

苏云金芽孢杆菌培养基优化及间歇发酵

关 雄 陈锦权 黄志鹏 汤玉波 高日霞

(福建农业大学 福州 350002)

摘 要 对苏云金芽孢杆菌的培养基配方进行室内摇瓶优化筛选,首先用摇瓶培养筛选到 II 号培养基,在此配方的基础上,将培养基组分划分为氮源、碳源及无机盐三因素,采用三因素二水平正交旋转组合设计的方法进行培养基优化组合研究,建立其芽孢产量依氮源、碳源、无机盐的响应面方程。借助此方程获得响应面最佳点即培养基各组分最佳配比。实验结果表明,该方法是苏云金芽孢杆菌培养基优化中十分简便、实用、快速的途径。此外,对其间歇发酵过程也进行了初步考察。

关键词 苏云金芽孢杆菌,培养基优化,间歇发酵

学科分类号 Q939.97

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)制剂是目前最重要的生物农药,其工业化生产是影响该制剂研究和开发的重要因素。在苏云金芽孢杆菌的生产中,发酵培养基配方趋势影响发酵水平和制剂的毒力^[1]。近年来,许多研究人员相继采用正交设计、取得了一定的成效。但在筛选过程中如何建立响应面方程,以期通过有限次的试验,在一定范围内寻找无限多的信息,至今还未见报道。本研究采用正交旋转组合设计的方法,对自己分离的苏云金芽孢杆菌进行培养基优化,在此基础上建立响应面方程,并借助此方程获得培养基各组分之间的最佳配比。同时,对该菌株间歇发酵过程进行了考察,为今后在生产上获得高毒力培养物及发酵培养条件的优化提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* 8010 由本实验室分离并保存。

1.2 摇瓶发酵试验

1.2.1 培养基及培养条件: 摇瓶培养基配方(表 1)参照文献[5],培养条件为:温度 30℃,摇床转速 200r/min。间歇发酵的培养基初始糖浓度为 0.78%。

1.2.2 旋转正交试验设计: 对上述 4 种不同配方培养基进行摇瓶培养稀释平板计数后,筛选出效果最佳的 II 号配方再进行培养基优化。按旋转正交组合设计^[6,7]。摇瓶培养,培养液稀释后平板计数测其活芽孢数。

表 1 摇瓶培养基配方

Table 1 Composition of the shaking flask media

No.	Components/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
I	Peptone 5.0, beef extract 3.0, NaCl 5.0, pH7.2
II	Peptone 10.0, glucose 5.0, yeast extract 2.0, KH_2PO_4 1.0, FeSO_4 0.02, MnSO_4 0.02, MgSO_4 0.3 pH7.0
III	Tryptone 20.0, glucose 2.0, Na_2HPO_4 2.5, NaCl 5.0, pH7.0
IV	Tryptone 20.0, glucose 2.0, Na_2HPO_4 1.4, NaCl 5.0, MnSO_4 0.3, MgSO_4 0.3, pH7.0

1.3 发酵罐试验

采用 BIOSTAT B 5L 发酵罐, 装量 4L, 温度 30℃, 搅拌转速为 500r/min, 供气量 1vvm。

1.4 参数测定

1.4.1 菌数: 采用 Bt. 活孢子计数法

1.4.2 浊度: 采用光密度法

1.4.3 pH 值及溶氧值: 由发酵罐的电极测得, 从罐上显示屏直接读取。

1.4.4 葡萄糖浓度: 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[8]。

2 结果与分析

2.1 摇瓶培养初筛

试验结果表明: 4 种培养基摇瓶培养液进行初筛, 培养液平板计数的活芽孢数差异较大, 其中以 II 号配方效果最佳。故选择 II 号配方作为旋转正交组合设计的基本水平进一步做培养基配方优化试验。

2.2 旋转正交组合设计摇瓶培养产孢量

以 II 号培养基配方设计进行摇瓶培养, 培养液经浓度稀释后平板培养计算活芽孢数, 结果见表 2。

表 2 正交试验摇瓶培养结果

Table 2 Orthogonal-rotation-test of the shaking flask

Test No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Spores [*] / 10^8ml^{-1}	147	171	438	357	410	457	311	180	365	390	202	237	123	103	412	478	376	362	366	325

* Mean value

2.3 建立芽孢数响应面方程

根据试验得到的数据, 参照文献[9, 10]介绍的方法, 以芽孢数作为响应值, 培养基的组分及浓度作为自变量, 建立二次多项式响应面方程: $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$ (1)

本试验设计中共有 20 个试验点, 将解出响应面方程的 10 个系数, 因此, 2^3 中心旋转合成设计为 20×10 的矩阵, 矩阵由自变量的因素及水平组成, 称为 x 矩阵:

$$x = \begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1.682 & 0 & 0 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1.682 & 0 & 0 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1.682 & 0 & 0 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1.682 & 0 & 0 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & -1.682 & 0 & 0 & 2.282 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1.682 & 0 & 0 & 2.282 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

将试验结果列为 Y 阵,结果如下:(单位为:亿 CFU/ml)

$$Y = \begin{bmatrix} 147 & 171 & 438 & 357 & 410 & 457 & 311 & 180 & 365 & 390 & 202 & 237 & 123 & 103 & 412 & 478 & 376 & 362 & 366 & 325 \end{bmatrix}$$

X 矩阵的转置矩阵 X' 为:

$$x' = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1.682 & 1.682 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & -1.682 & 1.682 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1.682 & 1.682 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 2.828 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 2.828 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2.828 & 2.828 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

矩阵运算如下: $A = X' \times X$; $g_{ij} = X' \times Y$; $b_{ij} = A^{-1} \times g_{ij}$

得到如下结果:

$$g_{ij} = \begin{bmatrix} g_0 \\ g_1 \\ g_2 \\ g_3 \\ g_{11} \\ g_{22} \\ g_{33} \\ g_{12} \\ g_{13} \\ g_{23} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 6213.0000 \\ -100.4500 \\ 158.3700 \\ 212.8600 \\ 4607.6400 \\ 3713.9920 \\ 3111.6280 \\ -281.5000 \\ -28.5000 \\ 854.5000 \end{bmatrix} \quad b_{ij} = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{11} \\ b_{22} \\ b_{33} \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 383.7000 \\ -7.2450 \\ 11.7050 \\ 15.4750 \\ 14.0390 \\ -41.8310 \\ -79.4900 \\ -35.3750 \\ -3.3750 \\ 106.6250 \end{bmatrix}$$

矩阵 b_{ij} 即是方程(1)的系数矩阵,因此有响应面方程:

$$y = 384 - 7.245x_1 + 11.705x_2 + 15.475x_3 + 14.039x_1^2 - 41.831x_2^2 -$$

$$79.4x_3^2 - 3.375x_1x_2 - 35.375x_1x_3 + -106.625x_2x_3 \quad (2)$$

对上述响应面方程求偏导数,令一阶偏导数等于零,

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = -7.245 + 28.079x_1 - 35.375x_2 - 3.375x_3 = 0$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = 11.705 - 35.375x_1 - 83.661x_2 - 106.625x_3 = 0$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_3} = 15.475 - 3.375x_1 - 106.625x_2 - 158.979x_3 = 0$$

解上述方程组得平稳点座标为: $x_0 = \begin{bmatrix} x_{01} \\ x_{02} \\ x_{03} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.0943 \\ -0.1480 \\ 0.1950 \end{bmatrix}$

代入方程(2)解得平稳点响应值: $Y_0 = 384$

因为响应面方程是自变量大于一元的多元方程,其一阶偏导数为零的点并不一定是极大值,而仅仅是平稳点,因此必须将响应面方程进一步变换,以便寻找到通向最佳点的路径。

2.4 寻找最佳点

由特征值矩阵:

$$\begin{bmatrix} b_{11} & (1/2)b_{12} & (1/2)b_{13} \\ (1/2)b_{12} & b_{22} & (1/2)b_{23} \\ (1/2)b_{13} & (1/2)b_{23} & b_{33} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 14.039 & -17.687 & -1.687 \\ -17.690 & -41.830 & -53.310 \\ -1.687 & -53.310 & -79.490 \end{bmatrix}$$

解得特征值: $B_{11} = 21.958$; $B_{22} = -11.011$; $B_{33} = -118.23$

得方程(2)的标准形式:

$$Y - 384 = 21.958X_1^2 - 11.01X_2^2 - 118.23X_3^2 \quad (3)$$

因 X_2 、 X_3 系数均为负值,且 X_2 、 X_3 为平方项,故沿 X_2 、 X_3 轴方向的任何点都降低响应值,而 X_1 的系数为正值,沿 X_1 轴的任何方向都为响应值增大方向。与系数 B_{33} 相比,

B_{11} 、 B_{22} 的值很小,即沿其轴方向移动的响应值变化很小,将 B_{22} 忽略,则得方程:

$$Y = 384 + 21.958X_1^2 - 118.23X_3^2 \quad (4)$$

按方程(4)进行绘图,可直观地得到图1。从图1中可见平稳点 Y_0 的值 $Y = 384$ 已几乎是最大响应值。沿 X_1 轴试验,响应面略有增加,但变化不大,事实上,进行追加试验,并未得到更高结果,故该平稳点就是最佳响应点。因此,平稳点所对应的培养基浓度值 $\sum c_i =$

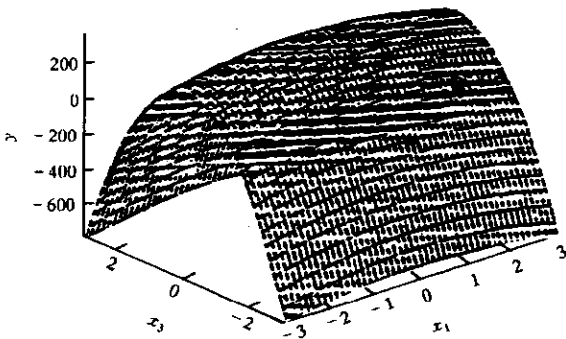


图1 培养基响应面

Fig. 1 Response-plane of media

1.2% ; $\sum c_2 = 0.5\%$; $\sum c_3 = 0.14\%$, 这就是所寻找的最佳配合。通过此最佳配合和氮源、碳源及无机盐中各单一组分的比例, 可以确定培养基中各单一组分的用量。

2.5 拟合响应面方差分析

拟合结果方差分析:

$$SS_{t_0} = \sum \sum Y_{ij}^2 - Y^2 \text{ 有 } 19 \text{ 个自由度}$$

$$SS_r = \sum b_i g_i \quad \text{有 } 9 \text{ 个自由度}$$

$$SS_e = SS_{t_0} - SS_r \quad \text{有 } 10 \text{ 个自由度}$$

表 3 拟合响应面方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of simulated response-plane equation

Error	DF	SS	MS	F _{0.01}
Regression	9	224025.3	24891.71	5.89
Deviated Regression	10	42247.7	4224.77	
Total	19	266273		

从方差分析结果(表 3)可见, 拟合响应面是可靠的。

2.6 间歇发酵过程的考察

初始葡萄糖浓度为 0.78% 时, 苏云金杆菌间歇发酵结果如图 2 所示。从图中可以看出, 660nm 处吸光值的上升与葡萄糖浓度下降基本同步, 而细胞数的迅速增加则要滞后大约 3 小时左右。也就是说, 在苏云金芽孢杆菌的培养过程中菌体的同化作用在时间上要先于细胞分裂, 造成细胞尺寸随培养时间而变化。

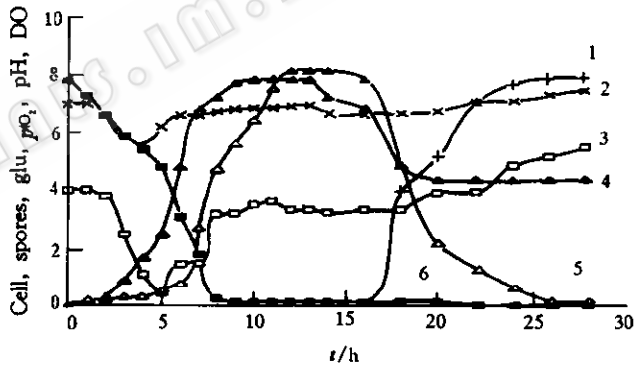


图 2 间歇发酵实验过程曲线

Fig. 2 An experimental curves during batch fermentation

- 1. Spores density/ $10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$, 2. pH
- 3. Dissolved oxygen conc. ($\times 10\%$), 4. OD₆₆₀
- 5. Cell density/ $10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$, 6. Glucose/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

3 小结与讨论

通过室内摇瓶培养稀释平板计数培养, 可以看出培养基

配方对 Bt 菌株的产孢数存在着显著差异, 因此, 通过培养基提高 Bt 菌株的芽孢数具有很大的潜力。

将旋转正交组合设计的模式用于苏云金芽孢杆菌培养基优化, 通过建立响应面方程, 可以从有限的试验数据得到大量的信息, 从而通过不同的组合寻找到的最佳的结果。由本试验可知, 该菌株培养基在氮源浓度、碳源浓度、无机盐浓度分别为 1.2%、0.5%、0.14% 时, 其产孢数最高, 故为培养基各组分最佳组合。该方法具有快速、省工、实用的特点,

可广泛用于各种易检测菌的培养基筛选,对微生物发酵特别是 Bt 发酵及生产具有普遍性的理论意义和实践应用价值。

参 考 文 献

- 1 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990
- 2 和致中. 微生物通报, 1980, 7: 7~10
- 3 吴继星. 生物防治通报, 1994, 10(3): 110~113
- 4 Dulmage H. T. J. Inverteber. Pathol, 1971, 16: 385~389
- 5 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用, 北京: 农业出版社, 1993
- 6 丁希泉. 农业应用回归设计, 北京: 科技出版社, 1986
- 7 丁岩钦. 昆虫数学生态学, 北京: 科技出版社, 1994
- 8 Summer J, Bert E. Laboratory Experiment in Biological Chemistry, Academic, New York. 1994
- 9 同济大学数学教研室. 线性代数, 北京: 高等教育出版社, 1990
- 10 赵士熙. 农作物病虫害数理统计测报 BASIC 程序库, 福州: 福建科技出版社, 1989

The Media Optimization and Batch Fermentation of *Bacillus thuringiensis*

Guan Xiong Chen Jinquan Huang Zhipeng Tang Yubo Gao Rixia
(Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002)

Abstract The No. II media was obtained with shake flask fermentation, and composition of the media was divided into three factors—nitrogen sources, carbon sources and inorganic salts. The relationship between fermentation media and spore numbers of *Bacillus thuringiensis* was demonstrated by using the Orthogonal-rotation-Ocombination-test. A response-plane equation was formed. The results showed that this method is simple, practical and repid for selecting fermentation media for Bt. In addition, the whole course of batch fermentation was investigated.

Key words *Bacillus thuringiensis*, media optimization, batch fermentation