

嗜热脂肪土芽孢杆菌 CHB1 发酵培养基的优化

任香芸^{1,2}, 蔡海松¹, 林新坚¹, 邱宏端², 陈济琛¹

(1. 福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350013; 2. 福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350002)

摘要: 以菌体生长量和 pH 值作为培养基优化的指标, 对嗜热脂肪土芽孢杆菌 CHB1 发酵培养基成分进行了筛选与优化。结果表明, 不同碳氮源对发酵液菌数影响相差较大, 最佳培养基配比为: 牛肉膏、大豆蛋白胨、NaCl、K₂HPO₄和KH₂PO₄; 最佳摇瓶发酵配方为: 牛肉膏 0.5%, 大豆蛋白胨 0.9%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄: KH₂PO₄为 0.1%: 0.075%, 该培养基中培养 CHB1 比在发酵基础培养基中培养菌量提高 10 倍以上。

关键词: 嗜热脂肪土芽孢杆菌 CHB1; 发酵培养基; 优化

中图分类号: Q 939.99

文献标识码: A

Optimum medium composition for *Geobacillus stearothermophilus* CHB1 fermentation

REN Xiang-yun^{1,2}, CAI Hai-song¹, LIN Xin-jian², QIU Hong-duan¹, CHEN Ji-chen^{2*}

(1. Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2 College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Cell biomass and pH of *Geobacillus stearothermophilus* CHB1 in culture medium were used as indices in the optimization study. The results indicated that different carbon and nitrogen sources significantly affected the microbial growth. By using orthogonal experimentation design, the optimal medium composition was obtained: 0.5% beef extract, 0.9% soy peptone, 0.2% NaCl, 0.1% K₂HPO₄ and 0.075% KH₂PO₄. It was found that the biomass resulted from the newly formulated medium was ten times greater than that from the standard fermentation medium.

Key words: *Geobacillus stearothermophilus* CHB1; fermentation medium; optimization

人类为满足自身活动的需要, 在生产和生活过程中会产生大量的有机固体废弃物, 堆肥化是我国资源化处理利用有机固体废弃物的有效途径之一^[1], 其中微生物在堆肥过程中起着重要的作用^[2]。赵京音等报道用 EM 制剂进行鸡粪堆肥试验, 可有效去除畜禽粪便恶臭^[3]; 沈根祥等报道了 Hsp 菌剂能迅速提高牛粪堆肥的发酵温度, 有效杀灭粪便中所含的杂草种子和虫卵病菌, 具有快速堆肥腐熟和无害化的功效^[4], 但所用菌剂都不是由我国自主研制的。“圃园牌畜禽粪便发酵菌曲”是我国第一个具有自主知识产权处理有机固体废弃物的发酵菌剂产品。由于当前堆肥工艺的经济性, 堆肥产品的应用存在一定的问题, 限制了堆肥技术的推广应用。因此系统深入地研究发酵菌剂中各种微生物的生理生化特性, 优化发酵工艺参数, 实现高密度培养, 不仅可以降低成本, 为提高有机固体废弃物的生物处理效率和堆肥质量提供理论依据; 还

可以促进发酵菌剂的商品化进程, 为其推广普及奠定基础。

发酵生产中优良的菌株首先应该是生长快, 生理状态良好, 接种至发酵培养基后能迅速生长, 延滞期短; 其次是生物量较大^[5]。而微生物的生长和代谢产物的积累受制于培养基的组成如碳源、氮源、生长因子、无机盐等多种因子的影响, 找出影响的主要因子并对其参数进行优化是种子培养基优化的关键^[6]。初步试验表明: 嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) CHB1 在有机固体废弃物的堆肥化处理中能有效促进堆肥温度, 缩短腐熟时间, 是研制有机固体废弃物微生物转化制剂的良好菌种, 但在基础培养基中生长较差。本文以 CHB1 为出发菌株, 对其培养基进行优化, 以获得菌体收获量大的液体发酵培养基, 旨在为嗜热脂肪土芽孢杆菌的工业化生产提供依据。

收稿日期: 2006-11-25 初稿; 2007-01-15 修改稿

作者简介: 任香芸 (1980-), 女, 硕士研究生, 从事微生物遗传育种研究 (E-mail: xiangyun09@126.com)。

通讯作者: 陈济琛 (1964-), 男, 研究员, 从事农业微生物与食用菌研究 (E-mail: chenjichen2001@163.com)。

基金项目: 福建省发改委资助项目 (闽计高技 [2003] 37)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 嗜热脂肪土芽孢杆菌CHB1,由福建省农业科学院土壤与肥料研究所微生物室保存,中科院微生物所鉴定。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 活化培养基 牛肉膏0.3%,蔗糖0.2%,大豆蛋白胨1.0%,NaCl0.2%,琼脂2%,pH7.5。

1.1.2.2 平板计数培养基 牛肉膏0.5%,蔗糖0.5%,大豆蛋白胨0.5%,蛋白胨0.5%,NaCl0.2%,琼脂2%,pH7.5。

1.1.2.3 发酵基础培养基 牛肉膏0.3%,蔗糖0.2%,大豆蛋白胨1.0%,NaCl0.2%,pH7.5

1.2 方法

1.2.1 菌体浓度测定

1.2.1.1 活菌计数法 参照文献[7]的方法。取1mL发酵液加入到9mL无菌水中,依次做10倍系列稀释,选取3个适当的稀释倍数,吸取1mL稀释液注入培养皿中,3次重复。置60℃恒温培养箱中培养18h,选取菌落数在30~300的培养皿计菌落数。

1.2.1.2 吸光度法 取5mL培养液,以未培养的培养基作为空白对照,测定其在波长620nm处的吸光值。

1.2.2 菌悬液的制备 将CHB1在活化培养基中培养18h,按照1管菌10mL无菌水的比例将斜面菌体洗入无菌水中,摇匀,制成一定浓度的菌悬液,备用。

2 结果与分析

2.1 碳源的筛选

以发酵基础培养基为对照,将其中的碳源0.3%牛肉膏和0.2%蔗糖分别换为1%蔗糖、糖蜜、牛肉膏、玉米粉、玉米淀粉和可溶性淀粉,按10%接种量将菌悬液接入盛有50mL培养基的250mL三角瓶中,于58℃,180r·min⁻¹摇床培养24h(以下培养条件同2.1),测菌体生长量和发酵液pH值。

结果显示(表1),不同碳源对菌体生长量的影响很大。以蔗糖、糖蜜、玉米粉和玉米淀粉为碳源,菌量在 $2.07 \times 10^5 \sim 4.88 \times 10^5$ (CFU·mL⁻¹);以1%牛肉膏或1%可溶性淀粉作碳源菌量较大,分别达到 5.57×10^7 和 2.34×10^7 (CFU·mL⁻¹)。

优于发酵基础培养基。从培养后的菌液pH值看,以可溶性淀粉做碳源,培养液pH值下降较大,不利于CHB1的生长;以牛肉膏做碳源,培养液pH值会上升,且在菌体的耐受范围内。可能是牛肉膏成分较复杂,在菌体的生长中不仅作为碳源来发挥作用,对pH值也起到一定的缓冲作用,适宜作CHB1培养的碳源。

表1 不同碳源对CHB1生长的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the growth of CHB1

碳源	发酵液pH	菌量(CFU·mL ⁻¹)
0.3%蔗糖+0.2%牛肉膏	8.40	1.98×10^6
1%蔗糖	5.39	2.18×10^5
1%糖蜜	4.50	2.07×10^5
1%牛肉膏	8.72	5.57×10^7
1%玉米粉	5.91	4.88×10^5
1%玉米淀粉	5.17	2.40×10^5
1%可溶性淀粉	5.31	2.34×10^7

2.2 氮源的筛选

用1%牛肉膏代替发酵基础培养基中的0.3%牛肉膏和0.2%蔗糖,分别以1%蛋白胨、黄豆粉、酵母粉、干酪素和麸皮代替1%大豆蛋白胨,培养后测得菌量和发酵液pH值。结果显示(表2),不同氮源对CHB1的生长也有很大影响,以大豆蛋白胨为氮源培养菌数最多,且发酵液pH值呈碱性,适宜菌体生长。所以宜选择大豆蛋白胨作最佳氮源。

表2 不同氮源对CHB1生长的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on the growth of CHB1

氮源(1%)	发酵液pH	菌量(CFU·mL ⁻¹)
大豆蛋白胨	8.44	1.9×10^7
蛋白胨	8.39	6.0×10^5
黄豆粉	8.28	1.7×10^6
酵母粉	6.18	3.8×10^5
干酪素	5.29	3.4×10^6
麸皮	5.31	3.0×10^5

2.3 牛肉膏对CHB1菌体生长量和pH的影响

以1%大豆蛋白胨为氮源,分别添加0.02%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%牛肉膏进行试验,结果如图1,随牛肉膏含量降低,菌液pH升高,原因可能菌体分解其中的氮源产生较多的胺类等碱性物质,使pH值上升;随牛肉膏含量增大,OD₆₂₀值先升高后下降,牛肉膏含量在

0.6% 时, OD_{620} 值最大, 菌液 pH 值呈碱性, 说明适宜 CHB1 生长的牛肉膏含量为 0.6%。

氮源, 分别添加 0, 0.2%, 0.4%, 0.6% NaCl 进行试验, 结果显示 (图 3), NaCl 在 0.2% 时, 菌数最多; 随其 NaCl 的增加, 菌数下降, 说明过高的盐含量不适宜菌体的生长。不加 NaCl 的试验组与加 0.2% NaCl 的试验组相比, 菌量相对较小, 说明适量 NaCl 对 CHB1 的生长繁殖有促进作用。

图 1 不同含量牛肉膏对 CHB1 菌体生长量的影响

Fig 1 Effect of beef extract concentrations on the biomass of CHB1

注: 在一定范围内, 发酵液 OD_{620} 值可以反映菌量的大小。
 OD_{620} 值越大, 说明菌量越大; 反之, 菌量越小。

2.4 大豆蛋白胨对 CHB1 菌体生长量和 pH 的影响

以 0.6% 牛肉膏为碳源分别添加 0, 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8% 大豆蛋白胨进行试验, 结果如图 2, 随大豆蛋白胨含量的增加, 菌数先上升后下降, 大豆蛋白胨在 0.9% 时, 菌数达到最大值, 可知适宜 CHB1 生长的大豆蛋白胨为 0.9%。当大豆蛋白胨含量在 0.9%~1.8% 时 pH 的变化与菌数的变化趋势大体一致, 表明发酵液中碱性物质的多少与菌量大小呈某种正相关关系。

图 2 不同含量大豆蛋白胨对 CHB1 菌体生长量的影响

Fig 2 Effect of soy peptone concentrations on the biomass of CHB1

2.5 NaCl 对 CHB1 菌体生长量的影响

以 0.6% 牛肉膏作碳源, 0.9% 大豆蛋白胨为

图 3 不同含量 NaCl 对 CHB1 菌体生长量的影响

Fig 3 Effect of NaCl concentrations on the biomass of CHB1

2.6 磷酸盐对 CHB1 菌体生长量的影响

磷酸盐中的 P 元素是菌体合成核酸、辅酶等物质的重要元素, K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 合理的浓度配比可调整培养基的 pH, 并起到缓冲作用, 保证菌体适宜的生长环境。本试验用 K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 配成不同 pH 的缓冲液加入发酵培养基中进行培养, 测定菌体生长量和 pH 值。结果如图 4, 不同 pH 磷酸盐缓冲液对 CHB1 的菌体生长量有较大影响。当缓冲液 pH 在 7.0 左右, 即 $K_2HPO_4 : KH_2PO_4$ 为 0.1% : 0.075% 时, 菌体生长量最大。

图 4 不同配比磷酸盐对 CHB1 菌体生长量的影响

Fig 4 Effect of phosphate concentrations on the growth of CHB1

2.7 培养基配比优化

以上述研究结果为基础,菌体生长量为指标,牛肉膏、大豆蛋白胨、NaCl、磷酸盐为考察对象,选择 $L_9(3^4)$ 型正交表进行正交试验^[8],结果见表3和表4,各影响因素的主次顺序为:牛肉膏>大豆蛋白胨>NaCl>磷酸盐。其最佳组合为A₁B₂C₂D₂,即:牛肉膏0.5%,大豆蛋白胨0.9%,NaCl0.2%,K₂HPO₄:KH₂PO₄为0.1%:0.075%。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表Table 3 $L_9(3^4)$ Orthogonal experimentation factors

水平	因 素			
	牛肉膏 (%)	大豆蛋白胨 (%)	NaCl (%)	K ₂ HPO ₄ : KH ₂ PO ₄
1	0.5	0.8	0.1	2:1(0.2%:0.075%)
2	0.6	0.9	0.2	1:1(0.1%:0.075%)
3	0.7	1.0	0.3	1:2(0.1%:0.15%)

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计和结果分析Table 4 $L_9(3^4)$ Orthogonal experimentation design and data analysis

试验号	牛肉膏 (%)	大豆蛋白胨 (%)	NaCl (%)	K ₂ HPO ₄ : KH ₂ PO ₄	lg 菌量 (CFU·mL ⁻¹)
1	1(0.5)	1(0.8)	1(0.1)	1(2:1)	7.95
2	1(0.5)	2(0.9)	2(0.2)	2(1:1)	8.19
3	1(0.5)	3(1.0)	3(0.3)	3(1:2)	8.15
4	2(0.6)	1(0.8)	2(0.2)	3(1:2)	7.87
5	2(0.6)	2(0.9)	3(0.3)	1(2:1)	7.92
6	2(0.6)	3(1.0)	1(0.1)	2(1:1)	7.85
7	3(0.7)	1(0.8)	3(0.3)	2(1:1)	7.80
8	3(0.7)	2(0.9)	1(0.1)	3(1:2)	7.94
9	3(0.7)	3(1.0)	2(0.2)	1(2:1)	7.93
K ₁	24.29	23.62	23.74	23.8	T= 71.6
K ₂	23.64	24.05	23.99	23.84	
K ₃	23.67	23.93	23.87	23.96	
R	0.65	0.43	0.25	0.16	

3 讨 论

本文对耐高温的嗜热脂肪土芽孢杆菌CHB1发酵培养基进行了研究,得到了较佳的发酵培养基配方,菌量比在发酵基础培养基中提高10倍以上。在所优化的培养基成分中,牛肉膏和大豆蛋白胨对菌体的生长影响较为显著,而NaCl和磷酸盐对菌体生长影响不明显。从碳氮源的筛选试验结果看

出,CHB1对营养要求比较严格,在碳氮源种类及浓度的需求上明显不同于其类似菌嗜热脂肪芽孢杆菌^[9~10]。

从试验成本考虑,以牛肉膏和大豆蛋白胨作碳氮源,较适于种子发酵培养;如需大批量培养,还要进一步试验寻找能够较好的替代这两种组分的其他廉价碳氮源。此外,固体发酵采用的原料一般是廉价的农副产品,采用的设备也较液体发酵简单,生产成本大大低于液体发酵,且具有产酶水平较高、环境污染小等优点^[11~12],CHB1固体发酵培养有待进一步研究。

在培养基的筛选与优化试验中,笔者只考虑了不同的碳氮源及无机盐对CHB1生长的影响,并未试验温度、时间、溶氧量等培养条件对菌体生长的影响。因此在所优化的培养基中菌体生长量并非是其最大生长量。

参考文献:

- [1] 黄国锋,吴启堂,黄焕忠.有机固体废弃物好氧高温堆肥化处理技术[J].中国生态农业学报,2003,11(1):159~161.
- [2] 朱能武.堆肥微生物学研究现状与发展前景[J].氨基酸和生物资源,2005,27(4):36~40.
- [3] 赵京音,姚政.微生物制剂促进鸡粪堆肥腐熟和臭味控制的研究[J].上海农学院学报,1995,13(3):193~197.
- [4] 沈根祥,袁大伟.Hsp菌剂在牛粪堆肥中的试验应用[J].农业环境保护,1999,18(2):62~64.
- [5] 陈义光,刘祝祥,李铭刚,等.产环己酰亚胺新菌株YIM41004种子培养基优化研究初报[J].云南大学学报:自然科学版,2006,28(2):173~177.
- [6] 陈启和,何国庆.产弹性蛋白酶EL314CF100菌株种子培养基优化的研究初报[J].食品与发酵工业,2002,28(10):13~17.
- [7] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学试验[M].北京:高等教育出版社,1999:92~95.
- [8] 郑明东,刘炼杰,余亮,等.化工数据建模与试验优化设计[M].合肥:中国科学技术大学出版社,2001:98~117.
- [9] 刘军,陈向东,戴玄,等.嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶分解毛发角蛋白的研究[J].氨基酸和生物资源,2004,26(3):52~54.
- [10] 刘军,陈向东,彭珍荣.分离嗜热脂肪芽孢杆菌单个菌落的方法[J].微生物学通报,1998,25(5):302~303.
- [11] 张志焱,徐海燕,杨军方.枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化[J].饲料博览,2005(9):34~36.
- [12] 魏铁麒,奚新伟,毕建文,等.固体发酵法生产 α -淀粉酶的研究[J].生物技术,1997,7(6):27~29.

(责任编辑:翁志辉)