

## 侧孢芽孢杆菌 HBL-26 发酵条件的优化研究

赵云彤

(黑龙江省农业科学院 牡丹江分院,黑龙江 牡丹江 157041)

**摘要:**为对拮抗菌株 HBL-26 的发酵培养基进行优化,通过正交试验设计对发酵液的 4 个单因子进行优化筛选,经软件分析后确定发酵培养基最佳配方为:葡萄糖 6 g·L<sup>-1</sup>、牛肉膏 14 g·L<sup>-1</sup>、NaCl 6 g·L<sup>-1</sup>、MnSO<sub>4</sub> 0.05 g·L<sup>-1</sup>。同时,得到回归方程: $Y=5.34X_1-1.72X_2+14.44X_3-6.43X_4+8.35$ ,其标准差  $S=14.23$ ;  $F=4.202$ ;显著值  $\text{Sig.}=0.019<0.05$ 。最后通过单因子试验对菌株 HBL-B26 的发酵条件进行了优化,确定的最优培养条件为:培养基初始 pH 8、发酵温度 30℃、发酵最佳时间为 48 h。

**关键词:**侧孢芽孢杆菌;发酵条件;优化

**中图分类号:**TQ920.6

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)05-0112-05

侧孢芽孢杆菌是具有多种功能的微生物<sup>[1-3]</sup>。国内外许多文献相继报道侧孢芽孢杆菌具有杀虫、抗菌、抗肿瘤和降解污染物等多种生物功能<sup>[4-8]</sup>,在微生物农药研究方面前景十分广阔。研究表明其发酵上清液对多种植物病原真菌具有抑制作用,如小麦赤霉、烟草赤星病菌等,因此该试验对其发酵培养基与发酵条件进行优化,旨在提高抑菌物质浓度,达到更好的防治效果,同时为其抑菌物质的结构性质分析提供研究基础,为其无

公害农药的研究提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试菌株

供试菌株为侧孢芽孢杆菌 HBL-26 (*Brevibacillus laterosporus*);甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Snyder & Hansen)。

#### 1.2 主要培养基及试剂

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基 牛肉膏 3 g, NaCl 1.0 g, 蛋白胨 5 g, 水 1 000 mL, pH7。

1.2.2 PDA 培养基 200 g 已去皮的马铃薯切成块,煮沸 0.5 h,纱布过滤后滤液中加 20 g 蔗糖、20 g 琼脂融化后,加蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 自然。

收稿日期:2012-03-12

作者简介:赵云彤(1983-),女,黑龙江省双鸭山市人,硕士,研究实习员,从事微生物和植物保护研究。E-mail:zyt-37@163.com。

## Optimization of Cellulose Production by *Trichoderma reesei*

WANG Guan<sup>1</sup>, WANG Ming-yu<sup>2</sup>, MU Zi-ming<sup>2</sup>, HOU Shao-li<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>, FU Xiao-ping<sup>1</sup>, FANG Xu<sup>2</sup>

(1. Veterinary Medicine College of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070;

2. Life Science College of Shandong University, Jinan, Shandong 250100)

**Abstract:** Reducing cellulose production cost through improving cellulose titers during the fermentation is a key strategy for developing economically competitive bioethanol production from lignocellulosic biomass. Medium composition and inoculate time, temperature, initial pH and other factors were key factors to cellulose production. For the purpose to fully used *Trichoderma reesei* to produce cellulose, the influence of medium composition and growth condition of the cellulose-producing strain *Trichoderma reesei* FST-1 on its enzyme production was investigated. The result showed that the contents of wheat bran, peptone and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> had the significant effect on cellulose titer, the No. 4 medium was the best medium. Through the study on different enzyme production condition, it found that the optimum inoculation time was 24 hours, the optimum temperature was 32℃ and the optimum initial pH was 5.5. Cellulose titer and soluble protein content were increased 3 times with optimized culture condition.

**Key words:** *Trichoderma reesei*; cellulose; pH; temperature; optimization

1.2.3 种子液 牛肉膏 3 g,NaCl 1.0 g,蛋白胨 5 g,水 1 000 mL,pH7.0。

1.3 方法

1.3.1 发酵培养基的正交试验设计 在原有发酵液的基础上,进行培养基的优化。以发酵液抑菌效价值作为测定方法,确定 4 个影响因子最佳配比。4 个因子分别为:A 葡萄糖、B 牛肉膏、C  $\text{MnSO}_4$  和 D NaCl。试验因子数为 4,因子水平数为 3。通过 SPSS 软件生成正交试验设计,并将试验结果进行方差分析<sup>[9-11]</sup>。

1.3.2 不同温度对菌株拮抗作用的影响 将活化好的菌种分别置于 28、30、32、34、36℃ 温度下,180 r·min<sup>-1</sup> 摇床振荡培养 2 d,分别测定菌株发酵液的效价值大小,确定最佳温度。

1.3.3 发酵培养基的起始 pH 对菌株拮抗作用的影响 配制不同起始 pH 的发酵培养基,pH 大小分别为 5、6、7、8、9,在最适温度下,将活化好的菌种于 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 2 d,测定菌株发酵液效价值的大小。

1.3.4 不同发酵时间对菌株拮抗作用的影响 分别取摇床振荡培养 24、48、72、96、120 和 148 h 的发酵液,180 r·min<sup>-1</sup> 摇床振荡培养,确定其最佳培养时间。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的优化

以发酵液抑菌效果作为测定方法,来确定 4 个影响因子最佳配比。4 个因子的试验水平见表 1。

表 1 正交试验的水平及结果分析

Table 1 Analysis on the level and results of the orthogonal experiment

试验号 Test number	各试验因子正交水平 Factors and levels				效价值 Y1	效价值 Y2	效价值 Y3
	葡萄糖/g·L <sup>-1</sup>	牛肉膏/g·L <sup>-1</sup>	氯化钠/g·L <sup>-1</sup>	硫酸锰/g·L <sup>-1</sup>	/AU·mL <sup>-1</sup>	/AU·mL <sup>-1</sup>	/AU·mL <sup>-1</sup>
	Glucose	Beef extract	NaCl	MnSO <sub>4</sub>	Titer Y1	Titer Y2	Titer Y3
1	3(9)	2(14)	1(3)	3(0.20)	30.20	27.10	30.90
2	3(9)	3(16)	2(4)	1(0.05)	27.54	24.21	24.95
3	2(6)	1(12)	2(4)	3(0.20)	22.39	20.14	20.75
4	2(6)	3(16)	1(3)	2(0.10)	19.32	21.28	20.14
5	2(6)	2(14)	3(6)	1(0.05)	81.28	79.82	83.18
6	1(4)	3(16)	3(6)	3(0.20)	31.33	29.24	29.85
7	1(4)	1(12)	1(3)	1(0.05)	18.07	18.25	16.91
8	3(9)	1(12)	3(6)	2(0.10)	50.40	45.78	45.08
9	1(4)	2(14)	2(4)	2(0.10)	17.99	20.18	21.04

2.1.1 正交试验结果的直观分析 表 2 给出了 4 个试验因子的 3 个水平均值,标准差与置信区间,可以看出在葡萄糖的 3 个试验水平中, $A_2 > A_3 > A_1$ 。在牛肉膏的 3 个试验水平中, $B_2 > B_1 > B_3$ 。在氯化钠的 3 个试验水平中, $C_3 > C_1 > C_2$ 。在硫酸锰的 3 个试验水平中, $D_1 > D_2 > D_3$ 。根据各因子的直观分析,可知该试验的最佳组合为  $A_2B_2C_3D_1$ 。

2.1.2 正交试验结果的方差分析 表 3 对试验中的 4 个因素作出了方差分析,同时结合直观分析法,可以确定该发酵培养基的最佳组合为

$A_2B_2C_3D_1$ 。即葡萄糖用量为 6 g·L<sup>-1</sup>,牛肉膏为 14 g·L<sup>-1</sup>,氯化钠为 6 g·L<sup>-1</sup>,硫酸锰为 0.05 g·L<sup>-1</sup>。4 个因子显著值均为 Sig. = 0.000 < 0.01,证明该试验的 4 个因子都具有极显著性差异。

同时得到回归方程: $Y = 5.34X_1 - 1.72X_2 + 14.44X_3 - 6.43X_4 + 8.35$ ,其中 Y 为菌株效价值; $X_1$  为葡萄糖含量(%); $X_2$  为牛肉膏含量(%); $X_3$  为氯化钠含量(%); $X_4$  为硫酸锰含量(%),其标准差 S = 14.23;F = 4.202;显著值 Sig. = 0.019 < 0.05,说明该方程能够反应抑菌物质的效价值与培养基中各组分的关系,具有统计学意义。

表 2 单因素统计分析  
Table 2 The statistical table of single factor

试验因子 Factors	水平 Levels	平均数 Mean	标准误差 Std. error	95%置信区间 95% Confidence interval	
				下界	上界
				Lower bound	Upper bound
葡萄糖 Glucose	1	22.903	0.567	21.740	24.065
	2	40.773	0.567	39.611	41.936
	3	33.711	0.567	32.548	34.874
牛肉膏 Beef extract	1	28.773	0.567	27.610	29.935
	2	43.266	0.567	42.103	44.429
	3	25.348	0.567	24.186	26.511
氯化钠 NaCl	1	22.703	0.567	21.541	23.866
	2	22.074	0.567	20.911	23.237
	3	52.609	0.567	51.446	53.772
硫酸锰 MnSO <sub>4</sub>	1	41.303	0.567	40.141	42.466
	2	28.422	0.567	27.259	29.584
	3	27.662	0.567	26.499	28.824

表 3 正交试验方差分析  
Table 3 Analysis of variance of orthogonal test

来源 Source	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
校正模型 Corrected Model	12834.540 <sup>a</sup>	8	1604.318	416.257	0.000
截距 Intercept	37936.651	1	37936.651	9.843E <sup>3</sup>	0.000
葡萄糖 Glucose	1944.263	2	972.131	252.230	0.000
牛肉膏 Beef extract	2171.274	2	1085.637	281.680	0.000
氯化钠 NaCl	7308.564	2	3654.282	948.142	0.000
硫酸锰 MnSO <sub>4</sub>	1410.440	2	705.220	182.977	0.000
误差 Error	104.062	27	3.854		
总和 Total	50875.254	36			
校正总和 Corrected Total	12938.602	35			

2.2 发酵条件的优化

HBL-26 都能够产生抗菌物质;pH 为 8 时,抑菌

2.2.1 发酵培养基的起始 pH 对菌株拮抗作用的影响 由表 4 可知,pH 为 6、7、8、9 时,菌株

效果最好,其效价值为(75.86±5.63) AU·mL<sup>-1</sup>。

表 4 初始 pH 对菌株拮抗作用的影响

Table 4 Effect of initial pH on antagonism of bacterial strain

pH	5	6	7	8	9	10
效价值/AU·mL <sup>-1</sup> Titer	0	15.57±0.72	69.52±4.84	75.86±5.63	15.14±0.57	0

SSR 多重比较结果说明(见表 5):pH 为 8 时发酵液效价值极显著高于 pH 为 6、7、9 的处理。pH 为 6、9 的处理间差异不显著。

2.2.2 不同温度对菌株拮抗作用的影响 由表 6 可知,在试验的 5 个温度中,30℃时发酵上清液的抑菌效果最好,效价值达  $71.45 \pm 5.05 \text{ AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 28℃次之。同时,从表 6 中可以看出,在 30~36℃,抑菌效果随温度的升高而减小。

表 6 不同发酵温度对菌株拮抗作用的影响

Table 6 Effect of fermentation temperature on antagonism of bacterial strain

温度/℃ Temperature	28	30	32	34	36
效价值/ $\text{AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ Titer	$30.20 \pm 1.28$	$71.45 \pm 5.05$	$28.12 \pm 1.06$	$17.87 \pm 0.87$	$15.15 \pm 0.65$

SSR 多重比较结果(见表 7)表明,培养温度 32、34 与 36℃时的效价值。在 34、36℃条件下差为 30℃时的发酵上清液的效价值极显著高于 28、异不显著。28、32℃条件下相比较,差异不显著。

表 7 SSR 法检测组间差异

Table 7 Group difference tested by SSR method

温度/℃ Temperature	$\bar{X}_i$	$\bar{X}_i - 15.15$	$\bar{X}_i - 17.87$	$\bar{X}_i - 28.12$	$\bar{X}_i - 30.20$
30	71.45	$56.30^{**}$	$53.58^{**}$	$43.33^{**}$	$41.25^{**}$
28	30.20	$15.05^{**}$	$12.33^{**}$	2.08	
32	28.12	$12.97^{**}$	$10.25^{**}$		
34	17.87	2.72			
36	15.15				

2.2.3 不同发酵时间对菌株拮抗作用的影响 随着发酵时间的增加,抗菌物质的效价值先增加后逐渐减少,即在 0~48 h 内,抑菌物质迅速累积,并在发酵 48 h 时达到最高值,此时发酵上

清液的效价值达  $(72.95 \pm 5.21) \text{ AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在 48~120 h,抑菌物质产量有所下降,而在发酵 148 h 后,发酵上清液没有抑菌效果(见表 8)。

SSR 多重比较结果表明(见表 9),48 h 的发

表 8 不同发酵时间对菌株拮抗作用的影响

Table 8 Effect of fermentation time on antagonism of bacterial strain

时间/h Time	24	48	72	96	120	148
效价值/ $\text{AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ Titer	$39.81 \pm 2.21$	$72.95 \pm 5.21$	$38.84 \pm 1.37$	$18.49 \pm 0.86$	$13.49 \pm 0.46$	0

表 9 SSR 法检测组间差异

Table 9 Group difference tested by SSR method

时间/h Time	$\bar{X}_i$	$\bar{X}_i - 13.49$	$\bar{X}_i - 18.49$	$\bar{X}_i - 38.84$	$\bar{X}_i - 39.81$
48	72.95	$59.46^{**}$	$54.46^{**}$	$34.11^{**}$	$33.14^{**}$
24	39.81	$26.32^{**}$	$21.32^{**}$	0.97	
72	38.84	$25.35^{**}$	$20.35^{**}$		
96	18.49	$5.00^{**}$			
120	13.49				

酵上清液效价值极显著高于发酵 24、72、96、120 h 的效价值。发酵 24 h 和发酵 72 h 的效价值相比,差异不显著,但二者均极显著高于发酵 96 h 和 120 h 的效价值;发酵 96 h 和发酵 120 h 之间差异极显著。

### 3 结论

该研究对高产突变株 HBL-26 的发酵培养基进行了优化,通过正交试验对培养基的 4 个单因子进行优化筛选,经方差分析确定发酵培养基最佳配比为:葡萄糖( $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、牛肉膏( $14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、NaCl( $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $\text{MnSO}_4$ ( $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。最后通过单因子试验对菌株 HBL-26 产抗菌物质的条件进行了优化,确定的最优培养条件为:培养基初始 pH8、发酵温度  $30^\circ\text{C}$ 、发酵最佳时间为 48 h。

### 参考文献:

- [1] Takeuchi T. Spargualin a novel antitumor antibiotic produced by *Bacillus laterosporus*[J]. Gan To Kagaku Ryo-ho, 1984, 11: 2633-2639.
- [2] Viviane Zahner, Leon Rabinovitch, Philip Suffys, et al. Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains[J]. Appl Environ Microbiol. 1999, 65 ( 11 ): 5182-5185.
- [3] Zhao Qiumin, Chen Yuehua, Cai Jun, et al. The strain *Brevibacillus laterosporus* producing chitinase that can inhibit fungi[J]. Chinese Journal of biological control, 2006, 22: 42-46.
- [4] Li Dingjun, Chen Wu, Luo Kuan. The research of antibacterial material property excreted by *Brevibacillus laterosporus* 2-Q-9[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2007, 33(4): 471-475.
- [5] Ren Zhaozhen, Zheng Yuan, Sun Mi. The isolation and characteristics study of antibacterial substances produced by ocean *Brevibacillus laterosporus* Lh-1[J]. Journal of Microbiology, 2007, 47(6): 997-1001.
- [6] Li Weijie, Jiang Ruibo. The extraction and characteristics analysis of antagonistic substance the spore *Brevibacillus laterosporus* X10 [J]. Journal of Biology, 2006, 23 ( 5 ): 16-20.
- [7] Gong Zhanyuan, Wang Yanjie, Li Yongpeng. The research on ability of organic phosphorus degradation of *Brevibacillus laterosporus*[J]. Farming Cultivate University Journal, 2008, 18(1): 2-14.
- [8] Xu Xianghong. Improving the selection method of repeated orthogonal test in the agricultural science research[J]. Prat Agricultural Science, 2011, 28(4): 679-682.
- [9] Yao Yujiang, Yao Yan. Analysis of the factors influencing sweatstalks smashing property[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2010, 5(5): 6-7.
- [10] Qi Junshan, Xin Zhimei. Data analysis of pesticide experiments using SPSS[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2008(7): 100-104.

## Optimization of Fermentation Condition of *Bacillus laterosporus* HBL-26

ZHAO Yun-tong

(Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

**Abstract:** In order to optimize the fermentation culture medium of HBL-26, four single factors were selected by the orthogonal design. The optimum medium was glucose  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , beef extract  $14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCl  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $\text{MnSO}_4$   $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The regression model was obtained  $Y = 5.34X_1 - 1.72X_2 + 14.44X_3 - 6.43X_4 + 8.35$ ,  $S = 14.23$ ;  $F = 4.202$ ;  $\text{Sig} = 0.019 < 0.05$ . Four factors were tested to increase the antibiotics yield by single-factor test method. The result showed that the optimum process parameters were initial pH was 8.0, culture temperature was  $30^\circ\text{C}$  and the best fermentation time was 48 h.

**Key words:** *Bacillus laterosporus*; fermentation condition; optimization