

引用格式:

孙标, 陈维菁, 赵迎庆, 卢建军, 唐寅芳, 张富明. 凝结芽孢杆菌的产孢条件及高密度培养工艺[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(2): 171-179.

SUN B, CHEN W J, ZHAO Y Q, LU J J, TANG Y F, ZHANG F M. Optimization of the spore-forming and high density culture conditions for *Bacillus coagulans*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(2): 171-179.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



凝结芽孢杆菌的产孢条件及高密度培养工艺

孙标^{1,2}, 陈维菁², 赵迎庆³, 卢建军³, 唐寅芳^{1*}, 张富明¹

(1.浙江启润生物科技有限公司, 浙江 嘉兴 314022; 2.浙江中科院应用技术研究院, 浙江 嘉兴 314022; 3.浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要:为提高凝结芽孢杆菌发酵产孢率,通过单因素试验、Plackett-Burman 设计、爬坡试验、中心复合试验对凝结芽孢杆菌高密度发酵工艺进行优化。结果表明:凝结芽孢杆菌最佳培养基组分为麸皮 36.91 g/L、玉米浆干粉 13.70 g/L、MnSO₄ 0.84 g/L,在此条件下凝结芽孢杆菌发酵产孢数达到 2.848×10¹⁰ cfu/mL,相比优化前芽孢数提高了 61.72%;在优化的培养基基础上进行 500 L 发酵试验,培养条件为发酵温度 40 °C、转速 150 r/min、通气量 2.5 m³/h、接种量 5%、pH 7.0、培养时间 36 h,发酵液芽孢数达到 2.98×10¹⁰ cfu/mL,与优化试验结果相近,为进一步优化生产工艺提供了必要的支撑。

关键词:凝结芽孢杆菌;高密度发酵;芽孢数;响应面试验;培养基优化

中图分类号: S939.97

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)02-0171-09

Optimization of the spore-forming and high density culture conditions for *Bacillus coagulans*

SUN Biao^{1,2}, CHEN Weijing², ZHAO Yingqing³, LU Jianjun³, TANG Yinfang^{1*}, ZHANG Fuming¹

(1.Zhejiang Qirun Biotechnology Limited Company, Jiaxing, Zhejiang 314022, China; 2.Applied Technology Research Institute of Zhejiang Academy of Sciences, Jiaxing, Zhejiang 314022, China; 3.College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: In order to improve sporulation rate of *Bacillus coagulans*, in this study, we investigate the high-density fermentation culture conditions for *Bacillus coagulans* using a batch experiments including single-factor experiment, Plackett-Burman design experiment, steepest ascent search experiment, response surface experiments with the Box-Behnken design. The results showed that Bran 36.91 g/L, corn steep powder 13.70 g/L, MnSO₄ 0.84 g/L were the optimal medium for *Bacillus coagulans*. Under this condition, the spore number of QR-N323 was 2.848×10¹⁰ cfu/mL. The number of spores increased by 61.72% compared that before the optimization. The optimized medium components were used for 500 L fermentation scaling-up test with temperature 40 °C, Rotating speed 150 r/min, ventilatory capacity 2.5 m³/h, inoculation quantity 5%, pH 7.0 and incubation time 36 h. The results were comparable to the optimized experiment results, which provides necessary data supporting further production process optimization.

Keywords: *Bacillus coagulans*; high density fermentation; spore number; response surface experiment; medium optimization

收稿日期: 2020-01-21

修回日期: 2020-02-19

基金项目: 浙江省重点研发项目(2019C02051); 浙江中科院应用技术研究院项目(ZK-PY-2019-02)

作者简介: 孙标(1986—), 男, 安徽萧县人, 硕士, 工程师, 主要从事生物发酵工程研究, cheery_bio@163.com; *通信作者, 唐寅芳, 硕士, 工程师, 主要从事微生物菌株优化研究, sun11sea@163.com

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)为芽孢杆菌属革兰阳性菌^[1]。研究^[2]发现凝结芽孢杆菌可以在代谢过程中产生乳酸,同时也具备芽孢杆菌的特性,当发酵环境恶化时可以产生芽孢,形成抵抗客观环境的休眠体^[3-4]。凝结芽孢杆菌能在肠道定植,降低肠道 pH,抑制有害菌群滋生,起到调节动物肠道健康、提高消化能力和提高免疫力等作用^[5-6]。凝结芽孢杆菌在应对发酵环境恶劣情况下可以产生具有耐高温、耐胆盐、耐酸碱等特性的芽孢休眠体,这为凝结芽孢杆菌顺利在肠道定植提供了有利保障^[7-9]。

近年来,凝结芽孢杆菌益生特性受到了科研工作者的广泛关注,先后被美国食品药品监督管理局和美国饲料控制官员协会列入安全菌株微生物种名单^[10]。研究表明,凝结芽孢杆菌可保持肠道微生物菌群平衡,提高机体的免疫能力,提高饲料的转化率,提高饲料蛋白和能量的利用率,为畜禽代谢吸收提供更加丰富的营养物质,从而减少疾病发生,促进畜禽健康快速成长^[11-12]。在农业农村部发布的最新版《饲料添加剂品种目录》中,凝结芽孢杆菌被列入新型微生物饲料添加剂,可以广泛用于畜禽生产养殖中^[13-16]。

当前凝结芽孢杆菌菌株已成为畜牧行业重点研发菌株,越来越多的高校院所和企业参与其中,生态制剂的研究应用已从传统方式逐步走向高科技产业之路。该菌株发酵过程污染率高、发酵适应期长、芽孢产孢率低,这是制约凝结芽孢杆菌制剂生产的关键因素;所以,在工业生产过程中缩短凝结芽孢杆菌发酵周期、提高发酵液凝结芽孢杆菌活菌数以及产孢率,对降低生产成本、提高经济效益具有重要意义。

1 材料与主要仪器

1.1 材料

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) QR-N323,为浙江启润生物科技有限公司实验室筛选,采用冻干甘油管-40℃保存。

斜面培养基(改良的 YPD 培养基)^[17]:葡萄糖 2 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL;pH 7.0;121℃灭菌 30 min。

种子活化培养基^[18]:葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母浸粉 10 g,水 1000 mL;pH 7.0;121℃灭菌 30 min。

基础发酵培养基:葡萄糖 10 g/L,玉米浆 5 g/L,硫酸锰 0.34 g/L;pH 7.0~7.2;121℃灭菌 30 min。

麦芽糊精,西王集团生产;蔗糖,中粮股份有限公司生产;麦芽糖,西安裕华生物科技有限公司生产;土豆淀粉、尿素,山东鲁西化工集团有限责任公司生产;蛋白胨、酵母膏,安琪酵母股份有限公司生产;牛肉膏,安琪酵母股份有限公司生产;NaCl、NaNO₃、FeCl₃、MnSO₄、MgSO₄、K₂HPO₄、Na₂HPO₄,江苏科伦多食品配料有限公司生产;CaCO₃,常州碳酸钙有限公司生产;玉米面、玉米浆干粉,山东鲁洲集团生产;麸皮、豆粕、黄豆饼粉,江苏五得利集团生产。

1.2 主要仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台,江苏通净净化设备有限公司生产;HWS-1200 型恒温培养箱,上海煜南仪器有限公司生产;ZHUY-2112B 型大容量双层全温恒温振动摇床,精达仪器制造有限公司生产;BX53 型显微镜,奥林巴斯上海贸易有限公司生产;500 L 全自动液体发酵系统,上海高机生物工程有限公司生产。

2 方法

菌种活化:将凝结芽孢杆菌菌株用斜面培养基活化,40℃培养 48 h,4℃保存,备用。

液体种子的制作:将活化的凝结芽孢杆菌斜面母种接种到摇瓶种子培养基中,40℃、150 r/min 摇床培养 36 h。

发酵培养:向基础发酵培养基中接入 5%的种子液,40℃、150 r/min、通气量 2.5 m³/h 培养 36 h。

2.1 单因素试验

分别用 10 g/L 玉米面、麦芽糊精、麸皮、蔗糖、麦芽糖、土豆淀粉代替基础发酵培养基中的碳源,其他成分不变,接种量为 5%,发酵温度 40℃、转速 150 r/min、通气量 2.5 m³/h,培养 48 h,研究碳源对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

分别用 5 g/L 豆粕、蛋白胨、尿素、酵母膏、牛肉膏、黄豆饼粉、玉米浆干粉代替基础发酵培养基中的氮源成分,其他成分不变,接种量为 5%,研究氮源对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

分别用 0.34 g/L 的 MnSO₄、MgSO₄、NaCl、FeCl₃、K₂HPO₄、Na₂HPO₄、CaCO₃、NaNO₃ 代替基础发酵培养基中的无机盐成分,其他成分不变,

接种量为 5%，研究无机盐对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

将凝结芽孢杆菌分别以 1%、2%、3%、4%、5%、6% 接种量接种到基础发酵培养基中，研究接种量对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

上述 4 个试验的培养条件均为发酵温度 40℃、转速 150 r/min、通气量 2.5 m³/h，培养 48 h。

将凝结芽孢杆菌接种到基础发酵培养基中，分别在 90、120、150、180、210 r/min 转速条件下培养，接种量 5%，通气量 2.5 m³/h，发酵温度 40℃、培养 48 h。研究转速对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

将凝结芽孢杆菌接种到基础发酵培养基中，分别置于 30、35、40、45℃ 条件下培养，接种量 5%，通气量 2.5 m³/h，转速 150 r/min，培养 48 h。研究发酵温度对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

将凝结芽孢杆菌接种到基础发酵培养基中，通气量分别为 2.0、2.5、3.0、3.5 m³/h，接种量 5%，转速 150 r/min，发酵温度 40℃、培养 48 h。研究通气量对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响。

2.2 凝结芽孢杆菌高密度发酵培养工艺优化

2.2.1 Plackett–Burman (PB) 设计筛选凝结芽孢杆菌高密度发酵影响显著因子

采用 PB 试验设计^[19]，快速筛选出试验过程中影响显著的因子。在单因素试验基础上，设定麸皮、玉米浆干粉、MgSO₄、MnSO₄、转速、发酵温度、通气量等试验因子，按表 1 进行设计，并将其编码为“-1”和“+1”水平，以全面考察试验因素的影响主次。

表 1 Plackett–Burman 试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiments design		
因素	“-1”水平	“+1”水平
麸皮/(g·L ⁻¹)	6.0	16.0
玉米浆干粉/(g·L ⁻¹)	3.0	7.0
MgSO ₄ /(g·L ⁻¹)	0.7	1.4
MnSO ₄ /(g·L ⁻¹)	0.3	0.5
转速/(r·min ⁻¹)	120	210
发酵温度/℃	30	45
通气量/(m ³ ·h ⁻¹)	2	3

2.2.2 最陡爬坡试验设计

通过 Plackett–Burman 试验，根据各影响因素正负效应的大小、数据变化比例大小设定变化步长及变化方向，以进一步优化试验区域。

2.2.3 中心复合试验优化凝结芽孢杆菌高密度发酵工艺

以最陡爬坡试验结果为基础，以显著影响因素的中心点为零水平，高水平、低水平分别高于、低于零水平 1 个实际步长，采用 Design Expert 8.0.6 中心复合试验设计(BBD)进行响应面分析。

2.2.4 凝结芽孢杆菌发酵放大试验

利用已经优化的发酵培养基制作 500 L 发酵液，初始 pH 7.0，将 95% 的乙醇棉均匀放入发酵罐接种口下凹槽中，利用火焰法进行接种，接种量 5%。在 40℃、通气量 2.5 m³/h、转速 150 r/min 条件下培养 36 h。每 2 h 取样，检测发酵液的 pH、活菌数及芽孢产生情况。

2.3 活菌总数计数方法

采用平板计数法^[20-21]统计活菌总数；根据严涛等^[22]的平板计数法进行芽孢计数。将培养好的发酵液在 80~95℃ 水浴 20 min，以除掉菌液中的营养体。水浴后迅速用无菌生理盐水稀释，统计芽孢数。

2.4 数据处理与统计分析

采用 Excel 2013 进行数据分析和绘图；Plackett–Burman 试验、最陡爬坡试验、结合中心复合试验均运用 Design Expert 8.0.6 软件进行数据分析。

3 结果与分析

3.1 不同碳源对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

由图 1 可知，用麸皮作为碳源时，发酵液中的凝结芽孢杆菌芽孢数达到 1.09×10¹⁰ cfu/mL；以麦芽糖、玉米面、土豆淀粉为碳源时，凝结芽孢杆菌芽孢数分别为 8.3×10⁹、6.8×10⁹、7.5×10⁹ cfu/mL；以蔗糖作为碳源时，芽孢最少。最终确定以麸皮作为碳源进行后续研究。

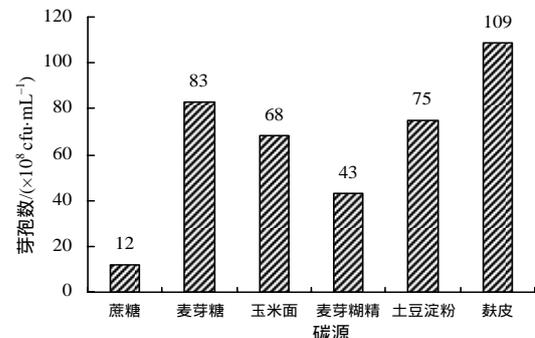


图 1 不同碳源处理的凝结芽孢杆菌发酵产孢数

Fig.1 The sporulation of *Bacillus coagulans* treated with different carbon sources

3.2 不同氮源对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

从图2可知,凝结芽孢杆菌对7种氮源均可以利用,其中以玉米浆干粉、黄豆饼粉、牛肉膏、豆粕为氮源时,产孢数达到 7.7×10^9 cfu/mL以上;以蛋白胨、酵母膏为氮源,产孢率偏低;以尿素作为氮源时,产孢率最低。最终选择玉米浆干粉作为氮源进行后续研究。

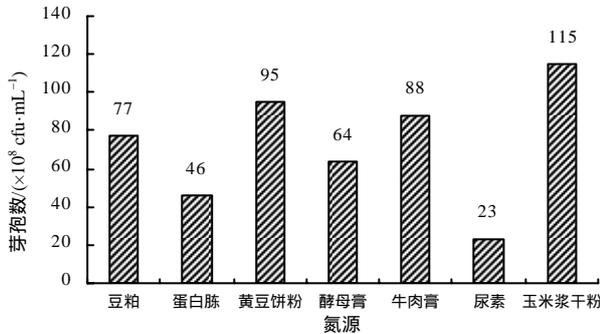


图2 不同氮源处理的凝结芽孢杆菌发酵产孢数

Fig.2 The sporulation of *Bacillus coagulans* treated with different nitrogen sources

3.3 不同无机盐对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

从图3可以看出, MnSO_4 作为无机盐时芽孢数最多, 达 8.4×10^9 cfu/mL, 以 MgSO_4 、 K_2HPO_4 为凝结芽孢杆菌发酵无机盐时, 产孢数分别为 6.5×10^9 、 7.5×10^9 cfu/mL。 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 是微生物生长和芽孢形成所需的微量元素^[23], 其中, Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 是催化过程中重要的辅助因子^[24]; 因此, 选择 MnSO_4 、 MgSO_4 进行下一步研究。

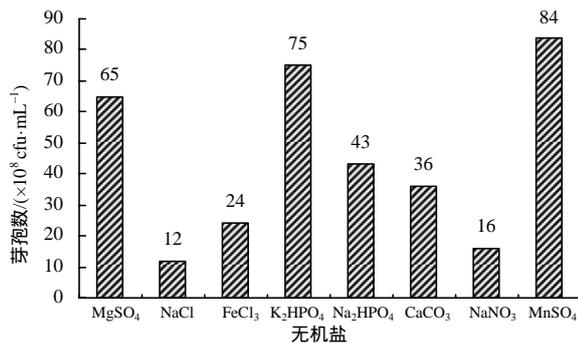


图3 不同无机盐处理的凝结芽孢杆菌发酵产孢数

Fig.3 The sporulation of *Bacillus coagulans* treated with different inorganic salt

3.4 接种量对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

由图4可知, 随接种量的增大芽孢数呈先增加后减小趋势, 在接种量为5%时, 芽孢数最大, 为 8.7×10^9 cfu/mL; 因此, 确定最适接种量为5%。

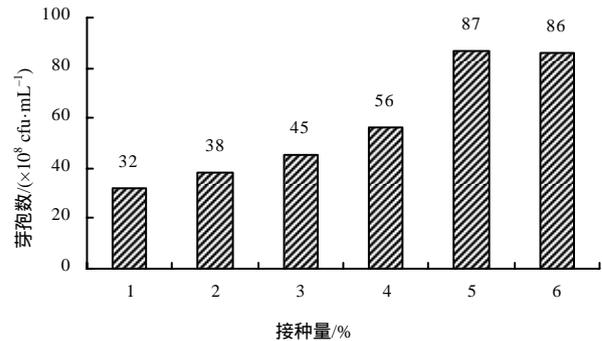


图4 不同接种量处理的凝结芽孢杆菌发酵产孢数

Fig.4 The sporulation of *Bacillus coagulans* treated with different inoculum size

3.5 转速对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

从图5可以看出, 当转速为210 r/min, 芽孢数最多, 为 1.02×10^{10} cfu/mL, 与转速150、180 r/min时的芽孢数差别不大。综合生产成本及生产设备磨损, 最终选择150 r/min为最佳发酵转速。

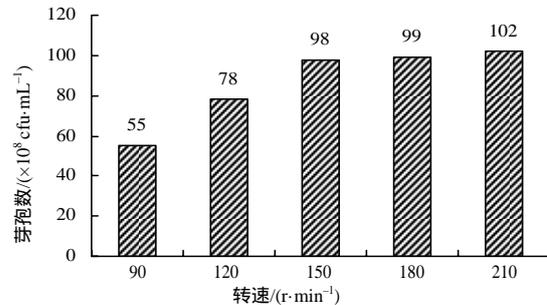


图5 不同转速处理的凝结芽孢杆菌发酵产孢数

Fig.5 The sporulation of *Bacillus coagulans* treated with different speed

3.6 发酵温度对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

凝结芽孢杆菌在30、35℃条件下培养, 只有少量的芽孢产生; 当发酵温度为40℃时, 芽孢数骤增, 达 9.8×10^9 cfu/mL; 当培养温度为45℃时, 芽孢数下降到 7.8×10^9 cfu/mL; 因此, 选择40℃为最佳培养温度。

3.7 通气量对凝结芽孢杆菌发酵产孢的影响

通气量为2.0、2.5、3.0、3.5 m³/h时, 芽孢数分别为 5.6×10^9 、 9.9×10^9 、 7.8×10^9 、 6.5×10^9 cfu/mL; 因此, 选择2.5 m³/h为最佳通气量。

3.8 PB 试验结果分析

在单因素试验基础上, 按PB试验设计, 把每个因素设计成“-1”和“+1”2个水平, 以凝结芽孢杆菌发酵产芽孢数为试验评价指标, 确定各影响因素

对凝结芽孢杆菌发酵产孢影响主次, PB 试验设计及 芽孢数结果及试验因素效应分析见表 2 和表 3。

表 2 PB 试验设计及响应值

Table 2 The design and results of Plackett-Burman experiments

试验号	麸皮质量 浓度/(g·L ⁻¹)	玉米浆干粉质 量浓度/(g·L ⁻¹)	MnSO ₄ 质量浓 度/(g·L ⁻¹)	MgSO ₄ 质量浓 度/(g·L ⁻¹)	转速/ (r·min ⁻¹)	发酵温度/ ℃	通气量/ (m ³ ·h ⁻¹)	芽孢数/ (×10 ⁹ cfu·mL ⁻¹)
1	16	7	0.70	0.50	210	45	2	7.85
2	6	7	1.40	0.30	210	45	3	6.18
3	16	3	1.40	0.50	120	45	3	4.35
4	6	7	0.70	0.50	210	30	3	7.31
5	6	3	1.40	0.30	210	45	2	6.99
6	6	3	0.70	0.50	120	45	3	11.48
7	16	3	0.70	0.30	210	30	3	5.80
8	16	7	0.70	0.30	120	45	2	8.01
9	16	7	1.40	0.30	120	30	3	7.01
10	6	7	1.40	0.50	120	30	2	13.74
11	16	3	1.40	0.50	210	30	2	4.76
12	6	3	0.70	0.30	120	30	2	11.08

表 3 PB 试验因素效应分析

Table 3 Effect analysis of factors of Plackett-Burman experiments

影响因素	平方和	自由度	均方	回归系数	F 值	P 值	显著性
麸皮	30.46	1	30.46	1.58	10.24	0.001 9	**
玉米浆干粉	88.29	1	88.29	2.56	35.27	0.002 5	**
MnSO ₄	11.03	1	11.03	0.87	3.14	0.025 2	*
MgSO ₄	-8.63	1	8.63	0.80	2.56	0.112 0	
转速	-6.65	1	6.65	0.74	2.05	0.198 1	
发酵温度	-6.94	1	6.94	0.69	2.17	0.178 2	
通气量	5.85	1	5.85	0.77	1.78	0.225 4	

***、**、* 分别示 0.05、0.01 水平差异显著。

由表 2 和表 3 可知, 麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄ 和通气量为正效应, MgSO₄、转速、发酵温度为负效应。从 P 值来看, 麸皮、玉米浆干粉在置信区间 $P < 0.01$ 影响显著, MnSO₄ 在置信区间 $0.01 < P < 0.05$ 影响显著。以麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄ 的试验值变化梯度方向为爬坡方向, 根据各因素响应值大小确定变化步长, 在 40 °C、150 r/min、通气量 2.5 m³/h、接种量 5%、pH 7.0, 培养 40 h。最陡爬坡试验结果见表 4。由表 4 可知, 6 号试验凝结芽孢杆菌发酵液中芽孢数最多, 达 1.89×10^{10} cfu/mL。故采用麸皮 36.0 g/L, 玉米浆干粉 15 g/L, MnSO₄ 0.84 g/L, 进行后续工艺优化试验, 其他发酵条件为发酵温度 40 °C、转速 150 r/min、通气量 2.5 m³/h、接种量 5%、pH 7.0, 培养 40 h。

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 The design and results of the steepest ascent experiments

试验 序号	麸皮质量 浓度/(g·L ⁻¹)	玉米浆干粉质 量浓度/(g·L ⁻¹)	MnSO ₄ 质量 浓度/(g·L ⁻¹)	芽孢数/ (×10 ¹⁰ cfu·mL ⁻¹)
1	11	5	0.34	0.98
2	16	7	0.44	1.06
3	21	9	0.54	1.32
4	26	11	0.64	1.55
5	31	13	0.74	1.76
6	36	15	0.84	1.89
7	41	17	0.94	0.76
8	46	19	1.04	0.55
9	51	21	1.14	0.21

3.9 中心复合试验设计

最陡爬坡试验确定了麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄取值区间,利用 Design Expert 8.0.6 进行中心复合试验设计。以麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄的质量浓度为自变量,分别用 x_1 、 x_2 、 x_3 表示,以凝结芽孢杆菌芽孢数(y)为响应值。试验因素与水平见表 5,试验结果见表 6,回归模型方差分析结果见表 7。

表 5 中心组合试验设计因素与水平

Table 5 Factors and levels of central composite experiments

design 试验水平	g/L		
	麸皮 质量浓度	玉米浆干粉 质量浓度	MnSO ₄ 质量浓度
-1	31	13	0.74
0	36	15	0.84
1	41	17	0.94

表 6 中心组合试验结果

Table 6 The results of central composite experiments

试验号	麸皮质量 浓度/(g·L ⁻¹)	玉米浆干粉质 量浓度/(g·L ⁻¹)	MnSO ₄ 质量 浓度/(g·L ⁻¹)	芽孢数/ (×10 ¹⁰ cfu·mL ⁻¹)
1	31	13	0.84	1.78
2	41	13	0.84	1.22
3	31	17	0.84	1.58
4	41	17	0.84	1.34
5	31	15	0.74	1.57
6	41	15	0.74	1.08
7	31	15	0.94	1.69
8	41	15	0.94	1.48
9	36	13	0.74	1.88
10	36	17	0.74	1.97
11	36	13	0.94	2.09
12	36	17	0.94	2.05
13	36	15	0.84	2.57
14	36	15	0.84	2.45
15	36	15	0.84	2.64
16	36	15	0.84	2.55
17	36	15	0.84	2.65

表 7 回归模型方差分析结果

Table 7 The results of variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	差异显著性
模型	4.20	9	0.47	90.63	< 0.000 1	**
x_1	0.28	1	0.28	54.60	0.000 2	**
x_2	1.125×10 ⁻⁴	1	1.125×10 ⁻⁴	0.022	0.886 7	
x_3	0.082	1	0.082	15.92	0.005 3	**
x_1x_2	0.026	1	0.026	4.97	0.061 0	
x_1x_3	0.020	1	0.020	3.81	0.092 1	
x_2x_3	4.225×10 ⁻³	1	4.225×10 ⁻³	0.82	0.395 2	
x_1^2	2.81	1	2.81	545.98	< 0.000 1	**
x_2^2	0.32	1	0.32	61.71	0.000 1	**
x_3^2	0.38	1	0.38	73.45	< 0.000 1	**
残差	0.036	7	5.151×10 ⁻³			
失拟项	9.975×10 ⁻³	3	3.325×10 ⁻³	0.51	0.696 6	
纯误差	0.026	4	6.520×10 ⁻³			
总差	4.24	16	0.47			
决定系数 R^2	0.991 5					
校正系数 R_A^2	0.980 6					
预测 R_P^2	0.952 7					
信噪比	26.810					

“***”示 0.01 水平差异显著。

经过二次多项回归拟合后,得到以下回归方程预测模型:

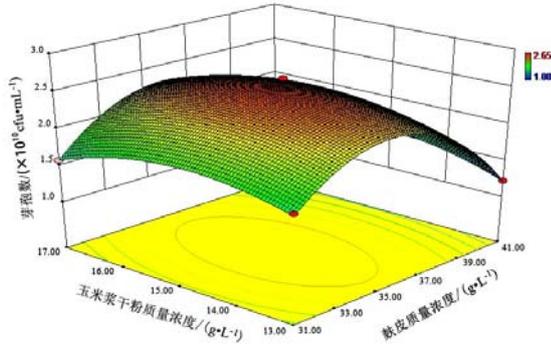
$$y=2.57-0.19x_1-3.75x_2+0.1x_3+0.08x_1x_2+0.07x_1x_3-0.33x_2x_3-0.82x_1^2-0.27x_2^2-0.3x_3^2。$$

由表 7 可知,模型 $P<0.000 1$,表明模型对响应值 y 影响显著,具有很高的可信度,模型的决定系数 $R^2=0.991 5$,且模型失拟项的 P 值为 0.696 6($P>0.05$),

影响不显著,说明建立的模型可以较好地反映不同条件下凝结芽孢杆菌产孢数变化情况,可以用回归方程对凝结芽孢杆菌产孢情况进行分析和预测。

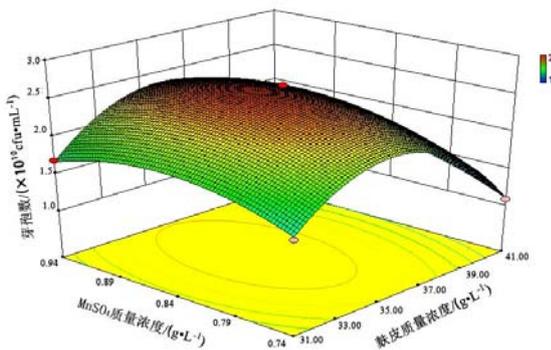
利用 Design Expert 8.0.6 对回归模型进行分析,得到麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄三者之间的响应面图,图 6、图 7、图 8 分别表示了麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄之间的交互作用对凝结芽孢杆菌产孢

的影响。利用 Design Expert 8.0.6 软件对本试验进行拟合分析,得到最适凝结芽孢杆菌发酵培养基中麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄ 对应的参数为 36.91、13.70、0.84 g/L,此条件下凝结芽孢杆菌产孢数为 2.78×10¹⁰ cfu/mL(预测值)。



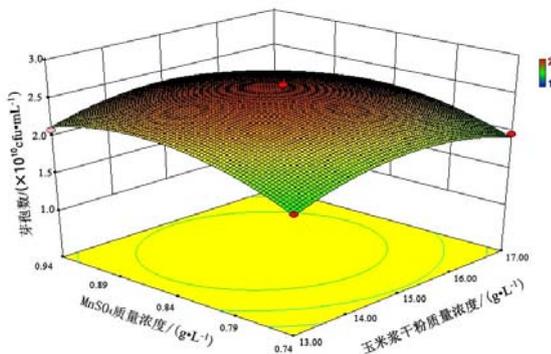
MnSO₄ 的质量浓度为 0.84 g/L。

图 6 麸皮与玉米浆干粉交互作用对芽孢数影响的响应面
Fig.6 Response surface plots between bran and corn steep powder extract on spore number



玉米浆干粉的质量浓度为 15.00 g/L。

图 7 麸皮与 MnSO₄ 交互作用对芽孢数影响的响应面
Fig. 7 Response surface plots between bran and MnSO₄ extract on spore number



麸皮的质量浓度为 36.00 g/L。

图 8 玉米浆干粉与 MnSO₄ 交互作用对芽孢数影响的响应面
Fig.8 Response surface plots between powder and MnSO₄ extract on spore number

为了证实上述优化条件的准确性,使用最优培

养基进行凝结芽孢杆菌产孢数试验,实际产芽孢数为 2.848×10¹⁰ cfu/mL(试验值),同预测结果相近,说明本研究所建立的数学模型可靠。

3.10 凝结芽孢杆菌 500 L 发酵放大试验结果分析

在前期凝结芽孢杆菌发酵优化的基础上进行 500 L 发酵试验,结果见图 9。从图 9 可以看出,凝结芽孢杆菌在 0~8 h 时,发酵液 pH 呈下降趋势,其间发酵液营养丰富,菌体生长旺盛,没有芽孢生成;发酵 8 h 后,发酵液 pH 开始呈上升趋势;在 14 h 时,发酵液开始出现芽孢,芽孢数量为 5×10⁸ cfu/mL,同时菌体数量增长开始变缓;发酵 20 h 时,凝结芽孢杆菌活菌数达最大值(3.01×10¹⁰ cfu/mL),此时发酵液营养已基本消耗完全,有大量芽孢开始产出;36 h 时芽孢数达到最大(2.98×10¹⁰ cfu/mL),这一结果同凝结芽孢杆菌高密度发酵优化结果相近(2.848×10¹⁰ cfu/mL),表明本研究工艺可以用于生产推广,实现对凝结芽孢杆菌高密度发酵。

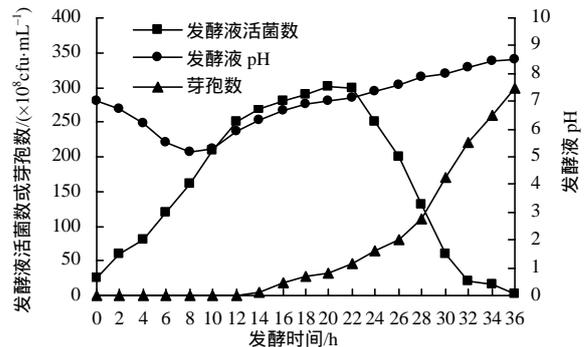


图 9 凝结芽孢杆菌 500 L 发酵试验结果
Fig.9 The results of 500 L fermentation test of *Bacillus coagulans*

4 结论与讨论

经过单因素试验、PB 试验设计、最陡爬坡试验、响应面设计分析,确定凝结芽孢杆菌最优发酵培养基配方为麸皮、玉米浆干粉、MnSO₄ 分别为 36.91、13.70、0.84 g/L,凝结芽孢杆菌芽孢数达 2.848×10¹⁰ cfu/mL,比优化前芽孢数提高了 61.72%。在优化培养基的基础上,对凝结芽孢杆菌进行 500 L 放大试验,发酵温度 40 ℃、转速 150 r/min、通气量 2.5 m³/h、接种量 5%、pH 7.0、培养时间 36 h,芽孢数量达到 2.98×10¹⁰ cfu/mL,试验结果同前期优化试验结果相近,说明本研究结果具有一定的稳定性及可重复性,为下一步生产推广提供了依据。

实际生产中,单一营养元素,如碳氮源、金属离子、培养条件都有可能成为限制凝结芽孢杆菌产孢的影响因素。本试验中,通过设置单一营养元素和高温环境,提高了凝结芽孢杆菌产孢率,相比严涛等^[22]的研究结果,芽孢数量提高了一个数量级。

随着益生菌研究的不断深入以及在各大民生领域的广泛应用,尤其是在“新冠疫情”的背景下,益生菌的作用被凸显出来。但在生产加工过程中相应的缺陷也不断暴露,如抗逆性差、保存条件要求严格、菌株活性衰减速率快等。凝结芽孢杆菌不仅具有乳酸菌的特性,还具有产芽孢休眠体特性,具有抗逆性强、安全、高效等优点,使得凝结芽孢杆菌微生态制剂逐渐成为当下的研究热点。本试验虽然得到了凝结芽孢杆菌高密度发酵条件,但后续产品开发以及产业化应用还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙研,王永红.不同凝结芽孢杆菌在单一及混合碳源下的发酵特性[J].食品工业科技,2020,41(16):74-80.
SUN Y, WANG Y H. Fermentation characteristics of different strains of *Bacillus coagulans* with single and mixed carbon sources[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 74-80.
- [2] 张奕敏,程辉,柳良好,等.奶粉中凝结芽孢杆菌的分离鉴定及其耐受性研究[J].食品与发酵工业,2020,46(16):110-114.
ZHANG Y M, CHENG H, LIU L H, et al. Isolation, identification and stress resistance of *Bacillus coagulans* from milk powder[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(16): 110-114.
- [3] SUDHA M R, CHAUHAN P, DIXIT K, et al. Molecular typing and probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans*-Unique IS-2: a potential biotherapeutic agent [J]. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2010: GEBJ-7.
- [4] MANDEL D R, 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] MIDHUN S J, NEETHU S, VYSAKH A, et al. Antagonism against fish pathogens by cellular components/preparations of *Bacillus coagulans* (MTCC-9872) and its in vitro probiotic characterisation[J]. Current Microbiology, 2018, 75(9): 1174-1181.
- [6] 肖新云,刘又嘉,邓艳玲,等.1株小鼠肠道酵母菌的分离与鉴定[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2016,42(4):419-423.
XIAO X Y, LIU Y J, DENG Y L, et al. Isolation and identification of a yeast strain from intestine of mice[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2016, 42(4): 419-423.
- [7] 王金果,莫云,张玳华,等.产乳酸凝结芽孢杆菌 N001 的抗逆性研究[J].中国微生态学杂志,2007,19(6):489-491.
WANG J G, MO Y, ZHANG D H, et al. Stress resistance of Lactic acid-producing *Bacillus coagulans* N001[J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 19(6): 489-491.
- [8] 刘转,邱成书,敬小兵,等.凝结芽孢杆菌 001RC 的分离鉴定及其抗逆性研究[J].四川大学学报(自然科学版),2013,50(2):385-390.
LIU Z, QIU C S, JING X B, et al. Study on the isolation, identification and tolerant property of *Bacillus coagulans* 001RC[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2013, 50(2): 385-390.
- [9] 安济山,胡睿智,杨玲,等.凝结芽孢杆菌的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J].动物营养学报,2020,32(3):1076-1083.
AN J S, HU R Z, YANG L, et al. Biological function of *Bacillus coagulans* and its application in livestock and poultry production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(3): 1076-1083.
- [10] NYANGALE E P, FARMER S, CASH H A, 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.
- [11] 戴青,赵述森,谢树贵,等.一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及生物学特性研究[J].饲料工业,2008,29(12):36-38.
DAI Q, ZHAO S M, XIE S G, et al. Isolation and screening of a strain of *Bacillus coagulans* and study on its biological characteristics[J]. Feed Industry, 2008, 29(12): 36-38.
- [12] SASAKI K, SASAKI D, INOUE J, et al. *Bacillus coagulans* SANK 70258 suppresses *Enterobacteriaceae* in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(9): 3859-3867.
- [13] 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.
ZHOU Y H, WU S L, HU X X, et al. The effect of different bacillus on the performance of weaned piglets[J]. Feed Industry, 2012, 33(3): 21-23.
- [14] 黄世猛,黄楚然,赵丽红,等.凝结芽孢杆菌对感染沙门氏菌蛋鸡生产性能、蛋品质和血浆生化指标的影响[J].动物营养学报,2017,29(12):4534-4541.

- HUANG S M, HUANG C R, ZHAO L H, et al. Effects of *Bacillus coagulans* on performance, egg quality and plasma biochemical parameters of laying hens infected with *Salmonella*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(12): 4534–4541.
- [15] 袁丰华, 林黑着, 李卓佳, 等. 凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长、消化酶及非特异性免疫酶的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(6): 792–797.
- YUAN F H, LIN H Z, LI Z J, et al. Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, digestive enzymes and nonspecific immune enzymes of sea bass (*Lateolabrax calcarifer*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(6): 792–797.
- [16] 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.
- LIU N N, LIU C J, LI H J, et al. Research progresses and related action mechanism of probiotics applied in aquatic animal feed[J]. Feed Industry, 2014, 35(14): 53–56.
- [17] 刘艳, 胡永红, 杨文革, 等. 益生凝结芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(8): 1861–1865.
- LIU Y, HU Y H, YANG W G, et al. Optimization of fermentation medium of the prebiotics *Bacillus coagulans*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(8): 1861–1865.
- [18] 董佩佩, 汪祥燕, 刘元香, 等. 一株凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 28–32.
- DONG P P, WANG X Y, LIU Y X, et al. Optimization of fermentation medium of *Bacillus coagulans*[J]. China Brewing, 2018, 37(4): 28–32.
- [19] 侯爱香, 王一淇, 姜辉, 等. 基于 Plackett–Burman 的湖南芥菜发酵菌种高密度培养条件优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017, 43(6): 669–675.
- HOU A X, WANG Y Q, JIANG H, et al. Optimizing the high-density culture conditions for bacteria fermentation of Chinese leaf mustard based on Plackett–Burman[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2017, 43(6): 669–675.
- [20] 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.
- XU S R, CHEN X, WU Y P. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4): 121–126.
- [21] 谭周进, 肖克宇, 肖启明, 等. 乳酸菌计数培养基和培养方法的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(5): 398–400.
- TAN Z J, XIAO K Y, XIAO Q M, et al. Screening of mediums and culture methods for enumerating lactic acid bacteria[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2001, 27(5): 398–400.
- [22] 严涛, 朱建国, 姜甜, 等. 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 238–249.
- YAN T, ZHU J G, JIANG T, et al. Isolation and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans*[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 238–249.
- [23] 王艳萍, 陈莹, 赵虎山, 等. 一株芽孢乳酸杆菌 TQ33 产芽孢特性及抗性的研究[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(3): 9–12.
- WANG Y P, CHEN Y, ZHAO H S, et al. Studies on the function of TQ33 strain with homolactic fermentation[J]. China Dairy Industry, 1996, 24(3): 9–12.
- [24] CHARNEY J, FISHER W P, HEGARTY C P. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(2): 145–148.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳正