

枯草芽孢杆菌发酵条件优化及其破乳效能

代阳¹ 魏利¹ 王继华² 马放^{1*} 徐暘¹

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

(2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 本文对枯草芽孢杆菌在不同碳源、氮源培养基的生长及破乳效能进行了研究, 并通过正交试验对枯草芽孢杆菌的发酵条件进行优化结果表明, 单一碳源葡萄糖和混合碳源葡萄糖 + 液体石蜡的培养基可提高枯草芽孢杆菌的发酵产量; 单一碳源葡萄糖、混合碳源葡萄糖 + 汽油和以硝酸铵 + 酵母膏为氮源的菌液有较高的破乳效能; 在正交试验中, 培养温度对枯草芽孢杆菌的发酵产量影响最大, 其最优组合为: 培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, 培养 pH 值 7.0, 接菌量 6 mL, 培养时间 24 h。摇床转数对枯草芽孢杆菌的发酵产物的破乳效能影响最大, 优化结果为: 培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, pH 值 7.0, 培养时间 20 h。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 生物破乳剂, 发酵条件, 破乳效能

Optimization of Fermentation Conditions for *Bacillus subtilis* and Its Demulsification Efficiency

DAI Yang¹ WEI Li¹ WANG Ji-Hua² MA Fang^{1*} XU Yang¹

(1. Harbin Institute of Technology Urban Water Resources and State Key Laboratory of Water Environment, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

(2. Life Science and Technology College, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: Growth and de-emulsification efficiency of *Bacillus subtilis* under different carbon and nitrogen sources were investigated. The fermentation conditions were also optimized with orthogonal tests. The results showed that medium containing glucose as sole carbon source and compound medium containing glucose and liquid paraffin as carbon sources could enhance the fermentation production of the *Bacillus subtilis*. Higher de-emulsification efficiency was obtain with medium utilized glucose as sole carbon source, compound medium utilizes glucose and gasoline as carbon source as well as medium utilized ammonium nitrate and yeast extract as nitrogen sources. The orthogonal tests showed that the incubation temperature was the most influential factor for the fermentation production of the *Bacillus subtilis*. The optimal combination for fementation was as follows: incubation temperature 25°C, shaker revolution 140 r/min, pH 7.0, inoculum concentration 6 mL and incubation time 24 h. The most influential factor for the de-emulsification efficiency of the fermentation products of the *Bacillus subtilis*'s fermentation products was the shaker revolution. The

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2009AA062906); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No. 1154G31); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动金资助项目(2009)

* 通讯作者: Tel: 86-451-86282107; ✉ mafang@hit.edu.cn

收稿日期: 2010-01-25; 接受日期: 2010-02-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

optimal combination for de-emulsification efficiency was as follows: incubation temperature 25°C, shaker revolution 140 r/min, pH 7.0 and incubation time 24 h.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Biological de-emulsifier, Fermentation conditions, De-emulsification activity

在石油工业中为了提高原油的问题,目前在原油破乳中广泛使用化学破乳剂,其优点是破乳速率快,专一性强。缺点是易造成环境污染,成本较高^[1]。微生物破乳是指利用微生物细胞本身或其代谢过程、代谢产物实开采量,在油田中加入大量的水和表面活性剂,加重了原油采出液的含水率和乳化程度。为解决这一乳状液破乳^[2],生物破乳剂经历 30 多年的研究,它具备化学破乳剂的优点,并弥补了化学破乳剂的不足,而生物破乳剂的高效性、环保性、可重复使用^[2-3]以及用于生产生物破乳剂的基质具有较广泛的可选择性^[4]是化学破乳剂无法比拟的。当前研究中发现生物破乳剂产生菌大部分为细菌,也有研究者筛选到了酵母菌、真菌等^[5]。枯草芽孢杆菌作为生物破乳剂早在 1968 年 Arima 等^[6]就发现它能产生表面活性物质,其特殊的化学组成和两亲型分子结构,表现出多种生理功能,帮助微生物细胞粘附于烃类物质表面进行解烃代谢;降低表面张力,促进微生物吸收和代谢疏水性物质,以利于微生物在水不溶性物质中生存。

本试验针对枯草芽孢杆菌在不同碳源、氮源培养基的生长及破乳效能进行了研究,并通过正交试验对枯草芽孢杆菌的发酵条件进行优化,对其生长及破乳进行了分析。为枯草芽孢杆菌作为生物破乳剂在实际的生产和应用做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 实验室所提供的一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

1.1.2 培养基: 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨固体培养基; 发酵培养基: NH_4NO_3 4.0 g, K_2HPO_4 4.0 g, KH_2PO_4 6.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 微量元素溶液 1 mL, 酵母膏 1.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 液体石蜡 4%, 去离子水 1000 mL。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 O/W 型乳状液的制备: (1) 油相: 0.028% (V/V) Span 60-煤油原液(1000 mL); (2) 水相: 0.072% (V/V)

Tween 60-水原液(1000 mL)。两种原液以 6.5:3.5 (V/V) 混和, 用转速 5000 r/min 乳化剪切机搅拌 3 min, 可形成稳定时间在 200 h 以上的模型乳状液。

1.2.2 破乳效能评价: 向装有 5 mL 的模型乳状液的磨口具塞比色管中加入 2 mL 的全培养液, 振荡混匀, 静置于室温进行破乳。用 1 mL 的注射器定时量取排出油的体积, 并进行排油率的计算。排油率按公式计算:

$$\text{排油率}(\%) = V/V_0$$

即: V : 破乳后产生的油体积; V_0 : 配置乳状液加入的油体积。

1.2.3 不同碳源对枯草芽孢杆菌的生长及破乳效能的影响: 在培养基中分别添加 4% (V/V) 的不同碳源:

(1) 石蜡 (2) 煤油 (3) 汽油 (4) 十六烷 (5) 葡萄糖 (6) 果糖 (7) 蔗糖 (8) 葡萄糖 10 g + 液体石蜡 (9) 蔗糖 + 液体石蜡 (10) 果糖 + 液体石蜡 (11) 葡萄糖 + 煤油 (12) 蔗糖 + 煤油 (13) 果糖 + 煤油 (14) 葡萄糖 + 汽油 (15) 蔗糖 + 汽油 (16) 果糖 + 汽油 (17) 汽油 + 石油 (18) 汽油 + 煤油 (19) 煤油 + 石油。培养基其他成分为 NH_4NO_3 4.0 g、 K_2HPO_4 4.0 g、 K_2HPO_4 6.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、微量元素溶液 1 mL、酵母膏 1.0 g。接种后在 31°C、140 r/min 条件下摇瓶培养, 分别在 24、48 h 测 620 nm 处吸光度值并投加到乳状液中计算相应的排油率。

1.2.4 不同氮源对枯草芽孢杆菌的生长情况及破乳效能的影响: 固定碳源为葡萄糖 + 液体石蜡 (4%, V/V), 选取 (1) 氯化铵 4 g、(2) 硝酸铵 4 g、(3) 尿素 4 g、(4) 碳酸氢铵 4 g、(5) 蛋白胨 4 g、(6) 酵母膏 4 g、(7) 硝酸铵 4 g, 酵母膏 1 g, 7 种不同氮源配置培养基。接种后在 31°C、140 r/min 条件下摇瓶培养, 分别在 24、48 h 测 620 nm 处吸光度值并投加到乳状液中计算相应的排油率。

1.2.5 全培养液不同组分的破乳效能: 对 (1) 全培养液 (2) 滤过中层液 (3) 中层液 (4) 油性上清液 (5) 菌悬液 5 部分分别进行破乳试验, 具体试验方法参见文献[7]。

1.2.6 枯草芽孢杆菌发酵条件优化: 以培养温度、摇床转数、培养 pH 值、接菌量、培养时间设计了一

组正交试验,研究枯草芽孢杆菌的发酵条件对破乳菌发酵产物产量以及破乳效能两方面的影响,从中优化出枯草芽孢杆菌最佳的发酵条件。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对枯草芽孢杆菌的生长及破乳效能

在培养基中分别加入 19 种单一碳源及混合碳源,测得枯草芽孢杆菌生长及破乳效能如图 1 所示。在以 48 h 的实验结果可知,加入单一碳源葡萄糖培养液的菌量最高,加入混合碳源葡萄糖 + 液体石蜡培养液的菌量最高。在进行的破乳实验中,加入单一碳源的葡萄糖菌液在培养 48 h 有较高的破乳效能;混合碳源培养液中,葡萄糖 + 汽油菌液有较高的破乳效能。可见葡萄糖作为碳源,不仅对枯草芽孢杆菌生长提供能量,而且对枯草芽孢杆菌的破乳也有一定的作用。主要原因是葡萄糖结构简单,枯草芽孢杆菌可以直接利用葡萄糖作为碳源进行生

长代谢活动,再加上有葡萄糖效应,因此在混合碳源中破乳菌优先利用葡萄糖进行生长代谢活动,当葡萄糖被利用完全后,枯草芽孢杆菌开始利用其它碳源继续维持生长。因此证明葡萄糖是枯草芽孢杆菌生长及破乳的最佳碳源。

2.2 不同氮源对枯草芽孢杆菌的生长情况及破乳效能的影响

在培养基中加入 7 种不同的氮源,试验结果由图 2 可知,在以葡萄糖 + 液体石蜡(4%, V/V)为碳源时,这 7 种不同氮源都有较好的生长量。培养 48 h 时以尿素为氮源的培养液菌量最高;氮源为硝酸铵 + 酵母膏的菌液有较高的破乳效能,排油率达 45%。由此证明枯草芽孢杆菌对无机氮化合物、简单的有机氮化合物和复杂的有机氮化合物均具有较好的降解效果。因此以硝酸铵 + 酵母膏为枯草芽孢杆菌的生长代谢提供了充足的氮源,提高了枯草芽孢杆菌的破乳效能。

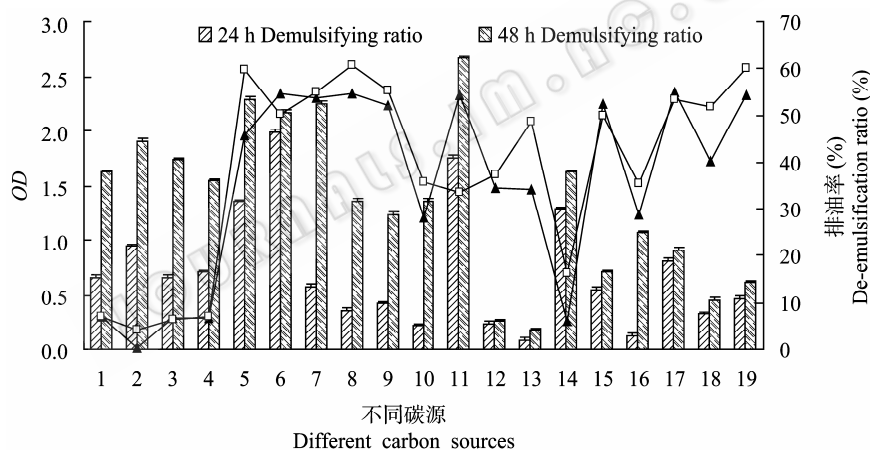


图 1 不同碳源对枯草芽孢杆菌的生长情况及破乳效能的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources for the demulsification rate and the growth result of *Bacillus subtilis*

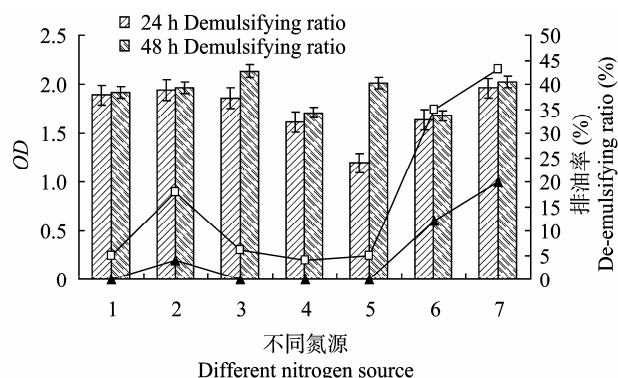


图 2 不同氮源对枯草芽孢杆菌的生长情况及破乳效能的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources for the demulsification rate and the growth result of *Bacillus subtilis*

2.3 全培养液不同组分的破乳效能

为进一步确定破乳活性物质,对全培养液、滤过中层液、中层液、油性上清液、菌悬液 5 部分分别作破乳试验,结果见图 3。经过考察全培养液各组分的破乳效能,发现枯草芽孢杆菌菌体细胞对乳状液的破乳效果影响极低,当菌体细胞单独存在时基本不具有破乳能力,从而证明枯草芽孢杆菌的破乳途径不是菌体相关型而是代谢产物相关型。中层液和滤过中层液的排油率仅低于全培养液,破乳有效成分主要分布在其中,由此可知枯草芽孢杆菌主要依靠代谢产物破乳。

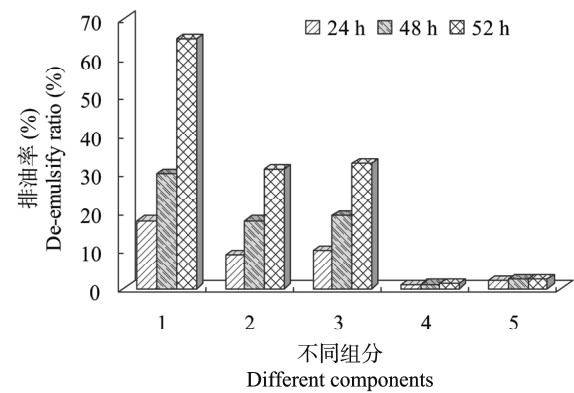


图 3 全培养液各部分破乳试验结果比较图

Fig. 3 The results of de-emulsifying test of each part of the culture compare chart

2.4 枯草芽孢杆菌发酵条件优化

2.4.1 发酵条件对枯草芽孢杆菌生长的影响: 本试验选择以上 5 个因素作为研究对象, 设计了 5 因子 4 水平的正交试验 $L_{16}(5^4)$, 优化枯草芽孢杆菌的发酵条件。其中枯草芽孢杆菌发酵条件的因子与水平数

表 1 枯草芽孢杆菌发酵条件正交因子与水平表 Table 1 The orthogonal factors and levels of <i>Bacillus subtilis</i> fermentation conditions				
因子 Factors	水平 1 Level 1	水平 2 Level 2	水平 3 Level 3	水平 4 Level 4
A: 培养温度(°C) A: Temperature (°C)	15	25	35	45
B: 摇床转数(r/min) B: Revolution of cradle (r/min)	80	120	140	160
C: 培养 pH 值 C: pH	6	6.5	7	7.5
D: 接菌量(mL) D: Inoculated-pathogen quantities (mL)	2	4	6	8
E: 培养时间(h) E: Culture time (h)	20	22	24	26

见表 1。

按正交表 $L_{16}(5^4)$ 进行破乳试验, 根据表 2 的结果, 进行了极差比较和水平选优与组合选优, 得到以下结果: 极差比较得到 5 个因素的极差比较大

表 2 枯草芽孢杆菌发酵条件正交试验直观分析表(1) Table 2 Orthogonal test intuitive analysis chart of <i>Bacillus subtilis</i> fermentation conditions (1)						
试验号 Test No.	A	B	C	D	E	OD ₆₂₀
1	1	1	1	1	1	1.078
2	1	2	2	2	2	0.069
3	1	3	3	3	3	2.178
4	1	4	4	4	4	0.160
5	2	1	2	3	4	2.051
6	2	2	1	4	3	2.107
7	2	3	4	1	2	2.313
8	2	4	3	2	1	2.246
9	3	1	3	4	2	2.043
10	3	2	4	3	1	2.250
11	3	3	1	2	4	1.411
12	3	4	2	1	3	1.853
13	4	1	4	2	3	1.696
14	4	2	3	1	4	1.535
15	4	3	2	4	1	2.154
16	4	4	1	3	2	1.675
T ₁	0.871	1.717	1.568	1.695	1.932	
T ₂	2.179	1.490	1.532	1.355	1.525	
T ₃	1.889	2.014	2.000	2.038	1.958	
T ₄	1.765	1.484	1.605	1.616	1.289	
x ₁	0.109	0.215	0.196	0.212	0.242	
x ₂	0.272	0.186	0.192	0.169	0.191	
x ₃	0.236	0.251	0.250	0.255	0.245	
x ₄	0.221	0.186	0.201	0.202	0.161	
R	1.308	0.530	0.468	0.683	0.669	

到小依次为 $|R|_A > |R|_E > |R|_D > |R|_B > |R|_C$ 。由此可知培养温度对枯草芽孢杆菌的发酵产量影响最大,其次是培养时间,再次是培养温度,对枯草芽孢杆菌发酵产量影响较小的是摇床转数和 pH 值。

根据比较 A 因子的 3 个水平平均数,发现 x_2 最大,所以选择 2 水平为最优;按此方法依次 B 因子选择 3 水平为最优, C 因子选择 3 水平为最优, D 因子选择 3 水平为最优, E 因子选择 3 水平为最优。所以水平选优与组合选优得到最优组合为: $A_2B_3C_3D_3E_3$, 即培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, 培养 pH 值 7.0, 接菌量 6 mL, 培养时间 24 h。在此发酵条件下枯草芽孢杆菌的生长最有利,可积累大量发酵产物。

2.4.2 发酵条件对枯草芽孢杆菌破乳效能的影响: 按正交表 $L_{16}(5^4)$ 进行破乳试验,在培养 48 h 后,得到结果列于表 3 中。

根据表 3 的结果,进行极差比较和水平选优与

组合选优。极差比较得到 5 个因素的极差比较从小到大依次为 $|R|_B > |R|_E > |R|_A > |R|_D > |R|_C$ 。由此可知摇床转数对枯草芽孢杆菌发酵产物的破乳效能影响最大,其次是培养时间,再次是培养温度,对枯草芽孢杆菌发酵产物破乳效能影响较小的是种子液的接入量和 pH 值。比较 A 因子的 3 个水平平均数,发现 x_2 最大,所以选择 2 水平为最优;按此方法依次 B 因子选择 3 水平为最优, C 因子选择 3 水平为最优, D 因子选择 3 水平为最优, E 因子选择 1 水平为最优。所以得到最优组合是 $A_2B_3C_3D_3E_1$, 故枯草芽孢杆菌的发酵产物破乳效能最高的发酵条件优化结果为: 培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, pH 值 7.0, 培养时间 20 h。

3 结论

(1) 通过不同碳源对枯草芽孢杆菌生长及破乳效能影响试验,得到单一碳源葡萄糖和混合碳源葡

表 3 枯草芽孢杆菌发酵条件正交试验直观分析表(2)
Table 3 Orthogonal test intuitive analysis chart of *Bacillus subtilis* fermentation conditions (2)

试验号 Test No.	A	B	C	D	E	24 h 排油率 24 h De-emulsifying ratio (%)	48 h 排油率 48 h De-emulsifying ratio (%)
1	1	1	1	1	1	21.5	65.5
2	1	2	2	2	2	10.0	10.0
3	1	3	3	3	3	62.0	100.0
4	1	4	4	4	4	6.2	15.0
5	2	1	2	3	4	17.3	62.5
6	2	2	1	4	3	55.0	100.0
7	2	3	4	1	2	70.5	100.0
8	2	4	3	2	1	51.8	64.8
9	3	1	3	4	2	23.0	33.8
10	3	2	4	3	1	56.8	100.0
11	3	3	1	2	4	21.5	100.0
12	3	4	2	1	3	37.5	100.0
13	4	1	4	2	3	18.0	41.3
14	4	2	3	1	4	13.5	23.0
15	4	3	2	4	1	58.3	100.0
16	4	4	1	3	2	9.5	16.3
T_1	24.925	19.950	26.875	35.750	47.100		
T_2	48.650	33.825	30.775	25.325	28.250		
T_3	34.700	53.075	37.575	36.400	43.125		
T_4	24.825	26.250	37.875	35.625	14.625		
x_1	3.115	2.494	3.359	4.469	5.888		
x_2	6.081	4.228	3.847	3.166	3.531		
x_3	3.448	6.634	4.697	4.550	5.391		
x_4	3.103	3.281	4.734	4.534	1.828		
$ R $	23.625	33.125	11.000	11.075	32.475		

萄糖 + 液体石蜡的培养基有利于枯草芽孢杆菌生长, 有较高的发酵产量; 单一碳源葡萄糖和混合碳源葡萄糖 + 汽油的菌液有较高的破乳效能。

(2) 从不同氮源对枯草芽孢杆菌生长及破乳效能影响试验, 得到不同氮源培养基对枯草芽孢杆菌都有较好的生长量; 以硝酸铵 + 酵母膏为培养基的枯草芽孢杆菌菌液有较高破乳效能, 排油率为 50%。

(3) 在正交试验中, 得到培养温度对枯草芽孢杆菌的发酵产量影响最大, 其次是培养时间, 再次是培养温度, 对枯草芽孢杆菌发酵产量影响较小的是摇床转数和 pH 值。最优组合为: 培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, 培养 pH 值 7.0, 接菌量 6 mL, 培养时间 24 h。

(4) 得到摇床转数对枯草芽孢杆菌的发酵产物的破乳效能影响最大, 其次是培养时间, 再次是培养温度, 对枯草芽孢杆菌发酵产物破乳效能影响较小的是种子液的接入量和 pH 值。发酵条件优化结果为: 培养温度 25°C, 摇床转数 140 r/min, pH 值 7.0, 培养时间 20 h。

参 考 文 献

- [1] 马挺, 梁凤来, 奚艳伟, 等. 红球菌 PR-1 菌株破乳性能研究. 环境科学, 2006, 27(6): 1191-1195.
- [2] 黄翔峰, 闻岳, 杨葆华, 等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能的试验研究. 油田化学, 2006, 23(2): 136-140.
- [3] 丁立孝, 何国庆, 孔青, 等. 微生物产生的生物表面活性剂及其应用研究. 生物技术, 2003, 13(5): 52-54.
- [4] 左晶, 王学川. 生物表面活性剂的应用. 化学工业与工程技术, 2005, 26(2): 23-26.
- [5] 徐成勇, 鲁时瑛, 周莲, 等. 发酵法生产生物表面活性剂. 微生物学通报, 2003, 30(3): 85-90.
- [6] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline pep-tidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Bio-chem Biophys Res Commun*, 1968, 31(3): 488-494.
- [7] 李旭, 杨基先, 马放, 等. 一株芽孢杆菌破乳特性实验. 哈尔滨工业大学学报, 2009, 41(8): 74-78.
- [8] Hommel RK, Ratledge C. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules//Kosaric N. Biosurfactants. New York: Marcel Dekker Inc, 1993: 43-53.
- [9] Tugba Tugrul, Emir Cansunar. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21(6/7): 851-853.
- [10] 李旭, 杨基先, 马放, 等. 生物破乳菌的筛选及发酵条件的优化. 微生物学通报, 2009, 36(4): 604-609.
- [11] 侯宁, 马放, 李大鹏, 等. 高效破乳菌的破乳效能及活性成分. 石油学报, 2009, 25(3): 435-441.
- [12] 欧昆鹏, 谢和. 不同发酵条件对枯草芽孢杆菌产多糖的影响. 贵州大学学报, 2008, 25(3): 321-327.
- [13] Chen CY, Baker SC, Richard CD. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(3): 503-510.
- [14] 马放, 任南琪, 杨基先. 污染控制微生物学试验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002: 162-166.

栏目介绍

生 物 实 验 室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。