

饲用枯草芽孢杆菌高密度发酵培养基的优化

李 达, 姜媛媛, 周 洋, 王景会*

(吉林省农业科学院农产品加工研究所, 长春 130033)

摘要: 为了提高枯草芽孢杆菌 NKY1145 发酵液微生物活菌量, 对培养基组成成分(碳源、氮源和无机盐)进行了优化试验。最终确定了枯草芽孢杆菌高密度发酵培养基组成成分最佳组合为葡萄糖 2%, 糖蜜 3%, 酵母粉 3%, 黄豆粉 2%, 氯化铵 3%, 硫酸镁 2%, 柠檬酸钠 3%, 枯草芽孢杆菌 NKY1145 最大活菌数浓度可达到 6.3×10^9 CFU/mL。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 高密度发酵; 培养基

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)02-0104-05

Optimization of High Density Fermentation Medium of *Bacillus subtilis*

LI Da, JIANG Yuanyuan, ZHOU Yang, WANG Jinghui*

(Institute of Agricultural Products Processing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: To improve microbial activity of *Bacillus subtilis* NKY1145 fermentation broth, the medium composition (carbon, nitrogen and inorganic salts) were optimized in the experiment. The best combination of high density fermentation of *Bacillus subtilis* culture medium composition was ultimately determined, which was, 2% glucose, 3% molasses, 3% yeast powder, 2% soybean powder, 3% ammonium chloride, 2% magnesium sulfate and 3% sodium citrate. Maximum live bacteria number concentration of *Bacillus subtilis* NKY1145 could reach 6.3×10^9 CFU/mL.

Key words: *Bacillus subtilis*; High density fermentation; Medium

饲用益生菌对牲畜的健康具有促进作用, 正是由于饲用益生菌所特有的益生性功能使得由其发酵生产的饲料产品越来越受到养殖业的青睐, 因此饲用益生菌成为近年来国内研究者的热点关注问题。枯草芽孢杆菌是中国农业部允许在饲料添加剂中直接应用的一种益生菌^[1-3]。其分泌物具有脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶等活性成分, 还产生较强的抗菌素, 上述益生特性对促进养殖禽畜机体营养的消化吸收、提高禽畜行业喂养饲料转化率和防止禽畜机体疾病发生, 促进禽畜机体生长发育等方面起到重要作用^[4-7]。目前枯草芽孢杆菌工业化生产还存在发酵生产周期长、微生物活菌量低、生产成本高等问题。本试验用单因素和正交试验对影响枯草芽孢杆菌生长的发酵培养基

成分的种类、添加量等因素进行了分析研究, 提高了枯草芽孢杆菌发酵液活菌量并降低了生产成本。对枯草芽孢杆菌 NKY1145 后续大规模工业化生产提供了有力的数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

枯草芽孢杆菌 NKY1145 由吉林省农业科学院农产品加工研究所分离保存。

1.1.2 试验试剂

基础 LB 培养基, 购于北京奥博星生物技术有限责任公司。葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、大豆蛋白胨、豆粕、酵母粉、牛肉膏、硝酸铵、硝酸钾、草酸铵、硫酸铵、氯化铵、硫酸铁、磷酸氢二钾、硫酸锌、硫酸镁、柠檬酸钠, 均为分析纯, 北京生化试剂公司生产。糖蜜、黄豆粉、玉米粉、豆粕, 市场购买所得。

1.1.3 试验仪器

pH 计(FE-20, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、电子分析天平(CP64, 奥豪斯仪器(上

收稿日期: 2015-11-01

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目(200150204080NY); 吉林省农业科技创新工程项目(ZYCX201315); 吉林省科技发展计划项目(20150307019NY)

作者简介: 李 达(1980-), 男, 助理研究员, 硕士, 从事农产品加工研究。

通讯作者: 王景会, 女, 研究员, E-mail: wjhjaas@163.com

海)有限公司)、立式蒸汽压力灭菌器(MLS-3780型,TEGA SANYO Industry CO., Ltd.)、超纯水机(基因型 180a,上海摩尔科学仪器有限公司)、恒温鼓风干燥箱(DHG-9210A型,上海一恒科技有限公司)、生物洁净工作台(BCN-1360B型,北京东联哈尔仪器制造有限公司)、恒温培养振荡器(HZQ-QX型,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌菌液的制备^[8]

试验室冻干保存的枯草芽孢杆菌基础LB液体培养基活化,经实验室前期确定的优化发酵工艺:接菌量 10%接入 10 mL 基础LB液体培养基中,在培养温度 37℃,转速 200 r/min 环境条件下摇瓶培养 18 h,制成枯草芽孢杆菌 NKY1145 种子液。

1.2.2 枯草芽孢杆菌活菌量测定

详细步骤见参考文献[9]。

1.2.3 培养基成分单因素试验

1.2.3.1 以 1% 酵母粉为氮源,以各自添加的碳源 LB 空白培养基做对照,再分别添加 1% 葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、玉米粉、糖蜜为液体培养基中的碳源,按接菌量 10% 的比例,将枯草芽孢杆菌种子液接入优化后的液体培养基中,温度 37℃、震荡摇床转速 200 r/min,培养 18 h 后,测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数(下同),检验培养基中碳源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 生长的影响。

1.2.3.2 有机氮源在上述 1% 最佳碳源保持不变,以各自添加的有机氮源 LB 空白培养基做对照,向液体培养基中分别添加 1% 的大豆蛋白胨、黄豆粉、豆粕、酵母粉、牛肉膏。按照上述枯草芽孢杆菌 NKY1145 培养条件进行发酵培养,最后测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数,检验有机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 生长的影响。

1.2.3.3 无机氮源以上述 1% 的最佳碳源保持不变,以各自添加的无机氮源空白培养基做对照向液体培养基中分别添加 0.5% 硝酸铵、硝酸钾、草酸铵、硫酸铵、氯化铵,按照上述枯草芽孢杆菌培养条件,接种培养,最后测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数,检验无机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 生长的影响。

1.2.3.4 无机盐以上述 1% 的最佳碳、氮源为基础保持不变,以各自添加无机盐的 LB 空白培养基作为对照,再向其中分别添加 0.1% 硫酸铁、磷酸氢二钾、硫酸锌、硫酸镁、柠檬酸钠。按照上述枯草芽孢杆菌培养条件,接种培养,最后测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数,检验无机盐对枯草芽孢杆菌

NKY1145 生长的影响。

1.2.4 正交试验

选择合适的碳源、氮源、无机盐成分,采用合适的正交表安排试验,按照上述条件接种培养,最后测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数,确定最佳碳源、氮源和无机盐浓度组合。

1.2.5 优化培养基验证试验

按照上述枯草芽孢杆菌培养发酵条件,分别在基础 LB 液体培养基和优化培养基接种培养,培养 26 h 并每隔 2 h 测定枯草芽孢杆菌发酵液活菌数,对比检验优化培养基对枯草芽孢杆菌 NKY1145 生长的影响。

1.2.6 数据统计

试验数据均由 SPSS 12.0 统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同有机碳源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

有机碳源是培养基构成的主要成分,这是因为碳水化合物在微生物细胞构成中占有的比例相当高,一般可占微生物细胞干物质的 50% 左右。碳水化合物是微生物细胞生命生长过程中最基本的营养物质,并且是构成微生物菌体碳架的产物^[10]。

有机碳源检验结果见图 1。从发酵液中生物活菌量来看,选择的 5 种碳源中,枯草芽孢杆菌 NKY1145 利用葡萄糖和糖蜜发酵生长繁殖效果呈现不显著差异,枯草芽孢杆菌活菌量都达到 10^8 CFU/mL 以上。葡萄糖是最容易利用的一种单糖,所有的细菌都可以利用葡萄糖,所以可作为一种促进微生物细胞生长发育的糖类成分^[11]。糖蜜不仅含有糖类,还含有一定量的维生素、促生长因子有效成分。而麦芽糖枯草芽孢杆菌发酵利用率最低,与其他 4 种碳源发酵活菌数形成显著差异,枯草芽孢杆菌

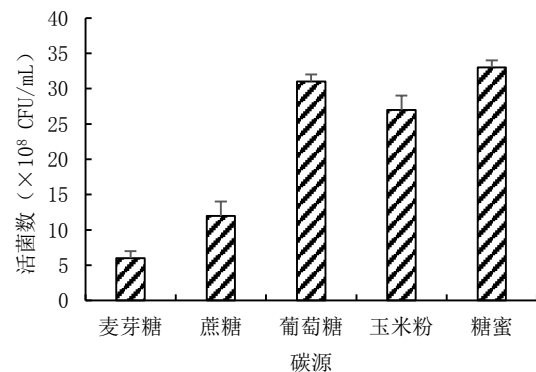


图 1 不同碳源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

菌活菌量只达到 10^8 CFU/mL左右。综合活菌生物量来考虑,选择葡萄糖和糖蜜作为优化培养基碳源。

2.2 不同有机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

氮元素是构成微生物生物体细胞的重要物质,主要用来合成细菌的生物体细胞物质和产生含氮代谢物质^[12]。

有机氮源检验结果见图2。从活菌生物量来看,在这5种有机氮源中,枯草芽孢杆菌 NKY1145 利用酵母粉和黄豆粉发酵效果之间呈现不显著差异,枯草芽孢杆菌活菌量都达到 3.5×10^9 CFU/mL以上。酵母粉是一种良好的有机氮源,能被枯草芽孢杆菌充分利用,提高微生物活菌量^[13]。黄豆粉不仅含有丰富的大豆蛋白,还含有刺激微生物生长繁殖的营养因子^[14]。而豆粕和牛肉膏作为氮源发酵微生物活菌量要低于前二者,呈现显著性差异,微生物活菌量达到 2.7×10^9 CFU/mL左右。添加大豆蛋白胨的发酵微生物活菌量只到 1.8×10^9 CFU/mL左右。进一步说明了枯草芽孢杆菌能利用有机氮源更好地生长繁殖。综合活菌生物量来考虑,选择酵母粉和黄豆粉作为优化培养基有机氮源。

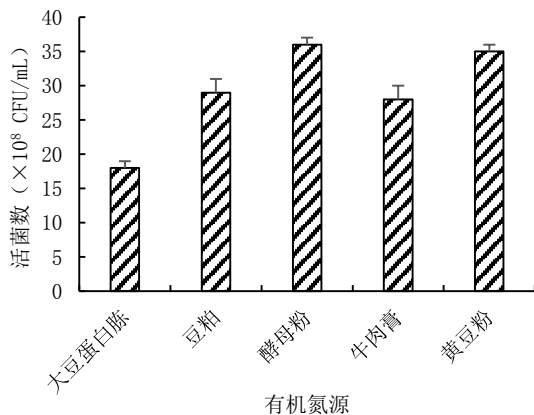


图2 不同有机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

2.3 不同无机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

无机氮源可以被微生物直接利用,通过利用 NH_4^+ 的形式进入微生物细胞成分中,这是氮在微生物细胞氮元素代谢途径中最重要的作用反应^[15]。

无机氮源检验结果见图3。从枯草芽孢杆菌活菌生物量来看,在这5种无机氮源中,枯草芽孢杆菌 NKY1145 利用氯化铵发酵效果最好,枯草芽孢杆菌活菌量达到 4×10^9 CFU/mL以上。而草酸铵、硝酸铵和硫酸铵作为无机氮源发酵微生物活

菌量,三者之间呈现不显著性差异,均低于氯化铵,微生物活菌量在 3.5×10^9 CFU/mL以下。添加硝酸钾的发酵微生物活菌量只达到 2.1×10^9 CFU/mL左右。说明了无机氮源对枯草芽孢杆菌活菌量的影响。 NH_4^+ 的存在可以刺激枯草芽孢杆菌生长繁殖,提高微生物发酵液中活菌量^[16]。综合枯草芽孢杆菌活菌数方面考虑,选择氯化铵作为优化培养基无机氮源。

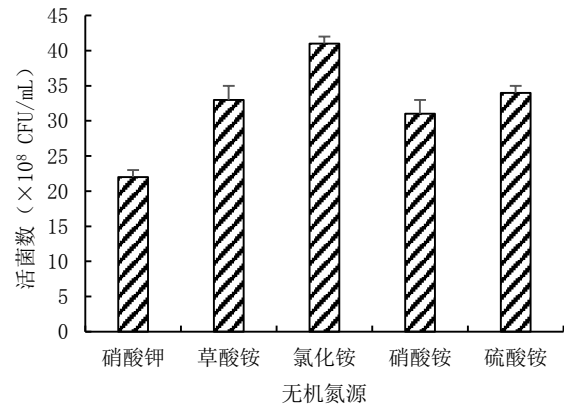


图3 不同无机氮源对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

2.4 无机盐对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

无机盐是微生物生长繁殖过程中不可缺少的物质,主要是构成细菌菌体细胞的组成成分,维持繁殖过程中所需酶的活性,调节微生物生长渗透压等环境^[17]。

无机盐对枯草芽孢杆菌活菌量检验结果见图4。从活菌生物量来看,在这5种无机盐中,枯草芽孢杆菌 NKY1145 利用硫酸镁和柠檬酸钠发酵效果之间呈现不显著差异,但对比其他3种无机盐呈显著性差异,枯草芽孢杆菌活菌量都达到 4×10^9 CFU/mL以上。硫酸镁提供了镁离子,作为一

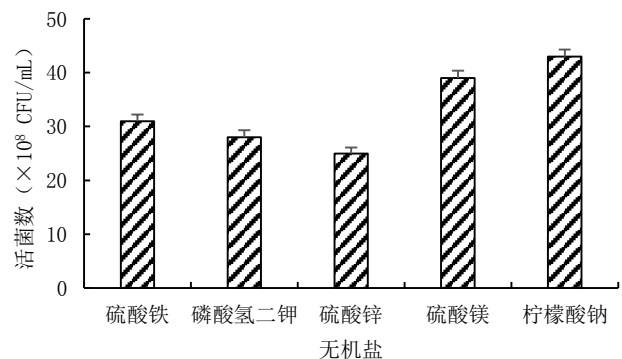


图4 不同无机盐对枯草芽孢杆菌 NKY1145 有效活菌数的影响

种酶的辅助因子,可以促进微生物细胞生长繁殖过程中细胞壁和细胞膜的形成^[18]。柠檬酸钠或许保持了发酵液离子平衡,对菌体起到非常重要的生长调节作用^[19]。而硫酸锌枯草芽孢杆菌发酵利

用率最低,与其他4种无机盐发酵活菌数形成显著差异,枯草芽孢杆菌活菌量只达到 2.5×10^8 CFU/mL左右。综合活菌生物量来考虑,选择硫酸镁和柠檬酸钠作为优化培养基无机盐。

表1 $L_{18}(3^7)$ 正交试验因素水平及结果分析

编号	葡萄糖(A)	糖蜜(B)	酵母粉(C)	黄豆粉(D)	氯化铵(E)	硫酸镁(F)	柠檬酸钠(G)	活菌数($\times 10^8$ CFU/mL)
1	1(1%)	1(1%)	1(1%)	1(1%)	1(1%)	1(1%)	1(1%)	47
2	1	2(2%)	2(2%)	2(2%)	2(2%)	2(2%)	2(2%)	48
3	1	3(3%)	3(3%)	3(3%)	3(3%)	3(3%)	3(3%)	58
4	2(2%)	1	1	2	2	3	3	51
5	2	2	2	3	3	1	1	50
6	2	3	3	1	1	2	2	56
7	3(3%)	1	2	1	3	2	3	51
8	3	2	3	2	1	3	1	52
9	3	3	1	3	2	1	2	57
10	1	1	3	3	2	2	1	49
11	1	2	1	1	3	3	2	49
12	1	3	2	2	1	1	3	55
13	2	1	2	3	1	3	2	50
14	2	2	3	1	2	1	3	52
15	2	3	1	2	3	2	1	59
16	3	1	3	2	3	1	2	52
17	3	2	1	3	1	2	3	51
18	3	3	2	1	2	3	1	54
K1	306	300	314	309	311	313	311	
K2	318	302	308	317	311	314	312	
K3	317	339	319	315	319	314	318	
k1	51.000	50.000	52.333	51.500	51.833	52.167	51.833	
k2	53.000	50.333	51.333	52.833	51.833	52.333	52.000	
k3	52.833	56.500	53.167	52.500	53.167	52.333	53.000	
R	2.000	6.500	1.834	1.333	1.334	0.166	1.167	

2.5 发酵培养基成分正交试验

以枯草芽孢杆菌活菌数作为指标,发酵培养基成分优化正交试验采用 $L_{18}(3^7)$ 正交设计表,即以葡萄糖(A)、糖蜜(B)、酵母粉(C)、黄豆粉(D)、氯化铵(E)、硫酸镁(F)、柠檬酸钠(G)进行7因素3水平正交试验研究,正交试验结果与分析见表1。

由表1可知,枯草芽孢杆菌NKY1145发酵培养基最佳组合为 $A_2B_3C_1D_2E_3F_2G_1$,但因素水平K分析得到最佳组合为 $A_2B_3C_3D_2E_3F_2G_3$,与正交试验得到的结果有偏差,以发酵液枯草芽孢杆菌活菌量为指标进一步确认结果,按 $A_2B_3C_3D_2E_3F_2G_3$ 发酵液成分组合培养枯草芽孢杆菌NKY1145活菌量为 6.3×10^9 CFU/mL,高于正交试验组合15的试验结果。所以枯草芽孢杆菌NKY1145发酵培养基成分组合为 $A_2B_3C_3D_2E_3F_2G_3$,即葡萄糖2%,糖蜜3%,

酵母粉3%,黄豆粉2%,氯化铵3%,硫酸镁2%,柠

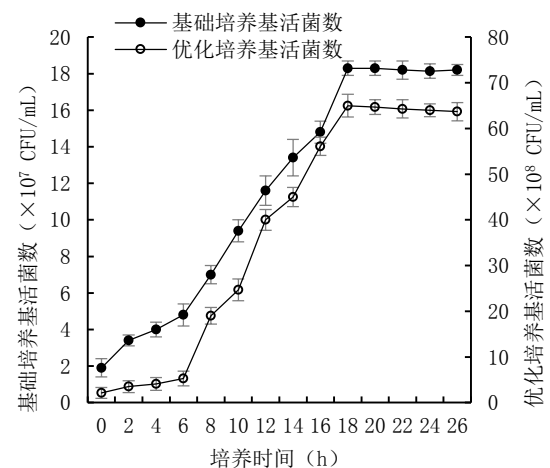


图5 基础培养基与优化培养基生长曲线

檬酸钠 3%。各因素的影响顺序为 $B > A > C > E > D > G > F$, 即糖蜜 > 葡萄糖 > 黄豆粉 > 氯化铵 > 酵母粉 > 柠檬酸钠。

2.6 优化培养基验证试验

用优化后的液体培养基与基础 LB 液体培养基进行对照。由图 5 结果可知, 优化后的培养基没有改变枯草芽孢杆菌各阶段(迟缓期、对数期、稳定期)生长周期的时间, 但提高了枯草芽孢杆菌 NKY1145 各个生长阶段的细菌总数。在培养时间达到 18 h 时, 枯草芽孢杆菌在优化培养基和基础培养基中活菌数都达到最高峰, 细菌总数从基础培养基中 1.83×10^8 CFU/mL 提高到优化培养基中 6.2×10^9 CFU/mL, 这说明优化培养基培养效果稳定可靠, 明显提高了枯草芽孢杆菌 NKY1145 单位活菌量。

3 结 论

微生物高密度细胞发酵培养是要在单位培养时间内, 单位发酵液体积内, 在不影响微生物产物得率的基础上, 得到尽可能多的微生物活体积累量。本试验结果表明, 通过单因素试验, 枯草芽孢杆菌 NKY1145 液体发酵培养基碳源为葡萄糖和糖蜜, 有机氮源为酵母粉和黄豆粉, 无机氮源为氯化铵, 无机盐为硫酸镁和柠檬酸钠。各组分通过正交试验得到最佳组合为: 葡萄糖 2%, 糖蜜 3%, 酵母粉 3%, 黄豆粉 2%, 氯化铵 3%, 硫酸镁 2%, 柠檬酸钠 3%。在优化培养基培养条件下, 可以得到枯草芽孢杆菌 NKY1145 最大活菌数浓度 6.3×10^9 CFU/mL。而基础培养基培养条件下, 得到枯草芽孢杆菌 NKY1145 最大活菌数浓度 1.83×10^8 CFU/mL, 优化后的培养基比基础培养基的枯草芽孢杆菌生物活菌数浓度提高了 34 倍。吴大华等^[9]优化一株枯草芽孢杆菌发酵培养基后, 发酵液中活菌数可达到 1.34×10^9 CFU/mL, 比优化前菌数提高了 30.47%。汤瑜婧等^[20]对一株饲用芽孢杆菌培养条件优化后, 发酵液中生物细胞数达到 8.1×10^{10} CFU/mL, 比空白培养基中生物活菌数提高了 62 倍。周映华等^[7]在三角摇瓶中对饲用纳豆枯草芽孢杆菌液体高密度培养后, 培养液中菌体细胞数量达到 1.26×10^9 CFU/mL, 对比基础培养基活菌数提高了 32 倍。优化培养基对枯草芽孢杆菌的生长繁殖有着积极的影响, 优化培养后微生物活菌量都有大幅度提高, 但提高幅度各枯草芽孢杆菌都不相同。微生物的生长繁殖是一个极其复杂的过程, 菌种特性变化多样, 同种属的不同微生

物对培养基营养成分需求条件都不尽相同。本研究对枯草芽孢杆菌 NKY1145 高密度发酵培养基进行了优化, 为下一步大规模工业化发酵培养提供了有力的理论基础。

参考文献:

- [1] 王宗伟, 李法增, 杨志平, 等. 枯草芽孢杆菌在畜禽营养上的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(1): 80-83.
- [2] 王景会, 李 达, 姜媛媛, 等. 枯草芽孢杆菌 JAASB4 的安全性评价[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(5): 102-103, 112.
- [3] 王 苇, 秦 瑶, 李 爽, 等. 枯草芽孢杆菌微生态制剂的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(11): 217-220.
- [4] 王景会, 李妹睿, 李 达, 等. 枯草芽孢杆菌 JAASB4 胞外酶修饰对玉米粉成分的影响[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(6): 82-85.
- [5] 张爱武, 薛 军. 枯草芽孢杆菌在动物生产中的应用效果[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 234-238.
- [6] 翟继鹏, 张金枝. 枯草芽孢杆菌在养殖业中的应用研究进展[J]. 浙江畜牧兽医, 2010(3): 7-9.
- [7] 周映华, 吴胜莲. 饲用枯草芽孢杆菌发酵条件的优化[J]. 湖南农业科学, 2010(11): 21-23.
- [8] 张 雷, 赵长山, 何付丽. 解淀粉芽孢杆菌 15-1-1 的摇瓶发酵条件优化[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(2): 87-91.
- [9] 吴大华. 枯草芽孢杆菌 CS27 高密度培养及保藏研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [10] 陈志文, 徐尔尼, 肖美燕. 产纤溶酶枯草芽孢杆菌发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(5): 23-24, 26.
- [11] 丁明亮, 欧阳安然, 王望斐, 等. 枯草芽孢杆菌产凝乳酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 156-160.
- [12] 杨 锋, 章亭洲. 枯草芽孢杆菌生物学特性的研究[J]. 饲料研究, 2011(3): 34-36.
- [13] 章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58-62.
- [14] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346.
- [15] 刘 雪, 叶 婧, 穆长青, 等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 230-235.
- [16] 马晓丹, 张红星, 钟思琼, 等. 枯草芽孢杆菌 C3 产抗菌物质发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 10-14.
- [17] 郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 液体发酵条件[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2006, 24(4): 380-385.
- [18] 秦 艳, 李卫芬, 黄 琴. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化[J]. 饲料研究, 2007(12): 70-74.
- [19] 刘 雪. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件及其抗菌物质分离纯化的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [20] 汤瑜婧, 葛 龙, 冯景泰, 等. 1 株饲用枯草芽孢杆菌培养条件的优化[J]. 饲料研究, 2015(21): 52-54.

(责任编辑: 范杰英)