

苏云金杆菌(Bt8010)工业发酵过程研究*

陈锦权 黄志鹏

(福建农业大学)

摘要 研究苏云金杆菌发酵过程诸多参数的变化对提高产品毒力很有意义。在5L发酵罐对Bt8010菌株进行培养,对发酵全过程的各参数包括葡萄糖消耗,细胞数和生物量增长,芽孢形成,溶氧和pH值变化等进行了详细的分析,用不同浓度葡萄糖进行培养,并对分批补料培养和分批培养结果进行比较,结果表明:葡萄糖浓度对发酵结果的影响很大。发酵过程的不同阶段,细胞的大小和结构各不相同,流加葡萄糖可以使发酵结果芽孢数达到 1.28×10^{10} 个/mL。

关键词 苏云金杆菌 发酵 流加

全世界每年因病虫害造成的农业损失高达1200亿美元,我国1992年仅棉铃虫危害一项就造成棉花减产30%以上,直接经济损失超过100亿元,化学农药虽然有显著的防治效果,但长期使用会使害虫产生抗药性,同时也对环境和食物造成严重的污染。为了消除化学农药的危害,对生物农药的研究和开发在世界范围内引起了高度重视,苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是最有前途的生物农药之一^[1]。目前,对苏云金杆菌的菌种选育,基因工程,培养条件以及工业化生产已经有了很多研究,但对于发酵的动力学和工艺方面,还必须进一步进行研究,以提高工业发酵的水平。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种:苏云金杆菌Bt8010菌株;发酵培养基(g/L):蛋白胨1.0,酵母膏2.0,无机盐1.0,pH7.0;罐上培养条件:温度30℃,搅拌转速500 r/min,供气量1L/(L·min)。

葡萄糖的使用量作为一个考察因素根据需要而定。发酵实验过程中,每隔一小时取样一次进行分析,测定残余葡萄糖浓度、细胞数、芽孢数、溶解氧量、光密度、pH值,而后将上述各组数值作为纵坐标,时间参数 t 为横坐标,采用样条法绘图。

1.2 培养装置

主要培养装置为BIOSTAT B 5L玻璃发酵罐,(西德B. Braun公司生产)。

1.3 分析方法

芽孢计数以及细胞计数:采用平板培养计数法;发酵液中葡萄糖含量的测定采用3,5-

收稿日期:1997-06-03 1997-11-01 修定

* 国家科委九五重点科技攻关项目(专题合同编号:95-C01-02-01)

陈锦权, 博士, 副教授, 福州市金山 福建农业大学食品科学系, 350001

二硝基水杨酸 DNS 法; 生物量浓度采用干重及光密度法, 根据数据回归出在菌体生长阶段光密度 A_{660} 与总生物量浓度之间的关系。

2 结果与讨论

2.1 Bt8010 间歇发酵实验

实验 1: 初始葡萄糖浓度为 0.78%, 间歇发酵结果如图 1。从图 1 可见, 发酵过程: 第一阶段为细胞生长阶段, 此时葡萄糖的消耗由慢逐渐变快, 在 5~8 h 之间消耗速度最快, 到了 9 h 消耗完毕, 此时的细胞数为 6.6×10^9 个/mL。之后虽然葡萄糖已消耗尽, 而细胞数量继续上升, 直到 12 h, 达到最大 8×10^9 个/mL。5~8 h 葡萄糖消耗较快, 是由于细胞一方面吸收养分, 储存一部分碳源和能量, 细胞个体膨大; 另一方面细胞分裂、增殖。在葡萄糖消耗完毕以后细胞数量继续上升, 即细胞继续分裂、增殖, 这时细胞消耗前一段时间积累的碳源和能量物质, 合成蛋白质、核酸等分裂、增殖所需的大分子。这可以从光密度曲线得到证明, 即光密度曲线的上升与葡萄糖浓度曲线的下降基本相对应。一般来说, 光密度曲线代表所生成的生物量, 细胞生长曲线的滞后则表示细胞先长大后分裂, 这说明苏云金杆菌 Bt8010 的生长过程中其细胞结构并不是大小均匀而是不断变化的。从溶氧曲线看, 发酵开始时 $P_{O_2} = 40\%$, 1 h 后, 溶解氧量开始降低, 并且急剧下降, 直至 5 h 降低到 $P_{O_2} = 4\%$, 表明此时的耗氧量最大, 生长代谢活动最活跃, 此阶段维持时间仅仅 1 h 左右, 而后 P_{O_2} 很快上升。从葡萄糖的消耗曲线看, 葡萄糖直线下降的阶段大约 4 h, 因此, 简单地用消耗代谢葡萄糖来解释溶解氧量降低的现象是不合理的。第二阶段为细胞生长速度减缓阶段, 此时葡萄糖几乎已消耗尽, 光密度基本达到最高。但细胞数量仍继续增长, 速度逐渐缓慢, 在 10 h 即葡萄糖耗尽之时, 用显微镜观察染色玻片, 可见有少量细胞中有晶体形成, 而且开始有孢子形成。第三阶段为平稳阶段, 亦即孢子期, 此时细胞总数不再增加, 光密度也基本不变, 发酵液的溶氧量基本不变约为 36%, 孢子逐渐形成, 而后孢子逐渐脱落, 细胞数量开始下降。随着细胞数量开始下降, 光密度也开始下降。此时镜检的伴胞晶体数与芽孢数大致相同。第四阶段为孢子脱落期, 从 16 h 开始, 细胞逐渐溶解, 孢子逐渐脱落, 直至 26 h, 细胞几乎完全消失, 孢子数达到最大, 光密度降低, pH 上升至最高, 发酵液的溶氧量上升至最高, 意味着在此阶段, 耗氧量降低。孢子数与先前的细胞数大致相同。

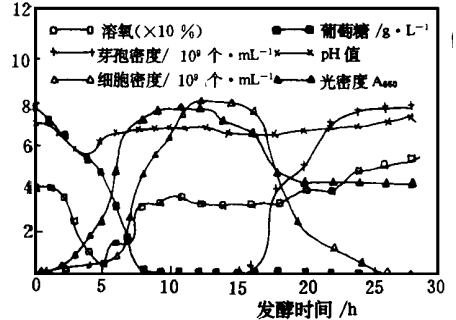


图 1 间歇发酵实验过程曲线

Fig. 1 Time course of batch cultivation

同。

实验 2: 将初始葡萄糖浓度提高为 10.0% 时, 其他条件与上述实验相同的情况下进行间歇发酵培养, 结果表明, 菌体的生长良好, 最高菌体量达到 1×10^9 个/mL, 但是产芽孢却受到较大的影响, 培养后期菌体部分自溶, 最大芽孢浓度仅为 6.4×10^9 个/mL, 这表明过高的初糖浓度会造成残糖浓度提高, 从而对产孢子产生抑制作用。

在不同的发酵阶段, 分别取 5 h (代谢旺盛期)、9 h (分裂旺盛期)、12 h (稳定期) 这三个点的发酵液测定菌体干重, 做出耗糖量与菌体生物量的关系曲线, 结果如图 2。

从图 2 可见: 1) 细胞干重量与耗糖量成直线关系, 随着时间的推移, 耗糖量增大, 细胞干重也增大。大约为线性关系。2) 在不同的发酵时间, 细胞干重量与耗糖量之比约为 1:1。3) 5 h 的单个细胞重量大于 9 h 的单个细胞重量, 而 9 h 的单个细胞重量大于 12 h 的单个细胞重量, 其重量分别为 $0.434\text{mg}/10^8$ 个, $0.132\text{mg}/10^8$ 个, $0.102\text{mg}/10^8$ 个。即 5 h 的单个细胞重量为 12 h 的单个细胞重量的 4 倍。

2.2 流加葡萄糖发酵实验

实验 3: 葡萄糖流加发酵实验。其初始条件与实验 1 相同, 发酵进行到 7 h 开始流加葡萄糖, 流加量是 $0.92\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 共流加了 4 h, 到 11 h 结束流加, 总流加葡萄糖量 14.7g , 平均流加浓度为 $3.7\text{g}/\text{L}$ 。实验结果见图 3。将实验 3 与实验 2 相比, 可以看出, 在同样的物耗条件下, 流加葡萄糖发酵的比不流加葡萄糖发酵的结果更好, 孢子量增加近一倍。

从图 3 与图 1 相比可见, 由于流加了葡萄糖, 细胞数量增大, 13 h 达到最大 1.36×10^{10} 个/mL, 16 h 细胞开始消失, 孢子开始脱落。葡萄糖浓度由于流加而上升, 一直保持在 $2.1 \sim 2\text{g}/\text{L}$, 不能被消耗尽, 直至结束。由于葡萄糖量较足, 代谢糖会生成酸性物, pH 值一直不能回升, 直至发酵结束, 保持在 5.3。最终孢子数达 1.2×10^{10} 个/mL。从结果可知, 自 3 至 7 h, 耗糖量为 $1.3\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 自 7 至 12 h, 平均耗糖量仅为 $0.33\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 自 12 至 16 h, 平均耗糖量为 $0.2\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 时间越往后推移, 消耗糖的速度越小。尽管发酵液中残留有大量的葡萄糖, 但是已经不能再利用了。细胞的生长过程可以根据葡萄糖的消耗速度, 划分为迟缓期, 生长期, 分裂期, 平稳期以及消失期等五个阶段。

实验 4: 根据实验 2 及实验 3 的结果, 将流加提前到第 5 至第 7.5 小时, 初始糖浓度为 $5.6\text{g}/\text{L}$, 流加量为 $1.57\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 共流加 3.5 h, 总葡萄糖浓度为 $11.1\text{g}/\text{L}$, 结果细胞数达到 1.35×10^{10} 个/mL, 芽孢数达 1.28×10^{10} 个/mL, 优于以上其它实验。

Bt 发酵的对数期间, 由于代谢旺盛, 耗氧很快, 导致体系中溶解氧急剧下降, P_{O_2} 达 $1\% \sim 5\%$, 采用葡萄糖作为碳源, 则在 5~6 h 溶解氧达到最低点, 菌体增长到对数生长期后期时溶解氧量逐渐上升, 直至溶解氧上升至 $50\% \sim 60\%$ 。可见, 在 Bt 的不同生长期对氧的需求相差很大。目前, 我国采用的传统 Bt 发酵方法的供氧, 主要是参照抗生素的生产模式, 中间很少调节, 似乎已不适合 Bt 生长规律的需要。合理的供氧问题应从变速搅拌中求得解决, 在细胞增殖前期和后期采用低转速搅拌, 中期采用高转速搅拌, 不同时期的最佳转速值应根据溶解氧曲线的变化进行调整, 以提高发酵水平, 同时也能降低能耗。

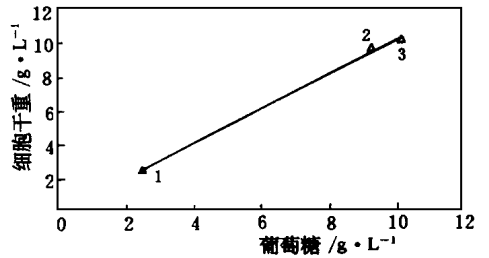


图 2 细胞干重与消耗葡萄糖的关系

Fig. 2 Relationship between dry cell density and glucose consumed

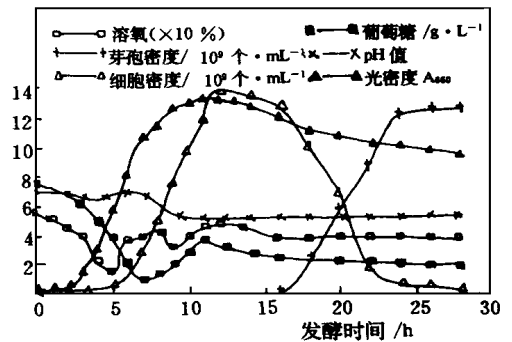


图 3 流加发酵实验过程曲线

Fig. 3 Time course of fed batch cultivation

在 Bt8010 菌株的发酵过程中, 不管培养基的浓度高低, 都有一个代谢速率很快, 耗氧量很大, 导致溶氧量降低至 1% ~ 4% 的阶段。以往普遍认为仅仅在高浓度培养基中(干固物量 9%) 才出现溶解氧不足, 而实际上在低浓度培养基中(干固物量 4%) 也存在。根据丁秋梅等人的研究报告^[2], Bt 培养的临界溶氧值在 20% 左右。要保证 Bt 在发酵过程中溶氧量都高于该值, 即确保发酵过程不缺乏氧, 才能使 Bt 的芽孢数和毒性更高。

3 结 论

- 1) 葡萄糖浓度对 Bt 的发酵结果影响很大, 其加量会影响 pH 值、细胞数及芽孢数。
- 2) 葡萄糖耗量与细胞生物量成正比。
- 3) 间歇式发酵结果与流加葡萄糖发酵的结果不同, 后者优于前者。
- 4) 发酵过程的不同时间, 细胞的大小及结构各不相同。
- 5) 苏云金杆菌 8010 菌株是一快速耗氧菌, 发酵过程中的不同阶段, 耗氧量各不相同。Bt8010 菌株的发酵过程会出现缺氧期, 如何加快溶氧速率, 是工业界需要解决的问题。

参 考 文 献

- 1 Sakharova Z V, Ignatenko Yu N, Schulz F. The kinetics of bacillus thuringiensis growth in batch cultivation. Mikrobiologiya, 1985(4): 604~ 609
- 2 丁秋梅. 优化溶解氧浓度提高苏云金杆菌发酵水平. 湖北农业科学, 1993(12): 5~ 8

Study on Bacillus Thuringiensis 8010 Industrial Fermentation Process

Chen Jinquan Huang Zhipeng

(Fujian Agricultural University, Fuzhou)

Abstract The change of the parameters plays a great role in Bt fermentation. Bt 8010 was cultured in 5 L fermentor. Factors including glucose consumption, cell numbers, biomass, spore numbers, dissolved oxygen and pH value were described in detail. The results showed that the concentration of glucose in media had an great effect on the spore numbers. The higher amount of spores ($1.28 \times 10^{10}/\text{mL}$) was produced in fed batch cultivation than that in batch cultivation. During different growth phases in batch culture, the size of cells and the oxygen uptake rate (OUR) varied greatly. The highest OUR was observed in exponential growth phase. Therefore, insufficient oxygen supply in exponential phase was probably the main problem in Bt cultivation.

Key words bacillus thuringiensis, fermentation, fed batch cultivation