

地衣芽孢杆菌发酵培养基的优化

丰贵鹏, 杨丽云 (新乡学院化学与化工学院, 河南新乡 453003)

摘要 [目的] 对地衣芽孢杆菌发酵培养基进行优化, 并在此基础上确定最佳培养条件, 为实现其工业化生产提供参考。[方法] 借鉴谷春涛等关于地衣芽孢杆菌 TS1 液体培养发酵条件的研究成果, 对培养基进行澄清, 并运用单因素试验和 4 因素 3 水平正交试验对其培养基进行改进, 对地衣芽孢杆菌发酵条件进行优化以得到其最佳温度、pH 值和接种龄。[结果] 4 种因素对地衣芽孢杆菌发酵影响的显著性次序为: 玉米浆 > 豆饼粉浸汁 > 蛋白胨 > 葡萄糖。培养基的最佳配比为: 玉米浆 0.45 g, 蛋白胨 1.50 g, 豆饼粉浸汁为 1:15, 葡萄糖 1.50 g。最适宜种龄为 18 h, 接种量 8%, 起始 pH 值 7.5, 最佳温度 37.5℃, 此条件下地衣芽孢杆菌对数生长期在 14~20 h, 发酵周期为 22~24 h。活菌数每单位提高近 1 亿个, 发酵周期比经验周期缩短 10 h。[结论] 试验得出了地衣芽孢杆菌发酵培养基的最佳配比及最佳培养条件, 在此条件下培养, 收获菌体量大大提高, 降低了生产成本, 更有利于其大规模工业化生产。

关键词 地衣芽孢杆菌; 发酵; 培养基优化; 正交试验

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06862-03

Research on the Optimization of the Medium for *Bacillus licheniformis* Fermentation

FENG Gui-peng et al. (Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Xinxiang College, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract [Objective] On the basis of the optimization of the *Bacillus licheniformis* fermentation medium, the best culture condition was determined for the reference for the implementation of its industrial production. [Method] On the basis of the results from Gu Chuntao in the liquid culture fermentation condition of *Bacillus licheniformis*-TS1, the further test of the culture medium was conducted, and the experiment in the medium improvement for *Bacillus licheniformis* was done with the single-factor orthogonal test with 4 factors and 3 levels for the optimum temperature, pH value and age of inoculation. [Results] The order of four kinds of factors significantly impacting the fermentation of *Bacillus licheniformis* was as follows: corn juice > steep liquor from bean cake powder > peptone > glucose, and the best contain in the medium was 0.45 g corn steep liquor, 1.50 g peptone, the ratio of steep liquor from bean cake powder in the medium of 1:15 and 1.50 g glucose. The most appropriate inoculation age was 18 hours; inoculation amount, 8%; the initial pH value, 7.5 and the best temperature, 37.5℃; under the condition, the logarithmic growth time of *Bacillus licheniformis* appeared from the 14th to 20th hour, and the fermentation period was 22-24 hours. The number of viable cells per unit was raised to near 100 million cells and the cycle of the fermentation was shortened for more than 10 hours. [Conclusion] The best *Bacillus licheniformis* fermentation medium and culture condition were obtained, under the condition, the harvested biomass was greatly improved and the production cost was reduced, which was more conducive to its large-scale industrial production.

Key words *Bacillus licheniformis*; Fermentation; Medium Optimization; Orthogonal test

地衣芽孢杆菌是我国 20 世纪 90 年代起开发利用的新型微生物制剂, 它的消长直接影响该制剂的疗效和产量的高低。目前在国内已有一定的应用, 但长期以来生产成本一直居高不下, 为此笔者对地衣芽孢杆菌发酵过程进行了优化试验, 以求提高产量, 降低生产成本^[1]。

国内已有许多学者对地衣芽孢杆菌的发酵条件进行研究, 但有的所用培养基为实验室常用的葡萄糖、酵母浸膏、尿素等, 工业生产成本难以大幅度降低^[2]。谷春涛等关于地衣芽孢杆菌 TS1 液体培养发酵条件的研究, 详实具体, 大量试验数据论证得到了地衣芽孢杆菌的一种新的廉价培养基, 使其生物量达到了前所未有的水平^[1]。但是他们采用的豆饼粉造成了培养基的浑浊, 很大程度上制约了该成果的应用。笔者借鉴其研究成果, 对培养基进行了澄清, 并运用单因素试验和 4 因素 3 水平正交试验对其培养基进行了改进, 对地衣芽孢杆菌发酵条件进行了优化, 从而得到了最佳温度和 pH 值, 发现了接种龄对发酵周期的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌种。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 由新乡学院化学与化工学院实验室提供(经鉴定为地衣芽孢杆菌)。

1.1.2 培养基。种子培养基^[1]: 牛肉膏 5 g、大豆蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、水 1 L, pH 值 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

经验培养基^[1]: 葡萄糖 20 g、豆饼粉 70 g、玉米浆 7 g、水 1

L, pH 值 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

发酵培养基: 组成见表 1, pH 值 7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器设备。蒸汽消毒器; 恒温培养箱; 回转式恒温调速摇瓶柜; 紫外分光光度计; 精密 pH 计。

1.2 方法

1.2.1 基本培养方法。

1.2.1.1 种子液的制备。将地衣芽孢杆菌从保存的斜面转接于新鲜试管斜面, 于 37℃ 培养 18 h。取培养好的斜面, 用接种环挑 1 环接种于盛有 50 ml 无菌种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 然后置回转式恒温调速摇瓶柜中 37℃ 振荡培养 24 h, 转速为 120 r/min。

1.2.1.2 摇瓶培养。分别取种子液, 超净工作台上接入盛有 50 ml 无菌种子培养基的 250 ml 三角瓶中, 接种量为 10% (V/V)。置回转式恒温调速摇瓶柜中振荡培养, 转速为 120 r/min, 37℃ 培养 30 h。培养结束取样测定活菌数。

1.2.2 活菌计数方法。

1.2.2.1 平皿活菌计数法。采用倾注法按 10 倍稀释法制成不同浓度稀释液, 从 3 种合适的稀释液中分别吸取 0.2 ml 置于无菌培养皿中, 每一稀释度做 3 个平皿。将事先融化并冷却至 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨培养基, 向每个培养皿中倒入约 10 ml 摇匀, 待凝固后, 37℃ 倒置培养进行菌落计数。

1.2.2.2 OD 值比浊法^[3-4]。在平皿活菌计数法的基础上采用分光光度计比浊计数, 取发酵液 10~15 ml 在 1600 r/min 下离心 10 min, 取 1 ml 分别稀释 5、10、15、20、25、30 倍, 以去离子水为参比池, 756 MC 紫外分光光度计在 600 nm 下测 OD 值。平皿活菌计数法对离心后的 1 ml 菌液计数, 按

稀释倍数计算得不同 OD 值下的菌数分析数据,从而得到标准工作曲线。

1.2.3 单因素试验。以经验培养基为基础进行单因素试验,单因素改变培养基组成,分别测定不同培养基下菌种的消长变化。经验培养基:葡萄糖 1 g、豆饼粉 3.5 g、玉米浆 0.35 g(为采用 OD 值法计数首先按 1:5,1:10,1:15,1:20 将豆饼粉浸泡煮沸取汁 50 ml 配置培养基考察豆饼粉与水的最佳比例),将得到的各发酵液稀释后以去离子水为参比池,紫外分光光度计在 600 nm 下测得的 OD 值与标准工作曲线对照得到菌体浓度。

1.2.4 摇瓶正交试验^[5]。结合单因素试验结果,设计 4 因素 3 水平正交试验,每种培养基做 2 个重复,共 18 瓶。通过正交试验对地衣芽孢杆菌的发酵培养基在摇瓶中进行优化,将各发酵液稀释后以去离子水为参比池,紫外分光光度计在 600 nm 下测得的 OD 值与标准曲线对照得到菌体浓度。综合分析直观法结果与单因素试验结果,得到最佳培养基。

2 结果与分析

2.1 标准工作曲线 设所求直线为 $y = kx + b$,在波长 600 nm 下,建立菌液的 OD 值与其活菌数之间的直线回归方程: $y = 2.0037x + 0.0212$ [x 为 OD 值, y 为菌浓度(亿个/ml)] (10 倍稀释),见图 1。

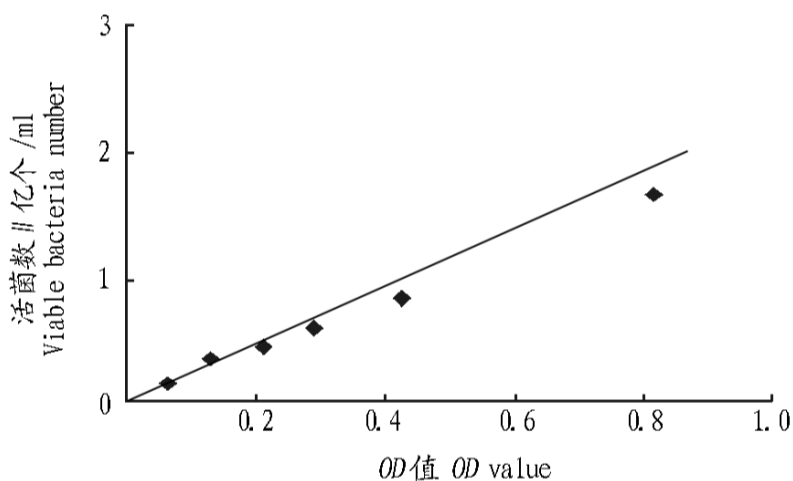


图1 地衣芽孢杆菌 OD 值和活菌数的关系

Fig.1 Relationship between OD value and active bacteria number of *Bacillus licheniformis*

2.2 单因素试验结果 按豆饼与水的比例为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 将豆饼粉浸泡煮沸取各 50 ml,按葡萄糖 1 g、蛋白胨 1 g、玉米浆 0.35 g 配培养基 5 瓶(10 倍稀释 OD 值)。活菌数依次为 4.12、5.52、6.82、7.11、7.25 亿个/ml。

按葡萄糖 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g,1:15 将豆饼粉浸泡煮沸各取 50 ml,蛋白胨 1 g、玉米浆 0.35 g 配培养基 5 瓶(10 倍稀释 OD 值)。活菌数依次为 4.23、5.16、6.01、7.05、7.32 亿个/ml。

按玉米浆 0.15、0.25、0.35、0.45、0.55 g,葡萄糖 2.0 g,1:15 将豆饼粉浸泡煮沸取各 50 ml,蛋白胨 1 g 配培养基 5 瓶(10 倍稀释 OD 值)。活菌数依次为 4.41、5.56、6.81、7.12、7.43 亿个/ml。

按蛋白胨 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g,葡萄糖 2.0 g,1:15 将豆饼粉浸泡煮沸取各 50 ml,玉米浆 0.35 g 配培养基 5 瓶(10 倍稀释 OD 值)。活菌数依次为 4.41、6.54、7.12、7.29、7.51 亿个/ml。

参考豆饼粉与水各比例试验结果,分析单因素试验结

果。由图 2 可见,豆饼粉与水 1:15 的比例处开始菌液浓度增长率变小,取 1:15 作为正交试验中豆饼粉与水比例的 3 水平中间水平,1:10 与 1:20 做为另两个水平。以菌液浓度增长率变化作为依据,同理分析各因素试验结果可以将 1:15 将豆饼粉浸泡煮沸取 50 ml、葡萄糖 2.0 g、蛋白胨 1.0 g、玉米浆 0.35 g 等作为正交试验中 3 水平的中间水平,与其相临两个水平做为正交试验的基本数据来设计正交试验。

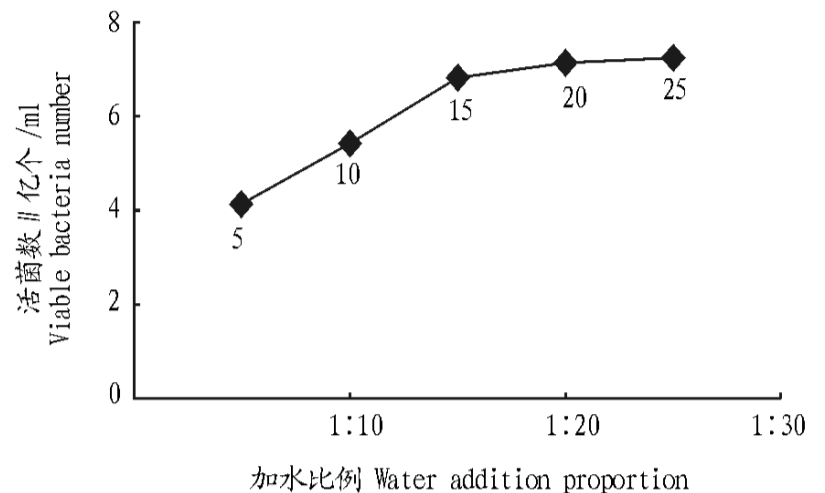


图2 豆饼粉与水各比例示意

Fig.2 Different proportion of bean cake powder and water

2.3 正交试验与结果分析 由表 1 可以看出,4 种因素对地衣芽孢杆菌发酵影响的显著性次序为:玉米浆 > 豆饼粉浸汁 > 蛋白胨 > 葡萄糖。培养基的最佳配比为:玉米浆 0.45 g,蛋白胨 1.5 g,豆饼粉浸汁为 1:15,葡萄糖 1.5 g。发酵液中菌液浓度达到 8.5 亿 ~9.0 亿个/ml。

表1 正交试验结果

Table 1 The results of the orthogonal experiment

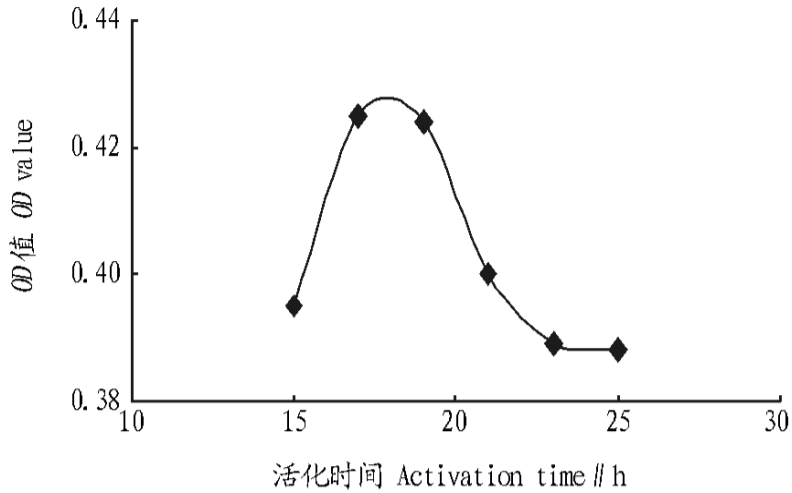
试验号 Est No.	豆饼粉浸汁 Juice of soybean cake meal	葡萄糖 Glucose	玉米浆 Corn steep liquor	蛋白胨 Peptone	活菌数 亿个/ml Viable bacteria number
1	1(1:10)	1(1.5 g)	1(0.25 g)	1(0.5 g)	6.24
2	1	2(2.0 g)	2(0.35 g)	2(1.0 g)	6.42
3	1	3(2.5 g)	3(0.45 g)	3(1.5 g)	8.62
4	2(1:15)	1	2	3	7.36
5	2	2	3	1	8.55
6	2	3	1	2	6.41
7	3(1:20)	1	3	2	8.35
8	3	2	1	3	6.17
9	3	3	2	1	6.53
K ₁	7.093	7.317	6.273	7.107	
K ₂	7.440	7.047	6.770	7.060	
K ₃	7.017	7.187	8.507	7.383	
极差 Range	0.423	0.270	2.234	0.323	

2.4 接种龄影响 接种龄对发酵周期的影响见图 3。分别以培养 15、17、19、21、23 h 的种子接种于发酵培养基中,36 发酵 20 h。结果 18 h 种龄的种子接入发酵培养基 20 h 后菌液浓度最高。18 h 的种子液,接出时的生理特征主要有:pH 值为 6~7,外观稍黏稠、色泽微红、镜检观察菌粗壮且形态呈竹节状(10 倍稀释 OD 值)。

2.5 接种量影响 接种量对发酵周期的影响见图 4,将 18 h 种龄的种子培养基以不同的接种量接入发酵培养基,经摇瓶振荡培养 20 h 后,测定。其中,以 8% 的接种量为最好。

2.6 起始 pH 值影响 起始 pH 值对菌液浓度的影响见图

5,用pHS 3C 精密pH 计将发酵培养基调节成不同的pH 值,菌种活化18 h。以8 %的接种量,经发酵培养20 h 后。从图5可以看出,pH 值影响较大,其中,起始pH 值为7.5 ~8.0 时,菌液浓度最高。



注:图中为10 倍稀释 OD 值。下图同。

Note: OD value in the figure was diluted for 10 times. The same as below.

图3 OD 值与菌种活化时间的关系

Fig.3 Relationship between OD value and activation time of bacteria

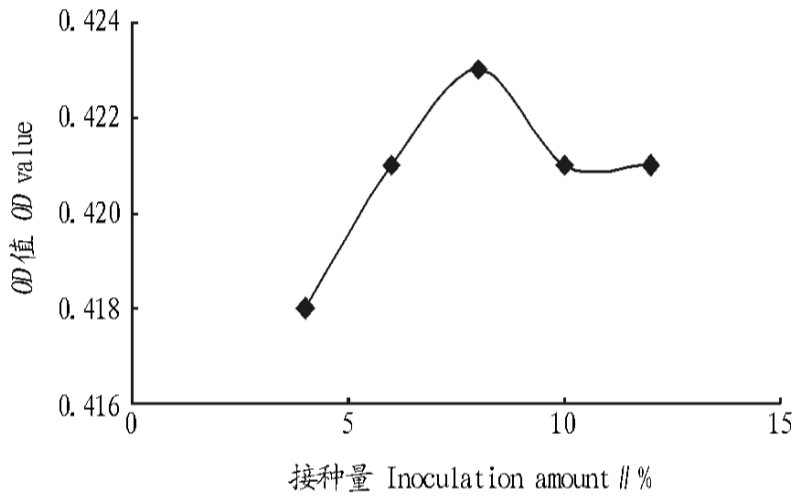


图4 OD 值与接种量的关系

Fig.4 Relationship between OD value and inoculation amount

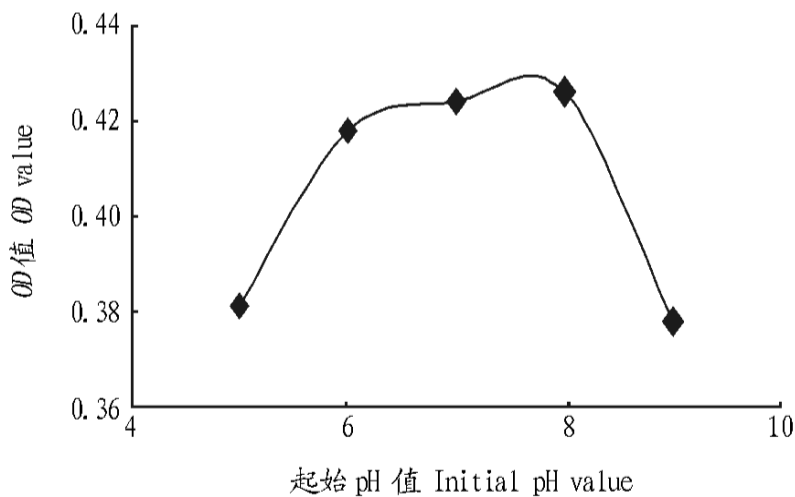


图5 OD 值与起始pH 值的关系

Fig.5 Relationship between OD value and initial pH value

2.7 温度影响 种龄18 h,接种量为8 %,起始pH 值7.5。20 h 后检测,发现37 左右菌液浓度最大,高温低温下增殖缓慢,温度低对菌体生长影响更大(图6)。

2.8 摇瓶发酵过程的生长曲线绘制 活化18 h,接种量为

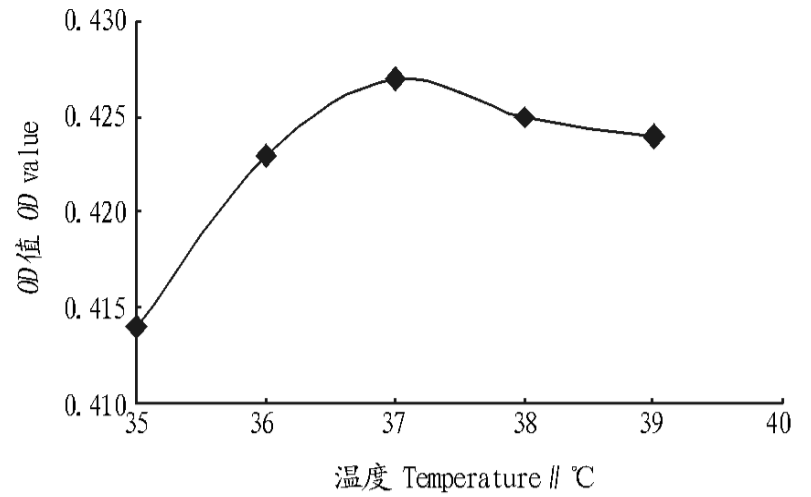


图6 OD 值与培养温度的关系

Fig.6 Relationship between OD value and culture temperature

8 %,起始pH 值7.5 培养温度37.5 。发酵培养12 h 后,每2 h 抽样检测菌液 OD 值。得到地衣芽孢杆菌的对数生长期在14 ~20 h,24 h 后菌液变化很小说明已经进入生长平衡时期,应该在此时间收集菌体(图7)。

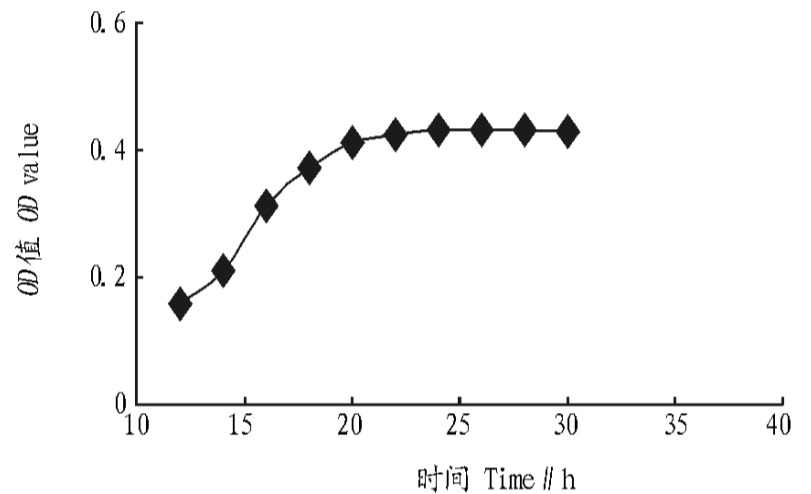


图7 发酵过程中 OD 值变化

Fig.7 The changes of OD value in the fermentation process

3 结论

4 种因素对地衣芽孢杆菌发酵影响的显著性次序为:玉米浆>豆饼粉浸汁>蛋白胨>葡萄糖。培养基的最佳配比为:玉米浆0.45 g,蛋白胨1.5 g,豆饼粉浸汁为1:15,葡萄糖1.5 g。最适宜种龄为18 h,接种量8 %,其始pH 值7.5,最佳温度37.5 ,此条件下地衣芽孢杆菌对数生长期在14 ~20 h,发酵周期为22 ~24 h。活菌数每单位提高近1 亿个,发酵周期比经验周期缩短10 h。

参考文献

- [1] 谷春涛,彭爱铭,萨仁娜,等.地衣芽孢杆菌TS1 发酵培养基的优化[J].饲料工业,2003(8):19-20.
- [2] 刘莹,孙荣丹,杨翔华,等.地衣芽孢杆菌LNU1 发酵条件研究及培养基优化[J].食品科技,2006(8):28-30.
- [3] 乔军,孟庆龄,贾桂珍.OD 值法进行细菌计数的研究[J].中国家禽,1996(4):26.
- [4] 俞俊棠,唐孝宣,邬行彦.新编生物工艺学(上)[M].北京:化学工业出版社,2003:111.
- [5] 马远中,薛兆民.乳酸乙酯最佳合成工艺的正交试验设计[J].菏泽师专学报,1998(4):42-44.