

链霉菌 Men-myco-93-63 固体发酵的初步研究

郝春英 孟庆芳 赤国彤 杨文香 刘大群*

(河北农业大学植物保护学院 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心 保定 071001)

摘要: 试验对链霉菌 Men-myco-93-63 固体发酵的培养基和培养条件进行了研究。以产孢量为指标, 通过单一固体基质筛选、组合固体基质筛选及正交试验得到适宜链霉菌 Men-myco-93-63 产孢的固体培养基是大米:高粱:米糠:稻壳为 2:2:3:3(W/W/W/W), 试验中产孢量最高达到 2.52×10^9 CFU/g。在此培养基的基础上研究了装料量、初始水料比、接种量和培养温度对其产孢的影响。结果表明, 链霉菌 Men-myco-93-63 产孢的适宜条件为: 装料量为 15 g/500 mL 三角瓶, 初始水料比为 1.7:1.0(V/W, 不计稻壳质量), 液体接种量为 7 mL, 培养温度为 28℃。

关键词: 链霉菌 Men-myco-93-63, 固体发酵, 培养基, 发酵条件

Preliminary Study on Solid-state Fermentation of *Streptomyces* Strain Men-myco-93-63

HAO Chun-Ying MENG Qing-Fang CHI Guo-Tong YANG Wen-Xiang LIU Da-Qun*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Centre of Plant Pathogens and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001)

Abstract: The culture medium and cultural conditions of solid-state fermentation of *Streptomyces* Men-myco-93-63 were tested in this study. The suitable medium which contains rice, sorghum, millet bran, and rice hull with the proportion of 2:2:3:3 was developed for the spore production of *Streptomyces* Men-myco-93-63 using single substrate screening, mixture substrate screening and orthogonal experiments, and the sporulation was up to 2.52×10^9 CFU/g. And then, initial charge, initial ratio of water to solid, inoculating quantity, and culture temperature impact to sporulation of *Streptomyces* Men-myco-93-63 were tested. The favorite cultural conditions are developed as the following: the initial charge is 15 g in 500 mL Erlenmeyer flask; initial ratio of water to solid is 1.7:1.0 (V/W, rice hull excluding), inoculating quantity is 7 mL, culture temperature is 28℃.

Keywords: *Streptomyces* Men-myco-93-63, Solid-state fermentation, Culture medium, Cultural conditions

随着能源危机与环境问题的日益严重, 20 世纪 90 年代以来, 固体发酵技术以其特有的优点^[1]引起了科研工作者们极大的兴趣。它已被广泛应用于食品^[2]、饲料^[3]和生物降解^[4]等方面。

链霉菌 Men-myco-93-63 是从马铃薯疮痂病衰退土壤中分离获得的一株拮抗链霉菌, 该菌株对多种植物病原菌都有很强的抑制作用, 如棉花黄萎病菌、番茄灰霉病菌、马铃薯疮痂病菌等^[5]。大田试

验表明,该菌株对黄瓜白粉病有很好的抑制效果,防效达到95%以上。本试验对该菌株的固体发酵培养基及其发酵条件进行了初步研究,为链霉菌Men-myco-93-63孢子的活菌制剂研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种和培养基

供试菌株:玫瑰黄链霉菌Men-myco-93-63,河北农业大学生物防治实验室保存;

斜面培养基:PDA培养基;

液体种子培养基:高氏一号培养基。

1.2 种子液的制备

将28条件下培养7d的链霉菌Men-myco-93-63斜面用无菌水制成孢子悬浮液(孢子浓度为 10^7 CFU/mL),取3 mL接种到100 mL种子培养基中,于28、200 r/min摇床培养3 d。

1.3 固体发酵培养方法

本试验采用液固双相发酵法^[6]。取3 mL种子液加入到固体培养基中,28条件下静置培养7 d。初始培养基(20 g基质,其中含5 g稻壳)的水料比为2.0:1.0 (V/W ,不计稻壳质量), 1×10^5 Pa湿热灭菌30 min。每个处理重复3次。

1.4 产孢量的测定

无菌条件下称取1 g发酵产物装入盛有无菌的0.15% TW-80溶液的50 mL三角瓶中振荡以充分洗涤孢子,获得孢子悬浮液后用血球计数板计数。每个处理重复3次,取其平均值。

产孢量(CFU/g发酵产物)=每小格孢子数 $\times 4 \times 10^6 \times$ 稀释倍数 \times 孢子悬浮液体积/发酵产物质量

1.5 固体培养基的筛选

1.5.1 单一固体基质的筛选:分别以麦麸、米糠、玉米秸粉、玉米面、玉米渣、小米、大米、高粱米、黑米、大麦、燕麦粒、燕麦片12种单一固体基质为培养基,培养方法同1.3。

1.5.2 组合固体基质的筛选:根据1.5.1试验的结果,分别以大米+黑米、大米+高粱、大米+玉米秸粉、大米+米糠、大米+大麦、玉米秸粉+米糠为组合固体基质培养基,培养方法同1.3。

1.5.3 正交组合试验:在1.5.1和1.5.2试验的基础上,以大米、高粱、米糠和稻壳为4个因子,每个因子分别按不同比例设3个水平,进行 $L_9(3^4)$ 的正交试验,正交试验设计见表1。

1.6 固体培养条件的研究

1.6.1 单一培养条件的因素设计:在1.5试验的基础上分别设不同初始水料比:0.8:1.0、1.1:1.0、1.4:1.0、1.7:1.0、2.0:1.0、2.3:1.0和2.6:1.0(V/W ,不计稻壳质量),不同接种量:1 mL、3 mL、5 mL、7 mL、9 mL和11 mL,不同固料添加量为500 mL三角瓶中分别加入:10 g、15 g、20 g、25 g和30 g的固体基质,不同培养温度:24、28、32和36。培养方法同1.3。

1.6.2 固体发酵条件正交试验:以含水量、温度、固料添加量、接种量为单因子,每个因子设有3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,正交试验设计见表4。

2 结果与分析

2.1 单一固体基质的筛选

链霉菌Men-myco-93-63在大米、米糠、玉米秸粉、高粱、大麦和黑米这6种基质上的产孢量较高,产孢量达到 10^9 CFU/g,最高为 1.98×10^9 CFU/g;燕麦和燕麦片这2种固体基质上的产孢量接近 10^9 CFU/g,而在小米、麦麸、玉米面和玉米渣这4种固体基质上的产孢量较低,产孢量仅为 10^8 CFU/g。 $P=0.05$ 时,处理1、3、6之间有差异,1与2之间、3、4与5之间差异均不显著,除6外均与后6种基质的产孢量间存在显著性差异。说明大米、米糠、玉米秸粉、高粱、大麦和黑米这6种基质适宜作为固态发酵培养基的基础原料(图1)。

2.2 组合固体基质的筛选

链霉菌Men-myco-93-63在大米+高粱和大米+米糠组合的固体基质上产孢量较高,分别为 2.34×10^9 CFU/g和 2.14×10^9 CFU/g,在其它4种组合固体基质上的产孢量明显降低。在 $P=0.05$ 水平上,大米+高粱和大米+米糠组合的固体基质差异不显著,但与其它4种处理间差异显著(图2)。

2.3 正交组合试验

链霉菌Men-myco-93-63在处理5中的产孢量最高,为 2.52×10^9 CFU/g。由正交分析结果可以看出大米浓度的极差最大,其次依次是米糠、稻壳、高粱。说明米糠的浓度对产孢量影响最大。方差分析(表2)表明4个因子在95%置信度下只有A对指标存在显著性差异。从极差可以看出最优培养基组合为:A2B2C3D3,即A:B:C:D=2:2:3:3(表1)。

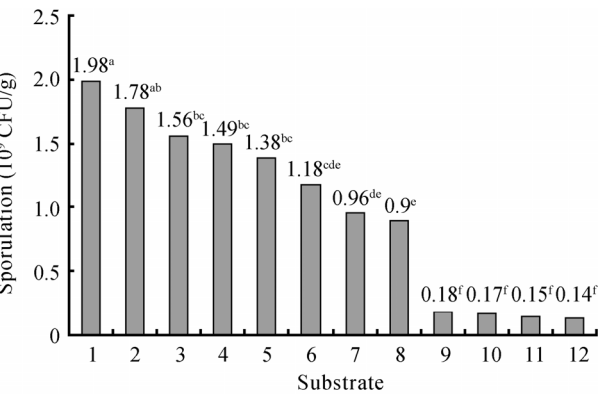


图 1 不同单一固体基质对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响

Fig. 1 Sporulation of Streptomyces Men-myc-93-63 on different substrates

1: 大米; 2: 米糠; 3: 玉米秸粉; 4: 高粱; 5: 大麦; 6: 黑米; 7: 燕麦片; 8: 燕麦粒; 9: 小麦; 10: 麦麸; 11: 玉米面; 12: 玉米渣
a、b、c 等为 $P=0.05$ 时不同处理时产孢量的显著性差异
1: Rice; 2: Millet bran; 3: Cornstalk meal; 4: Sorghum; 5: Barley; 6: Black rice; 7: Oatmeal; 8: Oat; 9: Millet; 10: Wheat bran; 11: Cornmeal; 12: Cornbits
a, b, c etc. mean the significant different at $P=0.05$

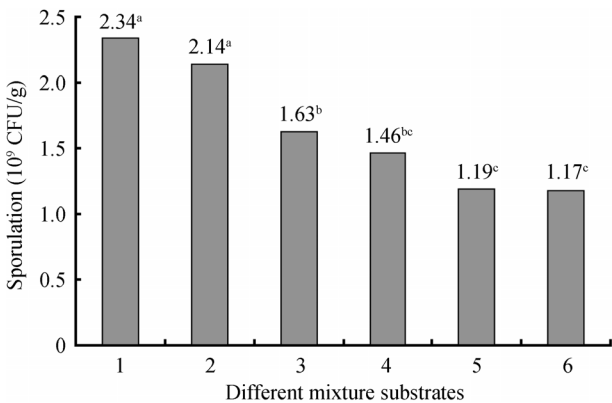


图 2 不同组合固体基质对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响

Fig. 2 Sporulation of Streptomyces Men-myc-93-63 on different substrate mixtures

1: 大米+高粱; 2: 大米+米糠; 3: 大米+玉米秸粉; 4: 大米+黑米; 5: 大米+大麦; 6: 米糠+玉米秸粉
a、b、c 为 $P=0.05$ 时不同处理时产孢量的显著性差异
1: Rice+sorghum; 2: Rice+millet bran; 3: Rice+cornstalkmeal; 4: Rice+black rice; 5: Rice+barley; 6: Millet bran+corn stalk meal
a, b, c etc. mean the significant different at $P=0.05$

表 1 正交试验结果分析
Table 1 The result of the orthogonal experiment on sporulation of Men-myc-93-63

序号 Order	因素(g)Factors(g)				产孢量 Sporulation(10 ⁹ CFU/g)
	A 大米 Rice	B 高粱 Sorghum	C 米糠 Millet bran	D 稻壳 Rice hull	
1	2.5	2.5	2.5	2.5	1.39
2	2.5	5	5	5	1.56
3	2.5	7.5	7.5	7.5	2.45
4	5	2.5	5	7.5	2.20
5	5	5	7.5	2.5	2.52
6	5	7.5	2.5	5	1.74
7	7.5	2.5	7.5	5	1.54
8	7.5	5	2.5	7.5	1.23
9	7.5	7.5	5	2.5	0.96
k1	1.7	1.71	1.453	1.623	
k2	2.153	1.77	1.573	1.613	
k3	1.243	1.617	2.07	1.86	
R	0.91	0.153	0.617	0.247	

表 2 正交试验结果方差分析($P=0.05$)
Table 2 Analysis of variance of the result of the orthogonal experiment on sporulation of Men-myc-93-63($P=0.05$)

因素 Factors	偏差平方和 Errors square sum	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significant different
A(Rice)	1.242	2	34.5	19	*
B(Sorghum)	0.036	2	1	19	
C(Millet bran)	0.641	2	17.806	19	
D(Rice hull)	0.117	2	3.25	19	
Error	0.04	2			

2.4 固体培养条件对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响

2.4.1 培养基初始含水量对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响: 在初始水料比为 1.7:1.0 时链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量最高, 为 1.78×10^9 CFU/g, 与水料比为 2.0:1.0 的处理相比差异不显著, 与其他处理相比差异显著。随着水料比比值的升高或降低, 链霉菌 Men-myc-93-63 的产孢量逐渐降低。当培养基中含水量较高, 导致固体基质粘结成团, 多孔性降低, 同时过多的游离水充满空隙, 影响空气流动和氧的传递; 低的含水量使基质的膨胀程度低, 不利于菌体营养的吸收, 影响菌体生长(表 3)。

2.4.2 接种量对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响: 开始随着接种量的增大, 产孢量逐渐增加, 当接种量为 5 mL 时, 链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量最高, 为 1.54×10^9 CFU/g, 然后随着接种量的增加产孢量逐渐降低。接种量为 5 mL 的产孢量与其它处理存在显著性差异。当接种量较大时, 菌体生长过多, 可能造成营养基质缺乏和供氧不足, 从而不利

于产孢(表 3)。

2.4.3 固料添加量对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响: 固料添加量为 20 g 时, 链霉菌 Men-myc-93-63 的产孢量最高, 为 1.05×10^9 CFU/g, 与其它处理相比差异显著。固料添加量为 10 g 时, 产孢量最低, 与固料添加量 30 g 处理间差异不显著, 与其它处理差异显著。固料添加量 25 g 处理与 30 g 及 15 g 处理差异不显著, 与其它处理差异显著。固料添加量多少影响到基质中的通气量, 说明链霉菌 Men-myc-93-63 的生长和产孢对氧气有一定要求, 过大过小都不利于其生长和产孢(表 3)。

2.4.4 培养温度对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响: 培养温度为 28 时, 链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量最高, 为 1.68×10^9 CFU/g, 与其它培养温度的产孢量相比差异显著, 说明培养温度为 28 时利于菌体的生长和产孢。当培养温度为 24 时, 温度较低, 不能满足菌体生长和产孢; 而当培养温度过高时, 使固体基质的温度很快升高, 温度热量很难较快散出, 不利于菌体生长和产孢(表 3)。

表 3 初始加水量、接种量、固料添加量和培养温度对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响 Table 3 The effect of Initial water content, inoculation dosage, substrates weight and temperature on the sporulation of <i>Streptomyces</i> Men-myc-93-63							
初始加水量 Initial water content (V/W, :1.0)	产孢量 Sporulation (10^9 CFU/g)	接种量 Inoculum quantity (mL)	产孢量 Sporulation (10^9 CFU/g)	固料添加量 Substrate (g)	产孢量 Sporulation (10^9 CFU/g)	温度 Temperature ($^{\circ}$ C)	产孢量 Sporulation (10^9 CFU/g)
0.8	0.63 ^d	1	0.61 ^{de}	10	0.50 ^d	24	0.65 ^c
1.1	0.80 ^{cd}	3	0.89 ^c	15	0.82 ^b	28	1.68 ^a
1.4	1.09 ^{bc}	5	1.54 ^a	20	1.05 ^a	32	1.07 ^b
1.7	1.78 ^a	7	1.14 ^b	25	0.67 ^{bc}	36	0.71 ^c
2.0	1.68 ^a	9	0.72 ^{cd}	30	0.55 ^{cd}		
2.3	1.15 ^b	11	0.45 ^c				
2.6	0.80 ^{cd}						

注: a, b, c 等为 $P=0.05$ 时不同处理产孢量的显著性差异
Note: a, b, c etc.mean the significant different of the same treat at $P=0.05$

2.5 固体培养条件正交试验

为了综合考虑各个因素对链霉菌 Men-myc-93-63 产孢量的影响, 在单因素试验的基础上, 选择含水量、温度、固料添加量、接种量 4 个因素, 各设 3 个水平, 进行正交试验。结果见表 4, 处理 8 的产孢量最高, 为 1.68×10^9 CFU/g。从极差可以看出最优组合为 A2B2C1D3, 即固体发酵培养基中加水量和固体基质的比例为 1.7:1.0(V/W), 固料添加量为

15 g/500 mL 三角瓶, 接种量为 7 mL, 培养温度为 28 。

从极差和方差(表 5)计算结果可以看出, 影响产孢量的因素依次为: 温度>含水量>固料添加量>接种量, 其中温度在 0.10 水平上存在显著差异。各因素在 0.05 和 0.01 水平上不存在显著性差异, 分析认为单因素试验中确定了各个因素的用量, 正交试验中用量设计波动较小, 因此差异不显著。

表 4 固体培养条件正交试验结果分析表

Table 4 The orthogonal experimental analysis of sporulation on solid medium

因素 Factors	初始加水量(mL) Initial water content (A)	温度(℃) Temperature (B)	固料添加量(g) Substrate (C)	接种量(mL) Inoculum quantity (D)	产孢量 Sporulation (10 ⁹ CFU/g)
1	1.4:1.0	24	15	3	0.48
2	1.4:1.0	28	20	5	0.81
3	1.4:1.0	32	25	7	0.86
4	1.7:1.0	24	20	7	0.72
5	1.7:1.0	28	25	3	1.51
6	1.7:1.0	32	15	5	1.18
7	2.0:1.0	24	25	5	0.8
8	2.0:1.0	28	15	7	1.68
9	2.0:1.0	32	20	3	0.87
k1	0.717	0.667	1.113	0.953	
k2	1.137	1.333	0.8	0.93	
k3	1.117	0.97	1.057	1.087	
R	0.42	0.666	0.313	0.157	

表 5 正交试验结果方差分析表(P=0.10)

Table 5 Analysis of variance of the result of the orthogonal experiment on sporulation of Men-myc-93-63(P=0.10)

因素 Factors	偏差平方和 Errors square sum	自由度 Degree of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significant different
Initial water content	0.337	2	2.018	19	
Temperature	0.668	2	4	19	*
Substrate	0.167	2	1	19	
Inoculum quantity	0.043	2	0.257	19	
Error	0.17	2			

3 结论与讨论

3.1 固体培养基

培养基是影响链霉菌生长和产孢的重要因素。固体发酵基质的选择需要考虑营养成分、可得到性、通气性等因素^[7]。本试验得到适合链霉菌Men-myc-93-63 产孢的固体培养基为大米:高粱:米糠:稻壳=2:2:3:3(W/W/W/W)。大米和高粱颗粒较大, 利于保持良好的通气性, 而且营养丰富可为微生物的生长及其代谢提供充足的养分; 米糠和稻壳比较蓬松, 有利于基质的通气性, 且这 4 种基质为易大量获得农副产品。但本试验只考虑了培养基本身的碳氮养分及其物理性状, 还需对培养基的成本、外加微量元素、营养成分及培养基碳氮比等进行研究。

3.2 固体培养条件

得到适合链霉菌Men-myc-93-63 产孢的固体培养条件为: 初始水料比为 1.7:1.0(V/W, 不计稻壳

质量), 固料添加量为 15 g/500 mL三角瓶, 接种量为 7 mL, 培养温度为 28 ℃。不同的水料比、固料添加量、接种量和培养温度对链霉菌Men-myc-93-63 产孢有明显影响, 影响产孢的因素依次为: 温度>含水量>固料添加量>接种量。培养温度是最主要的影响因素, 但是固态发酵过程散热使温度升高, 如何散发积热是固体发酵成功与否的关键环节之一^[8], 采用有效导热的生物反应器可以有效的散发积热^[9]。本试验尚处于实验室水平, 采用 500 mL三角瓶进行发酵, 如果改用浅盘或纱窗式料盘培养可能会进一步提高产孢量。固体基质的含水量也是影响固体发酵的主要因素之一^[10], 与本试验的研究结果相同。

此外, 关于初始 pH 值、种子培养基的菌龄、发酵周期及其相对湿度等等需进一步研究, 明确各因素与发酵的关系, 对放大试验有一定的参考价值, 也为菌剂的研制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Dos Santos MM, Souza da Rosa A, Dal Boit S, *et al.* Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Biore-souce Technology*, 2004, **93**: 261–268.
- [2] Rodríguez Couto S, Sanromán A. A pplication of solid-state fermentation to food industry-a review. *Food Engineering*, 2006, **76**: 291–302.
- [3] 刘 琨, 赖翠华, 童张法. 工业糖化酶固态发酵木薯渣制取单细胞蛋白饲料的研究. *高校化学工程学报*, 2007, **21**(4): 720–724.
- [4] Hernández M, Hernández CMJ, Ball AS, *et al.* Degradation of alkali-lignin residues from solid-state fermentation of wheat straw by stryptomycetes. *Biodegradation*, 2001, **12**: 219–223.
- [5] Yang WX, Zhang T, Liu DQ. Biological control cucumber powdery mildew using culture filtrate of antagonistic *Streptomyces* in green house. The 2nd international work-shop on white agriculture, 2004, p.85
- [6] 张丽萍, 程辉彩, 王迎春, 等. 绿僵菌固体生产条件的研究. *农药*, 2002, **41**(7): 20–21.
- [7] 吴振强. 固态发酵技术与应用. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2006, p.15.
- [8] 胡加付, 李农昌, 樊美珍, 等. 白僵菌固态发酵实验研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(6): 20–25.
- [9] Krissna C. Solid state fernebtation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, **25**: 1–30.
- [10] Pandey A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemitry*, 1992, **27**: 109–117.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武 文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>