

文章编号:1673-1689(2009)02-0267-05

## 固态发酵生产复合纳豆芽孢杆菌制剂

牛丽亚, 黄占旺\*, 帅明, 李佩佩  
(江西农业大学 食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:**为了探索复合益生菌剂多菌种混合发酵条件,作者以活菌数为指标,采用固态发酵技术,研究了接种比例、接种量、培养基初始 pH 值、含水量、发酵温度和时间对固态发酵的影响,并通过  $L_9(3^4)$  正交试验确定了纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母混合固态发酵最佳条件。结果表明:培养基初始含水量 70%、pH 6.5、纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例为 1:1、接种体积分数 10%、发酵温度 34℃、发酵 5 d 的效果最好。在此条件下发酵后,纳豆芽孢杆菌数为  $1.96 \times 10^{10}$  cfu/g,啤酒酵母数为  $1.68 \times 10^9$  cfu/g。

**关键词:**纳豆芽孢杆菌;啤酒酵母;固态发酵

**中图分类号:**TQ 920.1

**文献标识码:**A

### Studies on Technology for Compound Producing *Bacillus natto* Preparations by Solid State Fermentation

NIU Li-ya, HUANG Zhan-wang\*, SHUAI Ming, LI Pei-pei  
(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** In order to determine the optimum fermentation conditions of bacterium in probiotics, the solid state fermentation conditions such as inoculum ratio, inoculum size, initial pH value, and initial moisture, fermentation temperature and time of *Bacillus natto* and *Saccharomyces cerevisiae* were optimized manuscript by  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment. The best results were achieved at the following conditions: initial pH value 6.5, initial moisture 70%, inoculum ratio 1:1, inoculum size 10%, fermentation temperature 34℃ fermentation time 5 days. The total number of *Bacillus natto* reached  $1.74 \times 10^{10}$ , and the total number of *Saccharomyces cerevisiae* was  $1.76 \times 10^9$  after fermentation.

**Key words:** *Bacillus natto*, *Saccharomyces cerevisiae*, solid state fermentation

益生菌剂主要是通过其含有活菌的积极生命活动来调节微生态平衡,活菌数的高低是产品质量的关键<sup>[1]</sup>。由于单一菌种含有的益生菌较少,效果有限,而且易被仿制。所以,越来越多的学者将目光转向了复合益生菌剂的研究。多菌复合益生菌

剂一般都具有协同作用,能产生更好的效果。纳豆芽孢杆菌是在 20 世纪中期从日本传统食品纳豆中分离出来的对人体无害的安全菌株,是益生菌剂的理想生产菌株<sup>[2]</sup>。近年来,随着对纳豆芽孢杆菌功能和性质的研究,纳豆芽孢杆菌益生菌剂的开发和

收稿日期:2008-04-08

基金项目:江西省教育厅基金项目(赣教科技字[2007]160号)。

\*通讯作者:黄占旺(1964-),男,江西余干人,教授,硕士生导师,主要从事食品微生物与发酵工程方面的研究。

Email:huangzw@163.com

研究也成为继乳酸杆菌和双歧杆菌制剂之后,国内外学者研究和开发的热点。目前,国外一些国家已经生产出包括纳豆芽孢杆菌在内的复合益生菌剂,但在我国还未见相关报道。作者以发酵后的活菌数为指标,对纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母混合固态发酵条件进行了初步研究,为生产复合纳豆芽孢杆菌益生菌剂提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌种** 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) B<sub>1</sub>为江西农业大学食品微生物实验室分离保存;啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购于中科院微生物菌种保藏中心。

**1.1.2 固态发酵培养基** 豆粕:玉米粉:麦麸=1.5:1.5:7,葡萄糖2 g/dL。

### 1.2 仪器设备

超净工作台 SW-CJ-2FD,苏州安泰空气技术有限公司制造;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-40自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂制造。

### 1.3 方 法

**1.3.1 接种比例的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母分别按3:7、4:6、5:5、6:4、7:3和8:2的比例,接入体积分数10%的菌液于初始含水量为80%,pH 7.0的固态发酵培养基,32℃下培养5 d后,分别测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.2 接种量的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母按1:1的比例,分别接入体积分数4%、6%、8%、10%和12%的菌液于初始含水量为80%,pH 7.0的固态发酵培养基,在32℃下培养5 d,分别测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.3 培养基初始含水量的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母按1:1的比例,分别接入体积分数10%的菌液于初始含水量为50%、60%、70%、80%和90%,pH 7.0的固态发酵培养基,在32℃下培养5 d,分别测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.4 培养基初始pH值的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母按1:1的比例,分别接入体积分数10%的菌液于初始含水量为80%,pH值为5.5、6.0、6.5、7.0和7.5的固态发酵培养基,在32℃下培养5 d,分别测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.5 发酵温度的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵

母按1:1的比例,接入体积分数10%的菌液于初始含水量为80%,pH 7.0的固态发酵培养基,分别在30、32、34、36、38℃下培养5 d后,测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.6 发酵时间的选择** 纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母按1:1的比例,接入体积分数10%的菌液于初始含水量为80%,pH 7.0的固态发酵培养基,在32℃下分别培养3、4、5、6、7 d,分别测定纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数。

**1.3.7 正交试验** 以发酵后的活菌数为指标,在单因素试验的基础上,选择纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例、接种量、发酵温度和发酵时间4个因素的合适水平进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,见表1。

表1 正交试验因素水平表

Tab.1 Levels of factors in orthogonal test

水平	因素			
	A 温度/ ℃	B 发酵 时间/d	C 接种 比例	D 接种 体积分数/%
1	32	4	5:5	6
2	34	5	6:4	8
3	36	6	7:3	10

**1.3.8 活菌数测定方法** 采用平皿稀释涂布计数法。其中纳豆芽孢杆菌的计数培养基为牛肉膏蛋白胨培养基,稀释涂布后于37℃恒温培养;啤酒酵母的计数培养基为PDA培养基,稀释后涂布于28℃恒温培养,培养36 h后分别计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种比例的选择

双菌种混合发酵中,微生物之间存在相互影响,发酵系统中各菌种的生长速度和最终密度与接种比例相关,进而影响到整个混合发酵产物的组成和发酵效果。由表2可知,随着纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例的增大,发酵后的纳豆芽孢杆菌数呈先上升后下降的趋势,在接种比例为7:3时达到最大值,为 $1.56 \times 10^{10}$ ,此时啤酒酵母数为 $1.8 \times 10^9$ ,仅比其峰值略微减少;而当啤酒酵母数达到最大值时,此时的纳豆芽孢杆菌数却仅为其峰值的86.5%。因此,选择接种比例为7:3为固态发酵的最佳接种比例。

### 2.2 接种量的选择

接种量的大小一般是由菌种的生长繁殖速度所决定的。发酵期间菌体生长快慢与生长量在很大程度上取决于接种量。由表3可知,随着接种量

的增大, 发酵后的纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数都呈先增大后减少的趋势, 且都在接种体积分数为 8% 的时候达到最大值。这是因为在一定的接种量范围内, 增大接种量可使菌体数快速增长, 增加活菌数, 缩短发酵周期; 但如果接种量太大, 培养基中营养物质不能满足菌体生长需要, 进而会限制菌体的生长, 使发酵后的活菌数减少。因此, 选择体积分数 8% 的接种量为固态发酵的最佳接种量。

表 2 接种比例对固态发酵的影响

Tab. 2 Effect of inoculum ratio on solid fermentation

接种比例 (纳豆芽孢杆菌: 啤酒酵母)	活菌数/( $10^9$ cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
3:7	3.0	0.82
4:6	8.0	0.71
5:5	9.35	1.87
6:4	13.5	1.94
7:3	15.6	1.8
8:2	6.7	1.2

表 3 接种体积分数对固态发酵的影响

Tab. 3 Effect of inoculum size on solid fermentation

接种体积 分数/%	活菌数/( $10^9$ cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
4	6.43	0.86
6	12.0	1.29
8	13.6	3.1
10	9.35	1.87
12	8.95	1.83

### 2.3 培养基初始含水量的选择

由表 4 可知, 随着培养基初始水分质量分数的增加, 发酵后的纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数都呈先增大后减少的趋势, 且都在含水量为 70% 的时候达到最大值。这是因为如果固态发酵培养基初始水分质量分数过高, 会使培养基黏度增大, 导致培养基通透性降低, 使菌体生长缓慢; 而水分质量分数过低, 则水分供应不足, 也会限制菌体的生长繁殖, 进而影响发酵效果。因此, 选择 70% 为固态发酵培养基的最佳初始含水质量分数。

### 2.4 培养基初始 pH 值的选择

不同微生物生长所需的适宜 pH 值不同, 在双菌发酵中, 选择两种菌种都能生长的适宜 pH 值便显得尤为重要。啤酒酵母生长适宜 pH 值为 4.5~

5.0, 而纳豆芽孢杆菌生长最适 pH 值为 7.0<sup>[3]</sup>。由表 5 可知, 随着培养基初始 pH 值的升高, 发酵后的纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数都呈先增大后减少的趋势。其中纳豆芽孢杆菌数在 pH 6.5 时达到最大值, 为  $1.26 \times 10^{10}$ , 此时的啤酒酵母数约为其峰值的 58%; 而啤酒酵母数则在 pH 6.0 时达到最大值, 为  $3.72 \times 10^9$ , 此时的纳豆芽孢杆菌数仅为其峰值的 68%。由于益生菌剂在干燥中常遇到高温处理, 而纳豆芽孢杆菌具有芽孢, 能够耐受较高的温度, 可以减少制粒和贮藏过程中的损失。因此, 选择 pH 6.5 为培养基最佳初始 pH 值。

表 4 水分质量分数对固态发酵的影响

Tab. 4 Effect of the amount of water on solid fermentation

水分质量 分数/%	活菌数/( $10^9$ cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
50	5.3	0.98
60	11.6	1.72
70	11.8	2.0
80	9.35	1.87
90	8.95	1.85

表 5 pH 值对固态发酵的影响

Tab. 5 Effect of pH on solid fermentation

pH 值	活菌数/( $10^9$ cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
5.5	4.37	2.42
6.0	8.5	3.72
6.5	12.6	2.16
7.0	9.35	1.87
7.5	6.05	0.032

### 2.5 发酵温度的选择

由表 6 可以看出, 随着发酵温度的增加, 纳豆芽孢杆菌数呈先增大再减少再增大的趋势, 而啤酒酵母数则呈一直减少的趋势, 这是由于菌种的最适生长温度不同造成的。啤酒酵母最适生长温度为 28~32℃, 而纳豆芽孢杆菌最适生长温度为 30~45℃<sup>[3]</sup>。由表 6 可知, 啤酒酵母在最适温度 30℃ 下迅速生长, 活菌数达到最大值  $3.4 \times 10^9$ , 此后随着温度的升高, 数量逐渐减少; 纳豆芽孢杆菌数则在 34℃ 时达到最大值, 活菌数为  $1.51 \times 10^{10}$ , 其数量是 30℃ 时的 50 倍, 而此温度下啤酒酵母数为其峰值的 38%。因此, 选择 34℃ 为双菌固态发酵的最佳温度。

表6 发酵温度对固态发酵的影响

Tab. 6 Effect of fermentation temperature on solid fermentation

温度/℃	活菌数/(10 <sup>9</sup> cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
30	0.3	3.4
32	9.35	1.87
34	15.1	1.28
36	9.1	0.86
38	11.6	0.0044

## 2.6 发酵时间的选择

由表7可以看出,随着发酵时间的增加,纳豆芽孢杆菌数和啤酒酵母数都呈先增大再减少的趋势,且都在发酵5 d时达到最大值,这是因为固态发酵时间如果过短,菌体还没有充分生长,导致活菌数较少;但发酵时间过长,菌体会自溶死亡,而且被杂菌污染的可能性也就越大。因此,选择5 d为双菌固态发酵的最佳时间。

表7 发酵时间对固态发酵的影响

Tab. 7 Effect of fermentation time on solid fermentation

时间/d	活菌数/(10 <sup>9</sup> cfu/g)	
	纳豆芽孢杆菌	啤酒酵母
3	0.004 1	0.097
4	9.2	0.212
5	9.35	1.87
6	6.37	0.89
7	4.7	0.006

## 2.7 正交试验

通过单因素试验,在培养基初始 pH 值为 6.5,培养基初始水分质量为 70% 的基础上,选择纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例、接种量、发酵温度和发酵时间 4 个因素进行正交试验。正交试验结果由 DPS6.55 统计软件分析。通过极差和方差分析,得出纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母混合固态发酵的最优条件,见表 8。

表8 正交试验结果

Tab. 8 The results of Orthogonal experiment

处理		因素				纳豆芽孢杆菌/ (10 <sup>9</sup> cfu/g)		啤酒酵母 (10 <sup>9</sup> cfu/g)	
		A	B	C	D				
1		1	1	1	1	1.31	1.47	4.9	5.6
2		1	2	2	2	14.4	15.3	7.4	7.1
3		1	3	3	3	9.0	6.5	5.6	4.6
4		2	1	2	3	22.1	20.4	12.7	12.9
5		2	2	3	1	22.2	15.8	11.6	12.3
6		2	3	1	2	14.8	21.8	13.6	12.4
7		3	1	3	2	0.99	1.06	2.1	2.4
8		3	2	1	3	28.0	25.2	3.9	4.1
9		3	3	2	1	7.0	6.6	0.64	0.73
纳 豆 芽 孢 杆 菌	k <sub>1</sub>	7.996 7	7.888 3	15.430 0	9.063 3				
	k <sub>2</sub>	19.516 7	20.150 0	14.300 0	11.391 7				
	k <sub>3</sub>	11.475 0	10.950 0	9.258 3	18.533 3				
	R	11.520 0	12.261 7	6.171 7	9.470 0				
啤 酒 酵 母	k <sub>1</sub>	5.866 7	6.766 7	7.416 7	5.961 7				
	k <sub>2</sub>	12.583 3	7.733 3	6.911 7	7.500 0				
	k <sub>3</sub>	2.311 7	6.261 7	6.433 3	7.300 0				
	R	10.271 7	1.471 7	0.983 3	1.538 3				

从表8可以看出,影响发酵后纳豆芽孢杆菌数的主要因素排序为 B>A>D>C,最优发酵条件是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例为 1:1、接种体积分数 10%,发酵温度 34℃、发酵时间 5 d。从表9方差结果分析可知,4个因素对发酵后纳豆芽孢杆菌数都是差异极显著的因素。

从表8可以看出,影响发酵后啤酒酵母数的主

要因素排序为 A>D>B>C,最优发酵条件是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即纳豆芽孢杆菌和啤酒酵母接种比例为 1:1、接种体积分数 8%,发酵温度 34℃、发酵时间 5 d。从表10方差结果分析可知,接种量、发酵温度和时间对发酵后啤酒酵母数都是差异极显著的因素,接种比例是差异显著的因素。

表9 纳豆芽孢杆菌数方差分析表

Tab. 9 Variance analysis of the total number of *Bacillus natto*

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
A	418.955 2	2	209.477 6	34.932 2	0.000 1
B	488.724 5	2	244.362 3	40.749 5	0.000 1
C	129.569 5	2	64.784 8	10.803 4	0.004 1
D	292.210 9	2	146.105 4	24.364 3	0.000 2
误差	53.970 3	9	5.996 7		

注:  $p < 0.05$ , 表示差异显著;  $p < 0.01$ , 表示差异极显著。

表10 啤酒酵母数方差分析表

Tab. 10 Variance analysis of the total number of *Saccharomyces cerevisiae*

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
A	326.517 5	2	163.258 8	796.794 5	0.000 1
B	6.710 5	2	3.355 3	16.375 6	0.001 0
C	2.901 5	2	1.450 8	7.080 6	0.014 2
D	8.395 2	2	4.197 6	20.486 7	0.000 5
误差	1.844 1	9	0.204 9		

注:  $p < 0.05$ , 表示差异显著;  $p < 0.01$ , 表示差异极显著。

分别在上述两组最优条件下进行固态发酵。

## 参考文献(References):

- [1] 王海波, 马微, 钱程, 等. 益生菌的研究现状及发展趋势[J]. 现代食品科技, 2006, (3): 286-288.  
WANG Hai-bo, MA Wei, QIAN Cheng, et al. The current research and development trend of probiotic[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, (3): 286-288. (in Chinese)
- [2] 陈丽花, 陈有荣, 齐凤兰. 纳豆芽孢杆菌的功能及其应用[J]. 食品工业, 2001, (4): 39-41.  
CHEN Li-hua, CHEN You-rong, QI Feng-lan. The function and apply of *Bacillus natto*[J]. *Food Industry*, 2001, (4): 39-41. (in Chinese)
- [3] 黄占旺, 魏萍, 刘海林, 等. 纳豆菌生物学特性研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, (1): 83-85.  
HUANG Zhan-wang, WEI Ping, LIU Hai-lin, et al. A study on biological properties of *Bacillus natto*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2004, (1): 83-85. (in Chinese)
- [4] 贾艳萍, 赵军. 啤酒酵母的营养于综合利用[J]. 啤酒科技, 2006, (7): 24-25.  
JIA Yan-ping, ZHAO Jun. The nutrition and comprehensive utilization of beer yeast[J]. *Beer Science and Technology*, 2006, (7): 24-25. (in Chinese)
- [5] 张志焱, 徐海燕, 杨军方. 枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化[J]. 饲料博览, 2005, (9): 34-36.  
ZHANG Zhi-yan, XU Hai-yan, YANG Jun-fang. Optimization of the culture medium for *Bacillus subtilis* solid-state fermentation[J]. *Feed Review*, 2005, (9): 34-36. (in Chinese)
- [6] 金燕飞. 饲用纳豆芽孢杆菌微生态制剂的研制与开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [7] 肖怀秋, 林亲录, 李玉珍. 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Promax NTG<sub>24</sub> 发酵条件研究[J]. 中国食品添加剂, 2005, (6): 33-37.  
XIAO Huai-qiu, LIN Qin-lu, LI Yu-zhen. Studies on the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* promax NTG<sub>24</sub>[J]. *China Food Additives*, 2005, (6): 33-37. (in Chinese)
- [8] 祖国仁, 孔繁东. 纳豆菌固体发酵条件及产品成分分析[J]. 食品工业科技, 2006, (12): 122-124.  
ZU Guo-ren, KONG Fan-dong. Solid fermentation conditions for *Bacillus natto* and product composition analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, (12): 122-124. (in Chinese)
- [9] 陈红平. 浅谈对食品微生物中霉菌和酵母菌计数方法的认识[J]. 计量与测试技术, 2006, (11): 44-45.  
CHEN Hong-ping. Simple discussion of some views for the mould and yeast calculate of food microbiolog[J]. *Metrology and Measurement Technique*, 2006, (11): 44-45. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)