提供了参考。

关键词 蜡样芽孢杆菌;发酵培养基;优化

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)30-0007-02

Optimization of Fermentation Medium for A Probiotic *Bacillus cereus*

HUANG Xiu-min, LI Xue-you, YE Jun-hao et al (Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663)

Abstract [Objective] To increase the biomass of *Bacillus cereus* by optimizing the its fermentation medium. [Method] On the basis of initial fermentation medium, the single factor experiment and orthogonal experiment were used to determine the optimum carbon and nitrogen ratios in fermentation medium. [Result] The optimized fermentation medium was: 15.00 g/L glucose, 40.00 g/L soluble starch, 10.00 g/L peptone, corn steep powder 30.00 g/L, 3.00 g/L ammonium sulfate, 5.00 g/L dipotassium hydrogenphosphate, 5.00 g/L dihydrogen phosphate sodium, 1.25 g/L magnesium sulfate, 0.60 g/L manganese sulfate, and 2.00 g/L calcium chloride. After optimization, fermented viable cell count of *Bacillus cereus* in 50 L cans reached up to 1.6×10^{10} cfu/mL, which improved an order of magnitude comparing with that before optimization. [Conclusion] The optimized culture medium greatly enhances the biomass of *Bacillus cereus*, which provides references for the large-scale production in industrialization.

Key words *Bacillus cereus*; Fermentation culture medium; Optimization

芽孢杆菌是一类兼性厌氧或好氧,革兰氏阳性杆菌的总称,产芽孢,生理特征丰富多样,分布极其广泛,是植物体表、根际以及土壤、空气的重要微生物种群。芽孢杆菌是一类产生大量不同化学结构的多肽抗菌物质的物种^[1]。

蜡样芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,主要分布于尘埃、土壤、植物、水及空气中,能产生具有抗逆性内生芽孢,对紫外线、离子辐射、热和抗菌素及其他化学药品的抗性较高^[2]。蜡样芽孢杆菌可产生多种有益生物活性物质,在医药保健、农业、食品和饲料等各领域有着极其广泛的应用,牧渔养殖业上用作饲料添加剂,农业上用作生防制剂^[3-4]。笔者通过单因素试验和正交试验对 1 株益生蜡样芽孢杆菌发酵培养基进行了优化,并进行了 50 L 不锈钢发酵罐中试试验,以期对蜡样芽孢杆菌的工业化生产提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 蜡样芽孢杆菌由广州市微生物研究所提供。

1.1.2 培养基 种子和检测培养基采用 LB 培养基:胰蛋白胨 10.00 g/L,酵母粉 5.00 g/L,氯化钠 5.00 g/L, pH 7.0, 固体培养基加 20.00 g/L 琼脂粉。基础发酵培养基:葡萄糖 30.00 g/L,酵母粉 20.00 g/L,硫酸铵 3.00 g/L,磷酸氢二钾 5.00 g/L,磷酸二氢钠 5.00 g/L,硫酸镁 1.25 g/L,硫酸锰 0.60 g/L,氯化钙 2.00 g/L, pH 7.0。

1.1.3 主要试剂 胰蛋白胨(英国 Oxoid 公司)、琼脂粉(广东省广州环凯生物科技有限公司)、酵母粉(湖北安琪酵母股

份有限公司)、蛋白胨(贵州新华生化科技发展有限公司)、玉米浆干粉(山东康源生物科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、752N 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、pHS-25 数显酸度计(上海雷磁仪器厂)、50 L 不锈钢发酵罐(上海洋格生物工程设备有限公司)、DHZ-DA 大容量全温振荡器(江苏省太仓市实验设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 蜡样芽孢杆菌生长曲线的绘制 将活化好的蜡样芽孢杆菌接种于发酵培养基中,每间隔 3 h 取样测定发酵液的 pH 和 OD 值,绘制菌体生长曲线。

1.2.2 蜡样芽孢杆菌摇瓶发酵试验 从新鲜种子斜面挑取 1 环菌体,接入装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h,制成种子液;以 1% 的接种量将活化好的种子液接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h,取样测定 OD 值。

1.2.3 发酵过程参数测量

1.2.3.1 菌体生物量测定 测量经适当稀释后的发酵液在 600 nm 波长处的 OD 值。

1.2.3.2 pH 测定 用 pHS-25 数显酸度计测定。

1.2.3.3 菌落计数 采用平板菌落计数法。

1.2.4 最佳发酵培养基的确定

1.2.4.1 最佳碳源的确定 分别用 30.00 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米淀粉替代基础培养基中的碳源,其余配方同基础发酵培养基,进行摇瓶发酵试验。

1.2.4.2 最佳氮源的确定 在筛选出最佳碳源的基础上,分别用 23.00 g/L 的酵母粉、玉米浆干粉、蛋白胨、牛肉膏、豆

基金项目 广东省广州市科技计划项目(201605040004);广东省省级科技计划项目(2016B090918055)。

作者简介 黄秀敏(1990-),女,广东梅州人,助理工程师,从事微生物研究。

收稿日期 2016-09-14

粕粉、硫酸铵替代基础发酵培养基中的氮源,其余配方同基础发酵培养基,进行摇瓶发酵试验。

1.2.4.3 正交试验。采用4因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交表进行优化试验,研究影响蜡样芽孢杆菌生长的主要因素:葡萄糖、可溶性淀粉、蛋白胨和玉米浆干粉,求取最佳配比。正交试验因素与水平见表1。

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	葡萄糖(A) Glucose %	可溶性淀粉(B) Soluble starch//%	蛋白胨(C) Peptone %	玉米浆干粉(D) Corn steep powder//%
1	1.0	2.0	1.0	2.0
2	1.5	3.0	2.0	3.0
3	2.0	4.0	3.0	4.0

1.2.5 发酵中试试验。根据发酵培养基的优化结果,在50 L不锈钢发酵罐中进行扩大培养验证,发酵罐装液量为25 L。种子培养同摇瓶试验,接种量为4%,培养温度为37℃,通风量为10 m³/h,搅拌转速为200 r/min,罐压保持在0.04~0.06 MPa,发酵过程中pH保持在7.0左右。每2 h取样,测定发酵液的OD值,同时观察芽孢形成情况。

2 结果与分析

2.1 蜡样芽孢杆菌生长曲线 由图1可知,蜡样芽孢杆菌在0~3 h处于迟缓期,3 h以后进入对数生长期,OD值快速提高,至12 h OD值达到最高,进入稳定期,从18 h开始,蜡样芽孢杆菌进入衰亡期。在生产中通常使用对数期的菌体作为种子,此时菌体生长速率最快、代谢旺盛、酶系活跃、活细菌数和总细菌数大致接近、细胞的化学组成形态理化性质基本一致,所以选定蜡样芽孢杆菌的最佳种龄是12 h。

此外,随着培养时间的增加,pH逐渐上升,说明蜡样芽孢杆菌在增值过程中产生的代谢产物为碱性物质。

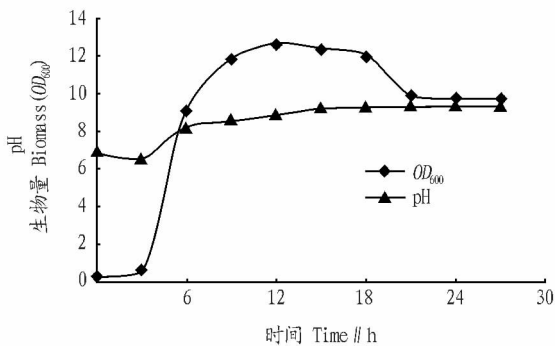


图1 蜡样芽孢杆菌的生长曲线和pH变化曲线

Fig. 1 Growth curve and pH change curve of *Bacillus cereus*

2.2 最佳发酵培养基的确定

2.2.1 最佳碳源。由图2可知,可溶性淀粉作为碳源时蜡样芽孢杆菌的生长明显优于其他碳源,OD值达14,所以最佳碳源为可溶性淀粉,其次是葡萄糖,最差的是玉米淀粉。但是考虑到可溶性淀粉是多糖,而葡萄糖作为速效碳源,能迅速启动菌体生长,缩短发酵周期,故选择葡萄糖和水溶性淀

粉搭配使用作为复合碳源。

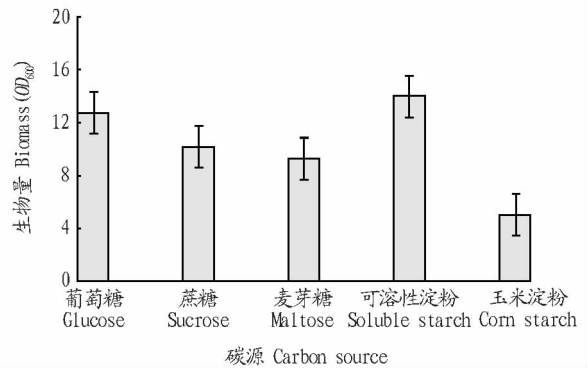


图2 碳源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

Fig. 2 Effects of carbon source on the growth of *Bacillus cereus*

2.2.2 最佳氮源。由图3可知,选用玉米浆干粉作为氮源时的OD值极显著高于其他组别,蛋白胨和牛肉膏次之。玉米浆干粉是以鲜玉米浆为原料经低温瞬间加热喷雾干燥而成,其水溶性蛋白质保存完好,在微生物发酵过程中提供水溶性植物蛋白及水溶性维生素等营养元素。使用硫酸铵时,生物量显著低于其他组别,说明蜡样芽孢杆菌在有机氮源中的生长明显优于无机氮源。由于硫酸铵能促进芽孢的生成,所以保留硫酸铵作为无机氮源。同样考虑到速效氮源有利于菌体快速启动,缩短迟缓期,同时蛋白胨的成本远低于牛肉膏,故选择蛋白胨和玉米浆干粉搭配使用作为最佳氮源。

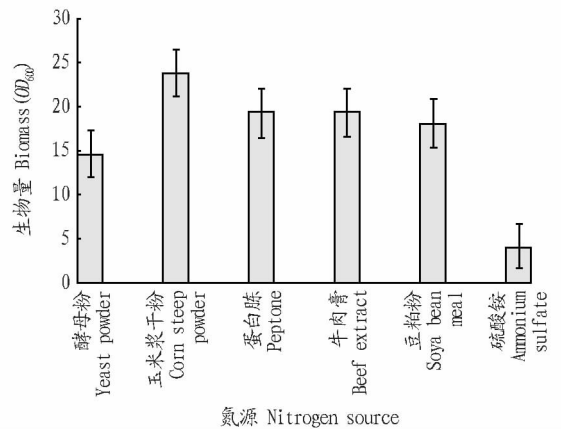


图3 氮源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen source on the growth of *Bacillus cereus*

2.2.3 正交试验结果。根据表2极差大小得出各因素对蜡样芽孢杆菌生物量影响的显著性顺序为玉米浆干粉>可溶性淀粉>蛋白胨>葡萄糖。最优培养基组合为 $A_2B_3C_1D_2$,即1.5%葡萄糖、4.0%可溶性淀粉、1.0%蛋白胨、3.0%玉米浆干粉。在摇瓶中对优化后的培养基配方进行验证,测得OD值为52.335,与正交试验结果一致。

2.3 50 L不锈钢发酵罐中试试验结果 由图4可知,0~2 h为迟缓期,较摇瓶缩短了1 h,镜检菌体稀少;2~12 h为对数生长期,菌体快速增值,12 h OD值达到最高,为61.505,高于摇瓶正交试验结果,生物量最大,此时镜检菌体增大、增

(下转第15页)

表 2 秋石斛试验品种幼苗耐寒性调查结果

Table 2 Investigation result of cold resistance of *Dendrobium* seedling cultivars

编号 Code	品种 Cultivar	黄叶率 Yellow leaf rate//%	落叶率 Defoliation rate//%
1	水蜜桃	1.57 c	0 c
2	秋石斛 5 号	3.93 c	0.56 c
3	红霞	4.73 c	0 c
4	秋石斛 6 号	7.37 c	0.46 c
5	秋石斛 1 号	18.57 b	7.86 b
6	马来西亚绿花	22.98 b	1.24 c
7	纯绿花	33.11 a	0.66 c
8	三亚阳光	37.38 a	21.50 a

注:同列数据后不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。
Note: Different lowercases in the same column indicated significant differences between treatments at 0.05 level.

源进行了初步的耐寒性评价,结果表明部分品种具有较好的耐寒性,能在海南安全越冬,如水晶、秋石斛 1 号、玉翡翠、水晶宝宝等;部分品种耐寒性一般,在不出现极端低温天气情况下亦可在海南越冬,但会受低微的低温伤害,如金如意、纯

绿花等;部分品种对低温非常敏感,耐寒性较低,在海南栽培越冬较困难,若出现极端低温,将造成重大损失,如秋石斛 41 号、秋石斛 709 号、秋石斛 513 号、秋石斛 699 号等。上述结果可为适栽品种的筛选、耐寒杂交育种的亲本选择等方面提供参考。

由于自然低温发生的强度和存在年度间差异,根据 1 个鉴定点、1 次鉴定结果对种质的耐寒性进行评价不够准确,因此,还需对初步鉴定筛选出的耐寒性强或极强的种质材料在人工控制条件下进行多次鉴定。

参考文献

- [1] 卢思聪. 秋石斛及其栽培[J]. 中国花卉盆景, 1999(7): 6-7.
- [2] 刘广林, 陈传华, 罗群昌, 等. 2009 年自然低温下优质稻种质资源耐冷性初步鉴定评价[J]. 南方农业学报, 2012, 43(4): 407-412.
- [3] 马增凤, 刘驰, 张月雄, 等. 低温寡照自然条件对不同水稻材料苗期耐寒性的影响[J]. 西南农业学报, 2015, 28(2): 447-452.
- [4] 陈鹭真, 王文卿, 张宜辉, 等. 2008 年南方低温对我国红树植物的破坏作用[J]. 植物生态学报, 2010, 34(2): 186-194.
- [5] 吕庆芳, 李映志, 余伟, 等. 持续低温引起菠萝蜜田间寒害症状调查及抗寒性分析[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 81-85.
- [6] 王冠群, 李丹青, 张佳平, 等. 德国鸢尾 6 个品种的耐寒性比较[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 773-780.

(上接第 8 页)

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号 Test code	因素 Factor				生物量 Biomass (OD_{600})
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	42.323
2	1	2	2	2	49.878
3	1	3	3	3	48.020
4	2	1	2	3	47.216
5	2	2	3	1	43.355
6	2	3	1	2	50.442
7	3	1	3	2	48.337
8	3	2	1	3	49.504
9	3	3	2	1	42.055
K_1	46.740	45.959	47.423	42.578	
K_2	47.004	47.579	46.383	49.552	
K_3	46.632	46.839	46.571	48.247	
R	0.372	1.620	1.040	6.974	

长,并开始形成芽孢,这是因为发酵罐搅拌和溶氧量远高于摇瓶,更有利于菌体生长;12 h 后进入稳定期,镜检菌体基本全部形成芽孢;20 h 进入衰亡期,菌体明显变少,芽孢开始脱落。12 h 发酵液活菌计数达 1.6×10^{10} cfu/mL,芽孢率为 96%。

3 结论

通过单因素试验和正交试验确定了蜡样芽孢杆菌最适发酵培养基为:葡萄糖 15.00 g/L,可溶性淀粉 40.00 g/L,蛋白胨 10.00 g/L,玉米浆干粉 30.00 g/L,硫酸铵 3.00 g/L,磷酸氢二钾 5.00 g/L,磷酸二氢钠 5.00 g/L,硫酸镁 1.25 g/L,

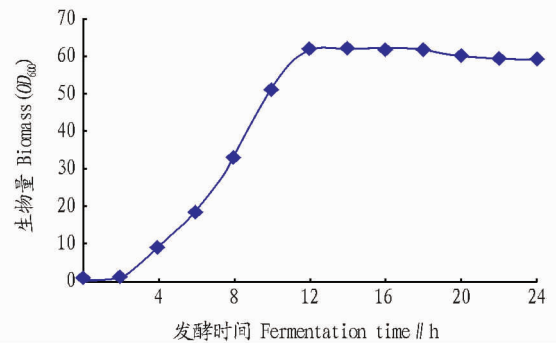


图 4 蜡样芽孢杆菌在 50 L 发酵罐中的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of *Bacillus cereus* in 50 L fermentation tank

硫酸锰 0.60 g/L,氯化钙 2.00 g/L。优化后摇瓶 OD 值达 52.335,是优化前的 4 倍,50 L 不锈钢发酵罐中试发酵的 OD 值为 61.505,发酵液活菌数达 1.6×10^{10} cfu/mL,较优化前的发酵液活菌数提高了 1 个数量级,表明优化后的发酵培养基显著提高了蜡样芽孢杆菌的生物量,具有实际应用价值,可为今后规模化生产提供理论依据。

参考文献

- [1] STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, synthesis and specific functions[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 845-857.
- [2] 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.
- [3] 聂实践,林伯荃,朱桂茹,等. 益生多(S-586)饲用微生态制剂的防病作用实验[J]. 饲料研究, 1999(5): 27-28.
- [4] 张惠云. 微生态制剂在水产养殖中的应用[J]. 饲料博览, 2000, 21(6): 46-47.