

饲用枯草芽孢杆菌 液体培养基的筛选与优化

葛 龙¹ 章亭洲² 赵 艳¹

1. 浙江科峰生物技术有限公司

2. 浙江工商大学环境科学与工程学院

摘 要 以 KFL070505 枯草芽孢杆菌为供试菌株,以活菌数为筛选的主要参考指标,进行 4 种液体培养基筛选,随后进行碳氮源利用试验及正交优化试验。结果表明:枯草芽孢杆菌 KFL070505 在 2 号培养基中活菌数最高,最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为蛋白胨,最佳培养基成分配方为 1.5 % 葡萄糖、1.5 % 蛋白胨、0.3 % K_2HPO_3 、30.8 mg/L $MnSO_4$ 0.1 %、0.7 % $CaCO_3$ 、0.05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01 % $FeCl_3$ 和 pH 7~7.2。

关键词 枯草芽孢杆菌 培养基 筛选 正交试验

中图分类号: S 816.3 文献标志码: B 文章编号: 1002 - 2813 (2011) 06 - 0022 - 03

枯草芽孢杆菌具有很好的抗逆性,代谢过程中可产生大量的蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶及其他有益因子,进入生物体内后能快速定殖,在肠道内形成良好的微生态环境,预防和治疗肠道疾病,并能减少氨气排放。枯草芽孢杆菌是我国农业部允许作为饲料添加剂的安全益生菌之一,现已在饲料领域得到广泛的应用。

无论是固态发酵还是液态发酵生产枯草芽孢杆菌制剂,液体培养都是生产工艺中必不可少的环节。提高液体培养的活菌数,对微生物制剂的生产具有重要意义。以自主筛选的枯草芽孢杆菌 KFL070505 为供试菌株,用常见的 4 种细菌培养基添加适当的无机盐作为基础培养基进行培养基筛选,然后在此基础上进行正交设计优化,得到活菌数最高的培养基,为枯草芽孢杆菌制剂的研制和生产提供科学依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

KFL070505 枯草芽孢杆菌,为浙江科峰生物技术有限公司筛选所得。

1.1.2 培养基

1 号培养基 (LB): 蛋白胨 1 %、酵母膏 0.5 %、 K_2HPO_3 0.3 %、30.8 mg/L $MnSO_4$ 0.1 %、 $CaCO_3$ 0.7 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 %、pH 7~7.2。

2 号培养基 (牛肉膏蛋白胨): 牛肉膏 0.5 %、蛋白胨 1 %、 K_2HPO_3 0.3 %、30.8 mg/L $MnSO_4$ 0.1 %、 $CaCO_3$ 0.7 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 %、pH 7~7.2。

3 号培养基 (土豆 + 葡萄糖培养基): 土豆 20 %、葡萄糖 2 %、 K_2HPO_3 0.3 %、30.8 mg/L $MnSO_4$ 0.1 %、 $CaCO_3$ 0.7 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 %、pH 7~7.2。

4 号培养基 (YPD): 蛋白胨 2 %、酵母膏 1 %、葡萄糖 2 %、 K_2HPO_3 0.3 %、30.8 mg/L $MnSO_4$ 0.1 %、 $CaCO_3$ 0.7 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 %、pH 7~7.2。

斜面培养基: 营养琼脂 35 g 溶于 1 000 mL 无菌水中,加热溶解,灭菌待用。

收稿日期: 2011-03-24

通讯作者: 章亭洲



种子培养基:蛋白胨 1 %、牛肉膏 0.3 %、NaCl 0.5 %、pH 7.2~7.4。

计数培养基 (PDA): 土豆 20 %、葡萄糖 2 %、NaCl 0.5 %、琼脂粉 2 %、自然 pH。

1.1.3 仪器与器皿

电子天平 (JA1003N, 上海精密科学仪器有限公司)、电热式压力蒸气灭菌器 (XFLS-40MB, 浙江新丰医疗器械有限公司)、磁力加热搅拌器 (79-1, 江苏金坛宏凯仪器厂)、生化培养箱 (SPX-250B-Z, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、台式冷冻恒温振荡器 (THZ-C-1, 太仓市实验设备厂)、pH 计 (PHS-3C, 上海雷磁)、光学显微镜 (YS100, 日本尼康)、旋涡混匀器 (WH-861, 太仓市科教器材厂)、移液枪、培养皿、锥形瓶、量筒和试管等。

1.2 试验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌的活化和培养

将斜面保存的枯草芽孢菌株转入新斜面, 活化 24 h, 接入 100 mL 种子培养基中, 37 °C, 160 r/min, 培养 16 h。

1.2.2 枯草芽孢杆菌在 4 种基础培养基中的生长情况测定

将培养 16 h 的种子液, 按 5 % 的接种量接入 4 种基础培养基中, 37 °C, 160 r/min 培养, 10 h 后开始测定活菌数, 每 4 h 计数 1 次, 计数至活菌数不再升高为止。计数采用平板计数法, 稀释倍数取 0.1 亿、1 亿和 10 亿 3 个梯度, 每梯度 3 个平行, 取菌落数在 30~150 个的平板读数, 计算同一梯度 3 个平板菌落数的算术平均值。

1.2.3 培养基碳源的筛选

以 4 个基础培养基中活菌数最高的培养基为母板, 分别用等量的蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、牛肉膏和乳糖进行对比试验, 培养基其他成分不变。在上述培养基中接入 5 % 的种子液, 37 °C, 160 r/min 培养, 分别在 20、26 和 32 h 3 个时间点进行活菌数测定, 选出最佳碳源。

1.2.4 培养基氮源的筛选

选定碳源后, 将培养基中的氮源分别用等量的大豆粉、鱼粉、蛋白胨、土豆汁和酵母粉做对比试验, 培养基其他成分不变, 试验操作同 1.2.3, 分别在 20、26 和 32 h 3 个时间点进行活菌数测定, 选出最佳氮源。

1.2.5 正交设计优化培养基主要成分

对培养基中的碳源、氮源、 MnSO_4 和 CaCO_3 4 种主要成分进行 $L_9(3^4)$ 正交设计试验。培养 30 h 后, 测定其活菌数, 并用芽孢染色法测定其芽孢率, 分析 4 种成分对枯草芽孢杆菌的影响度及最佳剂量组合。

1.2.6 验证试验

将 1.2.5 中得到的最佳培养基与试验中活菌数最高的培养基进行活菌数及芽孢率的比较, 验证正交设计的结果是否准确。

2 结果与分析

2.1 KFL070505 在 4 种不同培养基中生长情况比较

从图 1 可见: KFL070505 菌株在 4 种培养基中均能正常生长, 其中在 2 号培养基中生长速度最快, 活菌数最高, 在 1 号和 3 号培养基中活菌数较低。因此, 2 号培养基是 KFL070505 较为理想的培养基。

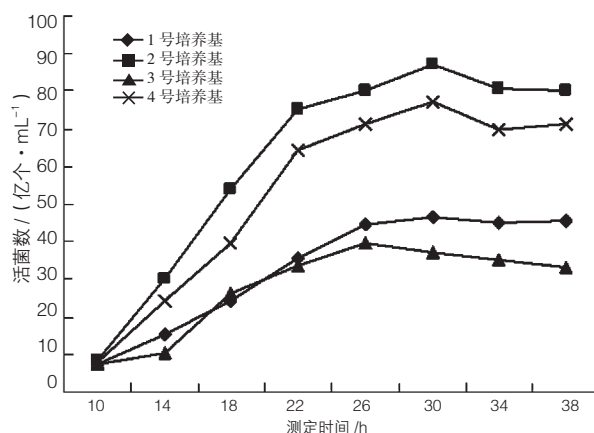


图 1 KFL070505 菌株在不同培养基中的活菌数变化

2.2 KFL070505 对不同碳源的利用情况比较

从图 2 可见: 该菌株对葡萄糖和牛肉膏利用效果最好, 蔗糖和麦芽糖次之, 对乳糖的利用效果最差, 考虑到成本及生产实际情况, 确定葡萄糖为其

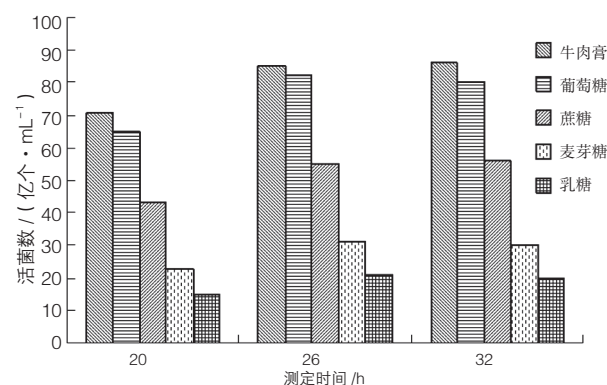


图 2 KFL070505 菌株对不同碳源的利用情况

最佳碳源。

2.3 KFL070505 对不同氮源的利用情况比较

从图 3 可见：KFL070505 在以蛋白胨或大豆粉为氮源的培养基中活菌数较高，其次为酵母粉和鱼粉，在土豆汁中的活菌数较低，可见菌数最适氮源为蛋白胨。

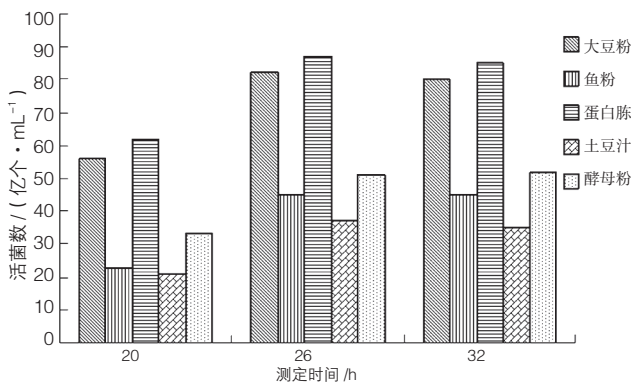


图 3 KFL070505 菌株对不同氮源的利用情况

2.4 正交设计试验

从表 1 可见：KFL070505 菌株在 7 号培养基中活菌数最高，在 3 号培养基中活菌数最低。通过极差分析，4 种成分对活菌数高低的影响顺序为，蛋白胨 > CaCO_3 > MnSO_4 > 葡萄糖。最优组合为 A2B1C1D2，即葡萄糖 1.5%，蛋白胨 1.5%，30.8 mg/L MnSO_4 0.1%， CaCO_3 0.7%。

表 1 KFL070505 菌株培养基优化正交设计及试验结果

项目	A 葡萄糖 /%	B 蛋白胨 /%	C 30.8 mg/L MnSO_4 /%	D CaCO_3 /%	活菌数 / (亿个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)	芽孢率 / %
1	1 (1.0)	1 (1.5)	1 (0.1)	1 (0.5)	103.3	> 85
2	1 (1.0)	2 (2.0)	2 (0.2)	2 (0.7)	87.7	> 85
3	1 (1.0)	3 (2.5)	3 (0.3)	3 (0.9)	70.3	> 85
4	2 (1.5)	1 (1.5)	2 (0.2)	3 (0.9)	97.0	> 85
5	2 (1.5)	2 (2.0)	1 (0.1)	1 (0.5)	83.7	> 75
6	2 (1.5)	3 (2.5)	3 (0.3)	3 (0.7)	85.7	> 85
7	3 (2.0)	1 (1.5)	3 (0.3)	2 (0.7)	112.7	> 85
8	3 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.1)	3 (0.9)	75.3	> 85
9	3 (2.0)	3 (2.5)	2 (0.2)	1 (0.5)	77.0	> 75
K1	87.1	104.3	87.4	88.0		
K2	88.8	82.2	87.2	95.4		
K3	88.3	77.7	89.6	80.9		
R	1.7	26.6	2.4	14.5		
最优水平				A2B1C1D2		
因素主次顺序				B > D > C > A		

2.5 验证试验

以 A2B1C1D2 为培养基配方，培养基其他成分不变，与正交设计中活菌数最高的 7 号培养基做对比试验。在 37℃，160 r/min 培养，分别于 20、26

和 32 h 测定其活菌数。从图 4 可见：该菌株在新培养基中 20、26 和 32 h 的活菌数均高于 7 号培养基，活菌数超过 120 亿个 /mL，因此正交设计符合试验要求。

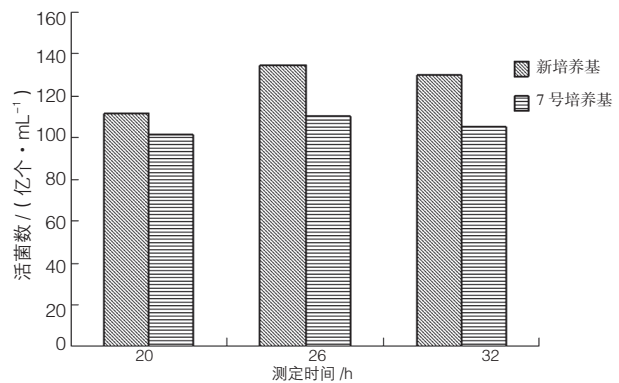


图 4 2 种不同培养基活菌数的比较

3 讨论

枯草芽孢杆菌在饲料、肥料、医药及工业领域都得到了广泛的应用。菌剂中的活菌数是衡量产品质量好坏的关键指标。研究通过对液体培养基的筛选与优化，得到了枯草芽孢杆菌 KFL070505 菌株的最佳培养基，其成分为葡萄糖 1.5%，蛋白胨 1.5%， K_2HPO_3 0.3%，30.8 mg/L MnSO_4 0.1%， CaCO_3 0.7%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%， FeCl_3 0.01%，pH 7~7.2，其活菌数超过 120 亿个 /mL，培养基成分中对活菌数高低的影响顺序为蛋白胨 > CaCO_3 > MnSO_4 > 葡萄糖。其中 CaCO_3 对该菌株活菌数有较大的影响，特别是对其芽孢率的影响较大，这与张丽霞等的研究结果基本相似。

参考文献

- [1] 周小辉, 李彪. 枯草芽孢杆菌的机制及应用研究. 饲料研究, 2009(10):26-28.
- [2] 李佳. 枯草杆菌特征和应用现状. 肉类研究, 2009(11):18-21.
- [3] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用. 东北农业大学学报, 2009, 40(9):111-114.
- [4] 刘吉华, 郭海龙, 吴俊罡, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化. 饲料研究, 2003(12):28-30.

通信地址：浙江杭州经济技术开发区六号大街
314423