

纳豆菌发酵鹰嘴豆固载条件研究

金爽^{1,2}, 谭金燕¹, 白秀云³, 吕晨¹, 夏欣欣⁴, 付玉杰⁴

(1. 黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江中医药大学博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省中医药科学院,
黑龙江 哈尔滨 150036; 4. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:通过单因素优化实验研究影响固载纳豆菌发酵鹰嘴豆溶栓活力的因素, 优化固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的条件, 为发酵鹰嘴豆的进一步开发利用以及工业化生产提供依据。结果表明, 固载基质种类、基质浓度、氯化钙浓度、菌液浓度和菌球直径对固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力均有较大影响。纳豆菌固载的最优条件为: 固载基质为海藻酸钠, 海藻酸钠浓度 7% (W/V)、氯化钙浓度 2.5% (W/V)、菌液浓度 7.4 log cfu/mL、菌球直径 5 mm, 此固载条件下制备的菌球具有极高的可复用性。采用单因素实验对固载纳豆菌发酵鹰嘴豆工艺进行优化, 得到的优化条件极大地提高了发酵鹰嘴豆的溶栓活力, 具有极高的可行性, 可在实际生产中推广应用。

关键词: 固载; 纳豆菌; 海藻酸钠; 包埋法; 可复用性

中图分类号: TQ 920.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2016)02-0076-04

Study on the immobilization conditions of chickpea fermented by *Bacillus natto*

JIN Shuang^{1,2}, TAN Jin-yan¹, BAI Xiu-yun³, LV Chen¹, XIA Xin-xin⁴, FU Yu-jie⁴

(1. Joint Key Laboratory of Basic Science and Application of North Traditional Chinese Medicine of Province and Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150040;
2. Postdoctoral Research Station of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150040;
3. Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin Heilongjiang 150036;
4. Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang 150040)

Abstract: The fermentation of chickpea with immobilized *Bacillus natto* was optimized to provide references for the further using and industrial production. The fermentation of chickpea with immobilized *Bacillus natto* (natto-chickpea) was optimized and the effect on thrombolytic activity was studied by the single factor experiments. The result showed that the species of immobilized matrix, matrix concentration, calcium chloride concentration, concentration of *Bacillus natto* and bead diameter had significant effects on the thrombolytic activity of natto-chickpea. The optimal immobilization conditions were: concentration of sodium alginate 7% (W/V), concentration of calcium chloride 2.5% (W/V), concentration of *Bacillus natto* 7.4 log cfu/mL, alginate bead diameter 5 mm. Under this optimal condition, the alginate bead has a very high reusability. The process was optimized by single factor experiments which improved highly the thrombolytic activity. The method is of feasibility and can be extended in production.

Key words: immobilization; *Bacillus natto*; sodium alginate; embedding; reusability

固载微生物技术是将特选的微生物固定在选证的载体上, 使其高度密集并保持生物活性, 在适宜条件下能够快速、大量增殖的生物技术^[1]。固载

技术最早是应用于酶的固载, 它将具有生物活性的酶通过吸附或者共价结合的方式固定在基质上, 方便酶与底物的分离。目前为止固载酶技术已在医药、食品、环保、农业、能源开发等多个领域得到广泛应用。

固载细胞技术是酶固载技术的发展, 主要是利用细胞内的酶和酶系。其优点主要是无需进行酶

收稿日期: 2015-10-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31270618); 黑龙江省博士后基金(LBH-Z1520); 哈尔滨市科技局应用技术研究与开发项目(2015RQQXJ044); 黑龙江中医药大学校科研基金(2014bs07)

作者简介: 金爽, 1984年出生, 女, 讲师。

的分离纯化、酶的回收率高、细胞内酶辅因子可再生、稳定性更高、细胞自身的多酶体系可催化反应、抗污染能力强^[2]。

目前固载的方法按照固定载体与作用方式的不同,主要可分为吸附、包埋和交联3种方法。在实际应用中常常将这三种方法结合起来使用,其中包埋法的应用较为普遍^[3]。

鹰嘴豆为豆科草本植物,别名桃尔豆、鸡心豆等,是印度和巴基斯坦的重要蔬菜之一。因其面形奇特,尖如鹰嘴,故称此名。其性味甘、平,有补中益气,温肾壮阳等功效^[4]。鹰嘴豆的淀粉具有板栗香味,制成的鹰嘴豆粉易于消化吸收,是常用的营养食品。前期研究发现,鹰嘴豆经纳豆菌发酵后的产品,可以解决传统经大豆制得的纳豆所存在的感官问题,使得纳豆产品能被更多人接受,为更多人的健康问题作出贡献。因此,进行鹰嘴豆产品的开发与研究有着巨大的经济和社会价值^[5]。

本实验结合固载微生物技术,将纳豆菌固载后用于鹰嘴豆的发酵,研究固载基质种类、基质浓度、氯化钙浓度、菌液浓度和菌球直径对固载纳豆菌发酵鹰嘴豆溶栓活力的影响,优化出最佳的固载条件,并且对固载菌球的重复使用次数进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鹰嘴豆购自甘肃;纳豆菌购自中国微生物菌种保藏中心(CICC 21927);其他试剂均为市售分析纯。HZQ-C空气浴振荡器,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;BPH-9162精密恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液的制备

向新鲜的纳豆菌斜面试管中注入20 mL无菌水,用接种环将菌种刮下,混合均匀后备用。

1.2.2 固载菌球的制备

纳豆菌的固载应用的是凝胶包埋技术,在室温下将均匀的纳豆菌菌液与固载基质混合后滴入到氯化钙溶液中,边滴边迅速搅拌,形成完好的菌球后静置2 h,用无菌水冲洗3次得到固载菌球。

1.2.3 发酵基质的制备

将鹰嘴豆用蒸馏水浸泡24 h后投入到无糖马铃薯液体培养基中,121 °C高压灭菌30 min,制备得到发酵基质。

1.2.4 固载纳豆菌发酵鹰嘴豆过程

将5 g制备的固载纳豆菌球投入到发酵基质中,恒温摇床培养,转速为110 r/min。

1.2.5 溶栓活力的测定

固载纳豆菌球发酵鹰嘴豆溶栓活力的测定方法为纤维蛋白平板法^[2]。

1.2.6 固载菌球活力的检测

采用pNPG法^[6]测定固载菌球的酶活力。以硝基酚- β -葡萄糖苷(pNPG)为底物,以对硝基苯的生成量表示酶活力。

1.2.7 固载基质筛选

采用包埋法对纳豆菌进行固载,对固载基质进行筛选,包括卡拉胶(A)、海藻酸钠(海藻胶)(B)、聚丙烯酰胺凝胶(C)、二醋酸纤维素(D)、甲壳素(E)、硅胶(F)、聚乙烯醇(G)、胶原(H)和琼脂(I)。以溶栓活力为指标,筛选出最佳基质。

1.2.8 固载纳豆菌菌球重复使用次数检测

固载微生物的可复用性在工业生产中是非常重要的因素,其再循环重复使用可以提供连续稳定的酶。因此检测使用3、5、7、9、11、13、15次后固载菌球的酶活力,由此评估固载菌球的可重复操作性。

1.2.9 纳豆菌固载条件单因素优化

测定在不同的固载基质浓度(3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%)、氯化钙浓度(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%)、菌液浓度(7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6 log cfu/mL)和菌球直径(1、2、3、4、5、6、7 mm)下固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力,确定最适的纳豆菌固载条件。

2 结果与分析

2.1 固载纳豆菌菌球基质筛选

由图1可知,采用海藻酸钠作为基质包埋的鹰

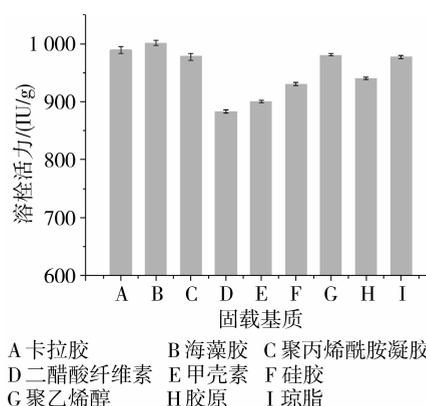


图1 固载基质的筛选

嘴豆发酵后溶栓活性最好。海藻酸钠作为一种天然多糖,具有很好的稳定性和安全性。海藻酸钠具有价廉易得、安全无毒、固载操作简单、反应条件温和等优点,采用海藻酸钠制备的小球还具有较高的传质性能与生物活性,因此海藻酸钠是目前研究应用最广的包埋剂之一。

2.2 固载纳豆菌菌球重复使用次数检测

固载菌球初始酶活力为 75 IU/g,图 2 为固载纳豆菌菌球使用第 1、3、5、7、9、11、13、15 次后酶的剩余活力,固载纳豆菌菌球使用 15 次后,剩余酶活性仍可达初次使用的 85.2%。可见固载微生物具有极高的可重用性,容易应用在食品工业和生产中。

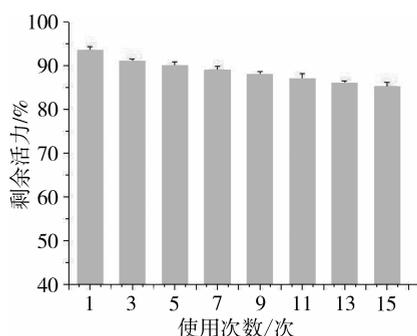


图 2 重复使用次数对固载纳豆菌菌球活力的影响

2.3 纳豆菌固载条件单因素优化

2.3.1 海藻酸钠浓度对纳豆菌固载的影响

为了寻找纳豆菌最适宜的固载条件,实验选取了不同浓度的海藻酸钠(3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%)进行研究,结果表明(图 3a),固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力先随着固载基质海藻酸钠浓度的增大而提高,当海藻酸钠的浓度达到 7% 时,发酵鹰嘴豆的溶栓活力最大,为 $1\ 285.03 \pm 8.05$ IU/g。而后,发酵鹰嘴豆的溶栓活力随着海藻酸钠浓度的提高而逐渐下降,因为凝胶浓度过大会影响酶发生作用时底物和产物的扩散,从而影响到固载菌球的活力。海藻酸钠的浓度也直接对固载菌球的机械强度和成球的难易程度有很大的影响。当海藻酸钠浓度过低时,形成的小球会出现拖尾现象,强度低且透明易碎;而当海藻酸钠的浓度过高时,制备菌球时推压针筒的过程较困难,并且过厚的包埋基质会阻碍菌球内外营养物质和活性氧的传递^[7]。因此,选用海藻酸钠浓度为 7%,此时制备的固载菌球球体完整、光洁、活力较好。

2.3.2 氯化钙浓度对纳豆菌固载的影响

氯化钙浓度对固载菌球的活力也有较大的影响,本实验选择 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0% 等氯化钙浓度进行优化。实验结果(图 3b)表明,当氯化钙的浓度由 1.0% 升高到 2.5% 时固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力逐渐增强,氯化钙浓度为 2.5% 时,固载菌球溶栓活力最强,为 $1\ 331.17 \pm 4.03$ IU/g,而随着氯化钙浓度的继续升高菌球溶栓活力开始有明显的下降趋势。海藻酸钠包埋菌的过程中,氯化钙起到重要的交联作用,低浓度的氯化钙会导致菌球难以成型,而高浓度的氯化钙又会导致菌球壁过厚,阻碍营养物质和活性氧的传递,从而影响菌球活力^[8]。

2.3.3 菌液浓度对纳豆菌固载的影响

图 3c 为不同的菌液浓度(7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6 log cfu/mL)对固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力的影响。菌液浓度采用平板计数法测定。菌液浓度为 7.4 log cfu/mL 时,所制备的固载菌球溶栓活力最高,达到 $1\ 368.03 \pm 16.04$ IU/g。当菌液浓度低于 7.4 log cfu/mL 时,随着菌液浓度的提高菌球的溶栓活力呈现逐渐增大的趋势,这是由于在氧气和营养物质充足的一定空间内,菌球的密度越大,代谢产生的酶越多,酶活力越好。而当菌液浓度超过 7.4 log cfu/mL 时,营养物质和氧气都不充足,此时菌与菌之间的竞争作用越来越大,菌代谢受阻,从而导致酶活力下降^[9]。

2.3.4 菌球直径对纳豆菌固载的影响

除了上述研究的几个影响因素外,固载菌球的直径也是影响菌球活力的重要因素之一。本实验研究了不同直径(1、2、3、4、5、6、7 mm)的固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力,对固载菌球的直径进行优化。实验结果(图 3d)表明,菌球直径在 1~5 mm 之间时,固载纳豆菌发酵鹰嘴豆的溶栓活力随着菌球直径的增大而增强,菌球直径为 5 mm 时发酵鹰嘴豆的溶栓活力最强,达到 $1\ 357.02 \pm 2.52$ IU/g。而当菌球直径大于 5 mm 时,随着菌球直径的增大发酵鹰嘴豆的溶栓活力开始逐渐下降。较小的菌球限制了菌体的生长,抑制了菌的代谢,而当菌球过大时则会因为较小的比表面积而限制固载基质的物质传递过程^[10]。

上述实验结果表明,通过单因素优化实验得到

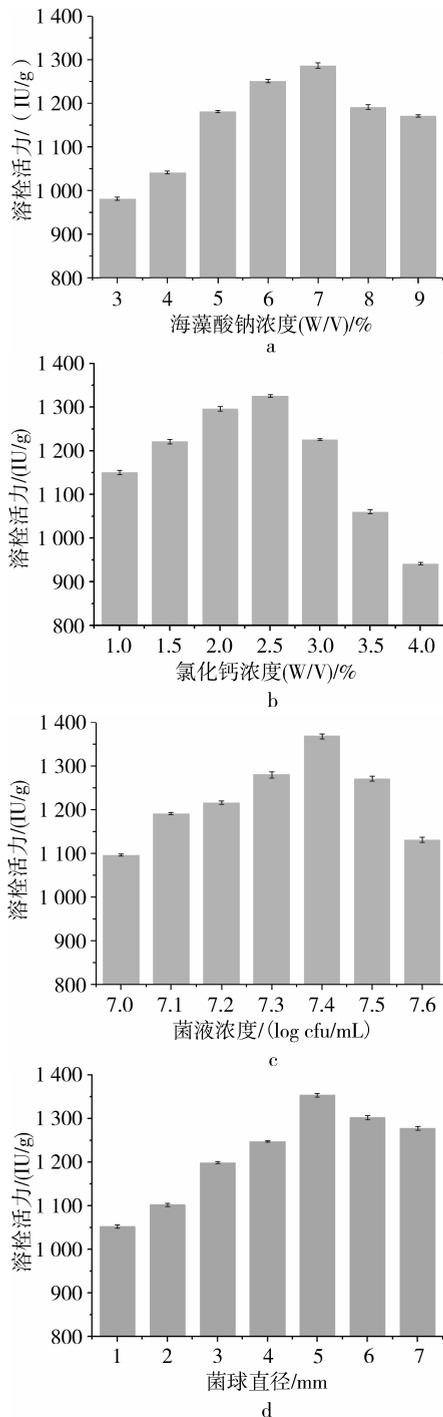


图3 纳豆菌固载条件单因素优化
a 海藻酸钠浓度对溶栓活力的影响;b 氯化钙浓度对溶栓活力的影响;c 菌液浓度对对溶栓活力的影响;d 菌球直径对溶栓活力的影响

图3 纳豆菌固载条件单因素优化

纳豆菌固载的最优条件为:海藻酸钠浓度7%、氯化钙浓度2.5%、菌液浓度7.4 log cfu/mL、菌球直径5 mm。

3 结论

近年来,微生物固载技术迅速发展,在各个领域均显示了其巨大的优越性。本实验将微生物固载技术应用于纳豆菌发酵鹰嘴豆的过程中,以溶栓

活力为考察指标,对影响纳豆菌固载的因素进行优化,研制出了具有较高溶栓活力的发酵鹰嘴豆,产品采用的固载技术无需进行酶的分离和纯化,减少酶活力损失,大大降低了成本,填补了人们对于具有溶栓功效的药食同源保健食品的需求。研究发现纳豆菌固载的最优条件为:固载基质为海藻酸钠,海藻酸钠浓度7%(W/V)、氯化钙浓度2.5%(W/V)、菌液浓度7.4 log cfu/mL、菌球直径5 mm,此固载条件下制备的菌球具有最佳活力,且菌球的重用性良好,为后期系列溶栓产品的开发提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 张桂芝,廖强,王永忠. 微生物固定化载体材料研究进展[J]. 材料导报,2011,17(3):105-108.
- [2] Lu L, Wu J, Song D, et al. Purification of fructooligosaccharides by immobilized yeast cells and identification of ethyl β -D-fructofuranoside as a novel glycoside formed during the process[J]. Bioresource Technology, 2013, 132:365-369.
- [3] 贺琳,曲洋,刘帅,等. 废水生物处理中固定化微生物技术与载体使用[J]. 内蒙古环境科学,2009,21(6):44-47.
- [4] 杨建梅,张慧,余琛,等. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(1):89-90.
- [5] 全智慧,徐墩海. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(12):3111-3112.
- [6] Wang X H, Masakazu I, Riki S, et al. Expression of neutral Purification of β -glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(3):362-365.
- [7] Zhang Y W, Prabhu P, Lee J K. Alginate immobilization of recombinant *Escherichia coli* whole cells harboring L-arabinose isomerase for L-ribulose production [J]. Bioprocess Biosystems Engineering, 2010, 33(6):741-748.
- [8] Yatmaz E, Turhan I, Karhan M. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor [J]. Bioresource Technology, 2013, 135:365-371.
- [9] Grossia M, Lanzonia M, Pompeib A, et al. Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(11):1616-1623.
- [10] Idris A, Suzana W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii* [J]. Process Biochem, 2006, 41(5):1117-1123.