

纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化

杨郁¹, 张丽靖¹, 天知诚吾²

(1. 浙江大学宁波理工学院生化分院, 分子设计与营养工程市重点实验室, 浙江 宁波 315100)

(2. 千叶大学微生物工学研究室, 千叶 松户 648)

摘要: 本实验对日本产优质纳豆中分离纯化得到的15株纳豆激酶菌株进行了研究。通过对其产纳豆激酶能力的测试, 筛选出1 mL发酵液产酶为900 IU的N-15株; 然后通过单因素试验和正交试验, 最终确定其最佳培养条件: 培养基由2%蔗糖和2%豆粕组成, 发酵温度为37℃, 起始pH为7; 用此优化培养基发酵菌株, 菌株产酶量为1033 IU/mL, 比优化前有显著的提高。

关键词: 纳豆激酶; 纳豆菌; 选育; 优化

中图分类号: TS214.9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)10-0022-04

Selection of high Nattokinase-producing Strains and Optimization of the Fermentation Conditions

YANG Yu¹, ZHANG Li-jing¹, Seigo Amachi²

(1. Key Laboratory for Molecular Design and Nutrition Engineering of Ningbo City Ningbo Institute of Technology

Zhejiang University, Ningbo 315100, China)

(2. Laboratory for Industrial Microbiology of Chiba University, Matsudo, Chiba 648, Japan)

Abstract: Fifteen Nattokinase-producing strains separated from Japanese food-natto were investigated in this study. The strain N-15 was selected from the examined strains for its high level of nattokinase-producing activity (900 IU/mL). The fermentation conditions of the strain N-15 for the nattokinase production were optimized by single factor and orthogonal tests. It was found that the optimal soybean residue content, sucrose content, incubation temperature and the original pH value were 20%, 2%, 37℃ and 7.0, respectively. Under the optimized fermentation conditions, Nattokinase was produced with a high activity level of 1033 IU/mL.

Key words: nattokinase; *Bacillus natto*; screened selection; optimization

纳豆激酶是一种可溶解交联纤维蛋白中丝氨酸的蛋白激酶, 是纳豆菌发酵的胞外产物, 对人体无毒副作用, 最早由须见洋行博士在日本的传统食品—纳豆中发现^[1]。经研究, 纳豆激酶除可有效溶解血栓外, 还具有多种生理功能, 比如降低血液粘度、抑制血小板凝固、降血脂、降胆固醇、改善血液循环状况、维持血细胞的正常形态和功能等。作为新一代的抗血栓物质, 具有较大的开发潜能。

本研究从日本产纳豆中分离纯化出纳豆菌, 对其发酵所产的纳豆激酶活力进行测定, 从中筛选出产纳豆激酶活性较高的菌株。同时对其培养基等发酵条件进行优化, 确定其最佳发酵条件。

1 实验材料

1.1 纳豆

收稿日期: 2007-06-28

作者简介: 杨郁(1978-)女, 讲师, 硕士, 主要从事微生物发酵研究工作

日本产纳豆9份, 其中市售7份, 自制纳豆2份。

1.2 主要试剂

凝血酶, 尿激酶, 牛纤维蛋白原(均购自中国药品生物制品检定所); 血浆(由宁波市中心血站提供); 巴比妥缓冲液(pH 7.8)。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(固体, 液体)。

2 实验方法

2.1 纳豆菌分离纯化

用接种环挑取少量纳豆表面的粘性物质, 并移至装10 mL无菌水的试管中充分搅拌, 制成悬浊液。取少量悬浊液, 在琼脂平板上涂划线, 置37℃培养箱中恒温培养24~48 h后, 挑取少量平板上长出的有拉丝的菌落, 镜检观察。继续划线纯化2~3次, 挑取单菌落, 斜面保存。

2.2 纤维蛋白原提取及纤维平板制作

参考 Astup 的方法^[6], 血浆先加入 4 °C 的 500 mL 蒸馏水稀释, 然后加入 4 °C 的饱和硫酸铵溶液 300 mL, 搅拌离心收集沉淀; 用 150 mL 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液溶解沉淀物, 300 mL 4 °C 的蒸馏水稀释, 再用 200 mL 4 °C 的饱和硫酸铵沉淀, 离心, 收集沉淀纤维蛋白原, 溶解在 150 mL 0.05 mol/L 巴比妥缓冲液 (pH 7.8) 中, 冷藏保存。

取 15 mL 纤维蛋白原缓冲液至平皿, 加入 10 IU 凝血酶, 37 °C 孵育, 生成乳白色半透明凝块备用。

或直接用 15 mL 巴比妥缓冲液 (pH 7.8) 溶解适量牛纤维蛋白原, 再加入 10 IU 凝血酶, 37 °C 孵育, 生成乳白色半透明凝块备用。

2.3 纳豆试制

取浸泡 16~24 h 的大豆 30 g, 灭菌锅内 1.0 kg/cm² 煮 30 min。冷却至 85 °C 时接入经 37 °C 液体培养 24 h 的纳豆菌液 2 mL, 混匀, 放入纸杯中, 用保鲜膜覆盖严实, 放入 37 °C 恒温箱中 24 h。取出后再放入 4 °C 冰箱内熟成 1 d。

2.4 纳豆激酶高产菌株的筛选

纳豆菌在 37 °C, 液体培养 24 h, 发酵液离心得到上清粗酶液。取粗酶液 10 μL 于纤维蛋白平板上, 18 h

后测量溶圈直径, 与标准尿激酶样品对照比较纳豆激酶活性。

2.5 纳豆菌及纳豆激酶生长曲线测定

采用平板活菌计数, 绘制菌的生长曲线, 并在不同时间测定发酵液纳豆激酶活性。

2.6 发酵条件优化

对纳豆激酶高产菌株分别进行碳源, 氮源, 温度, pH 等单因素实验。根据单因素实验对实验进行正交设计, 确定最佳发酵条件。

3 实验结果及分析

3.1 纳豆菌的分离纯化

9 份纳豆样品经分离纯化培养, 共得到 15 株菌。平板培养后, 菌落为白色及黄色圆形, 表面皱起, 较为干燥。分别编号为 N-1 至 N-15。15 株菌的格兰氏染色呈阳性; 菌落周边呈细细的菊花状; 40 倍下镜检, 可发现明显芽孢。

3.2 纳豆激酶高产菌株筛选

将纯化出的 15 株菌发酵, 取上清粗酶液滴于纤维平板后, 测定其溶圈, 计算酶活, 结果见图 1。

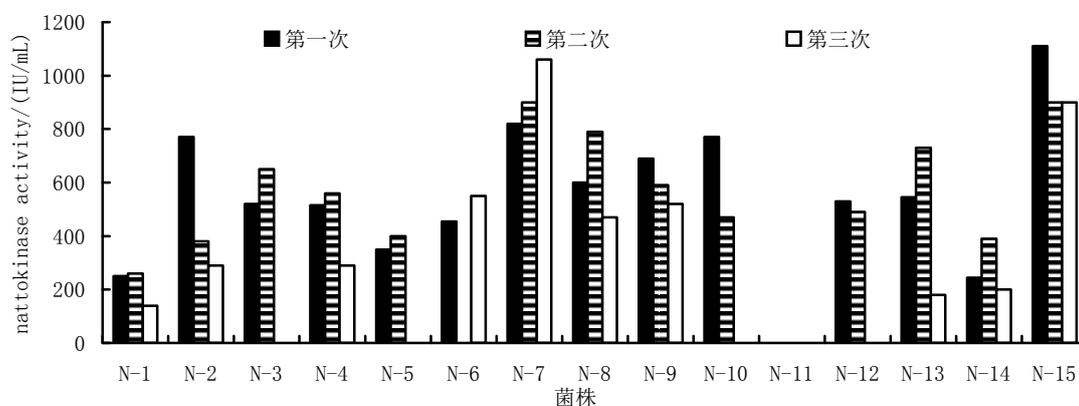


图 1 纳豆激酶活性测定

Fig.1 Nattokinase activity of *Natto bacillus* strains

从图 1 结果可看出, N-15 株的产酶能力最高, 达到了 900 IU/mL 发酵液。其次为 N-7 株。由此选定 N-15 菌株为纳豆激酶高产菌株, 进行试验。

3.3 纳豆试制及纳豆菌生物学特性鉴定

3.3.1 纳豆试制

N-15 发酵后可以产生拉丝, 和市售纳豆极为相似。进行纤溶活性测定, 也有明显的纤溶效果。

3.3.2 生物学特性

培养特征: N-15 株在牛肉膏蛋白胨培养基中生长良好, 菌落呈淡黄色, 表面皱起, 较为干燥, 边缘呈

菊花状;

镜检特征: 单细胞, 成杆状。有明显中生芽孢, 格氏染色阳性。与已报道的纳豆菌典型特征相似。

3.4 生长曲线测定

对产酶能力较高的 N-15 株进行了生长曲线的测定, 结果见图 2。从图 2 看出, 纳豆菌生长相对较迅速, 16 h 后, 活菌数量呈下降趋势。

在测定活菌数的同时, 也对菌株产酶活性进行了测定。结果表明在 24~60 h 之间, 纳豆激酶活性相对较大, 综合考虑活菌数和激酶活性, 最后选定发酵时

间为 24 h。

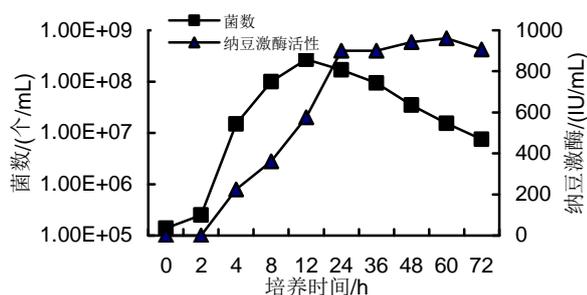


图2 纳豆菌 N-15 株生长及发酵产纳豆激酶曲线

Fig.2 Growth and Nattokinase activity of strains in liquid medium

3.5 发酵条件的优化

3.5.1 碳源选择

本实验选择了 2%含量的葡萄糖, 麦芽糖, 蔗糖, 淀粉, 乳糖和甘油六种低成本的碳源培养纳豆激酶高产菌株, 24 h 后分别测定各发酵液的纳豆激酶活性, 结果见图 3。

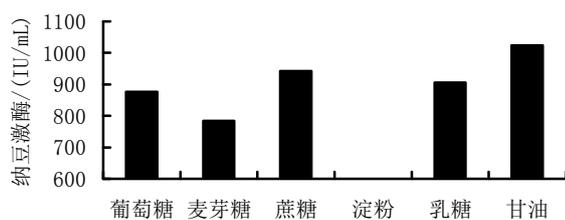


图3 碳源对纳豆激酶活性的影响

Fig.3 The effect of nattokinase activity by carbon source

从图 3 可知, 以甘油和蔗糖为碳源时, 纳豆激酶活性相对较高。同时考虑工业生产成本问题, 故选用蔗糖作为培养碳源。

3.5.2 氮源选择

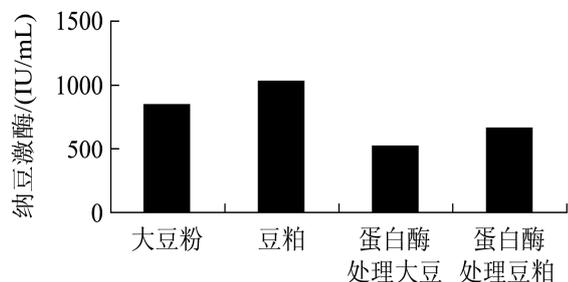


图4 氮源对纳豆激酶活性的影响

Fig.4 The effect of nattokinase activity by nitrogenous source

由于本菌从大豆发酵制品中分离得到, 所以选择 2%的大豆、豆粕及蛋白酶处理的大豆及豆粕作为氮源, 24 h 后比较活性变化, 结果见图 4。由结果可知,

用豆粕发酵时纳豆激酶活性相对较高。

3.5.3 温度选择

本实验选择了 25 °C、30 °C、37 °C 及 40 °C 四个温度对纳豆菌进行液体发酵, 24 h 后测定发酵液纳豆激酶活性, 结果见图 5。由测定结果可以看出, 发酵温度在 37 °C 时, 产酶效果最好。

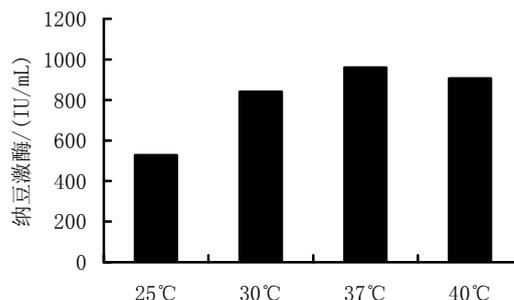


图5 温度对纳豆激酶活性的影响

Fig.5 The effect of nattokinase activity by temperature

3.5.4 初始 pH 选择

本实验选择了初始 pH 分别为 5、5.5、6、6.5、7、7.5 及 8 的液体培养基对纳豆菌进行发酵, 24 h 后测定发酵液纳豆激酶活性, 结果见图 6。由结果可知, 初始 pH 7.0 时, 发酵产纳豆激酶活性达到最高。

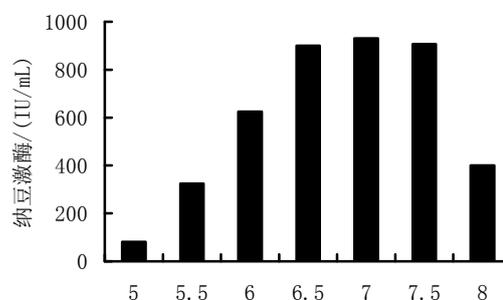


图6 初始 pH 对纳豆激酶活性的影响

Fig.6 The effect of nattokinase activity by pH

3.5.5 单因素正交实验

对碳源 (蔗糖)、氮源 (豆粕)、温度、起始 pH 四个因素, 设计正交实验表 L9(3⁴) (见表 1)。

利用 DPS 数据处理软件对正交试验结果进行正交试验方差分析, 比较各列的极差 R 值, 可以看出 R_A>R_B>R_C>R_D, 即在实验所设定的各因素中, 碳源对纳豆激酶活性影响最大, 其次是氮源和发酵温度, 而 pH 的影响较小, 最佳因素组合为 A₂B₂C₂D₂。从而得到该优化培养基 (ZD) 由 2%蔗糖和 2%豆粕组成, 发酵温度为 37 °C, 起始 pH 为 7.0。

表 1 正交试验结果

Tab.1 Results of orthogonal experiments

试验号	蔗糖/%	豆粕/%	温度/℃	起始 pH	纳豆激酶活性 (IU/mL)
1	1	1	30	6	700
2	1	2	37	7	880
3	1	5	40	8	702
4	2	1	37	8	845
5	2	2	40	6	951
6	2	5	30	7	796
7	5	1	40	7	694
8	5	2	30	8	677
9	5	5	37	6	695
K1	2282	2239	2173	2346	
K2	2592	2508	2420	2370	
K3	2066	2075	2347	2224	
k1	761	746	724	782	
k2	864	836	807	790	
k3	689	692	782	741	
优水平	A2	B2	C2	D2	
极差 R	175	144	83	49	

3.6 优化培养基发酵产酶测定

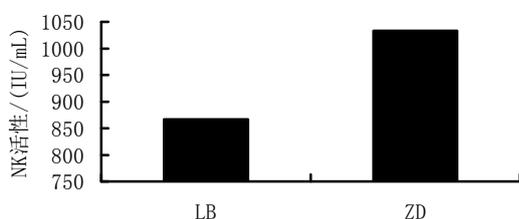


图 7 纳豆激酶活性比较

Fig.7 Nattokinase activity's compare

根据上述结果,用优化培养基配方(ZD)进行发

酵,并与牛肉膏蛋白胨(LB)发酵产酶活性进行比较,结果如图7。优化培养基中N-15菌株纳豆激酶活性为1033 IU/mL菌液,而牛肉膏蛋白胨中菌株的纳豆激酶活性只有867 IU/mL菌液。由此可以看出,用优化后的培养基进行发酵后,纳豆激酶活性也得到了很大程度的提高。

4 结论

4.1 本实验从纳豆中分离筛选出的15株纳豆激酶高产菌株中,最高酶活力的菌株为N-15,酶活力达到900 IU/mL。

4.2 通过对N-15菌株的碳源、氮源、温度和起始pH四个因素进行试验,最终确定其最佳培养条件为:培养基由2%蔗糖和2%豆粕组成,发酵温度为37℃,起始pH为7.0。用此优化培养基发酵纳豆菌,菌液的纳豆激酶活性由原来的867 IU/mL上升到1033 IU/mL,酶活显著提高。

参考文献

[1] 须见洋行,中岛仲佳,田谷直俊.血栓溶解酵素ナシトウキナ活性测定法[J]. J Brew Soc,Japan, 1993,88(6):482-486

[2] 李炳锦,崔京浩,李水林,等.纳豆激酶的研究与应用[J].药物生物技术.2003,10(6):401-404

[3] 陈志文,徐尔尼,肖美燕.纳豆激酶的研究进展[J].食品科技.2002,2:66-68

[4] 薄金岭.纳豆激酶高产菌株的筛选及发酵条件的优化[J].大豆通报.2004,2:22-23

[5] 王成涛,籍保平,张丽萍.纳豆激酶高活性菌株的筛选及其发酵条件的优化[J].食品科学.2004,4:71-74

[6] Astrup TS,Mullertz S.The fibrin plates methods for estimating fibrinolytic activity[J].Arch Biotech Biophysn, 1995,40(2):172-175

(上接第36页)

参考文献

[1] 杨丽英,Sriroth K, Piyachomkwan K.泰国木薯淀粉特性研究.云南大学学报(自然科学版),2003,(25):110-114

[2] 杨双权,刘中邦,刘春才.木薯高产实用栽培技术.云南农业科技,2004,(6):24-25

[3] 谢丽娟,宋少芳.木薯淀粉酸水解制可溶性淀粉.广西化工,1995,(3):38-41

[4] 白速逸,吴素芬,张香香.变性淀粉在食品工业中的应用.食品

工业,2006,(4):21-23

[5] 郝晓敏,王遂,崔凌飞.α-淀粉酶水解玉米淀粉的研究.食品科学,2006(2):141-143

[6] 邓宇.淀粉化学品及其应用.北京:化学工业出版社,2000

[7] 尤新.淀粉衍生物.北京:中国物资出版社,2001,40-41

[8] 刘亚伟.玉米淀粉生产及转化技术.北京:化学工业出版社,2003

[9] 郝晓敏,王遂.α-淀粉酶改性玉米淀粉表征及流变特性性质的研究.现代食品科技,2006,(4):17-18