

# 纳豆激酶液体深层发酵技术的研究

梁淑娃<sup>1</sup>, 黄晓曼<sup>2</sup>, 夏枫耿<sup>1</sup>, 彭中健<sup>1</sup>, 谭颖嫦<sup>1</sup>

(1. 广州市微生物研究所, 广东 广州 510250) (2. 广州市医药工业研究所, 广东 广州 510240)

**摘要:** 本文研究了纳豆菌株 ZN-4 (*Bacillus natto*) 的液体深层发酵条件及其对纳豆激酶活力的影响, 结果表明: 纳豆菌株 ZN-4 液体深层发酵的最佳培养基配方为: 葡萄糖 2%, 大豆蛋白胨 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.02%; 最佳培养基起始 pH 7.0, 接种量为 3%, 最适发酵温度为 35 ℃。在此条件下, 摇瓶、50 L 罐和 500 L 罐发酵酶活最高分别达到 1903 U/mL、2210 U/mL 和 1934 U/mL。

**关键词:** 纳豆菌株 ZN-4; 纳豆激酶; 液体发酵; 发酵优化

**中图分类号:** Q556.9; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)06-0001-03

## Study on Liquid Fermentation of Nattokinase

LIANG Shu-wa<sup>1</sup>, HUANG Xiao-man<sup>2</sup>, XIA Feng-geng<sup>1</sup>, PENG Zhong-jian<sup>1</sup>, TAN Ying-chang<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Microbiology Institute, Guangzhou 510250, China)

(2. Guangzhou Pharmaceutical Institute, Guangzhou 510240, China)

**Abstract:** The effect of liquid fermentation on Nattokinase activity produced by *Bacillus natto* No.ZN-4 strain was studied. Results showed that the optimal culture conditions were 2% glucose, 1% peptone, 0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0, the inoculums size 3% and temperature 35 ℃. Under these conditions, the Nattokinase activities of the strain reached 1903 U/mL in shake-flask, 2210 U/mL for 50 L fermentation, and 1934 U/mL for 500 L fermentation, respectively.

**Key words:** *bacillus natto* No.ZN-4 strain; nattokinase; liquid fermentation; fermentation optimization

纳豆激酶是从日本传统发酵食品纳豆中提取的一种枯草杆菌蛋白酶, 它是一种具有口服溶纤作用物质中最具发展潜力的溶纤蛋白酶<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外掀起了纳豆激酶的研究和开发热潮, 日本、韩国、朝鲜等多个国家已开始积极开发纳豆激酶产品<sup>[2]</sup>。我国研究人员在纳豆激酶高产菌株的筛选<sup>[3]</sup>、发酵条件的优化<sup>[3]</sup>、纳豆激酶的纯化及其酶学性质等方面均进行了研究, 并取得一定进展。但目前国内尚未见有纳豆激酶的口服药剂或保健品投产<sup>[2]</sup>。本文对筛选获得的纳豆菌株 ZN-4 (*Bacillus natto*) 产纳豆激酶的液体发酵条件进行了优化研究, 旨在确定获得最高纳豆激酶活力的最佳发酵工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

纳豆菌株 ZN-4 (*Bacillus natto*), 从市售纳豆中筛选得到, 经鉴定为纳豆菌 *Bacillus natto*, 保存于广

收稿日期: 2007-04-11

基金项目: 广州市科技攻关重点项目 (2004Z2-E4041)

作者简介: 梁淑娃, 高级工程师, 研究方向: 发酵工程

东省种质资源库。

#### 1.1.2 培养基

试管斜面培养基: 普通营养肉汤琼脂培养基。

液体种子培养基: LB 液体培养基。

发酵基础培养基: 碳源 2%, 氮源 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.02%; 其中碳源、氮源如下:

碳源: 葡萄糖, 甘油, 乳糖, 蔗糖, 木糖;

氮源: 大豆蛋白胨, 胰蛋白胨, 酵母粉, 硫酸铵。

#### 1.1.3 主要试剂

纤维蛋白原 (人源)、凝血酶 (人源)、尿激酶、牛血清白蛋白均为标准试剂, 购自中国药品生物制品检定所, 其余试剂及原料均为国产。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 种子液培养

种子用接种环挑取斜面菌种两环, 接种至装有 25 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 35 ℃、150 r/min 摇床培养 24 h。

#### 1.2.2 摇瓶发酵培养

500 mL 三角瓶装 100 mL 发酵培养基, 接种量 3%, 35 ℃、150 r/min 发酵培养 70 h。

### 1.2.3 50 L 罐发酵培养

温度 35 ℃, 通风量 1/ (0.3~0.5) (v/v), 搅拌转速 80~150 r/min, 罐压 0.05~0.08 MPa, 装液量 70% (v/v), 初始 pH 7.0, 接种量 3% (m/v), 发酵周期 70 h。

### 1.2.4 酶活测定方法

纤维蛋白平板法。参照并改良 Astrup 法制备双层纤维蛋白平板, 下层为 2.5% 的琼脂, 上层为一支纤维蛋白原 (人源)。先溶于 3 mL、37 ℃ 无菌水中, 再溶于 20 mL 已灭菌的巴比妥钠缓冲液中; 另取 0.6 g 琼脂糖溶于 40 mL 巴比妥钠缓冲液中灭菌冷却至 60 ℃, 二者迅速混匀, 加入人凝血酶 300 μL (20 U/mL), 摇匀倒入 4 个 φ 9 mm 已凝固的琼脂平板上层, 静置 1 h, 用 3 mm 打孔器打孔。将尿激酶标准品 (20 U/mL, 40 U/mL, 60 U/mL, 80 U/mL, 100 U/mL, 120 U/mL, 140 U/mL, 160 U/mL) 各 7 μL 点样于新配制的纤维蛋白平板上, 放置 10 min, 移入 37 ℃ 培养箱, 保温 17 h 后取出。测定溶圈的垂直直径, 并以垂直直径乘积 (cm<sup>2</sup>) 为横坐标, 以尿激酶浓度 (U/mL) 为纵坐标作图, 得标准曲线  $Y=aX+b$ 。

测定时取发酵液离心, 上清液 (即纳豆激酶粗酶样品) 用巴比妥钠缓冲液稀释至适当浓度, 取 7 μL 点样于纤维蛋白平板上, 并以 80 U/mL 尿激酶作为标准对照, 测量其溶圈垂直直径, 根据标准曲线计算样品活力 Y 值 (U/mL)。其中样品的 X 值=样品溶圈直径乘积 (cm<sup>2</sup>) ÷ 校正系数 f; f=样品平板尿激酶对照溶圈直径乘积 (cm<sup>2</sup>) ÷ 标准曲线中相对应的尿激酶溶圈直径乘积 (cm<sup>2</sup>)。

### 1.2.5 残糖测定方法: 直接滴定法

### 1.2.6 生物量测定方法

分光光度测定法。将发酵悬液稀释 10 倍, 500 nm 处测定其吸光度 (比色杯直径 1 cm), 得 OD<sub>500×10</sub>, 亦即得 OD<sub>500</sub>。

### 1.2.7 pH 值测定

发酵罐 pH 在线测定, 直接显示, 其余培养基及培养液 pH 值用酸度计测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 ZN-4 产纳豆激酶稳定性的考察

菌种高产且遗传性状稳定, 是实现微生物发酵生产的关键。对菌株 ZN-4 产纳豆激酶的稳定性的进行了考察, 将菌株 ZN-4 进行斜面传代, 用摇瓶发酵检测纳豆激酶的含量, 发酵培养基为葡萄糖 2%, 大豆蛋白胨 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.02%, pH 7.0; 每试验设 3 个重复,

结果见表 1。

表 1 菌株 ZN-4 产纳豆激酶的稳定性的结果 酶活单位: U/mL

传代数	1	2	3	4	5	6	7
酶活	1863	1712	1787	1792	1854	1812	1776
传代数	8	9	10	11	12	13	
酶活	1811	1781	1721	1796	1804	1795	

表 1 结果说明, 纳豆菌株 ZN-4 接种传 13 代, 酶活基本稳定。

### 2.2 不同碳、氮源对菌株 ZN-4 产纳豆激酶的影响

发酵基础培养基中以 1% 的大豆蛋白胨为氮源, 分别加入 2% 葡萄糖、2% 甘油、2% 乳糖、2% 蔗糖、2% 木糖等不同碳源; 发酵基础培养基中以 2% 葡萄糖为碳源, 分别加入 1% 的大豆蛋白胨、1% 胰蛋白胨、1% 酵母粉、1% 硫酸铵等不同氮源, 分别进行摇瓶发酵培养, 每试验设 3 个重复, 培养 70 h, 离心, 测上清液的酶活。结果见表 2。

表 2 不同碳、氮源对菌株 ZN-4 产酶的影响

碳源	酶活/(U/mL)	氮源	酶活/(U/mL)
葡萄糖	1866	大豆蛋白胨	1903
甘油	1726	胰蛋白胨	1631
乳糖	1632	酵母粉	1562
蔗糖	1353	硫酸铵	-
木糖	1952		

从表 2 可看出, 不同碳源对纳豆激酶的产生有一定的影响, 以木糖最高, 葡萄糖次之, 与谢秋玲等<sup>[2]</sup>的研究结果基本一致。由于葡萄糖来源广, 且价格便宜, 适宜于工业化生产, 故本研究选用葡萄糖作为碳源。当以大豆蛋白胨, 胰蛋白胨, 酵母粉, 硫酸铵为氮源时, 除硫酸铵不产酶外, 大豆蛋白胨, 胰蛋白胨, 酵母粉都能产酶, 其中以大豆蛋白胨为氮源时, 酶活最高。

### 2.3 不同发酵温度对菌株 ZN-4 产纳豆激酶的影响

温度对菌体的生长影响很大, 菌体量又直接影响到酶的分泌, 因此, 必须选择最佳的发酵温度。

将发酵基础培养基 (碳源为 2% 葡萄糖; 氮源为 1% 大豆蛋白胨) pH 调至 7.0, 分别在 30 ℃、35 ℃、37 ℃、43 ℃、47 ℃ 下摇瓶培养 70 h 后测培养液酶活, 结果见图 1。结果表明发酵温度对产酶影响较大, 以 35 ℃ 为产酶最适温度。

### 2.4 培养基初始 pH 值对菌株 ZN-4 产纳豆激酶的影响

将发酵培养基用 NaOH 或 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液调成 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 进行摇瓶培养, 70 h 后测定纳豆激酶的活性。结果如图 2 所示。结果

表明, ZN-4 菌株产纳豆激酶的培养基初始 pH 范围较广, 初始 pH 6.5~8.0 为适合, 以初始 pH 7.0 产纳豆激酶最高。

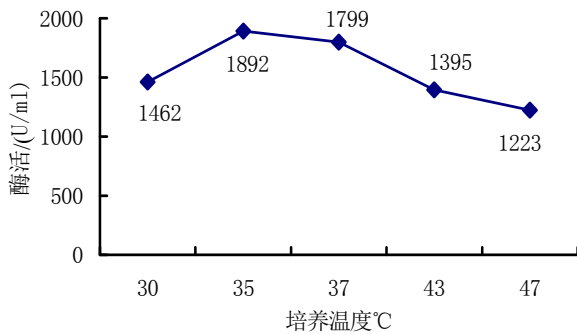


图 1 不同培养温度对产酶的影响

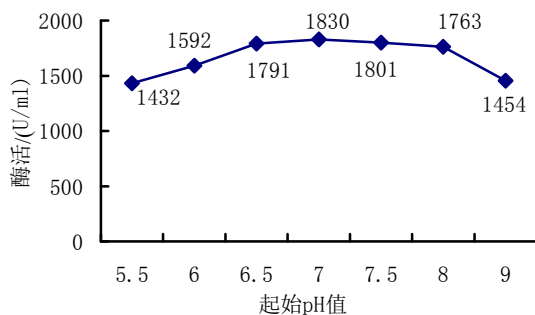


图 2 培养基初始 pH 值对产酶的影响

### 2.5 不同接种量对菌株 ZN-4 产纳豆激酶的影响

将新鲜培养的液体种子分别以 1%、2%、3%、4%、5%接种量接种于发酵培养基中, 摇瓶培养 70 h 后测定酶活, 每试验设 3 个重复, 结果见图 3。

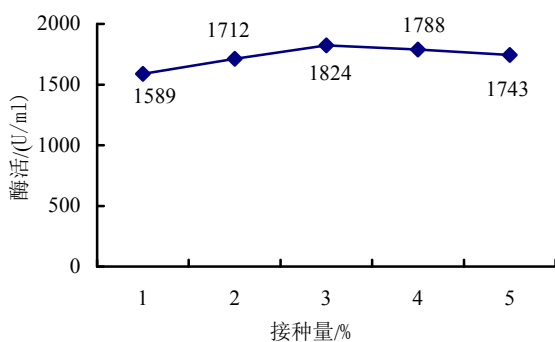


图 3 不同接种量对产酶的影响

图 3 结果表明, 以 3%接种量产纳豆激酶为最高。

### 2.6 50 L 罐发酵中试及结果

采用摇瓶试验获得的发酵优化培养基配方及发酵工艺条件, 并对通风量、搅拌速度等条件作适当的放大, 进行了 5 罐次 50 L 罐发酵试验, 结果见表 3 和图 4 (图 4 根据其中一罐的发酵情况所作)。

从表 3 可知, 5 罐次 50 L 罐发酵都很成功, 发酵

时发酵液的酶活在 1626~2210 U/mL, 平均为 1885 U/mL, 性能较为稳定, 这为进一步的扩大生产提供了依据。由图 4 可知, 此罐次发酵的产酶高峰在 56 h, 其它 4 罐次发酵的产酶高峰都在 55~65 h 之间。据此, 可考虑在发酵 55~65 h 放罐。

表 3 50 L 罐发酵中试结果

罐次	1	2	3	4	5	平均值
酶活/(U/mL)	1626	124	1949	1818	2210	1885

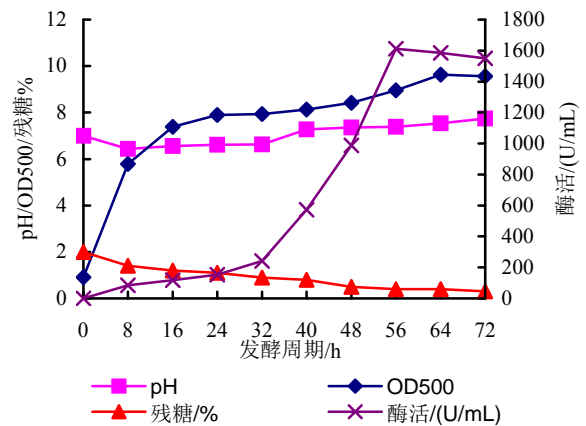


图 4 纳豆菌 ZN-4 50 L 罐发酵代谢情况

### 2.7 500 L 罐发酵生产试验

根据 50 L 罐发酵的工艺条件并作适当的放大, 我们进行了 3 罐次 500 L 罐发酵生产试验, 结果显示, 此菌株在 500 L 罐中发酵的代谢变化情况与在 50 L 罐发酵基本相同, 3 罐的发酵酶活力分别是 1721 U/mL、1682 U/mL 和 1934 U/mL, 均达到了较高的产酶水平。

## 3 结论

纳豆菌株 ZN-4 接种传 13 代, 其液体发酵产纳豆激酶活力的特性稳定, 该菌株液体发酵的优化培养基为: 葡萄糖 2%, 大豆蛋白胨 1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.02%, pH 7.0; 接种量为 3%, 最适发酵温度为 35 °C。在此条件下, 摇瓶、50 L 罐和 500 L 罐发酵酶活最高分别达到 1903 U/mL、2210 U/mL 和 1934 U/mL。

## 参考文献

- [1] Martin M, Kouhei M. Natto and its active ingredient nattokinase a potent and safe thrombolytic agent [J]. Alternative & complementary therapies, 2002(6):157-164
- [2] 王聪,孔繁东,祖国仁.纳豆激酶的研究现状与展望[J].食品研究开发,2004,25(6):17-20
- [3] 谢秋玲,郭勇.纳豆激酶液体发酵条件的优化[J].华南理工大学学报(自然科学版),1999,27(5):127-131