

保水功能菌枯草芽胞杆菌 LX-1 固态发酵的工艺优化

王海燕¹, 罗立津², 郑军荣², 乐占线², 林汪洋¹, 陈志彪^{1,3*}

(1. 福建师范大学 地理科学学院, 福建 福州 350007; 2. 福建省微生物研究所, 福建 福州 350007;

3. 福建师范大学 湿润亚热带生态地理过程教育部重点实验室, 福建 福州 350007)

摘要 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)对土壤保水和提高植物抗逆性具有明显作用,为了利用农产品加工下脚料发酵生产含有 γ -PGA的保水功能肥料,对福建省微生物研究所环境微生物研究室分离到的产 γ -PGA的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)LX-1的固态发酵培养基配比进行优化。实验以发酵产物的荧光素双醋酸酯酶(FDA)酶活和增比黏度为指标,在通过单因素实验选定固态发酵料的碳源、氮源、无机盐溶液的最佳配比以及无机盐最佳添加量的基础上,通过拟水平均匀设计 $U_7^*(7^4)$ 试验,得出菌株LX-1固态发酵的最佳培养基配方:V豆粕:V麦麸:V无机盐溶液=6:4:4,其中无机盐溶液的最佳配方为 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.24 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.78 g/L、NaCl 11.67 g/L。为利用农产品加工下脚料发酵生产含 γ -PGA保水肥料提供参考。

关键词 土壤保水; γ -聚谷氨酸; 枯草芽胞杆菌; 固态发酵; 均匀设计

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2022)04-0055-09

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2022.04.007

Optimization of Solid State Fermentation Technology of Soil Water Retention Function Bacteria *Bacillus subtilis* LX-1

WANG Hai-yan¹, LUO Li-jin², ZHENG Jun-rong², LE Zhan-xian², LIN Wang-yang¹, CHEN Zhi-biao^{1,3*}

(1. *Schl. of Geog. Sci., Fujian Normal Uni., Fuzhou 350007*; 2. *Fujian Inst. of Microbiol., Fuzhou 350007*;

3. *Key Lab. of Humid Subtrop. Ecogeog. Proc., Minist. of Educ., Fujian Normal Uni., Fuzhou 350007*)

Abstract γ -polyglutamate (γ -PGA) has obvious effects on soil water retention and improving plant stress resistance. In order to use agricultural waste fermentation to produce water-retention functional fertilizers containing γ -PGA, the component proportion of solid-state fermentation medium for *Bacillus subtilis* LX-1 strain which produced γ -PGA isolated by the research group was optimized in this study. The experiment, take fluorescence double acetate (FDA) enzyme activity and specific viscosity of fermentation products as indexes, and based on adopting single factor experiment, to pitch on optimal the proportion of carbon source, nitrogen source, inorganic salt solution and the optimal adding amount of inorganic salt in solid fermentation materials by quasi horizontal uniformity design $U_7^*(7^4)$ experiment, the optimal medium formula for the strain LX-1 solid-state fermentation was: soybean meal : wheat bran : inorganic salt solution = 6 : 4 : 4 ($V : V : V$), and the optimal formula of inorganic salt solution was $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.24 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.78 g/L, and NaCl 11.67 g/L. This study provides technical bases for the production of water-retaining fertilizer containing γ -PGA utilizing agricultural waste fermentation.

Keywords soil water retention; γ -PGA; *Bacillus subtilis*; solid fermentation; uniformity design

我国南方红壤分布广泛,区内的水土流失面积仍有16万 km^2 左右,不合理的土地生产及开发利用将导致一系列生态退化问题^[1-3]。如何从改善土壤结构、增强土壤肥力和蓄水能力的角度出

基金项目:福建省高校产学研合作项目(2020N5007)

作者简介:王海燕 女,硕士研究生。主要从事生态恢复、水土保持等方面的研究。E-mail:hyanw0604@163.com

* 通讯作者。男,教授,博士,博士生导师。主要从事水土保持、资源与环境等方面研究。E-mail:chenzhibiao@vip.163.com

收稿日期:2021-09-01

发以恢复土壤的整体生态功能是水土流失治理应着重研究的方向。人工施肥是改善土壤结构与功能的重要措施,但传统复合肥肥效较低、有效期短。土壤保水剂作为新兴的聚合物材料,凭借特殊的物理结构和化学组成在土壤侵蚀控制中的作用的研究愈加深,在保水保肥、农田抗旱保水、农作物增产等方面应用前景广阔^[4-6]。目前,国际上常用的保水剂为淀粉接枝丙烯酸盐共聚交联物和丙烯酸胺-丙稀酸盐共聚交联物两大类。但这些保水剂存在降解速度慢、失效快和污染土壤等问题^[7-9]。近年来,生物保水剂的开发已成为研究热点,并证明其在改良土壤结构^[10]、提高土壤蓄水能力^[11-12]方面具有明显的作用。 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)超吸水性树脂具有良好保水特性的关键因素,是新型的环保高分子材料,曾健等^[13]研究发现超吸收性 γ -PGA树脂具有高保水特性,对土壤中聚集体结构的形成具有显著地促进作用。但当前超吸收性 γ -PGA树脂的制备成本高且可能发生各种副反应^[14-16]限制其在工农业生产中的应用。张新民等的研究发现相对分子量小的 γ -PGA可被应用于农业浸种、增肥等方面^[17-19]。Yang等^[20]利用 γ -PGA作为土壤清洗剂有效去除了土壤中部分重金属,在不破坏土壤结构情况下改良土壤重金属分布。王传海等^[21]研究发现 γ -PGA的最大自然吸水倍数可以达到千倍以上,对于土壤的吸水倍数也可以达到几十倍。Yin等^[22-24]发现 γ -PGA在土壤保水、抗旱等方面也取得了较好效果,由此在农业保肥和育苗方面的应用愈发广泛^[24-27]。前期实验研究表明,在有机肥料中添加具备合成 γ -PGA能力的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)可产生丰富的 γ -PGA,从而利用其吸水特性赋予有机肥料的保水功效。基于以上研究结果,通过研究优化具有土壤保水特性的产 γ -PGA菌株枯草芽胞杆菌的固态发酵工艺,为利用农产品加工下脚料发酵生产含 γ -PGA等黏性物质的保水肥料提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) LX-1,为福建省微生物研究所环境微生物研究室选育鉴定保藏菌种。

1.1.2 培养基 ①牛肉膏蛋白胨培养基^[28];②LB培养基^[28];③固态发酵培养基:豆粕1 000 mL,无机盐溶液300 mL,该溶液中含 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g/L,pH 8.0。

1.1.3 主要仪器与设备 粉碎机(CLF-10C,中国浙江省温岭市创力药材器械厂);电子天平(CP114,奥豪斯仪器(上海)有限公司);恒温培养振荡器(ZWYR-G2402,上海智诚分析仪器制造有限公司);pH酸度计(S210-K,Sevencompact);旋转蒸发仪(PRM-201D,上海普渡生化科技有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9246A,上海精宏实验设备有限公司);电热恒温水浴锅(HH-4,金坛市杰瑞尔电器有限公司);移液枪(Research Plu,德国Eppendorf);超纯水机(WP-UP-Y2-100,沃特谱);冰柜(SC-316,Haier);多功能酶标仪(M5,美谷分子仪器(上海)有限公司);生化培养箱(MI-80A,施都凯仪器设备有限公司);高压蒸汽灭菌锅(TOMY-SX-700,施都凯仪器设备有限公司);超声波清洗机(KQ5200DE,昆山市超声仪器有限公司);乌氏粘度计(AGE)。

1.2 方 法

1.2.1 发酵料FDA测定 荧光素双醋酸酯(FDA)可被不同的酶消解产生荧光素,利用分光光度计和荧光光度计定量测定(其在最大吸收波长下的吸光值(abs)或荧光强度与具有代谢活性的菌体数目成正比^[29])是对多种环境样本中微生物酶活性进行迅速、灵敏、简便测定方法。取适量培养基发酵产物上清液置于96微孔板中,根据土壤微生物FDA酶活的测定方法^[30]处理,同时取系列标准溶液于96微孔板中,用酶标仪于490 nm波长测各个微孔中溶液的吸光度^[31-32]。以一系列荧光素浓度与其所测得的吸光度值绘制标准曲线。将样品的吸光度根据荧光素标准曲线换算为荧光素浓度,根据FDA酶活的计算公式计算各样品的FDA酶活。

1.2.2 发酵料黏度测定 在适宜温度及pH值条件下,发酵料黏性与 γ -PGA等黏性物质的产量表现出显著相关关系^[33-34]。参考中国药典采用乌氏黏度计测定法^[35],取培养的发 酵料提取液装入离心杯4 000 r/min离心10 min,去除杂质后于25℃条件下测定黏度两次,取其平均值作为测试溶液的流出时间,重复两次,无需重新加载样品。以

相同的方式操作同一组发酵液,重复测量两次,两个测量值应相同,取平均值作为溶剂流出时间并计算增比黏度值^[36-37]。同时称取定量的 γ -PGA 纯品配置成 10 g/L 溶液,稀释成不同倍数的 γ -PGA 溶液^[36]后,用乌氏黏度计在 25 °C 下测定各稀释液的流出时间 T 及超纯水流出时间 T₀,绘制 γ -PGA 水溶液增比黏度、流出时间与 γ -PGA 浓度的线性拟合关系图(图 1)。

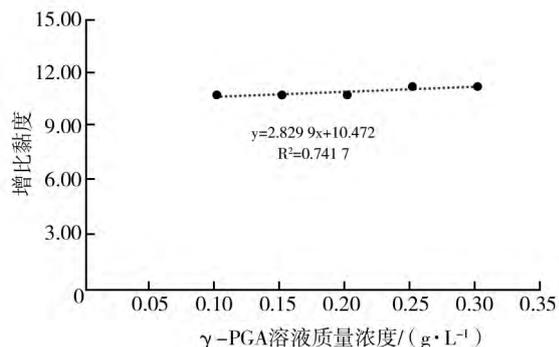


图 1 不同 γ -PGA 溶液的增比黏度与 γ -PGA 浓度的关系

Fig. 1 Relationship between the increasing viscosity of γ -PGA solution and γ -PGA concentration

1.2.3 单因素实验 按以下设置的豆粕、麦麸、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl 系列添加量调整培养基成分,进行单因素实验:①固体料配比:豆粕与麦麸混合比例(体积)分别为 0:10、2:8、4:6、6:4、8:2、10:0;②无机盐溶液添加量(体积分数):25%、30%、35%、40%、45%;③无机盐溶液中 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 质量浓度:0、2.0、4.0、6.0、8.0 g/L;④无机盐溶液中 NaCl 质量浓度:0、2.5、5.0、7.5、10.0 g/L。按设定的浓度配制无机盐溶液后,调节 pH 为 8.0,按设定添加量加入到豆粕与麦麸混合发酵料中,混匀,装入三角瓶中,灭菌后,按 5% (体积分数)接种量接种枯草芽胞杆菌 LX-1 种子液,37 °C 生化培养箱中培养 36 h 后,以发酵料的黏度和 FDA 酶活为指标,确定培养基的较佳配比。

1.2.4 均匀设计实验 在单因素实验基础上,进行均匀设计试验(表 1)。选取 X_2 (K_2HPO_4)、 X_3 (NaCl)、 X_4 ($MgSO_4$) (X_1 为空白列)为试验因素,以发酵黏液的 FDA 酶活为指标,采取拟水平均匀设计实验 $U_7 * (7^4)$ 进行试验(表 2)。依据均匀

设计设定的试验条件配制 7 组无机盐溶液,调整 pH 为 8.0,分别取 40 mL 无机盐溶液加入到 100 mL(约 50 g)豆粕和麦麸的混合物料中,每瓶加 0.5 g $CaCO_3$,混匀,灭菌,接种 5% (体积分数)枯草芽胞杆菌种子液,37 °C 培养 36 h 后,测定各组发酵料 FDA 酶活,检测结果使用 Design Expert 7.0 软件进行数据分析,确定培养基的较佳配比,并对所得最优条件进行确证实验。

表 1 试验因素水平

Table 1 Test factor level

因子水平	X_1 (空白列)	X_2 (K_2HPO_4)/ ($g \cdot L^{-1}$)	X_3 (NaCl)/ ($g \cdot L^{-1}$)	X_4 ($MgSO_4$)/ ($g \cdot L^{-1}$)
1	1.00	2.50	7.00	0.20
2	2.00	3.00	8.00	0.30
3	3.00	3.50	9.00	0.40
4	4.00	4.00	10.00	0.50
5	5.00	4.50	11.00	0.60
6	6.00	5.00	12.00	0.70
7	7.00	5.50	13.00	0.80
步长 Δ_j	1.00	0.50	1.00	0.10

表 2 拟水平均匀设计 $U_7 * (7^4)$ 试验条件

Table 2 Quasi-horizontal uniform design $U_7 * (7^4)$ test conditions

因子水平	X_1 (空白列)	X_2 (K_2HPO_4)/ ($g \cdot L^{-1}$)	X_3 (NaCl)/ ($g \cdot L^{-1}$)	X_4 ($MgSO_4$)/ ($g \cdot L^{-1}$)
1	1	3(3.50)	5(11.00)	7(0.80)
2	2	6(5.00)	2(8.00)	6(0.70)
3	3	1(2.50)	7(13.00)	5(0.60)
4	4	4(4.00)	4(10.00)	4(0.50)
5	5	7(5.50)	1(7.00)	3(0.40)
6	6	2(3.00)	6(12.00)	2(0.30)
7	7	5(4.50)	3(9.00)	1(0.20)

1.2.5 确证实验 通过对比单因素最佳组合、拟合方程预测最佳条件以及均匀设计试验最佳条件的三种不同配比的发酵料的 FDA 酶活和增比黏度进行比较(表 3)。

表 3 确证实验三种不同培养基配比设置

Table 3 Three different media ratio settings of confirmatory experiment

组分	I 单因素最佳组合	II 拟合方程预测最佳	III 均匀设计试验最佳
麦豆粕/mL	80	80	80
麦麸/mL	20	20	20
加水量/mL	40	40	40
$K_2HPO_4/(g \cdot L^{-1})$	4.00	5.24	5.00
NaCl/($g \cdot L^{-1}$)	10.00	11.67	8.00
$MgSO_4/(g \cdot L^{-1})$	1.00	0.78	0.70

1.2.6 数据分析 上述各项指标取其平均值 \pm 标准差为结果。差异性显著分析采用 SPSS 18.0 软件中 Duncan 法进行计算,不同小写字母表示组内显著性差异,显著水平 $P < 0.05$;不同大写字母表示组内极显著性差异,显著水平 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 固体培养基配比对发酵料黏度及 FDA 酶活的影响

根据图 2 和图 3 不同配比的豆粕与麦麸培养基,对比发酵培养测得的 FDA 酶活与黏度可知,当 V 豆粕 : V 麦麸为 10 : 0 时,增比黏度达到最大值,其原因可能是豆粕自身特性所致,可能由于其通气性不好,导致发酵黏液氨味较重,故不宜采用。在 V 豆粕 : V 麦麸为 (9 : 1) ~ (5 : 5) 区间时,此时的增比黏度不断增加,并在 5 : 5 时达到最大值,随后逐步降低;结合测得的 FDA 酶活,在 6 : 4 配比之后测得的酶活开始降低,综合两者得出,当豆粕麦麸的固体配比为豆粕 60%、麦麸 40% (体积分数) 时, U_{FDA} 酶活最佳,黏度较高。

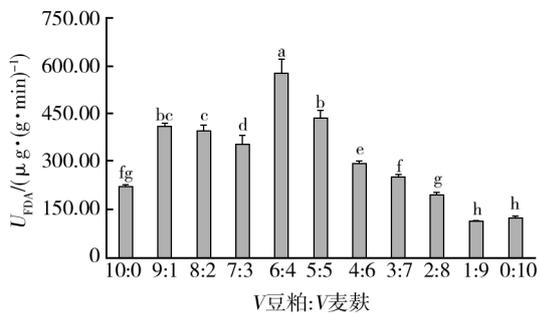


图 2 不同豆粕麦麸配比发酵料 FDA 活性的差异

Fig. 2 Differences in FDA activity of different soybean meal and wheat bran fermentation proportions

不同小写字母表示组内显著性差异,显著水平 $P < 0.05$, 图 3 ~ 10 同

Different lowercase letters indicate the significant difference within the group, the significant level $P < 0.05$, the same as figure 3-10

2.2 不同加水量对发酵料黏度及 FDA 酶活的影响

根据图 4、图 5 不同实验配液量培养基的 FDA 酶活和增比黏度分析显示,当加水量为 30% ~ 45%,经发酵培养测得的 FDA 酶活和黏度不断增加,且加水量 40% 时,达到最佳值,随后酶活降低,黏度下降。由此可知,固态发酵的最佳加水量

为 40%。

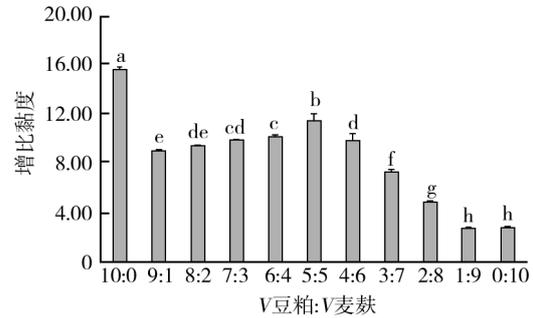


图 3 不同豆粕麦麸配比发酵料黏度的差异

Fig. 3 Differences in viscosity of fermented materials with different soybean meal and wheat bran

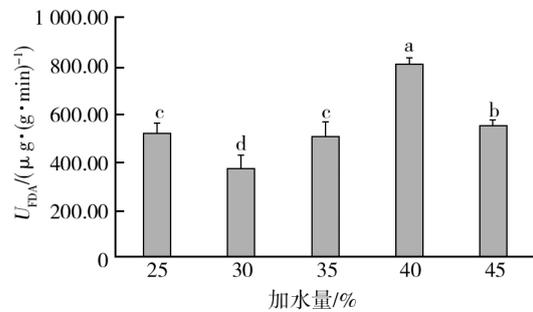


图 4 不同加水量发酵料 FDA 酶活的差异

Fig. 4 Differences in FDA activity of fermentation materials with different water addition

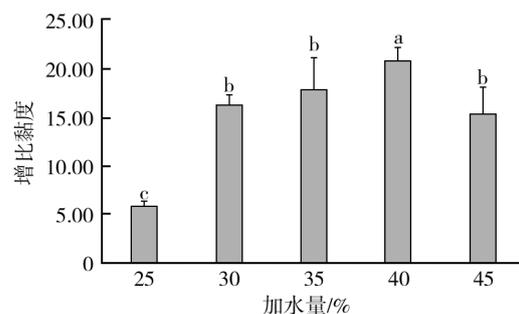


图 5 不同加水量发酵料黏度的差异

Fig. 5 Differences in viscosity of fermented materials with different water addition

2.3 不同 K_2HPO_4 浓度对发酵料黏度及 FDA 酶活的影响

根据不同 K_2HPO_4 浓度下的 FDA 的活性和增比黏度分析 (图 6、7), 对比在添加不同质量浓度 K_2HPO_4 的培养基经发酵培养测得数据可知,无机

盐溶液的 K_2HPO_4 最佳质量浓度为 4 g/L。

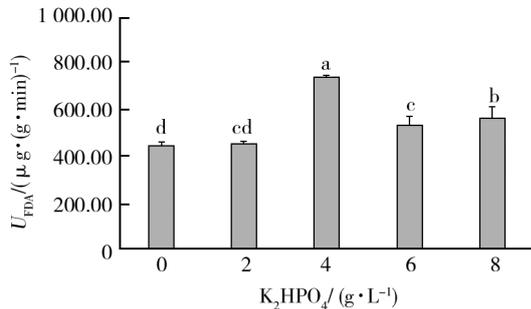


图 6 不同 K_2HPO_4 质量浓度发酵料 FDA 酶活的差异

Fig. 6 Difference of FDA activity of fermented material with different K_2HPO_4 concentration

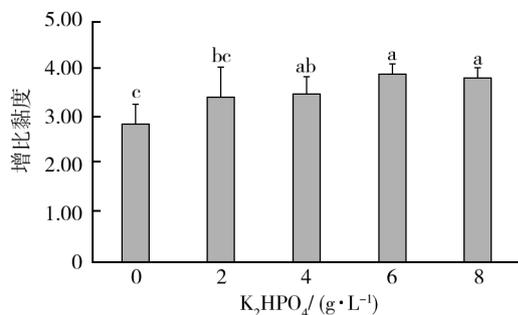


图 7 不同 K_2HPO_4 质量浓度发酵料黏度的差异

Fig. 7 Differences in viscosity of fermented materials with different K_2HPO_4 concentrations

2.4 不同 NaCl 质量浓度对发酵料黏度及 FDA 酶活的影响

NaCl 不同质量浓度下的 FDA 酶活和增比黏度分析显示(图 8、9),在培养基添加 5~10 g/L 的 NaCl 时, FDA 酶活和黏度值均表现出不断增加的特性,并且在 10 g/L 时表现出最大值,而后开始下降,由此可知,无机盐溶液的 NaCl 最佳质量浓度为 10 g/L。

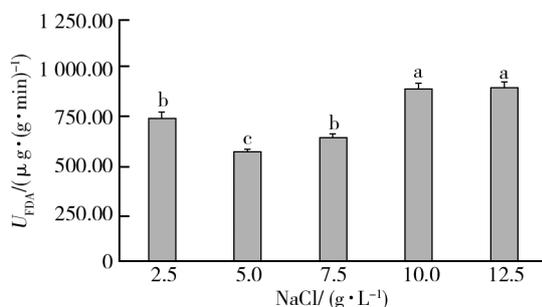


图 8 不同 NaCl 质量浓度发酵料 FDA 酶活的差异

Fig. 8 Differences in FDA activity of fermented materials with different NaCl concentrations

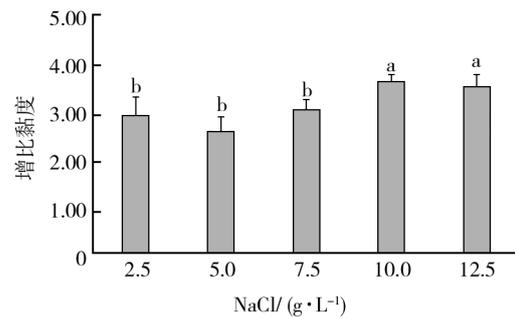


图 9 不同 NaCl 质量浓度发酵料黏度的差异

Fig. 9 Differences in viscosity of fermented materials with different NaCl concentrations

2.5 均匀设计试验结果

均匀设计是基于整个测试范围内测试点,从一致性角度提出的测试设计方法。在条件范围广泛且需要进行多级测试的情况下,均匀设计可以大大减少测试次数,选择一些具有代表性的测试点反映系统的突出特征^[38]。

本研究设计 3 因素,若每个因素取 5 个水平,采用正交设计实验,须采用 $L_{25}(5^6)$ 表,作 25 次试验,而采用均匀设计表 $U_5(5^4)$,只需要作 5 次试验,借助 Design Expert 7.0 软件可进行回归分析,再根据回归方程对发酵料 FDA 酶活进行预测,由此可确定最优参数。

为了获得效果更佳的产 γ -PGA 的固态发酵工艺参数,需要研究各影响因素及其水平组合对 γ -PGA 活性及黏度的影响。因此在单因素实验的基础上进行 $U_7(7^4)$ 均匀设计试验,其中第 1 列作为空白列, X_2 (K_2HPO_4)、 X_3 (NaCl)、 X_4 ($MgSO_4$) 分别列于 2、3、4 列。

从表 4 的均匀设计试验结果可以发现,试验 2 ($X_2 = 5$ g/L、 $X_3 = 8$ g/L 和 $X_4 = 0.7$ g/L) 发酵料的 FDA 酶活最高,达到 1 038 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

通过 Design Expert 7.0 软件分析,经多元二次线性方程逐步回归,得回归方程:

$$Y = 464.67 + 98.5X_2 + 272X_4 + 48.05X_2X_3 + 360.47X_2X_4 + 342.33X_4^2$$

经表 5 方差分析得知, $F = 36.48$ ($P < 0.0001$), 回归关系极显著,表明 X_2 (K_2HPO_4)、 X_3 (NaCl)、 X_4 ($MgSO_4$) 与 FDA 酶活呈极显著的回归关系。由回归方程可知, X_2 、 X_4 的系数为正,表明试验指标随因素 A、C 的增加而增加。通过上述回归方

程求 U_{FDA} 的最大值,得到当 X_2 (K_2HPO_4) 为 5.24 g/L 时, $Y_{\text{max}} = 1\,413.46$,这一结果明显优于表 4 中的 7 个试验结果。

表 4 均匀设计试验结果

Table 4 Uniform Design Test Result

实验号	X_2 (K_2HPO_4) / (g · L ⁻¹)	X_3 (NaCl) / (g · L ⁻¹)	X_4 (MgSO_4) / (g · L ⁻¹)	U_{FDA1} / ($\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$)	U_{FDA2} / ($\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$)	U_{FDA3} / ($\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$)	U_{FDA} / ($\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$)
1	3.50	11.00	0.80	808	935	912	885
2	5.00	8.00	0.70	954	1 075	1 086	1 038
3	2.50	13.00	0.60	261	414	412	363
4	4.00	10.00	0.50	386	534	474	465
5	5.50	7.00	0.40	203	359	358	307
6	3.00	12.00	0.30	381	528	510	473
7	4.50	9.00	0.20	384	532	518	478

表 5 回归模型方差分析表

Table 5 ANOVA Table of Regression Model

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	Probe > F
回归模型	1.36E+06	5	2.71E+05	36.48	< 0.000 1
A- X_2 (K_2HPO_4)	88 706.29	1	88 706.29	11.92	0.003 6
C- X_4 (MgSO_4)	6.76E+05	1	6.76E+05	90.92	< 0.000 1
AB	4 764.74	1	4 764.74	0.64	0.436 1
AC	2.82E+05	1	2.82E+05	37.85	< 0.000 1
C ²	2.42E+05	1	2.42E+05	32.51	< 0.000 1
残差	1.12E+05	15	7 440.18	-	-
失拟	22 898	1	22 898	3.61	0.078 1
纯差	88 704.67	14	6 336.05	-	-
总和	1.47E+06	20	-	-	-

注:“-”表示该项空白,无数据

2.6 确证实验结果

通过回归模型计算得出 U_{FDA} 的最佳条件,对比单因素最佳组合以及对均匀设计试验最佳条件进行比较。通过确证实验表明,配比 I (单因素最佳配比) 和配比 III (均匀设计试验最佳配比) 的 FDA 酶活分别为 883 和 950 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$,而根据拟合方程预测最佳条件(配比 II)测得的 FDA 酶活高于单因素最佳及均匀设计最佳条件,其 U_{FDA} 可达到 1 014 $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min})$,配比 II 与配比 I 之间的 U_{FDA} 差异达到 0.05 显著性水平(图 10)。测定发酵产物的增比黏度结果表明,配比 II 的增比黏度为 7.11,高于配比 I 的 6.47 和配比 III 的 6.93,其中配比 II 与配比 I 的差异达到了 0.01 极显著水平,配比 II 与配比 III 的差异达到了 0.05 显

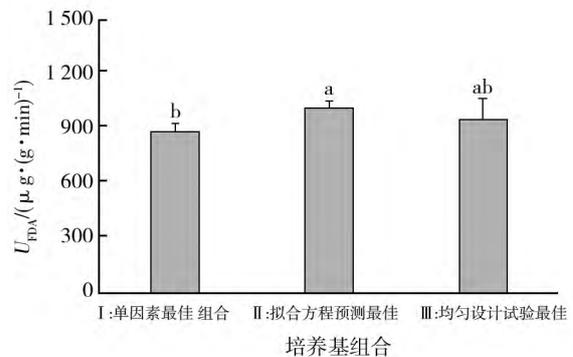


图 10 不同培养基组合之间 FDA 酶活的差异比较

Fig. 10 Comparison of differences in FDA activity between different media combinations

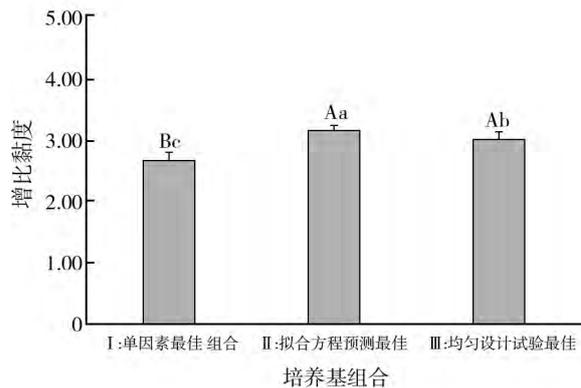


图 11 不同培养基组合之间发酵料黏度的差异比较

Fig. 11 Comparison of differences in the viscosity of fermented materials between different media combinations
不同小写字母表示组内显著性差异 $P < 0.05$; 不同大写字母表示组内极显著性差异,显著水平 $P < 0.01$
Different lowercase letters indicate significant differences within the group $P < 0.05$; different capital letters indicated extremely significant differences within the group $P < 0.01$

著水平(图 11)。由此证明,此模型的拟合方程具有一定的参考性。

通过本研究得出产 γ -PGA 的芽胞杆菌 LX-1 固态发酵培养基的最佳配方为 V 豆粕 : V 麦麸 : V 无机盐溶液 = 6 : 4 : 4, 其中无机盐溶液的最佳配方为 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.24 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.78 g/L、NaCl 11.67 g/L。

3 讨 论

γ -PGA 因其分子主链上大量的亲水性羧基和肽键,故具有良好的可降解性及生物友好等方面的突出优势。不同相对分子质量的 γ -PGA 表现出不同的生物特性^[39],这些良好特性将使生物菌肥在土壤改良和恢复等环保领域上的运用更加广泛。为优化 γ -PGA 的发酵培养条件,许多学者对 γ -PGA 固态发酵培养基进行了优化实验。胡荣章等^[40]筛选了一株枯草芽胞杆菌菌株并对碳源、氮源、谷氨酸钠浓度、初始 pH、接种量、通气量等发酵条件进行了优化。李艳华等^[27]利用响应面法优化得到柠檬酸、谷氨酸、磷酸氢二钾和硫酸镁四个显著影响因子。基于前人的研究成果,本研究利用微生物发酵技术选取一株具有保水、保肥作用的枯草芽胞杆菌生产菌株,通过优化其培养基条件,寻找高效的 γ -PGA 固态发酵工艺。采用黏度测定法能够快速、高效测定 γ -PGA 等黏性物质的含量。实验虽然没有直接测量 γ -PGA 的含量,但在发酵培养过程中伴随产生的其他胞外多糖等黏性物质,对于土壤团聚体形成^[41]、环境吸附^[42]和生物絮凝^[43]等具有促进作用,能够与 γ -PGA 协同发挥保水作用,由此为利用农产品加工下脚料发酵生产含 γ -PGA 等黏性物质的保水肥料提供参考。

豆粕作为大豆榨油的残渣仍含有丰富的有机质、蛋白质等营养成分,可为微生物生长提供碳源、氮源,但豆粕遇到水溶液会产生不同程度的黏结^[44],降低培养基透气性,进而抑制菌体生长。麦麸作为载体辅助成分,能够增加固态培养基的孔隙度,进而改善透气性。朱丽娟^[45]在大豆粉培养基质的基础上分别选用玉米芯碎、木屑、花生壳碎和麦麸作为辅助添加,发现在对比实验中麦麸是较好的培养基发酵载体。本研究在综合前人研

究结论的基础上选用豆粕、麦麸为培养基,通过设置系列配比实验以找寻最佳豆粕、麦麸配比,筛选更高效的产 γ -PGA 固态发酵工艺。固态发酵基于其培养基水分较少且选用农副产品为发酵底物,因此发酵产物浓度更高,生产成本低,能获得较高的经济效益。

适宜水量能够使微生物保持最佳生物活性。水量过多会影响培养基透气性,降低培养基中的溶氧量,而溶氧量是影响 γ -PGA 产量的重要因素;水量过少又会抑制微生物新陈代谢,降低酶活。本研究发现加水量 40% 左右时,发酵培养基的 FDA 酶活和增比黏度达到最佳,而加水量过多或过少均不同程度抑制菌体生长及 γ -PGA 的产量。桑莉等^[46]发现装液量过低时,菌体生长较好,但 γ -PGA 的产量低,而装液量过高也不利于菌体生长。胡荣章等^[40]也发现溶解氧含量并非越高越好,过高可能改变某些代谢途径而引起产量下降。具体影响其代谢途径的机制还有待进一步研究。

无机盐也是微生物发酵的所需物质,一方面调节培养基渗透压、pH 值,同时可以组成或调节某些生物生理活性物质。王勇等^[47]的实验结果表明磷酸盐会影响产酸效果,尤其是对谷氨酸生产菌 OD 值的净增有显著影响。李大力等^[48]和 Wei 等^[49]研究发现,在一定浓度范围 NaCl 浓度增加会对 γ -PGA 产率有促进作用,一旦浓度过高则可能影响 γ -PGA 分子量大小。本研究通过设置单因素实验,探究不同配比浓度的无机盐添加量对 γ -PGA 产量的影响并以及最佳实验结果,其结果与张文^[50]、吉美萍等^[51]的研究结果相似。

基于前期最佳液体发酵培养基的研究基础,本研究通过单因素实验及均匀设计实验,以发酵提取液的黏度及 FDA 酶活为评价指标,对产 γ -PGA 的枯草芽胞杆菌的固体发酵培养基进行优化,经过系列实验后得出最佳培养基配方为 V 豆粕 : V 麦麸 : V 无机盐溶液 = 6 : 4 : 4, 其中无机盐溶液的最佳配方: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.24 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.78 g/L、NaCl 11.67 g/L。通过优化保水材料功能菌产 γ -PGA 枯草芽胞杆菌 LX-1 的固态发酵工艺,从而为利用农产品加工下脚料发酵生产含 γ -PGA 保水肥料提供技术基础。

参考文献:

- [1] 刘艳改,姚娜,程艳辉.不同水土保持工程措施对侵蚀红壤坡地植被恢复的影响研究[J].绿色科技,2019,(24):20-22.
- [2] 史志华,杨洁,李忠武,等.南方红壤低山丘陵区水土流失综合治理[J].水土保持学报,2018,32(1):6-9.
- [3] 赵其国,黄国勤,马艳芹.中国南方红壤生态系统面临的问题及对策[J].生态学报,2013,33(24):7615-7622.
- [4] 黄占斌,万会娥,邓西平,等.保水剂在改良土壤和作物抗旱节水中的效应[J].水土保持学报,1999,5(4):52-55.
- [5] 黄占斌,辛小桂,宁荣昌,等.保水剂在农业生产中的应用与发展趋势[J].干旱地区农业研究,2003,21(3):11-14.
- [6] 孙蓟锋,王旭.土壤调理剂的研究和应用进展[J].中国土壤与肥料,2013(1):1-7.
- [7] 王砚田,王孟,赵小雯,等.高吸水性树脂对土壤物理性状的影响[J].北京农业大学学报,1990(2):181-187.
- [8] 何绪生,廖宗文,黄培训,等.保水缓/控释肥料的研究进展[J].农业工程学报,2006(5):184-190.
- [9] 冯金朝,赵金龙,胡英娣,等.土壤保水剂对沙地农作物生长的影响[J].干旱地区农业研究,1993(2):36-40.
- [10] 李杨.保水剂与肥料及土壤的互作机理研究[D].北京:北京林业大学,2012.
- [11] 侯贤清,李荣,何文寿,等.保水剂施用量对土壤水分利用及马铃薯生长的影响[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2015,41(5):558-566.
- [12] 张蕊,耿桂俊,白岗栓.保水剂施用量对土壤水分和番茄生长的影响[J].中国水土保持科学,2013,11(2):108-113.
- [13] 曾健,费良军,陈琳,等.添加 γ -聚谷氨酸对土壤结构及持水特性的影响[J].水土保持学报,2018,32(1):217-224.
- [14] 陈雪萍,翁志学,黄志明.高吸水性树脂的结构与吸水机理[J].化工新型材料,2002,30(3):19-21.
- [15] 游庆红,张新民,陈国广,等. γ -聚谷氨酸的生物合成及应用[J].现代化工,2002,22(12):56-59.
- [16] 吴淑芳,陈循军,杜建军,等.高吸水性树脂在农业生产中的应用研究进展[J].化工新型材料,2018,46(12):247-251.
- [17] 张新民,姚克敏,徐虹.新型高效吸水材料(γ -PGA)的农业应用研究初报[J].南京气象学院学报,2004(2):224-229.
- [18] 张艳丽,高华,刘小红.微生物合成的聚谷氨酸及其应用[J].生物技术通报,2008(4):58-62.
- [19] 鞠蕾,马霞,张佳. γ -聚谷氨酸的发酵及保水性能[J].中国酿造,2011(7):57-60.
- [20] Yang ZH, Dong CD, Chen CW, et al. Using poly-glutamic acid as soil-washing agent to remediate heavy metal-contaminated soils[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2018, 25(6):5231-5242.
- [21] 王传海,何都良,郑有飞,等.保水剂新材料 γ -聚谷氨酸的吸水性能和生物学效应的初步研究[J].中国农业气象,2004,25(2):19-22.
- [22] Yin AM, Jia YP, Qiu TL, et al. Poly- γ -glutamic acid improves the drought resistance of maize seedlings by adjusting the soil moisture and microbial community structure[J]. Applied Soil Ecology, 2018(129):128-135.
- [23] 贾艳萍,殷爱鸣,孙艳梅,等.产聚谷氨酸菌株的筛选及菌株发酵液对玉米幼苗抗旱性的作用[J].生物技术通报,2017,33(10):135-142.
- [24] 张文,张树清,王学江. γ -聚谷氨酸的微生物合成及其在农业生产中的应用[J].中国农学通报,2014,30(6):40-45.
- [25] 陈咏竹,孙启玲. γ -多聚谷氨酸的性质、发酵生产及其应用[J].微生物学通报,2004,31(1):122-126.
- [26] 史文娟,梁嘉平,陶汪海,等.添加 γ -聚谷氨酸减少土壤水分深层渗漏提高持水能力[J].农业工程学报,2015,31(23):94-100.
- [27] 李艳华,梁金钟,范洪臣.响应面法优化 γ -聚谷氨酸发酵培养基的研究[J].食品科技,2008,33(3):45-48.
- [28] 诸葛健,李华钟.微生物学[M].北京:科学出版社,2009:483-484.
- [29] Jan Michiels, Maarten Fauvert. 细菌滞留状态研究方法与操作规程[M].北京:中国农业科学技术出版社,2017:58-64.
- [30] 贾建丽.环境土壤学[M].北京:化学工业出版社,2016:203-204.
- [31] Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, et al. A microtiter-plate screening methods for biofilm-disinfection and removal[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 54(2):269-276.
- [32] Peeters E, Neils HJ, Coneye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates[J]. J Microbiol Methods, 2008, 72(2):157-165.
- [33] 姚俊,徐虹.生物絮凝剂 γ -聚谷氨酸絮凝性能研究[J].生物加工过程,2004(1):35-39.
- [34] 陈雄.枯草芽胞杆菌高产聚- γ -谷氨酸及其应用研究[D].武汉:华中农业大学,2005.
- [35] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[S].北京:化学工业出版社,2015:79-80.
- [36] 姚俊,孙荣斌,魏钦俊,等.黏度法测定 γ -聚谷氨酸含量[J].食品与发酵工业,2011,37(2):176-178.
- [37] 王进.产聚谷氨酸菌种的筛选以及其在肥料增效剂方面的应用研究[D].武汉:武汉工程大学,2018.
- [38] 刘永才.均匀设计及其应用[J].战术导弹技术,2002,1:58-61.
- [39] 王卫国,王卫,赵永亮,等. γ -聚谷氨酸的研究及应用进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2016,37(2):117-122,128.
- [40] 胡荣章,叶海峰,金丽,等. γ -聚谷氨酸高产菌株筛选及发酵条件优化[J].中国生物工程杂志,2005,25(12):62-65.
- [41] 上官王丽.产胞外多糖细菌多样性及其对土壤团聚体形成作用的研究[D].南京:南京农业大学,2013.
- [42] 康春莉,苏春彦,董德明,等.自然水体生物膜胞外多糖吸附铅和镉的研究[J].吉林大学学报(理学版),2005(1):121-125.
- [43] 李欧. *Paenibacillus elgii* B69 胞外多糖结构鉴定及生物合成途径研究[D].浙江:浙江大学,2014.

- [44] 帅明,黄占旺,牛丽亚. 纳豆芽胞杆菌固态发酵培养基的优化[J]. 中国食品学报,2009,9(1):143-147.
- [45] 朱丽娟. 枯草芽胞杆菌 HD11 发酵生产 γ -聚谷氨酸的研究[D]. 郑州:河南大学,2012.
- [46] 桑莉,徐虹,李晖,等. γ -聚谷氨酸产生菌的筛选及发酵条件[J]. 过程工程学报,2004(5):462-466.
- [47] 王勇,伊玉森,张远征. 无机盐及微量元素对谷氨酸发酵的影响[J]. 发酵科技通讯,2004(3):2-3.
- [48] 李大力,詹长娟,郗丽,等. 盐浓度对纳豆芽胞杆菌发酵产 γ -聚谷氨酸影响的研究[J]. 化学与生物工程,2007(2):50-51,72.
- [49] Wei XT, Ji ZX, Chen SW. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly- γ -glutamic Acid[J]. Applied Biochem & Biotechnology, 2010,160(5):1332-1340.
- [50] 张文. γ -聚谷氨酸制备及其农用效果[D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [51] 吉美萍,那日,郭九峰,等. 纳豆芽胞杆菌发酵生产 γ -聚谷氨酸的响应面优化[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2017,48(6):633-645.