

胶质芽孢杆菌液体发酵产孢培养基的优化

王金玲¹, 赵凤艳², 吕长山², 张洪超^{1,3}

(1. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学 应用技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;
3. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以提高胶质芽孢杆菌液体发酵芽孢产量为目的, 以血球计数板观察计数芽孢量, 对胶质芽孢杆菌液体发酵培养基组成进行优化研究。首先进行单因素试验, 筛选最优的碳源、氮源、碳源浓度、氮源浓度、无机盐及其浓度, 得到单因素最佳值; 然后以二次回归正交旋转组合设计对得到的单因素最佳值进行优化, 并进行验证试验。结果表明: 最优产孢发酵培养基配方为每 1 000 mL 培养基: 乳糖 21.57 g; 复合氮源 2.6 g, 其中含蛋白胨与硫酸铵, 二者质量比例为 1:3; 硫酸锰 0.21 g; 磷酸氢二钾 1.5 g; 七水硫酸镁 1.2 g; 经二次回归正交旋转组合设计优化建立了回归模型, 通过验证试验, 血球计数板计数结果显示胶质芽孢杆菌芽孢产量可达 3.44×10^9 cfu/mL, 实际芽孢量与回归模型预测值比为 0.977, 说明所得模型可靠。此优化培养基可以为工业生产胶质芽孢杆菌提供数据参考。

关键词: 胶质芽孢杆菌; 芽孢产量; 培养基; 二次回归正交旋转组合设计; 优化

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)04—0417—08

Medium Optimization for *Bacillus mucilaginosus* in Submerged Fermentation

WANG Jin-ling¹, ZHAO Feng-yan², LV Chang-shan², ZHANG Hong-chao^{1,3}

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. School of Applied Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This research was designed to optimize the culture medium for *Bacillus mucilaginosus* in submerged fermentation. With spore yield as indicator, the test was divided into three phases. Firstly, based on the results of single factor experiments, the optimum carbon source, nitrogen source and metallic ion and their concentrations were screened and the optimal values of single factors were obtained; secondly, quadratic regression orthogonal rotation composite design was used to optimize the medium further and got the model; then, verification tests were carried out to verify the model. The results showed that the optimal culture medium were (per liter): lactose 21.57 g, combined nitrogen source 2.6 g (ratio of peptone to ammonium sulphate was 1:3), MnSO_4 0.21 g, K_2HPO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g; cultured with the optimal medium, the spore number of *Bacillus*

收稿日期: 2012-09-18

基金项目: 哈尔滨市科技局重点攻关项目(2011AA6BN071)。

作者简介: 王金玲(1975—), 女, 黑龙江绥化人, 工学博士, 副教授, 主要从事微生物与发酵工程研究。E-mail: wangjinling08@yahoo.cn

mucilaginosus reached 3.44×10^9 cfu/mL; the ratio of actual spore yield to predicted value was 0.977, indicated that the model was reliable. The results could provide references for the producing of *Bacillus mucilaginosus*.

Keywords: *Bacillus mucilaginosus*, spore yield, culture medium, quadratic regression orthogonal rotation composite design, optimization

胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)又名胶冻样芽孢杆菌,国内通常称之为硅酸盐细菌^[1],是一种多功能菌。

农业上,胶质芽孢杆菌具有解钾、溶磷作用以及易形成根系优势种特性^[2-3],是目前我国微生物肥料产品中较为重要的一种。工业方面,胶质芽孢杆菌在无氮培养基或较大的C/N培养基中易产生显著的胞外多糖荚膜,利用这种多糖的絮凝作用生产优势明显的微生物絮凝剂前景广阔^[4-5]。冶金工业上,胶质芽孢杆菌可应用于细菌淋滤和改进某些矿物材料的特性^[6],尤其对低品位矿物的开发以及回收利用某些有用金属具有良好的前景。养殖业方面,胶质芽孢杆菌生长过程产生的蛋白质、有机酸等,可用作饲料补充物,提高饲料的价值^[7]。因此提高胶质芽孢杆菌的活菌或芽孢数量与质量具有重要的现实意义。

作者在培养基单因素筛选基础上,选用二次回归正交旋转组合设计,考察了培养基组成对发酵结果的影响,以期更大程度上提高芽孢产量,为胶质芽孢杆菌的广泛应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验菌株 胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)CGMCC 1.0910,购自中国普通微生物菌种中心,经紫外诱变处理,作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基 斜面培养基:亚历氏硅酸盐细菌培养基,蔗糖 5 g;磷酸氢二钠 2 g;七水硫酸镁 0.5 g;氯化铁 0.005 g;碳酸钙 0.1 g;土壤矿物,取耕层土加入体积分数 20%盐酸(耕层土与盐酸的质量体积比为 1 g:10 mL)煮沸 30 min,蒸馏水洗至无氯离子,过 100 目筛^[8],1.0 g;琼脂,30 g;蒸馏水 1 000 mL;pH 7.0~7.2。

种子培养基:蔗糖 10 g;磷酸氢二钾 0.5 g;七

水硫酸镁 0.5 g;碳酸钙 1 g;蒸馏水 1 000 mL;pH 7.5。

基础发酵培养基:蔗糖 20 g;复合氮源 2.5 g;磷酸氢二钾 1 g;七水硫酸镁 1 g;碳酸钙 5 g;蒸馏水 1 000 mL;pH 7.0~7.5。其中,复合氮源质量比为硫酸铵:酵母浸膏粉=3:1。

1.1.3 试剂 葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、可溶性淀粉、硫酸铵、硫酸锰、磷酸氢二钠、碳酸钙、氢氧化钠、硫酸镁、磷酸氢二钾、氯化铁为分析纯试剂,天津天力化学试剂有限公司;麦芽糖、牛肉膏(氮质量分数 13%)、蛋白胨(氮质量分数 14.5%)、胰蛋白胨(氮质量分数 12.5%)、酵母膏(氮质量分数 7%)、干酪素(氮质量分数 13.5%)、酵母浸膏粉(氮质量分数 7.2%)、玉米浆粉(氮质量分数 7.2%)、琼脂:北京奥博星生物技术有限责任公司产品。

1.2 仪器与设备

SYQ-DSX-280B 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂产品;ZD-85 恒温振荡器:常州国华电器有限公司产品;HZQ-X100 振荡培养箱:哈尔滨市东明医疗仪器厂产品;DH-6000A 电热恒温培养箱:天津市泰斯特仪器有限公司产品;XW-80A 旋涡混合器:海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;XB-K-25 血细胞计数板:上海求精生化试剂仪器有限公司产品;XSZ-4G 双目显微镜:北京联合科仪科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 培养方法 菌种活化:将保存的菌种转接至斜面培养基,32 ℃活化 24 h。

种子摇瓶培养:用接种环挑取 3 环菌泥,接入装有种子培养基 35 mL 的 250 mL 三角瓶中,32 ℃、200 r/min 摇瓶培养 20 h。

摇瓶发酵培养:将种子培养液接入发酵培养基中,接种量为 5%,发酵培养基装液量为 50 mL/250 mL,36 ℃,250 r/min 振荡培养 40 h。

1.3.2 分析方法 芽孢计数法:试验过程中因素与

组合的优劣比较采用血球计数板计数法^[9],计数前将菌液在 80 °C 水浴槽中热处理 15 min。

1.3.3 试验设计

1) 单因素试验 单因素选择如下:碳源(20 g/dL 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、甘露醇),碳源浓度(5、10、15、20、25、30、35 g/dL),有机氮源(酵母膏、酵母浸膏粉、牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、干酪素和玉米浆粉,采用有机氮源与硫酸铵复合氮源),复合氮源质量浓度(复合氮源水平 0.625、1.25、1.875、2.5、3.125、3.75、4.375 g/dL,有机氮源与硫酸铵质量比为 1:3),无机盐(0.1 g/dL, K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4$)及无机盐质量浓度^[10-11]。

培养基及培养条件:除单因素为变量外,其余采用摇瓶发酵培养基配方及培养条件,每个试验 3 次重复。

2) 二次回归正交旋转组合设计 根据单因素试验结果组合培养基组分,进行二次回归正交旋转组合设计。

3) 验证试验 以优化后的培养基组成进行验证试验,发酵工艺参数按摇瓶发酵培养条件。验证试验 3 次重复。

1.3.4 数据处理方法 试验中图表绘制采用 Microsoft Excel 处理;二次回归正交旋转组合设计与结果分析采用 Design Expert 7.0 及 SAS 9.0 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素优化试验

2.1.1 碳源的筛选 碳源的筛选试验结果如图 1 所示,N 为芽孢数量。由图可知,6 种碳源对芽孢产量的影响先后顺序为乳糖>甘露醇>可溶性淀粉>麦芽糖>蔗糖>葡萄糖,乳糖明显优于其他碳源,甘露醇次之。这是因为不同碳源对微生物发酵的影响与碳源结构和发酵过程中的中间代谢产物(如酶等)有关,能够为菌体快速吸收利用且存在有利于芽孢转换的碳源有利于活菌数与芽孢产量的提高。

2.1.2 碳源质量浓度的筛选 通过单因素 7 水平试验对乳糖浓度进行筛选,结果如图 2 所示。由图可以看出,当乳糖质量浓度为 5~20 g/dL 时,芽孢产量呈现上升趋势;之后随着添加量的继续增大,芽孢量略有下降。曲线初始变化趋势明显,这与碳源

对胶质芽孢杆菌的作用方式有关,增加碳源利于菌体的快速繁殖;但超过一定浓度后则对发酵液的理化性质产生不良影响,导致芽孢量有所下降。试验中选择 10~30 g/dL 作为进一步优化的试验范围。

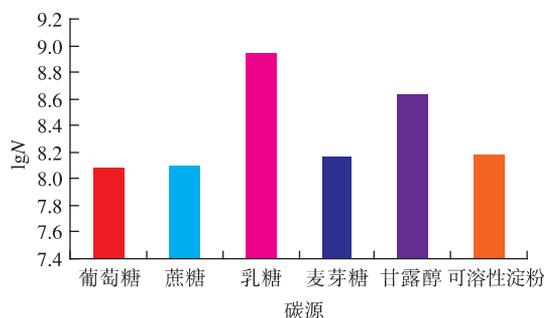


图 1 不同碳源对芽孢产量的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on spore yield

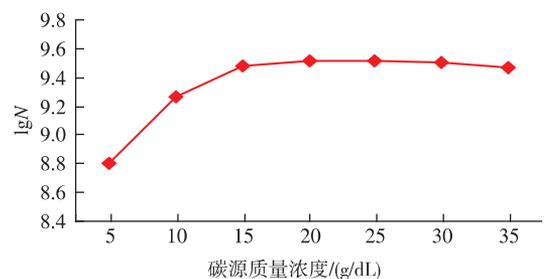


图 2 碳源质量浓度对芽孢产量的影响

Fig. 2 Effect of carbon source concentration on spore yield

2.1.3 氮源的筛选 试验中采用有机氮与硫酸铵混合的复合氮源^[10-11],有机氮源的筛选中以蛋白胨添加 0.625 g/dL 和硫酸铵添加 1.875 g/dL 为参照;其他有机氮源含氮量调整到与蛋白胨相同,添加的硫酸铵含量不变。结果表明(图 3),胶质芽孢杆菌芽孢产量最大的为酵母浸膏粉,其次为蛋白胨;两者生成芽孢量分别为 3.22×10^9 cfu/mL 和 3.05×10^9 cfu/mL,干酪素对产孢的影响也较好;但在相同含氮量的情况下,酵母浸膏粉的添加量为蛋白胨的 2 倍,而增加的芽孢产量为 5.6%。

以硫酸铵作为固定无机氮源有利于菌体的快速吸收,而采用有机氮源则可以提供缓释氮元素,其中还含有一些利于菌体生长与芽孢转换的生长因子和微量元素。因此从芽孢产量及经济方面考虑,试验中选择微生物发酵中常用的蛋白胨为最佳有机氮源。

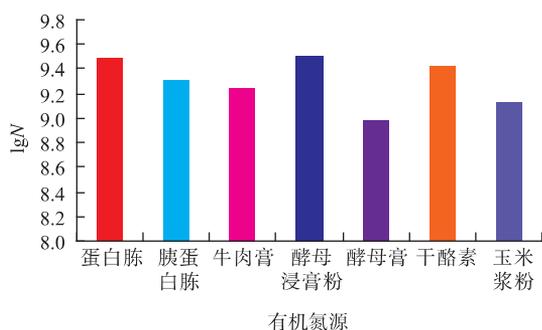


图3 不同氮源对芽孢产量的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on spore yield

2.1.4 氮源质量浓度的筛选 以硫酸铵为无机氮源,蛋白胨为有机氮源,有机氮质量:无机氮质量=1:3进行复合氮源浓度的筛选试验,结果见图4。

由图可知,芽孢产量随复合氮源质量浓度的增加呈现先急速上升后缓慢下降的趋势,其中曲线峰值出现点为2.5 g/dL。

无机氮与有机氮的搭配有利于满足发酵不同阶段的需求,既有利于菌体增殖又有利于芽孢的生成,根据试验设计的需求,选择的氮源进一步优化范围为1.25~3.75 g/dL。

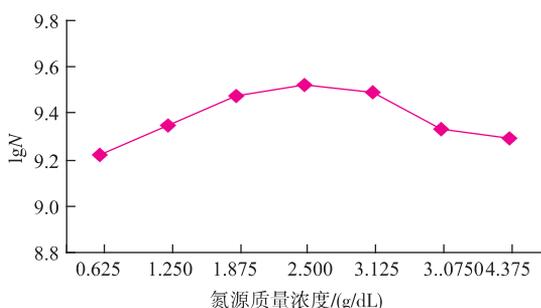


图4 复合氮源质量浓度对芽孢产量的影响

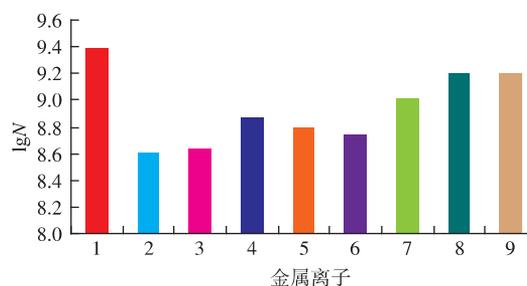
Fig. 4 Effect of nitrogen source concentration on spore yield

2.1.5 无机盐的筛选 无机盐的筛选试验结果如图5所示。由图可见,在试验浓度条件下,除 Mn^{2+} 可以较明显地促进产孢外,其他离子对促进产孢均无效果,其中 Mg^{2+} 、 K^+ 具有轻微抑制作用,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 则表现出明显的抑制作用,这可能与金属离子的作用方式和胶质芽孢杆菌的生长习性有关。

2.1.6 硫酸锰质量浓度的筛选 金属离子的筛选试验结果显示,硫酸锰具有促进芽孢生成的作用,试验中设计了单因素7水平筛选试验,结果见图6。

由图可见,在0.05~0.10 g/dL和0.30~0.35 g/dL

范围内,芽孢量变化趋势均较平缓,曲线中芽孢量较高且曲线变化幅度较大的硫酸锰质量浓度范围是0.10~0.30 g/dL,此范围可作为下一步优化试验的考查范围。



注:1. $MnSO_4$ 2. $ZnCl_2$ 3. $CuSO_4$ 4. $Al_2(SO_4)_3$ 5. $FeSO_4$ 6. $FeCl_3$ 7. K_2HPO_4 8. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9. 空白

图5 不同金属离子对芽孢产量的影响

Fig.5 Effect of different metallic ions on spore yield

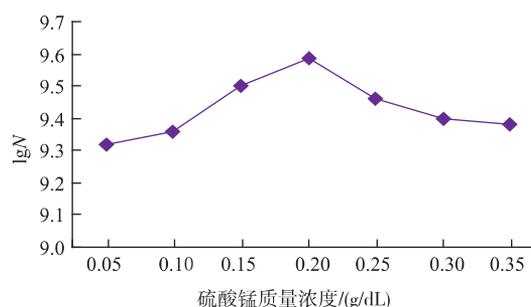


图6 硫酸锰质量浓度对芽孢产量的影响

Fig. 6 Effect of $MnSO_4$ concentration on spore yield

2.1.7 磷酸氢二钾质量浓度的筛选 金属离子的筛选试验结果显示钾离子对产孢有轻微抑制作用,但是多数研究者的培养基配方中均加入了磷酸氢二钾^[9,12],为了验证钾离子对产芽孢的作用,进行磷酸氢二钾质量浓度的筛选试验,结果如下图7所示。

2.1.5中选择的质量浓度为0.1 g/dL,当磷酸氢二钾质量浓度从0.1 g/dL增加时,芽孢产量迅速增加(部分数据未显示),到1 g/dL时,lg N达到9.04,在1~2 g/dL的范围内,变化趋势平缓,之后有所下降,说明在金属离子筛选试验中,钾盐浓度偏低,造成结果不同。由于磷酸氢二钾浓度在1~2 g/dL范围内对产孢影响不大,所以后续试验将其固定在最佳水平,即1.5 g/dL。

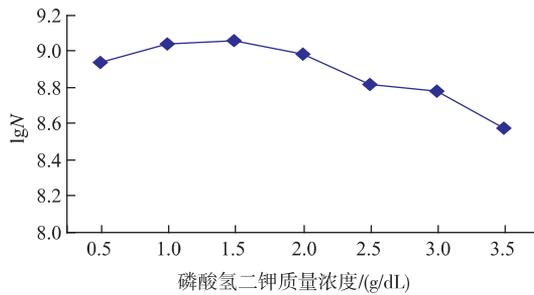


图7 磷酸氢二钾质量浓度对芽孢产量的影响

Fig. 7 Effect of K_2HPO_4 concentration on spore yield

2.1.8 硫酸镁质量浓度的筛选 金属离子的筛选试验结果显示镁离子对芽孢产量有轻微抑制作用,与钾离子相似,对硫酸镁的浓度筛选试验见图8所示。由图可见,随镁离子质量浓度增加,芽孢产量先增加后下降;硫酸镁质量浓度在1.2 g/dL时,芽孢产量最大。由于硫酸镁浓度在0.9~1.5 g/dL范围内对芽孢产量影响幅度不大,所以后续试验将其固定在最佳值水平,即1.2 g/dL。

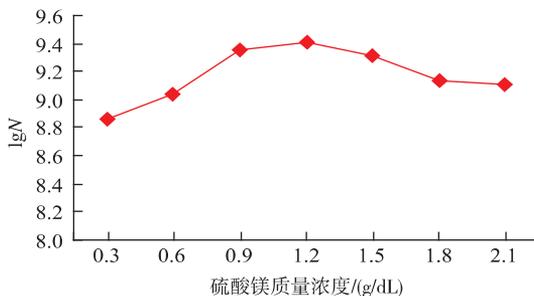


图8 硫酸镁浓度对芽孢产量的影响

Fig. 8 Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on spore yield

2.2 二次回归正交旋转组合设计优化培养基组成

2.2.1 二次回归正交旋转组合设计及结果 碳源与氮源及其质量浓度对发酵具有重要的影响,第一阶段的单因素试验已筛选出发酵培养基中的碳源为乳糖,有机氮源为蛋白胨;金属盐中硫酸锰对发酵产芽孢具有明显影响,选择碳源质量浓度、氮源质量浓度和硫酸锰质量浓度进行二次回归正交旋转组合设计优化,其他因素固定在最佳值水平;因子及水平设计见表1,试验设计及结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 二次回归正交旋转组合设计因素及水平表

Table 1 Factors and levels of quadratic regression orthogonal rotation composite design

编码值	因素及水平 $X_j/(g/dL)$		
	X_1 乳糖	X_2 复合氮源	X_3 $MnSO_4$
$-\gamma$	10.00	1.25	0.10
-1	14.05	1.76	0.14
0	20.00	2.50	0.20
1	25.95	3.24	0.26
γ	30.00	3.75	0.30
Δ_j	5.95	0.74	0.06

注: $\Delta_j=(X_{j\gamma}-X_{j0})/\gamma, \gamma=1.68$

表2 二次回归正交旋转组合设计及结果

Table 2 Results of quadratic regression orthogonal rotation composite design

试验号	试验设计			芽孢量 $Y(\times 10^9 \text{ cfu/mL})$
	x_1	x_2	x_3	
1	1	1	1	3.15
2	-1	-1	1	1.21
3	1	1	-1	1.43
4	-1	1	1	1.63
5	1.68	0	0	2.24
6	1	-1	-1	1.18
7	0	0	0	3.41
8	0	0	0	3.40
9	0	0	-1.68	1.05
10	0	0	0	3.20
11	0	-1.68	0	1.28
12	0	0	0	2.99
13	-1	-1	-1	0.94
14	-1.68	0	0	1.08
15	1	-1	1	2.43
16	0	0	1.68	1.95
17	0	1.68	0	2.05
18	0	0	0	3.35
19	0	0	0	3.43
20	-1	1	-1	1.38
21	0	0	0	3.51
22	0	0	0	3.29
23	0	0	0	3.48

表3 试验结果方差分析

Table 3 ANOVA for the results

来源	平方和	自由度	均方	F	P
X_1	1.82	1	1.82	55.60	<0.000 10
X_2	0.71	1	0.71	21.76	0.000 40
X_3	1.84	1	1.84	56.20	<0.000 10
X_1X_2	0.001 9	1	0.001 9	0.057	0.82
X_1X_3	0.76	1	0.76	23.18	0.000 30
X_2X_3	0.026	1	0.026	0.80	0.39
X_1^2	4.99	1	4.99	152.71	<0.000 10
X_2^2	4.98	1	4.98	152.03	<0.000 10
X_3^2	6.02	1	6.02	184	<0.000 10
回归	20.94	9	20.94	71.08	<0.000 10
剩余	0.43	13	0.43		
失拟	0.21	5	0.21	1.62	0.26
误差	0.21	8	0.21		
总和	21.37	22			

根据试验数据方差分析可以得到拟合回归方程： $Y = 3.34 + 0.37x_1 + 0.23x_2 + 0.37x_3 + 0.015x_1x_2 + 0.31x_1x_3 + 0.05x_2x_3 - 0.56x_1^2 - 0.56x_2^2 - 0.62x_3^2$ 。

为检验回归方程的有效性，按 $F_1 = \text{失拟均方} / \text{误差均方}$ ， $F_2 = \text{回归均方} / \text{剩余均方}$ 的程序进行检验。由表3可知，失拟项的 F 值为 1.62， $P = 0.26 > 0.05$ ，说明失拟检验不显著，所采用的回归模型适应于本研究中培养基组成的分析；二次回归模型的 F 值为 71.08， $P < 0.000 1$ ，说明模型的拟合极显著； $R^2 = \text{回归平方和} / \text{总平方和} = 0.979 9$ ，说明所建立的回归方程能在 97.99% 水平上很好地表达碳源质量浓度、氮源质量浓度及硫酸锰质量浓度 3 个因素之间的关系。

2.2.2 主效应分析 回归方程中因素前面系数的绝对值大小决定了各因素对试验结果的影响程度，经比较有： $X_3 > X_1 > X_2$ ，即考察的 3 种因素对胶质芽孢杆菌芽孢产量的影响大小为硫酸锰质量浓度 > 碳源质量浓度 > 复合氮源质量浓度。

2.2.3 最优培养基与产量预测 针对试验数据的回归方程，利用 SAS9.0 软件进行试验方案的预测分析，得到表 4 的培养基及芽孢量预测值。

表4 优化培养基预测值方案

Table 4 Optimization solution in the experiment

变量	编码值	实际值
X_1	0.26	21.57/(g/dL)
X_2	0.14	2.60/(g/dL)
X_3	0.25	0.21/(g/dL)
Y	-	3.52×10^9 /(cfu/mL)

根据优化模型可知，在 1 L 培养基中，当乳糖 21.57 g，复合氮源 2.60 g，硫酸锰 0.21 g，磷酸氢二钾 1.5 g，硫酸镁 1.2 g 时，胶质芽孢杆菌在摇瓶培养条件下培养，芽孢产量预测达到 3.52×10^9 cfu/mL。

用优化培养基进行验证试验，结果表明，血球计数板计数所得胶质芽孢杆菌芽孢产量为 3.44×10^9 cfu/mL ($n=3$)，实际值/模型最佳值=0.977，说明最佳模型可靠，得到的培养基可被之后发酵工艺参数的优化试验选用。

3 结 语

1) 胶质芽孢杆菌发酵的研究，目前主要集中在如何提高产菌量或者芽孢数量方面，以利于后期的工农业生产应用。在胶质芽孢杆菌的培养过程中，培养基组成及培养条件均对最终有效活菌数产生较大的影响。

胡秀芳等^[13]对一株离子束诱变的胶质芽孢杆菌进行了培养条件研究，结果表明，碳源对生物量和芽孢形成的影响最大，其次是氮源，磷和钾的影响较小；发酵培养基的理想配方（质量分数）为：2% 淀粉、0.4% 酵母、0.1% K_2HPO_4 、0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5% $CaCO_3$ ，pH 7.5；种子菌经二级扩大培养后，芽孢量可达到 9.8×10^8 cfu/mL。刘五星^[10]等人通过正交试验获得胶质芽孢杆菌的最佳培养基组成为（%）：葡萄糖 1，硫酸铵 0.15，酵母膏 0.01，KCl 0.01， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01， NaH_2PO_4 0.01， $CaCO_3$ 0.1，此条件下活菌数可达 6.5 亿/mL。李东华等^[14]的研究结果为糖蜜 3.2%，复合氮源（ m （硫酸铵）： m （豆粕）=2:1）0.4%，pH 8.0，为最佳培养基条件，响应面法预测的最大理论数值为 3.03×10^8 cfu/mL，实际值为 3.09×10^8 cfu/mL。

试验中获得的胶质芽孢杆菌最佳培养基组成为 1 L 培养基中，乳糖 21.57 g，复合氮源 2.6 g，硫酸锰 0.21 g，磷酸氢二钾 1.5 g，硫酸镁 1.2 g，pH 7.0~

7.5。以血球计数板计数,芽孢产量达到 3.44×10^9 cfu/mL。本研究结果不同于其他研究者的结果,可能是菌株营养型不同,或者菌株生长的环境不同等原因造成的。

试验中对常见的碳源、有机氮源和无机盐进行了筛选,结果表明不同结构及不同聚合度的碳源对微生物的菌体密度及芽孢转化具有一定的影响。采用不同有机氮源的培养基中芽孢形成量也有差别,干酪素作为氮源形成的芽孢量也较多,可能与其中氮素的存在形式和营养因子^[15]有关,具体作用机制还有待研究。此外,复合氮源的配比上试验选择为固定的有机氮源与无机氮源质量比为 1:3,这种组合对不同的有机氮而言也会有一些影响。无机盐中硫酸锰对于芽孢的形成具有明显促进作用,这在其他研究者的结果中未体现,锰离子对于芽孢的促进作用机理,还需要进一步研究。

试验采用二次回归正交旋转组合设计优化培养基组成,得到了有效的回归方程和预测方案,这表明此设计方案对预测试验结果具有一定的可行性。二次回归正交旋转组合试验为面体反应,因此它与一些复杂的响应面^[16]等方法的效果具有一定的可比性,而试验过程则得到了简化。

2) 胶质芽孢杆菌最佳培养基组成为 1 000 mL 培养基中,乳糖 21.57 g,复合氮源 2.6 g,硫酸锰 0.21 g,磷酸氢二钾 1.5 g,七水硫酸镁 1.2 g,pH 7.0~7.5。以血球计数板计数,芽孢产量达到 3.44×10^9 cfu/mL。

通过分阶段的优化试验,即单因素试验,二次回归正交旋转组合设计及验证试验,得到了胶质芽孢杆菌发酵培养基的最佳组成,并预测芽孢量,与验证试验实际值相符,说明模型的可靠性。所得最佳培养基可以为工农业生产胶质芽孢杆菌提供参考数据。

参考文献:

- [1] 刘五星,杨启银,徐旭士,等. 硅酸盐细菌肥料的研究进展[J]. 天津农业科学,2003,9(4):39-42.
LIU Wu-xing, YANG Qi-yin, XU Xu-shi, et al. Research progress of silicate bacteria fertilizer[J]. **Tianjin Agricultural Science**, 2003,9(4):39-42. (in Chinese)
- [2] 赵艳,张晓波,郭伟. 不同土壤胶质芽孢杆菌生理生化特征及其解钾活性[J]. 生态环境学报,2009,18(6):2283-2286.
ZHAO Yan, ZHANG Xiao-bo, GUO Wei. Physiological and biochemical characteristics and capacities of potassium-releasing of *Bacillus mucilaginosus* screened from different soils [J]. **Ecology and Environmental Sciences**, 2009,18 (6):2283-2286. (in Chinese)
- [3] BASAK B B, BISWAS D R. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop[J]. **Biol Fertil Soils**, 2010,46:641-648.
- [4] 曾晓希,刘学端,汤建新,等. 一株絮凝剂产生菌的 16srRNA 鉴定和絮凝性能研究[J]. 生命科学仪器,2008,6(9):30-33.
ZENG Xiao-xi, LIU Xue-duan, TANG Jian-xin, et al. Identification and characteristics of bioflocculant of a bioflocculant-produced strain[J]. **Life Science Instruments**, 2008,6(9):30-33. (in Chinese)
- [5] LIAN B, CHEN Y, ZHAO J, et al. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: Applications and mechanisms[J]. **Bioresource Technology**, 2008,99:4825-4831.
- [6] 朱云,曹维政,鲁安怀,等. 胶质芽孢杆菌-蒙脱石相互作用实验研究[J]. 岩石矿物学杂志. 2011,30(1):121-126.
ZHU Yun, CAO Wei-zheng, LU An-huai, et al. A study of the interaction between montmorillonite and a strain of *Bacillus mucilaginosus*[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 2011,30(1):121-126. (in Chinese)
- [7] WECKE C, VINOGRADOV JJ, CHOCHRIN, SN, et al. Protein quality of bacterial biomass (*Bacillus mucilaginosus*) and some results of its utilization in feeding domestic animals [J]. **Wissenschaftliche Zeitschrift -Karl -Marx -Universitat: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe**, 1983,32(6):601-605.
- [8] 刘五星. 胶质芽孢杆菌解钾作用与发酵条件研究及在烟草上的应用[D]. 南京:南京师范大学,2003.
- [9] 赵志浩,徐银荣,邱龙. 胶质芽孢杆菌的发酵工艺与田间应用[J]. 湖南农业科学,2004,5:34-37.
ZHAO Zhi-hao, XU Yin-rong, QIU Long. Study on the fermented craft of *Bacillus mucilaginosus* and its application [J]. **Hunan Agricultural Sciences**, 2004,5:34-37.
- [10] 刘五星,徐旭士,杨启银,等. 胶质芽孢杆菌发酵条件研究[J]. 南昌大学学报:理科版,2002,26(3):299-302.
LIU Wu-xing, XU Xu-shi, YANG Qi-yin, et al. Study on fermentation of *Bacillus mucilaginosus* [J]. **Journal of Nanchang**

- University, 2002, 26(3):299-302. (in Chinese)
- [11] 王雪,袁晓凡,赵兵,等. 胶质芽孢杆菌培养条件及发酵工艺的研究进展[J]. 过程工程学报, 2010, 10(2):399-415.
WANG Xue, YUAN Xiao-fan, ZHAO Bing, et al. Research progress in culture conditions and fermentation technology of *Bacillus mucilaginosus*[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2010, 10(2):399-415. (in Chinese)
- [12] 王雪,袁晓凡,赵兵,等. 胶质芽孢杆菌 PM13 菌株培养基的优化[J]. 过程工程学报, 2010, 10(3):582-587.
WANG Xue, YUAN Xiao-fan, ZHAO Bing, et al. Optimization of culture medium for growth of *B. mucilaginosus* PM13 Strain[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2010, 10(3):582-587. (in Chinese)
- [13] 胡秀芳,应飞祥,陈集双. 胶质芽孢杆菌突变株 021120 的培养条件及发酵工艺优化[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9):58-62.
HU Xiu-fang, YING Fei-xiang, CHEN Ji-shuang. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus mucilaginosus* mutant 021120[J]. **China Biotechnology**, 2007, 27(9):58-62. (in Chinese)
- [14] 李东华,杨博. 响应面法优化胶质芽孢杆菌 GM1 增殖发酵培养基[J]. 食品工业科技, 2012, 33(22):206-209.
LI Dong-hua, YANG Bo. Application of response surface methodology to optimize the spore production of *B. mucilaginosus* GM1 [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(22):206-209. (in Chinese)
- [15] ARASARATNAM V, SENTHURAN A, BALASUBRAMANIAM K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1996, 19(7):482-486.
- [16] HE J, ZHEN QW, QIU N, et al. Medium optimization for the production of a novel bioflocculant from *Halomonas* sp. V3a' using response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(23):5922-5927.

科 技 信 息

加拿大科学家研究二恶英、呋喃和多氯联苯的膳食暴露情况

2013年2月加拿大科学家在《食品添加剂与污染物》(Food Additives & Contaminants)杂志刊文,研究了1992-1999年1985-1988年间加拿大二恶英、呋喃和非邻位多氯联苯总膳食暴露情况。

研究人员在1985至1999年间,对有600份食品当中的二恶英、呋喃和非邻位多氯联苯含量进行了检测。研究发现,乳制品和牛肉在脂质基础上的毒性当量(TEQ)浓度最高,其次是家禽和猪肉。在15年间这些产品的TEQ浓度均有不同程度的降低,其中在液态奶中的浓度降低最大,家禽和猪肉次之,牛肉中基本未发生变化。

TEQ的主要食品来源种类为动物肉类和乳制品,少量源自鱼类和其他食物。

[信息来源]食品伙伴网. 加拿大科学家研究二恶英、呋喃和多氯联苯的膳食暴露情况

[EB/OL]. (2013-3-27). <http://www.foodmate.net/news/keji/2013/03/227822.html>

关于《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定-气相色谱法》和《蜂蜜中脯氨酸的测定-液相色谱法》2个国家标准征求意见的通知

由农业部蜂产品质量监督检验测试(北京)中心承担的《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定》和《蜂蜜中脯氨酸的测定》等2个国家标准征求意见稿已经起草完成,现公开征求意见。请各有关单位组织讨论,填写《意见反馈表》,并于2013年4月28日前将《意见反馈表》反馈给农业部蜂产品质量监督检验测试(北京)中心。

回函地址:北京香山北沟1号农业部蜂产品质量监督检验测试(北京)中心

邮编:100093 联系人:黄京平

联系电话:010-62594643 传真:010-62594643

电子邮箱:huang_jingping@126.com

[信息来源]中国蜂产品协会. 关于2个国家标准征求意见的通知 [EB/OL]. (2013-3-27). <http://www.china-bee.com/News/ShowInfo.aspx?ID=2286>