

地衣芽孢杆菌 TS-01 固态发酵培养基的优化*

谷春涛** 萨仁娜 佟建明

(中国农业科学院畜牧研究所 北京 100094)

摘要: 分离到一株饲用地衣芽孢杆菌 TS-01, 初步研究了该菌的固态发酵培养基, 得到的最优发酵培养基为 (g/kg 干固体物料) 含水量 600、红糖 7、米糠 420、麸皮 580。当采用此种配比的培养基, 接种量为 10% (v/w), 发酵 2 d 后, 菌体浓度可达 9.15×10^9 CFU/g 鲜曲, 芽孢浓度可达 7.50×10^9 CFU/g 鲜曲, 芽孢形成率在 80% 以上。

关键词: 地衣芽孢杆菌, 固态发酵

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0053-04

Optimization of Solid State Fermentation Medium of *Bacillus licheniformis* TS-01

GU Chun-Tao** SA Ren-Na TONG Jian-Ming

(Institute of Animal Science, China Academy of Agricultural Science, Beijing 100094)

Abstract: *Bacillus licheniformis* TS-01 was separated. The SSF medium for TS-01 strain was investigated. The result showed that the optimal fermentation medium contained (g/kg dry solid materials): water 600, brown sugar 7, rice bran 420, wheat bran 580. when the medium and inoculum size 10% (v/w) were adopted, as spore concentration of 7.50×10^9 CFU/g (wet qu) was obtained after two days' fermentation with a spore percentage of greater than 80% and a maximum live cell concentration of 9.15×10^9 CFU/g (wet qu).

Key words: *Bacillus licheniformis*, Solid state fermentation

饲用益生菌, 又称动物用微生态制剂, 近年来受到饲料科技工作者的广泛关注。伴随着各种新型的有效菌株不断被分离筛选以及对其作用机制的深入认识, 微生态制剂在畜牧行业具有广阔的应用前景。选取合适的生产方式, 实现低成本、高产率, 满足畜牧业生产发展的需要, 是一个亟待解决的课题。目前, 动物用微生态制剂的生产方式有两种: 液态发酵和固态发酵。液态发酵易实现纯种培养, 产品浓度高, 但能耗高, 环境污染严重; 固体发酵虽难以实现纯种培养, 但能耗低, 环境污染少, 也可得到较高的产率^[1]。因而采用固态发酵生产动物用微生态制剂具有较明显的优越性。我们分离到一株饲用地衣芽孢杆菌 TS-01 (属于批准菌种), 动物实验表明, 该菌在促进食欲、增加体重、防止腹泻等方面具有明显的效果。本文通过浅盘培养对其固态发酵培养基进行了初步研究, 旨在为其工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) TS-01 由中国农业科学院畜牧

* 国家“十五”科技攻关计划资助项目 (No. 2002BA514A-12)

** 联系人 Tel: 010-62819257, E-mail: chuntao_gu@sohu.com

收稿日期: 2003-09-01, 修回日期: 2003-11-22

研究所饲料生物技术实验室分离保存,并经中国科学院微生物研究所鉴定。

1.1.2 培养基: (1) 种子培养基: 牛肉膏 5 g, 大豆蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 定容至 1 L, pH7.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min。 (2) 发酵培养基: 组成见正交表^[2], 调配时, 先将红糖溶于蒸馏水中, 再与麸皮、米糠搅拌均匀。将配好的各种培养基装入棉布袋中, 0.1 MPa 灭菌 50 min。另分别以米糠或麸皮为主要原料, 设计如下两种培养基, 与上述正交试验同时进行: 10[#] 米糠 0.4 kg、红糖 5 g、含水 600 g/kg 基料; 11[#] 麸皮 0.4 kg、红糖 5 g、含水量 600 g/kg 基料; 每种培养基做 2 个重复。

1.1.3 仪器设备: HZQ-Q 振荡器为中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司产品, 生化培养箱 (LRH-250A) 为广东省医疗器械厂生产, 塑料浅盘。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备: 将地衣芽孢杆菌 TS-01 从保存的斜面转接于新鲜试管斜面, 于 37℃ 培养 18 h。取培养好的斜面, 用接种环挑 3 环接种于盛有 50 mL 无菌种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 然后置摇床上 40℃ 振荡培养 14 h, 转速为 240 r/min。

1.2.2 接种与培养: 采用液体种子接种, 接种量按培养基干重的 10% (v/w)。将种子液与培养基充分搅拌均匀。然后平铺在塑料浅盘 (事先用酒精棉球表面消毒) 中, 各盘中曲料厚度保持一致, 约 2 cm。置生化培养箱 (在无菌间内) 中 37℃ 培养 48 h, 每 12 h 翻料一次, 同时取样测定活菌数 (CFU/g 鲜曲)、芽孢浓度 (CFU/g 鲜曲)。

1.2.3 活菌计数方法: 采用倾注法^[3]。准确称取翻曲后的曲料 10 g, 放入盛有 90 mL 无菌生理盐水 (含数粒玻璃珠) 的 150 mL 三角瓶中, 置摇床中 180 r/min 振荡 20 min, 使其分散均匀。然后按 10 倍稀释法制成不同浓度稀释液, 从 3 种合适的稀释液中分别吸取 0.2 mL 置于无菌培养皿中, 每一稀释度做 3 个平皿。将事先融化并冷却至 50℃ 左右的营养琼脂, 向每个培养皿中倒入约 12 mL, 摇匀, 凝固后, 于 37℃ 倒置培养 48 h, 进行菌落计数。

1.2.4 芽孢测定方法^[4]: 吸取 0.5 mL 10⁻² 稀释液, 放入盛有 4.5 mL 无菌水的试管中, 混匀。置 80℃ 恒温水浴中处理 10 min, 然后用流水迅速冷却。后面的操作步骤与 1.2.3 相同。

1.2.5 芽孢形成率的计算: 形成率 = 芽孢浓度 (CFU/g 鲜曲) / 菌体浓度 (CFU/g 鲜曲)。

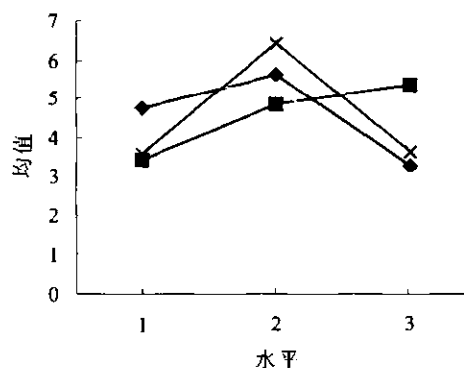


图 1 各因素在不同水平下的均值变化

◆ 因素 A, ■ 因素 B, ▲ 因素 C, —×— 因素 D

2 结果与分析

2.1 培养基最佳配比的确定

对实验结果进行直观分析如下: 按表 1 的正交实验因素, (1) 比较表 2 中各考察因素的极差 R, 由于 $RD > RC > RA > RB$, 所以各因素的主次顺序为 $D \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow B$, 即含水量是主要因素, 红糖次之, 米糠再次之, 麸皮是次要因素。 (2) 以各因素不同水平下的均值对各水平作图如图 1 所示: 从中可以看出, 对于因素 A 和 D, 其均值—水平的变化趋势相似, 都是先升高后下降; 因素 B 呈上升趋势, 而因素 C 呈下降趋

势。经比较后发现, A₂、B₃、C₁、D₂ 在每一因素的 3 个水平下对活菌数提高最大。(3) 由 (1)、(2) 可以确定地衣芽孢杆菌 TS-01 固态发酵培养基的最佳配比为 D₂C₁A₂B₃, 即含水量 600 g/kg 基料、红糖 5 g、米糠 0.5 kg、麸皮 0.7 kg。经换算后, 可如下计算: 每千克固体物料中含米糠 420 g、麸皮 580 g、红糖 7 g, 含水量为固体物料干重的 60%。

在 10[#]、11[#] 两种培养基最高菌数分别为: 1.50 × 10⁹ CFU/g 鲜曲、4.40 × 10⁹ CFU/g 鲜曲。可见, 米糠和麸皮单独使用时, 不如二者复合使用时效果好。

表 1 正交实验因素水平表

水平	A 米糠 (kg)	B 麸皮 (kg)	C 红糖 (g)	D 含水量 (mL/kg 基料)
1	0.3	0.2	5.0	500
2	0.5	0.5	10.0	600
3	0.8	0.7	20.0	700

表 2 正交实验

项目	A 米糠	B 麸皮	C 红糖	D 含水量	X _i 最高活菌数 (10 ⁹ CFU/g)
1	1	1	1	1	3.50
2	1	2	2	2	7.65
3	1	3	3	3	3.10
4	2	1	2	3	4.30
5	2	2	3	1	3.35
6	2	3	1	2	9.15
7	3	1	3	2	2.45
8	3	2	1	3	3.50
9	3	3	2	1	3.90
K ₁	14.25	10.25	16.15	10.75	
K ₂	16.80	14.50	15.85	19.25	
K ₃	9.85	16.15	8.90	10.90	
K ₁	4.75	3.42	5.38	3.58	
K ₂	5.60	4.83	5.28	6.42	
K ₃	3.28	5.38	2.97	3.63	
R	2.32	1.96	2.41	2.84	

2.2 最佳配比培养基上的发酵过程

最佳配比培养基上的菌体浓度变化见图 2, 芽孢浓度变化见图 3 (其它培养基上的芽孢浓度变化略)。图 3 表明: 第 36 h、第 48 h 的芽孢浓度分别约为第 24 h 的 2.5 倍和 3.8 倍。采用液体种子接种, 当接种量为 10% (v/w) 时, 培养 48 h 的菌体浓度为 9.15 × 10⁹ CFU/g 鲜曲, 芽孢浓度为 7.50 × 10⁹ CFU/g 鲜曲, 芽孢形成率在 80% 以上。

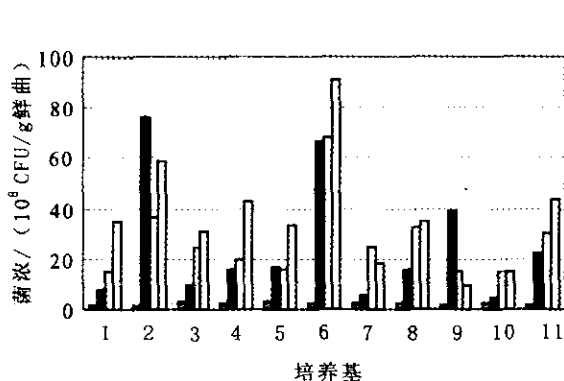


图2 各培养基上的菌浓度——时间变化图

■ 12h, ■ 24h, ■ 36h, ■ 48h

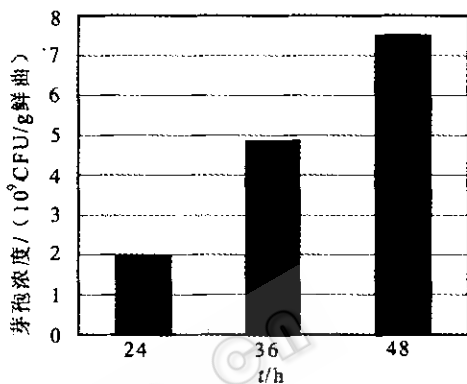


图3 最佳培养基组合上芽孢浓度随培养时间的变化

3 结语

影响固态发酵技术的关键是固态发酵反应器^[5]。目前,饲用微生态制剂生产企业大多在无菌间内采用固态浅盘培养或堆积发酵。这种生产方式不仅劳动强度大,而且风险性高,易染菌,难以实现纯种培养,导致产品质量和应用效果较差。随着对固态发酵技术研究的不断深入,许多可用于大规模纯种培养的固态发酵设备陆续被开发出来。将固态发酵的新技术、新设备用于饲用微生态制剂的生产,对于提升其生产现代化进程,稳定产品质量,提高应用效果,具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 沈萍主编. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000. 427.
- [2] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 628.
- [3] 钱柔存, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 198 ~ 196.
- [4] 无锡轻工业学院等合编. 微生物学. 北京: 轻工业出版社, 1980. 493.
- [5] 陈坚, 堵国成, 李寅, 等. 发酵工程实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2003. 34.