

Research on the Optimization of Fermentation Medium and Scale-Up Technology of *Bacillus amyloliquefaciens*

Guofu Yan*, Congbo Zhao, Panke Yang, Jie Tang

Leili Marine Bioindustry Inc. of Beijing, Beijing

Email: *39129557@qq.com

Received: Sep. 3rd, 2018; accepted: Sep. 14th, 2018; published: Sep. 21st, 2018

Abstract

The optimized fermentation medium was obtained by PB design and orthogonal experimental design. Based on fermentation condition in 50L biological reactor, the experiment was scaled up into 400 L fermentor on the basis of same KLa. The results indicated that the living bacteria count of *Bacillus amyloliquefaciens* was mainly influenced by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cornmeal, corn steep liquor and glucose. The obtained fermentation medium was as follows cornmeal 8 g/L, glucose 12 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g/L, and corn steep liquor 7 g/L. The fermentation condition of 50 L biological reactor was as follows the temperature 30°C, the inoculation rate 1%, the speed 200 r/min in 0 - 8 hours and 250 r/min after 8 hours, the ventilation quantity 15 - 40 L/min and the fermentation time about 30 hours. The fermentation condition of 400L biological reactor was as follows the temperature 30°C, the speed 130 r/min in 0 - 8 hours and 160 r/min after 8 hours, the ventilation quantity 9 - 15 m³/h and the fermentation time about 30 hours. Under the condition, the living bacteria count was 2.5×10^9 /mL.

Keywords

Bacillus amyloliquefaciens, PB Design, Orthogonal Experimental Design, Scale-Up Technology

解淀粉芽孢杆菌的培养基优化和放大研究

严国富*, 赵从波, 杨攀科, 汤洁

北京雷力海洋生物新产业股份有限公司, 北京

Email: *39129557@qq.com

收稿日期: 2018年9月3日; 录用日期: 2018年9月14日; 发布日期: 2018年9月21日

*通讯作者。

摘要

采用PB设计和正交试验设计优化解淀粉芽孢杆菌发酵培养基,在50L发酵罐发酵条件基础上采用以体积溶氧系数为基准的放大法进行了比拟放大。结果表明, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米粉、玉米浆和葡萄糖的质量浓度是影响有效活菌数的主要因素,最优组合为玉米粉8 g/L、葡萄糖12 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g/L、玉米浆7 g/L; 50 L发酵罐发酵条件: 温度30℃, 接种量1%, 搅拌转速0~8小时200 r/min, 8小时后250 r/min, 通风量15~40 L/min, 发酵周期30小时, 放大罐的发酵工艺: 温度30℃, 搅拌转速0~8小时130 r/min, 8小时后160 r/min, 通风量9~15 m³/h, 有效活菌数为 2.5×10^9 /mL。

关键词

解淀粉芽孢杆菌, PB设计, 正交设计, 比拟放大

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

解淀粉芽孢杆菌是一种与枯草芽孢杆菌亲缘性很高的细菌,具有抑制植物病害的能力,能够产生多种代谢产物,主要包括: 抑菌蛋白类, 脂肽类蛋白质, 伊枯草菌素 A, 表面活性物质, 芥芥素, 芽孢菌素 D, 大环内酯类, 寡肽酶, 肽类, 聚酮化合物等[1]-[6]。解淀粉芽孢杆菌对多种作物的致病真菌有较好的抑制效果,可制成生物制剂应用于植物病害防治上,因此其发酵工艺和比拟放大的研究具有重要的意义。实验室分离的解淀粉芽孢杆菌(保藏号: CGMCC5043, 专利号: ZL201210293465)能够降低灰霉病、立枯病、根腐病和炭疽病等多种农作物病害的发病指数。本实验能过 PB 设计和正交试验设计优化了菌株的培养基,同时在 50 L 发酵罐中进行了扩大培养,并采用以体积溶氧系数为基准的放大法进行了比拟放大,为下一步工业化生产提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*, 由北京雷力集团技术研发中心保藏。

2.1.2. 培养基

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 葡萄糖 5, 酵母粉 5, 琼脂 20。

液体种子培养基(g/L): 玉米淀粉 10, 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母粉 5。

初始发酵培养基(g/L): 玉米粉 12, 豆饼粉 18, CaCO_3 5, 葡萄糖 8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, 玉米浆 5, MgSO_4 2, MnSO_4 0.5。

2.2. 方法

2.2.1. 培养条件

菌种活化: 将保藏于斜面的菌株转接到斜面培养基上, 30℃培养 24 小时, 4℃保存备用。

液体种子液制备：试管斜面中加 10 mL 无菌水，刮下菌体，倒入 90 mL 无菌水中，摇床振荡 30 分钟，制成菌悬液。取 30 mL 种子培养基于 150 mL 三角瓶中，灭菌。接种菌悬液 1 mL，置于摇床中培养 15~18 小时，培养温度 30℃，转速 200 r/min。

摇瓶发酵培养：取 30 mL 发酵培养基于 150 mL 三角瓶中，灭菌，接种 0.3 mL 种子液，置于摇床中培养 28~32 小时，培养温度 30℃，转速 220 r/min。

2.2.2. 测定方法

比浊法：发酵液 1000 r/min 离心 10 分钟，上清液稀释至一定倍数，用 721 分光光度计(波长 600 nm)测定发酵液，以蒸馏水做对照。以光密度值 OD_{600} 为标准判断菌数。

菌落计数：执行国家标准 GB 20287-2006。

2.2.3. PB (Plackett-Burman)设计

PB 设计法是一种两水平的试验设计方法，它可以用最少的试验次数使各因素的主效应得到尽可能精确的估计，从众多考察因素中快速筛选出最为重要的几个因素。选用实验次数 $N = 12$ 的设计，对初始培养基中的 8 种成分进行二水平设计，从中选出对解淀粉芽孢杆菌有效活菌数影响较大的因素[7] [8]。

实验选用次数 $N = 12$ 的设计，培养基中的 8 种成分：玉米粉，豆饼粉， $CaCO_3$ ，葡萄糖， $(NH_4)_2SO_4$ ，玉米浆， $MgSO_4$ ， $MnSO_4$ ，分别作为 PB 设计中的 8 个因素，每个因素取两个水平，低水平“-1”为原始培养条件，高水平“1”取低水平的 1.25 倍，PB 设计实验水平及编码见表 1。

2.2.4. 正交试验

根据 PB 设计试验结果，选择对解淀粉芽孢杆菌有效活菌数影响较大的 4 个因素，并确定试验水平，采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行四因素三水平正交试验优化培养基配方，每个处理设 3 次重复。

2.2.5. 发酵罐放大

在摇瓶发酵的基础上，进行了 50 L 发酵罐放大，发酵条件：装料系数 0.6，温度 30℃，接种量 1%，压力 0.05 MPa，搅拌转速 250 r/min，pH 值自然，通风量 15~40 L/min。在 50 L 发酵罐基础上，根据 KLa (体积溶氧系数)相同的原理进行发酵罐放大。

根据公式计算 KLa ：

$$P_0 = (N/60)^3 D^5 \rho N_p \times 2 \times 10^{-3}$$

$$P_g = 2.25 \times 10^{-3} \left(\frac{P_0^2 N D^3}{Q^{0.08}} \right)^{0.39}$$

$$k_d = (2.26 + 3.3N_i) (P_g/V)^{0.56} v_s^{0.7} N^{0.7} \times 10^{-9}$$

P_0 ——无通气时搅拌器输入液体的功率(千瓦)

N ——涡轮搅拌器转速(转/分)

D ——搅拌器直径(米)

ρ ——发酵液密度(公斤/米³)

N_p ——功率准数，试验罐和放大罐均为 2 档圆盘六平直叶涡轮，取常数 6

P_g ——通气时搅拌器输入液体的功率(瓦)

Q ——通气量(毫升/分)

k_d ——溶氧系数 $\left(\frac{\text{摩尔氧}}{\text{毫升} \cdot \text{分} \cdot \text{大气压}(p)} \right)$

- N_i ——涡轮个数
- V ——发酵液体积(米³)
- v_s ——发酵罐空截面空气线速度(厘米/分)

3. 结果分析

3.1. PB 设计筛选主要因素

数据分析采用 Mintab 17 软件进行, 响应值(Y)为有效活菌数。实验设计及结果如表 2 所示, 各因素效应及评价表如表 3 所示。

由 PB 设计结果得出回归方程:

$Y = 17.625 - 1.675 \times 1 + 0.442 \times 2 - 0.325 \times 3 + 0.675 \times 4 - 1.775 \times 5 + 1.442 \times 6 - 0.158 \times 7 + 0.392 \times 8$ 。(NH₄)₂SO₄、玉米粉、玉米浆和葡萄糖对有效活菌数的影响较大, 其中(NH₄)₂SO₄和玉米粉为负效应, 降低浓度可提高活菌数, 玉米浆和葡萄糖为正效应, 提高浓度可提高活菌数。

Table 1. PB design experimental design level and coding
表 1. PB 设计实验设计水平及编码

因素	编码	水平(g/L)	
		-1	1
玉米粉	x1	12	15
豆饼粉	x2	18	22.5
CaCO ₃	x3	5	6.25
葡萄糖	x4	8	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	x5	1	1.25
玉米浆	x6	5	6.25
MgSO ₄	x7	2	2.5
MnSO ₄	x8	0.5	0.625

Table 2. PB design experimental design and results
表 2. PB 设计实验设计及结果

序号	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	Y/(亿·mL ⁻¹)
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	22.3
2	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	18.3
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	14.3
4	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	15.3
5	1	1	1	-1	1	1	-1	1	16.6
6	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	13.6
7	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	14.3
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	16.0
9	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	23.3
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	17.6
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	19.6
12	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	20.3

Table 3. PB design experiment factors effect and evaluation table
表 3. PB 设计实验各因素效应及评价表

项	效应	F 值	显著性排序
x5	-3.550	21.20	1
x1	-3.350	18.88	2
x6	2.883	13.99	3
x4	1.350	3.07	4
x2	0.883	1.31	5
x8	0.783	1.03	6
x3	-0.650	0.71	7
x7	-0.317	0.17	8

3.2. 正交试验优化培养基

根据 PB 试验的筛选结果, (NH₄)₂SO₄、玉米粉、玉米浆和葡萄糖 4 个因素对有效活菌数影响较大, 采用 L₉(3⁴)正交表设计了四因素三水平正交试验, 每个处理设 3 次重复。正交试验设计各因子和水平见表 4, 正交试验设计及结果见表 5。

由表 5 可知, 最优培养基组合为 A1B2C2D2, 即玉米粉 8 g/L, 葡萄糖 12 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.8 g/L, 玉米浆 7 g/L, 根据极差(R)大小分析可知, 4 因素对有效活菌数影响主次顺序为玉米粉 > (NH₄)₂SO₄ > 玉米浆 > 葡萄糖。最优组合与实验 2 相同, 无须再做验证实验, 优化培养基有效活菌数为 33.77 亿/mL。

3.3. 发酵罐放大

在前期工作的基础上, 确定了 50 L 发酵罐发酵条件: 装料系数 0.6, 温度 30℃, 接种量 1%, 压力 0.05 MPa, 搅拌转速 0~8 小时 200 r/min, 8 小时后 250 r/min, 通风量 15~40 L/min, pH 值自然, 发酵周期 30 小时(图 1)。

发酵 8 小时后, 溶氧开始急速下降, 表明菌体生长速度很快, 此时调节搅拌转速和风量, 提高溶氧, 发酵 16 小时后, 溶氧降至最低点, 20 小时后, 溶氧开始回升, 表明菌体繁殖速度减缓, 27 小时, 溶氧上升速度减缓, 芽孢大量形成, 发酵 30 小时, 芽孢率达到 95%, 发酵结束, 平板计数 30 亿/mL(图 2)。

从 50 L 发酵罐发酵情况看, 发酵 8 小时后, 溶氧下降速度非常快, 说明菌体耗氧速度快, 因此, 在发酵罐放大过程中采用以体积溶氧系数为基准的放大法。试验罐与放大罐基本参数对照见表 6, 试验罐与放大罐放大工艺参数见表 7。

根据小罐发酵情况, 为避免泡沫过大, 造成逃液, 放大罐空截面空气线速度取 90 cm/min, 通风量 $Q = \frac{\pi}{4} \times 32^2 \times 90 = 2.54 \times 10^5$ (mL/min), 约等于 1.06 vvm。

计算得溶氧系数为 2.83×10^{-6} , 依据溶氧系数相等原则可计算出放大罐搅拌转速为 159.2 r/min, 取整数为 160 r/min。由此确定了放大罐发酵工艺参数: 温度 30℃, 搅拌转速 0~8 小时 130 r/min, 8 小时后 160 r/min, 通风量 9~15 m³/h。

在放大罐上做了发酵试验, 每 2 小时测定发酵 OD 值, 结果见图 3。

从图 3 可以看出, 发酵 24 小时 OD 值达到最大值, 取样镜检, 无芽孢, 发酵 30 小时后, 芽孢率达到 95%, 停止发酵。平板计数有效活菌数为 25 亿/mL, 接近小罐水平。

Table 4. Orthogonal tests of various factors and levels

表 4. 正交试验各因素及水平表

水平	A: 玉米粉(g/L)	B: 葡萄糖(g/L)	C: (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	D: 玉米浆(g/L)
1	8	10	0.6	6
2	10	12	0.8	7
3	12	14	1.0	8

Table 5. Orthogonal experimental design and results

表 5. 正交实验设计及结果

序号	A: 玉米粉	B: 葡萄糖	C: (NH ₄) ₂ SO ₄	D: 玉米浆	有效活菌数: 亿/mL
1	1	1	1	1	29.47
2	1	2	2	2	33.77
3	1	3	3	3	26.17
4	2	1	2	3	27.80
5	2	2	3	1	26.30
6	2	3	1	2	29.90
7	3	1	3	2	25.07
8	3	2	1	3	25.20
9	3	3	2	1	26.17
k1	29.80	27.45	28.19	27.31	
k2	28.00	28.42	29.25	29.58	
k3	25.48	27.41	25.85	26.39	
R	4.32	1.01	3.40	3.19	

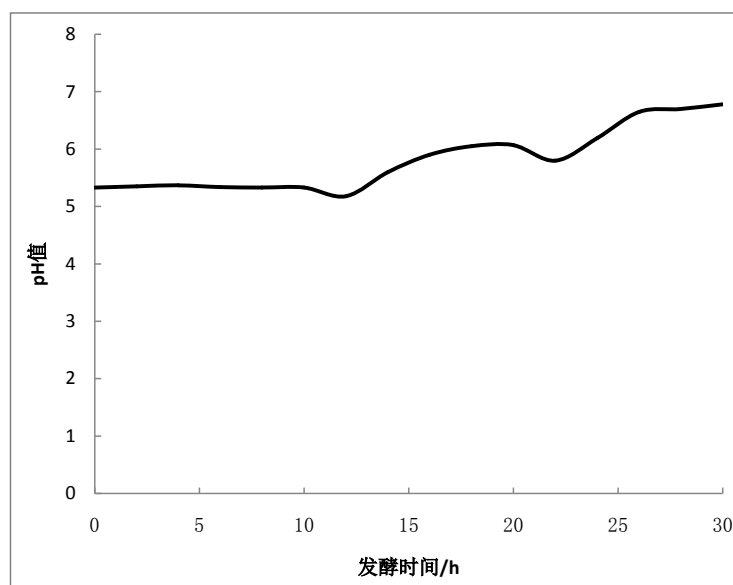


Figure 1. pH value with time change curve

图 1. pH 值随时间变化曲线

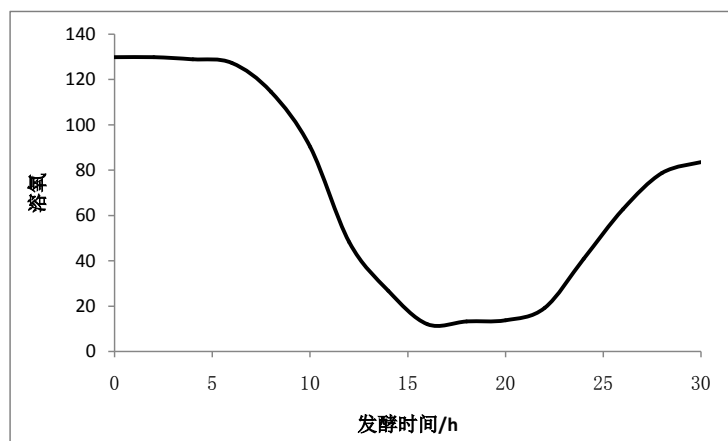


Figure 2. Curve of dissolved oxygen with time
图 2. 溶氧随时间变化曲线

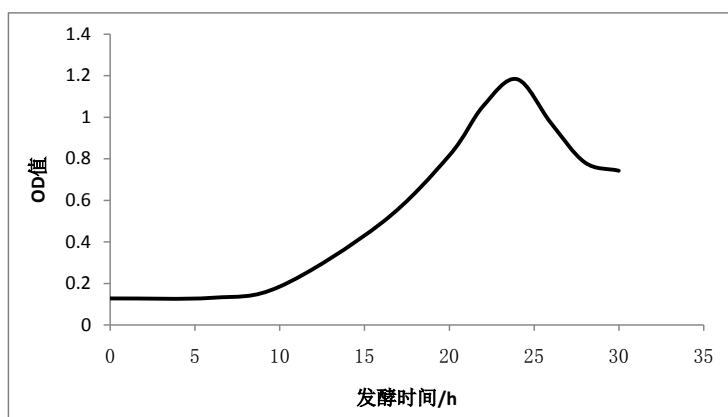


Figure 3. Change curve of OD value in fermented liquid
图 3. 发酵液 OD 值变化曲线

Table 6. Comparison of basic structural parameters between test tank and enlarged tank
表 6. 试验罐与放大罐基本结构参数对照表

对照项	内径 T (m)	柱高 H0 (m)	容积 V (m ³)	有效容积 V _{有效} (m ³)	搅拌器直径 D (m)
试验罐	0.32	0.64	0.058	0.03	0.105
放大罐	0.60	1.20	0.395	0.24	0.200

Table 7. Comparison table for enlarging process parameters of test tank and enlarging tank
表 7. 试验罐与放大罐放大工艺参数对照表

对照项	放大倍数	搅拌转速	通风量(vvm)	Pg/V(kW/m ³)	溶氧系数([摩尔氧/(毫升·分·大气压)])
试验罐	1	250	1.33	0.11	2.83×10^{-6}
放大罐	8	160	1.06	0.11	2.86×10^{-6}

4. 结论

通过 PB 设计筛选出了对解淀粉芽孢杆菌有效活菌数影响较大的 4 个主要因素： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、玉米粉、

玉米浆和葡萄糖, 其中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和玉米粉为负效应, 玉米浆和葡萄糖为正效应。对以上4个因素做了4因素3水平的正交试验, 确定了最优培养基组合为玉米粉 8 g/L、葡萄糖 12 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g/L、玉米浆 7 g/L, 摇瓶发酵有效活菌数为 33.77 亿/mL。

确定了 50 L 发酵罐发酵条件: 装料系数 0.6, 温度 30℃, 接种量 1%, 压力 0.05 MPa, 搅拌转速 0~8 小时 200 r/min, 8 小时后 250 r/min, 通风量 15~40 L/min, pH 值自然, 发酵周期 30 小时, 有效活菌数为 30 亿/mL。在 50 L 发酵罐基础上进行了放大试验, 放大倍数为 8 倍, 采用以体积溶氧系数为基准的放大法确定了 400 L 发酵罐的发酵工艺: 温度 30℃, 搅拌转速 0~8 小时 130 r/min, 8 小时后 160 r/min, 通风量 9~15 m³/h, 有效活菌数为 25 亿/mL, 接近小罐水平。以体积溶氧系数为基准的放大法在解淀粉芽孢杆菌放大过程中是可行的, 为解淀粉芽孢杆菌的工业化生产提供了理论依据。

参考文献

- [1] Wong, J.H., Hao, J., Cao, Z., *et al.* (2008) An Antifungal Protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 1888-1898.
- [2] Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. (2008) Iturin A Is the Principal Inhibitor in the Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against Postharvest Fungal Pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, **108**, 386-395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>
- [3] Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., *et al.* (2004) Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, **186**, 1084-1096.
- [4] Chao, S.H., Cheng, T.H., Shaw, C.Y., *et al.* (2006) Characterization of a Novel PepF-Like Oligopeptidase Secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 968-971. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.968-971.2006>
- [5] 王英国, 王军华, 权春善, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 41-45.
- [6] Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., *et al.* (2009) Genome Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Reveals Its Potential for Biocontrol of Plant Pathogens. *Journal of Biotechnology*, **140**, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
- [7] 赵从波, 章淑艳, 罗同阳, 等. 响应面分析法优化乳糖酶发酵培养基[J]. 中国乳品工业, 2014, 24(4): 38-41.
- [8] 张锋华, 许煜泉, 张雪洪. 采用响应面分析法优化吩嗪-1-羧酸的发酵条件[J]. 现代农药, 2007, 6(2): 15-18.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org