

# 苏云金芽孢杆菌增效物质回收工艺的改进

陈振民<sup>1,2</sup> 李 青<sup>2</sup> 刘华梅<sup>2</sup> 谢天健<sup>2</sup> 曹军卫<sup>1\*</sup>

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)<sup>1</sup> (武汉科诺生物农药有限公司 武汉 430074)<sup>2</sup>

**摘要:**应用膜过滤技术对苏云金芽孢杆菌 KN-11 增效物质回收工艺进行了改进,发现纳滤膜(200 D)能完全截留 KN-11 增效物质,通过 3 种膜过滤(0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、10,000 D 超滤膜和 200 D 纳滤膜)的总回收率达到 85.5%;与常规回收比较,膜过滤回收工艺能显著提高浓缩液和粉的增效物质含量(分别为 99.35 U/mL, 457.70 U/g),同时除去了大部分的糖、氮等可溶性杂质,使浓缩液和粉保持了较好的理化性状。所配制的 Bt 高含量悬乳剂的效价在 15,645 ~ 19,465 IU/ $\mu\text{L}$  之间,含固量较低且流动性较好, Bt 高含量原粉效价可达 100,646 IU/mg。

**关键词:**苏云金芽孢杆菌, 增效物质, 回收工艺改进, 膜过滤技术

**中图分类号:** S476<sup>+</sup>.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0094-05

## Study on Improvement of Recovering Process of Synergier from *Bacillus thuringiensis*

CHEN Zhen-Min<sup>1,2</sup> LI Qing<sup>2</sup> LIU Hua-Mei<sup>2</sup> XIE Tian-Jian<sup>2</sup> CAO Jun-Wei<sup>1\*</sup>

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)<sup>1</sup>

(Wuhan Kernel Biopesticide Company, Wuhan 430074)<sup>2</sup>

**Abstract:** Recovering process of synergier from *Bacillus thuringiensis* KN-11 was improved by membrane filter technique. The results showed that the synergier from ferment liquid could be fully intercepted by the nanomembrance (200 D), and reached the total recovery rate of 85.5% (0.1  $\mu\text{m}$  micromembrance, 10,000 D ultramembrance and 200 D nanomembrance). Comparing with traditional recovering technology, membrane filter recovering technology could raise content of synergier in condense liquid and powder (99.35 U/mL, 457.70 U/g, respectively), get rid of most foreign substance (such as dextrose, nitrogen) and keep condense liquid and powder in good physical-chemical characteristics. The emulsion made by membrane filter recovering technology had many excellences in high activity (15,645-19,465 IU/ $\mu\text{L}$ ), low solid content and good flowing characteristics. The technical powder had high potency (100646 IU/mg).

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, Synergier, Improvement of recovering process, Membrane filter technique

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是目前世界上产量最大的微生物杀虫剂<sup>[1]</sup>。其某些亚种的发酵上清液中含有一类对 Bt 晶体杀虫有显著增效作用的可溶性增效物质<sup>[2-4]</sup>。能否有效地回收 Bt 增效物质,是提高 Bt 生产效价收率的关键,因此越来越受到重视。Bt 增效物质的常规回收方法是采用发酵液直接喷雾干燥,上清液直接喷雾干燥或浓缩后加填料喷雾干燥<sup>[5]</sup>。上述方法使 Bt 效价收率得到大幅度提高,但是仍存在许多不足之处。随着生物技术的飞速发展,膜过滤技术目前已在酶制剂、疫苗、药物、基因生物制品、农用抗生素等的分离、浓缩和提纯中得到广泛应用,已成

\* 联系人 Tel: (027) 87872137, E-mail: caojw@email.whu.edu.cn

收稿日期: 2004-04-05, 修回日期: 2004-06-14

为提高产品质量, 缩短生产周期和提高功效的重要手段<sup>[6]</sup>。本文研究了膜过滤技术用于改进 Bt 增效物质的回收工艺, 通过此项工艺的使用, 明显提高了产品品质, 促进了 Bt 增效物质得到有效的利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

苏云金芽孢杆菌 KN-11 和以豆粕、淀粉为主的培养基, 武汉科诺公司提供。

### 1.2 发酵和上清液、菌浆的制备

参考文献 [3], 采用上述培养基发酵, 制备上清液和离心沉淀物 (菌浆) 备用。

### 1.3 膜过滤工艺回收 KN-11 增效物质

**1.3.1 膜过滤回收工艺流程:** KN-11 增效物质为一种性质类似于 zwittermicin A (分子量为 396 D) 的物质<sup>[4,5]</sup>, 根据文献 [6, 7], 设计膜过滤工艺流程, 如图 1。将一定体积原液 (上清液或发酵液) 依次通过微滤膜 (孔径为 0.1  $\mu\text{m}$ )、超滤膜 (10,000 D 或 4,000 D) 和纳滤膜 (200 D 或 400 D) 过滤处理。第 1 步用微滤膜除去上清液或发酵液中直径大于 0.1  $\mu\text{m}$  的不溶性杂质 (如菌体、伴

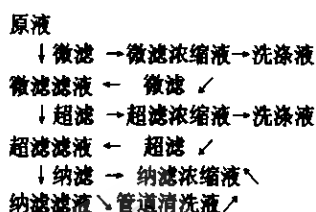


图 1 膜过滤工艺流程图

孢晶体、芽孢和培养基残渣), 同时加 10 L 水洗涤微滤后剩余的浓缩液, 洗涤液再经过微滤, 合并两次微滤滤液。第 2 步用超滤膜除去微滤滤液中分子量大于 10,000 D 或 4,000 D 的可溶性杂质 (主要是可溶性蛋白), 同上加 10 L 水洗涤超滤后剩余的浓缩液, 洗涤液再经过超滤, 合并两次超滤滤液。第 3 步超滤滤液经纳滤膜通过反渗透作用除去分子量小于 200 D 或 400 D 的可溶性杂质和大部分水份, 且纳滤终管道清洗液返回浓缩液, 最后收集含有 KN-11 增效物质的纳滤浓缩液。参考文献 [5], 浓缩液喷雾干燥, 得到增效物质粉。

**1.3.2 工艺参数计算:** 增效物质浓缩倍数 = 纳滤浓缩液增效物质含量 / 原液增效物质含量; 体积浓缩倍数 = 原液体积 / 纳滤浓缩液体积。

### 1.4 常规工艺回收 KN-11 增效物质

参考文献 [5], 上清液直接喷雾干燥 (常规工艺 1) 或浓缩 5 倍后加 25% 轻质碳酸钙, 喷雾干燥 (常规工艺 2), 得到两种不同方法制备的增效物质粉。

### 1.5 增效物质和生物效价测定

管碟法<sup>[8]</sup>测定增效物质含量; 生测法<sup>[9]</sup>测定对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 效价。

### 1.6 苏云金芽孢杆菌 KN-11 孢晶粉制备

按文献 [3] 制备 KN-11 孢晶粉, 标定生物效价为 43,727 IU/mg, 置 4℃ 冷藏备用。

### 1.7 总糖、氨基氮、含固量及粘度测定

斐林法测定总糖; 甲醛法测定氨基氮; 烘干法测定含固量; 用 NDJ-1 型粘度计测定粘度, 室温 (25℃), 使用 4 号转子, 30 r/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同膜组合回收 KN-11 增效物质的效率

表 1 0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、4,000 D 超滤膜和 400 D 纳滤膜组合的回收率

各级处理	增效物质含量 (U/mL)	体积 (L)	增效物质收率 (%)
原液 (上清液)	9.00	67.0	
微滤滤液	8.88	62.0	91.3
超滤滤液	8.23	60.8	90.9
纳滤浓缩液	70.4	3.2	45.0
纳滤滤液	3.73	57.6	
纳滤管道洗液	6.67	20.9	
总回收率			37.4

损失。纳滤滤液的增效物质含量为 3.73 U/mL, 表明增效物质有部分透过 400 D 纳滤膜, 说明 400 D 纳滤膜不能完全截留增效物质, 故宜采用截留分子量更小的纳滤膜。

2.1.2 0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、10,000 D 超滤膜和 200 D 纳滤膜组合的回收效率: 按材料与方法所述, 采用本膜组合, 从 KN-11 上清液中回收增效物质, 测定并计算各级有关参数 (表 2), 结果表明, 本膜组合增效物质浓缩倍数 (9.9) 与体积浓缩倍数 (11.6) 很接近, 说明增效物质损失较小。增效物质总回收率达到 85.5%, 微滤、超滤、纳滤

表 2 0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、10,000 D 超滤膜和 200 D 纳滤膜组合的回收率

各级处理	增效物质含量 (U/mL)	体积 (L)	增效物质收率 (%)
原液 (上清液)	10.01	108.0	
微滤滤液	10.03	100.0	92.7
超滤滤液	10.02	98.0	97.9
纳滤浓缩液	99.35	9.3	94.2
纳滤滤液	0	97	
纳滤管道洗液	15.84	3.6	
总回收率			85.5

表 3 膜过滤回收发酵液中增效物质的效率

各级处理	增效物质含量 (U/mL)	体积 (L)	增效物质收率 (%)
原液 (上清液)	9.35	96.0	
微滤滤液	10.30	58.0	66.5
超滤滤液	10.02	58.0	95.6
纳滤浓缩液	95.70	5.5	90.6
纳滤滤液	0	60.0	
纳滤管道洗液	14.47	3.6	
总回收率			57.6

2.1.1 0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、4,000 D 超滤膜和 400 D 纳滤膜组合的回收效率: 按材料与方法所述, 采用本膜组合, 从 KN-11 上清液中回收增效物质, 测定各级增效物质含量、体积, 计算增效物质浓缩倍数、体积浓缩倍数、增效物质的各级过滤收率和总回收率 (表 1)。结果表明, 本膜组合增效物质浓缩倍数 (7.8) 与体积浓缩倍数 (20.9) 相差很大, 说明增效物质损失很大。增效物质总回收率仅为 37.4%。分析认为, 微滤、超滤的增效物质收率分别为 91.3%, 90.9%, 而纳滤收率仅为 45.0%, 说明增效物质主要在纳滤过程中

的增效物质收率均在 92.7% 以上, 说明增效物质在各级膜过滤中得到大部分回收。纳滤滤液的增效物质含量为 0, 也证明纳滤膜 (200 D) 能完全截留增效物质。

2.1.3 膜过滤回收发酵液中增效物质的效率: 按材料与方法所述, 采用 0.1  $\mu\text{m}$  微滤膜、10,000 D 超滤膜和 200 D 纳滤膜组合, 从 KN-11 发酵液中回收增效物质, 测定并计算各级有关参数 (表 3), 结果表明, 增效物质浓缩倍数 (10.2) 与体积浓缩倍数 (17.5) 相差较大, 说明增效物质损失较大。增效物质总回收率仅为 57.6%, 超滤、纳滤增效物质收率分别为 95.6%、90.6%, 而微滤收率为 66.5%, 说明增效物质主要在微滤过程中损失。从表 3 可见, 发酵液、微滤滤液的增效物质含量分别为 9.35 U/mL、10.30 U/mL, 而体积从 96 L 锐减至 56 L, 说明微滤中增效物质损失主要是由于物料损失所致。这可能与发酵液的含固量、粘度较上清液高, 致使微滤膜孔径易被堵塞, 通量显著减小有关。因此宜采用含固量低、粘度小的离心上

清液作为膜过滤原液。

2.2 膜过滤工艺与常规工艺的效果比较

采用表 2 所述膜过滤工艺和材料与方法 1.4 所述常规工艺 1, 2, 从 KN-11 离心上清液中回收增效物质, 测定不同工艺中原液 (上清液)、浓缩液和增效物质粉的增效物质含量 (表 4), 结果表明, 膜过滤工艺所得浓缩液的增效物质含量 (99.35 U/mL) 为原液 (10.01 U/mL) 的 9.93 倍, 为常规工艺 2 浓缩液 (50.01 U/mL) 的 1.99 倍。膜过滤工艺所得增效物质粉的增效物质含量 (457.70 U/g) 为常规工艺 1 粉 (224.30 U/g) 的 2.04 倍, 为常规工艺 2 粉 (102.8 U/g) 的 4.45 倍。同时测定浓缩液和粉的相关理化性状参数, 发现, 膜滤工艺与常规工艺 2 所得增效物质粉, 均不易吸潮结块, 它们的总糖、氨基氮含量也较低, 分别为 9.44%, 7.81% 和 19.03 mg/g, 16.7 mg/g。而常规工艺 1 所得粉极易吸潮结块, 其总糖、氨基氮含量也偏高 (分别为 17.03%, 35.8 mg/g)。膜过滤工艺所得浓缩液的含固量 (21.2%) 与常规工艺 2 浓缩液 (20.62%) 的相当, 但是其总糖、氨基氮含量 (分别为 2.05%, 4.13 mg/mL) 显著低于后者 (分别为 3.80%, 7.85 mg/mL)。

以上说明, 膜过滤工艺较常规工艺显著提高了浓缩液和粉的增效物质含量, 同时除去了大部分的糖、氮等可溶性杂质, 可以获得含固量较低且糖、氮残留较低的浓缩液和理化性状优良的增效物质粉。

2.3 膜过滤工艺回收增效物质在 Bt 生产中的应用效果

2.3.1 在 Bt 悬乳剂中的应用效果: 随着人们对环境保护的重视, Bt 悬乳剂以其防效好、无公害和不污染环境等优点, 在森林害虫的飞机喷雾防治中日益得到推广应用, 但是因为 Bt 悬乳剂效价水平低 (最高效价为 8000 IU/ $\mu$ L<sup>[10]</sup>) 而使药剂飞行费用约占防治成本的 50%, 导致整个森林防治成本较高, 严重制约了 Bt 悬乳剂在森林飞防中的广泛应用。降低森林飞防成本的关键是提高 Bt 悬乳剂的效价, 以减少飞行架次。按材料方法所述, 将 Bt 工业离心沉淀物 (菌浆) 分别与常规工艺 1 的上清液、常规 2 的浓缩液和膜过滤工艺的浓缩液按不同比例混合均匀, 测定混合物的生物效价 (表 5)。表 5 表明, 当菌浆与上清 (浓缩) 液的比例在 6:4 至 4:6 之间时, 膜过滤工艺的浓缩液与菌浆混合物效价最高, 在 15,645 ~ 19,465 IU/ $\mu$ L 之间; 常规工艺 2 的浓缩液与菌浆混合物效价次之, 在 10,222 ~ 11,337 IU/ $\mu$ L 之间; 常规工艺 1 的上清液与菌浆混合物效价最低, 在 5884 ~ 4827 IU/ $\mu$ L 之间。

同时测定混合物的相关理化性状参数, 发现, 常规工艺 1 的上清液与菌浆混合物的流动性最好, 膜过滤工艺的浓缩液与菌浆混合物的流动性次之, 常规工艺 2 浓缩液与菌浆混合物的流动性最差, 混合物粘度依次为 10、18、29 Pa/s, 表明混合物的流动性、粘度与混合物的含固量、糖、氮含量相关, 最终与所用的上清 (浓缩) 液的含固量、糖、氮含量相关。以上

表 4 不同工艺所回收浓缩液和粉中增效物质含量的比较

不同工艺	增效物质含量		
	原液 (U/mL)	浓缩液 (U/mL)	增效物质粉 (U/g)
常规工艺 1	10.01		224.30
常规工艺 2	10.01	50.01	102.80
膜过滤工艺	10.01	99.35	457.70

表 5 不同工艺的上清液 (浓缩液) 与菌浆混合物的生物效价

不同混合物	不同配比的生物效价 (IU/ $\mu$ L)				
	10:0	6:4	5:5	4:6	0:10
菌浆 + 常规工艺 1 上清液	8023	5884	5355	4827	0
菌浆 + 常规工艺 2 浓缩液	8015	10222	10779	11337	0
菌浆 + 膜过滤工艺浓缩液	8010	15645	17559	19465	0

说明, 尽管常规工艺 2 所制备 Bt 悬乳剂的效价在 10, 222 ~ 11, 337 IU/ $\mu$ L 之间, 但是其流动性较差, 不利于应用。而膜过滤工艺制备的 Bt 悬乳剂不仅效价可在 15, 645 ~ 19, 465 IU/ $\mu$ L 之间, 而且其含固量较低且流动性较好, 有利于 Bt 悬乳剂在森林飞防中的推广应用。

**2.3.2 在 Bt 原粉中的应用效果:** 目前国内 Bt 原粉效价最高在 55, 000 IU/mg 左右<sup>[10]</sup>, 研发效价更高的原粉对于提高 Bt 的制剂水平和田间防效, 降低生产成本有着重要意义, 因此研发高含量原粉一直是各厂家追求的目标。将孢晶粉分别与上述膜过滤工艺的增效物质粉 (图 2 曲线 a)、常规工艺 1 的增效物质粉 (图 2 曲线 b)、常规工艺 2 的增效物质粉 (图 2 曲线 c) 按不同比例混合, 测定混合物的生物效价, 以比例为横坐标, 效价为纵坐标作图 2, 表明, 曲线 a, b, c 最高效价是不同的, 分别为 100, 646 IU/mg (比例 3:7 时)、65, 790 IU/mg (比例 6:4 时)、53, 918 IU/mg (比例 8:2 时)。而且在

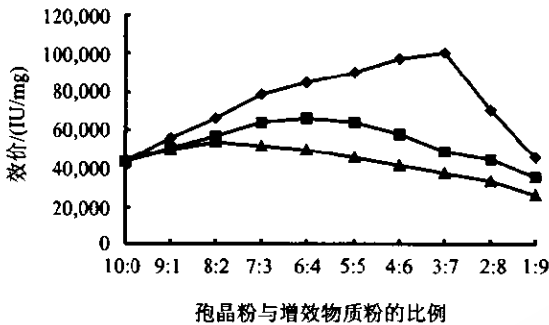


图 2 不同工艺增效物质粉与孢晶粉混合物的效价

◆ 效价 a, ■ 效价 b, ▲ 效价 c

同一比例处 (10:0 除外), 曲线 a 效价 > 曲线 b 效价 > 曲线 c 效价。

这与所用增效物质粉中增效物质含量高低呈显著正相关 (分别为 457.70 U/g, 224.30 U/g, 102.80 U/g, 表 4)。图 2 同时说明, 在一定比例范围内, 混合物效价随其中的增效物质粉用量增大而升高, 但超过一定范围 (例如曲线 a 在比例为 3:7 时), 其效价反而降低。因此在配置高含量原粉时, 应控制合适的增效物质粉用量。

以上说明, 常规工艺的增效物质粉仅能以较低的比例 (6:4 或 8:2) 加入孢晶粉, 提高混合物效价的能力有限 (最高效价为 65, 790 IU/mg 或 53, 918 IU/mg)。而膜过滤工艺的增效物质粉则能以较高的比例 (3:7) 加入孢晶粉, 并能显著提高混合物效价至 100, 646 IU/mg。

本文应用膜过滤技术改进了 Bt 增效物质回收工艺, 发现纳滤膜 (200 D) 能完全截留增效物质, 膜过滤总收率可达到 85.5%。改进工艺显著提高了浓缩液和粉的增效物质含量, 同时除去了大部分的糖、氮等可溶性杂质, 使浓缩液和粉保持了较好的理化性状。改进工艺在 Bt 生产中有很好的应用潜力, 可用于配制成性状优良的 Bt 高含量悬乳剂和高含量原粉。

## 参考文献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌制剂的生产与应用. 北京: 农业出版社, 1993. 1.
- [2] 李青, 吴继星, 谢天健, 等. 中国生物防治, 1997, 13 (4): 166 ~ 168.
- [3] 陈振民, 李青, 刘华梅, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (1): 22 ~ 25.
- [4] Manker D C, Macintosh S C. International Patent, 1994, WO94/09630.
- [5] 杨自文, 王开梅, 吴继星, 等. 中国生物防治, 2001, 17 (3): 129 ~ 132.
- [6] 张雯. 医药工程设计. 1996, 17 (1): 38.
- [7] 陈小霞, 岳振峰, 吴振强, 等. 武汉工业学院学报, 2000, 20 (2): 40.
- [8] 李青, 刘华梅, 陈振民, 等. 微生物学通报, 2002, 29 (3): 73 ~ 74.
- [9] 钟连胜, 谢天健, 吴继星, 等. 生物防治通报, 1990, 增刊, 1 ~ 5.
- [10] 中华人民共和国农业行业标准. NY293-95, 苏云金芽孢杆菌制剂. 1995.