

# 耐高温半乳糖地质杆菌BWTGW1-1液体发酵工艺优化及中试生产

谢小林<sup>1</sup>, 陈猛<sup>1,2</sup>, 李燕旋<sup>1</sup>, 周莲<sup>1,3</sup>, 王勇<sup>3</sup>, 李成江<sup>1,3</sup>, 刘玉敏<sup>1,3</sup>, 姚青<sup>2\*</sup>, 朱红惠<sup>1\*</sup>

(1. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 农业农村部农业微生物组学重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东广州 510070) (2. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642) (3. 广东博沃特生物技术有限公司, 广东韶关 512026)

**摘要:** 半乳糖地质杆菌 (*Geobacillus galactosidasius*) 是畜禽养殖废弃物堆肥发酵过程中常见的菌株类群, 在好氧堆肥发酵过程中有重要作用。为获得菌株 BWTGW1-1 液体发酵的最佳条件, 并建立其规模化生产工艺, 该研究采用单因素和响应面试验对菌株 BWTGW1-1 液体发酵培养基的组成、发酵条件进行了优化。结果表明菌株 BWTGW1-1 液体发酵最佳的培养基组成和条件为: 甘露醇 2.50 g/L、酵母膏 8 g/L、大豆蛋白胨 5 g/L、氯化钠 1.50%, 培养温度 60 °C、pH 值 6.00、液体接种量为 0.50%, 在此条件下菌株 BWTGW1-1 液体菌剂 OD<sub>600</sub> 值可达 1.423 7。在此基础上, 基于 5 t 液体发酵罐体系, 建立菌株 BWTGW1-1 规模化液体发酵工艺, 并通过 2 个批次规模化生产进行验证, 获得将近 5.50 t 菌株 BWTGW1-1 液体菌剂产品, 菌剂有效活菌数能达到  $7.25 \times 10^8$  CFU/mL, 喷雾干燥原粉有效活菌数达到  $1.12 \times 10^{10}$  CFU/g, 杂菌率极低 (<0.01%)。研究表明菌株 BWTGW1-1 的最优中试生产发酵条件为, 甘露醇 2.50 g/L、酵母膏 8 g/L、大豆蛋白胨 5 g/L、NaCl 1.50 wt%、pH 值 6.00、温度 60 °C, 发酵 0~12 h 转速 150 r/min, 12~24 h 转速 250 r/min, 通气量 20 m<sup>3</sup>/h, 发酵时长 24 h。

**关键词:** 半乳糖地质杆菌; 耐高温; 液体发酵条件; 响应面优化; 中试发酵

文章编号: 1673-9078(2024)09-87-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1043

## Optimization of Liquid Fermentation Process and Pilot Production of High Temperature-resistant *Geobacillus galactosidasius* BWTGW1-1

XIE Xiaolin<sup>1</sup>, CHEN Meng<sup>1,2</sup>, LI Yanxuan<sup>1</sup>, ZHOU Lian<sup>1,3</sup>, WANG Yong<sup>3</sup>, LI Chengjiang<sup>1,3</sup>, LIU Yumin<sup>1,3</sup>, YAO Qing<sup>2\*</sup>, ZHU Honghui<sup>1\*</sup>

引文格式:

谢小林, 陈猛, 李燕旋, 等. 耐高温半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 液体发酵工艺优化及中试生产 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 87-95.

XIE Xiaolin, CHEN Meng, LI Yanxuan, et al. Optimization of liquid fermentation process and pilot production of high temperature-resistant *Geobacillus galactosidasius* BWTGW1-1 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 87-95.

收稿日期: 2023-09-03

基金项目: 广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目 (2022SDZG09); 广东省农业科技创新九大主攻方向“揭榜挂帅”项目 (2023SDZG09); 广东省省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目 (2022-440000-43010104-9463); 韶关市科技计划项目 (210806164532037); 广州市科技计划项目 (202201011832); 广东特支计划项目 (2021JC06N628)

作者简介: 谢小林 (1986-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 农业废弃物资源化利用, E-mail: xiexiaolin198606@sina.com; 共同第一作者: 陈猛 (1991-), 男, 在读博士, 工程师, 研究方向: 农业废弃物资源化利用, E-mail: 1091026467@qq.com

通讯作者: 姚青 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物肥料与果树栽培研究, E-mail: yaoqsc@scau.edu.cn; 共同通讯作者: 朱红惠 (1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源发掘与创新利用, E-mail: zhuhh@gdim.cn

(1.State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)(2.College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(3.Guangdong Bowote Biotechnology Co. Ltd., Shaoguan 512026, China)

**Abstract:** *Geobacillus galactosidasius* is a common bacterial group in the livestock and poultry waste composting fermentation process, and plays an important role in aerobic composting fermentation. To obtain the optimal liquid fermentation conditions for strain BWTGW1-1 and establish its large-scale production process, a single factor and response surface methodology were used to optimize the composition and fermentation conditions of the liquid fermentation of strain BWTGW1-1. The results showed that the optimal medium composition and conditions for liquid fermentation of strain BWTGW1-1 were as follows: mannitol (2.50 g/L), yeast extract (8 g/L), soy peptone (5 g/L), sodium chloride (1.50%), culture temperature of 60 °C, pH value 6.00, and liquid inoculum (0.50%). Under these conditions, the OD<sub>600nm</sub> value of the liquid inoculum of strain BWTGW1-1 reached 1.423 7. On this basis, using a 5 ton liquid fermentation tank system, a large-scale liquid fermentation process for strain BWTGW1-1 was established, and validated through two batches of large-scale production. Nearly 5.50 tons of strain BWTGW1-1 liquid microbial product were obtained, with an effective viable bacterial count of  $7.25 \times 10^8$  CFU/mL. The effective viable count in the spray-dried raw powder reached  $1.12 \times 10^{10}$  CFU/g, with a noticeably low impurity rate (<0.01%). Conclusively, the optimal pilot production fermentation conditions for strain BWTGW1-1 were as follows: mannitol 2.50 g/L, yeast extract 8 g/L, soy peptone 5 g/L, NaCl 1.50 wt.%, pH 6.00, temperature 60 °C, fermentation speed 150 r/min for 0~12 h, 250 r/min for 12~24 h, ventilation rate 20 m<sup>3</sup>/h, and fermentation time of 24 h.

**Key words:** *Geobacillus galactosidasius*; high temperature resistance; liquid fermentation conditions; response surface optimization; pilot fermentation

嗜热菌产生的酶在高温和较宽的 pH 值范围内都能保持催化活性, 具有很好的应用前景; 因此, 近年来嗜热菌的分离筛选得到了广泛关注<sup>[1]</sup>。地杆菌属 (*Geobacillus*) 即是其中被常分离到的类群, 也是嗜热菌中的最重要类群之一, 其为革兰氏染色阳性、需氧、可形成内孢子且专性嗜热类群<sup>[2]</sup>。*Geobacillus* 于 2001 年从芽孢杆菌属中分离出来并重新分类<sup>[3]</sup>, 其主要从堆肥中分离<sup>[4]</sup>, 此外也有从高温油田和温泉等分离到<sup>[5,6]</sup>。在功能方面, *Geobacillus* spp 代谢五碳和六碳糖、木聚糖和淀粉的能力突出, 引起了国内外学者的广泛关注, 相关研究主要集中于将其在需要生物质转化的生物技术中应用, 如好氧高温堆肥应用研究等<sup>[7-9]</sup>。

好氧堆肥技术是畜禽粪便、废饲料和废弃羽毛等养殖固体有机废弃物资源化利用的最重要技术手段, 是利用好氧微生物发酵及酶解代谢, 使养殖固体有机废弃物充分腐熟, 蛋白质、脂肪、淀粉和纤维素等大分子有机质降解为小分子有机物, 同时生物源高分子腐殖质含量明显增加, 成为适宜于植物生长且稳定的有机肥料的过程<sup>[10]</sup>。温度是影响好氧堆肥的关键因子, 代表有机质降解速度及微生物活

性, 是衡量有机物堆肥是否达到无害化的重要标准之一<sup>[11]</sup>。高温阶段是好氧堆肥过程中最重要的阶段之一, 但应用普通发酵菌株的高温堆肥工艺的高温阶段温度仅为 50~60 °C, 难以充分降解木质纤维素, 且还存在发酵周期长、堆肥腐熟度低、无害化不彻底、氮素损失大等问题<sup>[12]</sup>。而耐高温地质杆菌类群能提升堆肥高温阶段的温度上限, 促成超高温堆肥过程, 有助于大分子蛋白质、木质素、纤维素的快速降解<sup>[13,14]</sup>, 从而大大缩短堆肥发酵周期<sup>[15]</sup>。但目前, 生产可应用的耐高温菌剂极其匮乏, 亟需突破相关耐高温菌株的发酵技术壁垒, 以期形成可产业化应用的高效菌剂。

本课题组前期从屠宰场猪粪污泥发酵堆体中分离得到一株耐高温半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1。猪粪污泥好氧堆肥试验表明, 与对照相比, 添加菌株 BWTGW1-1 可将堆体高温阶段温度提升到 70 °C 左右, 延长高温阶段时间 3 d 以上, 同时缩短堆肥发酵周期 2~3 周以上, 说明该菌株是一株优良的高温发酵菌株, 应用潜力巨大<sup>[16]</sup>。本研究通过对菌株 BWTGW1-1 进行碳源、氮源的筛选并研究其与盐度、pH 值等最佳的培养条件, 并建立基于 500~5 000 L 液体发酵罐进行规模化中试生产工艺, 为半乳糖地

质杆菌 BWTGW1-1 产业化生产提供理论指导及实际应用数据支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种、试剂与培养基

#### 1.1.1 菌种来源

菌种为半乳糖地质杆菌 (*G. galactosidasius*) BWTGW1-1: 分离自广东省东莞市万江街道滘围北路1号东莞市中心定点屠宰场股份有限公司猪粪污泥有机废弃物堆肥样品, 保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号: GDMCC No: 61374。

#### 1.1.2 试剂

甘露醇、酒石酸钾钠、柠檬酸钠、乙酸钠、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、酵母膏、牛肉膏、硫酸铵和氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司, 酵母浸粉、细菌学蛋白胨、大豆蛋白胨、玉米浆干粉和豆粕粉购自广东环凯生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯或生化试剂。

#### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 10.00 g/L、酵母浸粉 5.00 g/L 和 NaCl 10.00 g/L, pH 值 7.00, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。LB 固体培养基: LB 液体培养基中添加琼脂粉 20.0 g/L。

### 1.2 仪器与测定方法

#### 1.2.1 实验仪器

HVE-50 高压蒸汽灭菌锅, 日本 Hirayama 公司; 超纯水机 RM-220, 湖州先河; PHS-3C 型 pH 计, 上海雷磁; 5424 小型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Ultrospec 6300 pro 紫外/可见分光光度计, 英国 GE Healthcare 公司; MDF-682 超低温冰箱, 日本 Panasonic 公司; SW-CJ-2FD 洁净工作台, 苏州苏净安泰; LRH-250 生化培养箱, 上海浦东荣丰, HZQ-X300C 恒温振荡器, 上海一恒科学; DM6 光学显微镜, 德国 Leica 公司; 碟式离心机, 广州富一液体分离技术; 500L-5000L 液体发酵罐, 镇江天泰生物工程设备。

#### 1.2.2 测定方法

##### 1.2.2.1 摇瓶种子液制备

取菌株 BWTGW1-1 在 LB 培养基平板上划线活化, 55 °C 培养箱中过夜培养。将单菌落接种于盛

有 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中, 于 60 °C 水浴恒温振荡器震荡培养 24 h 备用。

##### 1.2.2.2 菌株 BWTGW1-1 发酵培养基优化

###### (1) 单因素试验

碳源培养基: 基础培养基: 酵母膏 5 g/L, 细菌学蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.00。在基础培养基上, 探究甘露醇、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乙酸钠、酒石酸钾钠、柠檬酸钠等七种不同碳源 (碳源添加量为 10.00 g/L) 及最佳碳源添加量 (设置 5 个梯度: 2.50、5.00、10.00、15.00、20.00 g/L) 对菌株 BWTGW1-1 生长量 OD<sub>600</sub> 的影响。

氮源培养基: 基础培养基: 甘露醇 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.00。在基础培养基上, 探究胰蛋白胨、细菌学蛋白胨、大豆蛋白胨、玉米浆干粉、硫酸铵、豆粕粉等六种不同氮源 (氮源添加量为 10.00 g/L) 及最佳氮源添加量 (设置 5 个梯度: 2.50、5.00、10.00、15.00、20.00 g/L) 对菌株 BWTGW1-1 生长量 OD<sub>600</sub> 的影响。

最后, 在固定最适碳源及氮源的基础上, 研究酵母膏添加量 (设置 5 个质量浓度梯度: 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 g/L)、NaCl 质量分数 (设置 7 个质量分数梯度: 0.00%、0.50%、1.00%、1.50%、2.00%、3.00%、5.00%) 及不同 pH 值 (基础培养基: 酵母提取物 5g, 大豆蛋白胨 10 g, NaCl 10 g。用 0.1% 稀盐酸和氢氧化钠调节培养基 pH 值分别为: 5、6、7、8 和 9) 对菌株 BWTGW1-1 生长量 OD<sub>600 nm</sub> 的影响。

###### (2) 最陡爬坡试验

通单因素试验发现甘露醇、酵母膏和大豆蛋白胨 3 个因子对菌株 BWTGW1-1 生长的影响非常明显, 确定为主要因子。在单因素试验基础上设定甘露醇、酵母膏和大豆蛋白胨取值范围及变化方向, 进行  $n=5$  的最陡爬坡试验, 通过最陡爬坡试验快速逼近对菌体细胞密度 (OD<sub>600</sub>) 影响最大的最佳水平。

表 1 最陡爬坡试验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of path of steepest ascent method experiments design

试验编号	因子		
	甘露醇	酵母膏	大豆蛋白胨
1	3.50	6	2
2	3	7	3
3	2.50	8	4
4	2	9	5
5	1.50	10	6



### (3) 响应面试验设计

根据最陡爬坡试验的结果,选择甘露醇(X1)、酵母膏(X2)、大豆蛋白胨(X3)3个因素,设计3因素3水平的中心组合试验设计(Central Composite Design, CCD),响应面试验。响应面试验设计因素及水平见下表。采用软件 Design Expert 8.0.5 对试验结果进行多元回归分析,拟合出各因素水平和菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值之间的回归方程。

表 2 响应面试验设计因素及水平

Table 2 Factors and levels of response surface tests design

因素	因子		
	-1	0	1
X1	2	2.50	3
X2	7	8	9
X3	3	4	5

#### 1.2.2.3 半乳糖地质杆菌BWTGW1-1中试发酵工艺流程

(1) 种子液的制备(500 L 发酵罐):按响应面试验优化后的液体发酵培养基配方,在 500 L 发酵罐中进行种子液的发酵试验,投料体积 300 L,消泡剂 0.05%,灭菌前调 pH 值至 6.00,121 °C 灭菌 20 min、冷却水循环降温至 55 °C 后,接入 1 L 菌株 BWTGW1-1 摇瓶种子菌液,设置发酵参数条件:发酵 0~8 h 转速 150 r/min,8~15 h 转速 300 r/min,通气量 15 m<sup>3</sup>/h,60 °C 培养 15 h 后转 5 000 L 罐。

(2) 5 000 L 罐发酵中试:按响应面试验优化后的液体发酵培养基配方,在 5 000 L 发酵罐中进行产业化中试发酵试验,投料体积 3 000 L,消泡剂 0.05%,灭菌前调 pH 值至 6.00,121 °C 灭菌 20 min、冷却水循环降温至 55 °C 后,将(1)步骤发酵好的 300 L 种子液通过专门联通管道接入大罐,设置发酵参数条件:发酵 0~12 h 转速 150 r/min,12~24 h 转速 250 r/min,通气量 20 m<sup>3</sup>/h,60 °C 培养 24 h 后放罐,并将其中 1 吨菌液通过碟式离心机(富一液体分离技术,广州)离心,浓缩液经离心式喷雾干燥塔喷雾干燥(设置 3 s 瞬时温度 150 °C)得到原粉。整个中试发酵重复两批次,并检测两批次半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 成品菌液和喷雾干燥原粉的有效活菌数。活菌计数采用稀释涂布平板法<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.2.4 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 作图,用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析。所有数值在  $P < 0.05$  时均被认为是显著的,并以平均值 ± 标准偏差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 半乳糖地质杆菌BWTGW1-1发酵培养基优化单因素试验

#### 2.1.1 不同碳源及甘露醇添加量对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响

不同碳源及甘露醇添加量对菌株 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响分别见图 1 和图 2。

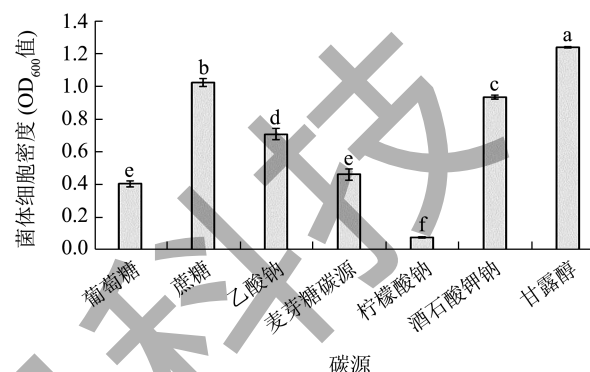


图 1 碳源种类对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.1 Effect of carbon source types on the bacterial cell density of *G. galactosidarius* BWTGW1-1

注:不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),下同。

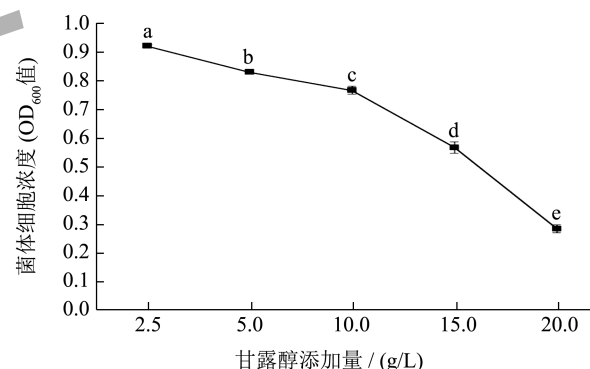


图 2 甘露醇添加量对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.2 Effect of carbon mannitol addition on the bacterial cell density of *G. galactosidarius* BWTGW1-1

由图 1 可知,甘露醇作为单一碳源时,菌体细胞密度最大,OD<sub>600</sub> 值达到 1.240 5,其次是蔗糖,OD<sub>600</sub> 值达到 1.026 6。芽孢杆菌类群的最佳发酵碳源多为小分子糖类(葡萄糖、蔗糖等)及淀粉或糊精,甘露醇为最佳发酵碳源的很少<sup>[18-21]</sup>,推测可能是半乳糖地质杆菌类群有较为独特的碳源偏好性。因发酵结果差距达到显著水平,且成本在可接

受范围,故确定最佳碳源为甘露醇。图2结果显示,随着甘露醇添加量的升高,菌体细胞密度 $OD_{600}$ 值呈不断降低趋势,可能是菌株BWTGW1-1对甘露醇利用较为高效,较低浓度甘露醇即可满足其生长需求,而当甘露醇添加量过多时,与蔗糖类似,可能会导致培养基的渗透压过高,从而导致菌体的生长受到抑制<sup>[22]</sup>。当甘露醇添加量为2.50 g/L时, $OD_{600}$ 值最大为0.9216。因此,选择甘露醇的最优添加量为2.50 g/L开展后续单因素试验。

### 2.1.2 不同氮源及大豆蛋白胨添加量对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响

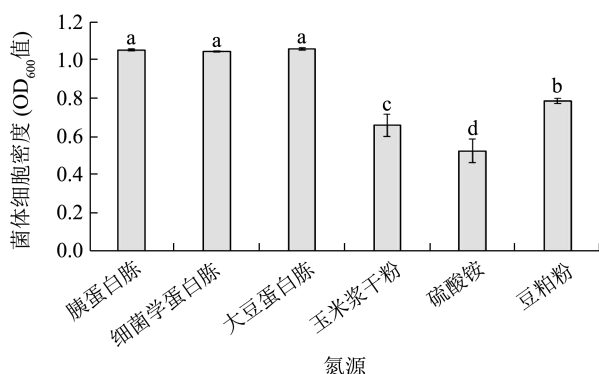


图3 氮源种类对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source types on the bacterial cell density of *G. galactosidarius* BWTGW1-1

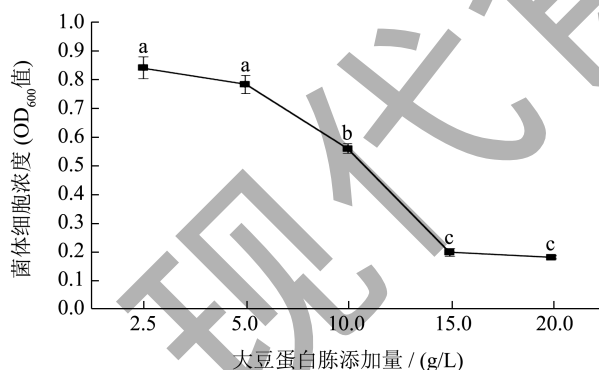


图4 大豆蛋白胨添加量对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.4 Effect of soya peptone addition on the bacterial cell density of *G. galactosidarius* BWTGW1-1

不同氮源及大豆蛋白胨添加量对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响见图3和图4。由图3可知,采用蛋白胨类(胰蛋白胨、细菌学蛋白胨和大豆蛋白胨)为单一氮源时,菌株BWTGW1-1的菌体细胞密度 $OD_{600}$ 值显著高于豆粕粉等其他类型氮源,其中大豆蛋白胨最高达1.0574。图4结果表明,随

着大豆蛋白胨添加量的增加, $OD_{600}$ 值呈不断下降趋势,这可能由于碳氮比对菌株生长的影响<sup>[23]</sup>,菌株BWTGW1-1适宜生长的碳氮比(C/N)较大,随着氮源添加量的增加,C/N不断减少,抑制了其正常生长。此外,当大豆蛋白胨添加量为2.50~5.00 g/L时,菌体细胞密度显著高于其他处理,添加量为2.50 g/L时 $OD_{600}$ 值最高,达到0.8752。

### 2.1.3 不同酵母膏添加量对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响

酵母膏是酵母类有机氮源的主要种类,但其除了蛋白质含量高(蛋白质占干菌体总重50%以上),还富含维生素和矿物质等微生物生长繁殖所需的重要生长因子<sup>[24]</sup>。前期预实验发现酵母膏对菌株BWTGW1-1生长有明显影响,因此将其专列开展单因素试验。不同酵母膏添加量对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响见图5。试验结果表明,随着酵母膏添加量的增加, $OD_{600}$ 值呈先升高后下降趋势,这可能由于少量添加酵母膏,可以给菌株BWTGW1-1生长提供了必须的维生素和矿物质等重要因子,但酵母膏添加量过多时,C/N过小,抑制了其正常生长。当酵母膏添加量为8.00 g/L时, $OD_{600}$ 值最高达到0.8259。

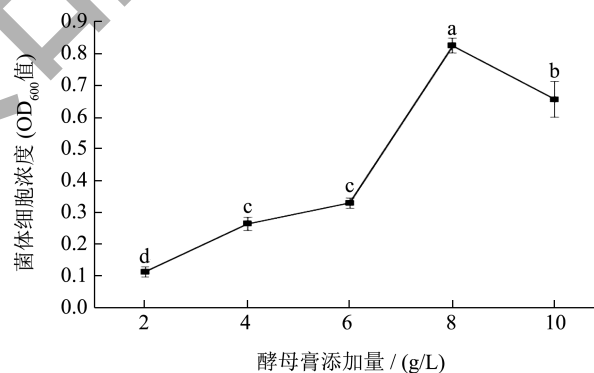


图5 酵母膏添加量对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.5 Effect of yeast extract paste addition on the bacterial cell density of *G. galactosidarius* BWTGW1-1

### 2.1.4 不同盐质量分数对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响

无机盐类具有调节细胞膜的通透性,维持正常渗透压和酸碱平衡,参与调节酶、激素和维生素等多种生理功能<sup>[25]</sup>。不同盐质量分数对菌株BWTGW1-1菌体细胞密度的影响见图6。试验结果表明,随着盐质量分数的不断增加, $OD_{600}$ 值呈先升高后下降趋势,当NaCl质量分数为1.50%时, $OD_{600}$ 值最高达到1.0992。值得注意的是,许多研

研究者也有考虑其他盐类对芽孢杆菌类微生物发酵的影响,例如磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锰和氯化钾等,这些研究表明,像磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钾等都可能不同菌株的最适盐类<sup>[19-21,26]</sup>。本研究只考虑氯化钠较为单一,后续研究可探索多种其他盐类对菌株 BWTGW1-1 生长的影响。

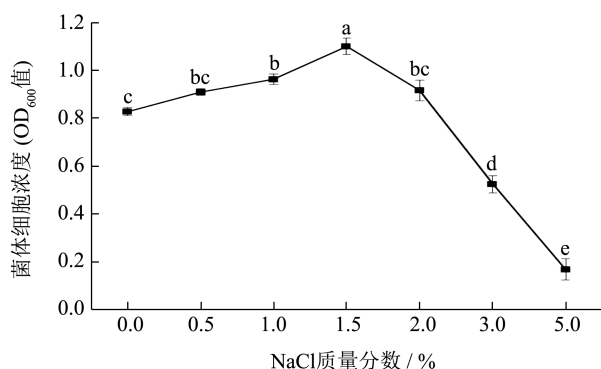


图 6 NaCl 质量分数对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.6 Effect of NaCl concentration on the bacterial cell density of *G. galactosidasius* BWTGW1-1

### 2.1.5 不同 pH 值对菌株 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

微生物都有其最适生长 pH 值,例如解淀粉芽孢杆菌的最适生长 pH 值在 7.50 上下,但不同芽孢杆菌类群之间的最适 pH 值存在一定差异<sup>[27]</sup>。为探究 pH 对菌株 *G. galactosidasius* BWTGW1-1 生长的影响,笔者配制不同 pH 的发酵培养基,结果见图 7。当初始 pH 值为 6.00~8.00 时,菌株 BWTGW1-1 菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值达到 1.059 6~1.137 4,差异不显著,在 pH 值为 6.00 时,OD<sub>600</sub> 值达到最大值,整体看一般在芽孢杆菌适宜 pH 值范围内,初始 pH 值对菌体数量影响不大。

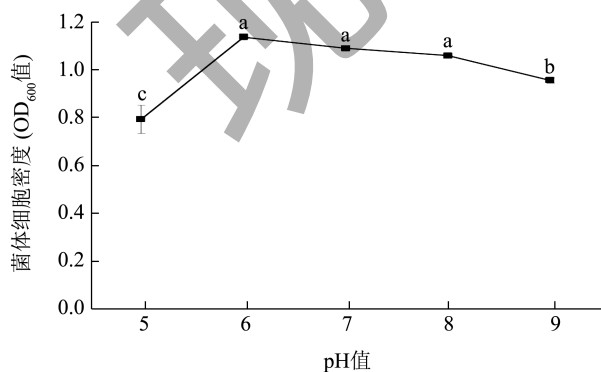


图 7 pH 值对半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度的影响

Fig.7 Effect of pH on the bacterial cell density of *G. galactosidasius* BWTGW1-1

## 2.2 菌株 BWTGW1-1 培养基优化最陡爬坡试验

最陡爬坡试验设计及结果见表 3 和图 8。分析表明,菌株 BWTGW1-1 发酵液菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值最高值出现在试验 4,应选择试验 4 的条件作为响应面试验因素水平的中心点,即甘露醇 2.00 g/L、酵母膏 9 g/L 和大豆蛋白胨 5 g/L。

表 3 最陡爬坡试验设计及结果

Table 3 Design and results of the steepest climb experiments

试验号	因子			响应值
	甘露醇	酵母膏	大豆蛋白胨	
1	3.50	6	2	0.726 0 ± 0.040 3
2	3	7	3	0.773 9 ± 0.034 7
3	2.50	8	4	0.873 2 ± 0.014 1
4	2	9	5	0.875 9 ± 0.012 1
5	1.50	10	6	0.855 8 ± 0.019 1

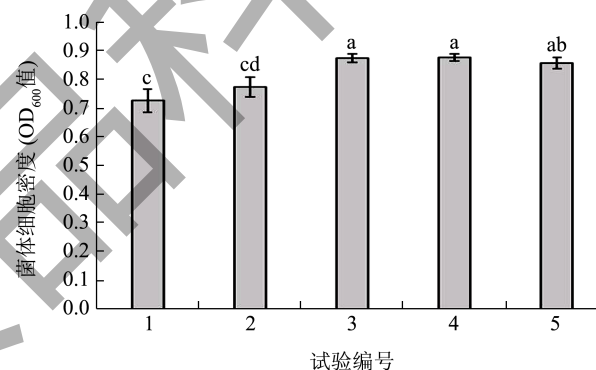


图 8 最陡爬坡试验结果

Fig.8 Results of the steepest climb experiments

## 2.3 响应面试验设计及结果

试验设计及结果见表 4,回归模型方差分析见表 5。采用 Design Expert 8.0.5 软件对表 4 试验数据进行多元二次回归拟合分析,得出二次多项回归方差为:

$$Y = 7.246 0 - 0.772 0A - 2.059 0B + 1.359 0C + 0.065 0A^2 + 0.109 0B^2 - 0.109 0C^2 + 0.113 0AB - 0.121 0AC + 0.001 0BC$$

表 5 的结果显示,模型  $P$  值 = 0.025 3 < 0.05,表明模型对结果影响显著 ( $P < 0.05$ );失拟项对结果影响不显著 ( $P$  值 = 0.131 8 > 0.05),决定系数  $R^2$  为 86.07%,调整决定系数  $R^2_{adj}$  为 68.15%。这与许多芽孢杆菌类菌株发酵响应面优化的研究结果类似,如乔香君等<sup>[26]</sup>研究解淀粉芽孢杆菌响应面优化后的回归模型方差分析结果  $R^2 = 92.95%$ ,李敏等<sup>[28]</sup>对卡氏芽孢杆菌研究结果为  $R^2 = 91.77%$ 、 $R^2_{adj} = 84.36%$ 。由此表明本研究模型可靠,能对



*G.galactosidasius* BWTGW1-1 菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值进行较好的分析和预测。由 *P* 值可知, B、C 二次项 B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 对菌株 BWTGW1-1 发酵菌体细胞密度有显著影响 (*P*<0.01), 交互项 AB、AC 有一定影响但不显著 (*P*>0.05), 其他项对结果影响不显著 (*P*>0.05)。这与石慧敏等<sup>[29]</sup>研究结果类似, 其研究显示二次项对贝莱斯芽孢杆菌发酵产芽孢都有显著影响, 而所有交互项对结果影响均不显著 (*P*>0.05)。此外, 由 *F* 值可知, 各因素对菌体细胞密度直径影响程度为 B>C>A。

综合以上试验结果, 获得发酵培养基为: 甘露醇 2.50 g/L、酵母膏 8.00 g/L、大豆蛋白脲 5.00 g/L。在此最佳发酵培养基条件下, 菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值预测值为 1.435 5。目前, 耐高温地质杆菌类群菌株响应面优化试验还未见报道, 所以与其他菌株优化试验结果可比性较低。解淀粉芽孢杆菌是公认的较易发酵的菌种, 且已经大规模产业化应用, 我们这里对比参考, 敖静等<sup>[23]</sup>以发酵液 OD<sub>600</sub> 值作为响应值, 对解淀粉芽孢杆菌开展响应面条件优化, 研究结果表明, 在最优培养条件下发酵液 OD<sub>600</sub> 值为 2.365 0, 这与我们的半乳糖地质杆菌菌株研究结果差距并不是很大, 说明本研究对需要特殊高温条件的耐高温半乳糖地质杆菌的优化达到了较为理想的水平。

表 4 响应面试验设计及结果

Table 4 Design and results of response surface tests design

试验号	X1	X2	X3	菌体细胞密度 (OD <sub>600</sub> 值)
1	0	1	1	1.061 7 ± 0.027 9 <sup>cd</sup>
2	0	0	0	0.849 6 ± 0.027 2 <sup>c</sup>
3	0	0	0	1.092 3 ± 0.047 4 <sup>bcd</sup>
4	0	0	0	1.094 2 ± 0.027 1 <sup>bcd</sup>
5	1	0	-1	1.034 4 ± 0.023 2 <sup>cd</sup>
6	-1	1	0	1.001 3 ± 0.022 2 <sup>d</sup>
7	1	0	1	1.435 5 ± 0.026 9 <sup>a</sup>
8	-1	-1	0	1.117 3 ± 0.018 6 <sup>bc</sup>
9	0	-1	-1	1.121 3 ± 0.046 5 <sup>bc</sup>
10	1	-1	0	1.103 8 ± 0.045 6 <sup>bcd</sup>
11	0	0	0	1.068 3 ± 0.031 3 <sup>cd</sup>
12	0	1	-1	1.034 9 ± 0.036 8 <sup>cd</sup>
13	-1	0	-1	1.101 4 ± 0.054 8 <sup>bcd</sup>
14	1	1	0	1.086 7 ± 0.027 0 <sup>cd</sup>
15	-1	0	1	1.001 5 ± 0.031 5 <sup>d</sup>
16	0	-1	1	1.195 7 ± 0.015 2 <sup>b</sup>
17	0	0	0	1.092 8 ± 0.013 1 <sup>cd</sup>

表 5 回归模型方差分析

Table 5 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.180 0	9	0.020 0	4.800 0	0.025 3	显著
A	0.003 2	1	0.003 2	0.760 0	0.412 3	不显著
B	0.058 0	1	0.058 0	13.580 0	0.007 8	显著
C	0.040 0	1	0.040 0	9.420 0	0.018 1	显著
AB	0.013 0	1	0.013 0	2.980 0	0.128 0	不显著
AC	0.015 0	1	0.015 0	3.470 0	0.104 8	不显著
BC	0.000 1	1	0.000 1	0.001 0	0.974 4	不显著
A <sup>2</sup>	0.001 1	1	0.001 1	0.260 0	0.625 9	不显著
B <sup>2</sup>	0.050 0	1	0.050 0	11.830 0	0.010 9	显著
C <sup>2</sup>	0.050 0	1	0.050 0	11.850 0	0.010 8	显著
误差	0.030 0	7	0.004 3			
失拟项	0.021 0	3	0.007 2	3.440 0	0.131 8	不显著
纯误差	0.008 3	4	0.002 1			
总离差	0.210 0	16				

Design Expert 8.0.5 软件所预测的最佳试验条件为甘露醇 2.50 g/L、酵母膏 8.00 g/L、大豆蛋白脲 5.00 g/L、NaCl 1.50%、pH 值 6.00、培养温度 60 °C。为验证其准确性, 开展验证试验, 得到发酵液半乳糖地质杆菌 BWTGW1-1 菌体细胞密度为 1.423 7, 稀释涂布法检测活菌数为 2.50×10<sup>8</sup> CFU/mL, 基本符合模型预测值。

## 2.4 5 000 L 发酵罐中试发酵

表 6 两批次中试发酵情况

Table 6 Two batches of pilot fermentation situation

项目	5 000 L 发酵 第一批	5 000 L 发酵 第二批
发酵周期/h	24	24
菌液有效活菌数 (×10 <sup>8</sup> CFU/mL)	7.20	7.25
喷雾干燥原粉有效活 菌数(×10 <sup>8</sup> CFU/g)	108	112

目前, 尚未有地质杆菌属类群相关的中试发酵试验研究。本研究两批次 5 000 L 中试发酵试验周期均为 24 h, 发酵完成放罐后, 共获得 5.50 t 液体发酵菌液, 并将其中 1 t 菌液通过碟式离心机离心及喷雾干燥塔喷雾干燥共获得 45 kg 菌剂原粉。将发酵液、喷雾干燥原粉分别进行稀释平板计数, 结果见表 6。中试试验液体活菌数最高达到 7.25×10<sup>8</sup> CFU/mL, 喷雾干燥原粉有效活菌数最高达到 1.12×10<sup>10</sup> CFU/g。

两批次中试试验结果相差不大,证明中试放大方案是可行的。

### 3 结论

本研究以菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值为响应值,通过单因素试验和响应面试验得到耐高温半乳糖地质杆菌 *G. galactosidasius* BWTGW1-1 最优发酵培养基配方为甘露醇 2.5 g/L、酵母膏 8.00 g/L、大豆蛋白胨 5.00 g/L、NaCl 1.50 wt.%、pH 值 6.00、培养温度 60 °C。

*G. galactosidasius* BWTGW1-1 优化后的菌体细胞密度 OD<sub>600</sub> 值为 1.423 7,活菌数为 2.50×10<sup>8</sup> CFU/mL。

菌株 BWTGW1-1 的最优中试生产发酵条件为,甘露醇 2.50 g/L、酵母膏 8.00 g/L、大豆蛋白胨 5.00 g/L、NaCl 1.50 wt.%、pH 值 6.00、温度 60 °C,发酵 0~12 h 转速 150 r/min,12~24 h 转速 250 r/min,通气量 20 m<sup>3</sup>/h,发酵时长 24 h。

### 参考文献

- [1] GOMES J, STEINER W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes [J]. Food Technol Biotechnol, 2004, 42 (4): 223-235.
- [2] NABI I, DAS S, THAKUR N. Reclassification of *Geobacillus galactosidasius* and *Geobacillus yumthangensis* as *Parageobacillus galactosidasius* comb. nov. and *Parageobacillus yumthangensis* comb. nov. respectively [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(12): 6518-6523.
- [3] HUSSEIN A H, LISOWSKA B K, LEAK D J. Chapter One-the Genus *Geobacillus* and Their Biotechnological Potential, in: S. Sariaslani, G. M. Gadd (Eds.) [M]. Advances in Applied Microbiology, Academic Press, 2015: 1-48.
- [4] DAAS M J A, VRIESENDORP B, WEIJER A H P, et al. Complete genome sequence of *Geobacillus thermodenitrificans* T12, a potential host for biotechnological applications [J]. Curr. Microbiol, 2018, 75 (1): 49-56.
- [5] KUISIENE N, RAUGALAS J, CHITAVICHIUS D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54 (6): 1991-1995.
- [6] 贾宪波.福州温泉嗜热菌多样性及嗜热菌*Geobacillus thermoglucosidasius*低温适应的机制[D].福州:福建农林大学,2016.
- [7] POLI A, LAEZZA G, GUL-GUVEN R, et al. *Geobacillus galactosidasius* sp. nov. a new thermophilic galactosidase-producing bacterium isolated from compost [J]. Systematic & Applied Microbiology, 2011, 34(6): 419-423.
- [8] BRUMM P J, LAND M L, MEAD D A. Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. WCH70, a thermophilic strain isolated from wood compost [J]. Standards in Genomic Sciences, 2016, 11(1): 1-8.
- [9] ROGER M, ANDREA F, SPYROS G P, et al. Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport? [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(5): 841-852.
- [10] 王华平,蒋勇,李帅军,等.畜禽粪便好氧堆肥技术研究进展[J].中国动物保健,2023,25(1):98-99.
- [11] PUTRANTO A, CHEN X D. A new model to predict diffusive self-heating during composting incorporating the reaction engineering approach (REA) framework [J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 211-221.
- [12] NIKAEEN M, NAFEZ A H, BINA B, et al. Respiration and enzymatic activities as indicators of stabilization of sewage sludge composting [J]. Waste Management, 2015, 39: 104-110.
- [13] 李再兴,马骏,武肖莎,等.接种高温嗜热菌剂加快牛粪秸秆堆肥发酵进程[J].植物营养与肥科学报,2022,28(5): 953-960.
- [14] ZHOU C, LIU Z, HUANG Z L, et al. A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting [J]. Waste Management, 2015, 40: 38-43.
- [15] 徐智,张陇利,张发宝,等.接种内外源微生物菌剂对堆肥效果的影响[J].中国环境科学,2009,29(8):856-860.
- [16] 陈猛,谢小林,周莲,等.一种半乳糖地质杆菌BWTGW1.1及其应用:中国,202110913914.7[P].2021-08-10.
- [17] 龚军辉,王晶.稀释涂布平板法计数活菌的方法简介[J].生物学教学,2018,43(2):70-71.
- [18] 廖先清,刘芳,周荣华,等.胶冻芽孢杆菌发酵中试研究[J].湖北农业科学,2017,56(23):4513-4515.
- [19] 敖静,桓明辉,李杨,等.1株耐高温产蛋白酶细菌的筛选鉴定及其液体发酵条件的优化[J].河南农业科学,2016, 45(11):116-121,125.
- [20] 王朝恩,刘婉慧,陆蓝翔,等.短小芽孢杆菌HR10产孢培养基及发酵条件优化[J].微生物学杂志,2021,41(2):37-45.
- [21] 杨冬静,赵永强,孙厚俊,等.解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus*



- amyloliquefaciens*)XZ-1发酵条件的优化[J].江西农业学报,2017,29(10):35-39.
- [22] 林丹乐,谢永婷,王雪梅.低聚木糖对变异链球菌生长和产酸影响的体外研究[J].中国实用口腔科杂志,2019,12(8):480-485.
- [23] 潘子怡,毛丙永,唐鑫,等.耐高渗青春双歧杆菌的筛选及发酵工艺优化[J].食品与发酵工业,2024,50(3):30-37.
- [24] 王宁宁,吴振,江建梅,等.酵母类有机氮源及其在发酵行业的应用[J].产业与科技论坛,2014,13(2):69-71.
- [25] 胡红伟,段明房,闫凌鹏,等.一株枯草芽孢杆菌的鉴定及液体发酵工艺优化[J].中国饲料,2017,5:13-19.
- [26] 敖静,李杨,高晓梅,等.解淀粉芽孢杆菌DF-7液体培养基优化及其无菌发酵液稳定性研究[J].山东农业科学,2021,53(12):149-154.
- [27] 乔香君,吴影,赵丽娜,等.解淀粉芽孢杆菌BA118高密度发酵工艺研究[J].农产品加工,2022,11:51-57.
- [28] 李敏,黄满,邱炜玥,等.响应面法优化卡氏芽孢杆菌ST-1产芽孢发酵培养基[J].中国酿造,2023,42(2):193-198.
- [29] 石慧敏,叶建仁,王焱,等.响应面优化贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)菌株YH-18产芽孢培养基和培养条件[J].南京林业大学学报(自然科学版),2023,47(1):209-218.

现代食品科技