

## 研究报告

## 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化

严涛 朱建国 姜甜 陈珂可 方曙光\*

(江苏微康生物科技有限公司 江苏 苏州 215000)

**摘要:**【背景】凝结芽孢杆菌除了具有一般乳酸菌的益生功能外, 还具有较强的耐酸、耐胆盐、耐高温、易贮存等生物特性。【目的】从泡菜中筛选一株性能优良的凝结芽孢杆菌用于微生态制剂的制备, 并对其产孢率进行优化, 为该菌株的进一步工业化生产提供参考依据。【方法】采用选择性培养基通过特定的培养条件, 筛选到一株抑菌效果良好的产酸芽孢杆菌, 并对其进行特异性引物的鉴定、16S rRNA 基因序列分析及生理生化实验。通过单因素及正交试验对菌株的产芽孢条件进行优化。【结果】筛选得到一株凝结芽孢杆菌 BC01, 该菌株对大肠杆菌 (*Escherichia coli* CVCC 1527)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* CVCC 2228)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens* CVCC 46)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis* CVCC 503) 等均有较强的抑制作用; 模拟胃液处理 120 min 存活率达到 94%; 0.3% 的胆盐存活率达到 84.3%。单因素及正交试验优化后的最适培养基配方: 糖蜜 10.0 g/L, 酵母浸出粉 20.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0 g/L, MnSO<sub>4</sub> 10.0 mg/L; 最适培养条件: 接种量 4%, 温度 45 °C, 初始 pH 7.0, 转速 200 r/min, 培养时间 36 h。在该优化条件下, 其活菌数最高达到 6.7×10<sup>9</sup> CFU/mL, 产孢率达到 89.2%。【结论】筛选得到一株可用于微生态制剂的菌株——凝结芽孢杆菌 BC01, 对其产孢率进行了优化, 为工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 凝结芽孢杆菌, 筛选, 芽孢, 优化

## Isolation and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans*

YAN Tao ZHU Jian-Guo JIANG Tian CHEN Ke-Ke FANG Shu-Guang\*

(Jiangsu Wecare Biotechnology Co. Ltd., Suzhou, Jiangsu 215000, China)

**Abstract:** 【Background】 In addition to the general function of lactic acid bacteria, *Bacillus coagulans* have strong biological properties of resistance to acid, bile salts, heat and easy storage. 【Objective】 Screen a strain of *Bacillus coagulans* from pickle to apply for the preparation of probiotics and optimize its sporulation rate as a guide for further industrial production. 【Methods】 *Bacillus* with good antibacterial effect screened by specific culture conditions, are identified by

**Foundation item:** National Key Research and Development Program of China (2016YFD0400600)

\*Corresponding author: E-mail: 16426030@qq.com

**Received:** March 16, 2017; **Accepted:** October 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 02, 2017  
基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0400600)

\*通信作者: E-mail: 16426030@qq.com

收稿日期: 2017-03-16; 接受日期: 2017-10-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-02

specific primers, 16S rRNA gene sequence analysis and physiological & biochemical experiments. The single-factor and orthogonal experiments are used to optimize the spore-producing conditions. [Results] *Bacillus coagulans* BC01 with a strong inhibitory effect to *Escherichia coli* CVCC 1527, *Salmonella typhimurium* CVCC 2228, *Clostridium perfringens* CVCC 46 and *Salmonella choleraesuis* CVCC 503 was screened. Its survival rate under 120 min of gastric acid treatment is up to 94%. 84.3% after 6 h in the 0.3% bile salt solution. The best medium is obtained by single factor and orthogonal experiment optimization. The optimized formula includes, molasses 10.0 g/L, yeast leaching powder 20.0 g/L, NaCl 5.0 g/L,  $K_2HPO_4$  5.0 g/L and  $MnSO_4$  10.0 mg/L. The optimum culture conditions are as follows, inoculation quantity 4%, temperature 45 °C, initial pH 7.0, rotational speed 200 r/min, culture time 36 h. Under the conditions, the number of viable cells up to  $6.7 \times 10^9$  CFU/mL and the rate of sporulation 89.2%. [Conclusion] *Bacillus coagulans* BC01 for microecological preparation was screened. The sporulation rate of *Bacillus coagulans* BC01 was optimized. It will lay down a foundation for industrial scale production of *Bacillus coagulans*.

**Keywords:** *Bacillus coagulans*, Screening, Spore, Optimization

随着微生物生态学研究的不断深入以及抗生素大范围使用所带来的抗药性问题, 无毒、无抗药性、对环境无污染且能调节肠道微生态平衡的绿色环保的生态制剂已越来越受到人们的关注, 其中以益生菌——乳酸菌为代表, 被广泛应用于食品<sup>[1]</sup>、医疗、保健、畜牧业<sup>[2]</sup>和水产等行业<sup>[3]</sup>。但是乳酸菌普遍存在对环境的抗逆性差(不耐热、稳定性差等)的缺点, 尤其进入肠道后对胃酸、胆盐的耐受能力不强, 易失活导致保存期短的问题给生态制剂的保藏、运输都带来了较大困难。

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)是一类能形成芽孢的产乳酸细菌<sup>[4]</sup>, 被美国食品药品监督管理局(FDA)和美国饲料控制官员协会列入可用于饲料的安全微生物菌种名单<sup>[5]</sup>, 它除了具有一般乳酸菌维持肠道微生态平衡<sup>[6]</sup>、刺激免疫<sup>[7]</sup>、提高机体健康水平、提高人和动物消化功能等作用外, 同时由于能产生芽孢, 具有抗逆性强、抗胃酸<sup>[8]</sup>、抗干燥、耐高温高压<sup>[9]</sup>和易贮存等独特的生物特性<sup>[10]</sup>, 产乳酸芽孢杆菌的研究已成为益生菌菌株研发的热点。凝结芽孢杆菌的芽孢较其营养体细胞易保藏、复活率高, 因此, 芽孢是制备凝结芽孢杆菌制剂的理想存在形式<sup>[11]</sup>。凝结芽孢杆菌广泛分布于泡菜等许多人类食品中以及土壤、植物根际、

动物粪便<sup>[12]</sup>。获得高浓度、高活性的芽孢是制备凝结芽孢杆菌制剂的关键。本研究组从泡菜中筛选得到一株耐酸、耐胆盐且对病原菌有抑制作用的凝结芽孢杆菌 BC01, 通过单因素及正交试验对其产孢率进行了优化, 并于 20 L 发酵罐中进行验证, 为凝结芽孢杆菌芽孢制剂的产业化生产奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株

指示菌株大肠杆菌(*Escherichia coli* CVCC 1527)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* CVCC 2228)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens* CVCC 46)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis* CVCC 503)购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

### 1.2 主要试剂和仪器

蔗糖、乳糖, 国产生化试剂; 酵母膏、蛋白胨、酵母浸出粉, 安琪酵母股份有限公司; 葡萄糖、可溶性淀粉、 $K_2HPO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、NaCl、硫酸铵、氯化铵, 国药集团分析纯试剂; 糖蜜, 济南鑫瑞源化工有限公司; 黄豆饼粉, 济宁双华工贸有限公司; 其他试剂为分析纯试剂。

双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公

司；恒温培养箱、回旋式恒温摇床，太仓精密仪器设备有限公司；光学显微镜，重庆奥特光学仪器有限公司；高压蒸汽灭菌锅，上海三申医疗器械有限公司；20 L 自动机械搅拌发酵罐，上海世远生物工程设备有限公司。

### 1.3 培养基

TYG 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母浸出粉 10.0，葡萄糖 5.0，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0，NaCl 5.0，MnSO<sub>4</sub> 0.015，pH 6.8–7.0。固体培养基添加 1.5% 的琼脂。

可溶性淀粉培养基(g/L)：可溶性淀粉 10.0，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0，MgSO<sub>4</sub> 1.0，NaCl 1.0，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0，CaCO<sub>3</sub> 2.0，FeSO<sub>4</sub> 0.001，MnCl<sub>2</sub> 0.005，ZnSO<sub>4</sub> 0.001，pH 6.8–7.0。

溴甲酚紫葡萄糖固体平板培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，可溶性淀粉 2.0，葡萄糖 5.0，溴甲酚紫 0.04，叠氮化钠 0.2，琼脂 15.0。

人工胃液：取胃蛋白酶 1.0 g 溶于 100 mL 蒸馏水，用 1 mol/L 盐酸调不同 pH 值。

人工肠液：取磷酸二氢钾 0.68 g 溶于 100 mL 蒸馏水，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8，再加胰酶 1.0 g，加不同量的胆盐配制不同胆盐浓度的肠液。

C 源基础培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母浸出粉 10.0，NaCl 5.0，pH 6.8–7.0。

N 源基础培养基(g/L)：葡萄糖 5.0，NaCl 5.0，pH 6.8–7.0。

无机盐基础培养基(g/L)：葡萄糖 5.0，蛋白胨 10.0，酵母浸出粉 3.0。

## 2 方法

### 2.1 菌种筛选及鉴定

取泡菜样品 10 g 放入装有 90 mL 无菌水并有小玻璃珠的 250 mL 三角瓶中，振荡 10 min 使之摇匀。将样品悬液置于 65 °C 水浴处理 10 min 后，吸取 2 mL 接种于可溶性淀粉培养基，50 °C、

200 r/min 培养 36 h。取培养后的菌液 1 mL 进行 10 倍梯度稀释，取适宜稀释梯度涂布溴甲酚紫葡萄糖固体平板，50 °C 培养 48 h。待菌落长出后，挑取有黄色昏圈的菌落，分离纯化，编号保存。

将初筛得到的菌株进行液体培养，取菌液 1 μL 接种于 TYG 固体平板，50 °C 培养，待菌落长出后倒入混有肠道致病菌的软琼脂，37 °C 培养观察平板上菌落生长情况，筛选抑菌能力较强的菌株用于后续实验。

设计凝结芽孢杆菌的特异性引物 P1 和 P2 (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：10×Buffer (含 MgCl<sub>2</sub>) 2 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL，引物 P1 和 P2 (10 μmol/L) 各 1 μL，Taq DNA Polymerase (5 U/μL) 0.1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 13.9 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，48 °C 30 s，72 °C 2 min，30 个循环。

若特异性引物能扩增出特异性条带，再用 16S rRNA 基因的通用引物 P3 和 P4 (表 1) 扩增其基因片段 (PCR 反应条件同上)，将 PCR 产物回收纯化，送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测得的序列与 GenBank 中 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析比对，以 16S rRNA 基因序列一致性 ≥99% 为鉴定标准。

经初步筛选鉴定后的菌株参照《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化实验。

表 1 特异性引物和 16S rRNA 基因的通用引物  
Table 1 Specific primers and 16S rRNA gene universal primers

Primer name	Primer sequences (5'→3')
P1	GTCACGGAAGAGCAAGCTTG
P2	GTTTCTGAAATGTATGCACG
P3	AGAGTTTGATCCTGGCTCA
P4	GGTACCTTGTTACGACTT

## 2.2 凝结芽孢杆菌特性测定

### 2.2.1 耐模拟胃液试验

菌种活化后按 3% 接种量转接 50 mL 液体 TYG 培养基, 50 °C、200 r/min 培养至大部分菌体形成芽孢后, 4 °C、6 500 r/min 离心 15 min 去上清液。收集芽孢加入无菌人工胃液, 人工胃液 pH 值梯度为 1.5、2.5 和 3.5, 37 °C 处理 2 h, 于不同时间取处理液进行活菌计数。

### 2.2.2 耐胆盐试验

准备人工肠液, 其中分别加有 0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、2.0% 和 3.0% 的胆盐。取 1 mL 菌株培养液, 加入 9 mL 不同胆盐浓度的培养液中, 37 °C 静置培养 6 h 后取培养液进行活菌计数。

### 2.2.3 耐抗生素试验

活化好的菌液 0.1 mL 接种 TYG 固体平板上, 放入常用抗生素药敏纸片, 37 °C 培养观察菌落生长情况。

### 2.2.4 急性毒性试验

安全性评价采用急性毒性试验, 参照 GB15193.9-2014 最大耐受剂量法进行。取体重 18–22 g 的小鼠 15 只观察 3 d 后, 1 日内分 3 次经口给予 0.25 g/mL 注菌液 0.4 mL (相当于每千克体重 15 000 mg), 连续 14 d 观察小鼠是否有中毒和死亡现象。

## 2.3 凝结芽孢杆菌产孢率优化

### 2.3.1 种子培养

用 2 mL 无菌水将 TGY 试管斜面上的凝结芽孢杆菌菌苔全部洗下, 接入到 TGY 液体培养基中, 50 °C 培养 24–48 h, 镜检以芽孢为主即为成熟。

### 2.3.2 培养基成分的优化

在碳源基础培养基中分别加入葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、糖蜜、玉米淀粉各 5.0 g/L, 进行碳源的单因素选择试验; 在氮源基础培养基中分别加入酵母浸出粉、蛋白胨、黄豆饼粉、酵母膏、氯化铵、硫酸铵各 5.0 g/L 进行氮源单因素选择试验; 在无机盐基础培养基中分别加入锰离子(硫酸锰)配置成如下浓度: 0、5、10、

15、20、30 mg/L, 考察单因素锰离子浓度对芽孢生成的影响。

实验条件为: 装液量 50 mL (250 mL 三角瓶), 50 °C、200 r/min 摇瓶发酵 48 h, 培养结束后分别测定活菌数及芽孢数, 计算产孢率。

实验中取活菌数及芽孢数较高的营养成分进行正交试验, 确定最佳碳源及氮源。

### 2.3.3 培养条件优化

在最佳培养基条件下, 对接种量、培养时间、初始 pH 值及温度 4 个培养条件进行 5 水平的单因素试验(表 2)。进行单因素试验时, 4 个因素的基本水平: 接种量 3%, 培养时间 48 h, 初始 pH 7.0, 培养温度 45 °C, 即当进行接种量单因素试验时, 培养时间、初始 pH 和温度固定, 为基本水平。其他单因素试验同理。

### 2.3.4 20 L 自动机械搅拌发酵罐培养

发酵罐装液量 10 L, 取成熟的种子菌悬液, 经 80 °C 水浴 10 min 后, 接入 20 L 发酵罐中, 以最佳培养条件及培养基配方对实验结果进行放大验证。

## 2.4 测定方法

### 2.4.1 活菌总数

计数采用平板计数法<sup>[13]</sup>。

### 2.4.2 芽孢数测定

菌液经 80 °C 水浴处理 10 min 后, 采用平板菌落计数法检测芽孢的菌落个数。

表 2 培养条件考察的单因素与水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test for culture conditions

因素 Factors	水平 Level				
	1	2	3	4	5
接种量 Inoculation amount (%)	2	4	6	8	10
培养时间 Culture time (h)	12	24	36	48	72
培养温度 Culture temperature (°C)	37	40	45	50	55
初始 pH 值 Initial pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0

### 2.4.3 芽孢率计算公式

产孢率=(芽孢数/活菌总数)×100%。

## 3 结果与分析

### 3.1 凝结芽孢杆菌的筛选鉴定及其特性研究

挑取典型菌落 40 个, 划线分离纯化后编号 BC01-BC40 进行体外拮抗实验。实验结果表明, 其中 5 株菌(BC01、BC09、BC16、BC20、BC35)对 4 种指示菌(大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气荚膜梭菌、猪霍乱沙门氏菌)有不同程度的抑制, 产生的抑菌圈大小如图 1 所示, 挑选这 5 株菌进行下一步实验。

将 5 株菌用凝结芽孢杆菌的特异性引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 仅菌株 BC01 出现特异性条带, 条带大小为 300 bp 左右(理论为 292 bp)(图 2)。进一步将菌株 BC01 用 16S rRNA

基因通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物回收纯化后测序, 将所测得的序列与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析比对。结果显示测得序列与凝结芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列一致性为 100%。

菌株 BC01 在 TYG 培养基上生长良好, 36 h 形成直径为 2 mm-3 mm 大小的圆形菌落, 白色而有光泽, 表面湿润、平坦, 边缘整齐。油镜观察发现菌株 BC01 菌体形态为杆状, 单个或成对排列, 端生芽孢。菌株 BC01 的生理生化特征(表 3)与《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》中的凝结芽孢杆菌的理化特征相符合。

综合特异性引物鉴定、16S rRNA 基因测序结果比对及生理生化鉴定结果, 鉴定菌株 BC01 为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。

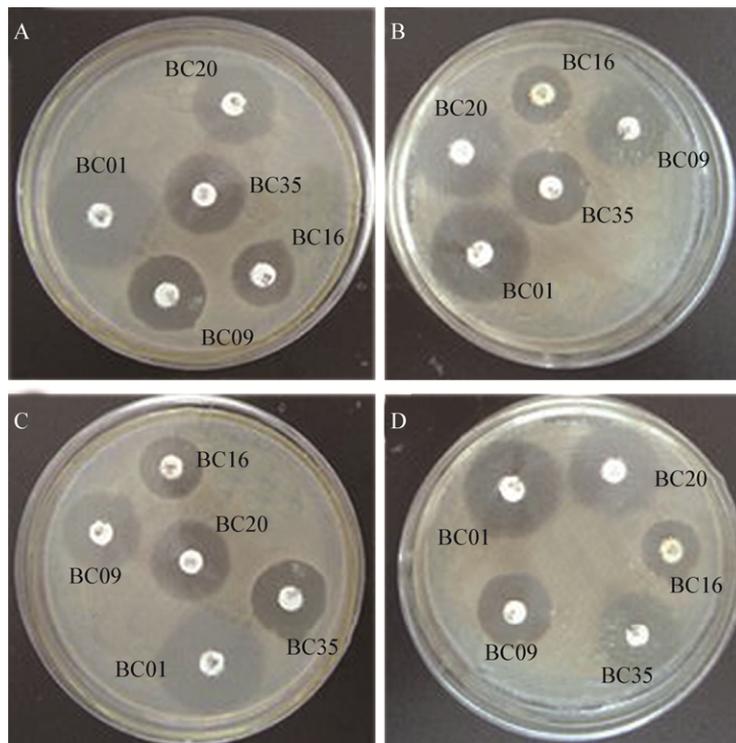


图 1 BC01、BC09、BC16、BC20、BC35 对 4 种致病菌的抑制效果

Figure 1 The inhibition effect of BC01, BC09, BC16, BC20, BC35 on four kinds of pathogenic bacteria

注: A: 大肠杆菌; B: 鼠伤寒沙门氏菌; C: 产气荚膜梭菌; D: 猪霍乱沙门氏菌。

Note: A: *Escherichia coli* CVCC 1527; B: *Salmonella typhimurium* CVCC 2228; C: *Clostridium perfringens* CVCC 46; D: *Salmonella choleraesuis* CVCC 503.

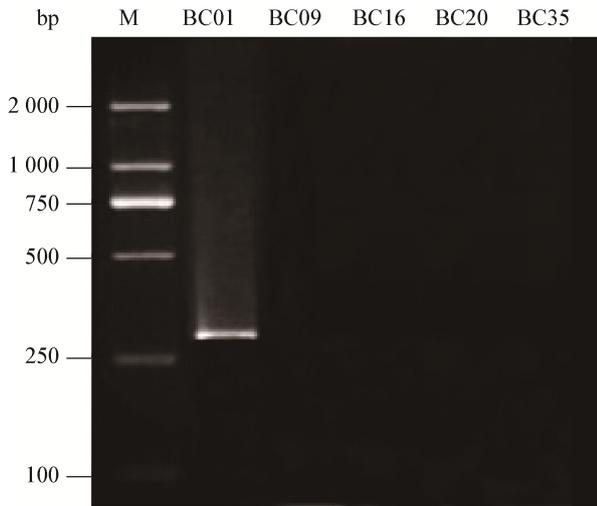


图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析  
Figure 2 Electrophoresis analysis of PCR product

表 3 菌株 BC01 生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain BC01

参数 Parameter	菌株 BC01 Strain BC01
革兰氏染色 Gram stain	+
0.02% 叠氮化钠 0.02% Sodium azide	+
50 °C 生长 50 °C growth	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+
氧化酶 Oxidase	+
过氧化氢酶 Catalase	+
葡萄糖产酸 Glucose acid production	+
甲基红 Methyl red	+
V-P 试验 V-P test	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
吲哚产生 Indole production	-
7% 氯化钠 7% Sodium chloride	-

注: +: 阳性; -: 阴性.  
Note: +: Positive; -: Negative.

凝结芽孢杆菌是以芽孢的形式添加到动物饲料中, 经过胃液时菌体依然是芽孢的状态, 因此以芽孢为实验对象考察其模拟胃液酸耐受性能。一般动物胃酸 pH 2.0–3.0, 食物在胃中停留时间为

1–2 h。因此本实验设置 pH 梯度为 1.5、2.5 和 3.5, 处理时间为 2 h。表 4 显示的是不同 pH 处理后凝结芽孢杆菌的活菌数。结果表明, 该菌株可耐受 pH 2.5 和 pH 3.5 的胃液 120 min, 模拟胃液处理 30 min 后存活率可达 96%。

凝结芽孢杆菌的芽孢通过动物胃酸环境进入小肠后开始萌发长成菌体, 小肠中胆盐对菌体会抑制作用, 因此耐胆盐能力考察采用菌体作为实验对象。实验结果如表 5 所示, 凝结芽孢杆菌在 0.5% 的胆盐浓度下, 其存活率可达到 80% 以上, 说明该菌株能顺利在小肠环境中发挥作用。

凝结芽孢杆菌 BC01 对抗生素耐受性如表 6 所示, 磺胺、杆菌肽对凝结芽孢杆菌抑制作用较弱, 使用时可与其中一种使用, 其他一些常用抗生素对凝结芽孢杆菌抑制效果明显, 因此, 使用凝结芽孢杆菌时不能同时使用极高敏的抗生素。此实验结果也说明了该菌株为不具有抗药性的菌株。

表 4 凝结芽孢杆菌 BC01 在模拟胃液中存活情况  
Table 4 Survival of *Bacillus coagulans* BC01 in simulated gastric juice (CFU/mL)

pH	0	30 min	120 min
1.5	$2.82 \times 10^8$	$1.92 \times 10^8$	$1.25 \times 10^8$
2.5	$2.95 \times 10^8$	$2.86 \times 10^8$	$2.76 \times 10^8$
3.5	$2.79 \times 10^8$	$2.67 \times 10^8$	$2.58 \times 10^8$

表 5 凝结芽孢杆菌 BC01 在不同胆盐浓度中存活情况  
Table 5 Survival of *Bacillus coagulans* BC01 in different bile salt concentrations

胆盐浓度 Bile salt concentration (%)	活菌数 Living bacteria (CFU/mL)	存活率 Survival rate (%)
0.0	$3.12 \times 10^8$	100.0
0.1	$2.50 \times 10^8$	91.2
0.3	$2.00 \times 10^8$	84.3
0.5	$1.70 \times 10^8$	80.1
1.0	$1.20 \times 10^8$	73.0
2.0	$9.80 \times 10^7$	59.0
3.0	$7.30 \times 10^7$	23.9

表 6 凝结芽孢杆菌 BC01 与常见抗菌药物的相容性

Table 6 Compatibility of *Bacillus coagulans* BC01 with common antimicrobial agents

抗菌药物 Antimicrobials	抑菌环直径 Bacteriostatic ring diameter (mm)	敏感程度 Sensitive degree	相容性 Compatibility
青霉素 Penicillin	22	极高敏	不相容
苯唑青霉素 Oxacillin	23	极高敏	不相容
氨苄青霉素 Ampicillin	24	极高敏	不相容
羧苄青霉素 Carbenicillin	29	极高敏	不相容
氧哌嗪青霉素 Oxypiperazine penicillin	21	极高敏	不相容
先锋霉素IV Pioneer IV	29	极高敏	不相容
先锋霉素V Pioneer V	39	极高敏	不相容
先锋霉素VI Pioneer VI	41	极高敏	不相容
头孢肤肟 Cephalosporins	42	极高敏	不相容
复达欣 Fu Daxin	32	极高敏	不相容
菌必治 Bacteria must rule	36	极高敏	不相容
先锋必素 Pioneer	30	极高敏	不相容
丁胺卡那霉素 Amikacin	20	极高敏	不相容
庆大霉素 Gentamicin	16	高敏	不相容
卡那霉素 Kanamycin	21	极高敏	不相容
新霉素 Neomycin	15	高敏	不相容
四环素 Tetracycline	31	极高敏	不相容
强力霉素 Doxycycline	29	极高敏	不相容
美满霉素 Minomycin	26	极高敏	不相容
红霉素 Erythromycin	25	极高敏	不相容
氯霉素 Chloramphenicol	37	极高敏	不相容
磺胺 Sulfonamide	2	低敏	相容
多粘菌素 B Polymyxin B	8	中敏	不相容
杆菌肽 Bacitracin	2	低敏	相容

在急性毒性试验中，所有小鼠均未出现中毒和死亡现象，说明凝结芽孢杆菌 BC01 急性毒性试验最大耐受剂量 MTD>15 000 mg/kg，根据分级标准该菌株为无毒物质。

综上所述，凝结芽孢杆菌 BC01 为无抗药性、安全的菌株，能耐酸、耐胆盐，具有作为微生态制剂的潜力。因此，以凝结芽孢杆菌 BC01 为对象进行后续优化实验。

### 3.2 凝结芽孢杆菌 BC01 培养基成分及培养条件优化

不同碳源对凝结芽孢杆菌的菌体数量及芽孢数量有着不同的影响。从表 7 可以看出，凝结芽孢杆菌对各种碳源均可以利用，其中以可溶性淀粉和糖蜜为碳源时芽孢率较高，分别达到 42.1% 和 46.1%；以葡萄糖、麦芽糖、玉米淀粉等为碳源时芽孢率偏低；以蔗糖为碳源时的芽孢

率最低。糖蜜作为廉价易得的微生物培养物, 适合工业化大生产, 综上所述, 选用糖蜜作为碳源。

在氮源基础培养基中分别加入酵母浸出粉、蛋白胨、黄豆饼粉、酵母膏、氯化铵和硫酸铵 6 种氮源进行考察, 结果如表 8 所示, 凝结芽孢杆菌 BC01 对这 5 种氮源均可以利用, 其中以蛋白胨和酵母浸出粉为氮源时其产孢率较高, 分别达到了 37.5% 和 59.5%; 其他有机氮源产孢率偏低, 而以无机氮源硫酸铵作为氮源时产孢率最低。可能是有机氮源是天然的营养物, 富含多种营养成分及未知生长因子, 能促进菌体生长。无机氮源相对营养成分单一, 因此导致凝结芽孢杆菌将其作为氮源时的产孢率不高。综上所述, 选择酵母浸出粉作为氮源。

$Mn^{2+}$  是微生物生长和芽孢形成所需的一种微量元素<sup>[14]</sup>, 可作为超氧化物歧化酶、黄嘌呤氧化酶和 L-阿拉伯糖异构酶等酶催化过程中重要的辅助因子<sup>[15]</sup>, 因此考察了不同锰离子浓度对活菌数及芽孢数量的影响。表 9 中的实验结果显示  $Mn^{2+}$  浓度对凝结芽孢杆菌芽孢的形成有显著影响, 当  $Mn^{2+}$  浓度为 10 mg/L 时, 芽孢数量达到最高 ( $2.5 \times 10^8$  CFU/mL), 是 5 mg/L  $Mn^{2+}$  浓度下芽孢数的 3 倍, 且产孢率可达 71.4%; 此后随着  $Mn^{2+}$  浓度的增加芽孢数量呈下降趋势, 当  $Mn^{2+}$  浓度达到 30 mg/L 时芽孢率仅为 21.4%。由此可见,  $Mn^{2+}$  最适浓度为 10 mg/L。

根据上述实验结果选择糖蜜、酵母浸出粉、硫酸锰进行 3 因素 3 水平的正交试验(表 10), 正交试验结果见表 11。

表 7 不同碳源对活菌数及芽孢数量的影响

Table 7 Effect of carbon source on living cell and spore

碳源 Carbon source	活菌数 Living bacteria (CFU/mL)	芽孢数 Spore number (CFU/mL)	产孢率 Spore production rate (%)
葡萄糖 Glucose	$1.0 \times 10^8$	$2.5 \times 10^7$	25.0
蔗糖 Sucrose	$2.6 \times 10^8$	$6.0 \times 10^7$	23.1
麦芽糖 Maltose	$8.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	37.5
可溶性淀粉 Soluble starch	$1.9 \times 10^8$	$8.0 \times 10^7$	42.1
玉米淀粉 Bran	$1.5 \times 10^8$	$4.0 \times 10^7$	26.7
糖蜜 Molasses	$1.8 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$	46.1

表 8 不同氮源对活菌数及芽孢数量的影响

Table 8 Effect of nitrogen source on living cell and spore

氮源 Nitrogen source	活菌数 Living bacteria (CFU/mL)	芽孢数 Spore number (CFU/mL)	产孢率 Spore production rate (%)
酵母膏 Yeast extract	$1.9 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$	36.8
蛋白胨 Peptone	$8.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	37.5
黄豆饼粉 Soybean cake powder	$1.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$	30.0
酵母浸出粉 Leaching yeast powder	$3.7 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	59.5
氯化铵 Ammonium chloride	$6.7 \times 10^7$	$5.8 \times 10^6$	8.7
硫酸铵 Ammonium sulfate	$7.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	14.3

表 9 锰离子浓度对活菌数及芽孢数量的影响

Table 9 Effects of Manganese ion concentration on living cell and spore

锰离子浓度 Manganese ion concentration (mg/L)	活菌数 Living bacteria (CFU/mL)	芽孢数 Spore number (CFU/mL)	产孢率 Spore production rate (%)
0	$2.5 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$	28.0
5	$3.0 \times 10^8$	$8.0 \times 10^7$	26.7
10	$3.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	71.4
15	$3.0 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	60.0
20	$2.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	44.0
30	$1.4 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$	21.4

表 10 培养基成分优化的正交因素与水平

Table 10 Orthogonal factors and levels of medium composition optimization

水平 Leve	A 糖蜜 A Molasses (%)	B 酵母浸出粉 B Leaching yeast powder (%)	C 硫酸锰 C Manganese sulfate (%)
1	0.5	1	5
2	1.0	2	10
3	2.0	3	15

表 11 培养基成分的正交试验结果

Table 11 Results of orthogonal test for medium compositions

试验组 The experimental group	A 糖蜜 A Molasses (%)	B 酵母浸出粉 B Leaching yeast powder (%)	C 硫酸锰 C Manganese sulfate (%)	产孢率 Spore production rate (%)
1	1	1	1	55.9±1.9
2	1	2	2	63.4±2.3
3	1	3	3	57.39±1.3
4	2	1	2	75.4±1.5
5	2	2	3	85.1±1.9
6	2	3	1	72.1±0.17
7	3	1	3	55.4±1.6
8	3	2	1	59.5±1.8
9	3	3	2	62.7±2.4
均值 1 Average 1	58.3	61.7	62.0	67.3
均值 2 Average 2	77.3	69.0	66.7	63.3
均值 3 Average 3	58.7	63.7	65.7	63.7
极差 Range value	19.0	7.3	4.7	4.0

正交试验结果表明,培养基各组分对芽孢产率的影响主次为A>B>C,最优组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。通过单因素试验及正交试验得出的最佳培养基成分为:糖蜜 10.0 g/L,酵母浸出粉 20.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0 g/L,MnSO<sub>4</sub> 10.0 mg/L。

培养条件对产孢率影响的结果如图3所示。当接种量增加到4%时,其产孢率达到最高(65.1%),而进一步提高接种量后,产孢率不断下降(图3A),可能是由于菌体生长过快导致代谢产物大量积累,使培养基pH急剧降低所致。培养时间对产孢率的影响表现为:前36h其产孢率呈上升趋势,36h时达到最高(69.1%);36h后由于营养物质缺乏、培养条件恶劣,菌体大量死亡,其产孢率也逐渐降低(图3B)。初始pH值为中性时,其产孢率达到最高64.2%,如图3C所示。由于凝结芽孢杆菌BC01为高温筛选所得,因此最适培养温度高于一

般细菌,可达到45℃,在该培养温度下菌株BC01长势良好,产孢率最高可达65.4%。综合以上结果,单因素最佳条件为接种量4%,温度45℃,初始pH7.0,培养时间36h。

### 3.3 20 L 自动发酵罐中分批发酵培养

按照摇瓶实验优化获得的最佳培养基成分及培养条件,于20 L发酵罐中进行扩大培养,考察菌体生长、活菌数及芽孢个数,为进一步大规模工业化生产提供基础。按实验获得的最佳培养基组分配制培养基,即:糖蜜 10.0 g/L,酵母浸出粉 20.0 g/L,NaCl 5.0 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0 g/L,MnSO<sub>4</sub> 10.0 mg/L。初始pH为7.0,培养温度为45℃,起始通气量为10 L/min,转速为200 r/min,通过调节转速及通气量控制发酵过程中溶氧水平在40%以上,培养时间为48h。发酵过程中取样测活菌数及芽孢数,并计算产孢率,结果如图4所示。

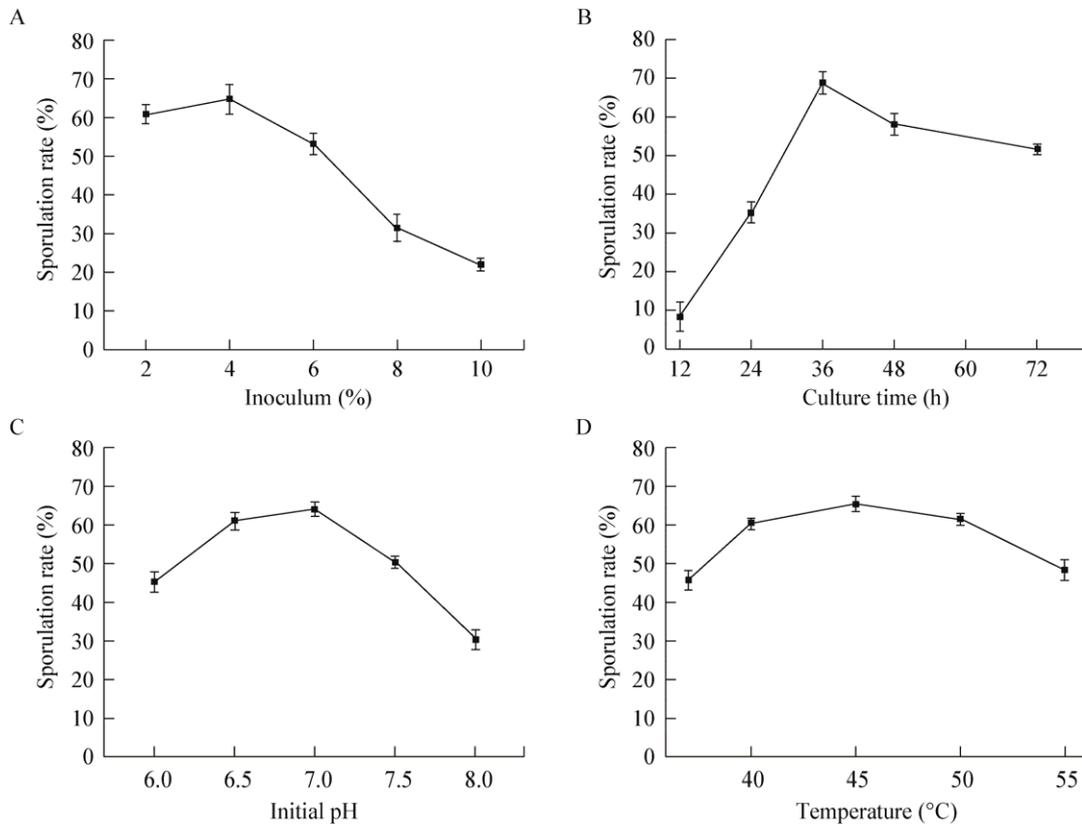


图3 接种量(A)、培养时间(B)、初始pH值(C)、温度(D)对产孢率的影响

Figure 3 Effects of inoculum (A), culture time (B), initial pH (C), temperature (D) on sporulation rate

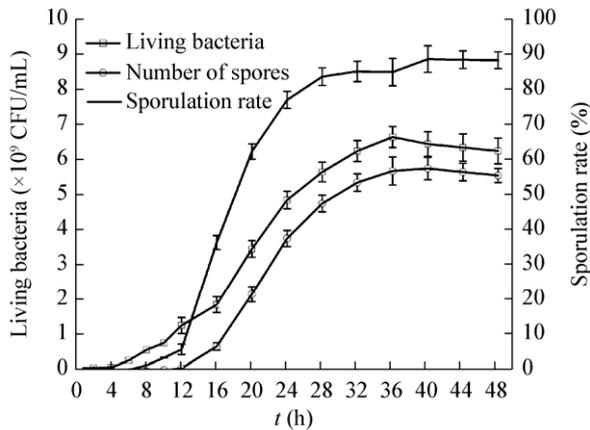


图4 20 L 发酵罐中活菌数、芽孢数及产孢率形成曲线  
Figure 4 The curve of living bacteria, number of spores and sporulation rate in 20 L auto fermentation tank

从图4可以看出, 凝结芽孢杆菌BC01的芽孢接入发酵培养基后, 0-4 h 为菌体生长的延滞期, 4 h 后菌体生长迅速, 活菌数快速上升, 在 36 h 达到最高, 为  $6.7 \times 10^9$  CFU/mL, 随后由于培养基营养物质的耗竭及代谢产物的积累, 周围环境不利于菌体生长, 菌体进入衰亡期并开始自溶, 表现为活菌数逐渐降低。芽孢数在 12 h 时开始逐渐增加, 产孢率随之上升; 培养 30 h 后镜检可见芽孢成熟脱落, 40 h 时达到最高, 为  $5.8 \times 10^9$  CFU/mL, 相应产孢率最高达到 89.2%; 40 h 后芽孢数逐渐降低, 可能是因为部分芽孢复苏为菌体, 从而导致芽孢数量的减少。实验结果表明, 凝结芽孢杆菌 BC01 在 20 L 自动发酵罐中扩大培养效果良好, 上述实验获得的最佳培养条件及培养基成分为进一步应用于工业化大规模生产奠定基础。

#### 4 讨论与结论

本实验根据凝结芽孢杆菌的相关特性, 通过选择性培养基在特定培养条件下筛选并鉴定得到抑菌能力较强的凝结芽孢杆菌, 并对其产孢条件进行优化, 得到高产芽孢的发酵工艺, 为其实现工业化生产提供参考依据。本研究通过营养限量和高温诱导的方式提高凝结芽孢杆菌 BC01 的芽孢率<sup>[16-17]</sup>, 这与徐世荣等<sup>[13]</sup>和路程等<sup>[18]</sup>的研究结果大致相同。

在凝结芽孢杆菌芽孢的形成过程中, 碳源、氮源都能作为限制性生长底物, 其中碳源对芽孢的形成有重要的影响。碳源缺乏可诱导芽孢形成; 而碳源充足有利于营养菌体的生长, 不利于芽孢的形成, 且菌体易发生自溶。在实际生产中需要选择合适的碳、氮源, 并注意限量添加<sup>[19]</sup>。很多研究表明  $Mn^{2+}$  可以提高菌株的芽孢形成率<sup>[20-21]</sup>, 本研究的实验结果也符合上述结论。本研究虽然筛选到可用于微生态制剂的凝结芽孢杆菌, 但是其功能性如何还需要后期通过动物实验来验证。

#### REFERENCES

- [1] Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, et al. Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(4): 894-901
- [2] Zhou YH, Wu SL, Hu XX, et al. Effects of different *Bacillus* species on performance of weaned[J]. Feed Industry, 2012, 33(3): 21-23 (in Chinese)  
周映华, 吴胜莲, 胡新旭, 等. 不同芽孢杆菌对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(3): 21-23
- [3] Liu NN, Liu CJ, Li HJ, et al. Research progresses and related action mechanism of probiotics applied in aquatic animal feed[J]. Feed Industry, 2014, 35(14): 53-56 (in Chinese)  
刘娜娜, 刘长军, 李红军, 等. 益生菌在水产动物饲料中的应用及作用机制研究进展[J]. 饲料工业, 2014, 35(14): 53-56
- [4] Mandel DR, Eichas K, Holmes J. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010, 10: 1
- [5] Nyangale EP, Farmer S, Cash HA, et al. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 modulates *Faecalibacterium prausnitzii* in older men and women[J]. The Journal of Nutrition, 2015, 145(7): 1446-1452
- [6] Ou MS, Ingram LO, Shanmugam KT. L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(5): 599-605
- [7] Su LM, Zhuang YH, Wang JL, et al. The influence of *Bacillus coagulans* combined with olsalazine on serum TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-17 in patient with ulcerative colitis[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(7): 816-818 (in Chinese)  
苏连明, 庄彦华, 王加良, 等. 凝结芽孢杆菌联合奥沙拉嗪对轻中型溃疡性结肠炎患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-17 的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(7): 816-818
- [8] Zhao SP, Bao WC, Gao PF, et al. Study on characteristics of *Bacillus coagulans*[J]. Acta Ecologicae Animalis Domastici, 2014, 35(2): 6-10,20 (in Chinese)

- 赵树平, 包维臣, 高鹏飞, 等. 凝结芽孢杆菌的特性及研究进展[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(2): 6-10,20
- [9] Vercammen A, Vivijis B, Lurquin I, et al. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 152(3): 162-167
- [10] Liu ZW, Zhang C. Probiotics—study on the stability of *Lactobacillus*[J]. Livestock and Poultry Industry, 2005(3): 32-33 (in Chinese)  
刘志伟, 张晨. 益生菌——乳酸芽孢杆菌应用稳定性研究[J]. 畜禽业, 2005(3): 32-33
- [11] Zhou X, Wang Y, Gu Q, et al. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi yellow chicken[J]. Poultry Science, 2010, 89(3): 588-593
- [12] Gu SB, Zhao LN, Wu Y, et al. Potential probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(6): 851-863
- [13] Xu SR, Chen X, Wu YP. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4): 121-126 (in Chinese)  
徐世荣, 陈骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-126
- [14] Wang YP, Chen Y. Studies on the function of TQ33 strain with homolactic fermentation[J]. China Dairy Industry, 1996, 24(3): 9-12 (in Chinese)  
王艳萍, 陈莹. 一株芽孢乳酸杆菌 TQ33 产芽孢特性有抗性的研究[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(3): 9-12
- [15] Charney J, Fisher WP, Hegarty CP. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(2): 145-148
- [16] Yu Y, Wang CW, Zhu AX, et al. Stress resistance and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans*[J]. Feed Industry, 2013(7): 43-47 (in Chinese)  
余岳, 王春维, 祝爱侠, 等. 一株凝结芽孢杆菌芽孢抗逆性研究及其产孢条件优化[J]. 饲料工业, 2013(7): 43-47
- [17] Zhen J, Guo ZY, Xie BE, et al. Optimization of medium composition for the production of *Bacillus subtilis* XK-1 spores[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 146-151 (in Chinese)  
甄静, 郭直岳, 谢宝恩, 等. 枯草芽孢杆菌 XK-1 产芽孢条件的优化[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 146-151
- [18] Lu C, Zhou CH, Yu HM, et al. Optimizing spore-forming conditions of *Bacillus coagulans* T50[J]. China Brewing, 2009, 28(7): 93-95 (in Chinese)  
路程, 周长海, 于红梅, 等. 凝结芽孢杆菌 T50 产芽孢条件优化的研究[J]. 中国酿造, 2009, 28(7): 93-95
- [19] de Vecchi E, Drago L. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabeling?[J]. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 2006, 1(1): 3-10
- [20] Guo XH, Lu WQ, Deng P, et al. Medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* MA139 as a probiotic[J]. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(3): 41-46 (in Chinese)  
郭小华, 陆文清, 邓萍, 等. 益生枯草芽孢杆菌 MA139 增殖培养基的优化[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 41-46
- [21] Chen QH, Sun M, Kuang Q, et al. Influence of cultivation condition on sporulation of *Bacillus coagulans*[J]. Biotechnology, 2009, 19(1): 77-81 (in Chinese)  
陈秋红, 孙梅, 匡群, 等. 培养条件对凝结芽孢杆菌芽孢形成的影响[J]. 生物技术, 2009, 19(1): 77-81