

解淀粉芽孢杆菌 L-S60 生物学特性及其固态发酵工艺研究

王卉 游成真 秦宇轩 李平兰*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 以优良植物生防菌解淀粉芽孢杆菌 L-S60 为研究对象,通过单因素试验研究酸碱、盐浓度、温度对该菌株生长的影响;检测解淀粉芽孢杆菌 L-S60 的产酶和抑菌特性;并研究优化解淀粉芽孢杆菌 L-S60 的固态发酵工艺。结果表明:解淀粉芽孢杆菌 L-S60 具有较宽的酸碱耐受性,盐的质量分数 $>10\%$ 时菌落数会显著下降, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下菌落数无明显变化。解淀粉芽孢杆菌 L-S60 能产生蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶,且对多种病原真菌有抑制作用。L-S60 的最佳固体发酵条件为:温度 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、接种量 30% 、料水质量比 $1:0.45$ 、装瓶量 40% 和发酵时间 42 h ;最佳固体培养基组成为, m (花生饼粉): m (麦麸): m (棉粕) $=53:35:12$,外源物质蛋白胨、葡萄糖和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量分别为 3.00 、 2.00 和 0.20 g/kg ,此时,解淀粉芽孢杆菌 L-S60 菌落数达到 $2.42 \times 10^{10}\text{ CFU/g}$ 。解淀粉芽孢杆菌 L-S60 具有很好的开发利用价值。

关键词 解淀粉芽孢杆菌;生物学特性;固态发酵;菌落数

中图分类号 S 482.292

文章编号 1007-4333(2016)09-0133-10

文献标志码 A

The biological characteristics and solid-state fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60

WANG Hui, YOU Cheng-zhen, QIN Yu-xuan, LI Ping-lan*

(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The impacts of concentration of acid, alkali, salt and the temperature on the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 were investigated through single factor experiments. The biological features of L-S60 were studied and the solid-state fermentation condition of this strain was optimized in this study. The results showed that: The resistance of *B. amyloliquefaciens* L-S60 to acid and alkali is robust; the colony number of L-S60 dropped significantly when the salt concentration exceeded 10% ; there was no significant difference of the colony number of L-S60 when the temperature is under $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Strain L-S60 could produce amylase, protease and cellulose. It also showed strong inhibitory effects on a variety of pathogenic fungi. In order to make *B. amyloliquefaciens* L-S60 a good bio-fertilizer, the solid fermentation conditions and medium composition were also explored. The optimum temperature was $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, the inoculum concentration was 30% and the ratio of material and water was $1:0.45$. We chose 40% as the amount of bottling and 42 h as the fermentation time. The best solid fermentation medium contained 53% of peanut shell powder, 35% of wheat bran, and 12% of cottonseed meal. Finally, extra nitrogen source (3.00 g/kg), carbon source (2.00 g/kg), and inorganic salt ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/kg) were added in the solid state fermentation medium. Under this condition, the number of *B. amyloliquefaciens* colonies L-S60 reached $2.42 \times 10^{10}\text{ CFU/g}$.

Keywords *Bacillus amyloliquefaciens*; biological characteristics; solid-state fermentation; the number of colonies

近年来,化肥、农药等化学品的过量使用甚至滥用,导致环境污染、生物多样性破坏、生态环境恶化等问题日益严峻。与此同时,微生物肥料以高效、环

保、安全等诸多优点受到人们的关注,制备微生物肥料已成为实现生态农业的主要手段之一。因此,筛选高效、安全的植物根际促生菌,制备微生物肥料,

收稿日期:2015-08-13

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目

第一作者:王卉,硕士研究生,E-mail:wanghai31240@163.com

通讯作者:李平兰,教授,主要从事应用微生物的研究,E-mail:lipinglan@cau.edu.cn

发挥微生物对植物生长发育的促进作用,具有重要的现实意义。

固态发酵(Solid-state fermentation, SSF)^[1]是指微生物在一定湿度的固体基质上生长发酵的过程。目前,微生物固态发酵已广泛用于酶制剂^[2]、风味制剂^[3]、食品^[4]、饲料^[5]和农业^[6]等领域,具有广阔的应用前景。

前期研究表明,实验室保藏的1株解淀粉芽孢杆菌 L-S60 具有优良的植物促生长效果,具有开发成生物肥料在农业生产中广泛应用的潜力。本研究旨在探究解淀粉芽孢杆菌 L-S60 的生物学特性,开发该菌株的固态发酵活菌制剂,以期对今后的工厂化育苗生物肥料生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试试验菌株:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)L-S60 菌株 2012 年分离于草炭土育苗基质,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),编号 10045;病原真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、黑根霉菌(*Rhizopus nigricans*)、青霉菌(*Green rhizopus*)、绿曲霉菌(*Green aspergillus*)、根霉菌(*Rhizopus*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、桔青霉菌(*Penicillium citrinum*)均由中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供。

1.2 主要仪器设备及药品试剂

1.2.1 主要仪器设备

垂直流洁净工作台为北京赛伯乐实验仪器有限公司生产的 SCL-1300 型;高速离心机为长沙平凡仪器仪表有限公司生产的 TG16W 型;电热恒温培养箱为上海精宏实验设备有限公司生产的 DNP-9162 型;紫外分光光度计为上海美谱达仪器有限公司生产的 UV-1800;恒温振荡器为太仓市实验设备厂生产的 TH2-C 型。

1.2.2 主要药品试剂

酵母膏、蛋白胨和琼脂等购于北京奥博星生物技术有限责任公司;麦芽糖、果糖、胰蛋白胨、酪蛋白胨等购于北京蓝弋化工产品有限责任公司,分析纯;MnSO₄·H₂O、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O 等购于国药集团化学试剂有限公司,分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 L-S60 生物学特性

1) L-S60 菌悬液的制备。

挑取新鲜 L-S60 单菌落,接种于 LB 液体培养基,37 ℃,200 r/min 振荡培养过夜;8 000 r/min 离心 10 min,所得菌体用 0.85% 的 NaCl 溶液漂洗 3 次,并将菌液调至 10⁸ CFU/mL 备用。

2) L-S60 生长曲线。

将制备好的 L-S60 菌悬液接种于 LB 液体培养基,接种量为 5%,37 ℃,200 r/min 振荡培养,每隔 2 h 测定菌液的 OD₆₀₀,至 OD₆₀₀ 无显著变化为止,重复 3 次。

3) L-S60 耐酸碱、耐盐和耐热特性。

按 1.3.1 中 2) 的方法接种,耐酸碱特性试验用 0.1 mol/L HCL 或 0.1 mol/L NaOH 调节培养基的初始 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0;耐盐特性试验调节培养基的 NaCl 质量分数为 0、1%、3%、5%、7%、10%、15% 和 20%;耐热特性试验调节培养温度至 37、55、65、80 和 100 ℃,涂布法平板计数,重复 3 次。

4) L-S60 产酶特性。

产蛋白酶定性检测方法按肖怀秋^[7]的方法测定;产纤维素酶定性检测方法按董志扬等^[8]的方法测定;产淀粉酶定性检测方法按何盛华等^[9]方法测定;产脂肪酶定性检测方法按周晶^[10]方法测定;产脲酶定性检测方法按彭仁^[11]方法测定。

5) L-S60 抑制病原真菌特性。

用倾注法制备含 L-S60 的 PDA 固体培养基,分别接种病原真菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、黑根霉菌、青霉菌、绿曲霉菌、根霉菌、橄榄链格孢、灰霉菌、桔青霉菌,28 ℃ 恒温培养 48 h,测量其菌落直径和抑制率,抑制率=(对照直径-处理直径)/对照直径×100%。

1.3.2 L-S60 固态发酵工艺

1) 固态发酵培养基的筛选。

参考相关文献^[12-13],选取价格低廉的工农业废弃物麦麸、棉粕、米糠、酒糟、花生粕、向日葵粕等制备基质(表 1),对 L-S60 进行固体发酵,基质粉碎后过 20 目筛,加适量的水混合均匀,121 ℃ 灭菌 45 min,间歇灭菌 2 次,冷却后接入 L-S60 菌悬液,30 ℃ 培养 48 h。称取 10 g 固态发酵物,挂线法进行菌落计数,重复 3 次。

表 1 不同的固体发酵培养基及其 pH

Table 1 Different solid-state fermentation materials and their pH values

编号 Number	固体发酵培养基成分及质量分数 Ratio of different solid-state fermentation materials	pH
1	棉粕, 50%; 玉米皮粉, 20%; 豆粕, 20%; 麦麸, 10%	5.94
2	低纤维豆粕, 98.18%; 石灰, 0.91%; 葡萄糖, 0.91%	5.77
3	玉米皮粉, 5%; 花生粕, 16%; 酵母粉, 4%; 硫酸锰, 3%; 碳酸钙, 4%	5.57
4	麸皮, 80%; 低纤维豆粕, 10%; 碳酸钙, 1%	6.41
5	米糠, 90%; 低纤维豆粕, 10%	6.94
6	酒糟, 80%; 麸皮, 15%; 低纤维豆粕, 5%; 碳酸钙, 0.5%	4.55
7	花生饼粉, 53%; 麦麸, 35%; 棉粕, 12%	6.87
8	米糠, 50%; 粗麸, 30%; 草炭, 10%; 花生粕, 8%	5.99
9	米糠, 65%; 麸皮, 30%; 玉米粉, 2%; 葡萄糖, 2%; 蛋白胨, 1%	6.20
10	向日葵粕, 98.19%; 石灰, 0.91%; 葡萄糖, 0.91%	6.27

2) 料水质量比、接种量、装瓶量对固态发酵的影响。

料水优化试验调节培养基料水质量比为 1 : 0.30、1 : 0.40、1 : 0.45、1 : 0.50 和 1 : 0.55; 接种量优化试验按照 10%、15%、20%、30%、40% 和 50% 的接种量接种 L-S60 菌悬液; 装瓶量优化试验按照容量的 20%、30%、40%、50% 和 60% 装瓶, 搅拌均匀, 30 °C 培养 48 h, 菌落计数, 重复 3 次。

3) 温度、时间对固态发酵的影响。

温度优化试验将发酵温度设置为 30、35、40 和 45 °C; 时间优化试验分别将固态发酵物培养 0、6、12、18、24、30、36、42 和 48 h, 菌落计数, 重复 3 次。

4) 外加碳源、氮源、无机盐对固态发酵的影响。

为考察外加碳源对固态发酵的影响分别向固态基质中添加 0.2% 的淀粉、果糖、麦芽糖、葡萄糖和蔗糖; 为考察外加氮源对固态发酵的影响分别向固态基质中添加 0.2% 的酪蛋白胨、大豆蛋白胨、蛋白胨、鱼蛋白胨和胰蛋白胨; 为考察外加无机盐对固态发酵的影响分别向固态基质中添加 0.02% 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 发酵条件按照 1.3.2 中 3) 的优化结果, 菌落计数, 重复 3 次。

5) 外源物质对固态发酵影响的正交试验。

根据外源物质的单因素筛选结果, 选择对固态发酵水平影响较大的葡萄糖、蛋白胨及 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 设计 3 因素 3 水平正交试验(表 2)。

表 2 外源物质对固态发酵影响的正交试验设计

Table 2 Orthogonal test design of solid-state fermentation culture medium exogenous components

水平 Level	影响因素 Factor		
	A, 蛋白胨质量分数/(g/kg) Content of peptone	B, 葡萄糖质量分数/(g/kg) Content of glucose	C, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量分数/(g/kg) Content of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
1	1.00	1.00	0.10
2	2.00	2.00	0.20
3	3.00	3.00	0.30

1.4 统计分析

本研究所得数据用 Excel 2010 和 SPSS 17.0

软件进行数据统计分析, 置信度为 95% ($\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 L-S60 生物学特性

2.1.1 L-S60 生长曲线

图1示出L-S60的生长曲线,菌落在0~10 h内为迟缓期,生长缓慢;10 h后进入对数生长期,菌落数迅速增长;20 h进入稳定期;培养28 h, OD_{600} 为1.67时,达到最大菌落数 2.3×10^9 CFU/mL。

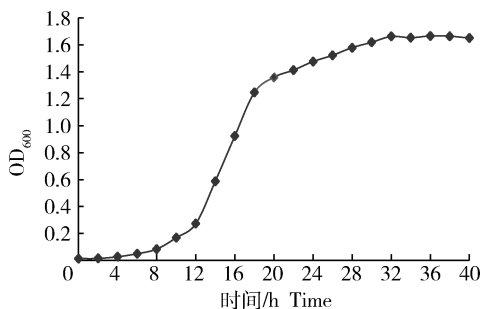
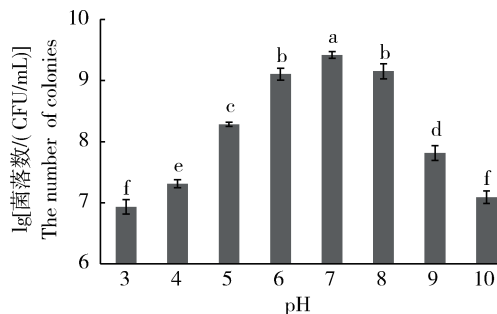


图1 L-S60 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *B. amylolique faciens* L-S60

2.1.2 L-S60 耐酸碱特性

L-S60 具有较宽的酸碱耐受能力(图2)。初始pH=7时,菌落数最大为 2.62×10^9 CFU/mL;随着pH的继续升高或降低,L-S60的菌落数逐渐下降;pH 5~9时,菌落数均能够达到 10^8 CFU/mL。



相同字母表示在0.05水平上无显著性差异,下同。

Values in figure are not significantly different at 0.05 level from each other according to Duncan Test. The same as follows.

图2 L-S60 耐酸碱能力

Fig. 2 Resistance to acid and alkali of *B. amylolique faciens* L-S60

2.1.3 L-S60 耐盐特性

NaCl质量分数为0~5%时,L-S60菌落生长未受影响。随着NaCl质量分数的继续上升,L-S60菌落数显著下降(图3)。

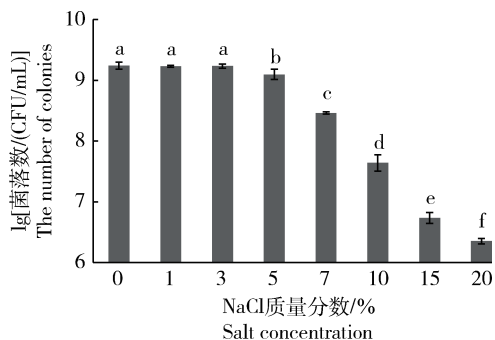


图3 L-S60 耐盐能力

Fig. 3 Resistance of salt of *B. amylolique faciens* L-S60

2.1.4 L-S60 耐热特性

L-S60耐热性较强,55~80℃处理对L-S60菌落数影响不大,100℃处理能显著降低L-S60的菌落数(图4)。

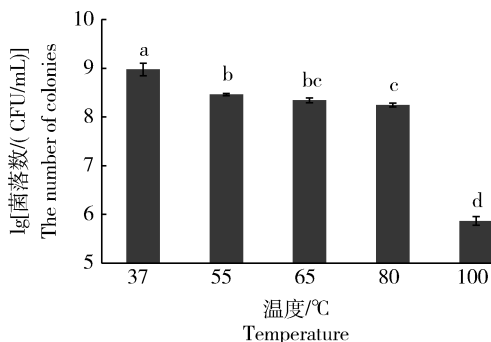


图4 L-S60 耐热能力

Fig. 4 Resistance of temperature of *B. amylolique faciens* L-S60

2.1.5 L-S60 产酶特性和抑真菌活性

解淀粉芽孢杆菌L-S60菌株能产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶,不产脂肪酶和脲酶(图5)。

L-S60发酵液能抑制多种病原真菌,具有广谱抗真菌能力;对立枯丝核菌、尖刀镰刀菌、青霉菌、橄榄链格孢等病原真菌均有强烈的抑制效果(表3)。

2.2 L-S60 固态发酵工艺

2.2.1 固态发酵培养基筛选

L-S60在不同固态发酵培养基中的菌落数见图6。在7号培养基发酵达到最大菌落数 5.1×10^9 CFU/g,采用7号培养基为后期的发酵培养基。6号培养基的菌落数最少为 6.5×10^6 CFU/g,这可能是因为该培养基的酸性环境(pH 4.55)导致菌株不能大量繁殖。

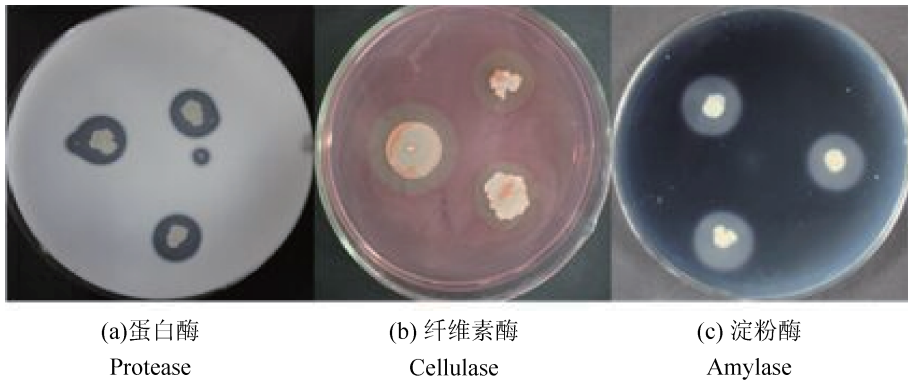


图 5 L-S60 产酶特性

Fig. 5 Productivity of enzyme by *B. amyloliquefaciens* L-S60

表 3 L-S60 对病原真菌的抑制效果

Table 3 Effect of L-S60 on the inhibition of pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungi	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Ratio of inhibition
立枯丝核菌	2.98±0.07 b	66.85±0.81 d
尖孢镰刀菌	1.22±0.12 de	86.48±1.30 ab
黑根霉菌	2.37±0.16 c	73.70±1.77 c
青霉菌	1.42±0.09 d	84.26±0.98 b
绿曲霉菌	0.93±0.02 e	89.63±0.19 a
根霉菌	3.30±0.15 a	63.33±1.69 e
橄榄链格孢	0.97±0.03 e	89.26±0.37 a
灰霉菌	1.20±0.06d e	86.67±0.64 ab
桔青霉菌	1.17±0.07 de	87.04±0.74 ab

注：每列数字后相同字母表示在 0.05 水平上无显著差异，下表同。
 Note: Values followed by the same letters in each column are not significantly different at 0.05 level from each other according to Duncan Test. The same as follows.

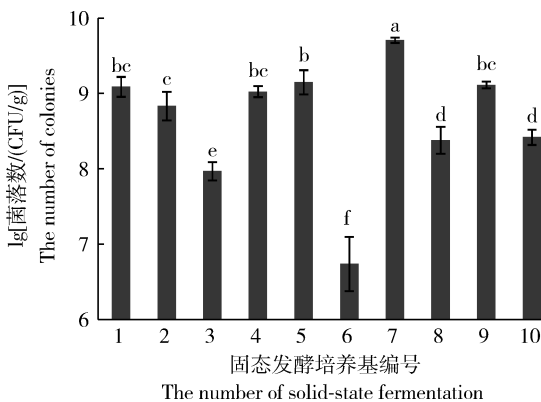


图 6 固态发酵培养基对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 6 Effect of solid state fermentation materials on the number of *B. amyloliquefaciens* L-S60

2.2.2 料水质量比对固态发酵的影响

随着料水质量比的递减,L-S60 菌落数呈现先增加后减少的趋势。料水质量比为 1 : 0.45 时,L-S60 菌落数达到最大值 1.15×10^{10} CFU/g (图 7)。

2.2.3 接种量对固态发酵的影响

L-S60 菌落数随接种量的增加呈先升高后降低的趋势,接种量为 30% 时,L-S60 菌落数达到最大值 8.53×10^9 CFU/g(图 8)。

2.2.4 装瓶量对固态发酵的影响

L-S60 菌落数在 20%~50% 装瓶量下差异不显著,当装瓶量为 40% 时,菌落数达到最高值 1.21×10^{10} CFU/g;装瓶量为 60% 时 L-S60 菌落数

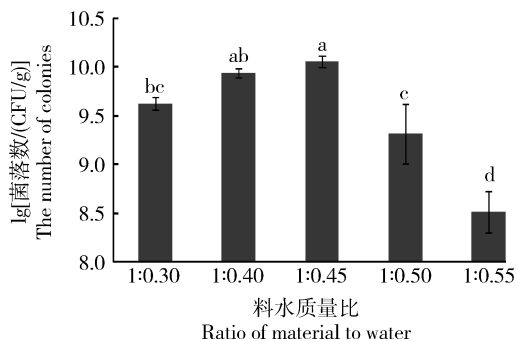


图7 料水质量比对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 7 Effect of water ratio on the number of *B. amylolique faciens* L-S60

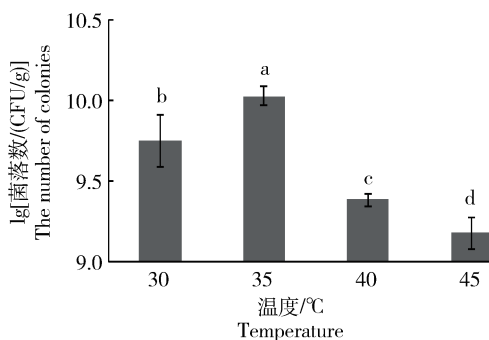


图10 温度对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 10 Effect of temperature on the number of *B. amylolique faciens* L-S60

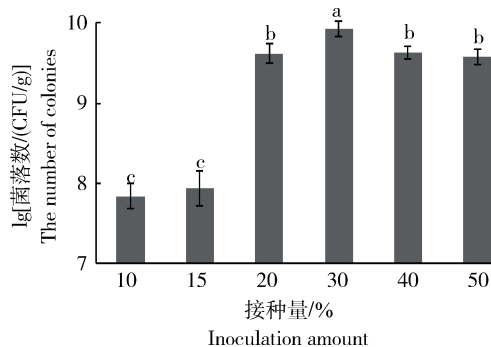


图8 接种量对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 8 Effect of inoculation amount on the number of *B. amylolique faciens* L-S60

2.2.6 时间对固态发酵的影响

L-S60 菌落数随发酵时间延长先增加后减少,其中固体发酵时间为 42 h 时,菌落数最高达 1.24×10^{10} CFU/g(图 11)。

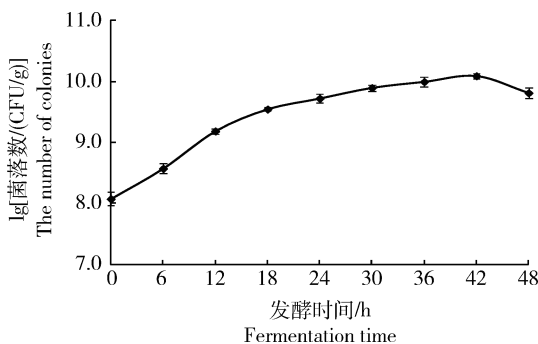


图11 发酵时间对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 11 Effect of time on the number of *B. amylolique faciens* L-S60

显著降低,可能是因为固态培养基中通气性不好抑制了菌落的生长(图 9)。

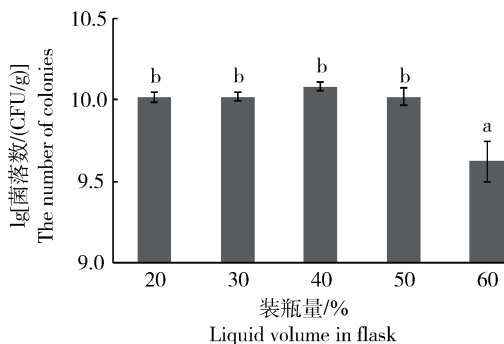


图9 装瓶量对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 9 Effect of bottling capacity on the number of *B. amylolique faciens* L-S60

2.2.5 温度对固态发酵的影响

随固态发酵温度的增加 L-S60 菌落数呈先增加后降低的趋势。温度为 35 °C 时,L-S60 菌落数最高达到 1.08×10^{10} CFU/g(图 10)。

2.2.7 外加碳源对固态发酵的影响

除添加果糖外,其他处理组 L-S60 的菌落数均高于对照,添加葡萄糖时,L-S60 菌落数最高,可达 2.03×10^{10} CFU/g。淀粉、麦芽糖和蔗糖均可分解产生葡萄糖,说明该菌株能很好的利用含葡萄糖单位的糖类。添加果糖反而会抑制菌落的生长(图 12)。

2.2.8 外加氮源对固态发酵的影响

除添加鱼蛋白胨外,其他处理组 L-S60 菌落数均高于对照,其中添加蛋白胨时,L-S60 菌落数最高,可达 1.66×10^{10} CFU/g(图 13)。

2.2.9 外加无机盐对固态发酵的影响

外源添加 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 处理组的 L-S60 菌落数显著高于对照组,菌落数最高为 2.15×10^{10} CFU/g;

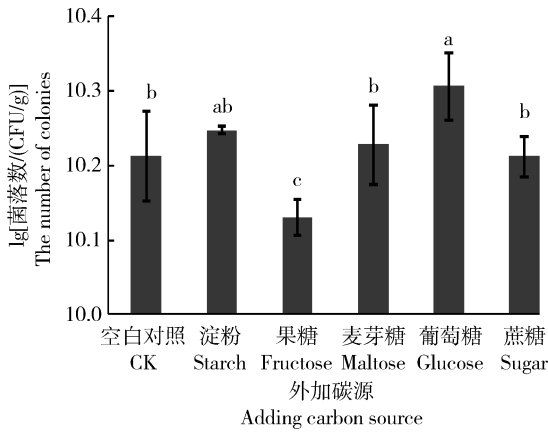


图 12 外加碳源对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 12 Effect of carbon sources on the number of *B. amyloliquefaciens* L-S60

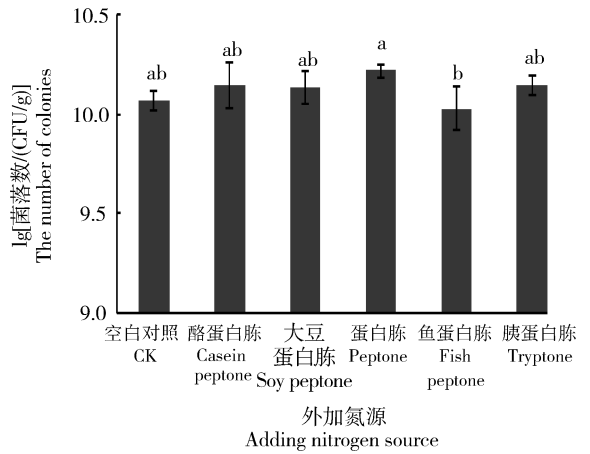


图 13 外加氮源对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 13 Effect of nitrogen sources on the number of *B. amyloliquefaciens* L-S60

添加 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 处理的 L-S60 菌落数均与对照无显著差

异；而添加 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 处理的 L-S60 菌落数低于对照组(图 14)。

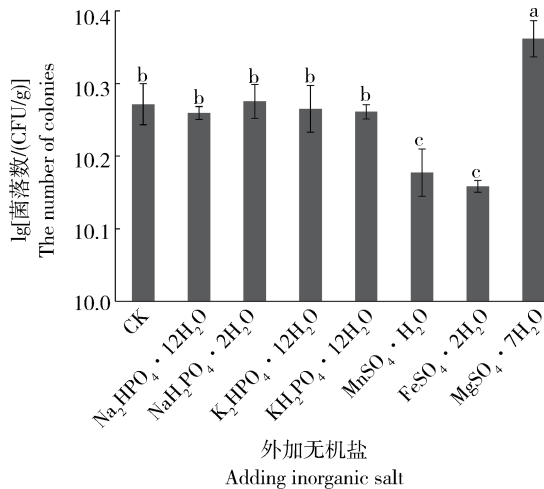


图 14 外加无机盐对 L-S60 菌落数的影响

Fig. 14 Effect of inorganic salts on the number of *B. amyloliquefaciens* L-S60

2.2.10 外源物质对固态发酵影响的正交试验

由极差分析(表 4)可知,影响 L-S60 固态发酵的主次因素为蛋白胨>葡萄糖> $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。最佳水平组合为 $A_3B_2C_2$ 。因此,固态发酵最优外源物质组成为蛋白胨、葡萄糖和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,添加量分别为 3.00、2.00 和 0.20 g/kg。此时,L-S60 菌落数可达到 2.42×10^{10} CFU/g。正交试验方差分析结果见表 5。

蛋白胨显著性 = 0.034 < 0.05,表明蛋白胨影响达到显著水平,在固体发酵过程中应严格控制蛋白胨的使用量,其他因素影响未达到显著水平

(表 5)。

由此可知,解淀粉芽孢杆菌 L-S60 具有较宽的酸碱耐受性, NaCl 质量分数超过 10%时菌落数会显著下降,80 °C 以下对菌落数无明显变化,能产生蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶,且对多种病原真菌有抑制作用。L-S60 的最佳固体发酵条件为:温度 35 °C、接种量 30%、料水质量比 1 : 0.45、装瓶量 40%和发酵时间 42 h;最佳固体培养基组成为 m (花生饼粉) : m (麦麸) : m (棉粕) = 53 : 35 : 12,外源物质蛋白胨、葡萄糖和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量分别为 3.00、2.00 和 0.20 g/kg。此时,解淀粉芽孢杆菌

表4 固体发酵培养基外源物质组分正交试验结果

Table 4 The orthogonal experiment results of solid-state fermentation

试验号 Test number	影响因素 Factor			lg[菌落数/(CFU/g)] Number of colonies
	A, 蛋白胨	B, 葡萄糖	C, MgSO ₄ · 7H ₂ O	
	质量分数/(g/kg)	质量分数/(g/kg)	质量分数/(g/kg)	
	Content of peptone	Content of glucose	Content of MgSO ₄ · 7H ₂ O	
1	1.00	3.00	0.20	10.33±0.02
2	1.00	1.00	0.10	10.16±0.05
3	1.00	2.00	0.30	10.28±0.08
4	2.00	3.00	0.10	10.32±0.02
5	3.00	1.00	0.20	10.32±0.10
6	2.00	1.00	0.30	10.31±0.01
7	3.00	2.00	0.10	10.39±0.03
8	3.00	3.00	0.30	10.34±0.02
9	2.00	2.00	0.20	10.36±0.04
K ₁	10.25	10.27	10.29	
K ₂	10.33	10.34	10.34	
K ₃	10.35	10.33	10.31	
R	0.10	0.07	0.05	

表5 固体发酵培养基外源物质组分正交试验结果方差分析

Table 5 Orthogonal experiment results of solid-state fermentation by variance analysis

因素 Factor	平方和 Quadratic sum	自由度 Freedom degree	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Sig.
A, 蛋白胨	0.140	2	10.129	10.129	0.034
B, 葡萄糖	0.003	2	2.247	2.247	0.108
C, MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.002	2	0.216	0.216	0.322
误差	0.001	2	0.001	0.090	
总和	0.019	8			

L-S60 菌落数可达 2.42×10^{10} CFU/g。

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌 L-S60 的生物学特性研究从菌株的耐受、产酶和抑菌方面展开。从耐受能力看, L-S60 具有较强的酸碱耐受能力, 这与李雅丽^[14]报道的 6 株芽孢杆菌对酸碱的稳定性基本一致; 6 株芽孢杆菌最高可耐 NaCl 质量分数为 7%^[14], L-S60 对 NaCl 质量分数的耐受可以达到 10%, 说明 L-S60 菌株在盐耐受方面具有一定的优势; 戴秀华^[15]报道的解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 在温度达到 52 °C 时菌体几乎全部死亡, L-S60 在温度 37~80 °C 下对其菌落数影响不大, 可见 L-S60 耐高温能力较强, 在夏季田间防治具有优势。

目前, 有关解淀粉芽孢杆菌抑菌机理的研究报道较多, 主要分为 2 个方面: 一方面是直接对病原菌

的抑制作用, 包括对空间位点和营养的竞争、抗菌作用、产生胞外酶和溶菌作用等^[16]; 另一方面是作用于植物, 如分泌促生物质、激发诱导抗性, 通过增强植物自身来抵御病原菌的入侵^[17-18]。试验证明 L-S60 的抑真菌能力较强, 具有广谱抗真菌能力; L-S60 能够产生蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶, 这与杨锋^[19]报道的芽孢杆菌能产生较高活性的中性蛋白酶和淀粉酶结果相似。

在固态发酵过程中, 影响因素主要有固态基质、含水量、接种量、外加碳源和外加氮源等。在考虑获得最大活菌量的同时, 也要考虑固态发酵基质的原料成本, 在活菌量差异不显著的情况下, 应优先选择价格低廉的原材料。Vimala 等^[20]以麦麸为主要基质, 有氧发酵 4 d, 可使苏云芽孢杆菌数量达 10^{10} CFU/g; 本试验最终采用花生饼粉 (m (花生饼粉): m (麦麸): m (棉粕) = 53:35:12) 进行发

酵,菌落数最高达到 2.13×10^{10} CFU/g。杨柳等^[21]的研究结果表明固态发酵培养基 pH 为 7.0~7.5 时,芽孢杆菌达到较高的菌落数和芽孢数;而本试验固态基质整体呈微酸环境,在 pH 为 5.5~7.0 时菌落均生长良好;这在一定程度拓宽了芽孢杆菌固态发酵的 pH 范围。

料水质量比主要通过影响固态发酵过程中的供氧量和孔隙度来决定固态发酵的水平,是决定固态发酵能否成功的重要原因^[22]。高料水质量比时固态培养基水分含量过少,会影响溶氧能力和传递氧能力,从而限制菌落的生长;低料水质量比可使固态培养基凝结成块,导致多孔性、溶氧量和散热性降低而影响发酵水平,增加杂菌污染的机率和干燥成本。本试验料水质量比最终采用 1:0.45,一方面可使固态基质保持疏松,充分利用氧气的流通和热量的传递;另一方面可为微生物生长提供营养。

固态发酵通常采用菌悬液作为种子培养基,以液-固 2 相的发酵方式进行,需要合适的接种量。本试验经过优化选取 30% 的接种量,因为接种量过大会加速固态发酵培养基的消耗,使基质中溶氧不足或营养物质过度消耗,不利于菌落数的增加,且菌株产生的次级代谢物会抑制菌落的繁殖,降低菌株固态发酵的数量^[23];接种量较小会延长发酵周期,成本增大,且会增加杂菌污染机率,影响发酵产品质量^[24]。此外,装瓶量也是影响固态发酵水平的因素之一。高装瓶量会导致供氧量和散热性的降低,进而抑制微生物的固态发酵水平。在不影响固态发酵菌落数的条件下,装瓶量越大,发酵次数越少,能够较大程度上减少固态发酵所需的成本^[25],本试验在 20%~50% 的装瓶量下 L-S60 菌落数均无明显差异,为了生产成本最小化,最终采用 50% 的装瓶量。

固态发酵的时间一般是 3~7 d,发酵时间对微生物繁殖和次级代谢产物的产生有着重要的影响。发酵周期短,基质营养利用不充分,造成浪费;周期过长,菌体自溶,影响活力。杜英等^[26]采用玉米秸秆和玉米粉发酵枯草芽孢杆菌,结果表明以玉米秸秆酶解液发酵 42 h 后活菌数达 4.64×10^{10} CFU/mL,这与本试验最终发酵时间为 42 h 的结果一致。

固态发酵物中的碳源和氮源是影响微生物生长繁殖和产生次级代谢产物的另一个重要因素。一般常用的外加碳源有葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖、蜜饯和甘油等;外加氮源主要有蛋白胨、豆粉、硫酸铵、硝酸铵和酵母浸粉等。碳氮源质量比也非常重要,若

碳源过多,菌株可能生长缓慢,易被杂菌污染而失效;氮源过多,微生物就会大量繁殖,不利于次级代谢产物的累积。本试验最终采用葡萄糖最为外加碳源,蛋白胨作为外加氮源,碳氮质量比为 1:1.5,此时固态发酵菌落数可达 2.42×10^{10} CFU/g。无机离子在固态发酵过程中也起到重要作用。它能够调节固态发酵基质的酸碱平衡、维持渗透压、构成如蛋白质等活性物质的辅基或功能团等,本试验结果表明 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 能够显著增加菌落总数,研究证明 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 可促进芽孢杆菌生长繁殖,增加酶类等物质的分泌活性^[20,27]。L-S60 固态发酵剂的开发能够对今后的大田育苗提供理论指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Flodman H R, Nouredini H. Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distillers grain with *Trichoderma reesei* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 81(50):24-28
- [2] 申继忠. 微生物农药剂型加工研究进展[J]. 中国生物防治, 1998, 14(3):129-133
Shen J Z. Microbial pesticide formulations processing research progress[J]. *Journal of China Biological Control*, 1998, 14(3):129-133 (in Chinese)
- [3] Han B Z, Rombouts F M. A Chinese fermented soybean food [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65: 1-10
- [4] Haddadin S Y, Abu-Reesh I M. Utilization of tomato as a substrate for the production of vitamin B12 preliminary appraisal[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78(3):225-230
- [5] Yang X X, Chen H Z, Gao H L. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78(3):277-280
- [6] Holker U, Lenz J. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantage[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005(8):201-230
- [7] 肖怀秋. 高活力产中性蛋白酶细菌菌株的选育及酶学性质研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2006
Xiao H Q. The breeding of high energy neutral protease producing bacteria strains and enzymology properties [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [8] 董志扬, 祝令香, 于巍. 高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J]. 核农学报, 2001, 25(1):187-192
Dong Z Y, Zhu L X, Yu Wei. Cellulase high-yield strains of mutation breeding and research condition of the enzyme production[J]. *Nuclear Agronomy*, 2001, 25(1):187-192 (in Chinese)
- [9] 何胜华, 罗聪, 李海梅. 米曲霉 KFR1 888 产中性蛋白酶、 α -淀粉酶酶学性质的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 9(13):92-94
He S H, Luo C, Li H M. *Aspergillus oryzae* KFR1 888 neutral

- protease, α -amylase enzyme properties research[J]. *Journal of Food Industry Science and Technology*, 2006, 9 (13): 92-94 (in Chinese)
- [10] 周晶. 一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其酶学性质研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2012
Zhou J. One lipase producing bacteria screening, fermentation condition optimization and enzymology properties [D]. Hangzhou: China Metrology Institute, 2012 (in Chinese)
- [11] 彭仁, 邱业先, 汪金莲. 脲酶高产菌的筛选和产酶条件的研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2003, 3(2): 12-14
Peng R, Qiu Y X, Wang J L. Urease screening of high yield bacteria and the conditions of enzyme production research[J]. *Journal of Jiangxi Normal University: Natural Science Edition*, 2003, 3(2): 12-14 (in Chinese)
- [12] 孙倩, 陈福生, 丁长河. 地衣芽孢杆菌固体发酵培养基优化研究[J]. 食品工业, 2006, 54: 1151-1157
Sun Q, Chen F S, Ding C H. *Bacillus licheniformis* solid fermentation medium optimization study[J]. *Journal of Food Industry*, 2006, 54: 1151-1157 (in Chinese)
- [13] 胡瑞, 陈艳, 王之盛. 复合益生菌发酵豆粕生产工艺参数的优化及酶菌联合发酵对豆粕品质的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(8): 1896-1903
Hu R, Chen Y, Wang Z C. The composite probiotic fermented soybean meal production process parameters optimization and joint effect on the quality of soybean meal fermentation enzyme bacteria[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(8): 1896-1903 (in Chinese)
- [14] 李雅丽, 秦燕, 周绪霞. 6株芽孢杆菌的生物学特性比较研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 62-65
Li Y L, Qin Y, Zhou X X. 6 strains of *Bacillus* the biological characteristics of comparative study [J]. *Journal of China Animal Husbandry and Veterinary*, 2011, 38(4): 62-65 (in Chinese)
- [15] 戴秀华, 张荣胜, 陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 生物学特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 573-580
Dai X H, Zhang R S, Chen Z Y. Starch solution of *Bacillus coli* Lx-11 biological characteristics research[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30(4): 573-580 (in Chinese)
- [16] 张宝俊, 张家榕, 韩巨才. 内生解淀粉芽孢杆菌 LP-5 抗菌蛋白的分离纯化及特性[J]. 植物保护学报, 2010, 37(2): 143-147
Zhang B J, Zhang J R, Han J C. The endogenous starch solution of *Bacillus coli* LP-5 antimicrobial protein purification and characteristics[J]. *Journal of Plant Protection*, 2010, 37(2): 143-147 (in Chinese)
- [17] 孙力军, 陆兆新, 别小妹. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 Es-2 菌株产抗菌脂肽的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3389-3392
Sun L J, Lu Z X, Bie X M. Medium of starch solution of *Bacillus coli* Es-2 strains to produce the effect of antibacterial peptide lipid[J]. *Chinese Agricultural Science*, 2008, 41(10): 3389-3392 (in Chinese)
- [18] 李森, 产祝龙, 田世平. 果实采后病害诱导抗性研究进展[J]. 保鲜与加工, 2010, 10(5): 1-7
Li M, Chan Z L, Tian S P. Postharvest diseases of fruits inducible resistance research progress [J]. *Journal of Preservation and Processing*, 2010, 10(5): 1-7 (in Chinese)
- [19] 杨锋, 章亭洲. 枯草芽孢杆菌生物学特性的研究[J]. 饲料研究, 2011, 30(4): 27-31
Yang F, Zhang T Z. *Hay Bacillus coli* biological characteristics research[J]. *Journal of Feed Research*, 2011, 30(4): 27-31 (in Chinese)
- [20] Vimala Ebenezer, Arulazhagan P, Kaliappan S. Effect of deflocculation on the efficiency of low-energy microwave pretreatment and anaerobic biodegradation of waste activated sludge[J]. *Applied Energy*, 2015, 145: 104-110
- [21] 杨柳, 郑华, 张邑帆. 凝结芽孢杆菌芽孢高产固体发酵的研究[J]. 家畜生态学报, 2013, 7(34): 49-53
Yang L, Zheng H, Zhang Y F. The condensation of high-yield, solid-state fermentation bacillus spores study [J]. *Journal of Animal Ecology*, 2013, 7(34): 49-53 (in Chinese)
- [22] Chowdappa P, Mohan Kumar S P, Lakshmi M Jyothi. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3[J]. *Biology Control*, 2013, 65(1): 109-117
- [23] 孙镇平, 刘洪红, 王忠敏. 解淀粉芽孢杆菌固体培养条件优化[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2014, 35(1): 55-64
Sun Z P, Liu H H, Wang Z M. Starch bacillus solid solution culture conditions optimization [J]. *Journal of Yangzhou University: Agriculture and Life Science Edition*, 2014, 35(1): 55-64 (in Chinese)
- [24] 梁雪杰, 刘邮洲, 张荣胜. 生防菌 PTS-394 发酵培养基及培养条件的优化[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 34(3): 75-82
Liang X J, Liu Y Z, Zhang R S. The bio-control bacteria PTS-394 fermentation medium and culture conditions of optimization[J]. *Journal of Yangzhou University: Agriculture and Life Sciences*, 2013(3): 75-82 (in Chinese)
- [25] Gravel V, Antoun H, Tweddell R J. Growth stimulation and fruit yield improvement of green house tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid[J]. *Soil Biology Biochemical*, 2007, 39: 1968-1977
- [26] 杜英. 利用玉米秸秆发酵生产芽孢杆菌肥料的研究[D]. 保定: 河北大学, 2013
Du Y. Using corn stalk fermentation to produce *Bacillus* fertilizer research[D]. Baoding: Hebei University, 2013
- [27] Harmeet S K, Kanupriya S. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus sp* PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production[J]. *Biology Control*, 2009, 65(6): 119-127