

文章编号:1009-038X(2005)01-0011-04

## 苏云金芽胞杆菌不同发酵阶段的补糖发酵

张家学, 陈守文\*, 孙明, 喻子牛

(华中农业大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 通过苏云金芽胞杆菌工程菌 BMB005 发酵不同阶段补加葡萄糖发酵试验, 研究了补糖对苏云金芽胞杆菌发酵的影响. 结果表明: 对数生长期补加葡萄糖可以提高生物量, 进而使发酵液中杀虫晶体蛋白的质量分数提高 33.1%, 而稳定期补加葡萄糖则是通过提高菌体合成晶体蛋白的能力而使发酵液中晶体蛋白的质量分数提高 18.1%. 30 L 发酵罐补糖实验结果表明: 在起始碳源质量浓度为 3.0 g/dL 的情况下, 对数生长期补加 1.0 g/dL 葡萄糖可以将发酵液中杀虫晶体蛋白的质量分数和生物效价分别提高 37% 和 51%; 稳定期补加 1.0 g/dL 葡萄糖可以将发酵液中杀虫晶体蛋白的质量分数和生物效价分别提高 33.7% 和 75.1%; 而且稳定期补加比对数生长期补加葡萄糖更有利于增效因子的合成.

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; 葡萄糖补加; 杀虫晶体蛋白; 生物效价

**中图分类号:** TQ 920.6

**文献标识码:** A

### Effect of Glucose Feeding at Different Phases on the Fermentation of *Bacillus thuringiensis*

ZHANG Jia-xue, CHEN Shou-wen\*, SUN Ming, YU Zi-niu

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The effect of glucose feed on the fermentation of *Bacillus thuringiensis* BMB005 were investigated by feeding glucose at the exponential and stationary growth phases, respectively. In flasks, better effects were obtained by feeding glucose at the exponential phase causing a higher biomass concentration and the concentration of ICPs could be enhanced by 33.1%. When feeding glucose at stationary phase which increased the synthesis capability and the concentration of ICPs could be enhanced by 18.1% in turn. Implementing the fermentation in a 30 L B. Braun fermentor by constant feeding 1.0 g/dL glucose at exponential phase, the concentration of ICPs and the titer could be enhanced by 37% and 51%, respectively. while the concentration of ICPs and titer increased 33.7% and 75.1%, respectively, when feeding 1.0 g/dL glucose at the stationary phase. It is concluded that, the synthesis of synergistic factor can be promoted more effectively when feeding glucose at the stationary phase rather than exponential phase.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; glucose fed; ICPs; titer

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)以其独特的产伴胞晶体蛋白( $\delta$ -内毒素, ICPs)的能力使

收稿日期:2004-03-29; 修回日期:2004-05-08.

基金项目:国家科技攻关计划项目(2001BA708B07-02)资助课题.

作者简介:张家学(1979-),男,湖北武汉人,工学硕士;\*通讯作者.

它成为目前世界上使用最广泛的杀虫微生物。从 20 世纪 70 年代起,苏云金芽胞杆菌在生物防治方面得到了广泛地应用,主要用于农、林、牧等领域的害虫防治<sup>[1]</sup>。随着新菌株的发现以及分子克隆技术的应用,它的应用范围还在不断扩大<sup>[1,2]</sup>,使得 *Bacillus thuringiensis* 发酵过程研究成为研究热点。为了降低生产成本和提高发酵水平,许多学者在菌种的筛选和基因工程菌的构建、发酵原料的选择、培养基的优化以及发酵过程中相关参数对发酵水平的影响等方面都作了大量的研究<sup>[3~6]</sup>。目前国内采用分批发酵生产 *Bacillus thuringiensis*,且一般都通过提高培养基的浓度来提高发酵水平,但由于底物抑制作用和供氧的限制很难达到好的效果<sup>[5]</sup>。补料发酵介于分批发酵和连续发酵,兼有两者的优点,可以很好地解决上述两个问题。在 *Bacillus thuringiensis* 的补料发酵研究方面,由于以前的补料研究以提高生物量或芽孢数为目的,从而使得生物量和芽孢数达到了  $10^{10}$  个以上<sup>[7]</sup>,但发酵水平大幅度下降<sup>[8,9]</sup>。

作者对不同发酵时期补加葡萄糖对发酵水平的影响做了研究,以期探讨不同时期的葡萄糖补加对菌体生成、芽孢合成、晶体蛋白表达以及发酵水平的综合影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

苏云金芽胞杆菌工程菌 BMB005,由作者所在实验室构建并保存。

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 组分(g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10,NaCl 5.0。pH 7.2。

1.2.2 发酵培养基 H<sub>9</sub> 组分(g/L):液化玉米淀粉 30,黄豆饼粉 20,蛋白胨 20,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.35。pH 7.0。

### 1.3 培养方法

将斜面菌种转接到种子培养基中,30℃下 150 r/min 培养 7 h,再将种子液以体积分数 0.5% 的接种量接种到发酵培养基中进行发酵。为了消除供氧不足对发酵的影响,在摇瓶发酵时,将发酵培养基的浓度减半,并采用一次性补加方式;在 30 L 的 B. Braun 发酵罐中采用恒速连续补加的方式。

### 1.4 分析方法

1.4.1 晶体含量测定 先进行 SDS-PAGE 电泳<sup>[10]</sup>,再用 Image-Master 软件进行定量分析。

1.4.2 生物效价测定 以棉铃虫作为供试虫,按

《中华人民共和国农业行业标准 NY293-95 苏云金芽胞杆菌制剂》<sup>[11]</sup>规定的方法测定。

1.4.3 生物量测定 稀释平板记数法<sup>[12]</sup>。

1.4.4 同步率测定 显微记数法<sup>[12]</sup>。

1.4.5 还原糖质量浓度测定 DNS 法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 摇瓶发酵中对数生长期补加葡萄糖对菌体生长和杀虫晶体蛋白合成的影响

苏云金芽胞杆菌发酵过程主要分为 4 个阶段:延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡期<sup>[1]</sup>。在对数生长期,细胞数目以指数形式增长。在半倍的 H<sub>9</sub> 发酵培养基中,对数生长期补加 0.5 g/dL 和 1.0 g/dL 葡萄糖可显著提高生物量( $\alpha=0.1$ ),而对数生长期补加 1.5 g/dL 和 2.0 g/dL 葡萄糖对生物量没有显著性影响,见表 1。

表 1 对数生长期补加不同质量浓度的葡萄糖的摇瓶发酵试验结果

Tab. 1 Results of flask fermentation by feeding glucose at the exponential phase

补糖质量浓度/(g/dL)	ICPs/(mg/mL)	菌数/(CFU/mL)	Y <sub>ICPs/菌数</sub> /(mg/CFU)	Y <sub>ICPs/总糖</sub>
对照	1.27	$1.79 \times 10^9$	$7.09 \times 10^{-10}$	$8.47 \times 10^{-2}$
0.5	1.66	$2.23 \times 10^9$	$7.44 \times 10^{-10}$	$8.30 \times 10^{-2}$
1.0	1.69	$2.27 \times 10^9$	$7.44 \times 10^{-10}$	$6.76 \times 10^{-2}$
1.5	1.45	$2.06 \times 10^9$	$7.04 \times 10^{-10}$	$4.83 \times 10^{-2}$
2.0	1.37	$2.07 \times 10^9$	$6.61 \times 10^{-10}$	$3.91 \times 10^{-2}$

芽孢是 Bt 制剂中重要的有效性成分<sup>[7]</sup>,它对晶体杀虫蛋白有较强的协同作用,因此它的生成对发酵水平的提高有很大的影响。通过镜检发现,对数生长期补加葡萄糖对同步率没有显著的影响。杀虫晶体蛋白是发酵液中主要的活性物质,它的质量分数的高低直接影响到发酵液的效价水平<sup>[1]</sup>,因此提高菌体合成晶体蛋白的能力和发酵液的晶体质量浓度成为提高发酵水平的重要途径。通过补加不同质量浓度的葡萄糖发现:对数生长期补加葡萄糖有助于提高发酵液中晶体质量浓度,但当补加葡萄糖超过 1.0 g/dL 以后,发酵液中晶体质量浓度有降低的趋势。与对照相比,对数生长期补加葡萄糖对菌体合成晶体蛋白的能力( $Y_{ICPs/biomass}$ )没有显著影响。由此可见,对数生长期补加葡萄糖主要是通过提高生物量,进而提高发酵水平的。另外,总糖对晶体蛋白的转化率( $Y_{ICPs/Glucose}$ )随着补糖质量浓度的升高而降低。

2.2 摇瓶发酵中稳定期补加葡萄糖对菌体生长和杀虫晶体蛋白合成的影响

在发酵稳定期, 生物量基本上保持不变, 芽孢和晶体以及大部分增效因子均在此阶段大量形成. 在半倍的  $H_9$  培养基中, 考察发酵稳定期补加不同质量浓度的葡萄糖对发酵的影响. 结果表明: 在稳定期补加不同质量浓度的葡萄糖对生物量没有显著影响, 但对同步率的影响显著(见表 2). 补加 0.5 g/dL 和 1.0 g/dL 的葡萄糖时同步率总是维持在 95% 以上, 而补加 1.5 g/dL 和 2.0 g/dL 的葡萄糖时同步率分别为 86% 和 79%. 可见稳定期补加过量的葡萄糖会降低芽孢形成的同步率. 稳定期补加 0.5 g/dL 和 1.0 g/dL 葡萄糖会使发酵液中晶体质量浓度分别提高 15.0% 和 18.1%, 而稳定期补加 2.0 g/dL 葡萄糖会使发酵液中晶体质量浓度降低 22.8%, 这可能是由于过高的葡萄糖质量浓度使部分菌体减缓进入芽孢合成期的速度, 导致同步率下降, 进而降低发酵液中晶体的质量浓度. 另外补加 0.5 g/dL 和 1.0 g/dL 葡萄糖可使菌体合成晶体蛋白的能力分别提高 14.1% 和 15.5%, 而补加 2.0 g/dL 葡萄糖会使合成能力大幅度降低. 由此可见, 稳定期补加适量的葡萄糖可以提高菌体自身合成晶体蛋白的能力, 进而提高发酵水平. 和对数生长期补加一样, 在稳定期补加葡萄糖会使总糖对晶体蛋白的转化率降低.

表 2 稳定期补加不同质量浓度的葡萄糖的摇瓶发酵试验结果

Tab. 2 Results of flask fermentation by feeding glucose at the stationary phase

补糖质量浓度/(g/dL)	ICPs/(mg/mL)	菌数/(CFU/mL)	$Y_{ICPs/菌数}$ /(mg/CFU)	$Y_{ICPs/总糖}$	同步率/%
对照	1.27	$1.79 \times 10^9$	$7.09 \times 10^{-10}$	$8.47 \times 10^{-2}$	97
0.5	1.46	$1.81 \times 10^9$	$8.06 \times 10^{-10}$	$7.30 \times 10^{-2}$	96
1.0	1.50	$1.82 \times 10^9$	$8.24 \times 10^{-10}$	$6.00 \times 10^{-2}$	98
1.5	1.29	$1.84 \times 10^9$	$7.01 \times 10^{-10}$	$4.30 \times 10^{-2}$	86
2.0	0.98	$1.76 \times 10^9$	$5.57 \times 10^{-10}$	$2.80 \times 10^{-2}$	79

2.3 30 L 发酵罐系统中不同发酵阶段补加 1.0 g/dL 葡萄糖对发酵的影响

为了进一步验证补加葡萄糖的效果, 在 30 L 发酵罐中进行不同发酵阶段补加 1.0 g/dL 葡萄糖的发酵试验. 对数生长期恒速补加葡萄糖可以使发酵液

的晶体蛋白质量分数和生物效价分别提高 37% 和 51%, 而稳定期恒速补加葡萄糖可以使发酵液的晶体蛋白质量分数和生物效价分别提高 33.7% 和 75.1% (见表 3).

表 3 30 L 发酵罐中不同时期补加 1.0 g/dL 葡萄糖的发酵结果

Tab. 3 Fermentation results by feeding 1.0% glucose at different growth phases in a 30 L fermentor

发酵阶段	ICPs/(mg/mL)	效价/(IU/ $\mu$ L)	菌数/(CFU/mL)	$Y_{ICPs/菌数}$ /(mg/CFU)	$Y_{ICPs/总糖}$
对照	4.5	3085	$4.77 \times 10^9$	$9.43 \times 10^{-10}$	0.150
对数生长期补加	6.1	4671	$6.54 \times 10^9$	$9.33 \times 10^{-10}$	0.153
稳定期补加	5.9	5403	$5.44 \times 10^9$	$10.85 \times 10^{-10}$	0.148

与对数生长期补加葡萄糖相比, 晶体蛋白质量分数提高幅度稍低, 但效价提高的幅度要大得多. 与摇瓶实验相比, 在发酵罐中补加 1.0 g/dL 的葡萄糖对  $Y_{ICPs/Glucose}$  影响较小, 可见发酵罐中葡萄糖的利用率要比摇瓶中高. 在稳定期随着还原糖的利用, 发酵液的 pH 值不断降低, 直到稳定在 6.6 左右, 临近发酵结束时 pH 值才开始上升, 发酵结束时的 pH 值在 7.5 左右(图 1, 2).

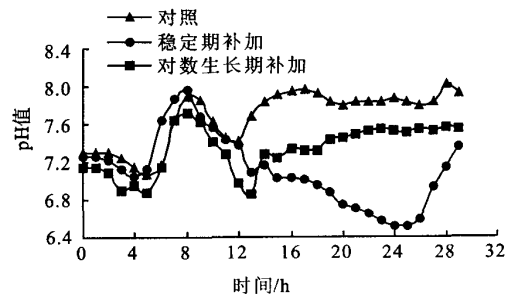
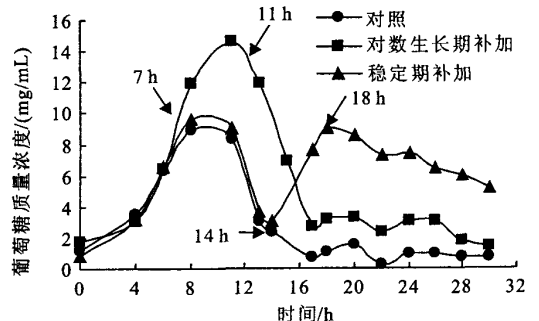


图 1 pH 值的过程变化曲线 (30 L 发酵罐)

Fig. 1 Time course of pH in a 30 L fermentor



箭头分别表示葡萄糖补加的起始和结束时间

图 2 还原糖质量浓度的过程变化曲线 (30 L 发酵罐)

Fig. 2 Time course profile of reducing glucose in a 30 L fermentor

这是由于在芽孢形成期苏云金芽孢杆菌的丙酮酸脱氢酶系发生解离,使得丙酮酸不能进入三羧酸循环<sup>[13]</sup>,稳定后期补加的葡萄糖大部分被转化成有机酸,从而发酵液 pH 值稳定在中性附近.和对照相比,稳定期补加葡萄糖不仅有助于提高菌体合成杀虫晶体蛋白能力,同时还有助于增效因子的产生.

### 3 讨论

发酵液的效价不仅与芽孢和杀虫晶体蛋白有关,还与菌体自身产生的增效因子有关<sup>[1]</sup>,因此要提高发酵水平必须综合考虑. C. Avignone Rossa 研究发现,提高生物量并不一定会提高发酵水平,甚至会使发酵水平大幅度降低<sup>[8]</sup>,可见提高菌体自身合成杀虫活性物质的能力同样重要.在摇瓶实验

中,对数生长期补加 1.0 g/dL 葡萄糖可显著提高菌数( $\alpha=0.1$ ),同时使发酵液的晶体质量浓度提高 33%,而菌体合成晶体的能力仅提高 4.2%;与此相比,稳定期补加 1.0 g/dL 葡萄糖虽然对生物量没有显著性影响,但可使发酵液的晶体质量分数提高 18.1%,且菌体合成晶体的能力提高 15.5%左右.从发酵罐的结果可看出,和对数生长期补加葡萄糖相比,稳定期补加适量的葡萄糖更有利于增效因子的合成.可见虽然在对数生长期和稳定期补加适量的葡萄糖都可以提高发酵水平,但两者机理截然不同.对数生长期补加葡萄糖可以显著提高生物量,进而提高发酵水平,这在可溶性发酵培养基实验中表现得更为显著;而稳定期补加葡萄糖对生物量影响较小,但它可以提高菌体产生活性物质的能力,进而提高发酵水平.

### 参考文献:

- [1] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京:农业出版社,1993. 1-14.
- [2] Ohba M, Lee Dong-Hyun. *Bacillus thuringiensis* associated with faeces of the Keramajika, Cervus nippon keramae, a wild deer indigenous to the Ryukyus, Japan[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2003,43(2):158-162.
- [3] Yang Xiao-ming, Wang Shaw S. Phase specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineering *Bacillus thuringiensis*[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 2000,(31):71-76.
- [4] Zouari N, Ali S B S, Jaoua S. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002 (31):411-418.
- [5] 陈在佺,吴继星. 我国苏云金杆菌液体深层发酵研究十年进展(1990~2000)[J]. **中国生物防治**, 2002,18(1):33-35.
- [6] Filiz B Dilek. Nutritional and cultural parameters influencing an-tidipteran delta-endotoxin production[J]. **Research in Microbiology**, 2003,(154): 49-53.
- [7] Kang B C, Lee S Y, Chang H N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture[J]. **Bio Letters**, 1992,14(8): 721-726.
- [8] Rossa C Avignone, Mignone C.  $\delta$ -endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis* [J]. **Bio Letters**, 1993,15(3):295-300.
- [9] Vallejo F, Posada A, Restrepo A. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture[J]. **Biotechnology Techniques**, 1999,(13):279-281.
- [10] 何小青. 苏云金芽孢杆菌基因工程菌 WG-001 的发酵工艺研究[D]. 武汉:华中农业大学,2002.
- [11] NY293-95, 苏云金芽孢杆菌制剂[S].
- [12] 李卓棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:农业出版社,1996. 28-37.
- [13] Thoms Walter, Arthur Aronson. Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999,274(12):7901-7906.

(责任编辑:李春丽)