

文章编号:1673-1689(2009)01-0122-05

纳豆芽孢杆菌的固态发酵条件

帅明, 黄占旺*, 牛丽亚

(江西农业大学 食品科学与工程学院, 江西南昌 330045)

摘要: 为了优化纳豆芽孢杆菌固态发酵条件, 以活菌数和芽孢数为指标, 采用微生物发酵技术, 研究了种龄、接种量、培养基初始 pH 值和含水量对固态发酵的影响, 并通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定了纳豆芽孢杆菌固态发酵最佳条件。试验结果表明: 接种体积分数 7%、种龄 17 h、培养基初始 pH 值 8.0、培养基初始水分质量分数 70%, 37 °C 固态发酵 5 d 效果最好, 活菌数和芽孢数分别达到 3.4×10^{10} cfu/g 和 1.8×10^9 cfu/g。

关键词: 纳豆芽孢杆菌; 固态发酵; 发酵条件

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Study on Solid Fermentation Conditions of *Bacillus natto*

SHUAI Ming, HUANG Zhan-wang*, NIU Li-ya

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to optimize solid fermentation conditions of *Bacillus natto*, the effect of seed age, inoculum size, initial pH value and moisture of culture medium, solid fermentation time and temperature on solid fermentation were carefully studied. The most optimum solid fermentation conditions of *Bacillus natto* were obtained by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment and shown as follows: seed age 17 h, inoculum size 7%, initial pH value 8.0, initial moisture 70%, solid fermentation temperature 37 °C and solid fermentation time 5 d. By the optimum conditions the total bacterium and total spores achieved at 3.4×10^{10} cfu/g, 1.8×10^9 cfu/g respectively.

Key words: *Bacillus natto*; solid fermentation; conditions

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)是从日本的发酵食品纳豆中发现并分离出来的, 属细菌科、芽孢杆菌属, 其原始菌株与枯草芽孢杆菌相同, 是枯草芽孢杆菌的一个亚种^[1]。纳豆芽孢杆菌耐酸、耐碱、耐高温, 能够抵抗胆汁的作用, 因此能够进入机体肠道定植和生长繁殖。纳豆芽孢杆菌能够促进双歧杆菌、乳酸杆菌和梭菌等厌氧菌的生长, 又能

有效抑制肠道中肠杆菌和肠球菌等需氧菌的生长, 促进宿主肠道正常菌群生长, 保持机体内环境平衡; 另一方面, 纳豆芽孢杆菌能使肠道酸化进而有利于铁、钙及维生素 D 等的吸收, 能明显提高蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性; 它的代谢物具有降血压、抗肿瘤、抗氧化性、溶血栓及预防骨质疏松等作用^[2-3]。人们早就认识到纳豆芽孢杆菌的巨大价

收稿日期: 2007-12-20

基金项目: 江西省教育厅基金项目(2007-160)。

* 通讯作者: 黄占旺(1964-), 男, 江西南昌人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品微生物与发酵方向的研究。

Email: huangzw@163.com.

值,并把它广泛应用于食品、医疗、养殖等行业。目前,纳豆芽孢杆菌及其代谢物主要通过液态深层发酵分离、纯化而得,投资大、成本高、技术要求高、产生废液多、污染严重^[4]。而固态发酵避免了液态发酵的上述不足,又适宜工业化生产,日益受到人们的重视,但国内关于纳豆芽孢杆菌固态发酵的文献报道还比较少见。作者对纳豆芽孢杆菌固态发酵条件进行了研究,为工业生产提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发酵培养基 玉米粉与麦麸质量比为 3:7、葡萄糖 2 g/dL、硝酸铵 0.5 g/dL、水分质量分数 60%。

1.1.2 菌种来源 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) B₁ 为江西农业大学食品微生物实验室分离保存。

1.1.3 菌种培养基 牛肉膏蛋白胨固体培养基,牛肉膏蛋白胨液体培养基^[5]。

1.2 仪器与设备

754 型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司制造;SPX-150B 生化培养箱:上海跃进医疗器械厂制造;HZQ-F160 型全温振荡培养箱:哈尔滨东联电子技术公司制造;101A-4B 电热鼓风干燥箱:上海实验仪器总厂制造;LDZX-40B 自动立式电热压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂制造;HH-2 型数显恒温水浴锅:国华电器有限公司制造。

1.3 方法

1.3.1 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定 挑取 2 或 3 环斜面菌种接种于液体培养基,于 37 ℃、120 r/min 恒温振荡培养,3 h 测定一次 $\Delta A_{660\text{ nm}}$,然后以时间(h)为横坐标、 $\Delta A_{660\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.2 单因素试验 以活菌数和芽孢数为指标,研究了种龄、接种量、培养基初始 pH 值和含水量、固态发酵温度和时间等因素对固态发酵的影响。

1.3.3 正交试验 根据单因素试验结果,选择种龄、接种量、培养基初始 pH 值和含水量 4 个因素中的合适水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,见表 1。测定 37 ℃、固态发酵 5 d 后的活菌数和芽孢数,以此来确定固态发酵最佳条件。作者数据统计均采用 DPS v6.55 软件,多重比较采用 Duncan 新复极差法。

1.3.4 干燥条件对活菌数、芽孢数的影响

以活菌数和芽孢数为指标,研究了干燥方式和干燥温度对活菌数和芽孢数的影响。

表 1 正交试验因素、水平表

Tab. 1 Factors and its levels of orthogonal

水平	A (pH 值)	B (种龄/h)	C (接种体积 分数/%)	D (水分质量 分数/%)
1	7.0	13	3	60
2	7.5	15	5	70
3	8.0	17	7	80

1.3.5 活菌数的测定 稀释平板法^[6]。

1.3.6 芽孢数的测定 样品于 85 ℃处理 15 min,然后稀释平板计数^[6]。

2 结果与分析

2.1 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定

由图 1 可知,0~6 h 为延滞期,在这段时间,菌体很快分散并适应新的环境,总菌数几乎没有变化;6~15 h 为菌体的指数生长期,菌体在这段时间以指数的形式大量增殖,指数期末期活菌数达到最大;15~24 h 为稳定期,菌体在这段时间内增长和衰亡都比较慢;24 h 以后菌体衰亡较快,进入衰亡期;菌体的细胞浓度在约 18 h 时达到最大。因此,试验所用种子液的种龄约为 18 h。

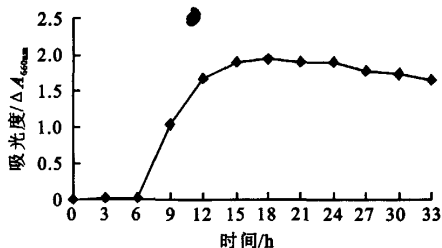


图 1 纳豆芽孢杆菌生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus natto*

2.2 单因素试验

2.2.1 接种量对固态发酵的影响 保持固态发酵其他条件不变,在固体发酵培养基中分别接入 5%、10%、15%、20% 种子液,测定固态发酵后的活菌数、芽孢数,见表 2。

在发酵工业中,为了尽可能缩短发酵周期,增大接种量是经常采取的行之有效的方法之一,但接种量只有在一定范围内变化才具有上述功能。由表 2 可知,在相同的发酵周期和 5%~20% 接种量范围内,随着接种量的增大,活菌数、芽孢数逐渐减少,这说明接种量大于 5% 反而不利于纳豆芽孢杆菌的固态生长和发酵。因此,固态发酵最佳接种量为 5%。

表 2 接种量对固态发酵的影响

Tab. 2 Effect of inoculum size on solid fermentation

接种量/%	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
5	2.5	2.60
10	1.45	1.85
15	1.15	1.75
20	0.25	0.40

2.2.2 种龄对固态发酵的影响 保持固态发酵其他条件不变,在固体发酵培养基中分别接入种龄为 9、12、15、18 h 的种子液,测定固态发酵后的活菌数、芽孢数,见表 3。

由表 3 可知,随着种龄的增大,活菌数、芽孢数呈先增加后减少的变化趋势,种龄为 15 h 时达到峰值。这是由种子液中菌体的数量和活力不同造成的。种龄为 9、12、15 h 时,菌体分别处于指数生长的早期、中期和晚期,菌体活力比较强,菌体数量依次增多却没有达到峰值;种龄为 18 h 时,菌体细胞浓度达到最大,而活力不及指数期的菌体活力,从而使活菌数、芽孢数呈上述变化趋势。

表 3 种龄对固态发酵的影响

Tab. 3 Effect of seed age on solid fermentation

种龄/ h	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
9	1.23	0.84
12	1.87	1.35
15	2.76	2.05
18	1.76	1.12

2.2.3 培养基 pH 值对固态发酵的影响 保持固态发酵其他条件不变,将固态发酵培养基初始 pH 值分别调为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,测定固态发酵后的活菌数、芽孢数,见表 4。

表 4 pH 值对固态发酵的影响

Tab. 4 Effect of pH on solid fermentation

pH 值	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
5.0	1.4	9.7
6.0	4.6	10.9
7.0	6.8	12.0
8.0	7.6	15.0
9.0	3.5	3.0

纳豆芽孢杆菌发酵过程中的大多数反应是酶

促反应,pH 值随代谢产物以及培养基成分的变化而变化,故需要摸索适宜的初始 pH 值^[7]。由表 4 可知,随着培养基 pH 值的升高,活菌数、芽孢数呈先增加后减少的变化趋势,在 pH 8.0 的时候达到峰值。因此,固态发酵培养基的最佳初始 pH 值为 8.0。

2.2.4 培养基水分质量分数对固态发酵的影响

保持固态发酵其他条件不变,在固态发酵培养基中分别加入 40%、50%、60% 和 70% 的水,测定固态发酵后的活菌数、芽孢数,见表 5。

表 5 水分质量分数对固态发酵的影响

Tab. 5 Effect of the amount of water on solid fermentation

水分 质量分数/%	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
40	0.80	5.04
50	1.10	5.94
60	1.38	6.90
70	0.88	5.37

由表 5 可知,随着培养基含水量的增加,活菌数、芽孢数呈先增加后减少的变化趋势,在培养基水分质量分数达到 60% 的时候达到最大。可能是由于培养基的水分质量分数小于 60% 的时候,培养基的水分不充足,限制了微生物生长繁殖;当培养基的水分质量分数大于 60% 的时候,培养基的透气性能减弱,微生物得不到充足的氧气供应,生长繁殖也受到限制。故固态发酵培养基最佳初始水分质量分数为 60%。

2.2.5 发酵时间对固态发酵的影响 保持固态发酵其他条件不变,分别测定固态发酵 3、4、5、6 d 后的活菌数和芽孢数,结果见表 6。

表 6 发酵时间对固态发酵的影响

Tab. 6 Effect of fermentation time on solid fermentation

发酵 时间/d	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
3	2.0	1.4
4	3.3	1.8
5	4.6	2.8
6	2.2	1.2

活菌数和芽孢数多少是衡量益生菌制剂质量优劣的重要指标,在固态发酵中,发酵时间对固态发酵后活菌数和芽孢数有相当大的影响。发酵时间过短,细菌菌体和芽孢没有充分形成,活菌数和芽孢数比较少;发酵时间过长,不仅菌体活力会降低,而且菌体还会自溶死亡,使活菌数和芽孢数减

少。由表 6 可知,固态发酵 5 d 时,活菌数和芽孢数均达到峰值,故固态发酵的最佳时间为 5 d。

2.2.6 发酵温度对固态发酵的影响 保持固态发酵其他条件不变,分别测定 30、37、40、45 ℃下固态发酵后的活菌数和芽孢数,结果见表 7。

表 7 发酵温度对固态发酵的影响

Tab.7 Effect of temperature on solid fermentation

发酵 温度/℃	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
30	1.8	8
37	3.4	20
40	2.2	14
45	1.4	10

由表 7 可知,37 ℃为菌种适宜的生长和发酵温度,当温度低于或高于 37 ℃,菌种生长和发酵受到一定的影响,活菌数和芽孢数均有所降低。

2.3 正交试验

采用 DPS6.55 软件对正交试验结果进行分析。正交试验结果见表 8、极差分析结果见表 9、10。由极差 R 可知,对于活菌数而言,各因素的主次关系为 D>C>B>A,最佳条件组合为 A₃B₃C₃D₂;对于芽孢数而言,各因素的主次关系为 C>D>B>A,最佳条件组合为 A₃B₃C₃D₂。各因素对活菌数和芽孢数的影响次序略有不同,但二者的最佳条件组合相同,且均为 A₃B₃C₃D₂,即培养基初始 pH 值 8.0、种龄 17 h、接种体积分数 7%、培养基初始水分质量分数 70%。

表 8 正交试验结果

Tab.8 Results of orthogonal experiment

处理 号	A	B	C	D	指 标			
					活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)		
1	1	1	1	1	6.0	8.2	2.5	3.5
2	1	2	2	2	14.3	16.4	11.1	9.3
3	1	3	3	3	33.7	29.6	18.4	15.8
4	2	1	2	3	14.0	12.3	9.7	8.6
5	2	2	3	1	9.0	12.7	4.0	6.8
6	2	3	1	2	24.5	21.5	12.8	10.6
7	3	1	3	2	34.0	30.0	19.0	15.6
8	3	2	1	3	10.1	8.9	4.8	3.4
9	3	3	2	1	12.4	14.9	9.3	11.8

表 9 正交试验极差分析结果(活菌数)

Tab.9 Results of Poor analysis of the orthogonal experiment (total bacterium)

	水平	A	B	C	D
总和	1	108.2000	104.5000	79.2000	63.2000
	2	94.0000	71.4000	84.3000	140.7000
	3	110.3000	136.6000	149.0000	108.6000
均值	1	18.0333	17.4167	13.2000	10.5333
	2	15.6667	11.9000	14.0500	23.4500
	3	18.3833	22.7667	24.8333	18.1000
极差 R		2.7167	10.8667	11.6333	12.9167

表 10 正交试验极差分析结果(芽孢数)

Tab.10 Results of poor analysis of the orthogonal experiment (total spores)

	水平	A	B	C	D
总和	1	60.6000	58.9000	37.6000	37.9000
	2	52.5000	39.4000	59.8000	78.4000
	3	63.9000	78.7000	79.6000	60.7000
均值	1	10.1000	9.8167	6.2667	6.3167
	2	8.7500	6.5667	9.9667	13.0667
	3	10.6500	13.1167	13.2667	10.1167
极差 R		1.9000	6.5500	7.0000	6.7500

2.4 验证试验

由于正交试验得到的最佳条件组合 A₃B₃C₃D₂并不在表 1 的试验组合中,因此以此组合作为发酵条件进行验证试验,见表 11。

表 11 验证试验

Tab.11 Validation experiment

固态发酵 条件	活菌数/ (10 ⁹ cfu/g)	芽孢数/ (10 ⁸ cfu/g)
优化前	7.6	15
优化后	34	18

由表 11 可知,最佳条件组合的活菌数和芽孢数分别达到 3.4×10¹⁰ cfu/g、1.8×10⁹ cfu/g,显著高于固态发酵条件优化前的活菌数和芽孢数(分别为 7.6×10⁹ cfu/g、1.5×10⁹ cfu/g),也高于正交设计表中各个组合条件下的活菌数和芽孢数。

2.5 干燥条件对活菌数、芽孢数的影响

不同的干燥方法和干燥温度对活菌数和芽孢数都有一定的影响。由表 12 可知,随着干燥温度的升高,活菌数和芽孢数都随之减少,活菌数减少

幅度远大于芽孢数的减少幅度。真空干燥效果优于常压干燥,50 ℃、真空度 0.095 MPa 干燥效果最好,此时活菌数和芽孢数分别达到 1.4×10^{10} cfu/g 和 8.2×10^8 cfu/g。因此,纳豆芽孢杆菌固态发酵后适宜的干燥方法是真空干燥,真空度 0.095 MPa、干燥温度 50 ℃。

表 12 干燥条件对活菌数、芽孢数的影响

Tab. 12 Effect of the drying conditions on the total bacterium and spores

干燥 条件	干燥 温度/℃	活菌数/ (10^9 cfu/g)	芽孢数/ (10^8 cfu/g)
真空干燥	50	12.0	7.0
	60	8.5	6.0
	70	6.0	5.2
常压干燥	50	14.0	8.2
	60	10.0	7.6
	70	8.0	6.8
CK(常压不干燥)		34	18

3 结 语

通过单因素试验和正交试验确定了纳豆芽孢杆菌固态发酵最佳条件为:种龄 17 h,接种体积分数 7%,培养基初始 pH 值 8.0,水分质量分数 70%,37 ℃ 固态发酵 5 d 效果最好。此时,活菌数和芽孢数分别达到 3.4×10^{10} cfu/g、 1.8×10^9 cfu/g,显著高于固态发酵条件优化前的活菌数和芽孢数(分别为 7.6×10^9 cfu/g、 1.5×10^9 cfu/g),也高于正交设计表中各个组合条件下的活菌数和芽孢数。

各因素对活菌数和芽孢数影响主次顺序略有不同,但最佳条件组合均为 $A_3B_3C_3D_2$;最佳条件组合与单因素试验得到的最佳条件均不相同,可能与这些因素的综合效应有关。

纳豆芽孢杆菌固态发酵后适宜的干燥方法是真空干燥,真空度 0.095 MPa,干燥温度 50 ℃,此时活菌数和芽孢数分别达到 1.4×10^{10} cfu/g 和 8.2×10^8 cfu/g。

参考文献(References):

- [1] 布坎南 R E,吉布斯 N E. 伯杰氏细菌学鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [2] 鞠洪荣. 纳豆的保健性与制作方法[J]. 中国酿造,2000(6):6-8.
JU Hong-rong. Sanitarian function and production method of natto[J]. *China Brewing*, 2000(6): 6-8. (in Chinese)
- [3] 陈兵,何世山,朱凤香,等. 纳豆芽孢杆菌剂对 AA 鸡生产性能和十二指肠消化酶的影响[J]. 浙江农业学报,2003,15(5): 289-292.
CHEN Bing, HE Shi-shan, ZHU Feng-xiang, et al. Effects of *Bacillus natto* sawanura preparation on growth capability and duodenum digestive enzyme of AA broilers [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2003, 15(5): 289-292. (in Chinese)
- [4] 俞俊棠. 新编生物工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [5] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001.
- [7] 周学永,金红,杨志生,等. 苏云金芽孢杆菌发酵液后处理工艺研究进展[J]. 化学与生物工程,2006,23(1):4-6.
ZHOU Xue-yong, JIN Hong, YANG Zhi-sheng, et al. Development of the downstream treatment processes of *Bacillus thuringiensis* fermentation liquor[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2006, 23(1): 4-6.

(责任编辑:李春丽)