



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102168055 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110051406. 9

(22) 申请日 2011. 03. 03

(73) 专利权人 大连吉翔农业科技有限公司

地址 116620 辽宁省大连市开发区松岚街
15 号

(72) 发明人 崔京春 张宝君 张献 吴俊罡
郭海勇

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任
公司 21212

代理人 毕进

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12R 1/125(2006. 01)

(56) 对比文件

王树香等. 大丽轮枝菌拮抗细菌枯草芽孢
杆菌 8-28 菌株产芽孢条件优化. 《湖北农业科
学》. 2009, 第 48 卷 (第 6 期), 1386-1388.

岳淑宁等. 一株饲用益生枯草芽孢杆菌液体
发酵的研究. 《China Brewing》. 2008, 第 22 卷
32-33.

李术娜等. 大丽轮枝菌拮抗细菌 B.
subtilis LZ2-70 产芽孢条件优化. 《棉花学
报》. 2009, 第 21 卷 (第 4 期), 307-312.

审查员 刘苗

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高芽孢率的枯草芽孢杆
菌发酵方法,属于微生物发酵工程领域。该方法
是经激活枯草芽孢杆菌、二步发酵培养生产目
标产品。先接种激活的枯草芽孢杆菌,培养温度
为 35 ~ 38 °C、罐压 0.02 ~ 0.06Mpa、通气比例
为 1 : 0.5 ~ 1 : 1、搅拌转数为 150rpm ~ 200rpm,
发酵培养 8 ~ 14 小时,得到种子菌液,再将种子
菌液接种培养 20 ~ 26 小时,得到高芽孢率枯草
芽孢杆菌液体产品。本发明方法的培养基成分易
得且价格便宜、工艺参数简单、发酵周期短,所
得的枯草芽孢杆菌活菌数高,并且芽孢率高,达
到 3.0×10^9 CFU/ml 以上,显著提高产品的芽孢数
和产品质量。

1. 一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法,包括以下步骤:

①将枯草芽孢杆菌无菌划线接种于灭菌的固体培养基上,于 35 ~ 38°C 静止培养 5 ~ 7 天,得到激活的枯草芽孢杆菌;

所述固体培养基按质量百分比,由如下组分组成:牛肉膏 0.20 ~ 0.50%、氯化钠 0.30 ~ 0.80%、蛋白胨 0.80 ~ 1.20%、琼脂 1.50 ~ 2.00%,余量为水,pH 7.0 ~ 7.5;

②将激活的枯草芽孢杆菌接种于 30L 种子发酵罐的灭菌培养基中,培养基装量为 20L,发酵条件为:温度 35 ~ 38°C、罐压 0.02 ~ 0.06Mpa、通气比例为 1:0.5 ~ 1:1、搅拌转数为 150rpm ~ 200rpm,发酵培养 8 ~ 14 小时,得到种子菌液;

所述种子发酵罐中的培养基按质量百分比,由如下组分组成:蔗糖 0.20 ~ 0.70%、尿素 0.10 ~ 0.40%、磷酸氢二钾 0.40 ~ 0.80%、磷酸二氢钾 0.20 ~ 0.40%、酵母膏 0.02 ~ 0.06%、氯化铁 0.01 ~ 0.04%、碳酸钙 0.01 ~ 0.04%、硫酸镁 0.05 ~ 0.20%、硫酸锰 0.01 ~ 0.04%、淀粉 0.30 ~ 0.80%、豆粕 1.00 ~ 1.50%、黄豆 0.80 ~ 1.20%、泡敌 0.01 ~ 0.02%,余量为水,pH 6.0 ~ 7.0;

③将种子菌液接种于 2000L 发酵罐的灭菌培养基中,培养基装量为 1400L,发酵培养 20 ~ 26 小时,其它发酵条件与步骤②相同,收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品;

步骤③所述培养基的组分与步骤②培养基的组分相同。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法,其特征在于所述培养基在使用前都需要灭菌处理,灭菌条件为:121°C、0.11Mpa 灭菌 20 ~ 30min。

一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种枯草芽孢杆菌的发酵方法,具体是涉及一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法,属于微生物发酵工程领域。

背景技术

[0002] 枯草芽孢杆菌是应用最广泛的产酶微生物之一,其广泛分布在土壤及腐败的有机物中,易在枯草浸汁中繁殖,故名。枯草芽孢杆菌菌体生长过程中产生的枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质,这些活性物质对致病菌或内源性感染的条件致病菌有明显的抑制作用。枯草芽孢杆菌能迅速消耗环境中的游离氧,造成肠道低氧,促进有益厌氧菌生长,并产生乳酸等有机酸类,降低肠道 PH 值,间接抑制其它致病菌生长。刺激动物免疫器官的生长发育,激活 T、B 淋巴细胞,提高免疫球蛋白和抗体水平,增强细胞免疫和体液免疫功能,提高群体免疫力。枯草芽孢杆菌菌体自身合成 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类,在消化道中与动物体内的消化酶类一同发挥作用。能合成维生素 B1、B2、B6、烟酸等多种 B 族维生素,提高动物体内干扰素和巨噬细胞的活性。所以,枯草芽孢杆菌广泛用于动物的保健与疾病预防和治疗领域。

[0003] 目前国内众多枯草芽孢杆菌生产企业生产过程中普遍存在菌数偏低特别是芽孢率偏低的问题,一般芽孢含量在 2.0×10^9 CFU/ml 以下,大大影响了产品的成本以及质量。为此,采取措施提高枯草芽孢杆菌的芽孢率是十分必要的。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有微生物发酵技术的不足造成枯草芽孢杆菌发酵芽孢率不高的问题,提供了一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法,以提高产品的芽孢含量和质量稳定。

[0005] 本发明所述原料枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 来源为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (AS1.15)。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案予以实现:一种高芽孢率的枯草芽孢杆菌发酵方法,包括以下步骤:

[0007] ①将枯草芽孢杆菌无菌划线接种于无菌固体培养基上,35 ~ 38℃ 静止培养 5 ~ 7 天,得到激活的枯草芽孢杆菌;

[0008] 所述固体培养基按质量百分比,是由如下组分组成:牛肉膏 0.20 ~ 0.50%、氯化钠 0.30 ~ 0.80%、蛋白胨 0.80 ~ 1.20%、琼脂 1.50 ~ 2.00%,余量为水,pH 7.0 ~ 7.5;

[0009] ②将激活的枯草芽孢杆菌接种于 30L 的种子发酵罐的无菌培养基中,培养基装量为 20L,发酵条件为:温度 35 ~ 38℃,罐压 0.02 ~ 0.06Mpa,通气比例:起始通气比为 1 : 0.5,当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1 : 1,当溶氧值回升高于 70 时降低通气比;搅拌转数:起始为 150rpm,根据溶氧值调整(溶氧值升高,降低搅拌转数;溶氧值降低,升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm,发酵培养 8 ~ 14 小时,得到种子菌液;

[0010] 所述种子发酵罐中培养基按质量百分比,是由如下组分组成:蔗糖 0.20 ~ 0.70%、尿素 0.10 ~ 0.40%、磷酸氢二钾 0.40 ~ 0.80%、磷酸二氢钾 0.20 ~ 0.40%、酵母膏 0.02 ~ 0.06%、氯化铁 0.01 ~ 0.04%、碳酸钙 0.01 ~ 0.04%、硫酸镁 0.05 ~ 0.20%、硫酸锰 0.01 ~ 0.04%、淀粉 0.30 ~ 0.80%、豆粕 1.00 ~ 1.50%、黄豆 0.80 ~ 1.20% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01 ~ 0.02%,余量为水, pH 6.0 ~ 7.0;

[0011] ③将种子菌液接种于 2000L 发酵罐的灭菌培养基中,培养基装量为 1400L,发酵条件与步骤②相同,发酵培养 20 ~ 26 小时,收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品;

[0012] 步骤③所述培养基的组分与步骤②培养基的组分相同;

[0013] 培养基的灭菌条件为:121℃、0.11Mpa 灭菌 20 ~ 30min。

[0014] 结晶紫染色后油镜观察,芽孢率 90%以上。

[0015] 本发明方法的优点在于:培养基成分易得且价格便宜、工艺参数简单、发酵周期短,所得的枯草芽孢杆菌活菌数高,并且芽孢率高,可以达到 3.0×10^9 CFU/ml 以上,显著提高产品的芽孢数和产品质量。

具体实施方式

[0016] 为了更好地理解本发明,以下用实施例对本发明作进一步说明。

[0017] 实施例 1

[0018] ①将 -70℃保存于甘油中的枯草芽孢杆菌无菌划线接种于灭菌固体培养基上(培养基按质量百分比,由如下组分组成:牛肉膏 0.30%、氯化钠 0.50%、蛋白胨 1.00%、琼脂 2.00%,余量为水, pH 7.2, 121℃、0.11Mpa 灭菌 20min), 37℃静止培养 6 天。

[0019] ②将固体培养基上的菌落用无菌生理盐水洗下后接种于 30L 种子发酵罐的无菌培养基中(培养基按质量百分比,由如下组分组成:蔗糖 0.50%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵母膏 0.04%、氯化铁 0.02%、碳酸钙 0.02%、硫酸镁 0.10%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.60%、豆粕 1.25%、黄豆 1.00% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%,余量为水, pH 6.5, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min), 培养基装量 20L。发酵参数如下:温度 37℃,罐压 0.05Mpa。通气比例:起始通气比为 1 : 0.5,当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1 : 1,当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数:起始为 150rpm,根据溶氧值调整(溶氧值升高,降低搅拌转数;溶氧值降低,升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm。培养周期:10 小时。

[0020] ③将②种子发酵罐菌液接种于 2000L 发酵罐的无菌培养基中(培养基按质量百分比,由如下组分组成:蔗糖 0.50%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵母膏 0.04%、氯化铁 0.02%、碳酸钙 0.02%、硫酸镁 0.10%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.60%、豆粕 1.25%、黄豆 1.00% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%,余量为水 pH 6.5, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min), 培养基装量 1400L。发酵参数如下:温度 37℃,罐压 0.05Mpa。通气比例:起始通气比为 1 : 0.5,当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1 : 1,当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数:起始为 150rpm,根据溶氧值调整(溶氧值升高,降低搅拌转数;溶氧值降低,升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm。培养周期:24 小时。结束发酵后收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品,混皿法活菌检测得到活菌数 3.5×10^9 CFU/

ml, 结晶紫染色后油镜观察, 芽孢率 95%。

[0021] 实施例 2

[0022] ①将 -70℃保存于甘油中的枯草芽孢杆菌无菌划线接种于无菌固体培养基上(培养基按质量百分比, 由如下组分组成: 牛肉膏 0.40%、氯化钠 0.50%、蛋白胨 0.90%、琼脂 2.00%, 余量为水, pH 7.2, 121℃、0.11Mpa 灭菌 20min), 37℃静止培养 5 天。

[0023] ②将固体培养基上的菌落用无菌生理盐水洗下后接种于 30L 种子发酵罐的培养基中(培养基按质量百分比, 是由如下组分组成: 蔗糖 0.30%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵母膏 0.05%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.350%、豆粕 1.00%、黄豆 1.20% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%, 余量为水, pH 6.5, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min), 培养基装量 20L; 发酵参数如下: 温度 37℃, 罐压 0.5Mpa, 通气比例: 起始通气比为 1:0.5, 当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1:1, 当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数: 起始为 150rpm, 根据溶氧值调整(溶氧值升高, 降低搅拌转数; 溶氧值降低, 升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm。培养周期: 9 小时。

[0024] ③将②种子发酵罐菌液接种于 2000L 发酵罐的无菌培养基中(培养基按质量百分比, 由如下组分组成: 蔗糖 0.30%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵母膏 0.05%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.350%、豆粕 1.00%、黄豆 1.20% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%, 余量为水, pH 6.5, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min), 培养基装量 20L; 发酵参数如下: 温度 37℃, 罐压 0.5Mpa, 通气比例: 起始通气比为 1:0.5, 当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1:1, 当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数: 起始为 150rpm, 根据溶氧值调整(溶氧值升高, 降低搅拌转数; 溶氧值降低, 升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm。培养周期: 23 小时。结束发酵后收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品, 混血法活菌检测得到活菌数 3.8×10^9 CFU/ml, 结晶紫染色后油镜观察, 芽孢率 96%。

[0025] 实施例 3

[0026] ①将 -70℃保存于甘油中的枯草芽孢杆菌无菌划线接种于无菌固体培养基上(培养基按质量百分比, 由如下组分组成: 牛肉膏 0.30%、氯化钠 0.50%、蛋白胨 0.80%、琼脂 2.00%, 余量为水, pH 7.2, 121℃、0.11Mpa 灭菌 20min), 37℃静止培养 5 天;

[0027] ②将固体培养基上的菌落用无菌生理盐水洗下后接种于 30L 种子发酵罐的培养基中(培养基按质量百分比, 是由如下组分组成: 蔗糖 0.40%、尿素 0.30%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵母膏 0.06%、氯化铁 0.02%、碳酸钙 0.02%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.40%、豆粕 1.20%、黄豆 1.00% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%, 余量为水, pH 6.8, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min), 培养基装量 20L; 发酵参数如下: 温度 37℃, 罐压 0.5Mpa, 通气比例: 起始通气比为 1:0.5, 当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1:1, 当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数: 起始为 150rpm, 根据溶氧值调整(溶氧值升高, 降低搅拌转数; 溶氧值降低, 升高搅拌转数)最大搅拌不超过 200rpm。培养周期: 10 小时。

[0028] ③将②种子发酵罐菌液接种于 2000L 发酵罐的无菌培养基中(培养基按质量百分比, 由如下组分组成: 蔗糖 0.40%、尿素 0.30%、磷酸氢二钾 0.60%、磷酸二氢钾 0.30%、酵

母膏 0.06%、氯化铁 0.02%、碳酸钙 0.02%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.40%、豆粕 1.20%、黄豆 1.00%（泡发后粉碎）、泡敌 0.01%，余量为水，pH 6.8, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min），培养基装量 20L；发酵参数如下：温度 37℃，罐压 0.5Mpa，通气比例：起始通气比为 1：0.5，当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1：1，当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数：起始为 150rpm，根据溶氧值调整（溶氧值升高，降低搅拌转数；溶氧值降低，升高搅拌转数）最大搅拌不超过 200rpm。培养周期：24 小时。结束发酵后收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品，混血法活菌检测得到活菌数 3.7×10^9 CFU/ml，结晶紫染色后油镜观察，芽孢率 95%。

[0029] 实施例 4

[0030] ①将 -70℃保存于甘油中的枯草芽孢杆菌无菌划线接种于无菌固体培养基上（培养基按质量百分比，由如下组分组成：牛肉膏 0.20%、氯化钠 0.40%、蛋白胨 1.00%、琼脂 1.50%，余量为水，pH 7.2, 121℃、0.11Mpa 灭菌 20min），37℃静止培养 6 天；

[0031] ②将固体培养基上的菌落用无菌生理盐水洗下后接种于 30L 种子发酵罐的培养基中（培养基按质量百分比，是由如下组分组成：蔗糖 0.30%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.80%、磷酸二氢钾 0.40%、酵母膏 0.05%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.50%、豆粕 1.00%、黄豆 1.10%（泡发后粉碎）、泡敌 0.01%，余量为水，pH 6.6, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min），培养基装量 20L；发酵参数如下：温度 35℃，罐压 0.4Mpa，通气比例：起始通气比为 1：0.5，当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1：1，当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数：起始为 150rpm，根据溶氧值调整（溶氧值升高，降低搅拌转数；溶氧值降低，升高搅拌转数）最大搅拌不超过 200rpm。培养周期：8 小时。

[0032] ③将②种子发酵罐菌液接种于 2000L 发酵罐的无菌培养基中（培养基按质量百分比，由如下组分组成：蔗糖 0.30%、尿素 0.20%、磷酸氢二钾 0.80%、磷酸二氢钾 0.40%、酵母膏 0.05%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.50%、豆粕 1.00%、黄豆 1.10%（泡发后粉碎）、泡敌 0.01%，余量为水，pH 6.6, 121℃、0.11Mpa 灭菌 25min），培养基装量 20L；发酵参数如下：温度 35℃，罐压 0.4Mpa，通气比例：起始通气比为 1：0.5，当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1：1，当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数：起始为 150rpm，根据溶氧值调整（溶氧值升高，降低搅拌转数；溶氧值降低，升高搅拌转数）最大搅拌不超过 200rpm。培养周期：26 小时。结束发酵后收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品，混血法活菌检测得到活菌数 4.2×10^9 CFU/ml，结晶紫染色后油镜观察，芽孢率 98%。

[0033] 实施例 5

[0034] ①将 -70℃保存于甘油中的枯草芽孢杆菌无菌划线接种于无菌固体培养基上（培养基按质量百分比，由如下组分组成：牛肉膏 0.30%、氯化钠 0.50%、蛋白胨 1.00%、琼脂 2.00%，余量为水，pH 7.2, 121℃、0.11Mpa 灭菌 20min），37℃静止培养 7 天；

[0035] ②将固体培养基上的菌落用无菌生理盐水洗下后接种于 30L 种子发酵罐的培养基中（培养基按质量百分比，是由如下组分组成：蔗糖 0.60%、尿素 0.40%、磷酸氢二钾 0.80%、磷酸二氢钾 0.40%、酵母膏 0.06%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.60%、豆粕 1.00%、黄豆 1.20%（泡发后粉碎）、泡敌 0.01%，余量

为水, pH 7.0, 121℃、0.11Mpa 灭菌 30min), 培养基装量 20L; 发酵参数如下: 温度 37℃, 罐压 0.5Mpa, 通气比例: 起始通气比为 1 : 0.5, 当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1 : 1, 当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数: 起始为 150rpm, 根据溶氧值调整 (溶氧值升高, 降低搅拌转数; 溶氧值降低, 升高搅拌转数) 最大搅拌不超过 200rpm。培养周期: 8 小时。

[0036] ③将②种子发酵罐菌液接种于 2000L 发酵罐的无菌培养基中 (培养基按质量百分比, 由如下组分组成: 蔗糖 0.60%、尿素 0.40%、磷酸氢二钾 0.80%、磷酸二氢钾 0.40%、酵母膏 0.06%、氯化铁 0.03%、碳酸钙 0.03%、硫酸镁 0.08%、硫酸锰 0.01%、淀粉 0.60%、豆粕 1.00%、黄豆 1.20% (泡发后粉碎)、泡敌 0.01%, 余量为水, pH 7.0, 121℃、0.11Mpa 灭菌 30min), 培养基装量 20L; 发酵参数如下: 温度 37℃, 罐压 0.5Mpa, 通气比例: 起始通气比为 1 : 0.5, 当溶氧值低于 20 时加大通气比为 1 : 1, 当溶氧值回升高于 70 时降低通气比。搅拌转数: 起始为 150rpm, 根据溶氧值调整 (溶氧值升高, 降低搅拌转数; 溶氧值降低, 升高搅拌转数) 最大搅拌不超过 200rpm。培养周期: 26 小时。结束发酵后收集发酵培养液得到高芽孢率枯草芽孢杆菌液体产品, 混血法活菌检测得到活菌数 4.0×10^9 CFU/ml, 结晶紫染色后油镜观察, 芽孢率 98%。