

# 嗜热脱硫菌 BSM 培养基成分响应面法优化

贺琳琳, 游海鹏, 祝加伟, 郭 凯, 隋媛红, 吕英海

(山东科技大学 化学与环境工程学院, 山东 青岛 266590)

**摘要:**采用单因素分析法、显著因子筛选实验设计法、爬坡实验设计法和响应面分析法,对 534-16 嗜热脱硫菌的培养基成分和培养条件进行了优化研究。结果表明,当培养基的主要成分为:葡萄糖 21.00 g/L,酵母粉 5.25 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6.60 g/L 时,脱硫菌生长速率最快。最适合菌种生长的条件为:培养基 pH 值为 7.0,培养温度为 53.39 °C。

**关键词:**嗜热脱硫菌;培养基;成分;优化;响应面法

中图分类号:Q939.97

文献标志码:A

文章编号:1672-3767(2014)05-0058-05

## Response Surface Methodology to Optimize BSM Medium Component of Thermophile Desulfurization Bacteria

He Linlin, You Haipeng, Zhu Jiawei, Guo Kai, Sui Yuanhong, Lü Yinghai

(College of Chemical and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266590, China)

**Abstract:** Single factor analysis, significant factor analysis, slope-climbing experiment and response surface methodology were used to optimize the medium's component and condition of desulfurization strain of 534-16. The results indicate that the optimum ratio for the maximum of the growth rate is 21 g/L glucose, 5.25 g/L yeast powder and 6.60 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; temperature and pH value are the two primary factors to influence the desulfurization strain's growth rate; the optimized temperature is 53.39 °C and optimized pH value is 7.0.

**Key words:** thermophile desulfurization strain; medium; component; optimization; response surface methodology

含硫化合物是化石燃料的主要成分,化石燃料燃烧所排放的  $\text{SO}_2$  等有害物质不仅对大气、水体造成了污染,更对人类的健康造成了威胁,所以脱硫技术的研究与应用变得日益重要。传统的化学脱硫方法需要高温高压的条件,成本高且脱硫效果不够理想,而生物脱硫是一种高效、环保的脱硫方法,脱硫条件温和,成本低。生物脱硫常用的脱硫菌主要有假单胞菌、红球菌、芽孢杆菌、大肠杆菌、克雷白杆菌等<sup>[1-2]</sup>。上述脱硫菌所使用的培养基种类繁多,主要有 BSM(bacteria strain medium)培养基、TB(terrific broth)培养基、LB(Luria-Bertani)培养基和 SOB(super optimal broth)培养基<sup>[3]</sup>。由于 BSM 在脱硫菌培养方面使用广泛<sup>[4]</sup>,本实验采用改良的 BSM 培养基作为主要研究对象,利用响应面法对其成分进行优化。响应面方法(response surface methodology, RSM)包括实验设计、建模、因子效应评估以及寻求因子最佳操作条件<sup>[5-6]</sup>。随着计算方法的完善和微机应用的普及,近些年来响应面方法已成功应用于生物技术的许多方面<sup>[7-8]</sup>,例如何美儒<sup>[9]</sup>等利用响应面法优化了达托霉素发酵培养基,赵培城等<sup>[10]</sup>研究了响应面法优化创伤弧菌增菌培养基,但响

收稿日期:2013-12-10

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目

作者简介:贺琳琳(1992—),女,山东聊城人,主要从事生物工程方面的研究。E-mail: hl8112@163.com

吕英海(1971—),男,山东莱芜人,副教授,博士,主要从事于生物工程方面的研究,本文通信作者。

E-mail: yhlv666@163.com

应面法优化嗜热脱硫菌培养基方面的研究尚未见报道。本研究利用响应面分析法,以培养基成分做变量,分析比较脱硫菌生长性能,以求达到最佳培养效果。另外,重点分析了菌种的培养条件(如:温度、pH 值)对细菌生长的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 菌株

自胜利油田矿井附近被石油污染的区域中分别取少量土壤样品和水样,用 LB 培养基培养,经一系列富集和筛选处理,得到几株耐高温的菌株,然后对其进行 Gibb's 试剂鉴定<sup>[11]</sup>、BaCl<sub>2</sub> 实验和 DBT(dibenzothio-  
phene)脱硫实验<sup>[12]</sup>。通过脱硫性能分析比较,534-16 具有较好的脱硫效果。经过 16SrDNA 分析,初步确定其为地衣芽孢杆菌,最终将其作为主要研究对象。对地衣芽孢杆菌属的 534-16 的培养基进行优化,以便进一步考察菌株的工业应用前景。

### 1.2 初始培养基成分及初始培养条件

采用改良的 BSM 培养基,主要成分有:酵母粉 5 g,葡萄糖 5 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 4 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 4 g,MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2 g,溶于 1 L 蒸馏水中,调节培养基 pH 值为 7.0~7.2,并进行 121 °C 湿热灭菌 20 min。然后以 1% 的接种量(体积比,下同)接入地衣芽孢杆菌属的 534-16,内加 100 mL 无菌培养基,45 °C,130 r/min 振荡培养。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 氮源及碳源影响的单因素实验

在培养基中分别添加等量的酵母粉、蛋白胨、牛肉膏和氯化铵等不同类别的氮源,分别以 1% 的接种量将 534-16 接入 100 mL 培养基,45 °C 下培养。由于吸光度与生物量成线性关系,24 h 后测定其在 600 nm 波长条件下的吸光度。通过吸光度大小来分析比较其生长状况。同时,在培养基中添加葡萄糖、乳糖、蔗糖和淀粉等不同类别的碳源,按上述方法培养,24 h 后比较其在 600 nm 的 OD(optical density)值。吸光值与干重的线性关系按照曾玺的实验方法测定<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.2 显著因子筛选实验(Plackett-Burman Design, PBD)

从 BSM 培养基的主要成分中,选择葡萄糖、酵母粉、NH<sub>4</sub>Cl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、VB<sub>1</sub> 共 6 个对菌株生长影响较大的因素作为考察对象,进行六因素二水平的 PBD 实验设计,每个因素取两个水平。共设计了 8 组实验。运用统计软件对各因素效应进行 *t* 检验分析,选择差异较显著的因素作为下一步考察对象。

#### 1.3.3 爬坡实验

响应面拟合方程只在考察的紧接邻域才能充分近似真实情形。所以,要先逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程。最陡爬坡法以实验值变化的梯度方向为爬坡方向,根据各因素效应值的大小确定变化步长,能快速、经济地逼近最佳区域。具体方案见表 1。

#### 1.3.4 中心组合实验

从 PBD 和爬坡实验结果出发,对培养基的葡萄糖、酵母粉、磷酸氢二钠三种成分进行三因素三水平的 CCD(central composite design)响应面实验,具体设计见表 2。

#### 1.3.5 培养基 pH 值、培养温度的优化

优选法是以数学原理为指导,合理安排实验,以尽可能少的实验次数尽快找到生产和科学实验中最优方案的科学方法。采用优选法中的抛物线法来确定培养脱硫菌最适的温度。以 1% 的接种量将 534-16 分别接种于温度为 45,55,65 °C 的 100 mL 培养基中培养,24 h 后测定其在 600 nm 波长条件下的吸光度。同时,以

表 1 最陡爬坡实验

Tab.1 The results of slope-climbing experiment

序号	葡萄糖 /(g·L <sup>-1</sup> )	酵母粉 /(g·L <sup>-1</sup> )	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O/ (g·L <sup>-1</sup> )
1	14	3.75	10.4
2	16	4.25	11.6
3	18	4.75	12.8
4	20	5.25	14.0
5	22	5.75	15.2

534-16 为目的菌种,以 1% 的接种量分别接种于 pH 值为 5,6,7,8,9 的 100 mL 培养基中,培养 24 h 后在 600 nm 波长条件下测定其 OD 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验氮源与碳源影响

通过生物量和吸光值的标准曲线  $y = 2.138x + 0.006$  ( $R^2 = 0.990$ ),将吸光值转换为生物量浓度后得到图 1。由图 1 可知,菌株 534-16 可利用酵母粉、蛋白胨、牛肉膏和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为氮源,但最适氮源为酵母粉。菌株 534-16 可利用葡萄糖、蔗糖和淀粉作为碳源,几乎不能利用乳糖,最适碳源为葡萄糖。

### 2.2 显著因子筛选实验

菌株培养过程中所受外界影响太多,所以选择  $P$  值以 10% 为观测界限。从表 3 可以看出,对脱硫菌 534-16 影响较大的因素为葡萄糖、酵母粉和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。葡萄糖、酵母粉和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  的浓度对生物量均呈现正效应。随后对这三个因素进行了爬坡实验,结果表明随着葡萄糖、酵母粉、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  用量的逐渐增加,菌种的 OD 值由 0.774 增至 0.815,随后又逐步降低至 0.705。通过比较可知,葡萄糖、酵母粉和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  的最适浓度为第二组。葡萄糖、酵母粉和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  的理想浓度分别约为 16,4.25 和 11.6 g/L。

表 2 CCD 响应面实验

Tab. 2 The results of response surface test

序号	葡萄糖	酵母粉	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	1.215	0	0
10	-1.215	0	0
11	0	1.215	0
12	0	-1.215	0
13	0	0	1.215
14	0	0	-1.215
15	0	0	0

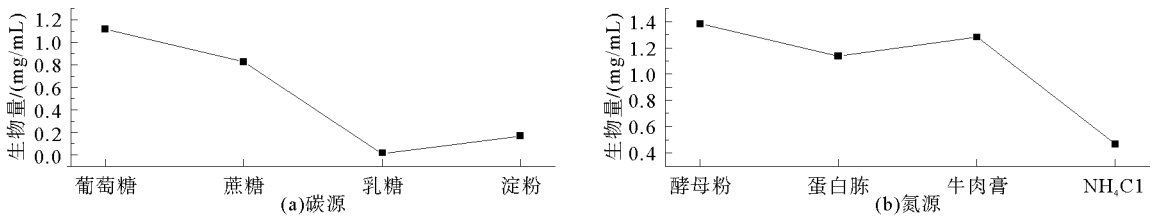


图 1 氮源与碳源对脱硫菌生物量的影响

Fig. 1 Effect of nitrogen sources and carbon sources on the desulfurization bacteria biomass

### 2.3 中心组合实验

由 CCD 实验可拟合得到多元回归模型  $Y = 2.202 - 0.233n(A) - 0.034n(B) + 0.089n(C) + 0.018n(A) \times n(B) - 0.003n(A) \times n(C) - 0.001n(B) \times n(C) + 0.006n^2(A) - 0.026n^2(B) - 0.002n^2(C)$ 。

其方差分析见表 4。由表 4 可以看出回归模型的  $P$  值小于等于 5%, 回归方程差异显著。其中磷酸氢二钠对菌体生长有影响。葡萄糖与酵母粉之间,葡萄糖与磷酸氢二钠之间存在显著地交互作用。

表 3 各种因素的影响水平表

Tab. 3 The impact of various factors

影响因素	低水平/ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	高水平/ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$t$ 值	$P$ 值/%
葡萄糖	4.00	10.00	2.35	10
酵母粉	1.25	2.75	2.35	8
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.00	5.00	1.94	47
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.00	8.00	2.35	8
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.10	0.40	1.94	47
$\text{VB}_1$	0.00	0.01	1.94	48

由图 2 可以得出,当酵母粉和葡萄糖浓度较低时,菌体生长较快。但是当培养基中葡萄糖和酵母粉浓度均比较高时,脱硫菌的菌浓度最大。由图 3 可知,当培养基中葡萄糖浓度较高和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  浓度较低时,脱硫菌的菌浓度最大。因此培养基应选择较高的葡萄糖浓度和较低的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  浓度。综上可以得出菌株 534-16 培养基的三个关键成分最优配比为:碳源为 21.00 g/L 的葡萄糖,氮源为 5.25 g/L 的酵母粉,无机盐为 6.60 g/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。经过对多元回归模型的验证得到最优配比下的生物量为 1.09 mg/mL。

表 4 回归模型的方差分析表

Fig. 4 Regression model analysis of variance

成分	偏差平方和/ $10^{-2}$	自由度	方差/ $10^{-2}$	F 值	P 值/%
Model	28.97	9	3.22	4.74	5.00
A	1.00	1	1.00	1.47	27.99
B	0.96	1	0.96	1.41	28.86
C	3.55	1	3.55	5.24	7.08
AB	6.62	1	6.62	9.76	2.61
AC	6.05	1	6.05	8.92	3.06
BC	0.01	1	0.01	0.02	89.93
$A^2$	9.60	1	9.60	14.14	1.31
$B^2$	0.29	1	0.29	0.43	54.30
$C^2$	0.88	1	0.88	1.30	30.65
Residual	3.39	5	0.68		
Col Total	32.36	14			

注:A-葡萄糖,B-酵母粉,C- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

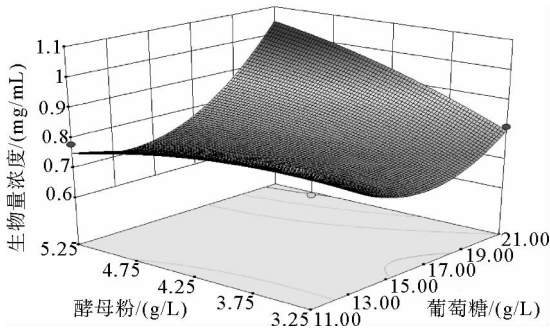


图 2 葡萄糖和酵母粉浓度对生物量影响的响应面图  
Fig. 2 Response surface of the impact of glucose and yeast powder concentration on biomass

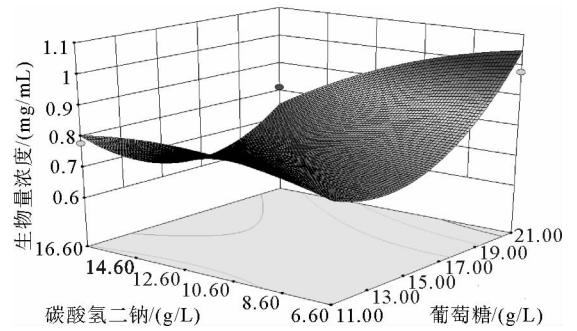


图 3 葡萄糖和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  浓度对生物量影响的响应面图  
Fig. 3 Response surface of the impact of glucose and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  concentration on biomass

## 2.4 培养基 pH 值和温度

采用优选法中的抛物线法来确定培养脱硫菌最适的温度。以温度和 pH 值为横坐标,吸光值为纵坐标绘制成图 4。经计算得该抛物线的最高点在温度为 53.39 °C 时,即培养基最佳使用温度是 53.39 °C。由图 4 还可以看出,培养基的 pH 值对菌株 534-16 生长影响不大,以中性条件下最有利于菌株生长。

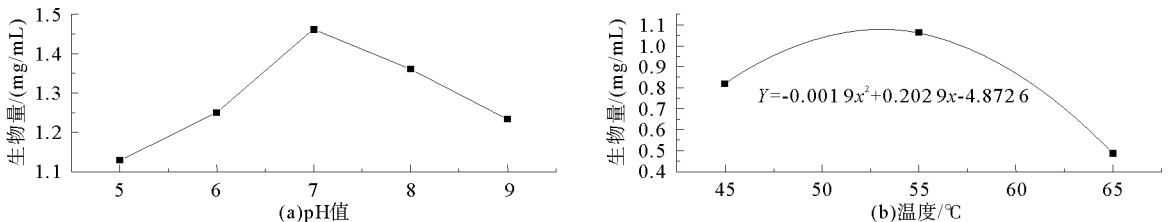


图 4 温度和 pH 值对脱硫菌生物量的影响

Fig. 4 Effect of temperature and pH value on the desulfurization bacteria biomass

### 3 结论

地衣芽孢杆菌属菌株 534-16 的最适氮源为酵母粉,最适碳源为葡萄糖。通过单因素和响应面优化实验等方法对菌株 534-16 的培养基和培养条件进行研究,发现最优培养方案应为:碳源为 21.00 g/L 的葡萄糖,氮源为 5.25 g/L 的酵母粉,无机盐为 6.60 g/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。采用优选法中的抛物线法来确定培养基对此菌株的最佳使用温度是 53.39 °C,培养基的 pH 值对菌株 534-16 生长影响不大,以中性条件下最有利于菌株生长。

#### 参考文献:

- [1] Agarwal P, Sharma D K. Comparative studies on the bio-desulfurization of crude oil with other desulfurization techniques and deep desulfurization through integrated processes[J]. *Energy & Fuels*, 2010, 24(1): 518-524.
- [2] Wei Z S, Ning X N. Development and application of the bio-desulfurization technology[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 518-523: 178-182.
- [3] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 中国农业出版社, 1995: 257-274.
- [4] 宋静. 二苯并噻吩脱硫菌的筛选及其代谢途径研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011: 29-43.
- [5] Ambati P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 17: 331-335.
- [6] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan[J]. *Bioprocess Engineering*, 2000, 23: 451-455.
- [7] 杨其义, 赵祥颖, 刘建军. 响应面法优化木糖醇发酵培养基[J]. *山东轻工业学院学报*, 2013, 27(2): 34-38.  
Yang Qiyi, Zhao Xiangying, Liu Jianjun. Statistical optimization of fermentation medium for xylitol production by response surface methodology[J]. *Journal of Shandong Polytechnic University*, 2013, 27(2): 34-38.
- [8] 李孱, 白景华, 蔡昭铃, 等. 细菌素发酵培养基的优化及动力学初步分析[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 177-192.  
Li Chan, Bai Jinghua, Cai Zhaoling, et al. Culture medium optimization and primary kinetics analysis for Nisin production [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2): 177-192.
- [9] 何美儒, 金志华, 胡升, 等. 响应面法优化达托霉素发酵培养基[J]. *化工进展*, 2012, 31(4): 873-877.  
He Meiru, Jin Zhihua, Hu Sheng, et al. Optimization of fermentation medium of daptomycin by response surface methodology [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2012, 31(4): 873-877.
- [10] 赵培城, 倪佳蕾, 毛红鸾, 等. 响应面法优化创伤弧菌增菌培养基[J]. *食品工业*, 2012, 33(12): 46-49.  
Zhao Peicheng, Ni Jialei, Mao Hongqian, et al. Optimization of vibrio vulnificus enrichment medium by response surface analysis[J]. *Food Industry*, 2012, 33(12): 46-49.
- [11] Boniek D, Figueiredo D, Pylro V S, et al. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica[J]. *Extremophiles*, 2010, 14(5): 475-481
- [12] 王伟志. 加氢脱硫过程中 DBT 和 4,6-DMDBT 动力学参数模拟[D]. 天津: 天津大学, 2007: 1-3.
- [13] 曾玺. 双载体固定化脱硫菌及脱硫性能的研究[D]. 天津: 天津大学, 2008: 16-21.
- [14] 汪彬彬, 车振明. Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究[J]. *食品科技*, 2011(5): 41-45.  
Wang Binbin, Che Zhenming. Optimization of rhizopus fermentation medium for glucoamylase production by Plackett-Burman and Box-Behnken design[J]. *Foods Science and Technology*, 2011(5): 41-45.

(责任编辑: 吕海亮)