

一株高产纳豆激酶菌株的筛选及其发酵条件的优化

余功保, 郭爱玲*, 秦巧玲, 吕均, 王震
(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 通过紫外诱变、纤维蛋白原平板初筛、复筛得到了一株高产纳豆激酶的纳豆芽孢杆菌菌株。研究液体发酵产纳豆激酶的最佳条件, 结果表明最佳培养基为营养肉汤, 最佳培养时间为 24h, 最佳培养温度 30℃。在优化条件下, 发酵液酶活达 640U/ml。该菌株的酶活比原始菌株酶活提高了 258%。

关键词: 纳豆激酶; 紫外诱变; 优化; 纳豆芽孢杆菌

Screening of High Nattokinase Activity Producing Strain and Optimization of Fermentation Conditions

YU Gong-bao, GUO Ai-ling*, QIN Qiao-ling, LU Jun, WANG Zhen
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A strain with high nattokinase activity was screened through the UV-induced mutation and fibrinogen plate and shake-flask liquid fermentation. The optimization of NK liquid fermentation was studied in this paper. The results showed that the optimal

收稿日期 2006-06-05

*通讯作者

作者简介: 余功保(1977-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

因广泛存在于细菌的基因组中, 以 *thyA* 基因缺陷菌株为受体菌, 在质粒上克隆受体菌基因作为外源性基因稳定表达的压力, 完全可以代替抗生素抗性, 如果以 *thyA* 基因作为质粒载体稳定表达的选择标记, 用这样的克隆或表达载体把有用于人和动物的多种外源基因, 如某些营养物质、具有特殊功能的基因导入这种菌中, 然后制成活菌制剂, 需要时口服或饲喂, 食入人和动物体内所需的外源基因的产物, 这种重组工程菌, 集菌体本身和有益基因于一体, 既可加强营养, 又可防治疾病, 在食品工业、医药工业和保健业等领域, 具有巨大的应用前景和潜在的商业价值。

参考文献:

- [1] BELFORT M, MALEY F. Primary structure of the *E. coli* *thyA* gene and its thymidylate synthase product[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1983, 80: 4914-4918.
- [2] HONESS R W, BODEMER W. The A-T rich genome of *Herpesvirus saimiri* contains a highly conserved gene for thymidylate synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83: 3604-3608.
- [3] IWAKURA M, KAWATA M, TSUDA K. Nucleotide sequence of the thymidylate synthase B and dihydrofolate reductase genes contained in one *Bacillus subtilis* operon[J]. *Gene*, 1998, 64: 9-20.
- [4] MARTIN B P, PETER R J, THOMAS J. Bacteriophage resistance of a Δ *thyA* mutant of *Lactococcus lactis* blocked in DNA replication[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 3010-3023.
- [5] PAUL R, FERGAL O G. Cloning and characterization of the thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 2156-2163.
- [6] PINTER K, SANTI D V. Cloning, sequencing and expression of the *Lactobacillus casei* thymidylate synthase gene[J]. *DNA*, 1988(7): 235-241.
- [7] PERRYMAN S M, ROSSANA C, DENG T, et al. Sequence of a c-DNA for mouse thymidylate synthase reveals striking similarity with the prokaryotic enzyme[J]. *Mol Biol Evol*, 1986(3): 313-321.
- [8] SASAKI Y, IT OY, SASAKI T. *ThyA* as a selection marker in construction of food-grade host vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1858-1864.
- [9] TAYLOR G R, HONESS R W. Molecular characterization of the cell cycle-regulated thymidylate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 5298-507.
- [10] EIDEMERDASH H A M, HELLER K J. Application of the *shsp* gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 4408-4412.
- [11] HERMAN R E, MCKAY L L. Cloning and expression of the beta-D-galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *E. coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52: 45-50.
- [12] LIU C Q, KHUNAJAKR N, LIAN G C. Genetic analysis of regions involved in replication and cadmium resistance of the plasmid pND302 from *Lactococcus lactis*[J]. *Plasmid*, 1997, 38: 79-90.

fermentation medium is nutrition meat broth, the optimal fermentation time 24h, and fermentation temperature 30°C. With this optimization, the enzyme activity of the screened strain can reach 640 U/ml. Its enzyme activity is increased 258%.

Key words nattokinase; UV-induced mutation; optimization; *Bacillus subtilis* (natto)

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0227-05

自1987年日本科学家须见洋行发现纳豆中含有纳豆激酶以来, 由于纳豆激酶具有无毒副作用, 体内半衰期长, 成本低廉等其他溶栓剂无法比拟的优点, 有潜力成为新一代抗栓药^[1], 受到了各国医药企业的重视, 同时也受到各国科学家的关心^[2]。因此筛选高产纳豆激酶的菌株就有很大的意义。本实验通过紫外线诱变获得了一株高产纳豆激酶的纳豆芽孢杆菌菌株。

1 材料

1.1 菌株

纳豆枯草芽孢杆菌 华中农业大学食品微生物实验室提供。

1.2 试剂

纤维蛋白原 Sigma公司; 凝血酶 三九集团昆明白马制药有限公司; 尿激酶 Calbiochem公司; 琼脂糖 Biowest公司。

1.3 方法

1.3.1 芽孢悬液的制备

无菌取4g纳豆搅碎, 加40ml无菌水混合均匀, 80℃水浴20min, 然后4800r/min离心10min取上清分装, 4℃保存。

1.3.2 紫外诱变

紫外灯(照射距离30cm)预热30min后, 照射涂布了芽孢悬液的营养琼脂平板表面(0.1ml, 芽孢浓度为 1.81×10^3 /ml)。照射时间分别为: 第一组30s, 第二组60s, 第三组90s, 依此类推共照射20组, 每一组三个平板。得到紫外照射芽孢的致死率曲线。确定诱变时间后, 照射涂布相同浓度、体积芽孢悬液的营养琼脂平板表面, 之后置于37℃ 24h避光培养。

1.3.3 筛选方法

1.3.3.1 平板初筛

借鉴筛选高产抗生素菌株的方法^[3], 把营养琼脂平板分成9部分, 打孔器在每一部分打一琼脂块, 把诱变前后的菌株分别接种在所打琼脂块中央, 菌落长满所打琼脂块后, 把琼脂块移到纤维蛋白原平板(参照中国药典测尿激酶的方法制备^[4])上。

1.3.3.2 液体复筛

对平板初筛得到的酶活高的菌株进行营养肉汤液体发酵, 离心取上清液, 用纤维蛋白原平板筛选相对酶活最高(用直径表示)的菌株。

1.4 液体发酵条件的优化

1.4.1 培养基的选择

根据Junguo Liu等^[5]的方法改变而来, 选择四种氮源和五种碳源。氮源及其对应的浓度: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5g/L、 NaNO_3 10g/L、谷氨酸 18.3g/L、酪蛋白 10g/L。碳源是葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、甘油, 碳源均为20g/L。在研究氮源时, 培养基是基本培养基($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L)加10g/L的葡萄糖和所研究的氮源。在研究碳源时, 培养基是以上优化的氮源加所研究的碳源。同时以营养肉汤培养基和营养肉汤培养基加所研究的碳源或氮源为对照。37℃ 180r/min 发酵28h。

1.4.2 发酵温度和时间的优化

酶活最高的菌株接种到100ml营养肉汤中, 37℃ 150r/min培养20h作为种子, 从种子中各取1ml接入4瓶装100ml营养肉汤的500ml摇瓶中, 分别26、30、37、40℃ 180r/min培养, 并分别在24、48、72、96h取样, -20℃冷冻保藏, 一起用纤维蛋白原平板比较酶活。

1.4.3 培养基初始pH的确定

用1mol/L的HCl和NaOH调节培养基的初始pH, 接种量为1%, 培养24h测其相对酶活, 用溶纤圈直径表示。培养基初始pH分别为6.0、6.5、7.0、7.2、7.4、7.6、8.0、8.5、9.0。

1.4.4 最佳装液量的确定

250ml摇瓶分别装20、30、40、50、60、70、80、90、100ml营养肉汤, 接种量为1%。培养24h, 测相对酶活(用直径表示)。

1.4.5 酶活的测定

酶活的测定以李炳锦等^[6]的方法改变而来。把200、400、600、800、1000U/ml的尿激酶的标准品和待测样品各取5μl点在纤维蛋白原平板上, 37℃培养18h。以尿激酶标准品的溶纤圈直径的乘积为横坐标, 酶活为纵坐标, 作标准曲线, 根据标准曲线得出待测样品酶活。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变

由于诱变剂所处理的细胞中的细胞核愈少愈好, 最好是处理单核的细胞^[3]。如果所处理的是芽孢杆菌, 则应处理芽孢而不是营养体。因为一般芽孢杆菌细胞中有两个核质体而芽孢只有一个, 而且芽孢悬液比较稳

定^[7]。所以提取芽孢进行紫外诱变。

紫外照射不同时间, 得到如图 1 的紫外照射芽孢的

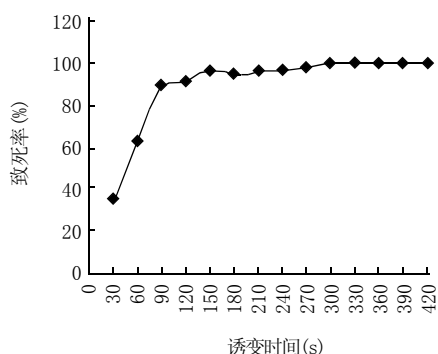


图1 诱变时间与芽孢致死率

Fig.1 Effects of UV-induced mutation time on spore fatality rate

致死率曲线。紫外照射芽孢 6min 时芽孢全部死亡。本实验中为减少工作量, 采取的诱变时间为 4min。诱变结果: 照射 56 个平板, 得到 330 个诱变菌落。

2.2 纤维蛋白原-琼脂糖平板初筛结果

330 株诱变菌株和原始菌株在相同培养条件下培养后, 以原始菌株为对照菌株, 如图 2 测量它们的溶纤圈直径, 得到 43 株的溶纤圈比对照株的大, 为确保结果的准确性, 43 株菌株每个菌株划线分离并随机挑 8 个单菌落, 以原始菌株为对照, 比较酶活, 选出 11 株酶活最高的菌株。

2.3 液体复筛结果



中央为原始菌株。

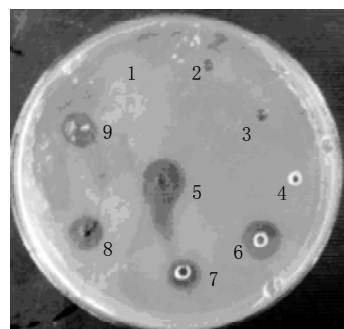
图2 诱变前后的菌株纳豆激酶酶活的比较

Fig.2 Comparison NK activity of induced-strains and initial strain

对平板初筛得到的 11 株酶活高的菌株进行营养肉汤液体发酵, 以原始菌株的发酵液为对照, 筛选酶活最高的菌株。比较溶纤圈的大小, 最终确定编号为 BSN-3 的菌株酶活最高。

2.4 培养基的选择

如图 3 所示, 选择氮源时 1~4 号培养基发酵 28h 仍没产生酶, 而 6~8 号培养基不利于菌株产酶, 这说明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、谷氨酸, 酪蛋白作氮源对纳豆激



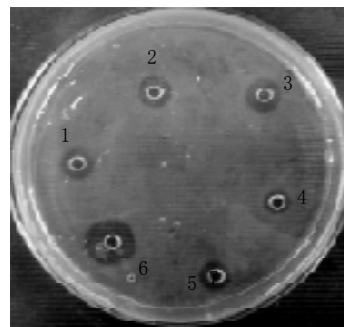
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖; 2. NaNO_3 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 葡萄糖; 3. 谷氨酸、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 葡萄糖; 4. 酪蛋白、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖; 5. 营养肉汤; 6. 营养肉汤 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5g/L; 7. 营养肉汤 + NaNO_3 10g/L; 8. 营养肉汤 + 谷氨酸, 18.3g/L; 9. 营养肉汤 + 酪蛋白 10g/L。

图3 氮源的选择

Fig.3 Screening of the optimal nitrogen sources

酶的产生有抑制作用, 添加无机氮源更不利于酶的产生, 其中硝酸钠的抑制作用最大。虽然多数情况下, 培养基采用低的碳氮比有利于蛋白酶的生产, 作为氮源, 蛋白质的水解物反而不及蛋白质本身好^[8], 但这种情况不适合纳豆芽孢杆菌。选择碳源时, 甘油、蔗糖、麦芽糖、木糖、葡萄糖对纳豆激酶的产生均有抑制作用, 其中木糖对纳豆激酶的产生抑制作用最大。这与薛健等的木糖是最佳碳源的结果不同^[9], 与郎亚军等^[10]的葡萄糖是最佳碳源的结论也不同, 这可能是所用的菌株不同的原因。BSN-3 菌株用营养肉汤发酵酶活最高。

2.5 最佳发酵温度和时间



1. 甘油 + 营养肉汤; 2. 蔗糖 + 营养肉汤; 3. 麦芽糖 + 营养肉汤; 4. 木糖 + 营养肉汤; 5. 葡萄糖 + 营养肉汤; 6. 营养肉汤。

图4 碳源的选择

Fig.4 Screening of the optimal carbon sources

由于纤维蛋白原平板在制作过程中存在差异, 所以只有从同一块纤维蛋白原平板上得出的数据才有可比性, 从不同的纤维蛋白原-琼脂糖平板上得出的数据不能比较。表 1、2、3 的数据分别从不同的纤维蛋白原平板上点样, 37℃放置 12h 得出。从表 1、2、3 可以看出, BSN-3 菌株的最佳发酵温度为 30℃, 这与熊晓辉等^[11]的

结论一致, 最佳发酵时间为 24h, 这与张锋等^[12]的结论一致。30℃发酵 24、48、72、96h 酶活性一致。

表 1 不同温度下 24、72h 的酶活比较
Table 1 Effects of 24 h and 72h cultured-time on nattokinase activity at different temperture

温度(℃)	24h				72h			
	26	30	37	40	26	30	37	40
溶纤圈直径(mm)	9.0	12.0	11.0	11.0	10.5	12.0	11.5	11.5

表 2 不同温度下 48、96h 的酶活比较
Table 2 Effects of 48h and 96h cultured-time on nattokinase activity at different temperture

温度(℃)	48h				96h			
	26	30	37	40	26	30	37	40
溶纤圈直径(mm)	10.0	12.5	11.5	11.5	10.5	12.5	11.5	11.5

表 3 30℃和 40℃时不同培养时间的酶活比较
Table 3 Effects of different cultured -time on nattokinase activity at 30℃ and 40℃

时间(h)	30℃				40℃			
	24	48	72	96	24	48	72	96
溶纤圈直径(mm)	11.0	11.0	11.0	11.0	9.5	9.5	10.0	10.0

2.6 培养基初始 pH 的确定

培养液不同初始 pH 对酶活的影响见图 5。pH6.5 和 pH7.0 时酶活最高, 这与熊晓辉的结论一致^[11], pH 超过 8.0 时, 不利于酶的产生。pH9.0 时, 纳豆芽孢杆菌不生长, 纳豆芽孢杆菌的合适产酶条件是中性或偏酸的环境。

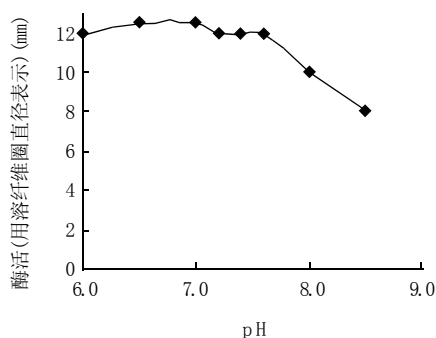


图 5 培养基不同初始 pH 对酶活的影响
Fig.5 Effects of different initial pH of culture medium on nattokinase activity

2.7 最佳装液量的确定

装液量对酶活的影响见图 6, 250ml 摇瓶装 50、60、70、80、90、100ml 的培养液时比装 20、30、40ml 的酶活高, 可能装液过少, 表面积大培养液蒸发了一部分或纳豆激酶由于表面变性, 损失了部分酶活。装液量大于 50ml 时, 装液量对酶活无影响。这说明培养液中的溶氧量能满足纳豆芽孢杆菌的耗氧量。

2.8 酶活的测定

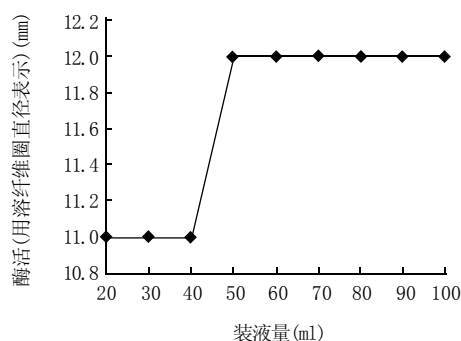


图 6 装液量对酶活的影响
Fig.6 Effects of volume of culture medium on nattokinase activity

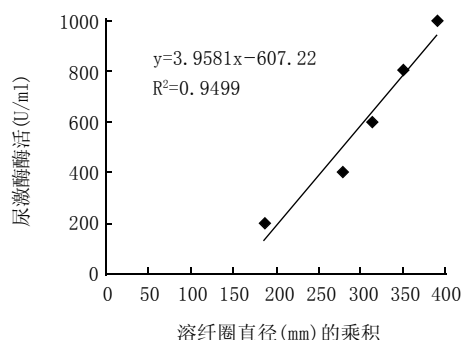


图 7 酶活标准曲线
Fig.7 Standard curve of enzyme activity

以尿激酶为标准品作的标准曲线见图 7。原始菌株和 BSN-3 菌株各按 1% 接种量接种到 100ml 营养肉汤培养基中, 30℃培养 24h, 离心取上清测酶活, 根据标准曲线, 原始菌株酶活为 248U/ml, BSN-3 菌株的酶活为 640U/ml。BSN-3 菌株的酶活比原始菌株的酶活提高了 258%。这比刘新梅等^[13]以原生质体紫外诱变选育纳豆激酶高产菌株得到酶活达 400.74U/ml 的菌株的酶活高。

通过比较诱变菌株与原始菌株溶纤圈直径的大小, 成功筛选出了 BSN-3 菌株, 该菌株的酶活比原始菌株酶活提高了 258%。通过对 BSN-3 菌株发酵条件的研究, BSN-3 菌株产酶最佳培养条件为: 培养基是营养肉汤, 发酵温度 30℃和发酵时间 24h。在研究过程中, 发现发酵溶液的装液量对产酶影响很小。培养液初始 pH 为 pH6.5 和 pH7.0 时酶活最高, pH 超过 8.0 时, 不利于酶的产生。pH9.0 时, 纳豆芽孢杆菌不生长, 纳豆芽孢杆菌的合适产酶条件是中性或偏酸的环境。

参考文献:

- [1] 张玉晶, 张苓花, 叶云生, 等. 重组纳豆激酶工程酵母菌发酵研究[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(2): 100-103.
- [2] 梁思宇, 陆兆新, 董红月. 营养条件对枯草杆菌生产血纤维蛋白溶解酶的影响[J]. 工业微生物, 2002, 32(3): 36-39.
- [3] 江汉湖. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 207-208.
- [4] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京:

原生质体融合构建耐高温高产酒精酵母

路玲玲¹, 王 敏², 朱会霞², 孙金旭², 檀建新¹, 张 伟¹

(1. 河北农业大学食品科技学院生物工程系, 河北 保定 071001;

2. 衡水学院生命科学系, 河北 衡水 053000)

摘 要: 选择化学药物和紫外灭活单亲原生质体为遗传标记, 以 0.01% 的三唑酮和紫外照射 h-1 原生质体 2min 为遗传标记, 采用四因素三水平正交试验确定了融合子 LZ-3 的浓醪酒精发酵工艺。浓醪发酵的最佳工艺条件是: 料水比为 1:2, 糖化酶用量为 400U/g 原料, 接种量为 9%(V/V), 初始 pH 值为 5.5, 在此条件下, 以玉米粉的糖化醪为培养基, 发酵 72h, LZ-3 的酒精产率为 9.0%。

关键词: 原生质体; 融合; 耐高温; 高产酒精酵母

Building Thermotolerant High-alcohol-producing Yeast by Proplast Fusion

LU Ling-ling¹, WANG Min², ZHU Hui-xia², SUN Jin-xu², TAN Jian-xin¹, ZHANG Wei¹

(1. Department of Biology Engineering, College of Food Science and Technology, Agricultural University of HeBei, Baoding 071001, China; 2. Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui 053000, China)

Abstract: As chemical drugs and UV used to exterminate the single parent protoplasts were chosen as hereditary markers, with 0.01% triadimefon content and irradiated by UV 2 min, the optimum conditions of the orthogonal test are: 33.3%(W/V) concentration of crude corn in fermenting material, 400 U/g of glucoamylase (per gram of raw corn), 9%(V/V) inoculum of yeast, and initial pH 5.5. The orthogonal test indicated that the fusion strain LZ-3 produces the highest amount of alcohol, or 9.0% alcohol after incubation at 42°C for 72 hours.

Key words protoplast; fusion; thermotolerant; high-alcohol-producing yeast

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0231-06

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

亲本: h-1: 42°C 产酒精率为 5.5%(V/V), 可在 50°C 下生长; SP-48: 30°C 产酒精率为 16.9%(V/V), 50°C 基本不生长, 以上两种菌现保存于河北农业大学食品科技

学院生物工程系。

1.1.2 融合培养基及试剂

1.1.2.1 再生培养基 YEPDS 固体培养基

葡萄糖 20 g、蛋白胨 20 g、酵母浸膏 10 g、水 1000ml、KCl 52.5g。

1.1.2.2 缓冲液

柠檬酸溶液: 柠檬酸 10.5g、水 500ml; Na₂HPO₄

收稿日期: 2006-01-16

作者简介: 路玲玲(1977-), 女, 硕士, 研究方向为食品微生物。

化学工业出版社, 2000: 323.

[5] LIU Jun-guo, XING Jian-min, CHANG Tian-shi, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2757-2762.

[6] 李炳锦, 崔京浩, 李水林, 等. 纳豆激酶分离纯化与鉴定[J]. 药物生物技术, 2003, 10(4): 232-237.

[7] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 65.

[8] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 400.

[9] 薛健, 臧学丽, 陈光, 等. 纳豆激酶液体发酵条件的优化[J]. 吉林农

业大学学报, 2005, 27(5): 569-573.

[10] 郎亚军, 隋海澜, 于育玲, 等. 纳豆枯草杆菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(1): 12-14.

[11] 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.

[12] 张锋, 金杰, 安莹, 等. 纳豆激酶液体发酵条件的优化研究[J]. 四川食品与发酵, 2005, 41(4): 22-25.

[13] 刘新梅, 高宇, 董明盛. 原生质体紫外诱变选育纳豆激酶高产菌株[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 69-72.