

文章编号: 1004-7271(2001)04-0323-05

纳豆芽孢杆菌 SFU-18 液体 深层发酵培养基的优化

陈丽花, 陈有容, 齐凤兰, 李柏林

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要:采用 BPY 培养基, 在最佳培养条件: 温度为 37℃、初始 pH 为 7.0、溶氧量为 40ml/250mL、230r/min 接种量为 4% 下, 测定了纳豆芽孢杆菌菌株 SFU-18 的生长曲线, 从而确定了纳豆芽孢杆菌的最佳接种种龄以及收获时间。然后, 在种子培养液其他成分保持不变的情况下, 分别改变氮源、碳源、无机盐、生长因子进行单因素实验(以原种子液为对照), 采用 L(9)3⁴ 正交表设计实验进行培养基的优化, 确定了纳豆芽孢杆菌液体深层发酵的最佳培养基配比为: 玉米淀粉 1%、豆粕粉 5%、玉米浆 1.5%、NaCl 0.2%。

关键词:纳豆芽孢杆菌; 液体深层发酵; BPY 培养基

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

Optimization of deep submerged fermentation of *Bacillus natto* SFU-18

CHEN Li-hua, CHEN You-rong, QI Feng-lan, Li Bai-lin

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The growth curve of *Bacillus natto* SFU-18 was studied when it was cultured in BPY medium under identified conditions: 37℃, initial pH 7.0, dissolved oxygen 40mL/250mL, 230r/min, inoculum 4% in order to determine the best inoculate and culture time. The nitrogen source, carbon source, inorganic salts and growth factor were changed respectively to process single factor test with BPY medium as control team. The L(9)3⁴ orthogonal chart was used to optimize the medium and the most suitable medium was identified as follows: 1% maize starch, 5% defatted soybean powder, 1.5% corn steep liquor, 0.2% sodium chloride.

Key words: *Bacillus natto*; submerged fermentation; BPY medium;

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)是在 20 世纪初期由日本学者发现并分离出来的^[1],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^[2]。经研究发现芽孢杆菌是以孢子的形式零星存在于动物肠道的微生物群落中,这类细菌在条件不利的情况下能形成芽孢,将自己保护起来,复活率高。由于纳豆芽孢杆菌具有芽孢,因而能耐酸,耐碱,耐高温(100℃)及耐挤压,在制粒过程及酸性胃环境中均能保持高度的稳定性,在肠道中不增殖,只在肠道上段迅速发育转变成具有新陈代谢作用的营养型细胞^[3]。体外试验研究表明,添加芽孢杆菌能使肠道酸化而有利于铁钙及维生素 D 等的

收稿日期: 2001-07-13

基金项目: 校长基金资助项目(SUF200005)

第一作者: 陈丽花(1971-),女,山东青岛人,本校 1999 级硕士研究生,专业方向为食品发酵工程。

吸收,促进动物生长,缩短饲养周期,同时纳豆芽孢杆菌具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性,能降解植物性饲料中某些复杂的碳水化合物,从而提高饲料的转化率并增加饲料的可利用种类^[4]。1999年7月,我国公布了12种可直接饲喂动物的饲料级微生物添加剂,其中就包括纳豆芽孢杆菌^[5]。因此,纳豆芽孢杆菌是微生态制剂的理想生产菌株。本研究旨在通过对纳豆芽孢杆菌液体深层发酵的培养条件进行选择,最终为利用该菌作为生产菌株进行液体深层发酵,生产微生态水产饲料添加剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

纳豆芽孢杆菌菌株 SFU-18(上海水产大学食品发酵工程实验室贮存菌种)。

1.2 种子培养基

BPY 培养基^[6]。

1.3 主要仪器

pH 值测试仪(PHS-25 型,上海精科雷磁仪器厂);YXQ-IP31-400 型立式消毒锅(上海江南容器厂);HYG-III 回转式恒温调速摇瓶柜(上海医药工业研究所);超净工作台;隔水式恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.4 种子液的制备

从斜面菌种上挑取 5 环菌种接种到种子培养基中,37℃、230 r/min 下培养 14h。

1.5 考察指标

活菌数(平板计数法)及经济性^[7]。

1.6 生长曲线的测定

按已测定的最佳生长条件,培养温度 37℃、初始 pH7.0、溶氧量 40mL/250mL、接种量 4% 及转速 230r/min 下采用 BPY 培养基进行培养。从 0 h 开始,每隔 2h 取出一组,直到 24h,测纳豆芽孢杆菌的活菌数。以时间为横坐标,活菌数的对数值为纵坐标作生长曲线,从而确定最佳接种种龄及最佳收获时间^[7]。

1.7 氮源的选择

在种子培养液其他成分保持不变的情况下改变氮源,分别加入酵母膏、酵母粉、牛肉膏、啤酒酵母、豆粕粉、尿素、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄ 在最佳培养条件下培养,以种子培养基(氮源为蛋白胨:牛肉膏:酵母膏 = 1:0.5:0.5)为对照组,选择最佳氮源(表 1)。

表 1 氮源种类及添加量
Tab.1 Different nitrogen source and its quantity %

1	2	3	4	5	6	7	8	9
对照组	酵母膏	酵母粉	牛肉膏	啤酒酵母	豆饼粉	尿素	NH ₄ Cl	(NH ₄) ₂ SO ₄
1:0.5:0.5	5	5	5	5	5	2	2	2

注:对照组为蛋白胨:牛肉膏:酵母膏

1.8 碳源的选择

保持种子培养液其他成分不变,改变碳源,分别加入蔗糖、乳糖、玉米淀粉、木薯淀粉、小麦淀粉、土豆淀粉,在最佳培养条件下培养,以种子培养基(碳源为葡萄糖)为对照,选择最佳碳源(表 2)。

表 2 碳源种类及添加量

Tab.2 Different carbon source and its quantity %

1	2	3	4	5	6	7
对照组	蔗糖	乳糖	玉米淀粉	木薯淀粉	小麦淀粉	土豆淀粉
0.5	0.5	0.5	2	2	2	2

注:对照组为葡萄糖

1.9 无机盐的选择

在种子培养液其他成分保持不变,改变无机盐,分别加入 K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 + K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 ,在最佳培养条件下培养,以种子液(无机盐为 NaCl)为对照,选择最佳无机盐(表 3)。

1.10 生长因子的选择

在种子培养液其他成分保持不变时,改变生长因子,分别加入玉米浆、L-谷氨酸及硫酸素,在最佳培养条件下培养,以种子液为对照,选择最佳生长因子(表 4)。

表 3 无机盐的种类及添加量

Tab.3 Different inorganic source and its quantity %

1	2	3	4
NaCl	K_2HPO_4	$NaH_2PO_4 + K_2HPO_4$	NaH_2PO_4
0.5	0.5	0.2+0.2	0.5

表 4 生长因子的种类及添加量

Tab.4 Different growth factor and its quantity %

1	2	3	4
玉米浆	硫酸素(V_{BI})	L-谷氨酸	牛肉膏(种子液)
1	0.5	0.5	0.5

1.11 培养基的优化

根据正交表 $L_9(3^4)$ 设计实验,进行培养基的优化选择实验。

2 结果与讨论

2.1 纳豆芽孢杆菌的生长曲线

纳豆芽孢杆菌采用 BPY 培养基在最佳生长条件下进行培养,结果如图 1。

由图 1 可知,在 0~4h,纳豆芽孢杆菌处于生长的延滞期;在 4~14h,是纳豆芽孢杆菌的对数生长期;在 14~20h,纳豆芽孢杆菌处于生长的稳定期;从 20h 开始,纳豆芽孢杆菌开始进入生长的衰亡期。由于在生产中通常选用处于对数生长期的菌体作为种子,此时的种子既保持有旺盛的增殖能力,又达到了高的浓度以缩短发酵周期^[8],因此,选定纳豆芽孢杆菌的最佳种龄是 14h。微生物制剂的有效成分主要是活菌,而活菌数是质量控制指标之一。纳豆芽孢杆菌在菌体生长的稳定期产生大量的芽孢,活菌数达到最大且基本保持稳定,同时培养物的生化稳定性也较好,因此最佳收获时间确定为 20h^[9]。

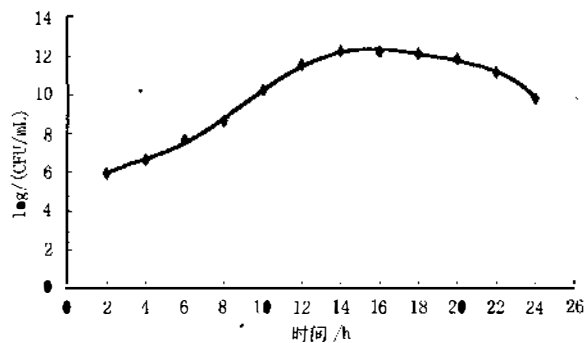


图 1 纳豆芽孢杆菌的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Bacillus natto*

2.2 氮源的选择实验

根据表 1 的设计,进行氮源选择试验,结果如图 2。

由图 2 可知,活菌数较高的 3 种氮源分别为:1(种子液:即氮源为牛肉膏、酵母膏和蛋白胨的组合)、2(酵母膏)、6(豆粕粉),其次是 4(牛肉膏)、3(酵母粉)、5(啤酒酵母),而当选用该 3 种无机氮(7、8、9)为氮源时,活菌数均较低。考虑到经济性及工业副产物的利用等问题,因此选用纳豆芽孢杆菌发酵培养基的最佳氮源为豆粕粉。

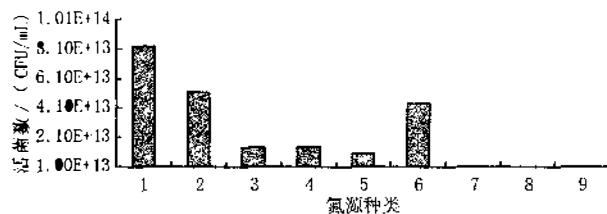


图 2 不同氮源对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig 2 Effect of different nitrogen sources on *B. natto*

2.3 碳源选择实验

根据表2的设计,进行碳源选择实验,结果如图3。

由图3可知,活菌数较高的3种碳源依次为:6(小麦淀粉)、4(玉米淀粉)、5(木薯淀粉)、7(土豆淀粉);而当选用3(乳糖)、2(蔗糖)及1(葡萄糖;即种子液)为碳源时,活菌数均较低。同时考虑到经济性问题,因此选用纳豆芽孢杆菌发酵培养基的最佳碳源为玉米淀粉。

2.4 无机盐的选择

根据表3的设计,进行无机盐选择试验,结果如图4。

由上图可知,在所选的4种等量无机盐中,当无机盐为NaCl时活菌数最高;当选择 K_2HPO_4 时活菌数较高;而当选择 NaH_2PO_4 和 K_2HPO_4 的混合物以及 NaH_2PO_4 时,活菌数均较低。因此选用NaCl作为纳豆芽孢杆菌深层液体发酵培养基的无机盐。

2.5 生长因子的选择试验

根据表4的设计,进行生长因子选择实验,结果如图5。

由上图可知,在所选用的3种生长因子中,与对照组4相比,对纳豆芽孢杆菌生长起作用最显著的是1(玉米浆;含大量的生物素),其次是2(维生素 B_1),而3(L-谷氨酸)对该菌的生长不起促进作用,由于纳豆芽孢杆菌完全不能利用L-谷氨酸^[10],因此L-谷氨酸的存在无助于纳豆芽孢杆菌的生长。所以选用玉米浆做为纳豆芽孢杆菌发酵培养基中的促生长因子,这与纳豆芽孢杆菌生长需要生物素的生理特性^[10]相吻合。

3.6 正交实验

根据正交表 $L(9)3^4$ 设计实验,结果见表5。

表中 K_1 、 K_2 、 K_3 分别表示第1,2,3列中“1”“2”“3”水平对应的试验结果之和。为了比较各因子对纳豆芽孢杆菌生长的影响大小,选出各因子中对指标最有利的水平,以各因子的不同水平为横坐标,以各因子对应的 K 的平均值为纵坐标,作因子和指标关系图(图6)。

从图中可以看出因子A(玉米淀粉)的三个点高低相差较大,因此对纳豆芽孢杆菌的生长影响最显著;其次是因子B(豆粕粉)、因子D(NaCl),说明对纳豆芽孢杆菌生长的影响来说是次要矛盾;影响最小的是因子C(玉米浆)。在因子A中,因子 A_1 相对 A_2A_3 来说,效果较好;在因子B中,以 B_2 培养效果较好;在因子C中,以 C_2 效果较好;在因子D中,以 D_1 培养效果较好。所以,最优化的培养基配比定为 $A_1B_2C_2D_1$,即为玉米淀粉1%,豆粕粉5%,玉米浆1.5%,NaCl 0.2%。

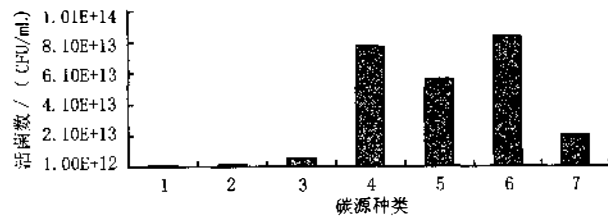


图3 不同碳源对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig.3 Effect of different carbon sources on *B. natto*

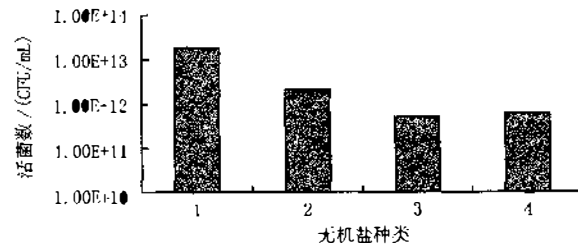


图4 不同无机盐对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig.4 Effect of different inorganic sources on *B. natto*

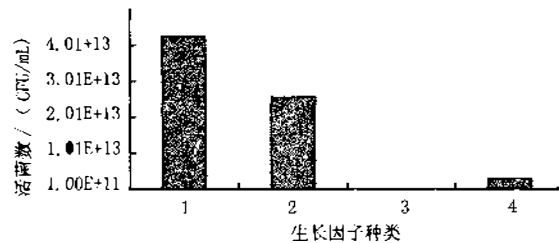


图5 不同生长因子对纳豆芽孢杆菌生长的影响

Fig.5 Effect of different growth factor sources on *B. Natto*

表 5 正交实验安排及结果

Tab.5 The L(9)3⁴ orthogonal chart and the experiment results

	A	B	C	D	实验结果 ($\times 10^{12}$)		合计
	1 玉米淀粉(%)	2 豆粕粉(%)	3 玉米浆(%)	4 NaCl(%)	第 1 次	第 2 次	
1	1	3	1	0.2	81	40	121
2	1	5	1.5	0.5	48.5	76	124.5
3	1	7	2	0.8	15	10	25
4	2	3	1.5	0.8	38.75	3	41.75
5	2	5	2	0.2	50.5	3	84.5
6	2	7	1	0.5	6.5	30	36.5
7	3	3	2	0.5	35.5	7	42.5
8	3	5	1	0.8	23.25	1.95	25.2
9	3	7	1.5	0.2	7.25	25	32.25
K_1	270.5	205.2	182.7	237.8			
K_2	162.8	234.2	198.5	203.5			
K_3	99.95	93.75	152	91.95			
\bar{K}_1	90.17	68.4	60.9	79.27			
\bar{K}_2	54.27	78.07	61.17	67.83			
\bar{K}_3	33.32	31.25	50.67	30.65			

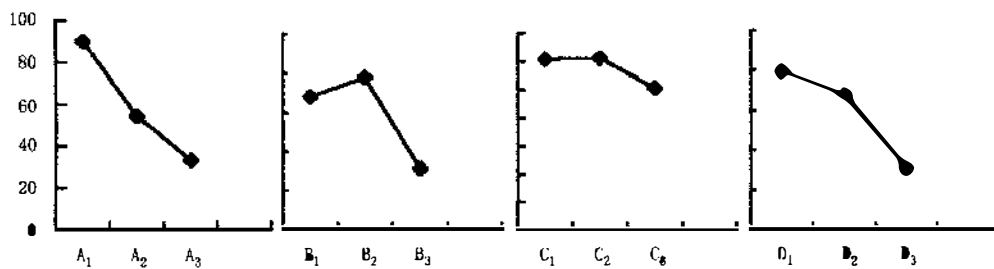


图 6 K 与各因子的关系

Fig.6 The relation between K and the factor A, B, C and D

3 结论

(1)通过实验确定纳豆芽孢杆菌 SFU-18 的最佳接种种龄为 14h,最佳收获时间为 20h。

(2)纳豆芽孢杆菌 SFU-18 深层液体发酵的最优化培养基配比为玉米淀粉 1%、豆粕粉 5%、玉米浆 1.5%、NaCl 0.2%。

参考文献:

- [1] 藤井久雄.纳豆菌にら粘物质の生成に関する研究[J].日本醸造协会志,1987,82(4):66-72.
- [2] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.792-735.
- [3] 刘学剑.微生物理论与绿色饲料添加剂的开发应用[J].湖南饲料,2000,59(5):2-7.
- [4] 胡东兴,潘康成.微生物制剂及其作用机理[J].中国饲料,2001,191(3):14-16.
- [5] 中华人民共和国农业部第 105 号公告,允许使用的饲料添加剂品种目录[R].1999.7.
- [6] 中国科学院微生物研究所,中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心.菌种目录[M].北京:科学出版社,1982.12-140.
- [7] 钱存柔.微生物学实验[M].北京:北京大学出版社,1985.39-40.
- [8] 高鼎.食品微生物学[M].北京:中国商业出版社,1996.143-146.
- [9] 王秀坤,陆文清.液态高密度培养饲用益生菌的研究与应用[J].饲料工业,2000,21(6):11-13.
- [10] 袁振远.日本纳豆[J].上海调味品,1992,51(1):4-10.