

# 蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 发酵条件探讨及培养基优化\*

李 野<sup>1\*\*</sup> 张小平<sup>1</sup> 张克强<sup>2</sup> 孙文君<sup>3</sup> 李军幸<sup>2</sup>

(四川农业大学资源与环境学院 雅安 625014)<sup>1</sup> (农业部环境保护科研监测所 天津 300191)<sup>2</sup>

(津南国家农业科技园区 天津 300350)<sup>3</sup>

**摘要:** 对蜡质芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) DLSL-2 深层液体发酵的主要影响因子温度、转速、初始 pH 值等进行了单因素实验探讨, 确定了最佳培养条件: 温度为 30℃、转速为 250 r/min、初始 pH 值为 7.0。并用均匀设计法对其发酵培养基进行了优化, 优化验证实验结果为  $7.1 \times 10^9$  cfu/mL 明显高于原发酵培养基结果  $3.2 \times 10^9$  cfu/mL。

**关键词:** 蜡质芽孢杆菌, 发酵, 培养基优化, 均匀设计

**中图分类号:** TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0045-05

## Optimization of Conditions on Submerged Fermentation of *Bacillus cereus*\*

LI Ye\*\* ZHANG Xiao-Ping ZHANG Ke-Qiang LI Jun-Xing SUN Wen-Jun

(College of Resource & Environment Science of Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)<sup>1</sup>

(Agro-Environmental Protection Institute of MOA, Tianjin 300191)<sup>2</sup>

(Tianjin Jinnan National Agriculture Science & Technology Zone, Tianjin 300351)<sup>3</sup>

**Abstract:** The fermentation of *Bacillus cereus* DLSL-2 was investigated through single-factor test. The optimized fermentation conditions are: temperature 30℃, initial pH 7.0, 250 r/min. Uniform design was used in shaking flask to optimize the fermentation medium of bacillus cereus. The most suitable medium was identified as follows: 4.88% defatted soybean power, 1.45% maize starch, 0.106%  $K_2HPO_4$ , 1.78% yeasts extract, 5.6% inoculum. the optimized medium allowed the *B. cereus* biomass concentration to be increased from  $3.2 \times 10^9$  cfu/mL to  $7.1 \times 10^9$  cfu/mL.

**Key words:** *Bacillus cereus*, Fermentation, Medium optimization, Uniform design

蜡质芽孢杆菌 (*B. cereus*), 为杆状菌体, 能产生具有活性较强的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶, 能产生具有相当高的热稳定性的抗菌活性蛋白, 具有抑制动植物病害的能力, 是自然界中广泛存在的非致病细菌, 对人畜无害, 不污染环境<sup>[1]</sup>。加上芽孢杆菌在生产过程中易保存等特点, 芽孢杆菌制剂已被广泛应用于饲料、农业、医药保健和食品等各领域<sup>[2]</sup>。康白于 1984 年首先用蜡质芽孢杆菌 DM423 研制成新型制剂“促菌生”, 开创了国内用芽孢杆菌研制微生态制剂的先例, 王世荣用蜡质芽孢杆菌 DM423 配合乳酸菌研制出“健康生”。周国庆等发现蜡质芽孢杆菌代谢液和细胞内含有较高的 SOD 在各种逆境下能减少氧自由基的伤害, 表现出较强的抗逆性<sup>[3]</sup>; 张凤凯等研究了蜡质芽孢杆菌 CMCC (B) 63301 发酵青霉素酶的方法和酶学的特征, 结果表明了此菌株产生青霉素酶活非常稳定, 且对大多数青霉素类抗生素都有酶解作用<sup>[4]</sup>。蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 是一种需氧杆菌, 其微生态制剂进入水体后能分泌大量胞外酶, 能把养殖动

\*2003 天津市科技发展计划项目

\*\* 通讯作者 Tel: 022-23003859, E-mail: yewawaly@126.com

收稿日期: 2004-07-01, 修回日期: 2004-09-30

物的排泄物、残存饲料、浮游生物残体等有机物迅速分解,并可以克服使用抗生素作为药品和饲料添加剂所带来的副作用<sup>[5]</sup>。微生物最佳在培养基的筛选的主要试验方法有正交设计和均匀设计。正交设计是从“均匀分散、整齐可比”的角度出发用正交设计表安排少量的试验,均匀设计最大的特点是分散性很好,冒尖性也很好,能用最少的试验次数获得科学结论,在生化和微生物方面以秀多成功的例子<sup>[6,7]</sup>,从经济和节省劳动方面考虑,采用均匀设计更为合算。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

蜡质芽孢杆菌菌株 DLSL-2 由本实验室保存

### 1.2 培养基

检测培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1,000 mL, pH 7.0~7.2。

种子培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,蒸馏水定容至 1,000 mL, pH 7.0~7.2。

发酵培养基成份:黄豆粉,玉米淀粉,牛肉膏,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ 。

### 1.3 摇瓶培养

斜面菌种 30℃ 活化后接种一环入种子培养液中(装液量 25 mL/250 mL 三角瓶)温度 30℃ 转速 200 r/min 摇床振荡培养 18 h 后按 4% (1 mL) 接种量再接入种子培养基中进行单因素的发酵条件实验。

### 1.4 主要仪器设备

普通摇床,培养箱,光学显微镜, pH 值测试仪,超净工作台。

### 1.5 分析方法

活菌数测定采用稀释平板计数法,并考虑材料的经济性。菌体生长曲线的测定:比浊法; pH 测定仪测定菌液 pH。

采用均匀设计方法优化发酵培养基配方,以发酵后活菌数为衡量标准。根据均匀设计表设计碳源、氮源、无机盐和接种量的含量,用多元二次逐步回归方法,根据实验数据运用数理统计的方法进行参数估计,建立回归方程,推断其可行性,由回归方程对发酵产菌数进行预测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵条件单因素试验

**2.1.1 pH 试验:** 由于摇瓶发酵过程中 pH 难以控制,因此只能控制发酵液的初始 pH 值。按种子发酵液培养基配方将培养基的初始 pH 值调至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、7.8、8.0,接种 4% 菌液于 30℃, 200 r/min 摇瓶培养 18 h,用平板计数法测其活菌数,结果如图 1 所示。由图 1 可知,初始 pH 7.0 时活菌数达最大为  $8.7 \times 10^8$  cfu/mL。说明最适 pH 值为 6.5~7.2 之间。另外,从图中可以看出,发酵液 pH 对菌株活菌数影响很大,应特别控制发酵液的 pH。

发酵结束后,均测菌液 pH 值,只有初始 pH 值为 5.5 时,最终 pH 值较低为 7.3;其余菌液最终 pH 值均在 8.6~8.7 之间。其可能原因为:随着芽孢形成并逐渐成熟,

pH值有升高现象,这主要是由于芽孢形成过程中菌体组织分离脱落,使孢内碱性物质溶出,另外也与芽孢形成过程中菌体的代谢有关<sup>[8]</sup>。

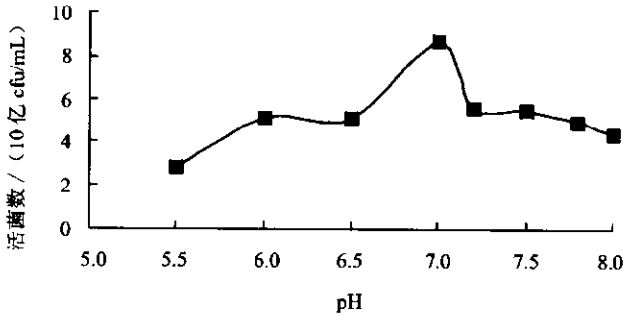


图1 pH值对菌数的影响

**2.1.2 转速试验:**蜡质芽孢杆菌是需氧性发酵过程,通过改变摇床转速来调节通气量,转速太小,通气量小,不利于菌体生长,但摇床转速太大时,可能会引起菌体自溶,使得生物量减少<sup>[9]</sup>。选取150、200、220、250、300 r/min 5个转速作为摇床转速分别测定不同转速对发酵液活菌数的影响,发酵液初始pH调至7.0,摇床温度30℃,摇瓶培养18 h,测其活菌数。结果如图2所示。由图可知,转速在250 r/min时,活菌数达最大值。

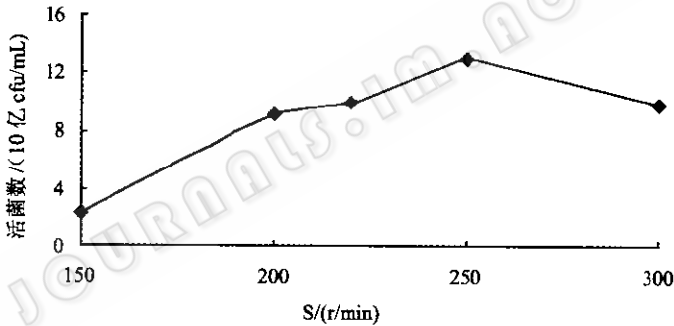


图2 转速对活菌数的影响

**2.1.3 温度试验:**选取20℃、25℃、30℃、32℃、37℃、40℃6个温度作为摇床温度分别测定不同温度对发酵液活菌数的影响,发酵液初始pH调至7.0,250 r/min摇瓶培养18 h,测其活菌数并镜检其芽孢形成情况,实验结果如图3所示。由图可知,该菌株最适发酵摇床温度为30℃,其活菌数最大达 $1.3 \times 10^9$  cfu/mL。

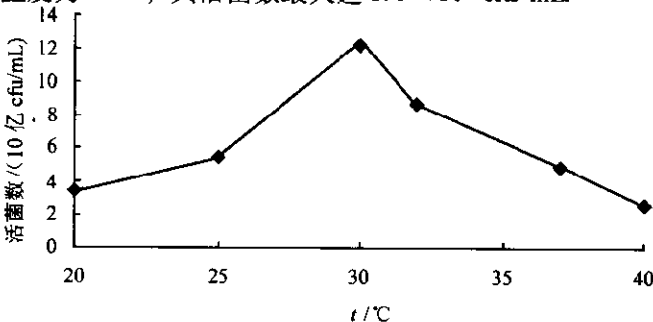


图3 温度对活菌数的影响

### 2.2 比浊法测定菌株生长曲线

按单因素确定的最佳发酵条件，初始 pH 为 7.0，摇床培养温度为 30℃，摇床转速为 250 r/min，采用牛肉膏蛋白胨液体培养基进行摇瓶培养，从 0h 开始，每 2 h 测定一次，600 nm 处分光光度仪测定 OD 值，用未接种的培养基适当稀释后作空白。结果如图 4 所示，测 OD 值同时并镜检其芽孢形成情况及菌体大小。

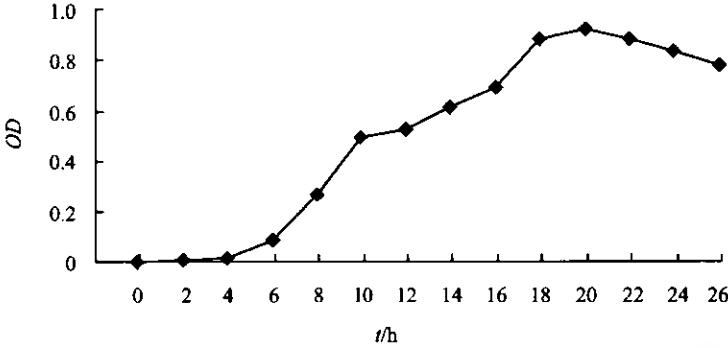


图 4 蜡状芽孢杆菌生长曲线的测定

由图 4 可知，在 0~4 h，蜡质芽孢杆菌处于生长的延滞期，镜检可见菌体小，数量极少；在 4~16 h，是蜡质芽孢杆菌的对数生长期，镜检结果菌体数量急剧增多，菌体形态增大增长，并开始形成芽孢；在 18~20 h，蜡质芽孢杆菌处于生长的稳定期，镜检可知菌体全部形成芽孢，孢囊略为膨大；从 22 h 开始，蜡质芽孢杆菌开始进入生长的衰亡期，菌数明显减少，部分芽孢开始脱落。

发酵培养时间是影响菌液浓度及芽孢成熟率的重要因素<sup>[10]</sup>，实验结果表明：发酵培养时间过短菌数尚可，但芽孢转化率及成熟度较低，时间过长芽孢转化率及成熟度并无明显提高，反而出现菌体老化、菌数下降的情况。由于在生产中通常选用处于对数生长期的菌体作为种子，此时的种子既保持有旺盛的增殖能力，又达到了高的浓度以缩短发酵周期，因此，选定蜡质芽孢杆菌的最佳种龄是 18~20 h。微生态制剂的有效成分主要是活菌，而活菌数是质量控制指标之一。蜡质芽孢杆菌在菌体生长的稳定期产生大量的芽孢，活性保持稳定，同时培养物的生化稳定性也较好。

### 2.3 均匀设计优化发酵培养基

**2.3.1 均匀设计方案及试验结果：**本实验采用 5 因素 15 水平 15 组试验的方式考察了发酵培养基中 4 种组分及接种量对菌株发酵活菌数的影响。每组试验重复 2 次。本实验选用 U\*15 (15<sup>7</sup>) 均匀设计表，考察黄豆粉、玉米淀粉、酵母膏、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、接种量 5 种因子不同水平对蜡质芽孢杆菌活菌数产量的影响。此表头共 5 列，即 5 种因子的 15 种水平。试验结果见表 1。

表 1 培养基成分的均匀设计及试验结果

	x1	x2	x3	x4	x5	活菌数 (10 <sup>8</sup> cfu/mL)
	黄豆粉 (%)	玉米淀粉 (%)	酵母膏 (%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	接种量 (%)	
1	2.5	1.25	2.00	0.20	7.5	65.0
2	5.0	2.65	0.25	0.10	7.0	63.4
3	7.5	0.85	2.50	0	6.5	37.7
4	2.0	2.25	0.75	0.22	6.0	55.7

续表 1

5	4.5	0.45	3.00	0.12	5.5	70.4
6	7.0	1.85	1.25	0.02	5.0	46.0
7	1.5	0.05	3.50	0.12	4.5	31.4
8	4.0	1.45	1.75	0.14	4.0	47.5
9	6.5	2.85	0	0.04	3.5	45.8
10	1.0	1.05	2.25	0.26	3.0	29.7
11	3.5	2.45	0.50	0.16	2.5	58.8
12	6.0	0.65	2.75	0.06	2.0	30.5
13	0.5	2.05	1.00	0.28	1.5	10.0
14	3.0	0.25	3.25	0.18	1.0	74.3
15	5.5	1.65	1.50	0.08	0.5	43.1

2.3.2 试验数据的回归分析及方程的建立: 用均匀设计软件对表 1 的数据进行多元二次逐步回归分析, 得出活菌数与各因素关系的方程为:

$$Y = 832.492X_1 + 293X_2 - 210X_3 + 7090X_4 + 15.2X_5 + 50.2X_1^2 + 1.18X_1X_2 - 103X_2^2 + 58.9X_3^2 - 33400X_4^2 - 1.35X_5^2$$

$F = 6.96$ ,  $R^2 = 0.981$ , 回归方程显著。其最优结果为: 黄豆粉为 4.88%, 玉米淀粉为 1.45%, 酵母膏为 1.78%,  $K_2HPO_4$  为 0.11%, 其余按原量, 接种量取为 5.6%, 预测最优结果为:  $7.5 \times 10^9$  cfu/mL, 实测值为  $7.1 \times 10^9$  cfu/mL。

### 3 结论

通过以上试验, 对蜡质芽孢杆菌发酵培养条件中几个重要因素作了研究, 并得到相应结果: 初始 pH7.0, 摇床温度 30℃, 摇床转速 250 r/min, 发酵时间 18 ~ 20 h。本试验考察了培养基成分对该蜡质芽孢杆菌发酵活菌数的影响, 通过均匀设计试验, 优化了培养基组成, 基本确定了最佳发酵培养基。筛选出的优化培养基活菌数为  $7.1 \times 10^9$  cfu/mL 是原培养基  $3.2 \times 10^9$  cfu/mL 活菌数的 222%。

### 参考文献

- [1] 詹益全. 家畜生态, 2001, 3: 10 ~ 13.
- [2] 黄丽彬. 中国饲料, 2001, 33 (9): 32 ~ 33.
- [3] 周国庆, 夏立秋, 丁学知. 常德师范学院学报 (自报科学报), 1999, 11: 62 ~ 63, 67.
- [4] 张凤凯, 张枫. 药物分析杂志, 1999, 19 (3): 158 ~ 161.
- [5] 杨保伟, 来航线, 盛敏. 西北农林科技大学学报, 2004, 32 (3) 101 ~ 103.
- [6] 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表. 北京: 科学出版社, 1994. 21 ~ 23.
- [7] 张里千. 数理统计与管理, 1995, 14 (1): 25 ~ 29.
- [8] 王刚. 饲料研究, 2002, 5: 8 ~ 12.
- [9] 陈少欣. 华东理工大学学报, 2000, 2: 41 ~ 44.
- [10] Wood T M. International of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 631 ~ 632.