

高大响,黄小忠,张雪松. 1 株产纳豆激酶芽孢杆菌固态发酵工艺的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):377-379.

1 株产纳豆激酶芽孢杆菌固态发酵工艺的优化

高大响,黄小忠,张雪松

(江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400)

摘要:采用单因素试验和正交试验,以豆粕、豆饼粉为原料对纳豆芽孢杆菌固体发酵生产纳豆激酶的工艺条件进行优化。结果表明,豆粕比豆饼粉更适宜作为发酵原料;以豆粕为原料进行固体发酵的最佳条件为:豆粕:麸皮=3:1(质量比),初始 pH 值 8.0,初始含水量 65%,接种量 10%,培养温度 33℃,发酵 4 d 达到发酵终点,该工艺下产酶量可达到 3 691 IU/g。

关键词:纳豆芽孢杆菌;纳豆激酶;固体发酵;优化工艺

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0377-03

纳豆激酶(natto-kinase,NK)是从日本传统食品纳豆中提取出来的一种具有溶血栓功能的丝氨酸蛋白酶^[1-2]。目前治疗血栓病的常用药品有链激酶(SK)、尿激酶(UK)、重组组织纤溶酶原激活剂(t-PA)、尿激酶原(pro-UK)等,但这些药品具有毒副作用大、在体内半衰期短或价格昂贵等缺点^[3]。纳豆激酶作为一种新型溶栓药物,与当前使用的同类产品相比,具有安全、无毒、分子量小易吸收等优点。我国已有学者开展了纳豆芽孢杆菌液体发酵条件研究^[4-6]。液态发酵通常选用葡萄糖、酵母膏、胰蛋白胨、黄豆汁等作为原料,成本高,难以规模化生产。固体发酵具有成本低、设备简单、原料广泛、产酶活力高、易推广的优点^[7-8]。油脂企业生产油脂产生大量豆粕和豆饼,蛋白质含量高,一般在 40% 左右,以其作为氮源,再添加其他农副原料,生产纳豆激酶,既实现了农副产品的有效利用,又降低了生产成本,提高了产品的附加值。本研究以筛选的 1 株产纳豆激酶活力高的芽孢杆菌为研究对象,采用豆粕、豆饼、麸皮、米糠等原料,进行固体发酵,对其发酵产酶条件进行研究,以期为其规模化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*),由江苏农林职业技术学院筛选并保存。

收稿日期:2013-05-17

作者简介:高大响(1969—),男,安徽颍上人,硕士,讲师,研究方向为农业发酵技术。E-mail:xueshengyj@126.com。

参考文献:

- [1]沙家骏,张敏恒,姜雅君. 国外新农药品种手册[M]. 北京:化学工业出版社,1993:78-81.
- [2]陈秀凤,俞永旦. 氯氟氰菊酯毒理学试验[J]. 浙江预防医学,1999(06):54-56.
- [3]顾宝根,王慧敏,陈隆智,等. 高效氯氟氰菊酯在稻田使用后对水生生物的安全性研究[J]. 农药学报,2006,8(1):56-60.
- [4]陈东海,操庆国. 中国农药废水处理技术现状[J]. 北方环境,2004,29(6):43-46.

1.2 试剂

豆粕、豆饼由张家港东海粮油有限公司提供;大豆为市售;尿激酶标准品(690 IU/支)、纤维蛋白原(74 mg/支)、凝血酶(210 BPU/支)由中国药品生物制品检定所提供;其他药品均为国产分析纯。

1.3 培养基

斜面培养基:蛋白胨 5 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g, pH 值 7.2~7.4

种子培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g, pH 值 7.2~7.4。

1.4 菌体培养与酶液收集

1.4.1 种子液制备 将菌种转接至斜面培养基,37℃培养 14 h。取 1 环活化菌种,接入种子培养基,37℃、200 r/min 摇瓶培养 1 d。

1.4.2 活菌及芽孢率检测 采用倾注法进行活菌计数^[9];芽孢率测定:将一定稀释度的菌液置于 80℃水浴加热 10 min,杀死营养体细胞,采用倾注法计数^[9-10];芽孢率:芽孢数占总菌数的比例。

1.4.3 粗酶液制备 按体积比 15:1 向固体发酵培养物中加入 0.9% 生理盐水,4℃浸提 24 h,5 000 r/min 离心 10 min,得纳豆激酶粗品。

1.5 固体发酵

分别取豆饼粉、豆粕各 20 g,放入 250 mL 三角瓶中,并加入一定量麸皮及米糠,然后加入一定量水,以用手抓起成团、按之散开为度,121℃灭菌 20 min 待用。将一定量种子液接种于固体培养基中,在一定温度下培养,间时拍打,使其均匀生长。

[5]葛湘锋. 高级光催化氧化技术处理有机磷农药废水的研究[D]. 广州:暨南大学,2005:1-6.

[6]张晓文,杜欣,李启成,等. 用电厂粉煤灰处理中药废水[J]. 环境科技,2009,22(1):27-29.

[7]张国卿,王罗春,徐高田,等. Fenton 试剂在处理难降解有机废水中的应用[J]. 工业安全与环保,2004,30(3):17-19.

[8]Chen C H, Xie B. The mechanisms of affecting factors in treating wastewater by Fenton reagent[J]. Environmental Science,2000,21(5):93-96.

另取干大豆 20 g, 粉碎后放入 250 mL 三角瓶中, 其他条件不变, 进行固体发酵, 作为对照。

1.6 芽孢激酶活性测定

1.6.1 标准曲线绘制 利用改进的纤维蛋白琼脂平板方法^[11]测定纳豆激酶活性。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.5)将尿激酶标准品配制为 110、220、340、460、690 IU/mL 等 5 个浓度梯度, 将各浓度尿激酶溶液和发酵收集的供试品溶液用微量进样器注入平板孔内, 10 μL/孔, 37 ℃ 孵育 18 h, 用游标卡尺测量每个溶圈的垂直直径, 计算溶圈面积。以尿激酶活力单位数为横坐标, 溶圈面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.6.2 样品酶活测定 用微量取样器取适当稀释的粗酶制品 10 μL, 加在纤维蛋白平板上, 37 ℃ 孵育 18 h, 测量溶解圈的垂直直径, 计算溶解圈面积, 根据标准曲线求出样品的酶

活力^[12]。

2 结果与分析

2.1 尿激酶标准曲线方程

尿激酶标准曲线方程为: $y = 0.028x + 0.9704$, $r^2 = 0.9936$ 。式中: x 为尿激酶活力, y 为溶圈面积。

2.2 发酵工艺条件对产酶的影响

2.2.1 固体培养基碳氮比对产酶的影响 分别以豆粕和豆粕饼为氮源, 以不同比例麸皮及米糠为碳源, 含水量 50%, 接种量 10%, pH 值 7.0, 置于 37 ℃ 下培养 3 d, 用纤维蛋白平板法测定纳豆激酶的酶活。以在粉碎后大豆中加入相同比例麸皮及米糠的产酶活力作为 100% (以下试验同), 比较不同比例豆渣与麸皮对产酶的影响, 结果见表 1。

表 1 豆粕和豆粕饼对酶活力的影响

碳源	相对酶活 (%)									
	豆粕饼: 碳源 (质量比)					豆粕: 碳源 (质量比)				
	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
麸皮	80	116	105	91	73	90	123	138	130	98
米糠	67	86	102	90	84	85	110	107	90	82

由表 1 可见, 豆粕、麸皮处理下的产酶量要相对高于豆粕粉、米糠; 豆粕与麸皮的质量比为 3:1 时, 产酶量最高。可能是由于豆粕是采用浸提法脱油后的副产品, 残油量低于 4%, 蛋白质含量一般在 43% 以上; 豆粕饼是采用压榨法脱油后的副产品, 压榨法脱油率低, 残油量约 4%, 豆粕蛋白质含量在 40% 以下。同样, 米糠中含有相对较多的脂肪, 麸皮中含有相对较多的蛋白。另外, 麸皮中既含有淀粉等碳水化合物, 还含有多种维生素和金属离子, 如 B 族维生素、生物素以及镁、磷、铁、钙等金属离子, 是微生物必需的生长因子, 同时麸皮使培养基松散, 从而改善通风状态, 有利于微生物产酶。培养基的碳氮比极其重要, 不仅影响微生物菌体的生长, 也影响发酵代谢途径。因此豆粕: 麸皮为 3:1 时更有利于酶的形成。

2.2.2 培养温度对产酶的影响 豆粕与麸皮的质量比例为 3:1, 其他条件不变, 置于不同温度下培养, 发酵测定结果见图 1。由图 1 可见, 该菌在 30 ℃ 左右产酶活力最高。

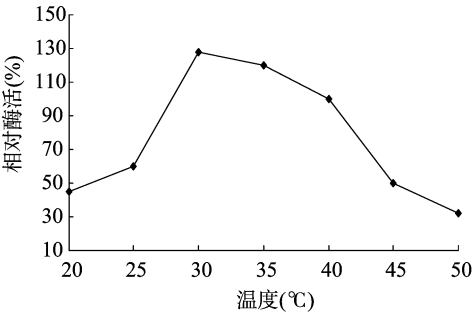


图 1 温度对纳豆激酶活力的影响

2.2.3 初始 pH 值对产酶的影响 由于摇瓶发酵过程中 pH 值难于控制, 只能控制发酵液的初始 pH 值。将不同初始 pH 值的发酵培养基进行固体发酵, 30 ℃ 下培养, 其他条件不变, 结果见图 2。由图 2 可见, 初始 pH 值约 8.0 时产酶活力最高, 初始 pH 值过低或过高都会使酶活下降。

2.2.4 培养基含水量对产酶的影响 以豆粕与麸皮的质量比例为 3:1, 加入一定量的水, 使其含水量分别为 30%、

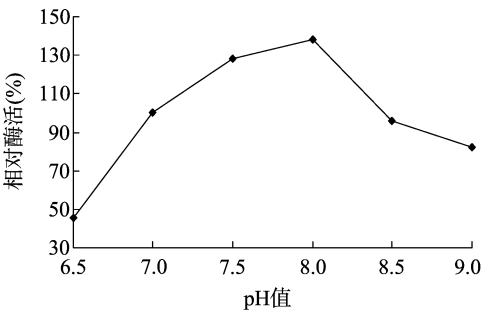


图 2 培养基初始 pH 值对纳豆激酶活力的影响

40%、50%、60%、70%、80%, pH 值为 8.0, 其他条件不变, 发酵测定结果见图 3。由图 3 可见, 培养基最适含水量为 60%。固体发酵中, 培养基含水量直接关系到氧气供应和微生物生长状态, 从而影响产酶量。如培养基含水量过低, 影响营养基质的溶解和传递以及颗粒润胀等, 不利于细胞生长; 培养基含水量过高则影响透气性, 使基质成团, 影响氧气传递和发酵热的散失, 导致酶活力下降。

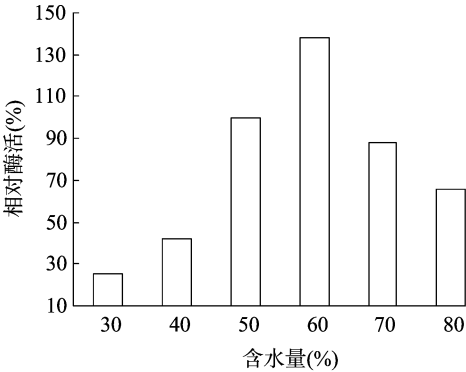


图 3 培养基含水量对纳豆激酶活力的影响

2.2.5 接种量的确定 以种龄 1 d 的液体种子进行接种量试验, 豆粕与麸皮的质量比例为 3:1, 含水量 60%, pH 值为 8.0, 30 ℃ 培养, 发酵测定结果见图 4。从试验结果可以看出,

采取 8%~10% 的接种量较为合适;进一步加大接种量,产酶没有明显变化,这与液体发酵有明显不同。

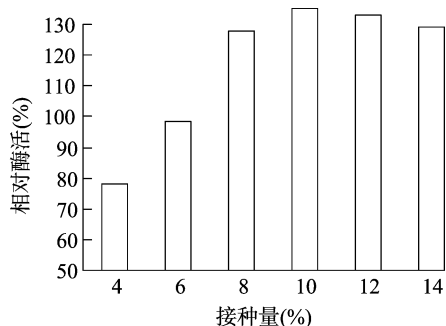


图4 接种量对纳豆激酶活力的影响

2.2.6 发酵时间的确定 按照上述优化的发酵参数进行培养,间隔一定时间取样,比较其相对酶活、芽孢率及活菌数,确定最佳发酵时间。由表 2 可知,在发酵前期(2 d 内),菌体产酶速率缓慢上升;从 2 d 开始快速进入产酶期;在 4 d 左右进入稳定期,活性达到最大。发酵过程中,活菌数、芽孢率与产酶呈正相关。继续发酵对酶活性等因素无显著影响。

表 2 培养时间对纳豆激酶活力、活菌数、芽孢率的影响

培养时间 (d)	相对酶活 (%)	活菌数 ($\times 10^9$ CFU/g)	芽孢率 (%)
1.0	45	0.5	27.5
1.5	54	1.1	40.4
2.0	75	3.8	59.3
2.5	112	10.4	93.8
3.0	147	11.6	94.5
4.0	175	12.4	94.9
4.5	168	12.5	93.2
5.0	170	12.0	92.4

2.3 正交试验分析

根据单因素试验结果,选择豆粕与麸皮质量比、含水量、初始 pH 值、温度等因素,按照 10% 接种量,发酵 4 d,在 250 mL 三角瓶中进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验因素和水平见表 3,正交试验结果见表 4。

表 3 固态发酵工艺正交试验因素及水平

水平	因素			
	A:豆粕:麸皮 (质量比)	B:含水量 (%)	C:初始 pH 值	D:温度 ($^{\circ}\text{C}$)
1	2:1	55	7.5	28
2	3:1	60	8.0	33
3	4:1	65	8.5	38

由表 4 的极差分析可知,影响纳豆激酶活力的因素主次顺序为:温度>豆粕与麸皮质量比>含水量>初始 pH 值。优化后的工艺条件是豆粕:麸皮=3:1(质量比),含水量 65%,初始 pH 值 8.0,接种量 10%,在 33 $^{\circ}\text{C}$ 左右培养 4 d。

2.4 正交试验结果验证

按照上述正交试验最佳工艺参数进行 3 次重复验证试验,结果表明平均酶活为 3 691 IU/g,证明优化结果合理,在实际生产中具有价值。

表 4 固态发酵工艺正交试验结果

编号	因素水平				酶活 (IU/g)
	A:豆粕:麸皮	B:含水量	C:初始 pH 值	D:温度	
1	1	1	1	1	1 031
2	1	2	2	2	1 987
3	1	3	3	3	1 383
4	2	1	2	3	2 577
5	2	2	3	1	1 402
6	2	3	1	2	3 679
7	3	1	3	2	2 074
8	3	2	1	3	1 073
9	3	3	2	1	1 698
k_1	1 467.0	1 894.0	1 927.7	1 377.0	
k_2	2 552.7	1 487.3	2 087.3	2 580.0	
k_3	1 615.0	2 253.3	1 619.7	1 677.7	
R	1 085.7	766.0	467.7	1 203.0	

3 结论与讨论

本研究以大豆为对照,以豆粕和豆饼为氮源,麸皮和米糠为碳源,研究了产纳豆激酶活力情况。通过优化工艺,利用豆粕和麸皮进行固体发酵,酶活可达 3 691 IU/g,高于孙岩等的研究结果^[10],说明筛选的菌种较为优良。纳豆激酶是纳豆芽孢杆菌的次级代谢产物,纳豆菌合成纳豆激酶主要分泌于胞外,该菌还需进一步改良,其产酶机理和合成机制还要进一步研究。

参考文献:

- [1]高瑞萍,刘辉,刘嘉,等.纳豆的研究进展[J].食品与发酵科技,2011,47(1):23-26.
- [2]Sumi H,Hamada H,Tsushima H,et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia,1987,43(10):1110-1111.
- [3]董明盛,江晓,江汉湖,等.溶栓纳豆菌的筛选鉴定及其发酵特性研究[J].南京农业大学学报,2001,24(1):95-98.
- [4]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.
- [5]王正刚,丁贵平,蔡正森.纳豆激酶的发酵工艺研究[J].氨基酸和生物资源,2001,23(2):17-21.
- [6]熊晓辉,梁剑光,熊强.纳豆激酶液体发酵条件的优化[J].食品与发酵工业,2004,30(1):62-66.
- [7]段金柱,曹淡君.固体发酵与液体发酵生产纤维素酶产率与催化性能的比较[J].粮食与饲料工业,2003,13(2):24-26.
- [8]鲍艳霞,钱之玉,陈钧,等.豆渣固体发酵产纳豆激酶的工艺优化及其部分酶学性质研究[J].大豆科学,2005,24(1):43-47.
- [9]杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006.
- [10]孙岩,王海宽,王建玲,等.以豆粕为原料固态发酵产纳豆激酶工艺的优化[J].天津科技大学学报,2011,26(6):7-11.
- [11]Marsh N A,Gaffney P J. The rapid fibrin plate—a method for plasminogen activator assay[J]. Thromb Haemost,1977,8(2):545-551.
- [12]李江伟,冉国侠,陈新梅.豆豉溶栓酶的分离纯化及其体外溶栓作用[J].中国生化药物杂志,1999,20(3):148-150.