

# 苏云金芽孢杆菌 HD-1 发酵工艺研究

申烨华<sup>1</sup>, 孙 君<sup>2</sup>, 周茂林<sup>3</sup>, 徐 强<sup>2</sup>, 李宝璋<sup>2</sup>

1. 西北大学 现代分离科学研究所; 2. 西北大学 化学工程学系, 陕西 西安 710069; 3. 延安大学 生物学系, 陕西 延安 716000

**摘要:**在直径100 mm、体积4.7 L的环隙气升式内环流反应器内,考察了不同通气量及培养基含固量对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)HD-1发酵水平的影响。实验表明,在该反应器中,Bt-HD-1发酵的最佳通气量为1.75 L/min,最佳培养基含固量为3.5%。此外,通过研究通气量和培养基含固量对终止DO及终止pH的影响发现,在环隙气升式内环流反应器中,Bt-HD-1发酵的正常指标为,终止pH>7.0,终止DO>60%。

**关键词:**环隙气升式内环流反应器;苏云金芽孢杆菌;发酵工艺

**中图分类号:**Q815 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(2001)05-0396-03

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)HD-1制剂是目前已知的最有效的无公害生物农药,用它代替化学农药具有显著的经济效益、社会效益和生态效益,但由于其生产成本低、价格贵,使推广应用受到很大的限制。为了降低生产成本,除选育高产菌株、探索最佳工艺条件外,还应致力于发酵罐的改进。目前,由于在Bt-HD-1工业生产中广泛使用机械搅拌罐,存在能耗高、易染菌、剪切力大等弊端,不太适用<sup>[1]</sup>。环隙气升式内环流反应器作为一种新兴的生化反应器,具有能耗低、结构简单、易密封、剪切力小、混合性能好、传质能力强、消泡作用显著等特点<sup>[2]</sup>,适用于Bt-HD-1发酵<sup>[3]</sup>。本文采用自制的4.7 L环隙气升式内环流反应器对Bt-HD-1菌进行发酵工艺研究,使该反应器早日应用于Bt-HD-1的发酵工业中,并为Bt-HD-1工业化生产提供基础研究数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及试剂

菌种:苏云金芽孢杆菌HD-1,华中农业大学喻子牛教授惠赠。

试剂:玉米粉,食用级,<0.246 mm(甘肃省榆中县面粉厂);黄豆饼粉,发酵用工业原料,0.147 mm(西安制药厂);蛋白胨,生化试剂(上海东海制药厂);牛肉膏,生化试剂(成都市华西生化制品厂);琼脂,食用级(青岛海洋渔业水产品加工厂);其余试剂均为西安化学试剂厂产品,分析纯。

### 1.2 培养基

1) 菌种斜面及平板测定培养基:牛肉膏1%,蛋白胨0.3%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.1%,琼脂2%~3%,消前pH7.5。

2) 发酵用培养基:1<sup>#</sup>,牛肉膏1%,蛋白胨0.3%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.1%;2<sup>#</sup>,玉米粉8%,黄豆饼粉1%,CaCO<sub>3</sub>0.5%<sup>[4]</sup>;3<sup>#</sup>,2<sup>#</sup>培养基浸出液。

1.3 培养方法及实验装置参见文献<sup>[3]</sup>。

### 1.4 参数测定

活芽孢计数(S.C.)采用10倍稀释法进行<sup>[5]</sup>,溶氧浓度(DO)用FC 201 DO溶氧测定仪测定,溶解氧电极为DO-15电解型。

## 2 结果与讨论

### 2.1 通气量对发酵水平的影响

通气量不同时,Bt-HD-1菌发酵情况见表1。由

收稿日期:2000-09-04

基金项目:陕西省科技攻关资助项目(97K03-J6)

作者简介:申烨华(1964-),女,陕西延安人,西北大学博士生,从事微生物培养及生物大分子分离与纯化研究。

表 1 可知: 当通气量小于 1.0 L/min 时, 该菌不能正常发育, 未形成芽孢和伴孢晶体, 终止 pH 为 5.8, 偏酸性, 终止 DO 为 1%~8%; 当通气量增至 1.5 L/min 以上时, 该菌发育正常, 形成了芽孢和伴孢晶体, 终止 pH 为 8.0~8.4, 偏碱性, 终止 DO 为 60%

以上, 并且随通气量增加, 芽孢数亦增加, 培养时间缩短; 当通气量大于 2.0 L/min 时, 芽孢数下降, 培养时间延长, 因此最佳通气量应为 1.75 L/min。这一结果与文献[6]一致。

表 1 通气量对 Bt-HD-1 菌发酵的影响

Tab. 1 Effects of the air-flux on fermentation of Bt-HD-1

通气量 / (L · min <sup>-1</sup> )	形态特征	培养时间 / h	终止 DO	终止 pH	S. C. / (10 <sup>8</sup> · mL <sup>-1</sup> )
0.5	18 h 开始出现网状杆菌, 无芽孢形成	48	1.1	5.8	—
1.0	同上	48	7.3	5.8	—
1.5	30 h 出现芽孢囊, 39 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 量少, 同步率低	39	61.0	8.4	11.6
1.75	24 h 出现芽孢囊, 32 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 同步率高	32	61.0	8.1	13.2
2.0	24 h 出现芽孢囊, 34 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 同步率较高	34	62.0	8.0	12.3
2.25	同上	34	61.8	8.1	12.2

通气量对发酵体系溶氧水平的影响, 是造成上述结果的主要原因。当通气量较低时, 体系混合效果差, 氧传递速度低, 溶氧较少, 使发酵过程中供氧不足, 从而对数生长期积累的大量有机酸不能顺利地经由有氧分解途径被异化, 在菌体内积累, 导致 pH 无法回升至 6.0 以上, 而对数生长期后期 pH 不能回升至 6.0 以上时, 芽孢和伴孢晶体无法形成。这是因为参与合成伴孢晶体的酶最适 pH 为 6.5~7.5, 在 pH 6.5 以下时活性急剧下降<sup>[7]</sup>。当通气量较高时, 体系混合更均匀, 氧传递速度增加, 溶氧充足, 对数生长期积累的大量有机酸可通过体内修正的三羧酸循环途径被进一步氧化分解, 2~3 h 后使 pH 上升至 6.0 以上, 顺乌头酸水化酶活性下降, 体内糖代谢水平降低, 需氧量下降, 芽孢和伴孢晶体形成, 终止溶氧回升。但是, 若通气量过高, 则会因气泡聚并效

应使混合效果变差、溶氧下降、剪切力增大, 会造成芽孢数下降。

## 2.2 培养基含固量对发酵水平的影响

表 2 为不同培养基时 Bt-HD-1 菌的发酵情况。由表 2 可知: 培养基含固量对发酵水平的影响与通气量类似, 在培养基含固量大于 5% 时, 该菌未形成芽孢, 终止 pH 为 5.8, 偏酸性, 终止 DO 为 2%~6%; 在培养基含固量为 0.5%~3.5% 时, 该菌形成芽孢和伴孢晶体, 终止 pH 为 7.7~8.6, 偏碱性, 终止 DO 为 60% 以上, 并且随含固量增加, 芽孢数亦增加, 培养时间缩短, 因此最佳含固量为 3.5%。这是由于在较低培养基含固量范围内, 随含固量增加, 固-液界面亦增加, 所以溶氧增加有利于 Bt-HD-1 菌发育。但是, 当培养基含固量过高时, 会使氧传递速度下降, 从而导致体系溶氧减少。

表 2 培养基含固量对 Bt-HD-1 发酵的影响

Tab. 2 Effects of amount of solid in cultural medium on fermentation of Bt-HD-1

培养基含固量 / %	形态特征	培养时间 / h	终止 DO	终止 pH	S. C. / (10 <sup>8</sup> · mL <sup>-1</sup> )
0.5	28 h 出现芽孢囊, 34 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 同步率好	34	80.9	8.6	3.2
2	26 h 出现芽孢囊, 33 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 同步率好	33	61.0	7.9	11.6
3.5	25 h 出现芽孢囊, 32 h 50% 以上芽孢脱落, 伴孢晶体规整, 同步率好	32	62.0	7.7	15.6
5	未形成芽孢	36	8.0	5.8	—
7.5	同上	36	7.0	5.8	—

### 3 结 论

1) 在 4.7 L 环隙气升式内环流反应器中, Bt-HD-1 菌发酵的最佳通气量为 1.75 L/min, 最佳培养基含固量为 3.5%。在此条件下, 培养时间为 32 h 时, 芽孢数可达  $15.6 \times 10^8$  个/mL。

2) 由通气量和培养基含固量对终止 DO 和终

止 pH 的考察得出, 在环隙气升式内环流反应器中, Bt-HD-1 菌发酵的正常指标为: 终止 pH > 7.0, 终止 DO > 60%, 从而为工业生产提供了简便可行的判断依据。

本文得到延安大学化学反应工程省级重点实验室主任杨文选教授和秦振平副教授的帮助, 西北大学现代分离科学研究所耿信笃教授提出了宝贵意见, 在此特表谢意。

### 参考文献:

- [1] JONG Jian-zhong, HSIUN Ding-yu, WU Wen-teng. Fed-batch culture of bacillus thuringiensis for thuringiensin production in a tower type bioreactor[J]. Biotechnol and Bioeng, 1995, 48, 207-213.
- [2] 章学钦, 夏 杰, 屠天强, 等. 环隙式反应器的开发 1. 流体力学研究 and 体积传质系数的关联[J]. 华东化工学院学报, 1992, 18(5), 601-605.
- [3] 申烨华, 孙 君, 黄岳元, 等. 苏云金杆菌在环隙气升式内环流反应器中深层发酵特性研究[J]. 化学工程, 2000, 28(5): 29-31.
- [4] 申烨华, 孙 君, 张粉艳, 等. 苏云金杆菌发酵培养基的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2000, 30(1): 32-34.
- [5] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [6] 马天良, 谢幸珠, 谢天健, 等. 苏云金杆菌发酵与溶氧关系的研究[J]. 华东化工学院学报, 1993, 19(1): 5-11.
- [7] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990.

(编 辑 张银玲)

## A study on fermentation process of Bt-HD-1 in annulus-airlift reactor

SHEN Ye-hua<sup>1</sup>, SUN Jun<sup>2</sup>, ZHOU Mao-lin<sup>3</sup>, XU Qiang<sup>2</sup>, LI Bao-zhang<sup>2</sup>

(1. Institute of Modern Separation Science, Northwest University; 2. Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Department of Biology, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

**Abstract:** To reduce productive cost and raise the level of fermentation, the effect of the air-flux and the solid percentage of the medium on Bt-HD-1 fermentation in an annulus-airlift reactor in  $\Phi 100$  mm and volume of 4.7 L is investigated. The results show that with this type of reactor, the optimum air-flux is 1.75 L/min and the solid percentage of the medium is 3.5%. Furthermore, it is found by examining the effect of air-flux and solid percentage of the medium on DO and pH at the end of fermentation that the normal indices of the fermentation are pH > 7.0 and DO > 60% at the end of fermentation in annulus-airlift reactor

**Key words:** annulus-airlift reactor; *Bacillus thuringiensis* (Bt); fermentation process parameter