

# 响应面法优化以豆渣为基质发酵纳豆菌

孙艳辉, 董 英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

**摘 要:** 为提高豆渣的附加值, 以豆渣为基质液体发酵纳豆菌; 首先用 Plackett-Burman 方法对影响纳豆菌发酵因素的效应进行评价并筛选出了具有显著效应的三个因素: 初始 pH 值、发酵温度和麸皮含量, 其他因素对纳豆菌发酵无显著影响; 然后采用最陡爬坡实验逼近最大响应区域, 最后由响应面实验确定了主要影响因素的最佳条件: 初始 pH 6.02、发酵温度 36.4℃、麸皮 0.31%; 在优化培养条件下, 纳豆菌发酵液活菌数达到  $4.35 \times 10^9$  CFU/ml。

**关键词:** 豆渣; 纳豆菌; 微生态制剂; 响应面法

Optimization of *Bacillus natto* Fermented from Soybean Dregs by Response Surface Methodology

SUN Yan-hui, DONG Ying

(School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** In order to improve soybean dregs added value, soybean dregs were utilized as medium to ferment *Bacillus natto*. Firstly, a Plackett-Burman design was used to evaluate the affecting factors of *Bacillus natto* fermented. Initial pH value, fermentation temperature and bran content are significant factors. The others had no significant effect on fermenting *Bacillus natto*. The steepest ascent experiment is used to approach the optimal conditions subsequently. Finally the optimized conditions are confirmed initial pH value 6.02, fermentation temperature 36.4℃ and bran 0.31% further optimized with response surface methodology. The best result is  $4.35 \times 10^9$  CFU/ml life bacteria count under the optimized conditions.

**Key words** soybean dregs; *Bacillus natto*; probiotics; response surface methodology

中图分类号: TS201.3 TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0208-04

纳豆菌(*Bacillus natto*)是20世纪初期由日本学者须见洋行从日本传统的大豆发酵食品——纳豆中发现并分离出来的<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2]</sup>。纳豆菌是好氧菌, 在一定条件下产生芽孢, 由于芽孢的特殊结构使芽孢杆菌耐酸碱、耐高温和挤压, 在肠道酸性环境中具有高度的稳定性, 可到达肠道有效部位; 纳豆菌是对人体无病原性的安全菌株, 可分泌各种酶和维生素促进小肠粘膜细胞增殖, 有助于营养物质的吸收; 纳豆菌可抑制肠道内有害菌的生长, 促进有益菌的生长; 另外, 纳豆菌能产生纳豆激酶等多种具保健功能的代谢物质。因此, 纳豆菌是微生态制剂的理想生产菌种<sup>[3]</sup>。国内已有人开始相关的研究<sup>[4-5]</sup>。

我国是世界上种植大豆的主要国家, 大豆的产量很高。豆渣是大豆制品(如豆奶、豆腐、腐竹、腐乳等)生产中的副产品, 按每加工1吨大豆产生2吨湿豆渣计算, 目前国内大豆食品行业每年约生产2000万吨湿豆渣<sup>[6]</sup>。但由于技术及开发成本等方面的原因, 长期以来豆渣没有很好地被利用, 大多作为饲料或垃圾处理,

浪费了资源, 而且还可能污染环境。纳豆菌一般使用大豆作为培养基, 成本很高。国内外还没有人以豆渣为培养基发酵培养纳豆菌。本研究以豆渣为基质, 液体深层发酵纳豆菌, 既能够降低成本、提高豆渣的附加值, 又能减少豆渣带来的环境问题。

影响纳豆菌液体发酵的因素众多, 选择哪些因素和哪些交互效应作为重点考察对象是值得深入研究的。如果遗漏了重要因素, 则所得结论的可信度以及其意义将会受到影响。Plackett-Burman设计法是一种以不平衡块为原理的实验设计, 能够从众多变量中快速、有效的筛选出最为重要的一些因素, 供进一步的详细研究<sup>[7]</sup>。响应面方法(response surface methodology, RSM)是综合实验设计和数学建模, 通过局部试验回归拟合因素与结果间的全局函数关系, 从而得到准确有效的结论<sup>[7]</sup>。

本研究以豆渣为培养基发酵培养纳豆菌, 采用 Plackett-Burman 设计法筛选出影响纳豆菌发酵的重要因素, 通过最陡爬坡实验逼近最大响应区域, 最后采用响应面法对重要因素进行优化, 确定较优的发酵条件, 为纳豆菌微生态制剂的研究和开发提供一定的理论基础。

收稿日期: 2006-05-08

作者简介: 孙艳辉(1978-), 男, 博士研究生, 主要从事生物资源综合利用的研究。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

纳豆菌(*Bacillus natto*) 江苏大学生物技术实验室保藏; 豆渣购自镇江市丹徒镇菜市场, 经测定含水量为81.9%; 种子培养基: 胰蛋白胨1.5%、葡萄糖1% NaCl 0.5%、pH7.0~7.2; 富集培养基: 豆渣、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4$ 和麸皮, 培养基配比按试验设计实施。

## 1.2 仪器

PSX 智能型恒温恒湿培养箱 宁波市机电工业研究  
设计院; PHS-3TC 型酸度计 上海天达仪器有限公司;  
SZX-3 超净工作台 苏洲净化设备厂; YX280A 手提式  
不锈钢蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司; THZ-  
82B 气浴恒温振荡器 江苏金坛市医疗仪器厂。

### 1.3 方法

### 1.3.1 种子液的制备

挑取已活化的纳豆菌一环接种到种子培养基中, 在 37℃ 转速为 160r/min 的摇床中培养 12h<sup>[8]</sup>。

### 1.3.2 接种与培养

分别取 5ml 种子液，接入盛有 100ml 含 15% 豆渣的无菌发酵培养基的 500ml 三角瓶中。置摇床中 37℃ 振荡培养，转速为 160r/min。培养 18h 后结束<sup>[8]</sup>，取样测定活菌数(CFU/ml)。

### 1.3.3 活菌计数方法

按涂布平板稀释法计数。无菌操作条件下,用无菌生理盐水将样品稀释至一定稀释度,取0.1ml,接种于平板上,用无菌玻璃涂棒将菌液涂布均匀,每个样品涂布3个平板,37℃恒温培养24h,进行菌落计数。

## 1.4 试验设计

#### 1.4.1 Plackett-Burman 法筛选影响发酵的主要因素

N次实验的Plackett-Burman设计至多可研究N-1个因素,其中至少应设置3个空项以估计试验误差,每个因素均取高、低2个水平。该方法数据处理简单,在

N 次试验中, 每个因素高、低水平分别出现  $N/2$ ; 而且, 在某个因素处于高(低)水平时, 其余因素各出现高、低水平  $N/2$  次。因此, 分别计算因素在高、低水平时试验响应的均值并求其之差就可得到此因素的效应, 其中空项效应的均方和为标准差估计值。各因素效应进行 t 检验, 选择可信度较高的因素作为重要因素作进一步考察。

以豆渣为培养基发酵纳豆菌的影响因素包括麸皮、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  的含量、初始 pH 值、发酵温度、接种量、转速、装液量等。试验选用  $N=12$  的 Plackett-Burman 设计安排, 对这 8 个因素进行研究, 另外 3 个因素为虚拟变量, 用于估计误差, 试验设计表头见表 1, 试验设计的每个因素取 2 个水平, 根据前期实验确定各因素的水平, 高水平约取低水平的 1.25 倍。各因素水平取值见表 2。

### 1.4.2 最陡爬坡试验

响应面拟合方程只在考察的紧接邻域里才充分近似真实情形,在其他区域,拟合方程与被近似的函数方程毫无相似之处,几乎无意义。所以,要先逼近最大响应区域后才能建立有效的响应面拟合方程。最陡爬坡法根据各显著因素效应值的大小来确定最陡上升路径,而其他因素的取值则根据各因素效应的正负和大小,正效应的因素均取较高值,负效应的因素均取较低值<sup>[7]</sup>。

### 1.4.3 响应面试验

采用响应面分析法对影响纳豆菌增殖的显著因素进行研究。用多项式回归分析对实验数据进行拟合,得到二次多项式,它是一个描述响应变量(因变量)与自变量(操作条件)关系的经验模型:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2$$

式中,  $y$  为预测响应值;  $\beta_0$ 、 $\beta_i$ 、 $\beta_{ii}$  分别是偏移项、线性偏移和二阶偏移;  $\beta_{ij}$  是交互作用系数;  $X_i$  为自变量编码值, 它同自变量试验水平实际值  $x_i$  的换算公

表1 N=12 的 Plackett Burman 试验设计与结果  
Table 1 Plackett-Burman test design and result (N=12)

[illegible]

表2 因素、水平及其效应  
Table 2 Factors, levels and effects

因素	低水平(-1)	高水平(+1)	效应	T 检验	显著性
A 初始 pH 值	5.8	7.0	-0.405	-5.680	99
B $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 含量(%)	0.1	0.2	-0.025	-0.351	
C $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 含量(%)	0.2	0.3	-0.062	-0.865	
(D)			-0.085	-1.192	
E 装液量(ml)	90	120	-0.102	-1.426	80
F 发酵温度(°C)	30	38	0.178	2.501	95
(G)			0.028	0.397	
H 麸皮含量(%, m/V)	0.2	0.3	0.135	1.893	90
I 转速(r/min)	160	200	0.025	0.351	
(J)			-0.085	-1.192	
K 接种量(%, V/V)	0.4	0.5	0.038	0.538	

式如下:

$$X_i = \frac{X_i - X_{0i}}{X_{+i} - X_{0i}}$$

式中,  $x_{0i}$  表示 0 水平的  $x_i$ ;  $x_{+i}$  表示 +1 水平的  $x_i$ 。

采用软件Statistic Version 8.0(StatSoft, Inc.) 进行试验设计, 软件Matlab7.0(StatSoft, Inc.)进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 重要因素的筛选

按试验设计进行两轮试验, 取两次测量值的平均值为准, 结果见表 1。分别计算各因素效应及重要性评价, 结果见表 2。

由表 2 可知, 对纳豆菌增值有显著影响(可信度>90%)的因素包括初始 pH 值、发酵温度和麸皮含量。由各因素效应还可看出, 要提高发酵液菌体浓度, 应该降低初始 pH 值, 升高发酵温度和麸皮含量。同时, 可以看不显著因素中  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  含量、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  含量和装液量是负效应、转速和接种量是正效应。因此在后续实验中  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  含量、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  含量和装液量应取低水平, 转速和接种量应取高水平。

### 2.2 最陡爬坡试验

表3 最陡爬坡试验设计及结果  
Table 3 Steepest ascent test design and result

初始 pH 值	发酵温度(°C)	麸皮含量(%, m/V)	菌体浓度( $10^6\text{CFU/ml}$ )
0	6.4	32	1.26
0+1 $\Delta$	6.2	34	1.85
0+2 $\Delta$	6.0	36	3.15
0+3 $\Delta$	5.8	38	2.10
0+4 $\Delta$	5.6	40	1.44

表 3 列出了各显著因素的变化方向、步长和试验结果。由表 3 知, 菌体浓度在 0+1  $\Delta$  到 0+2  $\Delta$  之间有一个明显的上升, 之后开始下降, 最优发酵条件在 0+2  $\Delta$  和

0+3  $\Delta$  之间, 故 0+2  $\Delta$  条件为后续试验的中心点。

### 2.3 响应面试验优化发酵条件

在对 Plackett-Burman 试验结果充分分析的基础上, 在最陡爬坡试验确定的区域内, 以菌体浓度为响应值设计了 3 因素 3 水平共 15 个试验点的响应面分析试验, 其中 12 个为析因点, 3 个为零点, 零点试验进行了 3 次用来估计误差。其因素水平选取见表 4, 试验方案与结果见表 5。

表4 三因素三水平取值表  
Table 4 Table of three factors and three levels

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
初始 pH 值	$X_1$	5.8	6.0	6.2
发酵温度(°C)	$X_2$	34	36	38
麸皮含量	$X_3$	0.27	0.29	0.31

表5 N=15 的 Box-Behnken 试验设计  
Table 5 Box-Behnken test design (N=15)

试验号	因素			菌体浓度( $10^6\text{CFU/ml}$ )
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	-1	0	1.76
2	-1	1	0	1.91
3	1	-1	0	2.18
4	1	1	0	2.55
5	0	-1	-1	3.14
6	0	-1	1	3.23
7	0	1	-1	3.35
8	0	1	1	3.94
9	-1	0	-1	2.51
10	1	0	-1	3.05
11	-1	0	1	2.98
12	1	0	1	3.47
13	0	0	0	4.19
14	0	0	0	4.14
15	0	0	0	4.23

利用 SAS 软件对响应面试验结果进行回归分析, 获得纳豆菌菌液浓度对初始 pH、发酵温度和麸皮含量的多元二次回归方程:

# 阳离子交换法分离纯化酵母细胞提取液中的谷胱甘肽

王 淼, 范崇东, 苏晓晋

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 谷胱甘肽是重要的生物活性物质, 本文采用国产 D001 阳离子交换双柱(A 柱和 B 柱)对酵母细胞提取液中的 GSH 进行了分离纯化, 确定了 A、B 离子交换柱分离纯化酵母提取液中的谷胱甘肽的工艺参数为: A 柱上样的提取液 pH 为 5.5~6.0; B 柱上样液(A 柱的收集液)的 pH 为 2.4~2.8; B 柱的洗脱采用 1.2% 的 NaCl 溶液。A、B 两柱上样和洗脱液的流速均为 0.5ml/min。酵母提取液中 GSH 的回收率大于 70%, 纯化倍数大于 100 倍。

**关键词:** 谷胱甘肽; 离子交换; 分离纯化

Glutathione Isolation and Purification of Yeast Extract with Ion Exchange Resin Columns

WANG Miao, FAN Chong-dong, SU Xiao-jin

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Glutathione, one of the most important biological active substance plays a central role in metabolic pathways of live

收稿日期: 2006-10-31

作者简介: 王淼(1962-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

$y = -1359.2 + 376.1813X_1 + 14.25125X_2 - 197.5417X_3 - 31.23958X_1X_2 - 0.209271X_2X_3 + 3.125X_2X_3 + 163.5417X_3X_3$

模型显著性检验表明,  $Pro > F_{失拟} = 0.1982$ ,  $Pro > F_{方程} = 0.0001$ 。所以该模型失拟不显著, 回归显著。回归方程的确定系数  $R^2$  为 0.9968, 表明模型与实际情况拟和很好。

利用 matlab 求解方程最大值, 当初始 pH 值为 6.02、温度为 36.4℃、麸皮含量为 0.31% 时, 发酵液菌体浓度最高, 为  $4.49 \times 10^9$  CFU/ml。为了检验模型的准确性, 在最佳发酵条件下进行发酵实验, 所得实际发酵液菌体浓度为  $4.35 \times 10^9$  CFU/ml, 表明所得的模型有一定的实验指导意义。

## 3 结 论

采用 Plackett-Burman 试验设计方法, 筛选出了影响纳豆菌发酵的三个显著因素: 初始 pH 值、发酵温度和麸皮含量。通过最陡爬坡法有效地逼近最大响应区域。然后, 利用响应面法建立了影响纳豆菌增殖的显著因素的数学模型, 对该模型方程的求解得最优发酵工艺: 初

始 pH 6.02, 发酵温度 36.4℃, 麸皮 0.31%。经验证, 在此条件下, 发酵液菌体浓度为  $4.35 \times 10^9$  CFU/ml。该结果为提高豆渣附加值、生产纳豆菌微生态制剂提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] 藤井久雄. 纳豆菌にらる粘物質の生成に关する研究[J]. 日本酿造协会志, 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[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 792-735.
- [3] 王发祥, 钟青萍, 钟士清. 纳豆菌的研究和应用[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19: 93-95.
- [4] 钟青萍, 王发祥, 钟士清, 等. 纳豆菌微生态制剂的稳定性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 133-136.
- [5] 钟青萍, 王发祥, 刘家畅, 等. 纳豆菌活菌干燥制剂的研制[J]. 食品科技, 2005, 26(8): 78-81.
- [6] 张振山, 叶素萍, 李泉, 等. 豆渣的处理与加工利用[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 400-406.
- [7] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [8] 王萍. 纳豆激酶的分离纯化及溶栓活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2005.