

陈宇峰,严花,李可,等.产酸短小芽孢杆菌生长与产酸条件响应面优化[J].黑龙江农业科学,2020(5):91-95.

产酸短小芽孢杆菌生长与产酸条件响应面优化

陈宇峰¹,严花²,李可²,孙冬梅¹

(1.黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319;2.林口县农技推广中心,黑龙江 林口 157600)

摘要:芽孢杆菌是一种重要的微生物资源,被广泛应用于农业生产中。黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物研究室分离获得了一株具有产酸能力的短小芽孢杆菌,为明确该菌株最优化生长与产酸条件,通过改变碳、氮源及乙醇浓度与培养温度等,利用响应面分析优化菌株生长及产酸发酵条件。结果表明:该菌株最适菌株生长及产酸的碳源和氮源分别为蔗糖和酵母膏,最适乙醇浓度为3%,最适培养温度为30℃。此条件下的OD₆₀₀为2.190,pH为2.93。

关键词:短小芽孢杆菌;响应面;生长;产酸

产酸菌是能够将糖类分解并且产生有机酸的微生物,这种产酸方式不需要将分子氧作为最终氧受体^[1]。

目前,关于产酸菌的研究受到国内外的关注。在国外,除乳酸菌的研究外,还对其他类型产酸菌也进行一定研究。Hanreich等^[2]和Krause等^[3]研究发现在沼气系统中能够形成大量的产酸菌,特别是芽孢杆菌。有许多研究^[4-6]表明能够通过芽孢杆菌种进行乳酸生产和利用。同时,葡萄球菌、假单胞菌、和大肠杆菌等也具有产酸的能力^[7]。但在国内,产酸菌的研究主要集中在食品发酵过程,比如对泡菜^[8]、白酒^[9]、醋^[10]、酸奶^[11]等食品的研究。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是农业生产中的重要微生物资源,被广泛应用于植物根围促生中,芽孢杆菌存在于空气、土壤、水源等自然环境中,在植物的根围土壤、根部组织等处可以很容易地分离得到芽孢杆菌,芽孢杆菌也可以在温泉和盐碱土等极端环境中存活并且被分离得到^[12-14]。芽孢杆菌是一种具有嗜热、好氧等特性的革兰氏阳性细菌,由于芽孢杆菌能产生耐热耐辐射的抗逆芽孢、醇类物质和多种抗生素,是目前研究和应用较多的一类生防细菌。芽孢杆菌具有促进植物生长;诱导植物抗病性;产生的芽孢能够耐盐、耐

热、抗紫外等特点^[15]。

在微生物试验中较为常见的产酸微生物的种类有醋酸菌和乳酸菌等。在工业生产中通常应用醋酸菌以酿造食醋及果醋饮料等^[16],乳酸菌被大量应用在饮料、乳制品、肉制品加工、果蔬谷物发酵和酿造调味品中^[17],而产酸芽孢杆菌目前研究较少。本试验室前期获得一株产酸芽孢杆菌,进一步确定其最优生长与产酸条件,为产酸微生物提供新的资源。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:BY-2037菌株由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物研究室提供;

培养基:蛋白胨 10 g·L⁻¹,牛肉膏 15 g·L⁻¹,NaCl 15 g·L⁻¹,琼脂 18 g·L⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 在液体培养基中接种产酸菌的单菌落,置于30℃、110 r·min⁻¹摇床中培养24 h,作为母液待用。

1.2.2 响应面设计 经单因素预试验,选择培养温度、碳源、氮源及乙醇浓度进行该菌株生长与产酸能力的响应面优化。培养温度(A)分别为:25,30和35℃;培养基中的乙醇浓度(B)分别为:2%、3%、4%;不同碳源(C)分别为:白糖、葡萄糖、蔗糖;不同氮源(D)分别为:牛肉膏、酵母膏、蛋白胨(表1)。培养基中接种量均为1.5%,置于30℃、110 r·min⁻¹摇床中培养,记录每6 h培养液在600 nm处吸光值和pH变化情况,每处理3次重复。

收稿日期:2020-01-12

基金项目:黑龙江省农垦总局项目(HKKY190403);大庆市指导项目(zd-2017-63)。

第一作者:陈宇峰(1997-),男,在读硕士,从事微生物学研究。E-mail:1152581073@qq.com。

通信作者:孙冬梅(1970-),女,博士,教授,从事应用微生物研究。E-mail:sdmlzw@126.com。

表 1 四因素三水平试验设计方案

Table 1 Design plan of four-factor and three-level test

序号 No.	A 温度 Temperature/°C	B 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	C 碳源 Carbon source	D 氮源 Nitrogen source
1	25	3	葡萄糖	酵母膏
2	25	4	蔗糖	酵母膏
3	35	2	蔗糖	酵母膏
4	30	4	蔗糖	蛋白胨
5	35	4	蔗糖	酵母膏
6	35	3	葡萄糖	酵母膏
7	25	3	蔗糖	牛肉膏
8	30	3	蔗糖	酵母膏
9	30	3	葡萄糖	牛肉膏
10	30	3	蔗糖	酵母膏
11	30	2	蔗糖	蛋白胨
12	30	2	白糖	酵母膏
13	25	3	白糖	酵母膏
14	30	4	白糖	酵母膏
15	30	3	蔗糖	酵母膏
16	35	3	蔗糖	牛肉膏
17	30	3	白糖	牛肉膏
18	35	3	白糖	酵母膏
19	25	2	蔗糖	酵母膏
20	35	3	蔗糖	蛋白胨
21	25	3	蔗糖	蛋白胨
22	30	2	蔗糖	牛肉膏
23	30	3	葡萄糖	蛋白胨
24	30	2	葡萄糖	酵母膏
25	30	4	蔗糖	牛肉膏
26	30	3	蔗糖	酵母膏
27	30	3	蔗糖	酵母膏
28	30	3	白糖	蛋白胨
29	30	4	葡萄糖	酵母膏

1.2.3 数据分析 采用 Design expert 软件对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 不同条件对菌株生长的影响

选取不同培养温度(A)、培养基中的乙醇浓度(B)、不同碳源(C)和氮源(D)作为影响因素,发酵液在培养 30 h 后的 OD₆₀₀ 作为响应值。得出菌株 BY-2073 在以蔗糖为碳源、酵母膏为氮源乙醇

浓度为 3% 的培养基中,置于 30 °C 条件下培养时,其生长量最大,发酵液 OD₆₀₀ 为 2.190。

不同因素对发酵液 OD₆₀₀ 的交互作用的响应面图形中,曲面开口向下,具有极大值。同时培养温度和乙醇浓度、培养温度和不同碳源、培养温度和不同氮源、乙醇浓度和不同碳源、乙醇浓度和不同氮源的交互作用的等高线呈椭圆形,表示其交互作用显著;不同碳源和不同氮源的交互作用的等高线呈圆形,表示其交互作用不显著(图 1)。

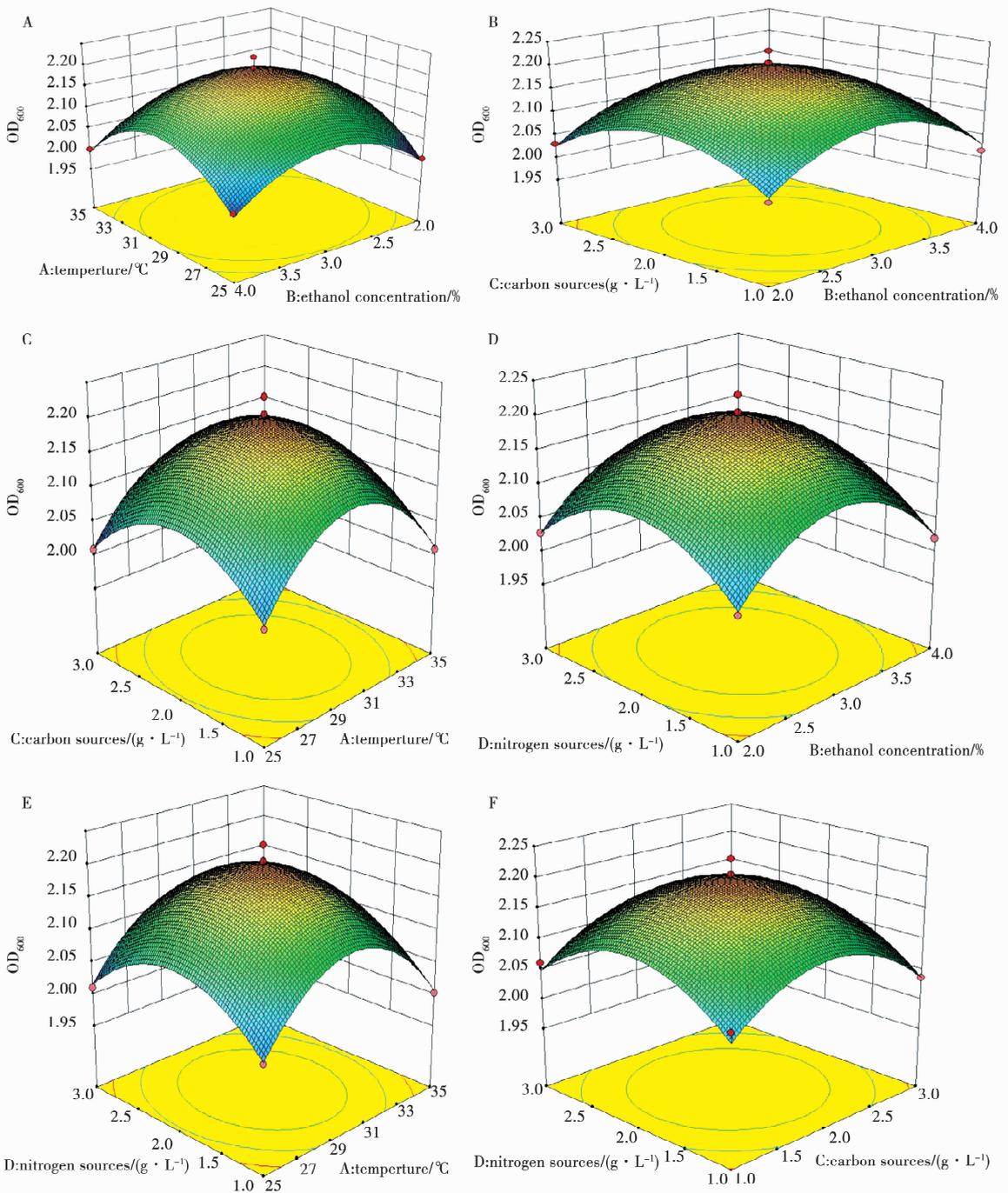


图1 培养温度、乙醇浓度、不同碳源和氮源对发酵液 OD₆₀₀ 的交互作用

Fig. 1 Interaction of culture temperature, ethanol concentration, different carbon and nitrogen sources on fermentation broth OD₆₀₀

2.2 不同条件对产酸的影响

选取不同培养温度(A)、培养基中的乙醇浓度(B)、不同碳源(C)和氮源(D)作为影响因素,发酵液在培养3 d后的pH作为响应值。得出菌株BY-2073在以蔗糖为碳源、酵母膏为氮源乙醇浓度为3%的培养基中,置于30℃条件下培养时,其产酸能力最强,发酵液pH为2.93。

利用Design expert软件做出不同因素对发酵液pH的交互作用的响应面图形,观察图形可知:曲面开口向上,具有极小值。同时培养温度、乙醇浓度、不同碳源和氮源4个因素对发酵液pH的交互作用等高线均呈椭圆形,表示四因素间的交互作用均显著(图2)。

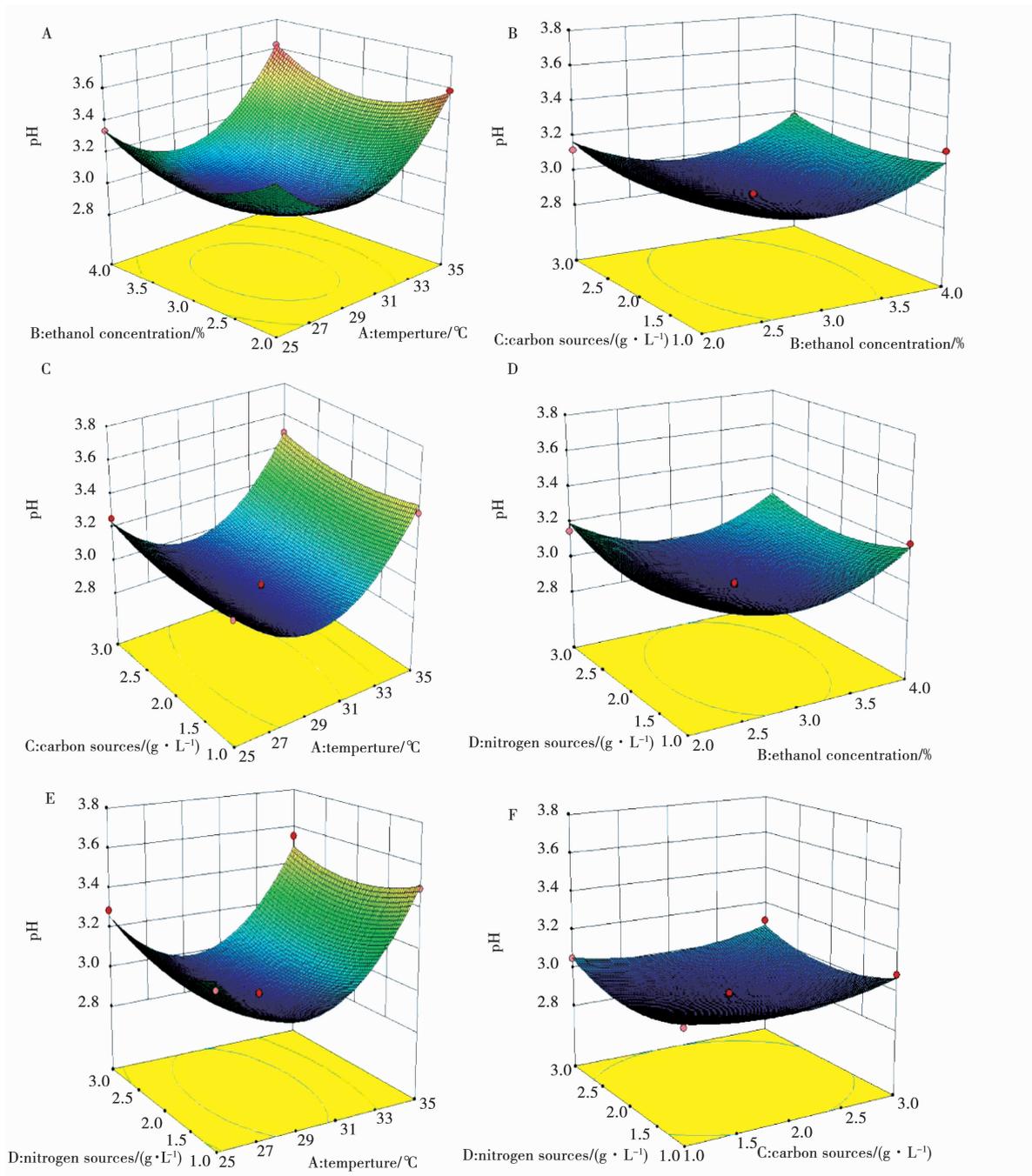


图2 培养温度、乙醇浓度、不同碳源和氮源对发酵液 pH 的交互作用

Fig. 2 Interaction of culture temperature, ethanol concentration, different carbon and nitrogen sources

3 结论与讨论

胡晓龙等^[18]采用单因素试验结合正交试验优化菌株产丁酸的发酵条件。结果表明,酪丁酸梭菌 RL1 的最优产丁酸发酵条件为:发酵培养基初始 pH=6.8,装液量 100%,培养温度 34℃,接种量 3%(体积分数),还原剂为硫代乙醇酸钠且其添加量为 0.5 g · L⁻¹;在该发酵条件下,酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量可达 10.66 g · L⁻¹,较优化

前提高了 41.76%。于文文等^[19]通过单因素试验和响应面优化,考察了发酵温度、pH、半乳糖质量浓度、发酵碳源及发酵氮源等对青蒿酸发酵产量的影响。结果表明:在发酵温度 30℃,发酵培养基初始 pH=5.5,发酵培养基中蔗糖质量浓度 91.8 g · L⁻¹,半乳糖质量浓度 10.1 g · L⁻¹,硫酸铵质量浓度 10.3 g · L⁻¹,磷酸二氢钾质量浓度 8.7 g · L⁻¹ 的条件下,青蒿酸发酵产量可

达(1 529.7±12.6) mg·L⁻¹,与未优化时的发酵产量相比提升了 67.1%。刘元等^[20]探讨了在不同的发酵温度、发酵时间、乳酸菌添加量和嗜热链球菌 S1 和保加利亚乳杆菌 L1 比例对米糠发酵液中 γ -氨基丁酸含量的影响。在单因素试验的基础上,选择四因素三水平进行正交试验优化工艺参数。结果表明:乳酸菌添加量 3%、发酵温度 48 ℃、嗜热链球菌 S1:保加利亚乳杆菌 L1=1:2、发酵时间 24 h,在此条件下 γ -氨基丁酸含量为 320.61 mg·100 g⁻¹。本研究经单因素预试验,也同样证实利用响应面的方法可以对菌株生长及产酸能力及性优化。优化后最适合菌株生长及产酸的碳源、氮源、乙醇浓度和培养温度分别为:蔗糖、酵母膏、3%和 30 ℃。该条件下生长和产酸能力分别为:该试验结果的获得为该菌株进一步应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张伟.低温沼气发酵产酸菌的分离鉴定及发酵特性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2004.
- [2] Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, et al. Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2013, 36(5): 330-338.
- [3] Krause L, Diaz N N, Edwards R A, et al. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(1-2): 91-101.
- [4] Michelson T, Kask K, Jögi E, et al. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis DSM 20073[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2006, 39(4): 861-867.
- [5] Payot T, Chemaly Z, Fick M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*—kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations[J]. Enzyme

- & Microbial Technology, 1999, 24(3-4): 191-199.
- [6] Sakai K, Yamanami T. Thermotolerant *Bacillus licheniformis* TY7 produces optically active L-lactic acid from kitchen refuse under open condition[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2006, 102(2): 132-134.
- [7] Smith S M, Eng R H, Buccini F. Use of D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections[J]. Journal of Infectious Diseases, 1986, 154(4): 658-664.
- [8] 杨晓晖.泡菜中低温发酵乳酸菌的分离鉴定及发酵工艺的研究[D].北京:中国农业大学,2005.
- [9] 李波,唐云容,毛晓红.浓香型白酒产酸细菌的分离筛选[J].酿酒科技,2011(9):51-53.
- [10] 弓晓艳,吕利华,武振宇,等.山西老陈醋产酸功能菌研究[J].食品工业科技,2010(2):170-173.
- [11] 徐杰,云月英,张文羿,等.酸马奶中干酪乳杆菌发酵特性的研究[J].中国乳品工业,2006,34(7):23-27.
- [12] Mills B, Fensterheim L, Taitel M, et al. Pharmacist-led tdap vaccination of close contacts of neonates in a women's hospital[J]. Vaccine, 2014, 32(4): 521-525.
- [13] Grujić M. 100th anniversary of the discovery of the tuberculosis *Bacillus*. The life and work of Robert Koch[J]. Plućne Bolesti I Tuberkuloza, 1982, 34(1-2): 5-7.
- [14] Schadowaldt H. History of the discovery of the tubercle Bacillus [J]. Die Medizinische Welt, 1982, 33(12): 419-426.
- [15] 王伟舵.防治水稻细菌性病害生防芽孢杆菌菌株筛选及芽孢杆菌处理后水稻蛋白质组学研究[D].南京:南京农业大学,2012.
- [16] 阳飞,覃凌云,张华山,等.醋酸菌分类及其应用研究进展[J].中国调味品,2015(10):112-115.
- [17] 崔艳华,徐德昌,曲晓军.乳酸菌基因组学研究进展[J].中国畜牧兽医,2012,6(4):85-89.
- [19] 沈娟,于中玉,仇建飞.乳酸菌在食品发酵中的应用[J].食品安全导刊,2017(33):125.
- [18] 胡晓龙,李聪聪,何培新,等.酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸发酵条件优化研究[J].轻工学报,2018,33(4):21-28.
- [19] 于文文,陈伟,滕云,等.酿酒酵母工程菌发酵产青蒿酸的工艺优化[J].精细化工,2019,36(5):856-864.
- [20] 刘元,王玥玮,张立娟.米糠发酵产 γ -氨基丁酸条件优化的研究[J].食品研究与开发,2019,40(18):150-153.

Response Surface Optimization for the Growth and Acid Production of *Bacillus pumilus*

CHEN Yu-feng¹, YAN Hua², LI Ke², SUN Dong-mei¹

(1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Linkou Agricultural Technology Extension Center, Linkou 157600, China)

Abstract: *Bacillus* is an important microbial resource which is widely used in agricultural production. An acid producing strain of *Bacillus pumilus* was obtained from the Laboratory of Microbiology, School of Life Science and Technology, Bayi Agricultural University, Heilongjiang Province. In order to determine the optimal growth and acid production conditions of the strain, response surface analysis was used by changing carbon, nitrogen source, ethanol concentration and culture temperature. The results showed that the most suitable carbon and nitrogen sources for the growth and acid production of the strain were sucrose and yeast extract, the most suitable ethanol concentration was 3%, and the most suitable culture temperature was 30 ℃. Under this condition, OD₆₀₀ was 2.190 and pH was 2.93.

Keywords: *Bacillus pumilus*; response surface; growth; acid producing