富硒纳豆芽孢杆菌的选育试验

刘 波

(辽东学院 农学院,辽宁 丹东 118003)

摘 要:利用纳豆芽孢杆菌将无机硒生物转化为有机硒后,进行富硒纳豆的发酵试验。结果表明:纳豆芽孢杆菌能够进行无机硒的生物转化,其转化无机硒的最大浓度为 1.0×10^{-6} mol/L。过量的无机硒对纳豆芽孢杆菌具有明显的毒害作用,少量的无机硒可促进纳豆芽孢杆菌的生长。通过正交试验优化出富硒纳豆的最佳发酵条件为 1 kg 大豆中添加硒 1.0×10^{-6} mol,接种量 7%,培养温度 42 ℃,培养时间 18 h,经检测此条件下发酵的纳豆硒含量为 6.58 μmol/kg,无机硒的转化率达 73.6%。

关键词:纳豆芽孢杆菌;富硒;纳豆

中图分类号:Q 946.91+9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)01-0215-02

纳豆是由纳豆芽孢杆菌发酵大豆而成的健康食品。纳豆中含有丰富的营养物质,尤其是因含有溶栓功效的纳豆激酶而越来越受到人们的关注。

“硒”在自然界地壳中的含量极低,且与其它元素共生,人体难以吸收,全世界共有 40 多个国家缺硒,我国缺硒省份高达 22 个,有 72%的土地面积处于严重缺硒和低硒地带,造成农产品硒含量极低,此外由于环境污染及其它原因也会导致人体“非地源性”的缺硒。而缺硒可导致包括心脑血管病、肝病、肿瘤、肠胃道疾病在内的 40 多种。因而科学补硒刻不容缓。

由于无机硒不易被人体吸收,且过量容易中毒,因此,利用纳豆芽孢杆菌将无机硒生物转化为有机硒后,进行富硒纳豆的发酵,既有助于人体对硒的摄取,也提高了纳豆的营养价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基 菌种:纳豆芽孢杆菌。液体培养基:牛肉膏 5 g;NaCl 5 g;蛋白胨 10 g;蒸馏水 1 000 mL;pH 7.0~7.3。固体培养基:在液体培养基的基础上添加 15~20 g 琼脂。

1.1.2 试剂 纤维蛋白原,凝血酶,亚硒酸钠。

1.1.3 仪器 UV-754 型紫外分光光度计,手提式高压灭菌锅,JG IA 型高压细胞破碎机。

1.2 方法

1.2.1 纳豆芽孢杆菌最大无机硒转化浓度的确定 配制含不同浓度无机硒的固体 LB 培养基,接种纳豆芽孢杆菌,37 ℃培养 24 h,观察不同硒浓度下的纳豆芽孢杆菌生长情况,菌落形态确定最大无机硒的转化浓度。

1.2.2 纳豆芽孢杆菌菌体内硒含量的测定 将培养后的菌液低温离心,收集菌体、破碎、磷酸缓冲液充分透析、低温离心、得到的沉淀真空冷冻干燥至恒重,检测有机硒锌含量。

1.2.3 富硒纳豆芽孢杆菌发酵条件的优化 影响富硒纳豆发酵的因素有发酵温度、发酵时间、硒浓度及接种量。根据此四因素设计正交试验(表 1),优化富硒纳豆的发酵条件。

1.2.4 最佳发酵条件下纳豆芽孢杆菌菌体有机硒的含量测定 利用优化所得的最佳发酵条件下进行富硒纳豆发酵,收集菌体、破碎、透析、干燥,测定有机硒的含量。

2 结果与分析

2.1 不同浓度无机硒对纳豆芽孢杆菌菌落形态的影响

由含不同浓度无机硒的固体平板可以看到,未添加硒的对照培养基,纳豆芽孢杆菌的菌落呈灰白色,边缘不整,微隆起,表面干燥,菌落数较多。与对照组比较,硒浓度为 10^{-3} mol/L 的平板培养基,纳豆芽孢杆菌形成的菌落小、呈红色,菌落数较少;硒浓度为 10^{-4} mol/L 的培养基中,纳豆芽孢杆菌菌落数少且小。表明较高浓度的无机硒不能被完全转化,而在纳豆芽孢杆菌体内富集,抑制了纳豆芽孢杆菌的生长;培养基中无机硒浓度为 10^{-5} mol/L 时,纳豆芽孢杆菌形成的菌落均呈灰白色,菌落数、菌落大小均与对照组相同,说明此浓度无机硒可被纳豆芽孢杆菌完全转化;培养基中无机硒浓度为 10^{-6} mol/L 时,纳豆芽孢杆菌的菌落呈灰白色,菌落大且菌落数多,表明此浓度的无机硒促进了纳豆芽孢杆菌的生长。

作者简介:刘波(1973-),女,辽宁辽阳人,硕士,讲师,现从事食品生产方面的研究。E-mail:liuboldxy@sina.com。

基金项目:辽东学院校级科研资助项目。

收稿日期:2008-08-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　正交试验因素及水平

水平	A 温度/℃	B时间/h	C 硒添加量/mol·kg⁻¹	D接种量/%
1	37	15	0	1
2	40	17	10^{-6}	3
3	42	19	10^{-5}	5
4	45	21	10^{-4}	7

表 2　不同 Se 浓度下纳豆芽孢杆菌菌落形态

Se浓度/mol·L⁻¹	纳豆芽孢杆菌的菌落形态
0	呈灰白色,边缘不整,微隆起,表面干燥,菌落数较多
10^{-3}	菌落小呈红色,菌落数较少
10^{-4}	菌落数少且菌落小
10^{-5}	纳豆芽孢杆菌形成的菌落均呈灰白色,菌落数、菌落大小均与对照组相同
10^{-6}	菌落呈灰白色,菌落大且菌落数多

2.2　纳豆芽孢杆菌菌体内硒含量测定

由表 3 可知,培养基中添加无机硒,浓度为 10^{-5} mol/L 时,无机硒转为有机态的比率最高,在菌体内也达到了较高的有机硒含量。

表 3　纳豆芽孢杆菌菌体内有机硒的含量

样品编号	说明	检测元素	菌体硒含量/μmol·L⁻¹	转化率/%
1	原培养基中硒含量 10^{-5} mol/L	Se	28.6	28.62
2	原培养基中硒含量 10^{-6} mol/L	Se	7.36	73.6

2.3　纳豆芽孢杆菌液体培养添加无机硒浓度的确定

在液体培养基中添加不同浓度的无机硒进行纳豆芽孢杆菌的培养,检测不同浓度无机硒对纳豆芽孢杆菌菌体湿重值、菌落数的影响,由表 4 可知,无机硒浓度为 10^{-6} mol/L 时,菌体湿重值、菌落数最高,与对照相当。因此,确定培养基中无机硒的最大添加量为 10^{-6} mol/L。

表 4　培养基中添加无机硒量与菌体生长的关系

	不添加(Se)	硒浓度/mol·mL⁻¹		
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
湿重/g	0.24	0.14	0.21	0.22
OD 值	0.23	0.05	0.27	0.29
活菌/个·mL⁻¹	4×10^7	0.05×10^7	10.8×10^7	12×10^7

2.4　富硒纳豆芽孢杆菌发酵条件的优化

由表 5 可知,纳豆芽孢杆菌最佳发酵条件为 1 kg 大豆中添加无机硒 10^{-6} mol/mL,接种量 7%,温度 42 ℃;培养时间 18 h。

3　结论

通过试验,证明纳豆芽孢杆菌能够进行无机硒的生物转化。纳豆芽孢杆菌转化无机硒的最大浓度均为 1.0×10^{-5} mol/L。过量的无机硒对纳豆芽孢杆菌具有明显的毒害作用;少量的无机硒可促进纳豆芽孢杆菌的生长。通过正交试验优化出富硒纳豆的最佳发酵条件为 1 kg 大豆中添加硒 1.0×10^{-6} mol,接种量 7%,培养温度 42 ℃,培养时间 18 h,经检测此条件下发酵的纳豆硒含量为 6.58 μmol/kg,无机硒的转化率 66.2%。

表 5　富硒纳豆芽孢杆菌发酵正交试验结果

	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	2	4
6	2	2	1	3
7	2	3	4	2
8	2	4	3	1
9	3	1	3	2
10	3	2	4	1
11	3	3	1	4
12	3	4	2	3
13	4	1	4	4
14	4	2	3	3
15	4	3	2	1
16	4	4	1	2
K_1	940.74	939.86	978.98	924.25
K_2	955.15	951.28	1012.46	941.56
K_3	980.24	968.89	962.15	958.66
K_4	950.55	965.96	848.55	989.52
R	39.43	29.59	106.89	70.12

参考文献

[1]　谢丽琪,欧阳政.酵母同化无机硒作用的研究[J].微生物学报,1990(1):36-40.

[2]　张立伟.硒的营养功能与富硒食品开发[J].武汉食品工业学院学报,1991(3):8-13.

[3]　黄伟昆.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1989.

[4]　贾建波.富硒酸奶[J].食品工业,2003,24(1):33-35.

[5]　鲍时翔,田艳,黄慧琴,等.纳豆菌液体发酵生产纳豆激酶的研究[J].药物生物技术,2002,9(6):322-325.

[6]　Schrauzer G N, White D A. Elemental selenium in organic。selenium compounds[J].Chemistry and biology Bioinorg Chem,1983,8(3):303-305.

[7]　刘庆堂,李锐增,李坚.紫外分光光度法测定龙胆中微量元素硒[J].广东药学,2001,11(6):30-32.

[8]　史丽英.人体必需微量元素—硒[J].微量元素与健康研究,2005,22(4):61-63.

The Screening Experiment of Baccillus Subtilis Natto Enriching Selenium

LIU Bo

(Agricultural Department of Liaodong University, Dandong, Liaoning 118003, China)

Abstract: The experiment proved that Baccillus Subtilis Natto be able to carry on the inorganic selenium the biotransformation as 1.0×10^{-5} mol/L. The colony was effected in vary degree by different concertration of Se. The conditions of fermentation enriching Se in Baccillus Subtilis Natto were optimized with high Nattokinase activity. The optimized conditions were identified as follows: 1.0×10^{-6} mol Se in 1 kg soybean, 7% inoculcum, cultured in 42℃ for 18 h. As a result 6.58 μmol/kg Se was detected in 1 kg Natto, and the convert ratio was 66.2%.

Key words: Baccillus Subtilis Natto; Selenium; Natto

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net