

# 振荡和静态组合式培养改善伊枯草菌素 A 表达水平

金 虎<sup>1</sup>, 李坤朋<sup>1</sup>, 黄凤洪<sup>1,2\*</sup>, 钮琰星<sup>1</sup>, 陈守文<sup>1,3</sup>

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; 2. 油料脂质化学与营养湖北省重点实验室, 武汉 430062; 3. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

**摘要:** **目的** 以廉价菜粕作为氮源, 对其直接生物利用过程中的碳源种类和培养模式进行优化和改进。**方法** 研究液态静置培养模式下细胞生长和伊枯草菌素生产变化特性, 在此基础上提出一种两阶段(振荡+静态)组合式培养模式。**结果** 麸皮作为碳源最有利于伊枯草菌素表达, 最高浓度是葡萄糖作为碳源时最高产量的 1.6 倍; 液态静置培养基表面能够形成厚而稳定的生物膜, 发酵中后期具有比振荡培养更高的伊枯草菌素生产强度; 采用液态振荡和静置组合培养方式伊枯草菌素最高浓度可达 1.10 g/L, 接近完全振荡培养时的最高水平(1.16 g/L)。**结论** 相对于传统的全程式振荡培养而言, 这种新的组合培养方式不仅有利于伊枯草菌素高产期(发酵中后期)的过程控制, 还能降低整个发酵过程的动力成本。

**关键词:** 菜粕; 枯草芽孢杆菌; 伊枯草菌素; 组合培养

## Improvement of iturin A production with a combined shaking and static culture mode by *Bacillus subtilis*

JIN Hu<sup>1</sup>, LI Kun-Peng<sup>1</sup>, HUANG Feng-Hong<sup>1,2\*</sup>, NIU Yan-Xing<sup>1</sup>, CHEN Shou-Wen<sup>1,3</sup>

(1. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Wuhan 430062, China; 2. Hubei Key Laboratory of Lipid Chemistry and Nutrition, Wuhan 430062, China; 3. College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize and improve the type of carbon source and culture model in the process of bio-utilization when using rapeseed meal as a nitrogen source. **Methods** A combined culture mode of first shaking culture following by static biofilm fermentation was proposed based on the changing characteristics of *Bacillus subtilis* growth and iturin A production under static culture. **Results** It was indicated that wheat bran was the best carbon source for iturin A production, and the maximum iturin A concentration was 1.6 times higher than that with glucose as a carbon source. Thick and stable biofilm was observed when adopting static culture, and the iturin A productivity was higher than that with traditional shaking culture during the later period of fermentation. Compared to single static culture, the proposed combined culture mode could further improve iturin A production, and the maximum iturin A concentration reached 1.10 g/L, which was close to the highest level produced with single shaking culture (1.16 g/L).

基金项目: 国家自然科学基金(31201461)、国家“863”计划(2011AA100904)、国家支撑计划(2012BAD49G00)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201461), the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA100904), National Key Technology Research and Development Program (2012BAD49G00)

\*通讯作者: 黄凤洪, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为油料加工。E-mail: jiagongzx@oilcrops.cn

\*Corresponding author: HUANG Feng-Hong, Researcher, Doctorial Tutor, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, No. 2, Xudong Second Road, Wuchang District, Wuhan 430062, China. E-mail: jiagongzx@oilcrops.cn

**Conclusion** This new culture strategy can not only decrease the power cost but also can benefit to process control of iturin A in the later period of fermentation.

**KEY WORDS:** rapeseed meal; *Bacillus subtilis*; iturin A; combined culture

## 1 引言

伊枯草菌素是一种具有广谱抗真菌活性的抗菌多肽,也是最早最著名的来源于微生物的生物表面活性剂之一,其分子结构由1个含7个氨基酸残基的肽链和1个链长C14~C17不等的 $\beta$ -氨基脂肪酸侧链构成<sup>[1]</sup>,可广泛用于防治各种作物、蔬菜和瓜果的真菌病害,具有稳定性好、抑菌持久、不易产生抗药性和对环境安全等优点,是一种极具研究开发价值和前景的新型生物农药<sup>[2,3]</sup>。然而,迄今为止,国内外均没有良好的伊枯草菌素A及其同系物的生产方法,尤其是伊枯草菌素A及其同系物的发酵生产技术没有突破,其产量低、成本高、发酵工艺控制难度大,制约着其工业化生产和商业化应用。

对于大多数生物发酵产品而言,原料成本通常占整个生产成本的30%~40%<sup>[4]</sup>。使用廉价、广泛的发酵原料可以有效降低伊枯草菌素的生产成本。菜粕是一种廉价的优质植物蛋白源,我国年产量超过700万吨,由于菜粕中存在硫甙、芥酸、植酸和多酚等多种有害或抗营养成分,极大限制了其作为蛋白源在饲料中的有效应用。大量的饼粕只能按少量比例添加到动物饲料中或直接用作低值有机肥料,造成了优质蛋白资源的巨大浪费。近年来,国际上很多研究者利用菜籽饼粕的营养特性,将菜粕经过有效预处理后,通过液态发酵生产有机酸和微生物油脂等高附加值产品<sup>[5-8]</sup>。课题组前期研究表明,低价格菜粕可以作为枯草芽孢杆菌生产伊枯草菌素的优异氮源,伊枯草菌素的表达水平明显优于其他2种可溶性商业氮源(蛋白胨和硝酸铵)。但是,和一般生物产品不同,伊枯草菌素作为一种两性生物表面活性剂,在现有的深层液态通气搅拌发酵生产模式下,发酵中后期随着产物浓度的增加会产生大量泡沫,发酵过程中需要不断添加化学消泡剂,过多消泡剂的添加会严重影响细胞生长和产物形成。静态生物膜发酵是近年来新开发的一项新的发酵技术,在发酵技术中极具应用前景<sup>[9]</sup>。研究表明,枯草芽孢杆菌在静态培养过程中,能够在培养基表面形成生物膜并分泌产

生脂肽类次级代谢产物。Rahman等<sup>[10]</sup>研究发现通过静态生物膜发酵伊枯草菌素的产量几乎是深层液态发酵时的2倍。本实验在前期研究的基础上,拟通过培养条件的优化进一步提高现有伊枯草菌素的表达水平。同时,为降低伊枯草菌素生产成本和生产可操作性,考察静态生物膜培养模式下枯草芽孢杆菌生长和伊枯草菌素的生产变化规律,为伊枯草菌素和其它脂肽类抗生素的工业化生产提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 3-10), GeneBank登陆号为JF460845。

### 2.2 培养基

斜面活化培养基:胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L,琼脂15 g/L。

种子培养基:胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L, pH 7.0。

液态发酵培养基:菜粕(过80目筛)90 g/L,麸皮40 g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.005 g/L,去离子水1 L, pH 7.0。

### 2.3 培养条件

挑取活化的枯草芽孢杆菌单菌落于种子培养基中进行摇瓶培养14 h(培养温度为28℃,转速为220 r/min),将种子培养液分别以2%的接种量接种于液态发酵培养基中进行静置和振荡培养,静置培养置于28℃恒温培养箱中,振荡培养转速为200 r/min,培养温度为28℃。

### 2.4 检测方法

伊枯草菌素含量检测:参照Mizumoto等<sup>[11]</sup>方法,略作修改。

取1.5 mL混匀的静置和振荡培养发酵液于2 mL离心管中,10 000 r/min离心15 min,取300 mL上清液于1.2 mL甲醇中,摇匀浸提60 min,然后以12 000 r/min离心15 min,上清液用孔径为0.22  $\mu m$ 的一次性过滤器过滤,滤液于高效液相色谱仪(HPLC)检测。

HPLC 分析系统为 Waters 2695 HPLC, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEA C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 °C; 所用流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 10 mmol/L 醋酸铵(V:V), 流动相比例: A:B=35:65(V:V); 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL。

活细胞数测定: 采用稀释平板菌落计数法进行测定。取 0.5 mL 静置和振荡培养发酵液样品置于 10 mL 无菌试管中, 加入 4.5 mL 无菌水, 用旋涡振荡器 150 r/min 进行充分混合 5 min, 按 10 倍进行稀释得到不同稀释度的发酵液, 从中取 3 个合适稀释倍数的发酵液取 0.1 mL 进行平板计数, 每个稀释度做 3 个平行, 将平板倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 根据稀释平板计数法的计算方式确定活菌数目。

还原糖浓度检测: 以葡萄糖作为标准, 采用 DNS 法测定进行测定<sup>[12]</sup>。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 葡萄糖作为碳源振荡培养过程动力学变化特性

图 1 显示了在葡萄糖作为碳源(初始葡萄糖浓度为 20 g/L)时, 枯草芽孢杆菌利用菜粕液态振荡培养生产表达伊枯草菌素发酵过程中细胞生长、伊枯草菌素和还原糖浓度的变化情况。由图 1 可知, 细胞在接种 d 1 处于对数生长期, 活细胞数从接种时的  $3.6 \times 10^7$

增至  $6.1 \times 10^9$  (1 d), 在此期间, 还原糖浓度也迅速下降, 从发酵初始时的 22.5 g/L 下降至 11.4 g/L。在发酵 d 2 后, 细胞浓度稳定在  $2.5 \sim 3.5 \times 10^{10}$  范围内。发酵 3 d 之后, 还原糖浓度维持在 3~4 g/L 的水平。伊枯草菌素浓度在发酵 1~2 d 内迅速增加, 在发酵 d 4 达到最大, 最大浓度为 0.67 g/L。

#### 3.2 不同种类碳源对枯草芽孢杆菌表达伊枯草菌素的影响

前期研究结果表明, 以葡萄糖作为碳源时, 氮源的种类对伊枯草菌素的表达影响很大, 相对于有机氮源(蛋白胨和菜粕)而言, 可溶性无机氮源(硝酸铵)更有利于细胞的生长, 却不利于伊枯草菌素的表达, 以不可溶性菜粕作为氮源时伊枯草菌素的产量最高<sup>[13]</sup>。为进一步提高伊枯草菌素的表达水平, 考察了以菜粕作为氮源时, 可溶性甘油(C3)、葡萄糖(C6)、麦芽糖(C12)、可溶性淀粉(多碳)及麸皮(不可溶碳源)等不同种类碳源对枯草芽孢杆菌表达伊枯草菌素的影响(图 2), 根据不同碳源中碳含量差异, 甘油、葡萄糖、麦芽糖和可溶性淀粉的浓度为 20 g/L, 麸皮和玉米皮浓度为 40 g/L。从图 2 中可以看出, 相对于其他可溶性碳源而言, 不可溶缓释氮源麸皮和玉米皮更有利于伊枯草菌素的表达, 当以麸皮作为碳源时, 摇瓶液态振荡培养下最高浓度达到 0.96 g/L, 是葡萄糖作为碳源时最高产量的 1.6 倍。

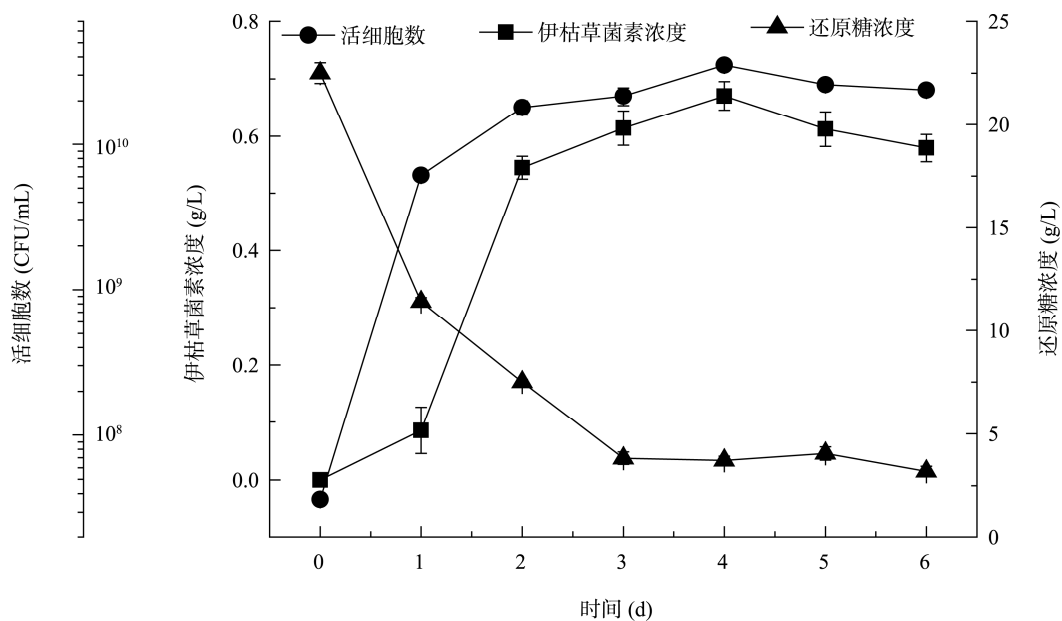


图 1 细胞生长、伊枯草菌素和还原糖浓度变化曲线

Fig. 1 Variation curve of cell growth, iturin A and reducing sugar concentrations

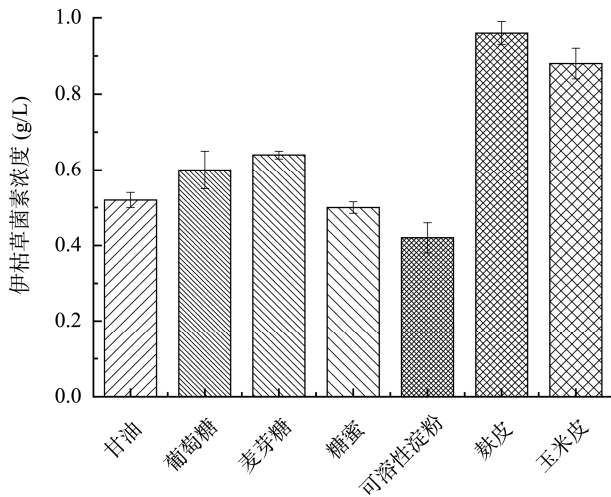


图2 不同种类碳源对枯草芽孢杆菌表达伊枯草菌素影响  
Fig. 2 Effects of different kinds of carbon sources on iturin A production

### 3.3 液态振荡和静置培养下伊枯草菌素生产性能比较

枯草芽孢杆菌在利用菜粕液态振荡培养发酵生产伊枯草菌素过程中,由于伊枯草菌素的两性表面活性剂特性,随着发酵后期伊枯草菌素浓度的增加,泡沫量也逐渐增加,在摇瓶培养过程中甚至会产生

逃液现象,不仅会造成产物的大量流失,也存在潜在染菌的风险。为此,有研究者在脂肽抗生素生产过程中增加了特殊的泡沫收集装置<sup>[14-16]</sup>。同时,在发酵过程中采用连续回收泡沫的方式能够进一步提高脂肽产量<sup>[17]</sup>。另外,采用新型静态生物膜发酵方式能够提高伊枯草菌素产量<sup>[9,10]</sup>。同时,培养基成分也影响生物膜的形成。从图3可以看出,在以菜粕和麸皮作为营养基质进行静置培养时,随着发酵时间的进行,逐渐形成厚而稳定的生物膜,且形成的生物膜颜色也有所改变。为降低伊枯草菌素生产成本和生产可操作性,比较了液态振荡和静置生物膜发酵下伊枯草菌素的表达水平。

从图4A可以看出,静置培养下发酵前4天的细胞浓度要低于振荡培养下的浓度水平,但均低于以葡萄糖作为碳源时的细胞浓度(图1)。从图4B可以看出,在发酵前5d,伊枯草菌素浓度随着发酵时间逐渐增加,但整个发酵过程中振荡培养下伊枯草菌素的浓度比静置生物膜发酵时高,但随着菌体浓度差异的减小,产物浓度之间的差距随着培养时间逐渐减小,在发酵后期(4~5d)静置生物膜发酵能够明显提高伊枯草菌素产量,具有更高的生产强度。2种培养方式下发酵d5的浓度达到最大,分别为1.14和

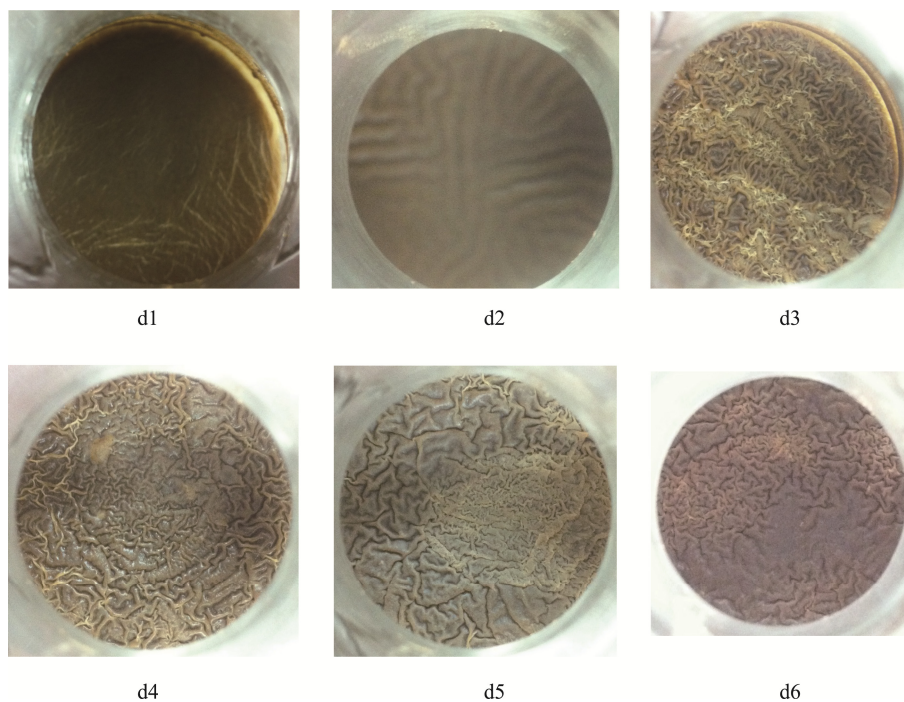


图3 静置培养下生物膜随时间变化规律

Fig. 3 Changed features of biofilm with time under static culture

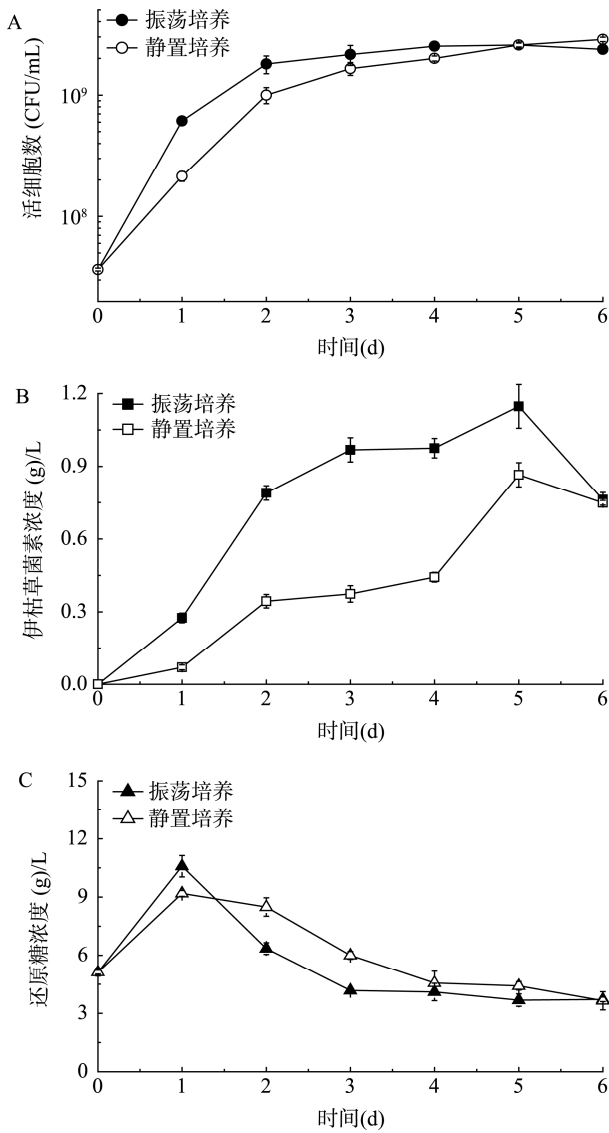


图 4 液态振荡和静置培养下活细胞数、伊枯草菌素和还原糖浓度比较

Fig. 4 Comparison of viable cells number, iturin A and reducing sugar concentrations between shaking and static culture

0.86 g/L。从图 4C 可以看出, 当以麸皮作为碳源时, 初始还原糖浓度约为 3 g/L, 表明一定浓度的可溶性还原糖释放到培养基中。随着发酵时间的进行, 释放的还原糖浓度逐渐增加, 但随着细胞浓度的增加, 还原糖浓度也逐渐降低, 发酵 4 d 后还原糖浓度维持在 3 g/L 的水平, 表明还原糖的释放和利用速率相当。

### 3.4 液态振荡和静态组合式培养对伊枯草菌素表达的影响

静置培养过程中, 芽孢杆菌通过在培养基表面

形成生物膜从而代谢产生伊枯草菌素。而且, 静置培养过程中氧的供应没有振荡培养过程充分, 导致培养过程中尤其是发酵前期的细胞浓度较低, 使得整个发酵过程中伊枯草菌素浓度低于振荡培养(图 4)。为此, 通过实验, 提出了液态振荡和静态组合式培养策略, 即通过前期的振荡培养, 使细胞在短时间内达到高密度, 在发酵后期通过静态生物膜发酵, 进一步提高伊枯草菌素的生产水平。从图 3 中可以看出, 振荡培养下细胞浓度在培养 d 3 基本稳定, 因此, 考察了振荡培养 1~3 d 再静置培养对伊枯草菌素表达的影响, 结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出, 相对于完全静置培养而言, 采用振荡和静态组合培养方式能够明显提高伊枯草菌素的表达水平, 发酵前 4 d 伊枯草菌素浓度明显高于完全静置培养时的浓度。振荡培养和静置培养各 3 d 时伊枯草菌素水平最高达 1.10 g/L, 接近完全振荡培养时的最高水平(1.16 g/L)。相对于完全振荡培养而言, 联合培养策略在保证相同发酵水平的同时, 能够显著降低发酵后期的动力消耗, 节省生产成本, 并能有效避免发酵中后期泡沫的产生和染菌风险。

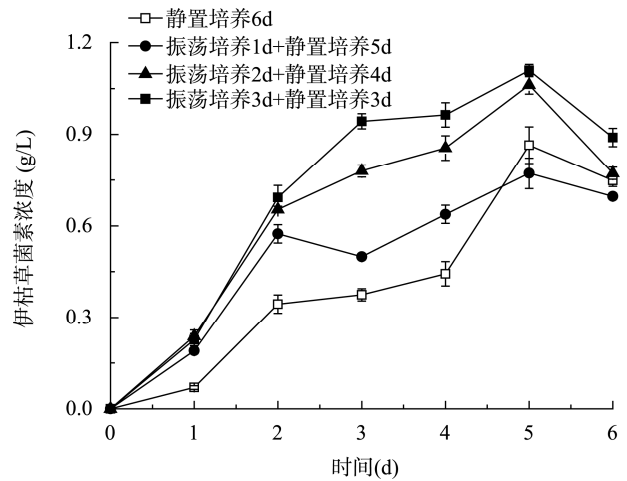


图 5 不同振荡和静置联合培养方式下伊枯草菌素浓度变化情况比较

Fig. 5 Comparison of iturin A production with different combined shaking and static culture modes

## 4 结 论

对以低值菜粕作为氮源时的碳源种类进行优化, 表明麸皮最有利于伊枯草菌素的生产表达, 摇瓶振

荡培养下的最高伊枯草菌素浓度达 1.16 g/L, 进一步提高了伊枯草菌素的表达水平。在此基础上, 研究了静止培养下枯草芽孢杆菌的生长变化和伊枯草菌素浓度变化特性, 并根据振荡和静置培养下细胞生长和产物生成变化差异, 提出振荡和静置组合培养提高伊枯草菌素表达的发酵策略, 振荡培养和静置培养各 3 d 时伊枯草菌素水平最高达 1.10 g/L, 接近单一振荡培养时的最高水平。相对于传统的全程式振荡培养而言, 这种新的组合培养方式不仅有利于伊枯草菌素高产期(发酵中后期)的过程控制, 还能降低整个发酵过程的动力成本。

### 参考文献

- [1] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol [J]. *Trend Microbiol*, 2008, 16: 115–125.
- [2] Bonmatin JM, Laprevote O, Peypoux F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6: 541–556.
- [3] Peng WJ, Zhong J, Yang J, *et al.* The artificial neural network approach based on uniform design to optimize the fed-batch fermentation condition: application to the production of iturin A [J]. *Microbiol Cell Fact*, 2014, 13: 10.
- [4] Jain RM, Mody K, Joshi N, *et al.* Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62: 52–58.
- [5] Lomascolo A, Uzan-Boukhris E, Sigoillot JC, *et al.* Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(5): 1105–1114.
- [6] Kiran EU, Salakkam A, Antoine P, *et al.* Enhancing the value of nitrogen from rapeseed meal for microbial oil production [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2012, 50(6–7): 337–342.
- [7] García IL, López JA, Dorado MP, *et al.* Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator* [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 130: 16–22.
- [8] Kiran EU, Trzcinski A, Webb C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 129: 650–654.
- [9] Salma ZU, Shahedur RM, Takashi A. Biofilm formation and lipopeptide antibiotic iturin A production in different peptone media [J]. *J Environ Sci Suppl*, 2009: S24–S27.
- [10] Rahman MS, Ano T, Shoda M. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168 [J]. *J Biotechnol*, 2007, 127: 503–507.
- [11] Mizumoto S, Hirai M, Shoda M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 72: 869–875.
- [12] Miller GL, Blum R, Glennon WE, *et al.* Measurement of carboxymethylcellulase activity [J]. *Anal Biochem*, 1960, 1: 127–132.
- [13] Jin H, Zhang XR, Li KP, *et al.* Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e111171.
- [14] Davis DA, Lynch HC, Varley J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2001, 28: 346–354.
- [15] Yeh MS, Wei YH, Chang JS. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis* [J]. *Process Biochem*, 2006, 41: 1799–1805.
- [16] Cavalcante Barros FF, Ponezi AN, Pastore GM. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35: 1071–1078.
- [17] Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJB, *et al.* Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42: 408–412.

(责任编辑: 李振飞)

### 作者简介



金 虎, 助理研究员, 主要研究方向为发酵过程优化与控制, 农业副产物生物转化与高值化利用。

E-mail: goldtiger1980@163.com



黄凤洪, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为油料加工。

E-mail: jiagongzx@oilcrops.cn