

以豆粕为基质纳豆芽孢杆菌生长条件优化

张 强, 王素英*

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘 要: 研究纳豆芽孢杆菌在以豆粕为基质的发酵培养基中的生长条件。利用全自动生长曲线测定仪, 以菌液浊度 OD_{660nm} 为指标, 对纳豆芽孢杆菌液体发酵培养基中的氮源(豆粕)和碳源(葡萄糖)配比进行研究, 确定豆粕质量浓度 50g/L, 葡萄糖质量浓度 10g/L 为最佳配比, 并通过单因素及正交试验筛选出影响纳豆芽孢杆菌生长的主要条件。再根据 Box-Behnken 试验优化, 结果表明, 采用功率 80W 超声波处理豆粕 4.32min, 且培养基初始 pH6.16, 发酵温度 35.5℃时纳豆芽孢杆菌在发酵生长 13h 后达到最大生物量, 此时 OD_{660nm} 为 1.635。

关键字: 纳豆芽孢杆菌; 豆粕; 正交试验; Box-Behnken 试验

Optimization of Culture Conditions for the Growth of *Bacillus subtilis natto* Utilizing Soybean Meal as Nitrogen Source

ZHANG Qiang, WANG Su-ying*

(Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science,
Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Cell suspension turbidity (optical density at 660 nm, OD_{660nm}) was measured using an automated growth curve analyzer to investigate the growth of *Bacillus subtilis natto* during incubation in a liquid culture medium composed of soybean meal as nitrogen source and glucose as carbon source. The optimal concentrations of soybean meal and glucose were found to be 50 g/L and 10 g/L, respectively. Using one-factor-at-a-time combined with orthogonal array design method, temperature, pH and time were identify as major factors that influence the growth of *Bacillus subtilis natto*. Further, Box-Behnken experimental design was used to optimize the main influencing factors. *Bacillus subtilis natto* achieved the highest biomass after 13 h of incubation at initial pH 6.16 and 35.5 °C in the presence of soybean meal treated by ultrasonic for 4.32 min, and the cell suspension turbidity was 1.635 under these conditions.

Key words: *Bacillus subtilis natto*; soybean meal; orthogonal array design; Box-Behnken experimental design

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0199-04

纳豆芽孢杆菌是一种从日本纳豆中分离出来的益生菌, 是枯草芽孢杆菌的一个亚种^[1]。研究显示, 大豆蛋白水解物具有 ACE 抑制活性^[2], 而豆粕中富含大量优质蛋白。利用纳豆芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽, 主要是依靠菌种自身的复合酶系去水解蛋白^[3-6]。然而菌种的生理代谢产物必定与其生长状况息息相关。为提高纳豆芽孢杆菌液体发酵生物量, 本研究通过正交试验和 Box-Behnken 优化试验确定培养基的碳氮源最佳配比、培养基预处理和液体发酵的最优条件, 旨在提高纳豆芽孢杆菌水解豆粕生成 ACE 抑制肽的产量。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*), 由本实验室分离保存。

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 5、蛋白胨 10、氯化钠 5、葡萄糖 20、琼脂粉 15, pH7, 水 1L; 种子培养基: 配方同斜面培养基, 但不加琼脂粉^[7]。发酵培养基(g/L): 豆粕 50、葡萄糖 10、 Na_2HPO_4 1、 NaH_2PO_4 1、 $CaCl_2$ 0.2、 $MgSO_4$ 1, 水 1L, pH7。

1.2 材料与仪器

豆粕(蛋白含量为 48.74% 的脱脂豆粕) 黑龙江广源粮油加工有限公司。

Bioscreen C 全自动生长曲线测定仪 芬兰 Bioscreen 公司; ZD-88 控温摇床培养箱 常州菲普仪器设备厂; YXQ-LS-30SII 全自动数显高压灭菌锅 西安常仪仪器设

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目(09ZCKFNC00800)

作者简介: 张强(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与开发应用。E-mail: zq13920769130@163.com

* 通信作者: 王素英(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物资源与开发应用。E-mail: wsying@tjcu.edu.cn

备有限公司; AUW220D 电子分析天平 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 种子液的制备

将斜面活化菌种制成浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液, 并按体积分数 2% 接种量接种 50 mL 于 250 mL 三角瓶中, 37°C 、160 r/min 培养, 每 2 h 测 1 次菌液浊度($\text{OD}_{660\text{nm}}$)绘制生长曲线, 对数生长期末 18 h 培养物作为种子液进行发酵培养基优化^[8-9]。

1.3.2 发酵培养基成分的优化

以豆粕作为氮源, 设其质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60 g/L, 以葡萄糖作为碳源, 设其质量浓度分别为 10、20、30 g/L, 将不同质量浓度的氮源和碳源组合配成不同碳氮比(C/N 比)的培养基, 将培养基的初始 pH 值调节为 7, 于 115°C 灭菌 20 min 后, 取发酵培养基 300 μL , 种子发酵液 40 μL 点到 Bioscreen C 测定板上。设定 37°C , 振荡幅度 Middle, 自动测定 36 h, 以纳豆芽孢杆菌菌液浊度为指标确定最佳配比^[10-13]。

1.3.3 单因素和正交试验设计

单因素试验: 利用 Bioscreen C 自动生长曲线测定仪, 在同一多孔培养板上点样, 设定温度 30°C , 振荡强度为 Middle, 自动测定 24 h, 以纳豆芽孢杆菌 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值为指标, 考察培养基初始 pH 值、超声功率^[14]、超声时间、温度对纳豆芽孢杆菌生长的影响。

正交试验: 为了反映各因素对纳豆芽孢杆菌生长的综合影响, 在单因素试验基础上, 以纳豆芽孢杆菌 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值为指标, 进行正交试验优化, 因素及水平设计见表 1。

表 1 纳豆芽孢杆菌生长条件的正交试验因素水平设计表

Table 1 Factors and levels for orthogonal array design

水平	因素			
	A 超声功率/W	B 处理时间/min	C 超声温度/ $^\circ\text{C}$	D 初始 pH
1	70	3	35	6
2	80	5	36	6.5
3	90	7	37	7

1.3.4 Box-Behnken 试验设计

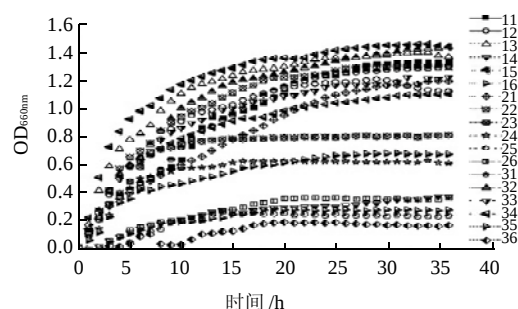
在正交试验结果基础上, 选择显著因素, 通过 Box-Behnken 试验设计进一步优化, 以确定纳豆芽孢杆菌液体发酵数学模型和最优生长条件^[15]。

1.3.5 数据处理

采用 Excel 和 Minitab 统计软件进行数据处理与分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。利用 Origin8 软件绘制数据图形。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基最佳碳氮比的确定



11 表示 C/N 比例为 1:1, 即葡萄糖 10 g/L, 豆粕 50 g/L; 12 表示 C/N 比例为 1:2, 即葡萄糖 10 g/L, 豆粕 20 g/L; 依此类推。

图 1 不同碳氮比对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig.1 Effects of ratio of carbon and nitrogen source on the growth of *Bacillus subtilis natto*

以 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值为指标, 结果表明在葡萄糖质量浓度 10 g/L, 豆粕质量浓度 50 g/L 的发酵培养基中, 纳豆芽孢杆菌的生长状况最佳, $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值最大可达到 1.4。在其他条件中, 低质量浓度的葡萄糖和低质量浓度豆粕组合配制的培养基中纳豆菌的生长状况较好, 且基本规律是葡萄糖质量浓度稍高时, 豆粕质量浓度要相应降低, 也就是说当碳源和氮源质量浓度同时过高时, 不利于纳豆菌的生长。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 初始 pH 值的影响

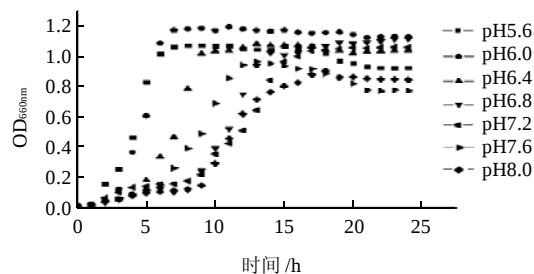


图 2 不同培养基初始 pH 值对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig.2 Effects of initial pH value on the growth of *Bacillus subtilis natto*

在超声时间 10 min, 功率 50 W, 温度 30°C 的条件下, 考察不同 pH 值对纳豆芽孢杆菌生长的影响, 结果如图 2 所示。从生长曲线看, 培养基初始 pH 值为 6 时, 纳豆芽孢杆菌的生长最好, 几乎不存在延滞期, 且对数生长期很短, 接种 10 h 后菌悬液 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值达到最大值 1.2。

2.2.2 超声波功率的影响

在初始 pH 6, 温度 30°C 的条件下, 采用 30、40、50、60、70、80、90、100 W 超声波功率对豆粕培养基进行破碎预处理, 处理时间定为 10 min, 工作 1 s 间隔 1 s, 之后进行纳豆芽孢杆菌的发酵培养, 以观察超声波功率对纳豆芽孢杆菌生长的影响, 结果见图 3。

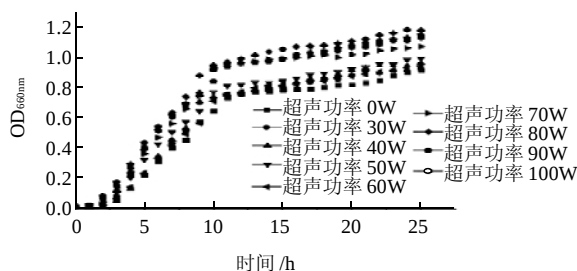


图3 超声功率对纳豆芽孢杆菌生长的影响
Fig.3 Effects of ultrasonic power on the growth of *Bacillus subtilis natto*

从图3可以看出,不同功率超声波处理豆粕培养基,均能促进纳豆芽孢杆菌的生长,并且随着功率的增加,纳豆芽孢杆菌的生长状况变好,功率达到80W时,菌悬液的OD_{660nm}值最大,达到1.2,之后缓慢下降。可能是超声波处理导致豆粕蛋白结构变得松散,有利于纳豆芽孢杆菌利用。

2.2.3 超声波预处理时间的影响

对初始pH6的豆粕培养基进行超声波预处理,超声波预处理功率80W,将处理时间设置为3、5、7、10、15min,处理方式为工作1s间隔1s,之后在30℃条件下进行发酵培养,结果见图4。

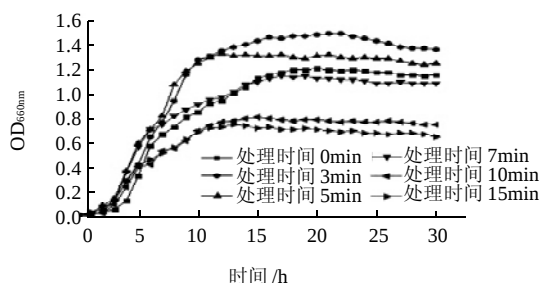


图4 预处理时间对纳豆芽孢杆菌生长的影响
Fig.4 Effects of ultrasonic treatment time on the growth of *Bacillus subtilis natto*

由图4可知,与未进行预处理的豆粕培养基相比,3min和5min的短时间预处理,有利于纳豆芽孢杆菌的生长,处理7min时与未经处理的生长状况相当,10min和15min的长时间处理则不利于菌的生长,这可能由于短时间处理使得豆粕蛋白变性水解,促进纳豆芽孢杆菌的利用,而超声波处理时间过长,培养基产生大量气泡,对纳豆菌的生长有一定不利影响。

2.2.4 超声温度的影响

利用功率80W的超声装置对初始pH6的豆粕培养基进行超声处理3min,之后在Bioscreen C上进行纳豆芽

孢杆菌最佳生长温度的选择。由图5可知,即使是很小幅度的温度变化,也会对纳豆芽孢杆菌的液体发酵生长造成较大的影响。在35℃时,该菌生长状况最佳,其最大OD_{660nm}值是33℃时的1.4倍。在许多研究中认为纳豆芽孢杆菌最佳生长温度为37℃^[16-17],这一差异可能和Bioscreen C运行时的实际温度比设定温度略高有关。

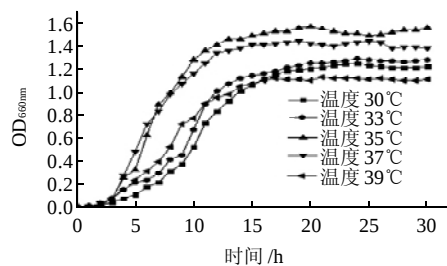


图5 温度对纳豆芽孢杆菌生长的影响
Fig.5 Effects of incubation temperature on the growth of *Bacillus subtilis natto*

2.3 正交试验优化结果

表2 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 2 Orthogonal array design and results

试验号	A	B	C	D	OD _{660nm}
1	1	1	1	1	1.56
2	1	2	2	2	1.42
3	1	3	3	3	0.83
4	2	1	2	3	0.95
5	2	2	3	1	1.39
6	2	3	1	2	1.34
7	3	1	3	2	1.05
8	3	2	1	3	1.13
9	3	3	2	1	1.46
k ₁	1.270	1.187	1.343	1.470	
k ₂	1.227	1.313	1.277	1.270	
k ₃	1.213	1.210	1.090	0.970	
R	0.057	0.126	0.253	0.500	

从表2可以看出,各因素对纳豆芽孢杆菌生长的影响顺序依次为D>C>B>A,即pH值>温度>处理时间>功率,其中pH值、温度、预处理时间对纳豆芽孢杆菌生长的影响作用较预处理功率要大。从直观分析得出,纳豆芽孢杆菌在A₁B₂C₁D₁条件下生长状况最佳,经3次验证实验,该条件下平均OD_{660nm}值为1.59。即最佳工艺条件为预处理功率为70W、处理时间5min、温度35℃、pH值为6.0。

2.4 Box-Behnken 试验确定纳豆芽孢杆菌生长的最佳条件

为了进一步优化纳豆芽孢杆菌的生长条件,根据正交试验结果,选择影响较大的因素进行Box-Behnken试验设计(表3),预处理功率设定为80W,利用Bioscreen C设定每0.5h自动测定1次OD_{660nm}值,取最大值进行比较,结果见表4。

表3 Box-Behnken 试验设计因素和水平表

Table 3 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

因素	编码及水平		
	-1	0	+1
X_1 温度	35	35.5	36
X_2 pH	5.5	6	6.5
X_3 处理时间	3	4	5

表4 Box-Behnken 试验优化结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y OD _{660nm}
1	-1	-1	0	1.18
2	0	0	0	1.63
3	0	+1	+1	1.56
4	0	0	0	1.63
5	+1	-1	0	1.24
6	0	-1	+1	1.30
7	-1	0	-1	1.43
8	-1	0	+1	1.51
9	0	0	0	1.64
10	0	+1	-1	1.50
11	-1	+1	0	1.45
12	0	-1	-1	1.23
13	+1	0	+1	1.49
14	+1	0	-1	1.47
15	+1	+1	0	1.44

表5 方差分析表

Table 5 ANOVA for the results from Box-Behnken experimental design

方差来源	自由度	连续平方和	校正平方和	均方和	均方比	P
回归	9	0.308592	0.308592	0.034288	231.15	0.000
线性	3	0.132225	0.132225	0.044075	297.13	0.000
平方	3	0.174217	0.174217	0.058072	391.50	0.000
交互作用	3	0.002150	0.002150	0.000717	4.83	0.061
残差误差	5	0.000742	0.000742	0.000148		
失拟	3	0.000675	0.000675	0.000225	6.75	0.132
纯误差	2	0.000067	0.000067	0.000033		
合计	14	0.309333				

由表3、4可见, Box-Behnken 试验结果得到回归方程: $Y = 1.6333 + 0.0088X_1 + 0.125X_2 + 0.0288X_3 - 0.1142X_1^2 - 0.1917X_2^2 - 0.0442X_3^2 - 0.175X_1X_2 - 0.015X_1X_3 - 0.0025X_2X_3$ 。由表5可见, 回归极其显著($P < 0.0001$), 失拟并不显著($P = 0.132$), 回归方程的确定系数 $R^2 = 0.9976$, 表明该模型与实际情况非常拟合。理论上当发酵温度为 35.50°C , pH6.16, 预处理时间4.32min时, OD_{660nm} 达到最大值1.658。经过3次验证实验, 取其平均值为1.635, 与预测结果基本吻合。

3 结 论

3.1 以菌悬液 OD_{660nm} 值为指标, 优化了纳豆芽孢杆菌

发酵培养基的碳氮比, 即在基础无机盐成分中, 葡萄糖质量浓度10g/L, 豆粕质量浓度50g/L, 即C/N比例为1:5时, 菌悬液浓度达到最大。

3.2 采用单因素和正交试验, Box-Behnken 试验优化, 以菌悬液 OD_{660nm} 值为指标, 对豆粕超声波预处理功率和时间, 培养基初始 pH 值及培养温度进行了优化, 结果表明当利用功率80W的超声波预处理豆粕培养基4.32min, 发酵培养条件为 pH6.16, 温度 35.5°C 时, 纳豆芽孢杆菌生长情况最好, 菌悬液 OD_{660nm} 值达到1.635, 比对照组(1.210)提高了35.12%。这与超声预处理破碎豆粕细胞, 使得细胞内营养成分充分溶出益于纳豆菌利用有一定关系。此工艺优化对工业化扩大生产有指导意义。

参考文献:

- [1] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 712-735.
- [2] CHIANG W D, TSOU M J, TSAI Z Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor[J]. Food Chem, 2006, 98(4): 725-732.
- [3] 叶倩. 发酵豆粕深度酶解生产低分子大豆多肽[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [4] MEISEL H, BOCKELMANN W. Bioactive peptides from milk proteins: proteolytic activation and the functional properties[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76: 207-213.
- [5] ANTONIOS T F, MACGREGOR G A. Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension: potential problems[J]. J Hypertens, 1995, 13 (Suppl 3): 11-16.
- [6] RAI A J J, Jr, BARONE J A, BYERLY W G, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a comparative review[J]. DICP, 1990, 24 (5): 506-525.
- [7] 薄金岭. 纳豆激酶高产菌株的筛选及发酵条件的优化[J]. 大豆通报, 2004(2): 22-23.
- [8] 王成涛, 籍保平, 张丽萍. 纳豆激酶高活性菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 71-74.
- [9] 孙梅, 匡群. 培养条件对纳豆芽孢杆菌形成的影响[J]. 饲料工业, 2006, 27(8): 19-24.
- [10] WU Y F, BAEK H H, GERARD P D, et al. Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP)[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(7): 1220-1227.
- [11] 张丽萍, 满丽莉, 马中苏. 纳豆菌高产培养基的成分优化[J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 33-37.
- [12] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2007, 23(10): 22-25.
- [13] 石彦国, 胡春林. 大豆蛋白酶解前预处理方法比较研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 110-113.
- [14] 钱方, 邓岩, 周晶, 等. 预处理对大豆蛋白酶解的影响[J]. 饮料工业, 1999, 2(6): 33-35.
- [15] BRASIL J L, EV R R, MILCHAREK C D, et al. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes[J]. J Hazard Mater, 2006, 133(1/3): 143-153.
- [16] 明飞平, 赵培静. 纳豆芽孢杆菌液体发酵条件的优化研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(6): 625-629.
- [17] 满丽莉, 向殿军. 纳豆菌培养条件的初步研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2008(8): 51-54; 84.