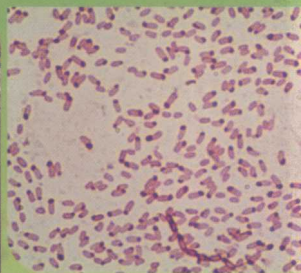


啤酒废弃物为原料的 **Bt**发酵研究

吴丽云 著



中国林业出版社

图书在版编目(CIP)数据

啤酒废弃物为原料的 Bt 发酵研究/吴丽云著. —北京:中国林业出版社,2011. 11
ISBN 978-7-5038-6411-7

I. ①啤… II. ①吴… III. ①啤酒工业-废弃物-发酵-制造-苏云金杆菌
IV. ①X797 ②TQ453.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 244689 号

出版 中国林业出版社(100009 北京西城区刘海胡同 7 号)
E-mail forestbook@163.com 电话 (010)83228427
网址 <http://lycb.forestry.gov.cn>
发行 中国林业出版社
印刷 北京北林印刷厂
版次 2011 年 11 月第 1 版
印次 2011 年 11 月第 1 次
开本 880mm × 1230mm 1/32
印张 7.5
字数 230 千字
印数 1 ~ 1000 册
定价 45.00 元

前 言

虫害是制约农作物高产、稳产的重要因素，全球每年因虫害对农业生产所造成的损失约占农作物总产量的 15% (李海燕, 2000)，其中每年被病虫害夺去谷物收成的 20%~40%，由此造成的经济损失高达 1200 亿美元(权桂芝, 2007)。通常害虫用化学杀虫剂控制，每年需生产 200 多万吨农药，其销售额高达 160 亿美元(权桂芝, 2007)，但化学农药不能生物降解，为非靶标杀虫剂，害虫易产生抗性(Rowe 等, 1987; Prabakaran 等, 2006)，更严重的是长期大量使用化学农药，导致非常严重的“3R”(Resisitance, Residue, Resurgence)问题，这些不利因素促使科学家研发可替代的、环境友好的生物杀虫剂来控制害虫。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)，简称 Bt，1901 年日本学者石渡繁撒(Ishiwata)从猝倒死亡的家蚕体内分离出来，命名为猝倒杆菌(Ishiwata, 1901)，1911 年 Berliner 在德国苏云金省的谷仓里发现这种细菌能杀死地中海粉螟(喻子牛, 1990)，1915 年才正式命名为 Bt。Bt 深层发酵产生芽胞-晶体悬浮液后，制成制剂成为商业杀虫剂(Rowe 等, 1987)。1938 年，第一个 Bt 商品制剂 Sporeine 在法国问世，并在地中海粉螟的防治中得到了应用(戴莲韵等, 1997; 鲁松清, 1999)。Bt 由于其易于生产、对脊椎动物无毒和产品的稳定性，成为最成功的生物杀虫剂(Deacon, 1983; Dipak Vora 等, 1999; Adams 等, 1999; 张玲, 2005)。早期的文献指出，Bt 伴胞晶体连同活芽胞在控制许多鳞翅目、双翅目、鞘翅目害虫具有巨大的潜力(Rowe 等, 1987)，已经广泛用于控制 92 种鳞翅类害虫(Vidyarthia 等, 2002)，目前主要用于粮食经济作物与蔬菜、林业以及一些卫生害虫的防治(Morris 等, 1997)，其占农业、森林、医学、兽医控制害虫的微生物杀虫剂的 90% (李世广等, 2005)，是一种最普遍、适用的(Ghribi 等, 2007)、有希望的自然微生物杀虫剂，可以部分代替化学农药用于害虫的综合防治(Rowe & Margaritis, 1987; Zeynep Tokcaer 等, 2006)。

另一方面,据统计,2009年前11个月,我国啤酒行业累计啤酒产量为4058.54万千升。预计全年产量将达到4350万千升(<http://www.foods1.com/content/889629/>),啤酒产量连续几年居世界第一,是啤酒大国。据统计,每生产1吨啤酒需要10~30吨新鲜水,相应地产生10~20吨废水(依工艺、设备及规模的不同而不同)(孙金荣等,1995),以保守统计,以每生产1吨啤酒产生 8m^3 废水来计算,我国啤酒工业每年排放的废水量超3.2亿升。啤酒厂总排水属于中、高浓度的有机废水(李家瑞等,1992),据国外统计,每生产1000吨的啤酒所排放出的BOD值相当于1.4万人生活污水的BOD值,悬浮固体SS值相当于8000人生活污水的SS值(匡武等,2006),如直接排入天然水体,将消耗水中的溶解氧,既造成水体缺氧,还能促使水底沉积化合物的厌氧分解,产生臭气,恶化水质,对水体环境造成严重危害(何增耀等,1991;张森林等,1995;李科林等,1999;左永泉,2000)。

Bt的商业化依赖于可行性和生产加工工艺的经济性。据2005年统计,我国生物农药年产量只占农药总量的1%,离“世界环境与发展大会”提出生物农药要达到60%的目标甚远,其中最主要原因之一是成本问题。任何产品要想具有竞争力,在保证质量的前题下,价格是主要因素。生物农药其开发成本只有化学农药的十分之一,但其生产成本要高于化学农药。据2010年我国杀虫剂市场统计,生物杀虫剂的成本比同效化学农药高30%左右,许多农户不太容易接受(<http://www.nz518.com/news/detail-28715.html>)。Bt杀虫剂成本高的主要原因是工业生产设备投资大,原料成本高、效价低、生产规模小、发酵技术相对落后。通常国内啤酒厂废水中 COD_{Cr} 含量为:1000~2500mg/L, BOD_5 含量为:600~1500mg/L,SS为200~400mg/L,pH值为5~9,其BOD/COD比值一般大于0.5,可生化性较好(李家瑞等,1992;袁惠民等,1994;李科林等,1999;闰宁等,2001),且含有一定量的凯氏氮和磷(李科林等,1999),这种废水含有较高浓度的糖类、蛋白质、脂肪、纤维、醇类、废酵母、酒花残渣等有机无毒成分,是一种来源广易的、营养高且成分相对稳定、卫生、可生化性好的原料,如能开发用于Bt的生产原料,既可以降低Bt生产成本,又可以免去废水的处理费用,实现双盈利。

本书尝试利用啤酒厂废弃物为原料培养 Bt，并从污水处理系统中筛选出适合污水为原料的 Bt 的高效菌株，缩短发酵周期，大大节约 Bt 的生产成本。该技术在解决废水污染的同时，又能大量获得生态效益和经济效益良好的微生物农药，这对于推动我国的环保事业和绿色工程建设具有非常积极的意义。

著者

2011 年 7 月

目 录

第一篇 降低 Bt 生产成本的探索

第一章 培养基的筛选	(2)
第一节 培养因子对 Bt 产毒的影响	(2)
一、Bt 的代谢特征	(2)
二、培养基成分对 Bt 产毒的影响	(4)
三、环境因子对 Bt 产毒的影响	(15)
第二节 废弃物培养基的选择	(17)
一、有机(工农业)废弃物的研究	(18)
二、工业废水的研究	(20)
三、污水污泥的研究	(25)
四、城市污水污泥预处理	(33)
第二章 Bt 发酵方式及其工艺优化	(37)
第一节 发酵方式	(37)
一、Bt 的固态发酵	(37)
二、Bt 的液态发酵	(38)
第二节 发酵工艺优化	(41)

第二篇 啤酒废弃物营养及其开发应用

第三章 啤酒废弃物种类与应用	(46)
第一节 啤酒糟	(48)
一、啤酒糟的产生与营养	(49)
二、啤酒糟的应用	(49)
第二节 啤酒废酵母	(52)
一、啤酒废酵母的产生及其营养	(52)
二、啤酒废酵母的结构及其自溶	(54)
三、啤酒废酵母的破壁方法和机理	(58)
四、啤酒废酵母的应用	(65)

第三节 啤酒废水及啤酒污泥	(71)
一、啤酒废水及啤酒污泥特质	(71)
二、啤酒废水、啤酒污泥的应用	(76)
第四节 其他废弃物的应用研究	(78)
一、残旋酒的利用	(78)
二、蛋白质凝固物	(79)
三、废硅藻土和冷热凝固物的利用	(79)
四、废酒花糟	(79)
五、麦 根	(79)
六、综合利用	(80)

第三篇 啤酒废弃物原料的 Bt 发酵研究

第四章 Bt 发酵原料的选择	(82)
第一节 啤酒废水的特点	(82)
一、啤酒废水、城市污水的产生和处理工艺	(83)
二、啤酒废水的营养特性	(84)
三、不同污水 COD、BOD 的比较分析	(84)
第二节 不同污水原料的发酵对比	(89)
一、工艺条件	(89)
二、发酵参数检测	(90)
三、发酵原料的筛选	(91)
四、啤酒废水、废酵母泥生产 Bt 的可能性及意义	(97)
第五章 啤酒废水、废酵母泥的预处理研究	(99)
第一节 啤酒废弃物的生化应用的预处理研究	(100)
一、研究方法	(100)
二、啤酒废水、活性污泥、新鲜酵母泥的预处理效果	(101)
第二节 酵母泥预处理正交试验	(104)
一、酵母泥预处理的正交优化	(104)
二、酵母泥预处理正交试验结果	(105)
三 结 论	(108)
第六章 专用菌株的筛选	(110)
第一节 污水污泥中 Bt 菌株的分离	(111)

一、分离样品的采集	(111)
二、研究方法	(112)
三、结果与分析	(113)
第二节 分离菌株的生物学研究	(115)
一、主要生理生化指标的鉴定	(115)
二、分离菌株的基因鉴定和蛋白质鉴定	(116)
第三节 分离菌株的毒力测定	(126)
一、研究方法	(126)
二、结果与分析	(128)
三、讨 论	(131)
第四节 啤酒废水为原料发酵菌株的选择	(131)
一、不同菌株发酵对比	(131)
二、不同菌株发酵液对小菜蛾杀虫活力的影响	(133)
第七章 啤酒废弃物发酵培养基的优化	(134)
第一节 营养因子与促生长剂的添加	(134)
一、研究方法	(134)
二、结果与分析	(135)
三、讨论	(140)
第二节 Plackett-Burman 设计筛选产毒重要影响因子.....	(141)
一、研究方法	(141)
二、结果与分析	(142)
第三节 响应面分析优化培养基组成	(144)
一、研究方法	(144)
二、实验结果与分析	(146)
三、讨 论	(154)
第八章 发酵条件优化及补料初探	(155)
第一节 培养条件的优化	(155)
一、研究方法	(155)
二、结果与分析	(156)
第二节 补料优化	(159)
一、研究方法	(159)
二、实验结果与分析	(160)

4 目 录

三、讨 论	(164)
第九章 展 望	(166)
一、研究的总体结论	(166)
二、有待进一步研究的问题	(167)
三、经济分析	(169)
四、本研究创新点及其展望	(172)
参考文献	(175)
附录 缩写词英汉对照	(219)
附 图	(221)
一、城市污水厂取样图	(221)
二、啤酒废水处理厂取样图	(222)
三、啤酒废弃物发酵图片	(223)
后 记	(224)

第一篇 降低 Bt 生产成本的探索

Bt 杀虫剂由于其易于生产、专一性、对脊椎动物无毒和产品的稳定性，是一种最普遍、适用的、最成功的微生物杀虫剂，可以部分代替化学农药用于害虫的综合防治。

生物农药生产成本高于化学农药，主要是因为 Bt 杀虫剂的工业生产设备投资大，原料成本高、效价低、杀虫谱窄、生产规模小、发酵技术落后。目前降低 Bt 生产成本应从筛选高效菌株、以废弃物替代粮食类原料来降低原料成本、发酵优化、提高下游处理效率及提高制剂活力和药效等入手。本书就目前 Bt 在筛选高效菌株、以废弃物替代粮食类原料来降低原料成本、发酵优化三个方面的研究进行阐述，从这三个方面入手（详见第一篇、第三篇），以达到降低 Bt 的生产成本的目的。

第一章

培养基的筛选

本章将重点阐述 Bt 的代谢特征、营养因子、环境因子对 Bt 生长和产毒的影响，并阐述了废弃物原料培养 Bt 的研究进展及其存在的问题。介绍了工业化污水污泥预处理的方法。

第一节 培养因子对 Bt 产毒的影响

一、Bt 的代谢特征

(一) Bt 的代谢

Bt 在其生长和芽胞形成过程中不断地进行各种分解代谢，同时进行合成代谢。其营养需求概括起来包括碳源、氮源、矿物质元素、微量元素和生长素等。发酵过程 Bt 大量水解培养基的底物，产生葡萄糖，葡萄糖经 EMP 和 PP 途径异化生成丙酮酸、乙酸等，再经 TCA 循环进一步氧化，大量产生 ATP 和细胞合成前体物质，形成芽胞和晶体蛋白，少量蛋白质被分解成氨基酸，构建菌体物质，菌体数量以几何数增值，溶氧降至低谷，总糖、还原糖、ATP、溶磷的含量及 pH 值有很大变化(杨自文, 1997)。因此，了解 Bt 的营养要求和代谢过程，以及各种代谢产物的生成情况，对 Bt 制剂的生产是很有帮助的。

Kenneth 等(1974)用呼吸运动计量法研究了 18 株 12 种血清型的 Bt 菌株，发现不论在最低限度营养的培养基，还是在含有酵母浸膏的培养基，EMP 是主要的代谢途径，PP 途径为次要途径，且不同的血清型对于营养需要没有很大的区别(Nickerson 等, 1974)；Luthy 等(1982)认为 Bt 的代谢是一种需氧的过程，其代谢是一个复杂的过程，两种代谢途径同时发生，但是所参与代谢的比例不同，93%~100% 的糖经 EMP 途

径, 伴随或而后是 TCA 循环, 0~7% 的糖经磷酸戊糖(PP)途径, 两者具体的比例取决于培养条件和菌种。此外, Bt 代谢中还存在着一个辅助途径, 即 γ -氨基丁酸途径和一个补救途径, 即乙醛酸途径(喻子牛, 1990)。

(二) 芽胞和晶体的产生

早期的文献报道, Bt 的培养和工业化应用主要采用深层分批发酵(Rowe & Margaritis, 1987)。Bt 杀虫剂是一种在发酵结束后, 获得的芽胞和晶体蛋白的混合物, 在 Bt 制剂的实际应用中, 需要大量的高杀虫活力的芽胞和晶体(Stockdate, 1985; Pearson & Ward, 1988; Prabakaran, 2008c)。Pearson & Ward 等(1988)报道, 杀虫活力与晶体蛋白合成等同, 芽胞形成与杀虫活力相关联; Mummigatti 等(1990)报道 Bt 杀虫活力首先取决于晶体包涵体, 其次是芽胞的作用。所以 Bt 的生产, 需要获得高产量的芽胞、内毒素及其毒素因子。一些研究表明, 大部分 Bt 伴胞晶体的形成过程与芽胞形成过程有密切联系(Scherrer & Sommerville, 1977; 喻子牛, 1990)。

在 Bt 分批发酵中, 碳源、氮源以及磷源, 任何一个因素的缺乏都会导致芽胞的出现(Yang & Wang, 1998)。在营养生长阶段, 碳和氮源经 EMP 途径分解, 主要产生醋酸盐和其他的中间体, 此时 pH 值下降, 培养基中的葡萄糖被耗尽。此后, 细胞利用葡萄糖代谢的中间产物, 尤其是通过乙酸氧化系统氧化有机酸, 此时 pH 值上升; 最后在过渡期产生代谢变化, 经过 TCA 循环, 形成芽胞(Benoit 等, 1990; Yang & Wang, 1998)。TCA 循环是乙酸同化吸收的主要途径, 只有当葡萄糖消耗到较低的水平时, 乙酸开始被利用, 如果培养基中缺乏葡萄糖, 芽胞形成时, 将缺少有机酸类的中间产物, 三羧酸循环也就不能正常进行, 从而会阻碍芽胞的形成, 自然也影响到伴胞晶体的形成。在连续发酵中, 当碳源或氮源作为限制因子时, 也能观察到芽胞。

关于芽胞形成的机制有许多解释。Schaefer 等认为含碳和氮的代谢物抑制了特异的芽胞合成酶, 但其他学者研究发现, 这种代谢阻遏与芽胞的诱导合成并无关系(Jeong, 1990); Hanson 等则发现芽胞调控和 TCA 循环的至少两个酶有相似性, 一个完整的 TCA 循环对于芽胞的形成是必不可少的(Hanson & Mackechnie, 1981)。由于氨基酸饥饿也能

诱导芽胞的形成,所以 RNA 水平上的反应与芽胞起始密切关联(Lopez, 1981)。然而, Freese 等(1981)认为在缺乏核酸而又没有 TCA 循环中的大部分酶的情况下,芽胞也能够形成,主要通过糖酵解途径来提供能量,还认为 GTP 可能是直接通过一种蛋白来阻止芽胞的形成。喻子牛(1990)认为,一般情况下,需要维持腺苷 5'-P 的一定水平和消除积累的某些抑制因子进行三羧酸循环,才能形成芽胞。

总之, Maria 等(2003)报道毒力产量依赖于培养基,也受操作条件的影响。

二、培养基成分对 Bt 产毒的影响

用于生产 Bt 的商业培养基通常都是由农副产品获得的碳源(能源)、氮源、磷和钾源等无机盐组成,其成分不太确定(和致中, 1980; Beegl 等, 1987)。碳源构成 Bt 的骨架,主要在 Bt 的生长和增殖中起作用,而氮源则为 Bt 合成各类蛋白提供原料,关雄(1997)报道从化学成分的角度确定 Bt 培养基是很困难的。

常用的碳源如葡萄糖、淀粉、糖蜜,氮源如蛋白胨、酵母膏或大豆粉(Arcas 等, 1987)。在我国,生产 Bt 制剂的主要碳、氮源有豆饼粉、棉籽饼粉、鱼粉、淀粉、玉米粉、酵母粉、麦麸等,矿物营养为硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、磷酸二氢钾、碳酸钙等;而实验室常用的氮源有蛋白胨、酵母粉、干酪素、酵母膏、牛肉膏等(李荣森, 1983)。研究者对 Bt 营养方面已进行了大量的研究(Rogo & Yousten, 1969; Nickerson & Bulla, 1975),发现培养基的各种农产品和副产品影响毒性(Salama 等, 1983a, 1983b; Obeta & Okafor, 1983, 1984; Ejiofor & Okafor, 1989)。不同的培养基, Bt 的毒性变化相当大,培养基成分不仅调节毒力浓度,而且调解 δ -内毒素的蛋白多肽组成(Nickerson & Bulla, 1974; 喻子牛, 1985)。关雄(1993)研究发现,利用不同碳、氮等营养素为原料的发酵产物,晶体形态和毒力都存在着差别,随着碳源浓度的变化,晶体的大小、蛋白质的含量以及毒素的产生也会发生相应变化。

可见, Bt 培养基配方与 Bt 发酵水平关系密切,设计一种细胞生长和 δ -内毒素生产最佳的培养基是很重要的(Arcas 等, 1984; Pearson &

Ward, 1988; Adams, 1999)。首先, 原料的选择是相当重要的, 原料占 Bt 成品成本总费用的 35% ~ 59% (Lisansky 等, 1993), 它很大程度上决定了最后产品的效益 (Morris 等, 1997)。由于 Bt 对营养要求不严, 不仅能在营养培养基中生长良好外, 在许多农副产品甚至以工业废水、废渣为主的培养基中也能生长良好, 并且 Bt 在固液两种形态培养基中都能生长良好。其次, 培养基的选择不仅需要选择合适的碳、氮源和氨基酸 (Nickerson & Bulla, 1974), 而且需要寻找合适的 C:N (Egli & Quayle, 1986), 且培养基碳、氮、磷、钾必须常常调整。再者, 培养基组分的配比、缓冲能力、黏度、消毒是否易彻底、消毒后营养破坏程度及原料中杂质含量都对细菌生长和产物形成有影响 (唐孝宣, 1991)。而且不同 Bt 菌株之间营养需求差异很大, 一种培养基适合某一菌株, 但对另一菌株则可能毫无用处, 不可能用某一特定配方作为所有 Bt 的发酵培养基。

总之, 培养基优化至关重要, 微生物杀虫剂成功商业化的关键是研发一种合适的廉价培养基。

(一) 不同碳源对 Bt 产毒的影响

从 Bt 的代谢途径看, 在芽胞形成期, 为了获得形成芽胞和合成晶体的能源, 碳源是必需的 (Mignone & Avignone Rossa, 1996; Farrera 等, 1998; Zouari 等, 1998), 芽胞形成和晶体形成还需氮源和金属盐 (Nickerson & Bulla, 1974)。Bt 不同菌株对培养基中碳源的利用具有很大的共性, 一般由葡萄糖或其聚合物组成, 但最好使用简单的碳源 (关雄, 1997)。利用不同碳源的发酵产物, 晶体的形态和毒力都存在着差别 (关雄, 1993), 碳源对晶体的合成有直接的调控或对芽胞的合成有间接的促进或抑制作用 (Yasemin 等, 2002)。

1. 葡萄糖对 Bt 产毒的影响

Arcas 等 (1984) 研究发现葡萄糖是最好的碳源, 蔗糖培养 Bt 生物量少的原因可能是由于该菌株缺少蔗糖转化酶。Rossa & Mignone (1993) 报道二糖以上需要先水解才能利用, 利用速度受限。也有研究发现: 由于葡萄糖是易降解糖, 抑制了芽胞菌蛋白水解酶的生成 (Melek 等, 2002; Dhouha Ghribi 等, 2007), 而这些正是芽胞生成的先驱代谢物质 (Rowe & Margaritis 1987)。当葡萄糖作为单一碳源时, 这些先驱体不

足, 细胞的蛋白折叠受影响, 导致不产芽胞和 ICP 不成形 (Sachidanandham & Jayaraman 1993)。因此, 简单碳源如葡萄糖和麦芽糖, 只能促进菌体的生长而不能促进芽胞和晶体的合成, 而蔗糖、乳糖和菊粉虽然不能促进菌体的生长, 但却能显著提高芽胞和晶体的合成量 (Yasemin 等, 2002)。但 Luthy 等 (1982) 认为如果培养基中缺乏葡萄糖, 芽胞形成时, 将缺少有机酸类的中间产物, TCA 循环也就不能正常进行, 从而会阻碍芽胞的形成, 自然影响到伴胞晶体的形成。

碳源的浓度也影响晶体大小、蛋白含量以及毒素的产生。Scherre 等 (1973) 发现随着葡萄糖浓度的变化, 蛋白质含量和晶体的大小都在变化, 当葡萄糖浓度为 6 ~ 8 g/L 时达到最高。

2. 其他碳源对 Bt 产毒的影响

Nickerson (1974) 研究发现, Bt 在缺少碳水化合物的培养基中芽胞形成不良。也有研究发现碳源浓度达到一定时, 芽胞形成受抑制, 菌数也大大减少 (关雄, 1997); Avignone Rossa 等 (1990) 发现维持培养基蛋白含量不变, 增加初糖浓度, 生物量和 δ -内毒素也增加。

Mummigatti 等 (1990) 用蔗糖和麦芽糖作 Bt 的碳源, 发酵液毒性是可溶性淀粉发酵液的 2.5 倍, 而用可溶性淀粉和蔗糖作复合碳源, 不论添加何种氮源毒力都不理想。Dipak Vora 等 (1999) 研究以蔗糖代替葡萄糖, 芽胞形成更早, 发酵 24h, 孢子形成率达到 99%, 但晶体蛋白更低, δ -内毒素提高; 程萍等 (2001) 研究发现 *cry* 基因的表达与初始碳源的种类有关, 丙酮酸钠的表达量最高, 葡萄糖次之, 在琥珀酸钠中最低。Yasemin Içgen 等 (2002a, 2002b) 发现蔗糖、乳糖、菊粉有利于芽胞的形成, 乳清、糖蜜也是良好的碳源, 其他碳源如葡萄糖、丙三醇、麦芽糖、淀粉、糊精产毒能力较低; 然而, Melek Özkan 等 (2003) 研究发现碳源中的葡萄糖、淀粉、糖蜜阻断或抑制毒素的形成, 特别是阻断 134kDa (*cry4Ba*) 的形成; 相反地, 糊精、乳清、麦芽糖、乳糖、菊粉、甘油和蔗糖对毒素和生物量生成有促进作用。在含麦芽糖的培养基里芽胞最少, 在含乳糖和糊精的培养基里芽胞率最高; Prabakaran (2008a) 报道淀粉和糖蜜是合适的碳源。可见, 不同的原料来源, 其对毒力的贡献不一样, 同一碳源在一种菌株、或一种毒性产品中或许是最好的碳源, 但在另一种情况下却是不好的碳源。

甘油可以提高晶体含量,毒力增大(Smith, 1982)。Mirta(1990)用甘油代替葡萄糖培养 Bt, 细胞干重和 δ -内毒素增加, 而以葡萄糖为碳源的培养基中 Bt 的比生长速率最高; 以甘油代替葡萄糖培养 Bt(库斯塔克亚种), 发酵产物中 130kDa 蛋白的含量增加; 孙翠霞(a)等(2006)以葡萄糖和甘油作碳源发酵 Bt, 其效果明显优于原实验室优化的培养基。

醋酸钠对芽胞的形成有影响。Bt 积累培养基的有机酸, 尤其是醋酸盐, 在芽胞形成的初期进一步消耗(Rowe 等, 1987), 醋酸钠抑制 Bt 芽胞的萌发(Travers 等, 1987)。醋酸钠的影响并不直接与芽胞和蛋白酶合成有关, 而是与乙酸代谢的更为复杂的因子有关, 它的作用主要在芽胞期, 目的是为了确保编码晶体蛋白的基因表达和芽胞基因的表达(Zouair 等, 1999; 2002)。Zouari 等(1999a)添加 10g/L 醋酸钠于发酵培养基, 明显增加了内毒素的生成, 但限制了蛋白酶的合成, 有的菌株芽胞数增加, 有的芽胞数明显减少, 随着乙酸钠浓度的提高, 形成芽胞的时间增加。有研究表明醋酸钠的作用依赖于通风, 在通风良好的培养基, 醋酸钠这一快速吸收的碳源, 可使菌株生长最好, 但增加了合成内毒素的抑制调节(Bhatnagar 等, 1997; Dhouib 等, 1998; Zouari, 1999a)。

综上所述, 碳源对 Bt 的影响非常复杂。毒力因碳源种类和来源的不同、碳源间比例的不同而不同, 就是同种碳源, 在不同的培养条件下或不同的菌株, 产不同的毒素, 其影响也是不同的。

(二) 不同氮源对 Bt 产毒的影响

1. 氨基酸对 Bt 产毒的影响

氨基酸可以为芽胞期三羧酸循环中间物质提供自由氨基酸和碳骨架, 确保培养的稳定性(Sachidanandham 等, 1997)。Bt 的晶体蛋白含有大约 5% 碳水化合物和 95% 蛋白质(Morris 等, 1997)。晶体蛋白通常占细胞干重的 30%~40%, 所含 18 种氨基酸是 Bt 生长所必需的, 不同晶体间的氨基酸差异较少(Aronson 等, 1993)。Bt 伴胞晶体氨基酸组成上具有明显特点, 酸性氨基酸所占比例较高, 天冬氨酸和谷氨酸分别占到 12.5% 和 14%, 两者之和占了 1/4。Bt 杀虫毒力活性主要取决于伴胞晶体, 晶体蛋白由氨基酸合成, 这些氨基酸来之于溶解的 Bt 培养基

成分(Morris 等, 1997)。Monroe(1961)证实 C 标记的氨基酸加到不论是处于生长期还是处于芽胞形成期的 Bt 培养液中, C 标记的氨基酸都合成到晶体蛋白中, 这其中不到 20% 的晶体合成是来源于形成芽胞前在细胞内存在的自由氨基酸, 大约 80% 的晶体合成是由芽胞期中的氨基酸所合成, 大部分来源于其他营养期蛋白的降解。Bt 的稳定期以氮代谢为主, 对于浓醪发酵, 胞外蛋白酶始终处于活性高峰, 蛋白质原料大量水解, 氨基氮的积累大幅减少, 用于合成芽胞的蛋白质组分和晶体。如果氮源供应充分, 则 pH 值上升, 伴胞晶体迅速长大, 芽胞逐渐成熟, 加强该期氮源供应对于高产和高收是十分重要的(杨建洲, 2000)。通常氮源对 Bt 的生长影响显著, 对发酵液的菌数起主导作用, 培养基氨基酸组成明显影响 Bt 孢子和毒力形成。在加了氨基酸的培养基中, 底物利用率及晶体含量和毒力均比不加氨基酸的要高, 但不是所有的氨基酸都能被 Bt 利用, 培养基中氨基酸的种类和组成与细胞的成长及菌株毒力都有密切关系。Rogoff & Yousten(1969)研究发现的氨基酸能抑制 Bt 的生长, 氨基酸含量不同直接影响芽胞的形成。李荣森(1983)和罗绍彬(1989)研究了 16 种单一氨基酸和一种有机酸或组合氨基酸对 Bt 的 18 个菌株产毒的影响, 发现氨基酸的组成与菌体的生长和毒力有关, 且不同菌株对氨基酸的营养要求不同。

谷氨酸是晶体含量最丰富的氨基酸, 谷氨酸是生物合成的中心。在 Bt 的整个生长阶段, 培养液所含游离氨基酸中, 谷氨酸和丙氨酸占 50% 以上(杨建洲, 2000)。Kenneth 等(1974)认为 TCA 循环对于芽胞形成并不是必须的, 天冬氨酸是 DPA 合成的前提物, 谷氨酸直接或间接地调控着吡啶二羧酸(DPA)的合成和芽胞的热抗性; 缺少一个有功能的 TCA 循环可能会影响到 DPA 的合成; Kenneth 等(1974)也发现谷氨酸和天冬氨酸是不可取代的, 因为它们能被转化为柠檬酸, 因而可促进细胞的生长和晶体的合成, 谷氨酸和天冬氨酸对 Bt 的生长是必需的(Dharmsthiti 等, 1985)。因此, 选择发酵培养基应选择天冬氨酸和谷氨酸所占比例较高的氮源(王程辉, 2000)。然而, 郭尽力等(2001)研究了不同浓度的谷氨酸对芽胞和伴胞晶体、Bt 形态和菌体浓度的影响, 发现一定浓度的谷氨酸对芽胞及伴胞晶体的形态无明显影响, 但有利于菌体的生长和提高菌体的增殖速度, 对芽胞的裂解则有显著抑制作用。