花生蛋白纳豆菌发酵工艺条件的研究

用慧敏,唐君钰,丁靖苇,邹於岑,曹 晖* (扬州大学旅游烹饪学院,江苏扬州 225127)

摘要 [目的]以花生粕作为纳豆菌发酵主要原料,研究花生蛋白纳豆菌发酵工艺的最佳条件。[方法]选择合适的工艺流程,将纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数作为观察指标,通过单因素试验和正交试验对发酵条件进行优化。[结果]花生蛋白纳豆菌发酵最佳工艺条件为接种量4%,发酵时间48 h,发酵温度37 ℃,种龄18 h,初始pH 7.0。在上述发酵条件下,可得到较高的纳豆激酶活力(271.57 U/mL)和纳豆菌活菌数(36×10^5 cfu/mL)。[结论]该试验结果为花生粕的研究与开发提供了理论依据。

关键词 花生粕;纳豆菌;发酵;纳豆激酶
中图分类号 S-3;TQ920.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)35-0070-05

Study on Fermentation Conditions of Peanut Protein of *Bacillus natto*

YONG Hui-min, TANG Jun-yu, DING Jing-wei, CAO Hui* et al (School of Tourism and Culinary Science, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127)

Abstract [Objective] The optimum fermentation conditions of peanut protein of *Bacillus natto* were studied with peanut meal as the main raw material for the fermentation of *Bacillus natto*. [Method] We chose the proper process flow and selected the nattokinase activity and the viable count of *Bacillus natto* as the fermentation parameters to obtain the optimum conditions of fermentation of peanut protein of *Bacillus natto*, through the analysis of the single factor experiments and orthogonal experiment. [Result] The optimum fermentation conditions of peanut protein of *Bacillus natto* were as followed: the inoculum amount was 4%; the fermentation time was 48 h; the fermentation temperature was 37 ℃; the seed age was 18 h; and the initial pH was 7.0. Under the above fermentation conditions, higher activity of nattokinase (271.57 U/mL) and more live bacteria number of *Bacillus natto* (36×10^5 cfu/mL) could be obtained. [Conclusion] The results provide reference for research and development of peanut meal.

Key words Peanut meal; *Bacillus natto*; Fermentation; Nattokinase

花生粕是花生经高温榨油后的副产物,含有丰富的花生蛋白,含量高达40% ~55%,且氨基酸种类齐全,具有良好的营养价值。但因为高温压榨制油后,花生蛋白严重变性,从而使其主要被用作于饲料或肥料,但这2种方式对花生蛋白的利用率较低,易造成蛋白质资源浪费。若能对这些花生蛋白资源进行相关的研究利用,将极大地提高花生粕的附加值,从而带来可观的经济效益。

20世纪初期,日本学者泽村发现并分离出了纳豆菌[1]。纳豆菌可以用来分解大分子物质,如分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等,使发酵产物容易被机体所吸收[2]。此外,在代谢过程中纳豆菌可以产生纳豆激酶[3-4]。纳豆激酶是一种由纳豆芽孢杆菌所产生的碱性丝氨酸蛋白酶。该酶具有很强的纤溶活性,能直接作用于纤维蛋白,也能激活体内纤溶酶原,且其具有安全性好、成本低、纤溶活性强、可口服、作用时间长等优点,正作为一个开发预防和治疗血栓药物的研究热点[5-6]。而且,纳豆激酶具有调节血脂和防止动脉硬化的作用,对预防和治疗高血压也有重要意义。目前,已有较多的研究是关于利用枯草芽孢杆菌发酵豆粕来制备易消化的蛋白质饲料[7-9],但利用其开展发酵花生粕的研究则很少,而纳豆芽孢杆菌作为枯草芽孢杆菌的一个亚种,可将其用于进行花生粕发酵的研究。笔者以花生粕作为纳豆菌发酵主要原料,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数作为观察指标,通过单因素试验和正交试验对花生蛋白纳豆菌发酵工艺进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料 花生粕,纳豆菌(扬州大学旅游烹饪学院分离保存),尿激酶标准品(西安依科生物技术有限公司),纤维蛋白原(北京达博诺科技有限公司),凝血酶(北京达博诺科技有限公司),琼脂糖(北京雷利华康商贸有限公司),蛋白胨、牛肉膏、NaCl、琼脂、胰蛋白胨、酵母膏、DDPH、无水乙醇、H_2O_2(扬州市广陵区荣达仪器试剂经营部)。

1.2 方法

1.2.1 纳豆激酶活力测定。采用琼脂糖-纤维蛋白平板法[10-11]。

1.2.1.1 琼脂糖-纤维蛋白平板的制作。称取200 mg琼脂糖溶解于10 mL生理盐水中,沸水浴中加热30 min,取出室温冷却至50 ~55 ℃。称取10 mg纤维蛋白原溶解于10 mL生理盐水中(37 ℃水浴加热)。将事先准备好的200 μL凝血酶(50 U/mL),加入琼脂糖溶液中混匀,并快速倒入保温好的纤维蛋白原溶液,混匀后立刻注入灭菌平板,注入时要避免出现气泡,室温静置冷却30 min,凝固后即为半透明的平板。用2 mm套管打孔,每个平板打孔4 ~6个。

1.2.1.2 标准曲线的制作。用配好的生理盐水稀释尿激酶标准品(1 500 U/支),配制成浓度为500.00、400.00、300.00、200.00、100.00、50.00 U/mL的尿激酶标准溶液。在平板上选定6个孔,将上述系列浓度尿激酶标准溶液分别以10 μL的量点在孔内,置于37 ℃恒温箱中,保温18 h。测量每个溶圈的直径,计算溶圈面积。绘制标准曲线:以尿激酶标准品1 mL活性单位为横坐标,以溶圈面积为纵坐标作图。

1.2.1.3 样品的测定。在平板上选定5个孔,每个孔依次加入10 μL样品。置于37 ℃恒温箱中保温18 h。测量溶圈

基金项目 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201611117058Y)。
作者简介 用慧敏(1995—),女,江苏宿迁人,本科生,专业:食品卫生与营养学。*通讯作者,副教授,从事食品营养与加工研究。
收稿日期 2017-10-18

的直径,计算溶圈的面积,通过标准曲线计算其活力。3 点取平均值,样品活力以“尿激酶活力单位”(UK)表示。

1.2.2 纳豆菌活菌数的测定[12]。参考 GB 4789.2—2010,食品卫生微生物学检验—菌落总数测定方法。将培养基换为营养琼脂培养基。

1.2.3 纳豆菌的活化。在无菌环境下,从纳豆菌保藏斜面中取 1 环菌体划线于牛肉膏蛋白胨斜面培养基中,置于37 ℃生化培养箱中培养 36 h。

1.2.4 纳豆菌种子液的制备。在无菌环境下挑取 1 环已经活化的纳豆菌接入经高压灭菌的置于250 mL 三角瓶的200 mL LB 液体培养基中,摇匀后在 37 ℃生化培养箱中培养 18 h。

1.2.5 花生蛋白纳豆菌发酵工艺流程。工艺流程见图 1。

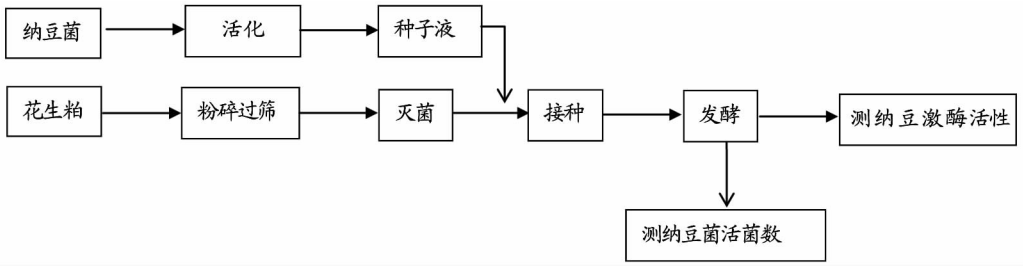

图 1　花生蛋白纳豆菌发酵工艺流程

Fig. 1　Fermentation technology process of peanut protein of *Bacillus natto*

1.2.6 花生蛋白纳豆菌发酵单因素试验。

1.2.6.1 种龄对花生蛋白纳豆菌发酵的影响。分别取培养 12、15、18、21、24 h 的纳豆菌种子液,在发酵时间 48 h、起始 pH 7.0、发酵温度 37 ℃、接种量 4% 的发酵条件下进行 5 组发酵培养试验,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数为指标,确定适宜的种龄范围。

1.2.6.2 接种量对花生蛋白纳豆菌发酵的影响。按 2%、3%、4%、5%、6% 的接种量接种种子液,在发酵时间 48 h、起始 pH 7.0、发酵温度 37 ℃、种龄 18 h 的发酵条件下进行 5 组发酵培养试验,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数为指标,确定适宜的接种量范围。

1.2.6.3 初始 pH 对花生蛋白纳豆菌发酵的影响。将初始 pH 分别设定为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,在发酵时间 48 h、发酵温度 37 ℃、接种量 4%、种龄 18 h 的发酵条件下进行 5 组发酵培养试验,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数为指标,确定适宜的初始 pH。

1.2.6.4 发酵时间对花生蛋白纳豆菌发酵的影响。在起始 pH 7.0、发酵温度 37 ℃、接种量 4%、种龄 18 h 的发酵条件下,调整发酵时间分别为 24、48、72、96、120 h,进行 5 组发酵培养试验,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数为指标,确定适宜的发酵时间范围。

1.2.6.5 发酵温度对花生蛋白纳豆菌发酵的影响。将培养温度分别设置为 30、33、37、41、45 ℃进行发酵培养,在发酵时间 48 h、起始 pH 7.0、发酵温度 37 ℃、接种量 4%、种龄 18 h 的发酵条件下进行 5 组发酵培养试验,以纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数为指标,确定适宜的培养温度范围。

1.2.7 花生蛋白纳豆菌发酵正交试验。从影响纳豆激酶活性和纳豆菌活菌数的一系列因素中筛选接种量、发酵时间、发酵温度 3 个关键因素。结合单因素试验设计,每个因素选取 3 个水平,根据正交试验设计原理,设计 3 因素 3 水平的正交试验。对正交试验结果进行分析,确定最佳发酵条件。

2　结果与分析

2.1　琼脂糖 – 纤维蛋白原平板法尿激酶标准曲线　当尿激酶活力在 50 ~ 500 U/mL 时,尿激酶活力与透明圈面积存在一定的线性关系。直线回归方程:$y = 0.006x + 0.421\ 9$,$r^2 = 0.960\ 2$,线性相关性良好(图 2)。因此,可以通过测量发酵产物所形成的透明圈面积间接计算出纳豆激酶相当于尿激酶的活力值。

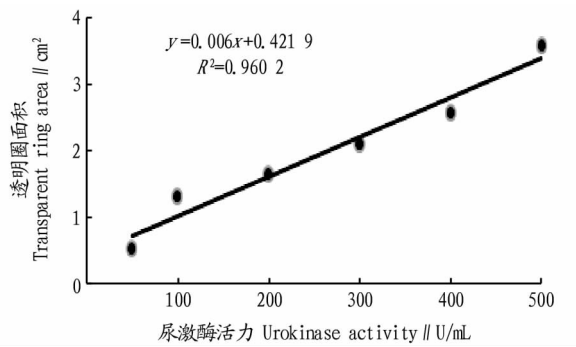

图 2　尿激酶标准曲线

Fig. 2　The standard curve of urokinase

2.2　种龄对花生蛋白纳豆菌发酵的影响　由图 3 可知,当种龄在 12 ~ 24 h 时,纳豆激酶活力的变化不明显。当种龄在 12 ~ 18 h 时,随着种龄的增大,纳豆激酶活力呈缓慢上升趋势;当种龄在 18 ~ 24 h 时,纳豆激酶活力呈缓慢下降趋势。种龄为 18 h 时纳豆激酶活力达到最高。由图 4 可知,当种龄在 12 ~ 24 h 时,纳豆菌活菌数变化较大,当种龄为 18 h 时,纳豆菌活菌数最大。一般情况下,接种的纳豆菌种龄偏小,会出现前期生长缓慢,发酵周期延长,产物开始形成较慢的现象;接种的纳豆菌种龄偏大,会造成生产能力下降,菌体过早自溶。选择合适种龄的纳豆菌种子液有利于纳豆菌的生长和纳豆激酶的形成。因此,选择种龄为 18 h。

2.3　接种量对花生蛋白纳豆菌发酵的影响　在发酵工业中通常采用增加接种量来缩短微生物的发酵周期,接种量越大,停滞期越短,发酵周期缩短,产物提前形成,但若接种量过多也不利于合成产物。由图 5 可知,接种量对纳豆激酶活力的影响较大,在其他发酵条件不变的情况下,当接种量为 4% 时纳豆激酶的活力最大,接种量低于 4% 时酶活较低,这

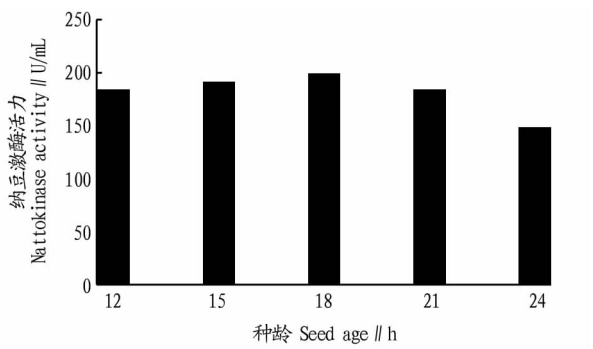

图 3 种龄对纳豆激酶活力的影响

Fig. 3 Effect of different seed age on nattokinase activity

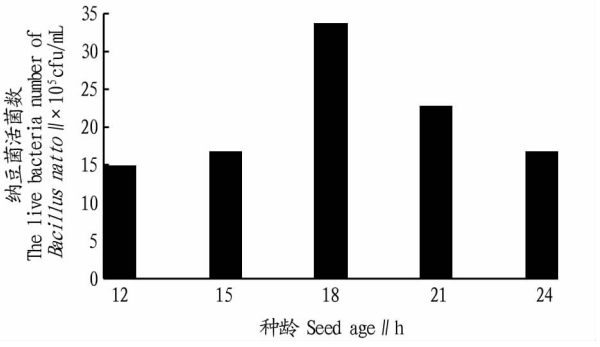

图 4 种龄对纳豆菌活菌数的影响

Fig. 4 Effect of different seed age on the live bacteria number of *Bacillus natto*

是因为菌体生长缓慢从而影响了正常代谢;接种量为 4% ~ 6% 时,随着接种量的增多纳豆激酶的活力呈下降趋势。接种量过低时菌体的生长变慢,会影响正常的代谢;接种量过高时,会出现纳豆菌活菌迅速死亡的现象。由图 6 可知,不同的接种量对纳豆菌活菌数存在差异,在其他发酵条件不变的情况下,当接种量过小时,纳豆菌活菌数较少。

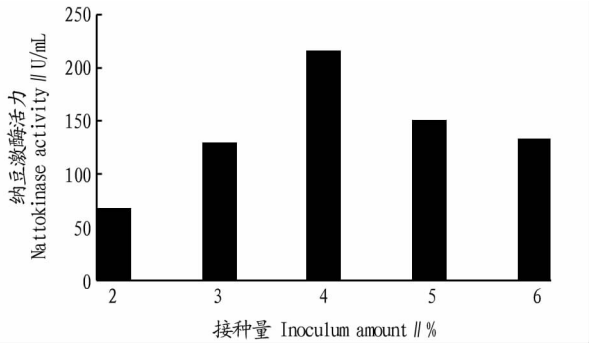

图 5 接种量对纳豆激酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different inoculation amount on nattokinase activity

2.4 初始 pH 对花生蛋白纳豆菌发酵的影响 由于在发酵过程中发酵产物的 pH 会发生变化,所以要选择适宜的初始 pH,最大程度地有利于纳豆激酶的形成。由图 7 可知,当 pH 为 7.0 时最有利于纳豆激酶的形成,因此适宜的初始 pH 是 7.0。

由图 8 可知,纳豆菌生长的最适初始 pH 在 7.0 左右。试验结果表明,当初始 pH 为 5.0 ~ 7.0 时,纳豆菌活菌数呈

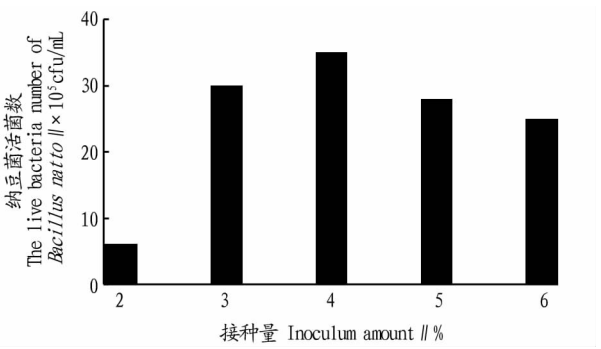

图 6 接种量对纳豆菌活菌数的影响

Fig. 6 Effect of different inoculation amount on the live bacteria number of Bacillu natto

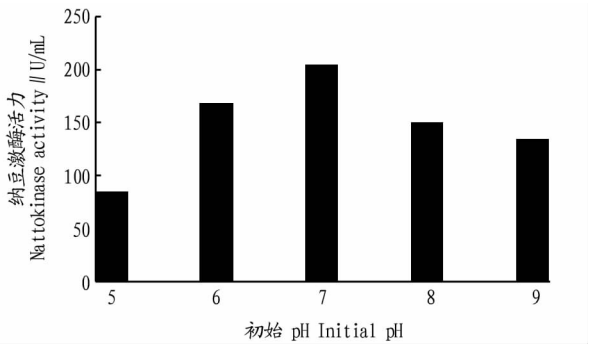

图 7 初始 pH 对纳豆激酶活力的影响

Fig. 7 Effect of different initial pH on nattokinase activity

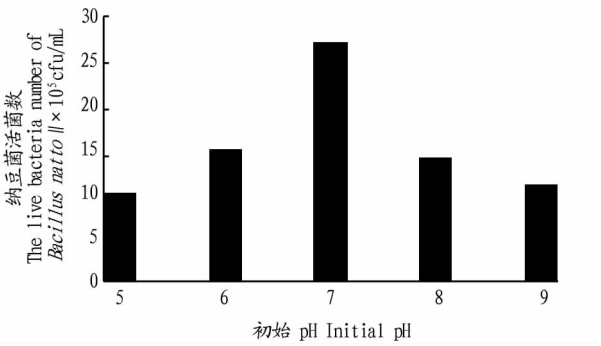

图 8 初始 pH 对纳豆菌活菌数的影响

Fig. 8 Effect of different initial pH on the live bacteria number of *Bacillus natto*

上升趋势,当初始 pH 大于 7.0 时,活菌数开始下降。

2.5 发酵时间对花生蛋白纳豆菌发酵的影响 纳豆菌的发酵时间过短或过长都会对菌体的生长产生影响。由图 9 可知,发酵时间在 24 ~ 72 h 时,随着发酵时间的延长纳豆激酶的活力逐渐增强,发酵时间超过 72 h 后纳豆激酶的活力开始下降。纳豆激酶活力在 72 h 时达到最高。由图 10 可知,发酵时间过长时,纳豆菌活菌数会有所减少。

2.6 发酵温度对花生蛋白纳豆菌发酵的影响 由图 11 可知,不同发酵温度对纳豆激酶活力存在一定的影响。在发酵温度为 37 ℃时纳豆激酶的活力较高,当温度为 45 ℃时纳豆激酶的活力非常低,这可能是由于过高的温度抑制了纳豆菌的生长。一般情况下,温度越高,反应速度越快,微生物的生长和代谢速度会加快,但同时由于酶对温度的热敏性较强,

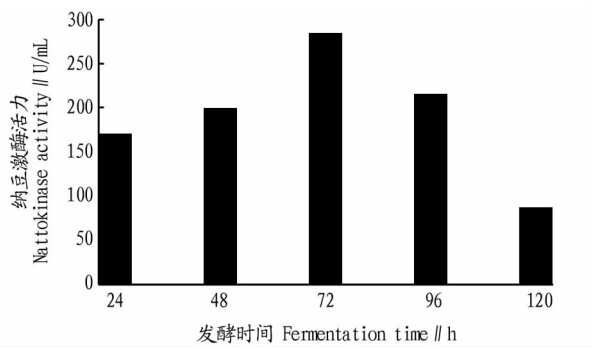

图 9　发酵时间对纳豆激酶活力的影响

Fig. 9　Effect of different fermentation time on nattokinase activity

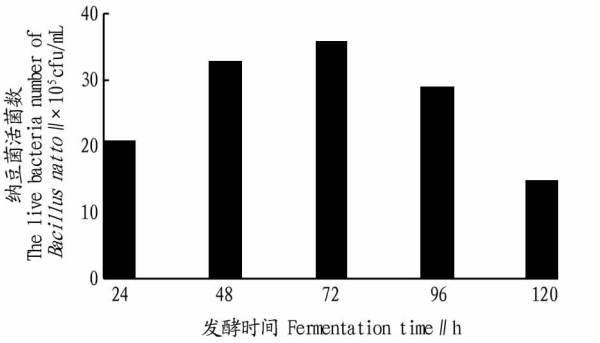

图 10　发酵时间对纳豆菌活菌数的影响

Fig. 10　Effect of different fermentation time on the live bacteria number of *Bacillus natto*

温度越高越容易使其失活,影响其发酵产量,所以在微生物的生长发酵过程中应注意控制反应温度,在保证其活性的同时提高其生长和代谢速度、增加酶产量。适当降低温度将有利于纳豆菌的生长及产酶。

由图 12 可知,不同发酵温度对纳豆菌的生长存在一定的影响。在发酵温度较低时,菌体代谢缓慢,不利于其生长;发酵温度过高时,菌体在开始的短时间内就大量生长,快速消耗营养物质,稳定期维持时间较短,很快就会进入衰亡期,活菌数会开始减少。

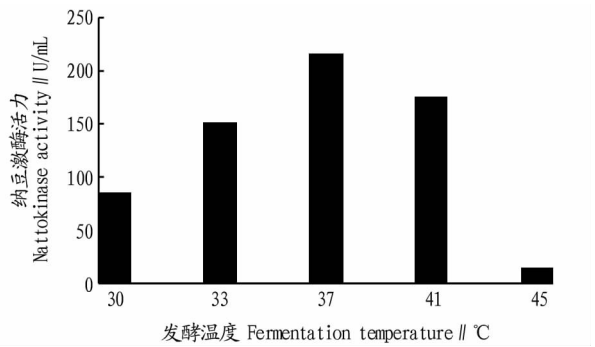

图 11　发酵温度对纳豆激酶活力的影响

Fig. 11　Effect of different fermentation temperature on nattokinase activity

2.7　花生蛋白纳豆菌发酵工艺正交试验结果　根据表 1 正交试验因素与水平,进行 3 因素 3 水平的正交试验,正交试验结果见表 2。

由表 2 可知,$R_C > R_B > R_A$,可见各因素对纳豆激酶活性影响从大到小的顺序为 C、B、A,比较各因素 k 值,得到 3 个因素的最优组合为 $A_2B_1C_2$,即接种量为 4%,发酵时间为 48 h,发酵温度为 37 ℃。由于所得到最优组合已出现在上述正交试验中的 9 组试验中,并通过与其他 8 组试验进行比较,发现纳豆激酶活性最高,实现正交目的,无需再进行追加试验。

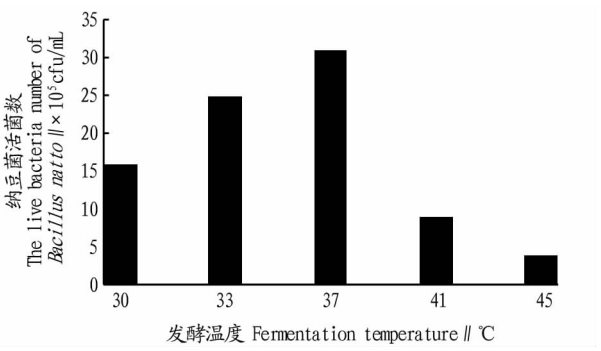

图 12　发酵时间对纳豆菌活菌数的影响

Fig. 12　Effect of different fermentation time on the live bacteria number of *Bacillus natto*

表 1　正交试验因素与水平

Table 1　Factor and level in orthogonal test

水平 Level	接种量(A) Inoculum amount // %	发酵时间(B) Fermentation time // h	发酵温度(C) Fermentation temperature // ℃
1	3	48	33
2	4	72	37
3	5	96	41

表 2　正交试验设计方案与结果

Table 2　Design scheme and results of orthogonal test

试验号 Test No.	因素 Factors A	B	C	纳豆激酶活力 Nattokinase activity U/mL	纳豆菌活菌数 The live bacteria number of *Bacillus natto* $\times 10^5$ cfu/mL
1	1	1	1	154.21	28
2	1	2	2	214.18	30
3	1	3	3	125.86	17
4	2	1	2	271.57	36
5	2	2	3	267.28	26
6	2	3	1	129.05	23
7	3	1	3	242.16	22
8	3	2	1	122.71	26
9	3	3	2	234.02	29
k_1	164.75	222.64	135.32		
k_2	222.63	201.39	239.92		
k_3	199.63	162.98	211.77		
R	57.88	59.67	76.45		
k_1'	25.00	28.67	25.67		
k_2'	28.33	27.33	31.67		
k_3'	25.67	23.00	21.67		
R'	3.33	5.67	10.00		

由表 2 可知,$R'_C > R'_B > R'_A$,可见各因素对纳豆菌活菌数影响从大到小的顺序为 C、B、A,比较各因素 k'值,得到 3

个因素的最优组合为 $A_2B_1C_2$,即接种量为 4%,发酵时间为 48 h,发酵温度为 37 ℃。由于所得最优组合已出现在上述正交试验中的 9 组试验中,并通过与其他 8 组试验进行比较,可观察到纳豆菌活菌数达到最大,实现正交目的,无需再进行追加试验。

综合 2 个指标得出,纳豆菌发酵花生粕最佳工艺条件为接种量 4%,发酵时间 48 h,发酵温度 37 ℃。

对纳豆菌发酵花生粕正交试验表进行方差分析,结果表明,发酵时间对纳豆激酶活力影响较大,而发酵温度和接种量对其影响较小。3 个因素的主次顺序为发酵温度、发酵时间、接种量。

对纳豆菌活菌数的方差分析表明,发酵温度对纳豆菌活菌数具有显著影响,而接种量和发酵时间对其影响较小。3 个因素的主次顺序为发酵温度、发酵时间、接种量。

综合 2 个指标得出,纳豆菌发酵花生粕工艺的最佳条件是接种量为 4%,发酵时间为 48 h,发酵温度为 37 ℃。

3 结论

主要以纳豆激酶活性、纳豆菌活菌数为指标,通过单因素试验和正交试验对花生蛋白纳豆菌发酵工艺条件进行优化。单因素试验发现选择合适种龄的纳豆菌种子液有利于纳豆菌的生长和纳豆激酶的形成。试验结果表明,应选择种龄为 18 h。接种量对纳豆激酶活力和纳豆菌活菌数存在一定的影响,在其他发酵条件不变的情况下,接种量过低时菌体的生长变慢,会影响正常的代谢;接种量过高时,会出现纳豆菌活菌迅速死亡的现象。为保证纳豆激酶活力、活菌数为最佳,应选择初始 pH 为 7.0。纳豆菌的发酵时间过短或过长都会对菌体的生长产生影响。当发酵时间为 72 h 时纳豆激酶活力达到最高,纳豆菌活菌数达到最大。适当降低温度将有利于纳豆菌的生长及产酶。

通过正交试验得出纳豆菌发酵花生粕对纳豆激酶活性的影响从大到小顺序为发酵温度、发酵时间、接种量,最优组合为接种量 4%,发酵时间 48 h,发酵温度 37 ℃。纳豆菌发酵花生粕对纳豆菌活菌数的影响从大到小顺序为发酵温度、发酵时间、接种量,最优组合为接种量 4%,发酵时间 48 h,发酵温度 37 ℃。综合 2 个指标得出,纳豆菌发酵花生粕工艺的最佳条件为接种量 4%,发酵时间 48 h,发酵温度 37 ℃。

在接种量为 4%、发酵时间为 48 h、发酵温度为 37 ℃、种龄为 18 h、初始 pH 为 7.0 的最佳发酵条件下,纳豆激酶的活力为 271.57 U/mL,纳豆菌活菌数为 36×10^5 cfu/mL。

参考文献

[1] SATO T,YAMADA Y,OHTANI Y,et al. Eficient Production of menaquinone(vita min K_2) by a menadione-resistant mutant of *Bacillus subtiils*[J]. Ind Microbiol Biotechnol,2001,26(3):115 - 120.

[2] 齐海萍,钱和. 纳豆——一种值得开发的食品[J]. 中国调味品,2003(2):11 - 14.

[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.

[4] YAMAGUCHI M,TAGUCHI H,GAO Y H,et al. Effect of vitamin K_2 (menaquinone-7) in fermented soybean (*natto*) on bone loss in ovariectomized rats[J]. Bone Miner Metab,1999,17:23 - 29.

[5] MINN M,SINHA S K. The lubrication of poly (etheretherketone) by an aqueoussolution of nattokinase[J]. Wear,2012,296(1):528 - 535.

[6] 朱文优. 菜籽粕的营养价值与毒性[J]. 江西饲料,2009(S1):10 - 12.

[7] FENG J,LIU X,XU Z R,et al. Effect of fermented soybeanmeal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets[J]. Digestive diseases and sciences,2007,52(8):1845 - 1850.

[8] SARKAR P K,JONES L J,CRAVEN G S,et al. A mino acid profilesof kinema,a soybean-fermented food[J]. Food chemistry,1997,59(1):69 - 75.

[9] 王嘉妮,熊焰,胡敏,等. 高效降解蛋白枯草芽孢杆菌的筛选及促建鲤生长的研究[J]. 微生物学通报,2014,41(10):2043 - 2051.

[10] ASTRUP T,MÜLLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys,1952,40(2):346 - 351.

[11] 须见洋行,中岛伸佳,田谷直俊. The method of deter mination of the thrombolytic enzyme nattokinase[J]. Brew Soc Japan,1993,88(6):482 - 486.

[12] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 菌落总数测定:GB 4789.2—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

名词解释

扩展总被引频次:指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年被引用的总次数。这是一个非常客观实际的评价指标,可以显示该期刊被使用和受重视的程度,以及在科学交流中的作用和地位。

扩展影响因子:这是一个国际上通行的期刊评价指标,是 E·加菲尔德于 1972 年提出的。由于它是一个相对统计量,所以可公平地评价和处理各类期刊。通常,期刊影响因子越大,它的学术影响力和作用也越大。具体算法为:

$$\text{扩展影响因子}=\frac{\text{该刊前两年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该刊前两年发表论文总数}}$$

扩展即年指标:这是一个表征期刊即时反应速率的指标,主要描述期刊当年发表的论文在当年被引用的情况。具体算法为:

$$\text{扩展即年指标}=\frac{\text{该期刊当年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊当年发表论文总数}}$$

扩展他引率:指该期刊全部被引次数中,被其他刊引用次数所占的比例。具体算法为:

$$\text{扩展他引率}=\frac{\text{被其他刊引用的次数}}{\text{期刊被引用的总次数}}$$

扩展引用刊数:引用被评价期刊的期刊数,反映被评价期刊被使用的范围。