

# 枯草芽孢杆菌 J-4 菌株产抑菌物质发酵条件优化

翟玉洁<sup>1</sup>, 邓祖丽颖<sup>2</sup>, 姜军坡<sup>1</sup>, 王世英<sup>1\*</sup>

(1. 河北农业大学 生命科学学院,河北 保定 071001; 2. 郑州幼儿师范高等专科学校,河南 郑州 450000)

**摘要:**为了提高枯草芽孢杆菌 J-4 菌株发酵液中抑菌物质的含量,采用单因素试验和正交试验相结合的方法,对基础发酵培养基的组成(碳源、氮源、无机盐含量)和发酵条件(发酵时间、装液量、发酵温度、接种量)进行优化。优化后的培养基组成为葡萄糖 1.00%、黄豆饼粉 1.00%、MgSO<sub>4</sub> 0.15%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.10%、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.10%;发酵条件为发酵时间 36 h、装液量 100 mL(250 mL)、发酵温度 37 ℃、摇瓶接种量 5%。在此条件下,枯草芽孢杆菌 J-4 菌株抑菌圈面积提高 50.25%。

**关键词:**枯草芽孢杆菌; 抑菌物质; 优化; 正交试验

中图分类号: S816.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2017)02-0131-05

## Optimization of Fermentation Conditions for Producing Antibacterial Substance from *Bacillus subtilis* Strain J-4

ZHAI Yujie<sup>1</sup>, DENGZU Liying<sup>2</sup>, JIANG Junpo<sup>1</sup>, WANG Shiying<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. Zhengzhou Infant Normal School, Zhengzhou 450000, China)

**Abstract:** In order to improve the content of antibacterial substance in the fermentation broth of *Bacillus subtilis* strain J-4, the combined method of single factor test and orthogonal test was used to optimize the factors, such as carbon source, nitrogen source, inorganic salts, fermentation time, media amount, fermentation temperature and inoculation amount. The medium composition and fermentation conditions after optimization were as follows: glucose 1%, soybean cake powder 1%, MgSO<sub>4</sub> 0.15%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.10%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.10%, fermentation time 36 h, media amount 100 mL (250 mL), fermentation temperature 37 ℃, inoculation amount 5%. The inhibition area after optimization increased by 50.25% compared with the inhibition area when using the basal fermentation medium.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; antibacterial substance; optimization; orthogonal test

枯草芽孢杆菌具有生物夺氧、拮抗致病微生物、增强动物体免疫功能、产生多种消化酶等作用<sup>[1]</sup>。枯草芽孢杆菌 J-4 菌株是从健康青年鸡粪便中分离筛选出的具有体外抗大肠杆菌活性的优良菌株<sup>[2]</sup>;饲料中添加 0.1% 的 J-4 菌剂,可使肉鸡的平均日增体质量提高 11.99%,料重比降低 11.03%<sup>[3]</sup>。研究发现,J-4 菌株胞外产生的抑菌物质可以被 60% 饱和度硫酸铵所沉淀,并可被胃蛋白酶和胰蛋白酶所降解,故初步推测该菌株所分泌的抗菌物质为肽类物质。目前,关于枯草芽孢杆菌

J-4 菌株产抑菌物质的发酵条件研究较少。为此,以抑菌圈面积为指标,利用琼脂打孔扩散法<sup>[4]</sup>,设计单因素试验和正交试验,研究枯草芽孢杆菌 J-4 菌株产抑菌物质的适宜发酵条件,以期为该菌株产抑菌物质的分离纯化和抑菌机制研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) J-4 菌株筛选自健康肉鸡粪便;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 由河北

收稿日期:2016-08-18

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展计划项目(151500062A)

作者简介:翟玉洁(1990-),女,河北保定人,在读硕士研究生,研究方向:饲用益生菌及其应用。

E-mail:zhaiyujie901118@126.com

\* 通讯作者:王世英(1963-),男,河北安平县人,教授,主要从事农牧微生物研究。E-mail:wsy99999@126.com

农业大学生命科学学院制药工程系实验室保藏。

## 1.2 培养基

NA 培养基、NB 培养基的组成及配制方法参见文献[5]。

基础发酵培养基组成: 蔗糖 1.00%、蛋白胨 1.00%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.20%、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.20%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、 $\text{CaCl}_2$  0.02%，pH 值 7.0~7.2。

## 1.3 J-4 菌株种子液的制备

将活化好的 J-4 菌株用灭菌竹签刮取斜面菌苔接种到含有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 ℃、180 r/min 摆床培养 12 h, 备用。

## 1.4 J-4 菌株产抑菌物活性测定

1.4.1 病原指示菌平板的制备 将 5 mL 无菌水加入活化好的大肠杆菌的斜面试管中, 用灭菌竹签刮取大肠杆菌菌苔后倒入另一支灭菌试管中, 在漩涡振荡器上振荡 30~60 s, 制成均匀的单细胞菌悬液。按照 5% 的接种量将菌悬液加入 55 ℃ 的 NA 培养基中, 摆匀, 立即倒平板。

1.4.2 抑菌物质活性测定 在病原菌平板上用打孔器按一定间距均匀打孔。将发酵液 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 50 μL, 加入到以上平板的孔中, 然后水平放置 37 ℃ 恒温箱中, 24 h 后观察测定抑菌圈的面积。

## 1.5 J-4 菌株产抑菌物质培养条件的优化

采用基础发酵培养基进行培养, 每组试验设 3 个重复, 分别测量并记录抑菌圈面积。基础发酵条件: 培养时间 48 h、装液量 50 mL(250 mL)、接种量 2%、温度 37 ℃、摇床转速 180 r/min、pH 值 7.0。

1.5.1 摆瓶装液量 利用基础发酵培养基, 装液量分别为 25 mL(250 mL)、50 mL(250 mL)、75 mL(250 mL)、100 mL(250 mL)、125 mL(250 mL)、150 mL(250 mL), 其余发酵条件同基础发酵。

1.5.2 摆瓶温度 利用基础发酵培养基和最优装液量, 分别于 25、28、31、34、37、40、43 ℃ 下进行培养, 其余条件同基础发酵。

1.5.3 接种量 利用基础发酵培养基、最优装液量和最优培养温度, 分别接入 1%、3%、5%、7%、9%、11% 的 J-4 菌株的种子液, 其余条件同基础发酵。

1.5.4 发酵时间 利用基础发酵培养基和以上最优条件, 分别发酵 12、18、24、30、36、42、48、54、60 h, 其余条件同基础发酵。

## 1.6 发酵培养基组成的优化

1.6.1 单因素试验 采用上述优化的发酵条件, 每个因素进行 3 个重复试验, 分别测量 J-4 菌株产抑菌物质的抑菌圈面积。

1.6.1.1 碳源种类 分别用葡萄糖、糊精、玉米粉、淀粉、乳糖、甘露醇代替基础发酵培养基中的蔗糖, 加入比例均为 1.00%, 其余成分不变。

1.6.1.2 氮源种类 用酵母粉、黄豆饼粉、尿素、胰蛋白胨、硝酸钠、硫酸铵、牛肉膏代替基础发酵培养基中的蛋白胨, 加入比例均为 1.00%, 碳源为依据试验确定的最适碳源, 含量均为 1.00%, 其余成分不变。

1.6.1.3 无机盐种类 用  $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{CuSO}_4$  代替基础发酵培养基中的  $\text{MgSO}_4$ , 加入比例均为 0.10%, 依据试验确定出的最适碳源和氮源, 含量均为 1.00%, 其余成分不变。

1.6.2 正交试验 根据上述单因素试验结果, 对碳源、氮源、无机盐及作为缓冲对的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ — $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1:1) 进行四因素三水平正交试验, 采用 1.5 优化后的培养条件进行发酵, 以抑菌圈面积为指标, 比较不同配比组合对抑菌能力的影响。正交试验设计见表 1。

表 1 培养基组成的正交试验设计 %

水平	碳源(A)	氮源(B)	无机盐(C)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (D)
1	0.50	0.50	0.05	0.10
2	1.00	1.00	0.10	0.20
3	1.50	1.50	0.15	0.30

## 2 结果与分析

### 2.1 J-4 菌株发酵产抑菌物质培养条件的单因素试验结果

2.1.1 摆瓶装液量 从图 1 可以看出, 摆瓶装液量在 25 mL(250 mL)~100 mL(250 mL) 时, 抑菌圈面积随装液量增加逐渐增大; 当装液量为 100 mL(250 mL) 时, 抑菌圈面积最大; 当装液量大于 100 mL(250 mL) 时, 抑菌圈面积随装液量增加逐渐减少。因此, 确定该菌株摇瓶发酵产抑菌物质的最适装液

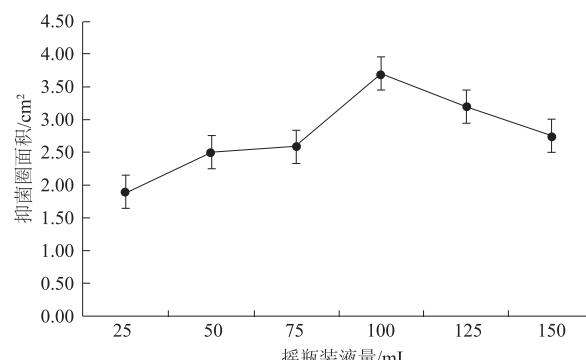


图 1 不同摇瓶装液量对抑菌圈面积的影响

量为 100 mL(250 mL)。

**2.1.2 摆瓶温度** 从图 2 可以看出,当发酵温度小于 37 ℃时,随着发酵温度的升高,抑菌圈面积不断增大;当发酵温度大于 37 ℃时,随着发酵温度的升高,抑菌圈面积反而减小;当发酵温度为 37 ℃时,抑菌圈面积达到最大,故 37 ℃为最适发酵温度。

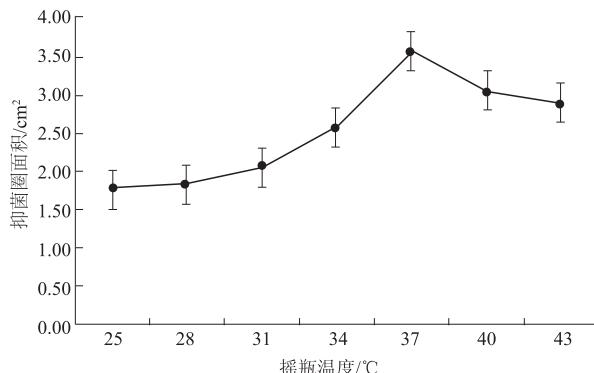


图 2 不同摇瓶温度对抑菌圈面积的影响

**2.1.3 接种量** 从图 3 可以看出,接种量在 1% ~ 5% 时,随接种量增加,抑菌圈面积逐渐增加;接种量在 5% ~ 12% 时,随接种量增加,抑菌圈面积逐渐减小,最终趋于平稳;接种量为 5% 时,抑菌圈面积最大。因此,以接种量 5% 作为最佳接种量。

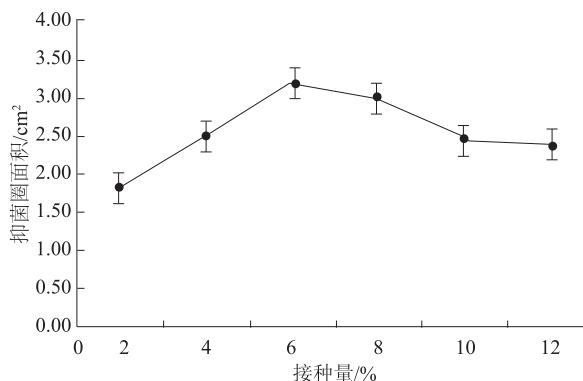


图 3 不同接种量对抑菌圈面积的影响

**2.1.4 发酵时间** 从图 4 可以看出,在 0 ~ 36 h,随发酵时间增加,抑菌圈面积逐渐增大,36 h 对应的抑

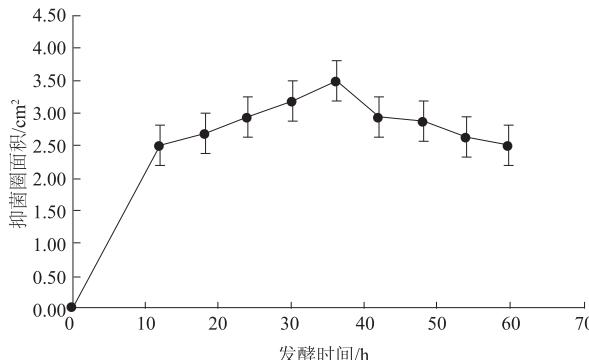


图 4 不同发酵时间对抑菌圈面积的影响

菌圈面积最大,为  $4.32 \text{ cm}^2$ ,36 h 后抑菌圈面积逐渐减小,说明 36 h 的发酵效果最好。故选择 36 h 为最佳发酵时间。

## 2.2 发酵培养基组成的优化结果

### 2.2.1 单因素试验

**2.2.1.1 碳源** 由图 5 可知,供试的 7 种碳源中葡萄糖为碳源时所产生的抑菌圈面积最大,且价格低廉,适于发酵生产。因此,确定葡萄糖为最适碳源。

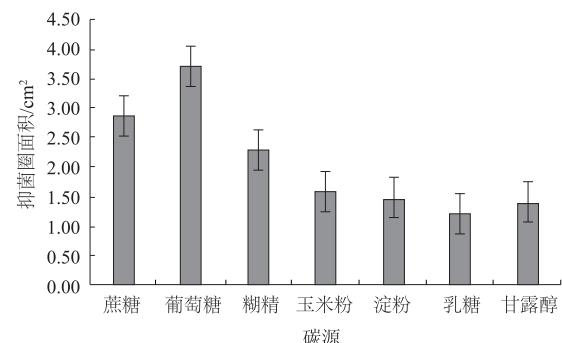


图 5 不同碳源对抑菌圈面积的影响

**2.2.1.2 氮源** 由图 6 可知,以尿素为氮源时无抑菌圈,说明该菌株不能利用无机氮源,在所有供试氮源中,以黄豆饼粉的效果最好,抑菌圈面积最大。因此,选择黄豆饼粉为最适氮源。

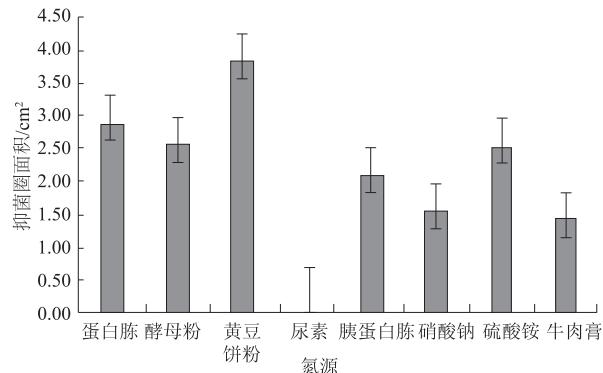


图 6 不同氮源对抑菌圈面积的影响

**2.2.1.3 无机盐** 由图 7 可知,供试的 5 种无机盐均可产生透明的抑菌圈, $\text{MgSO}_4$  产生的抑菌圈面积

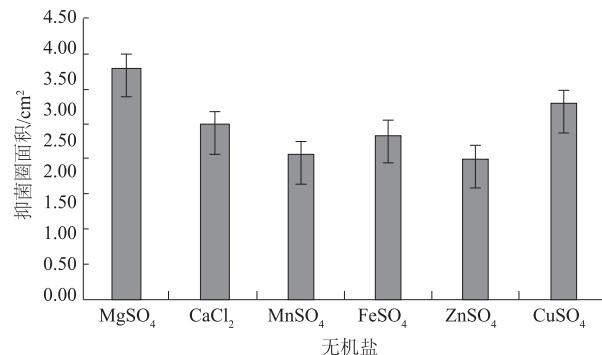


图 7 不同无机盐对抑菌圈面积的影响

最大。因此,选择  $MgSO_4$  为最适无机盐。

### 2.2.2 正交试验

2.2.2.1 正交试验结果及分析 由表 2 可知,4 种因素对抑菌圈面积的影响大小为: C > A > B > D, 即  $MgSO_4$  > 葡萄糖 > 黄豆饼粉 > 缓冲对。其最优组合为  $A_3B_3C_3D_1$ , 即葡萄糖 1.50%、黄豆饼粉 1.50%、 $MgSO_4$  0.15%、 $Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$  0.10%。基础发酵培养基对应的抑菌圈面积为  $3.96 \text{ cm}^2$ , 最佳培养基对应的抑菌圈面积增加了  $1.99 \text{ cm}^2$ , 比基础发酵培养基提高 50.25%。

2.2.2.2 正交试验结果验证 将正交试验的最优结果  $A_3B_3C_3D_1$  与正交表中抑菌圈面积最大组合  $A_2B_2C_3D_1$

进行比较,结果见表 3。由表 3 可知,正交试验最优培养基  $A_3B_3C_3D_1$  对应的平均抑菌圈面积为  $5.74 \text{ cm}^2$ , 而  $A_2B_2C_3D_1$  组合的平均抑菌圈面积为  $5.95 \text{ cm}^2$ , 故最佳培养基配方为  $A_2B_2C_3D_1$ , 即葡萄糖 1.00%、黄豆饼粉 1.00%、 $MgSO_4$  0.15%、 $Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$  0.10%。基础发酵培养基对应的抑菌圈面积为  $3.96 \text{ cm}^2$ , 最佳培养基对应的抑菌圈面积增加了  $1.99 \text{ cm}^2$ , 比基础发酵培养基提高 50.25%。

表 2 发酵培养基组成的正交试验结果

试验号	因素				抑菌圈面积/ $\text{cm}^2$			
	A	B	C	D	1	2	3	平均
1	1	1	1	1	1.21	1.19	1.17	1.19
2	1	2	2	2	1.99	1.98	1.91	1.96
3	1	3	3	3	5.03	5.01	5.04	5.02
4	2	1	2	3	1.85	2.04	2.49	2.12
5	2	2	3	1	5.14	5.44	6.41	5.65
6	2	3	1	2	1.93	1.99	1.93	1.95
7	3	1	3	2	4.98	5.44	5.78	5.39
8	3	2	1	3	2.06	1.96	1.93	1.98
9	3	3	2	1	4.58	5.02	4.98	4.86
$k_1$	2.72	2.90	1.71	3.90				
$k_2$	3.24	3.20	2.98	3.10				
$k_3$	4.08	3.94	5.35	3.04				
R	1.36	1.04	3.64	0.86				

表 3 正交试验最优培养基发酵产抑菌物质能力的验证结果

培养基组成	抑菌圈面积/ $\text{cm}^2$					平均值
	1	2	3	4	5	
基础发酵培养基	3.95	3.88	4.02	3.77	4.13	$3.96 \pm 0.12$
$A_2B_2C_3D_1$	5.43	5.73	6.70	5.77	6.11	$5.95 \pm 0.43$
$A_3B_3C_3D_1$	5.91	5.65	5.65	5.48	6.00	$5.74 \pm 0.19$

### 3 结论与讨论

由于抑菌圈面积与胞外抑菌物质含量的对数值呈线性关系<sup>[6]</sup>, 所以通过培养基组成和发酵条件的优化极大地提高了 J-4 菌株胞外抑菌物质的产量。不同培养基营养成分和发酵条件均可影响抑菌物质的产量。宋浩等<sup>[7]</sup>发现, 用优化后培养基对 W10 菌株进行优化培养, 比优化前抑菌率提高 22.3%。洪鹏等<sup>[8]</sup>在最佳发酵培养基和培养条件下, 菌株 HF-01 的抑菌能力提高 37.3%; 25 °C 条件下, 优化后所得发酵滤液处理柑橘果实 4 d 后, 发病率为 31.7%, 病斑直径为 25.9 mm, 显著低于优化前对应的发病率(56.7%)、病斑直径(48.1 mm)。孙沙沙等<sup>[9]</sup>发现, 优化培养条件后, CG24 菌株代谢产物活性作用增强, 抑菌圈直径比优化前提高了 25.72%。

本试验中发现,  $MgSO_4$  含量的变化会影响发酵物对应的抑菌圈面积, 这可能与 Mg、S 元素在抑菌

物质合成中起重要作用有关。其他研究人员也有类似发现, 如吴艳<sup>[10]</sup>研究表明, 当发酵培养基中  $MgSO_4$  含量为 0.2 g/L 时, 芽孢杆菌菌株 BCL-8 对立枯丝核菌抑菌效价达 833 UI; 魏娇洋<sup>[11]</sup>发现, 当培养基中  $MgSO_4$  含量为 0.5% 时, 内生解淀粉芽孢杆菌 X-278 发酵液对棉花黄萎病的抑菌圈直径为 33.4 mm; 王瑞霞<sup>[12]</sup>发现, 当  $MgSO_4$  含量为 0.05% 时, 枯草芽孢杆菌 B-903 菌株产抑菌物质的量最多。

本试验利用单因素试验和正交试验对枯草芽孢杆菌 J-4 菌株产抑菌物质条件进行优化, 最终确定发酵培养基组成为葡萄糖 1.00%、黄豆饼粉 1.00%、 $MgSO_4$  0.15%、 $Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$  0.10%; 优化培养条件为发酵时间 36 h、装液量 100 mL(250 mL)、发酵温度 37 °C、接种量 5%。培养基优化后, J-4 菌株产抑菌物质对应的抑菌圈面积比基础发酵培养基对应的抑菌圈面积增大 50.25%。通过培养基组

成和发酵条件的优化,极大地提高了胞外抗菌物质的产量,为枯草芽孢杆菌J-4菌株的抑菌机制研究及抑菌物质的分离纯化奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 戴晋军,罗毅,周小辉.禽用枯草芽孢杆菌对白羽肉鸡生长性能的影响[J].饲料研究,2009(8):30-32.
- [2] 王选.鸡源抗腹泻芽孢益生菌J-4菌株的筛选、鉴定、发酵条件优化及动物饲喂试验[D].保定:河北农业大学,2011.
- [3] 刘涛,张冬冬,姜军坡,等.枯草芽孢杆菌J-4制剂对肉鸡肠道酶活力及消化性能的影响[J].河南农业科学,2013,42(10):133-136.
- [4] 顾菊根,刘莉.抗生素微生物检定中抑菌圈测量法的改进[J].现代应用药学,1997(3):32-33.
- [5] 周德庆,徐德强.微生物学实验教程[M].3版.北京:高等教育出版社,2013.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2005.
- [7] 宋浩,纪兆林,陈夕军,等.地衣芽孢杆菌W10菌株发酵培养基优化[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2015,36(1):87-91.
- [8] 洪鹏,安国栋,胡美英,等.解淀粉芽孢杆菌HF-01发酵条件优化[J].中国生物防治学报,2013,11(4):569-578.
- [9] 孙沙沙,夏振远,吴德喜.枯草芽孢杆菌CG24发酵条件优化[J].云南农业大学学报,2013,28(1):36-43.
- [10] 吴艳.芽孢杆菌组合BCL-8发酵条件优化及抗菌蛋白的初步分离[D].石河子:石河子大学,2007.
- [11] 魏娇洋.解淀粉芽孢杆菌X-278生物片剂的研制及田间试验[D].保定:河北农业大学,2014.
- [12] 王瑞霞.枯草芽孢杆菌B-903菌株的发酵条件及所产抗生素的研究[D].郑州:河南农业大学,2003.

(上接第130页)

$R^2$ 高于赵峰<sup>[13]</sup>评定鸭模拟玉米动物试验法TME值对仿生消化法EHGE线性回归模型的 $R^2$ (0.88)。可见,体外法EHGE值与体内法TME值的线性回归模型拟合较好,模型可靠性较高。

综上所述,体外法省时、省力,达到了估测体内法代谢能的要求,能快速、准确评定日粮中养分的生物学效价,在现代饲料工业生产中及养殖业中推广应用具有可行性。

#### 参考文献:

- [1] 张子仪,聂光达.猪饲料消化能值的离体测定方法及其生物试验根据[J].中国畜牧杂志,1986(1):5-9.
- [2] Regmi P R,Sauer W C,Zijlstra R T.Prediction of *in vivo* apparent total tract energy digestibility of barley in grower pigs using an *in vitro* digestibility technique[J].Journal of Animal Science,2008,86(10):2619-2626.
- [3] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2007:60-61.
- [4] 赵峰,张宏福,张子仪.单胃动物仿生消化系统操作手

- [5] 张宏福,赵峰,张子仪.仿生消化法评定猪饲料动物试验效价的研究进展[J].饲料与畜牧,2011(3):5-9.
- [6] 任立芹.仿生法评定黄羽肉鸡常用饲料代谢能和可消化氨基酸研究[D].北京:中国农业科学院,2012.
- [7] 刘雨田.基于仿生消化系统的酶法测定鸡蛋白质饲料代谢能值的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [8] 赵江涛.豆粕鸭代谢能值的酶学评定方法研究[D].北京:中国农业科学院,2003.
- [9] 郑卫宽.用仿生消化仪测定棉粕鸭真代谢能值的研究[D].北京:中国农业科学院,2009.
- [10] 尹玉港.鸭饲料脂肪体外模拟消化方法的研究[D].扬州:扬州大学,2011.
- [11] 王钰明.猪模拟小肠液的制备及仿生消化法测定饲料可消化养分含量的研究[D].北京:中国农业科学院,2015.
- [12] 陈亮.猪常用饲料能量和粗蛋白质消化率仿生评定方法的研究[D].北京:中国农业科学院,2013.
- [13] 赵峰.用酶法评定鸭饲料代谢能的方法学研究[D].北京:中国农业科学院,2006.