

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^{*}

鲍艳霞¹ 钱之玉² 陈 钧³ 倪孟祥² 王 萍³

(1. 中国药科大学高职学院, 镇江 212003; 2. 中国药科大学药学院, 南京 210038;
3. 江苏大学生物与环境工程学院, 镇江 212013)

摘要 研究纳豆菌固体发酵产纳豆激酶的工艺及其部分酶学性质。采用单因素和正交试验, 对以豆渣为原料纳豆菌固体发酵生产纳豆激酶的工艺条件进行优化, 并利用最佳发酵工艺制备纳豆激酶粗品, 对纳豆激酶的部分性质进行研究。结果表明固体发酵培养基最佳配比: 豆渣: 麸皮=5:2, 初始含水量 65%, 接种量为 10%, 初始 pH 为 8.0, 培养温度 30℃。采用最适培养基和优化工艺, 在 250 ml 三角瓶中进行验证实验, 纳豆激酶的酶的产率可达到 1577U·g⁻¹。酶学性质研究表明, 最适反应温度为 60℃, 37℃以下稳定, 最适反应 pH 为 8.0, 在 pH7-9 溶液中基本稳定。体外溶栓作用表明, 纳豆激酶溶解纤维蛋白的方式是直接溶解, 而不是通过激活纤溶酶原。

关键词 纳豆菌; 固体发酵; 纳豆激酶; 酶学性质

中图分类号 R 931.6 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)01-0043-05

1987年须见洋行从日本食品纳豆中发现了具有溶解血栓的一种枯草杆菌蛋白激酶^[1](纳豆激酶), 该酶在体内除可溶解血栓外, 还可明显缩短优球蛋白的溶解时间, 兼具口服吸收溶栓的优点, 是一种非常具有开发潜力的食源性溶栓药物。

目前在纳豆激酶(NK)的研究中生产的方法有: 固体培养发酵, 液体深层发酵等^[2], 进行固体发酵的培养基主要是以黄豆为主要原料, 加入其它必要的营养成分而得到的。我国是世界上种植大豆的主要国家, 大豆的产量很高, 豆制品的加工也方兴未艾, 然而在豆制品加工过程中作为副产品的豆渣却没有得到有效地利用, 仅作为饲料或作为废弃物处理, 经济效益是很低的, 同时也造成了大量环境污染。而豆渣具有较高的营养, 据测定^[3], 每 100 g 干豆渣中含水分 2.96 g、蛋白质 13.21 g、脂肪 19.18 g、淀粉 3.75 g、灰分 2.76 g、总膳食纤维 59.87 g、可溶性膳食纤维 6.55 g、钙 0.09 g、磷 0.01 g。我国谢秋玲^[4]、王正刚^[5]等相继开展了液体发酵条件的研究。但对以豆渣为原料进行固体发酵的研究还未见报道。固体发酵具有成本低、设备简单、产酶活力高、易推广的优点^[6]。作者以豆渣为主要原料进行固体

发酵、发酵条件的优化以及发酵条件对酶合成影响的研究, 结果证实是完全可行的, 它为充分利用豆资源提供了新途径。

1 材料与方法

1.1 菌种

纳豆菌(江苏大学生环学院制药工程系筛选并保存)

1.2 试剂

凝血酶、纤维蛋白原、标准尿激酶均购自中国生物制品检定所。豆渣购自市场, 其他试剂为国产分析纯。

1.3 培养基

斜面培养基(g·mL⁻¹): 蛋白胨 0.5%, 牛肉膏 0.5%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, pH7.2-7.4。

种子培养基(g·mL⁻¹): 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH7.2-7.4。

固体发酵基础培养基: 250 mL 三角瓶中加入 5 g

* 收稿日期: 2004-08-16

作者简介: 鲍艳霞(1968-), 女, 讲师, 主要从事生物化学教学工作。电话: 0511-4409317 E-mail: Bao12004@tom.com

干豆渣,并加入一定量的水,以用手抓起成团,按之散开为度。121℃灭菌 20 min 待用。

1.4 菌体培养与酶液收集

1.4.1 菌种活化与种子液制备

将保存菌种转接到斜面培养基,37℃培养 14h。取一环活化菌种,接入种子培养基,37℃、200r·min⁻¹摇瓶培养 14h。

1.4.2 固体发酵条件

取种子培养液接种于固体培养基中,37℃培养 96h,间时拍打,使其均匀生长。

1.4.3 纳豆激酶粗品的制备

固体发酵培养物中按 1:15 的体积加入 0.9% 的生理盐水,4℃浸提 24h,5000r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,先加入硫酸铵使饱和度至 35%,离心除去杂蛋白,再加入硫酸铵使饱和度至 75%,搅拌溶解后冷处静置过夜,离心收集沉淀,超滤除盐,得纳豆激酶粗品。

1.5 纳豆激酶活性测定

1.5.1 纤维蛋白平板法^[7]

1.5.2 Folin-酚测蛋白酶活力^[8]

标准曲线的绘制 配制不同浓度的酪氨酸标准溶液,采用 Folin-酚法测其 OD_{680nm} 值,分别以 OD_{680nm} 值和酪氨酸浓度为纵坐标和横坐标,做标准曲线。

酪蛋白的酶解 精确称取 4g 酪蛋白,用少量氢氧化钠溶解后,用 pH7.8 的磷酸缓冲液配制成一定浓度的蛋白溶液,加入一定量的酶液,40℃水浴加热 10 分钟,加入 2ml10% 的三氯乙酸终止反应,离心分离,取滤液 1ml 按 Folin-酚法测其 OD₆₈₀ 值,作为测定纳豆激酶催化酪蛋白水解的最适 pH 和温度的酶促反应速度。

2 结果

2.1 标准曲线

尿激酶标准曲线进行线性回归得方程: $y = 0.344x - 0.3139$ $r = 0.9985$

酪氨酸标准曲线进行线性回归得方程: $y = 7.2854x - 0.0018$ $r = 0.9995$

2.2 固体发酵条件的研究

2.2.1 豆渣与麸皮的含量比对产酶的影响

以豆渣为发酵基质,同时作为氮源,加入不同比例的麸皮作为碳源,37℃培养 96 h,用纤维蛋白平板法测定纳豆激酶的酶活,以固体基础培养基产酶

的相对酶活为 100% 作为考察指标,比较豆渣与麸皮的不同比例对产酶的影响。试验结果见表 1。

表 1 豆渣与麸皮的含量比对产酶的影响

Table 1 Effects of different soybean residue /wheat bran on nattokinase activity

豆渣:麸皮 Soybean residue : wheat bran	5 : 0	5 : 2	5 : 5	2 : 5	0 : 5
相对酶活 Relative activity /%	100.0	133.7	112.1	97.2	90.5

结果表明,添加麸皮有利于微生物产酶。因为麸皮除含有淀粉质等碳水化合物以外,还含有多种维生素和金属离子,如 B 族维生素和生物素以及镁、磷、铁、钙等金属离子,它们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。豆渣:麸皮=5:2 时,产酶最高。

2.2.2 培养基含水量的影响

以豆渣干基为基准,加入一定量的水使其含水量分别达到 50%、60%、70%、80%、90%,比较不同含水量对产酶的影响。

表 2 培养基含水量的影响

Table 2 Effects of moisture content on nattokinase activity

相对湿度(%) Moisture content	50	60	70	80	90
相对酶活(%) Relative activity	62.3	83.3	100.0	92.7	85.4

表 2 的结果表明,最适含水量为 70%。固体发酵中,培养基含水量直接关系到氧气的供应和微生物的生长状态,从而影响产酶量。固体发酵含水量过低,影响营养基质的溶解和传递以及颗粒的润胀等条件,不利于细胞生长。含水量过高影响透气性,使基质成团,影响氧的传递和发酵热的散失,导致酶活力下降。

2.2.3 接种量对产酶的影响

以种龄 14h 的液体种子进行接种量试验,结果见表 3。

表 3 接种量对产酶的影响

Table 3 Effects of the inoculum on nat to kinase activity

接种量(%) Inoculum	6	8	10	12	14
相对酶活(%) Relative activity	91.3	100.0	118.5	82.2	77.6

该试验表明采取 10% 的接种量较为合适,接种量过低会使生长缓慢、发酵周期延长;过高的接种量,会造成培养基含水量不均匀、温度上升过快,不

易控制。

2.2.4 培养基 pH 值对产酶的影响

用 HCl 和 NaOH 调节水 pH, 再用来调节培

表 4 培养基 pH 值对产酶的影响

Table 4 Effects of pH medium on nattokinase activity

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
相对酶活(%)	0	71.9	85.3	100.0	102.1	74.6	69.7	54.4
Relative activity								

结果显示: pH 值为 8.0 左右时产酶最高, pH 值过低或过高则酶活下降。

2.2.5 培养温度对产酶的影响

将基本培养基置于不同温度下培养, 结果见表 5。

表 5 培养温度对产酶的影响

Table 5 Effects of temperature on nattokinase activity

温度(°C)	20	25	30	37	45
Temperature					
相对酶活(%)	62.8	65.5	110.2	100.0	85.9
relative activity					

该试验表明纳豆菌在 30 °C 左右产酶最高。

2.2.6 培养基组成正交试验

根据单因素的试验结果, 选择豆渣 : 麸皮、含水量、pH、温度在 250mL 三角瓶中进行 L₉(3⁴) 的正交

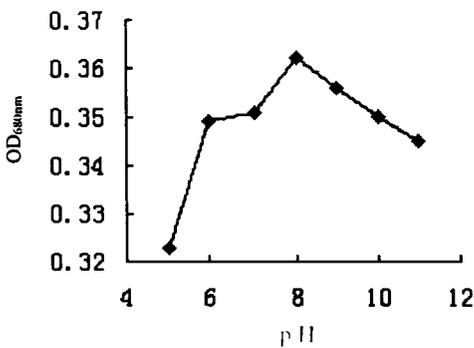


图 1 纳豆激酶的最适 pH

Fig. 1 Optimal pH of NK

在不同温度下反应 10min, 测定蛋白酶活力结果见图 2。酶的最适反应温度为 60 °C, 在 40 °C - 60 °C 之间均具有较高的活力, 高于 70 °C, 酶活力迅速下降。

2.3.2 酶的稳定性

热稳定性将粗酶液用 pH7.4 的磷酸缓冲液适当稀释后, 在不同温度 (20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C) 下各保温 2h 后测其酶活。从图 3 可以看出, 37 °C 以下保温 2h 对酶活不影响, 37 °C 以上保温 2h 酶活下降。超过 60 °C 保温 2h, 酶活力完全丧失, 说明酶对高温较为敏感, 但在 37 °C

培养基的湿度。取不同初始 pH 的发酵培养基进行固体发酵, 结果见表 4。

试验^[9]。

比较极差 R, 含水量、pH 对发酵效果影响较为显著。其最佳配方组成为豆渣 : 麸皮 = 5 : 2, 含水量 65%, 培养基的初始 pH 值为 8.0, 温度为 30 °C, 在此条件下发酵水平的酶的产率可达到 1577 U · g⁻¹。

2.3 纳豆激酶的酶学性质

2.3.1 纳豆激酶最适 pH 和温度

用浓度为 0.1mol/L 的不同 pH 值缓冲液 (pH5 - 11) 稀释粗酶液, 再分别与相应 pH 值缓冲液配制的 1% 酪蛋白底物混合, 40 °C 下反应 10min, 用 Folin 法测定蛋白酶活力, 结果见图 1。酶作用的最适 pH 值为 8, 在 pH6 - 9 的范围内均具有较高活力。

将粗酶液用 pH7.4 的磷酸缓冲液适当稀释后,

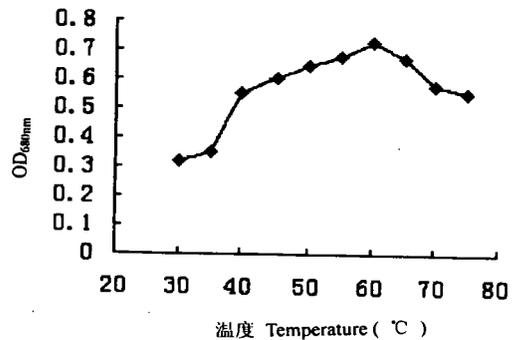


图 2 纳豆激酶的最适温度

Fig. 2 Optimal temperature of NK

以下贮存稳定, 24h 后残余酶活力仍在 95% 以上。

pH 值对酶稳定性的影响 纳豆激酶经 35% - 65% 饱和度硫酸铵盐析后, 取等量盐析液经 8000rpm 离心 30min, 获得等量的沉淀物, 分别以 pH 为 2.2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的缓冲液溶解并于 37 °C 作用 60min、4 °C 放置 24h、室温 24h 后测定溶液的酶活, 结果见图 4。由图可知, 该酶在 pH7 - 9 较稳定。

2.4 纳豆激酶溶解纤维蛋白的作用方式

由于使用的纤维蛋白原等试剂中含有少量的纤

溶酶原,因此无法判断纳豆激酶的活性是激活还是

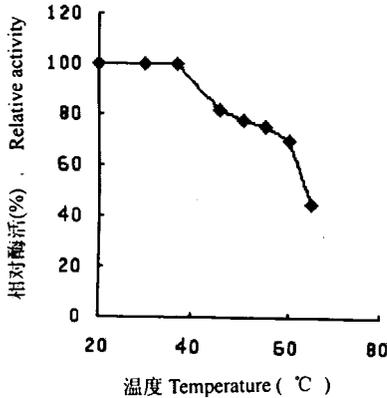


图3 温度对纳豆激酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the stability of NK

制成加热平板^[10],则其中的纤溶酶原因加热失活。尿激酶在加热纤维蛋白平板上不形成溶解圈,而它与纤溶酶原的混合液则表现出溶纤活性,说明尿激酶的溶纤作用是通过激活纤溶酶原。纳豆激酶则无论在纤维蛋白平板还是在加热平板上都形成溶解圈,且它与纤溶酶原混合后纤溶活性变化不大,说明纳豆激酶主要是直接降解纤维蛋白,因而是一种溶纤酶,而不是纤溶酶原激活剂。

3 结论

实验结果表明以豆渣为原料,纳豆菌固体发酵的最佳条件为:豆渣:麸皮=5:2,含水量65%,培养基的初始pH值为8.0,温度为30℃,在此条件下发酵水平的酶活可达到1577 U·g⁻¹。酶的最适反应温度为60℃,37℃以下稳定,最适反应pH为8.0,在pH7-9溶液中基本稳定。体外溶栓作用表明,纳豆激酶溶解纤维蛋白的方式是直接溶解,而不是通过激活纤溶酶原。

直接溶解性质,将纤维蛋白平板经85℃加热30min

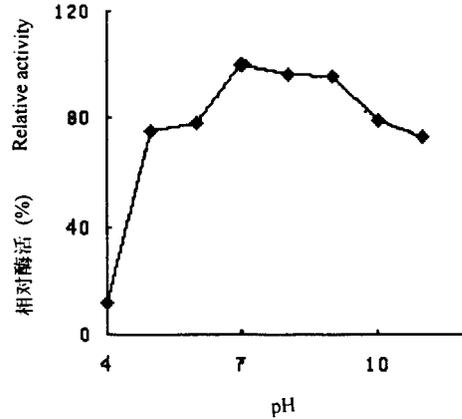


图4 pH对纳豆激酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the stability of NK

参 考 文 献

- 1 Chang C T, Fan M H, Kuo F C. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus IMR - NK* [J]. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2000, 48(8): 3210.
- 2 李道棠. 固态发酵[J]. *生命科学*. 1992(4): 15-17.
- 3 蔺新英. 豆渣纤维营养成分组成及对高血脂、糖尿病干预作用的实验研究[D]. 山东师范大学, 2002.
- 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 段金柱, 曹淡君. 固体发酵与液体发酵产纤维素酶产率与催化性能的比较[J]. *粮食与饲料工业*, 2003, 3: 24-26.
- 7 王敏, 王俊, 邵明远. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纤溶性质和溶栓作用[J]. *药学报*, 1998, 7: 28.
- 8 张龙翔. *生化实验方法和技术*[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981.
- 9 周润兰, 喻胜华. *应用概率统计*[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 182-192.
- 10 金莉蓉, 徐桂芝. 脑梗死的凝血纤溶状态和蚓激酶的作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 1999, 18(1): 48-50.

STUDY ON THE TECHNOLOGIES AND SOME ENZYME PROPERTY OF NATTO - KINASE PRODUCED FROM THE SOLID FERMENTATION OF SOYBEAN RESIDUE

Bao Yanxia¹ Qian Zhiyu² Chen Jun³ Ni Mengxiang² Wang Ping³

- (1. *Autitude Vocational School of China Pharmaceutical University, Jiangsu Zhenjiang 212003;*
- School of Pharmacy of China Pharmaceutical University, Jiangsu Nanjing 210038;*
- Biological and Environment Engineering School of Jiangsu University, Zhenjiang, 212013)*

Abstract Study on the technologies and some enzyme property of Natto - kinase produced from the solid fermentation of soybean residue was conducted. With single - factor and orthogonal test. The results

showed that the optimal medium of solid fermentation was as follows soybean was residue; wheat bran was 5 :2; initial moisture content was 65%; the inoculum size was 10%; initial pH 8.0, and temperature was 30 °C. Natto - kinase activity was 1577 U · g⁻¹ when the strain was grown on the optimal medium under the above culture conditions in 250 mL Erlenmeyer flask. The optimum temperature and pH for hydrolysis of casein were 60 °C and 8.0 respectively. The enzyme was stable up to 37 °C, within the pH range of 7 - 9. The fibrinolysis activity was performed by degrading the fibrous protein directly according to the experiment in vitro.

Key words Natto strain; Solid fermentation; Natto - kinase; Properties

欢迎订阅 2005 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主办的学术性期刊。国内外公开发行, 季刊, 16 开本, 每期 12 万字左右。国内每期订价: 7.00 元, 全年 28.00 元, 邮发代号: 14 - 95。国外每期订价: 10.00 美元(包括邮资), 全年 40 美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司, 北京 399 信箱。国外代号: Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊, 中国科学引文数据库来源期刊。主要刊登有关大豆遗传育种, 品种资源, 生理生态, 耕作栽培、病、虫、杂草防治, 营养施肥, 生物技术及食品加工等方面的科研报告, 学术论文, 国内外研究进展评述, 研究简报, 学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者, 农业院校师生、国营农场、各级农业技术推广部门的技术人员和民营企业科技人员。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业在我刊刊登广告, 广告经营许可证号: 2301004010071。

订阅办法: 全国各地邮局, 如在邮局漏订, 可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路 368 号《大豆科学》编辑部。邮政编码: 150086, 联系电话: (0451) 86668735。

网址: <http://ddkx.chinajournal.net.cn> E-mail: dadoukx@sina.com