

利用味精废水发酵生产苏云金芽孢杆菌的发酵条件研究*

杨建州 张松鹏

(中国科学院生态环境研究中心,北京,100085)

摘 要 利用搅拌转速为 180 r/min 的 5 L 发酵罐,研究了 1 株驯化后的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 在味精废水中发酵生产生物农药的适宜工艺条件,并对发酵过程中的各个指标进行了检测。在 1.2 m³ 规模的发酵罐中发酵菌数可达 68.7×10^8 /mL,毒力效价与标准品相当。

关键词 味精废水 苏云金芽孢杆菌 发酵条件

我国味精工业每年排出上亿吨以上的高浓度有机废水,这是味精厂的主要污染源且处理也最为困难,废水处理问题已成为我国味精工业面临的一大难题^[1]。虽然味精工业废水中含有大量可利用的营养成分,但处理成本常成为限制可资源化的重要因素。已经证明苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)制剂是 1 种生态效益良好的生物农药,并且可以利用工农业废料进行生产,很值得深入研究和大量生产^[2~4]。为此,作者以味精废水为对象探讨了 1 条经济效益和环境效益好的利用高浓度有机废水生产生物农药的方法。本文利用 5 L 的全自动搅拌式发酵罐研究了苏云金芽孢杆菌在味精废水中的发酵条件,并在 1.2 m³ 发酵罐中进行了检验,以供有关方面工业化时参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

(1) 味精废水:取自山东某味精厂。

(2) 菌种:本中心驯化的苏云金芽孢杆菌。

1.2 培养基与培养条件

培养基基本成分为:豆饼粉 2.5%,酵母粉 2.5%,淀粉 2.5%,玉米浆 3.0% (干粉度 26.9%), K₂HPO₄ 0.4%, ZnSO₄ 0.02%, MnSO₄

0.02%, CaCO₃ 0.3%。液体种子培养基中添加的是 1/2 味精废水,150 mL 三角瓶装 30 mL,灭菌后接种,31℃ 振荡培养(转速 100 r/min) 18 h。发酵培养基中添加完全的高浓度味精废水,5 L 发酵罐装 3 L,31℃ 振荡培养(转速 180 r/min)。

1.3 分析方法

(1) 菌数测定:血球计数板法计数^[5]。

(2) pH 测定:酸度计法,结果以 3 位有效数字表示。

(3) 还原糖测定:DNS 定糖法^[1]。

(4) 硫酸根测定:EDTA 络合滴定法^[1]。

(5) 甲醛氮测定:甲醛法^[6]。

1.4 主要仪器设备

HZ-9211K 恒温振荡器:江苏太仓实验设备厂;Cole Parmer pH/mV/℃ meter:Singapore 产;BF-07 型自动控制发酵罐:山东牟平仪器厂。

2 结果与讨论

2.1 碳源对发酵的影响

淀粉、玉米粉、葡萄糖和糖蜜都是苏云金杆菌发酵时常用的碳源,培养基中含有适量的葡萄糖,可以促进菌体生长,缩短发酵周期,但由于受 Fe²⁺ 和 PO₄³⁻ 等离子影响,葡萄糖在灭菌时很容易焦糖化,即碳化,碳化作

第一作者:博士,副研究员。

* 中科院“九·五”特别支持课题(中科院 KZ-95T05)

收稿时间:2002-02-20

用对发酵有很大影响^[1]。由于苏云金杆菌在生长过程中能分泌活跃的胞外淀粉酶^[7~9],所以在选择碳源时我们选择淀粉为碳源,它既可以克服葡萄糖代谢过快的弊病,保持发酵后期有一定的糖源;同时淀粉来源丰富,价格低廉,在味精厂专门有淀粉生产车间,因而可大大降低成本。实验结果如图 1 所示。

2.2 氮源对发酵的影响

Salam^[9]等证实,苏云金杆菌的毒力与所用氮源的种类有关,有机氮的多少对发酵液的菌数影响显著。在经过分解的蛋白质培养基中,营养体的发育同步性较好并能更好地形成芽孢。苏云金杆菌在比较短的培养时间内,能够分解吸收蛋白质的产物——氨基酸和蛋白胨,而对无机氮难以利用。培养基的碳氮比不同,培养结束后发酵液中营养体与释放的芽孢、伴孢晶体比例不同,即使生长同步,能达到全部释放芽孢和伴孢晶体的培养基也会因碳氮比不同而对昆虫的致死百分率不同。苏云金杆菌在利用糖时会大量产酸,如果糖浓度太高,发酵液的酸碱度可能会降到 5.5 以下,这种 pH 会抑制或阻止苏云金杆菌的生长,苏云金杆菌在利用氮源时会产生一些碱性物质,同时会利用糖代谢时产生的酸性中间产物,因此糖浓度过少,对苏云金杆菌发酵也是不利的,因此,选择合适的原料和碳氮比对工业生产是极其必要的。根据已有的发酵经验,采用豆饼粉、酵母粉和玉米浆作为氮源进行实验。结果见图 1。

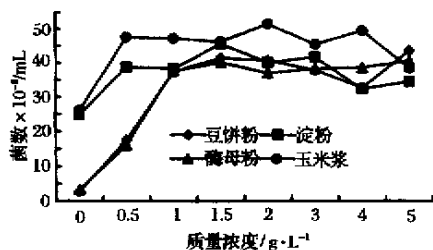


图 1 不同营养成分对菌数的影响

从图 1 中可以看出,这 4 种营养成分对菌数有较大的影响,而作为有机氮源的豆饼粉、酵母粉是不可缺少的。初始当豆饼粉或

酵母粉含量为零时,菌数很少,此时豆饼粉或酵母粉为限制性因素,是造成培养基的碳氮比过高引起的。研究表明^[10~12],合适的碳氮比是苏云金杆菌正常发酵的关键性因素之一。若不添加任何营养成分,该菌种在废水中也可以正常生长,并且菌数也可以达到 $1.0 \times 10^9/\text{mL}$ 左右。所以当在废水环境中培养 Bt 菌时,适宜的培养基碳氮比尤为重要。当豆饼粉的质量浓度达到 1.5 g/L 以后,再增加豆饼粉的量,菌数反而有所降低,这可能是因为豆饼粉浓度增加后,溶液中氧的溶解性降低导致的。

玉米浆的作用不仅仅作为氮源,更重要的是可以为菌体生长提供大量的生物素,但玉米浆本身含有大量的酸,中和又会产生大量的盐,从而加重渗透压的影响,所以添加的量要尽量减少。

2.3 KH_2PO_4 对发酵的影响

废水预处理采用 CaO 4% 的添加量,搅拌均匀后静置沉淀,取上清液加入基本培养基配方后添加不同浓度的 KH_2PO_4 ,灭菌后培养检测。磷在苏云金杆菌的代谢中非常重要,磷是组成核酸和磷脂的成分,高能磷酸化合物以及许多重要的酶活性基团中也都含有磷,此外,磷酸盐还对细胞和环境中的酸碱度起缓冲作用。苏云金杆菌主要从无机磷酸化合物中获得磷,磷进入细胞后,即迅速同化为有机的磷酸化合物。

K 是影响芽孢和伴孢晶体形成的重要矿质元素,伴孢晶体的形成与芽孢的形成密切相关,K 通过对芽孢的形成起调节作用,进而影响到伴孢晶体的形成。K 不参与细胞结构物质的组成,它是许多酶的激活剂,可以促进碳水化合物的代谢,也控制着原生质的状态和细胞质膜的透性,K 在细胞内的浓度比培养基中高得多,对维持细胞的离子平衡起着不可忽视的作用^[13]。有研究表明^[10],在半合成培养基中,不加 KH_2PO_4 时,对昆虫没有毒力,加入 0.1% 和 0.5% 对昆虫的毒力最高达 80%,加入 1.0% 时,毒力反而下降到

31%,加入 2.0%和 4.0%时,对昆虫却无毒性,这说明 P 和 K 均为苏云金杆菌所需要的主要矿质养料。废水中已经含有较多的 P 和 K,但在预处理过程中损失了一部分 P 和 K,所以需要在培养基中加入适量 P 和 K。

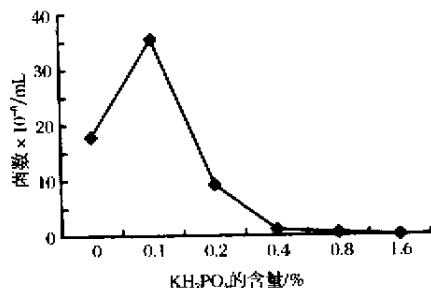


图2 KH₂PO₄对菌数的影响

从图2可以看出,当 KH₂PO₄ 添加量为 0.1%时,菌数达最高,再增加 KH₂PO₄,则菌数急剧下降。实验中还发现,当继续培养到 36h 后, KH₂PO₄ 含量为 0.4% 的菌数也能达到 3.0×10^9 /mL,可见过量的 KH₂PO₄ 加长了延迟期。这可能是增加了溶液中的渗透压所致,所以进行发酵时 KH₂PO₄ 的添加量应控制在 0.1% 以内。

2.4 CaCO₃对发酵的影响

钙不参与细胞结构,但芽孢的形成必须有钙的参与。钙以离子状态控制细胞的生理状态,如可以降低细胞质膜的透性、调节酸碱度,并对一些阳离子的毒性有拮抗作用^[11],所以在培养基中添加适量的 CaCO₃ 对提高发酵液的毒力效价是有利的。在后处理中也需要添加部分 CaCO₃,这是因为 Mg²⁺、Ca²⁺ 离子能够激活和增强敏感昆虫中肠蛋白酶的活性,从而加速 Bt 原毒素向活化毒素的转化^[14~16]。味精废水中虽然含有部分 Ca²⁺,但大量 SO₄²⁻ 的存在使可溶解的 Ca²⁺ 含量很少,采用 CaO 处理后,溶液中的钙多以 CaCO₃ 颗粒的形式存在,在菌体大量产酸时没有很好的缓冲作用,需要另外添加少量 CaCO₃。实验结果见图3。结果表明,在一定范围内, CaCO₃ 添加量的增加有利于菌数的提高,但过多的 CaCO₃ 则会降低菌数,具体原因不明,

估计是溶液中的 CaCO₃ 影响了溶液中氧的溶解传递与营养物质的吸收。所以 CaCO₃ 的添加量在 0.5% 以内为宜。

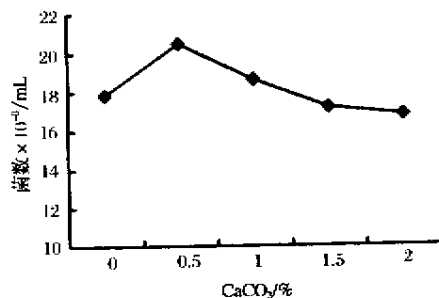


图3 不同 CaCO₃ 添加量对菌数的影响

2.5 初始 pH 对发酵的影响

废水预处理采用 4% CaO,搅拌均匀后加热沸腾 10 min,静置沉淀,取上清液加入基本培养基配方后,用烧碱和盐酸调节 pH,灭菌后培养检测。实验结果见图4。

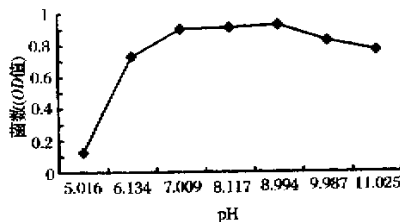


图4 初始 pH 对菌数的影响

实验表明,Bt 菌对 pH 有较高的耐性,可以在较宽的 pH 范围内很好的生长,当 $6.0 < \text{初始 pH 值} < 10.0$ 时,菌数相差不大。灭菌后 $\text{pH} < 6.5$ 后有利于芽孢的萌发和菌体的大量生长,但对后期晶体的形成不利, $\text{pH} > 7.5$ 则会延长芽孢的萌发期,因此灭菌后 pH 应在 6.8 左右为宜。预处理后的废水发酵配方灭菌后 pH 一般要降低 1 个单位左右,因此发酵液的初始 pH 选取 8.0 左右为好。

2.6 最佳发酵培养基组成及发酵过程检测

在 30℃,初始 pH8.0 左右的条件下,采用正交实验,并进行多元回归分析得出较佳培养基组成:豆饼粉 2.5%,淀粉 1.5%,玉米浆 4.0%,鱼粉 1.2%,KH₂PO₄ 0.1%,CaCO₃ 0.3%。在此条件下,对发酵过程进行动态监

测 结果如图 5 所示。

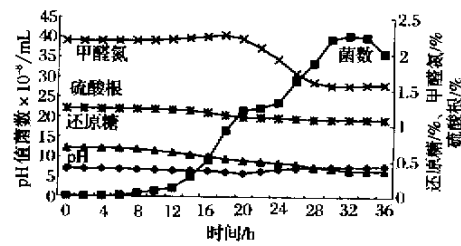


图 5 发酵过程动态监测

从图 5 可以看出,苏云金杆菌的芽孢在废水中的萌发期显著延长,而且菌体在对数期增殖阶段有过一段延迟。这可能是因为一旦苏云金杆菌适应了废水的生活环境,由于废水中含有大量的营养物质,所以菌体大量繁殖生长,同时培养基中某 1 种成分或溶解氧的缺乏就可能成为菌体生长的主要限制因素。一些菌体开始形成“空胞^[17]”,部分自融,但菌体大量生长也同时改善了废水的环

境,一些适应力强的菌体仍可以继续分裂完成对数期生长。在 30L 的全自动搅拌发酵罐培养过程中,也发现了相似的生长规律。硫酸根有所下降,并且下降趋势有与菌数增加大体吻合。苏云金杆菌在对数生长期可产生高活性的蛋白酶^[16]并能在较短的培养时间内分解蛋白质为氨基酸和蛋白胨。所以氨基氮的含量在对数生长期有所增加,但由于废水中含有大量氮氮对菌体生长的抑制作用,以及菌体开始合成晶体蛋白时消耗大量的氨基酸,所以氨基氮很快便开始降低。在 28 ~ 48 h 范围之内,氮氮和菌数没有显著的变化,但 pH 有所升高。40 h 后菌数开始明显减少,这说明在 40 h 左右菌体开始裂解。综合各项指标,最佳发酵时间以 40 ~ 48 h 为好,此时的菌体裂解比率大约为 5% ~ 15%。

2.7 较大规模试验

1.2 m³ 发酵罐,装液量 800 kg,接种量 320 mL,芽孢接种。罐压 0.1 ~ 0.13 MPa,转速 180 r/min,对上述发酵条件进行检验。

表 1 发酵培养结果

时间/h	温度/℃	pH	菌数 × 10 ⁻⁸ /mL	菌体形态
0	30	6.8		
8	30	6.7		少量细长杆菌,染色均匀
14	30	6.5	3.6	菌体染色深,活跃
18	30	6.9	6.1	大部分芽孢萌发完毕
22	31	7	12.6	菌体粗短,增值迅速
26	33	7	36.3	菌体处于对数生长期中期,两端变窄
30	34	7.4	54	部分菌出现透明小亮区
34	33	7.8	68.7	菌体染色较浅,已经处于对数生长末期
38	32	7.8	64.9	少数菌开始形成芽孢与晶体,个别释放
42	31	8		大部分菌形成芽孢与晶体,染色变深
44	31	8		晶体释放率在 5%
48	31	8		晶体释放率在 20%

表 2 发酵液的生物测定结果

样 品	44 h		对照品 *	
	(晶体释放率 95%)		(2000 IU/μL)	
稀释倍数	2000	8000	2000	8000
校正死亡率/%	82.8	69.0	58.6	72.4

注 对照品是湖北省农业科学院 Bt 开发中心研制。

从表 1 和表 2 可看出,在实验获得的条件下进行中等规模的扩大生产时菌数可达

6.87 × 10⁹/mL,而毒力效价与标准品相比没有显著的区别,这说明至少在中等规模的工厂化生产上本研究的发酵条件是切实可行的。

3 结 语

采用正交实验,进行多元回归分析,得

出较佳培养基组成:豆饼粉 2.5%,淀粉 1.5%,玉米浆 4.0%,鱼粉 1.2%, KH_2PO_4 0.1%, CaCO_3 0.3%。在此条件下进行了味精废水资源化生产生物农药并对发酵过程进行了动态监测。这为进一步研究味精废水资源化生产 Bt 生物农药提供了条件。Bt 发酵影响因素很多,例如废水预处理等,这些方面的研究将作另外的报道。

利用味精废水发酵苏云金芽孢杆菌生产 Bt 生物农药不仅能够处理味精废水、不会造成二次污染,而且能够得到高毒力、对环境无污染的生物农药,实际上是一举两得,为味精废水资源化提供了又一个选择空间。

参 考 文 献

- 1 于信令主编.味精工业手册.北京:轻工业出版社,1995
- 2 Jianzhou Yang, Hongyan Qi, Hongxun Zhang. The 3rd Pacific Rim Conference On Biotechnology *Bacillus thuringiensis*, China, Wuhan, 1999, 10 A~9
- 3 杨建州,张洪勋.化工冶金,1999,20(4):365~370
- 4 杨建州,鲁治宾.化工冶金,2000,21(1):35~39
- 5 诸葛健,王正祥主编.工业微生物实验手册.北京:中国轻工业出版社,1994
- 6 张克旭主编.氨基酸发酵工艺学.北京:中国轻工业出版社,1992
- 7 陈月华,任新改,梁凤来等.微生物学通报,1995,22(3):135~137
- 8 吴继星,陈在俱,谢天健等.生物防治通报,1994,10(3):110~113
- 9 陈锦权,黄志鹏,林建平等.化工学报,1997,48(4):407~416
- 10 喻子牛主编.苏云金芽孢杆菌制剂的生产与应用.北京:农业出版社,1993
- 11 复旦大学生物系微生物学教研室编.微生物学.北京:高等教育出版社,1992
- 12 袁志明,张用梅等.工业微生物,1993,22(2):13~18
- 13 Roop Singh Bora, Murty M G, Shenbagarathai R. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 50(1):214~222
- 14 Bechtel D B, Bulla L A. J. Bacteriol., 1976, 127: 1472~1481
- 15 Bulla L A. Biology of *Bacillus thuringiensis*. New York: Plenum Press, 1982. 1~23
- 16 Proon H, Knight B C J G. J. Gen. Microbiol., 1955, 13:474~480
- 17 顾真荣,马承铸,张繁琴等.杀虫微生物,1992,4:98~102

Study on the Conditions of *Bacillus thuringiensis* Fermentation in Monosodium Glutamate Wastewater

Yang Jianzhou Zhang Songpeng

(Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 100085)

ABSTRACT The optimum conditions of *Bacillus thuringiensis* fermentation in monosodium wastewater were studied. The strain could produce $40.56 \times 10^8/\text{mL}$ in 5L fermenter when cultivated for 40~48 hours under such conditions: soybean powder 2.5%, starch 1.5%, corn steep liquor 4.0%, fish meal 1.2%, KH_2PO_4 0.1%, CaCO_3 0.3%, initial pH 8.0, temperature 31°C, stirring rate 180 r/min. In addition, the changes of various parameters during the fermentation process were studied. Furthermore, the *Bac. thuringiensis* concentration in 1.2 m³ fermentor was $68.7 \times 10^8/\text{mL}$ and the toxicity under such conditions was indistinguishable with standard sample whose toxicity unit is 2000 IU.

Key words monosodium glutamate wastewater, *Bacillus thuringiensis*, fermentation conditions