

纳豆激酶液态发酵工艺的优化

任武贤, 王星星, 戴东升

(亚宝药业集团股份有限公司, 山西 芮城 044600)

摘要:对由纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)液体摇瓶发酵生产纳豆激酶的发酵条件进行优化,并对5L发酵罐放大工艺进行研究。结果表明:以4% (w/v)的可溶性淀粉作为碳源,种龄10 h,接种量3% (v/v),通气量0.5 vvm,发酵罐转速由220 r·min⁻¹提升至700 r·min⁻¹,使发酵罐中溶解氧保持在20%以上,以上条件更有利于纳豆激酶的表达。条件优化后,摇瓶中纳豆激酶的表达量由低于1 000 IU·mL⁻¹,提高到2 051.3 IU·mL⁻¹(以尿激酶活为标准)。

关键词:纳豆激酶;液态发酵工艺;碳源;溶解氧

中图分类号:TQ920.6

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0128

Research on Liquid Fermentation Process of Nattokinase

REN Wu-xian, WANG Xing-xing, DAI Dong-sheng

(Yabao Pharmaceutical Group Co. Ltd, Ruicheng 044600, China)

Abstract: The liquid fermentation process of nattokinase was studied both in shake flask experiment and 5L fermentor. The results showed that the best condition was 4% (w/v) soluble starch as carbon source, 10 h bacteria age, 3% (v/v) inoculum concentration, 0.5 vvm ventilation, and the rotate speed of fermentor increased from 220 r·min⁻¹ to 700 r·min⁻¹. All of those above could keep the dissolved oxygen in fermentor above 20%. After optimized, the expression quantity of Nattokinase in the shaker increased from lower than 1 000 IU·mL⁻¹ to 2 051.3 IU·mL⁻¹, equal to urokinase.

Keywords: Nattokinases; Fermentation; Carbon source; Dissolved oxygen

纳豆是常见的传统发酵食品,由黄豆通过纳豆菌(枯草杆菌)发酵制成,具有黏性,不仅保有黄豆的营养价值、富含维生素K2、提高蛋白质的消化吸收率,更重要的是发酵过程产生了多种生理活性物质,具有溶解体内纤维蛋白及其他调节生理机能的保健作用。须见洋行等^[1]在1987年从纳豆中提取出一种具有溶栓功能的物质并将其命名为纳豆激酶(Nattokinase,简称NK),它是由纳豆菌(*Bacillus natto*)发酵纳豆所产生的酶。纳豆菌是好氧的革兰氏阳性菌,属细菌科,芽孢杆菌属,其原始菌株与枯草芽孢杆菌相同,是枯草芽孢杆菌的一个亚种。该酶是一个由275个氨基酸组成的单链蛋白质,其分子量为27 728 Da,能显著溶解机体内外血栓,明显缩短优球蛋白的溶解时间(ELT),并能激活静脉内皮细胞产生纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA)^[2-3]。作为一种新型的溶血栓药物,纳豆激酶与当前使用的溶血栓药物相比,具有成本低、作用迅速、安全性好,以及可通过液体发酵大规模生产等优点^[4]。

在国内液态发酵相关资料的基础上^[5-7],本文通过对纳豆激酶液态发酵培养基及发酵条件进行优化,在提高纳豆激酶产量的同时,减少了发酵时间,降低了生产成本,为工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 纳豆枯草芽孢杆菌由本中心从市售纳豆中分离,筛选获得,并经广东省微生物分析检测中心鉴定为枯草芽孢杆菌,检测报告编号为粤微检2012ZD0175。

1.1.2 仪器及设备 超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州净化)、电热恒温振荡培养器(THZ-Q,太仓华美)、立式灭菌锅(YXQ-LS-70A,上海博迅)、电热恒温培养箱(DHP-9162,上海一恒)、发酵罐(BIO-6005B/G/B/N,上海高机生物)。

1.1.3 培养基 斜面固体培养基:蛋白胨1.0%,牛肉膏0.5%,NaCl 1.4%,琼脂2%,pH7.0~7.2,121℃灭菌20 min;种子培养基:蛋白胨1.0%,牛肉膏0.5%,NaCl 1.4%,pH7.0~7.2,121℃下灭菌20 min;初始发酵培养基:大豆蛋白胨1.0%,可溶性淀粉2.0%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,Na₂HPO₄·12H₂O 0.4%,KH₂PO₄ 0.15%,CaCl₂ 0.01%,调pH7.0~7.2,121℃灭菌20 min。

1.1.4 试剂 纤维蛋白原(Fibrinogen),凝血酶(Thrombin)购自中国食品药品鉴定研究院,尿激酶购自北京金赛,其余试剂均为国产试剂。

收稿日期:2014-04-05

基金项目:山西省科技基础条件平台建设项目(2011091013)。

第一作者简介:任武贤(1960-),高级工程师,主要从事制药及药物研发研究。E-mail:renwuxian@yabaoyaoye.com。

通讯作者:戴东升(1972-),男,高级工程师,主要从事生物制药研究。E-mail:dongshengdai@126.com。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备 用接种环在斜面上取半环菌种,接种至装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,37℃,160 r·min⁻¹ 摇床恒温培养。每隔 2 h 取样,直至 30 h,10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,弃上清,称量菌体湿重,以时间为横坐标,湿重为纵坐标,作为纳豆菌的生长曲线。

1.2.2 摇瓶发酵 在 500 mL 三角瓶中装有 75 mL 发酵培养基,接种量为 3%,35℃,160 r·min⁻¹ 培养 48 h。从原始菌种起,每 24 h 取上一代菌种,接种到下一斜面中,共传代 18 代,摇瓶发酵检测其稳定性。同时考察葡萄糖,3%、4%、5% 可溶性淀粉及种龄为 9,10,11 h 的种子对产酶的影响。

1.2.3 5L 发酵罐液态发酵 发酵罐装液量为 3.5 L,初始 pH 为 7.0,以氨水和乙酸酸调节 pH,接种量为 3%。通气量为 0.5 vvm,搅拌速度为 220 ~ 700 r·min⁻¹ (随着发酵时间的延长而调大),整个发酵周期为 28 ~ 32 h。

1.2.4 电泳检测 以 SDS - PAGE 电泳检测,按要求配制 5% 浓缩胶,10% 分离胶,上样,电泳。染色液染色 15 min,脱色液脱至无色。拍照,分析实验结果。

1.2.5 蛋白含量检测 参照 lowry 等^[8]的方法检测。

1.2.6 酶活性检测方法 参照 Astrup 等^[9]的方法制备双层纤维蛋白平板进行酶活检测。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 及 Bio - rad 凝胶成像系统自带 Quantity One 软件分析处理。

2 结果与分析

2.1 纳豆菌生长曲线

由图 1 可知,从接种到种子培养基前 4 h,纳豆菌几乎没有生长,此时为纳豆菌的生长的延滞期,4 ~ 16 h 为纳豆菌数量快速扩增,为菌株生长的指数生长期,16 h 后进入菌株生长的平稳期。已有研究^[10]表明处于指数生长期尤其是指数生长期中期的幼龄种子产酶活性高,因此确定摇瓶发酵最适种子种龄范围为 9 ~ 11 h。

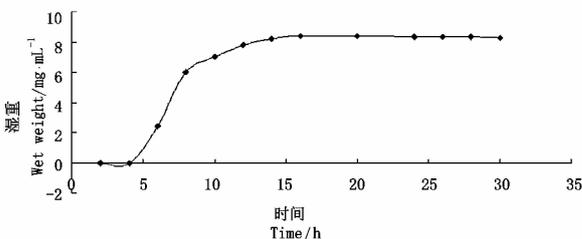
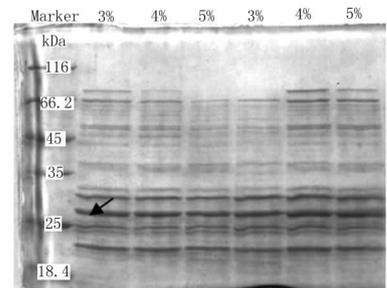


图 1 纳豆菌生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Bacillus natto*

2.2 纳豆菌接种量及稳定性考察

由图 2 可知,在 28 kDa 位置有条带出现,说明有目的蛋白表达,且条带浓度差异不大,说明分泌表达的纳豆激酶的量差不多。由活性检测结果可知 0921 批(第 1 代)及 1008 批(第 18 代)菌株在 42 h 最大活性的溶圈面积都为 207.45 mm² (此时尿激酶 1 000 IU·mL⁻¹ 单位的溶圈面积为 212.37 mm²),说明在此种情况下,纳豆激酶活性接近 1 000 IU·mL⁻¹,两代菌株无明显差异,菌株稳定性好。在以 3%、4%、5% 接种量下,活性无明显差异,考虑到后续发酵罐扩大培养对种子的需求,最终确定接种量为 3%。



从左到右:泳道 1:蛋白标准品(kDa);泳道 2~4:第 1 代 3%、4% 和 5% 接种量;泳道 5~7:第 18 代 3%、4% 和 5% 接种量。

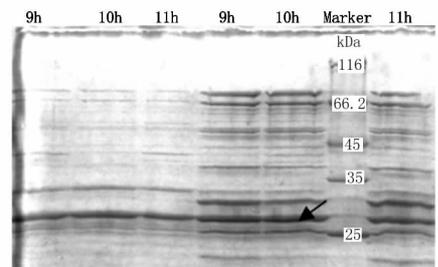
From left to right: Lane 1: Protein standard(kDa); Lane 2-4: The 1st generation with inoculums size as 3%, 4% and 5%, respectively; Lane 5-7: The 18th generation with inoculums size as 3%, 4% and 5% .

图 2 第 1 代菌种和第 18 代菌种不同接种量纳豆激酶表达情况 SDS - PAGE 检测结果

Fig. 2 SDS - PAGE analysis of Nattokinase expression level under different inoculation size between the 1st and 18th bacteria

2.3 种龄及碳源对产酶的影响

从图 3 可知:以葡萄糖作为碳源时,杂带少,目的条带为主带,以可溶性淀粉作为碳源时,杂带多,



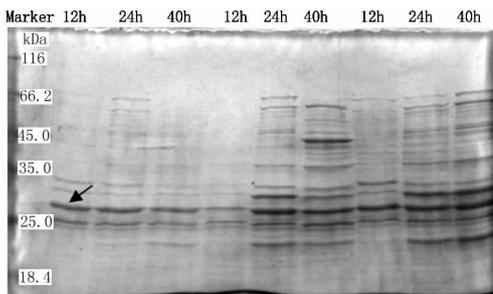
从左到右:泳道 1~3:以葡萄糖为碳源;泳道 4~5,7:以可溶性淀粉为碳源;泳道 6:蛋白标准品(kDa)。

From left to right: Lane 1-3: With glucose as carbon source; Lane 4-5,7: With soluble starch as carbon source; Lane 6: Protein standard(kDa) .

图 3 纳豆激酶在不同条件下表达的 SDS - PAGE 检测结果
Fig. 3 SDS - PAGE analysis of Nattokinase expression level under different conditions

但目的条带的浓度要高于以葡萄糖为碳源,说明纳豆激酶在以可溶性淀粉作为碳源的培养基的表达量要高于在以葡萄糖为碳源的培养基。由活性检测结果可知:纳豆菌种龄为9,10和11 h时,以可溶性淀粉为碳源的产纳豆激酶的活性要高于以葡萄糖为碳源的活性,纳豆菌种龄为10 h时,以可溶性淀粉为碳源的产酶活性最高为 218.17 mm^2 (此时尿激酶 $1000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 单位的溶圈面积为 177.88 mm^2),因此确定以培养10 h的纳豆菌作为种子,以可溶性淀粉作为发酵培养基的碳源。

由图4可知,在以3%为接种量的条件下,随着可溶性淀粉浓度的增高,纳豆激酶目的条带的浓度也随之增高,说明纳豆激酶的表达量随着可溶性淀粉的浓度增高而增高,因此以4%的可溶性淀粉为发酵培养基的碳源浓度。



从左到右:泳道1:蛋白标准品(kDa);泳道2~4:2%可溶性淀粉;泳道5~7:3%可溶性淀粉;泳道8~10:4%可溶性淀粉。

From left to right: Lane 1: Protein standard(kDa); Lane 2-4: 2% glucose as carbon source; Lane 5-7: 3% soluble starch as carbon source; Lane 8-10: 4% soluble starch as carbon source.

图4 纳豆激酶在不同浓度可溶性淀粉为碳源的发酵培养基表达的SDS-PAGE检测结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of Nattokinase expression level under different concentrations of soluble starch (carbon source) in culture medium

2.4 5L发酵罐放大发酵试验

以优化后的基础发酵培养基为发酵培养基,以种龄为10 h,3% (v/w)接种量,进行5L发酵罐(培养基体积为3.5L)的液态发酵,在发酵过程中,分别在发酵进行14,24和28 h和发酵结束的30 h取样,将样品稀释2倍上样检测活性。标准曲线为: $y = 1.8903 - 1.3147x$ ($R^2 = 0.9906$),其活性在前28 h随发酵时间的增加而增长,到第28小时活性达到最大值,为 $2051.3 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,比摇瓶发酵所需时间更短、活性更强。

3 结论与讨论

明飞平等^[11]的研究发现液态发酵纳豆激酶在碳源优化中最佳碳源浓度为2%葡萄糖,而本文中4%可溶性淀粉是最佳碳源浓度,可能原因是纳豆枯草芽孢杆菌有淀粉酶活性,能够直接利用淀粉,但葡萄糖更有利于菌体生长^[12]。

本文在现有研究的基础上经条件优化,工艺改进,确定液态发酵最佳条件:纳豆枯草芽孢杆菌种子

的种龄为10 h,接种量为3%,碳源为4%可溶性淀粉,大豆蛋白胨1.0%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.01%为发酵培养基,发酵罐装液量为3.5 L,37℃,初始pH为7.0,以氨水和乙酸调节pH,通气量为0.5 vvm,搅拌速度为220~700 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (随着发酵时间的延长而调高转速),整个发酵周期为28~32 h。最终发酵罐中纳豆菌湿重能达到 $160.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,发酵液上清得总蛋白 $1.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,纳豆激酶活性超 $2000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相当于尿激酶活力。

参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, et al. A novel fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese natto; A typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987 43(20): 1110-1111.
- [2] Kumada K. Isolation of *Bacillus subtilis* natto which shows high fibrinolytic activity [J]. *Igaku Seibutsugaku*, 1993, 126(6): 299-303.
- [3] Fujita, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [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): 127-130. (Xie Q L, Guo Y. The optimization of fermentation conditions of nattokinase [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 1999, 27(5): 127-130.)
- [5] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2007, 23(10): 22-25. (Yang Y, Zhang L J, Seigo Amachi. Selection of high Nattokinase producing strains and optimization of the fermentation conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(10): 22-25.)
- [6] 洪明章, 孙智杰. 纳豆激酶液体发酵条件优化[J]. 农产品加工·学刊, 2010(7): 54-57. (Hong M Z, Sun Z J. Optimization of liquid fermentation conditions of nattokinase [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2010(7): 54-57.)
- [7] 余功保, 郭爱玲, 秦巧玲, 等. 一株高产纳豆激酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 227-231. (Yu G B, Guo A L, Qin Q L, et al. Screening of high Nattokinase activity producing strain and optimization of fermentation conditions [J]. *Food Science*, 2007, 28(4): 227-231.)
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-75.
- [9] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40: 346-351.
- [10] Ebune A, Al-Asheh S, Duvnjak Z. Effects of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid state fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 54: 241-247.
- [11] 明飞平, 梁淑姝, 夏枫耿, 等. 产纳豆激酶菌株液体及固体发酵工艺初步研究[J]. 中国食品添加剂, 2009(2): 103-105. (Ming F P, Liang S W, Xia F G, et al. Study on liquid fermentation and solid fermentation technology of nattokinase [J]. *China Food Additives*, 2009(2): 103-105.)
- [12] 孙梅, 匡群, 施大林, 等. 培养条件对纳豆芽孢杆菌芽孢形成的影响[J]. 饲料工业, 2006(8): 19-24. (Sun M, Kuang Q, Shi D L, et al. Effects of culture conditions on the sporulation of *Bacillus natto* [J]. *Feed Industry*, 2006(8): 19-24.)