

脱酚棉籽蛋白培养腐熟用枯草芽孢杆菌 DK36 的研究

赵国群^{1,2*}, 王玉丽¹, 刘金龙¹

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018;

2. 河北省发酵工程技术研究中心, 河北 石家庄 050018)

摘要: 以脱酚棉籽蛋白为氮源, 研究了腐熟用枯草芽孢杆菌 DK36 的生长及产芽孢条件。结果发现, 当脱酚棉籽蛋白为氮源时, 菌体生长良好, 可完全代替豆饼粉, 甚至代替酵母粉。当葡萄糖为碳源时, 枯草芽孢杆菌 DK36 不形成芽孢。当玉米粉作碳源时, 枯草芽孢杆菌 DK36 可大量形成芽孢, 其芽孢数和芽孢率分别达到 2.7×10^9 CFU/mL 和 93.4%。培养基中添加钙、镁、锰和钾盐时芽孢数和芽孢率均明显提高, 而且钾盐与钙、镁和锰盐在促进生长和产芽孢上具有协同作用, 其中协同效果最好的组合是 KH_2PO_4 与 MgSO_4 , 其芽孢数和芽孢率分别为 3.2×10^9 CFU/mL 和 98.4%。然而, 脱酚棉籽蛋白会造成芽孢形成缓慢, 生产效率降低。

关键词: 脱酚棉籽蛋白; 枯草芽孢杆菌; 芽孢; 培养条件

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1673-6257 (2015) 06-0128-05

我国是世界第一大产棉国, 每年棉籽产量达 90 万 t 以上。棉籽是我国仅次于大豆的重要的油料资源。棉籽不仅含油量高, 也含有丰富的蛋白质, 榨油后的棉籽粕蛋白质含量在 40% ~ 50%^[1]。棉籽中含有有毒的棉酚。在工业上多采用“液-液-固”萃取法, 从脱壳的棉籽仁中分步浸提棉籽油和棉酚, 最终获得脱酚棉籽蛋白^[2]。脱酚棉籽蛋白的氨基酸组成与大豆蛋白相近, 其中蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸等必需氨基酸的含量高于大豆蛋白, 是一种优良的食用蛋白和饲用蛋白^[3]。由于脱酚棉籽蛋白价格低廉, 可以大幅度降低生产成本, 因此, 国内外对脱酚棉籽蛋白的研究大多集中于食品和饲料工业领域^[4-5]。从理论上讲, 脱酚棉籽蛋白可以作为氮源来培养微生物, 然而, 这一丰富廉价的氮源在发酵工业上的研究与应用却很少。

枯草芽孢杆菌是在自然界广泛存在的一种好氧的产芽孢杆菌。它可以产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和半纤维素酶等酶, 除广泛应用于饲料、食品工业外, 也是生产农作物秸秆、畜禽粪便等有机物腐熟菌剂的重要菌种^[6-7]。芽孢是产芽孢菌在生

长发育后期在细胞内形成的圆形或椭圆形、厚壁、含水量低、抗逆性强的休眠构造^[8]。研究表明, 枯草芽孢杆菌所产生的芽孢具有耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂等多种抗逆性, 有利于芽孢杆菌在环境中存活、定殖及其菌剂的加工、运输, 是制备微生物菌制剂的理想形式^[9]。本文以脱酚棉籽蛋白为氮源, 研究了腐熟用枯草芽孢杆菌 DK36 的生长及产芽孢条件, 以期充分利用棉籽蛋白这一丰富资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脱酚棉籽蛋白 (简称棉籽蛋白): 由河北某公司提供, 经测定, 其蛋白质含量 50.6%, 游离棉酚含量 310 mg/kg。

菌种: 腐熟用枯草芽孢杆菌 DK36 由石家庄某公司农用微生物菌剂研发中心提供。

斜面培养基: 氯化钠 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 琼脂 18 g/L, pH 值 7.4。

种子培养基: 葡萄糖 30 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, KH_2PO_4 4.5 g/L, CaCO_3 2.0 g/L, pH 值 7.2。

发酵基本培养基: 葡萄糖 30 g/L, 棉籽蛋白 15 g/L, KH_2PO_4 4.5 g/L, CaCO_3 2.0 g/L, pH 值 7.2。

1.2 试验方法

试验于 2014 年 8 ~ 10 月在河北省发酵工程技

收稿日期: 2014-08-28; 最后修订日期: 2014-10-11

基金项目: 河北省科技计划项目 (14222902D)。

作者简介: 赵国群 (1963-), 男, 河北藁城人, 博士, 教授, 研究方向为工业微生物技术。同时为通讯作者。E-mail: gqzhao18@126.com。

术研究中心发酵实验室进行。

种子液的制备: 将 2~3 环斜面培养物接种至装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 24 h。

不同氮源的细胞生长特性比较: 将发酵基本培养基中的氮源分别调整为酵母浸粉 15 g/L、豆粕粉 15 g/L、棉籽蛋白 15 g/L。按 5% 的接种量接种后, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养。定时取样, 监测菌体生长情况和观察芽孢形成情况。

棉籽蛋白添加量对菌体生长的影响: 将发酵基本培养基中棉籽蛋白添加量分别控制为 10、20、30、40 和 50 g/L, 其他组分保持不变。按 5% 接种量接入种子液, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 48 h。

碳源对产芽孢的影响: 将发酵基本培养基中的碳源分别调整为 (30 g/L) 玉米粉、麸皮、可溶性淀粉、蔗糖和葡萄糖。按 5% 接种量接种后, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 6 d。

无机盐对产芽孢的影响: 将发酵基本培养基调整为玉米粉 30 g/L、棉籽蛋白 30 g/L, 并作为对照, 向其分别加入碳酸钙 2.0 g/L、氯化钙 2.0 g/L、硫酸镁 2.0 g/L、氯化镁 2.0 g/L、硫酸锰 0.15 g/L、氯化锰 0.15 g/L、磷酸二氢钾 4.5 g/L、碳酸钙 2.0 g/L + 磷酸二氢钾 4.5 g/L。为了考察复合无机盐对产芽孢的影响, 将磷酸二氢钾 4.5 g/L 分别与碳酸钙 2.0 g/L、氯化钙 2.0 g/L、硫酸镁 2.0 g/L、氯化镁 2.0 g/L、硫酸锰 0.15 g/L、氯化锰 0.15 g/L 组合, 加入到培养基中。按 5% 接种量接种后, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 6 d。

培养时间对产芽孢的影响: 将发酵培养基调整为玉米粉 30 g/L、棉籽蛋白 30 g/L、磷酸二氢钾 4.5 g/L、硫酸镁 2.0 g/L。按 5% 接种量接种后, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养, 观察芽孢形成情况。

接种量对产芽孢的影响: 将发酵培养基调整为玉米粉 30 g/L、棉籽蛋白 30 g/L、硫酸镁 2.0 g/L、磷酸二氢钾 4.5 g/L。分别以 2%、4%、6%、8% 和 10% 接种量接入种子液, 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 6 d。

1.3 检测方法

活菌计数方法: 平板菌落计数法^[10]。

芽孢计数方法: 将待计数样品于 80℃ 水浴处理 15 min 后, 再采用平板菌落计数法计数, 所得计数

结果即芽孢数^[11]。

芽孢率的计算: 芽孢数占活菌数的百分比。

2 结果与分析

2.1 棉籽蛋白对枯草芽孢杆菌生长的影响

2.1.1 不同氮源的细胞生长特性比较

酵母粉和豆饼粉是微生物发酵常用的有机氮源。酵母粉是优良的水溶性速效氮源, 营养丰富, 价格比较高。豆饼粉是蛋白态的缓效氮源, 价格相对便宜。由于枯草芽孢杆菌可产生蛋白酶, 可直接利用蛋白态氮源, 因此, 豆饼粉是枯草芽孢杆菌发酵生产上最常用的氮源。如图 1 所示, 当使用棉籽蛋白为氮源时, 菌体生长非常旺盛, 其细胞的生长速度略低于酵母粉, 但远高于豆饼粉。这个结果说明, 棉籽蛋白是一个优良的氮源, 可完全代替豆饼粉, 甚至代替酵母粉, 从而降低培养基的成本。在发酵期间, 对芽孢的形成进行了观测, 3 种有机氮源均没有发现有芽孢形成, 这可能与碳源为葡萄糖有关。由于芽孢的形成非常有利于微生物菌剂的生产、储运及使用, 芽孢率是菌剂质量的重要指标, 因此, 如何使得枯草芽孢杆菌产生大量芽孢就成为后续研究的重点。

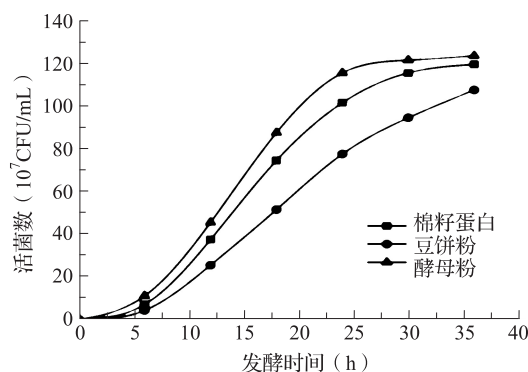


图 1 不同氮源的枯草芽孢杆菌生长曲线

2.1.2 棉籽蛋白添加量对细胞生长的影响

为了考察棉籽蛋白添加量对菌体生长的影响, 调整了发酵基本培养基中脱酚棉籽蛋白含量, 其他组分保持不变, 在 30℃、200 r/min 下振荡培养, 试验结果见图 2。从图 2 可看出, 棉籽蛋白在 10~30 g/L 范围内, 随着棉籽蛋白在培养基中用量的增加, 活细胞数逐渐增加。当棉籽蛋白超过 30 g/L 时, 随着棉籽蛋白添加量的继续增加, 发酵液中活细胞数不再增加, 反而稍有下降。当棉籽蛋白添加

量为 30 g/L 时, 获得最大活细胞数, 3×10^9 CFU/mL。

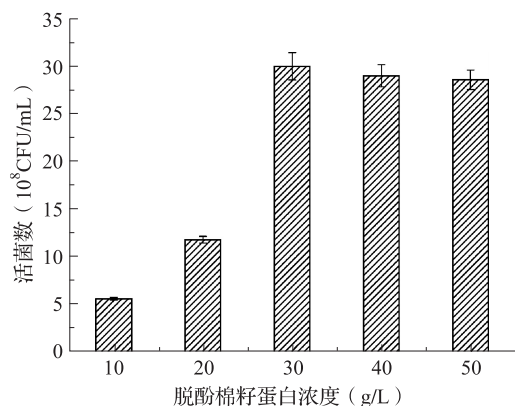


图2 棉籽蛋白添加量对细胞生长的影响

2.2 发酵条件对枯草芽孢杆菌产芽孢的影响

2.2.1 碳源的影响

碳源是影响枯草芽孢杆菌产生芽孢的重要因素之一。从图3中可以发现, 枯草芽孢杆菌可以很好地利用各种碳源, 菌体生长旺盛。然而, 就形成芽孢而言, 碳源种类的影响非常大。当使用蔗糖和葡萄糖作碳源时, 菌体完全不产生芽孢。可溶性淀粉作碳源时, 产生的芽孢数也很少, 芽孢率仅为2.1%。当采用玉米粉和麸皮作碳源时, 枯草芽孢杆菌大量形成芽孢, 其中玉米粉最高, 其芽孢数和芽孢率分别达到 2.7×10^9 CFU/mL 和 93.4%。甄静等^[12]、郭夏丽等^[6]研究了枯草芽孢杆菌的产芽孢条件, 发现麸皮是最佳碳源。王树香等^[13]研究发现, 生防用枯草芽孢杆菌的最佳碳源是麦芽糊精。这些研究的结果不一致, 可能与使用的菌株及氮源种类不同有关。

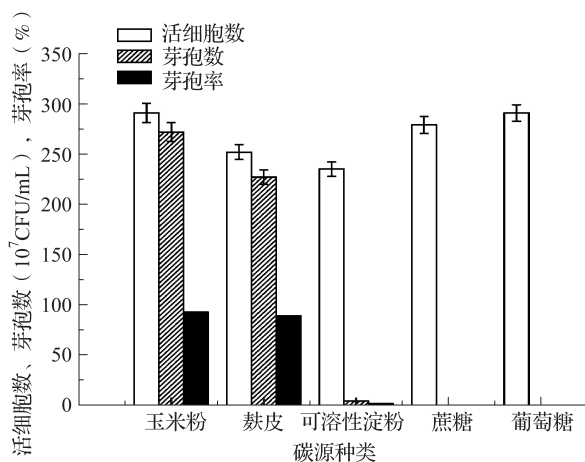


图3 碳源对产芽孢的影响

2.2.2 无机盐的影响

芽孢并不是细菌生活史中不可缺少的部分, 只是产芽孢细菌在生长过程中形成的一种抗逆性休眠体, 它的形成受很多因素的影响, 其中培养基中无机盐的种类及含量是关键因素。从图4中可以发现, 与没有添加无机盐的培养基(对照)相比, 添加钙、锰和钾盐时芽孢数和芽孢率均明显提高, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 K^{+} 促进芽孢的形成, 这与大多数研究结果一致^[12-14]。关于镁盐的影响, 多数研究表明, 镁盐促进枯草芽孢杆菌产芽孢的效果不理想, 甚至有负作用, 其原因是 Mg^{2+} 能够通过干扰吡啶二羧酸的合成降低芽孢的抗热性^[6,14]。但本研究发现, 添加硫酸镁时, 活细胞数和芽孢率最高, 说明 Mg^{2+} 在特定条件下具有很好的促进生长和产芽孢作用。酸根离子的种类对产芽孢也有显著的影响。例如, 硫酸镁的芽孢数和芽孢率分别为 9.7×10^8 CFU/mL 和 93.8%; 而氯化镁的芽孢数和芽孢率仅分别为 5.2×10^8 CFU/mL 和 86.5%。

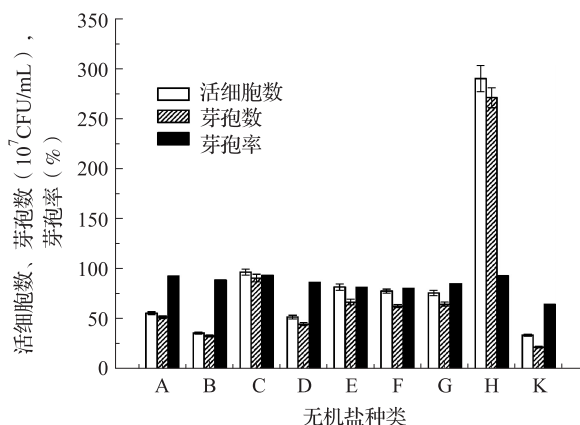


图4 单一无机盐对产芽孢的影响

A: 碳酸钙; B: 氯化钙; C: 硫酸镁; D: 氯化镁; E: 硫酸锰; F: 氯化锰; G: 磷酸二氢钾; H: 碳酸钙 + 磷酸二氢钾; K: 对照

从图4中还可发现, 当同时添加碳酸钙和磷酸二氢钾时, 枯草芽孢杆菌的活细胞数和芽孢数远远高于试验所用的任一无机盐, 这说明二者在促进生长和产芽孢上具有良好的协同作用。那么, 磷酸二氢钾是否也与其他盐具有协同作用呢? 为此, 进行了复合无机盐试验, 其结果见图5。如图5所示, 碳酸钙、氯化钙、硫酸镁、氯化镁、硫酸锰、氯化锰与磷酸二氢钾复合添加时, 其活细胞数和芽孢数均比单一盐时高3~4倍, 这说明 K^{+} 与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 具有非常好的协同作用。其中协同效

果最好的组合是硫酸镁与磷酸二氢钾, 其芽孢数和芽孢率分别达到了 3.2×10^9 CFU/mL 和 98.4%。

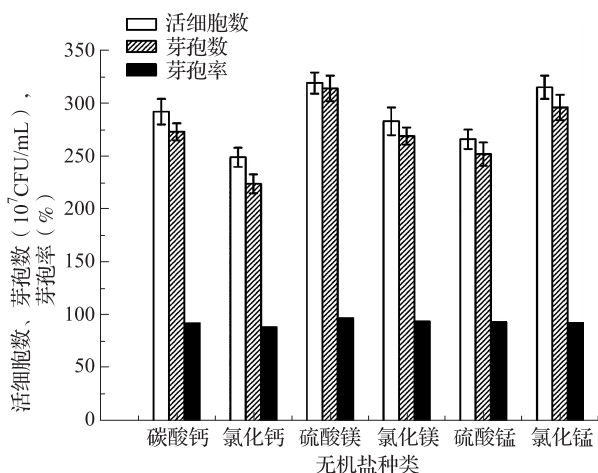


图5 复合无机盐(钾盐与钙、镁、锰)对产芽孢的影响

2.2.3 培养时间的影响

从图6可以看出, 随着培养时间的延长, 活细菌总数在逐渐增加, 当培养第6 d达到最大值。而在培养4 d时, 芽孢形成率仅有35%, 到培养6 d时才大量形成芽孢并接近最大值。大多数的研究表明, 枯草芽孢杆菌最佳的产芽孢培养时间为2~3 d^[13-15]。造成这现象的原因可能与所使用的氮源种类有很大的关系。虽然棉籽蛋白价格低廉, 但它会造成芽孢形成非常缓慢, 大大降低了生产效率。

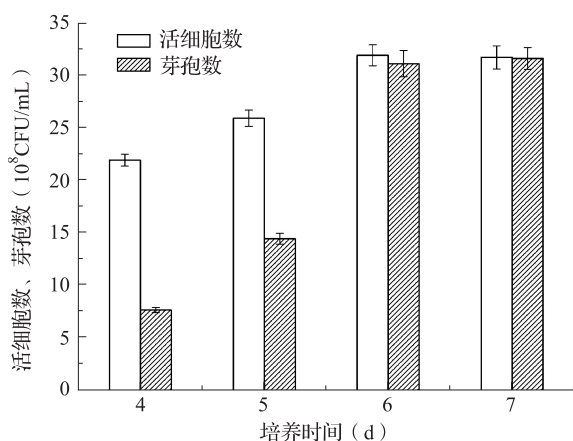


图6 培养时间对产芽孢的影响

2.2.4 接种量的影响

从图7可知, 随着接种量逐渐加大, 活细胞数、芽孢数和芽孢率也不断增加。接种量为8%时, 芽孢数和芽孢率分别为 3.5×10^9 CFU/mL 和 98.7%。但当接种量超过8%时, 活细胞数和芽孢数呈下降趋势。最适接种量与菌种的特性、种子的

质量和发酵条件均有关系。较大接种量可以缩短菌种的延滞期, 使对数期提前到来, 还可以降低传代率, 降低变异几率, 但过大的接种量也可能导致培养基养分提前消耗完, 降低代谢产物的合成及芽孢的数量^[16]。故此, 最适接种量为8%。

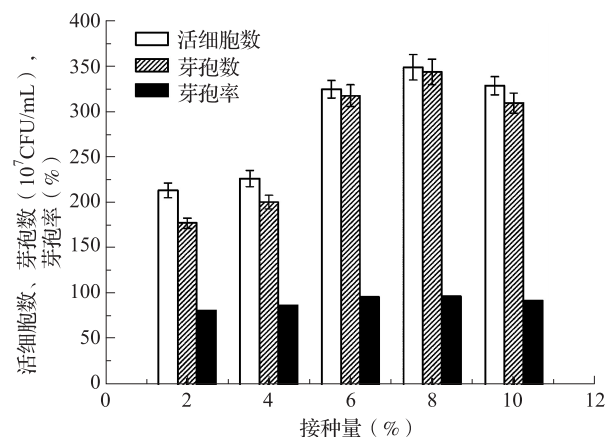


图7 接种量对产芽孢的影响

3 结论

本研究以脱酚棉籽蛋白为氮源, 研究了腐熟用枯草芽孢杆菌 KD36 的生长及产芽孢条件。研究发现, 当棉籽蛋白为氮源时, 枯草芽孢杆菌生长良好, 可完全代替豆饼粉, 甚至代替酵母粉, 从而降低培养基的成本。当棉籽蛋白 30 g/L、葡萄糖 30 g/L 时, 获得最大活细胞数 3×10^9 CFU/mL。由于芽孢数是决定微生物菌剂质量的一个非常重要的指标, 而发酵条件对芽孢形成有重要影响。研究结果表明, 当葡萄糖为碳源时, 菌体不形成芽孢。当采用玉米粉或麸皮作碳源时, 枯草芽孢杆菌大量形成芽孢, 其中玉米粉最高, 芽孢数和芽孢率分别达到 2.7×10^9 CFU/mL 和 93.4%。添加钙、镁、锰和钾盐时芽孢数和芽孢率均明显提高, 而且钾盐与钙、镁和锰盐在促进生长和产芽孢上具有协同作用, 其中协同效果最好的组合是硫酸镁与磷酸二氢钾, 其芽孢数和芽孢率分别达到了 3.2×10^9 CFU/mL 和 98.4%。枯草芽孢杆菌的最适接种量为8%, 最适培养时间为6 d。同其他氮源相比, 棉籽蛋白会造成芽孢形成缓慢, 生产效率降低。如何克服这一问题, 尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵小龙, 刘大川. 棉籽蛋白资源开发研究进展 [J]. 中国油脂, 2014, 39 (1): 23-26.

- [2] 曹建琦, 张方平. “一步法”脱酚棉籽蛋白生产技术的特点 [J]. 中国油脂, 2007, 32 (8): 73-74.
- [3] 高丹丹, 李海星, 常通, 等. 不同蛋白酶水解棉籽蛋白制备抗氧化多肽的研究 [J]. 食品科技, 2010, 35 (2): 18-22.
- [4] Tsaliki E, Pegiadou S, Doxastakis G. Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18 (4): 631-637.
- [5] 徐晶, 陈光, 刘国明, 等. 不同菌株固态生料发酵棉籽粕的研究 [J]. 中国油脂, 2012, 37 (7): 16-19.
- [6] 郭夏丽, 狄源宁, 王岩. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化 [J]. 中国土壤与肥料, 2012, (3): 99-103.
- [7] 王宇, 赵述森, 胡咏梅, 等. 几种微生物及其组合在猪粪堆肥发酵中的作用 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48 (1): 81-84.
- [8] 郭晓军, 李璐滨, 李术娜, 等. 毛竹枯梢病拮抗细菌巨大芽孢杆菌 6-59 菌株的产芽孢条件优化 [J]. 植物保护学报, 2008, 35 (5): 443-447.
- [9] 付小猛, 赵述森, 梁运祥, 等. 一株饲用枯草芽孢杆菌 CCAM 080032 固态发酵工艺的研究 [J]. 饲料工业, 2010, 31 (22): 43-46.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 30-31.
- [11] 杜连祥. 工业微生物学实验技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 104.
- [12] 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.
- [13] 王树香, 王伟, 李术娜, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌枯草芽孢杆菌 8-28 菌株产芽孢条件优化 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48 (6): 1386-1388.
- [14] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化 [J]. 中国生物防治, 2006, 22 (增刊): 82-88.
- [15] 钟蔚, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BS1 发酵培养基的优化 [J]. 饲料工业, 2013, 34 (12): 42-45.
- [16] 刘雪, 叶婧, 穆长青, 等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株发酵条件的研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28 (10): 230-235.

Study on cultivation of *Bacillus subtilis* DK36 for microorganism composting preparations using degossypolized cottonseed protein

ZHAO Guo-qun^{1,2*}, WANG Yu-li¹, LIU Jin-long¹ (1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018; 2. Fermentation Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang Hebei 050018)

Abstract: In this work, cell growth and sporulation of *Bacillus subtilis* DK36 for microorganism composting preparations were investigated using degossypolized cottonseed protein as nitrogen source. The results showed that the cells grew very well when degossypolized cottonseed protein was used as nitrogen source, and it could replace soybean meal and even yeast extract. The cells of *B. subtilis* DK36 did not sporulate when glucose was used as carbon source. The cells produced a great amount of spores when corn meal was used as carbon source. The treatment with corn meal had the highest spore yield and sporulation efficiency, which were 2.7×10^9 CFU/mL and 93.4%, respectively. Supplement of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and K^+ improved significantly spore yield and sporulation of *B. subtilis* DK36. K^+ had a synergism with Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} in stimulation of the cell growth and sporulation. KH_2PO_4 and MgSO_4 had the best synergism effect, and its spore yield and sporulation efficiency were 3.2×10^9 CFU/mL and 98.4% respectively. However, degossypolized cottonseed protein made sporulation of the cells very slowly, which greatly reduced the production efficiency.

Key words: degossypolized cottonseed protein; *Bacillus subtilis*; spore; cultivation condition