

纳豆激酶液体发酵条件的优化

熊晓辉 梁剑光 熊 强

(南京工业大学制药与生命科学学院,南京 210009)

摘 要 以纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto,BSN)为实验菌株,对其液体发酵生产进行了研究。实验考察了发酵条件(温度、接种量、起始 pH、装液量)和培养基成分(碳源、氮源、金属离子等)对纳豆激酶产量的影响,在优化发酵条件和培养基的基础上,进行了 5 L 发酵罐放大实验,产酶量为 2 250 IU/mL。

关键词 纳豆芽孢杆菌,纳豆激酶,液体发酵

1987 年,日本的须见洋行从纳豆中提取出一种具有溶血栓功能的物质,定名为纳豆激酶(Nattokinase,简称 NK)^[1]。研究表明^[2],NK 具有纤溶活性,可治疗和预防血栓病,还可激活纤溶酶原,从而增加酶源性纤溶酶的量与作用。目前常用及有待开发的治疗血栓病的药品有^[3]链激酶(SK)、尿激酶(UK)、重组组织纤溶酶原激活剂(t-PA)和尿激酶原(pro-UK)等,但它们均在不同程度上存在一定的缺陷,或者毒性强、副作用大,或在体内半衰期短,或来源紧缺、价格昂贵,而 NK 有望弥补这些不足,具有较大的开发潜能,成为新一代抗栓药物^[4]。本文以本实验室所保存的纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto,BSN)生产 NK 的液体发酵条件进行优化,为 NK 的产业化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种与培养基

菌种 纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto,BSN)本实验室保存。

种子培养基(%) :蛋白胨 1,牛肉膏 0.5,NaCl 0.5,pH 7.0~7.2。

发酵基础培养基(%) :葡萄糖 1,蛋白胨 1,K₂HPO₄ 0.25,KH₂PO₄ 0.1,pH 7.2~7.4。

1.1.2 主要试剂

牛纤维蛋白原和凝血酶:均为中国药品生

物制品检定所制备;尿激酶:南京大学药业有限责任公司产。

1.2 培养方法

1.2.1 BSN 种子制备

挑取斜面种子接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶,30℃ 振荡培养 18~20 h。

1.2.2 发酵培养

将种子接入发酵培养基中,振荡培养,按设计进行实验。

1.3 测定方法

1.3.1 纳豆激酶的酶活测定方法

依据《中华人民共和国卫生部 WS-011(X-006)95》关于“蚓激酶的部颁标准”中“尿激酶琼脂糖——纤维蛋白平板法”进行测定。

(1)将牛纤维蛋白原溶解于 pH7.4 磷酸盐缓冲液中,制成 0.89 mg/mL 可凝结蛋白溶液;牛凝血酶溶解于 pH7.4 磷酸盐缓冲液中,制成 7.5 单位/mL 的溶液。

(2)琼脂糖-纤维蛋白平板制备:取 1% 琼脂糖溶液 20 mL,先在水浴 50℃ 恒温 10~15 min,然后将牛纤维蛋白原 15 mL 在 50℃ 水浴中恒温 5~10 min,待两者温度一致时,将凝血酶 1 mL 和牛纤维蛋白原 15 mL 与琼脂糖溶液迅速混匀,立即倒平板,凝固备用。

(3)发酵液经离心后,取上清液,适当稀释后即为粗酶液。加样 10 μ L 于琼脂糖-纤维蛋白平板上,同时以一定单位的标准尿激酶作对

第一作者 博士研究生 副教授。

收稿时间 2003-06-16,改回时间 2003-08-21

照 放置 37℃ 恒温反应 18 h。观察测定溶圈的直径将其与尿激酶标准品相比较 ,得出 NK 酶活(相当于尿激酶)单位(IU/mL)。

1.3.2 发酵液中蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝法^[5]。以 BSA 做标准蛋白曲线 ,测定发酵液的 $OD_{595\text{ nm}}$ 值 ,得到发酵液蛋白质含量(mg/mL)。

1.3.3 残糖测定

DNS 法^[5]。

1.3.4 生物量的测定

光密度法^[6] ,于 $OD_{660\text{ nm}}$ 测定。

2 结果与分析

2.1 发酵条件对纳豆激酶产量的影响

2.1.1 温度对纳豆激酶产量的影响

从图 1 中可以看出 ,纳豆激酶发酵的最适温度为 30℃ ,过低则不利于细菌的生长 ,过高又不利于产酶 ,且酶在过高温度下极易失活。

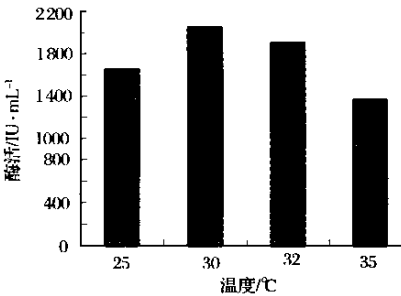


图 1 不同温度对纳豆激酶产量的影响

2.1.2 接种量对发酵产酶量的影响

分别接入 1.5% ,2% ,3% ,5% 的种子培养液到发酵基础培养基当中 ,使其发酵 3 d ,测定各酶活。从图 2 可知 ,接种量对产酶量有一定的影响 ,接种量为 2% 时 ,产酶量最高 ,接近 2 100 IU/mL。接种量太少或太多 ,都会影响菌体的生长及酶的产量。因而纳豆激酶产量最高时的接种量为 2%。

2.1.3 起始 pH 值对发酵产酶的影响

调节起始 pH 至 5.0~10.0 ,接入 2% 的种子液 ,发酵 3 d 后测定酶活 ,结果如图 3 所示。当起始 pH 为 7.0 时 ,产酶量最高 ,偏酸性或偏碱性均不利于 NK 的发酵。实验过程中 ,还发

现虽然碱性如 pH8.0 比中性条件利于菌体生长 ,但不利于产酶。因而选择起始 pH7.0 为宜。

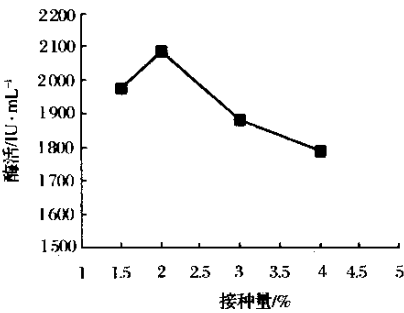


图 2 不同接种量对发酵产酶量的影响

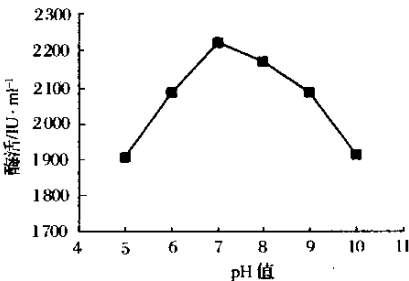


图 3 起始 pH 值对发酵产酶的影响

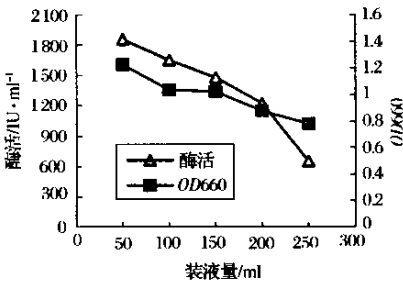


图 4 不同装液量对 NK 发酵的影响

2.1.4 不同装液量对发酵产酶的影响

500 mL 的三角瓶中分别加入 50、100、150、200、250 mL 的发酵培养基 ,培养 3 d 后测定 $OD_{660\text{ nm}}$ 及酶活 ,其结果如图 4。从图 4 中可知 ,随着装液量的增加 ,不论是生物量还是产酶量都呈下降的趋势 ,说明纳豆菌是好氧菌 ,提高溶氧量有利于其生长及产酶。

2.2 发酵培养基的组成对 NK 的影响

2.2.1 不同碳源对发酵产酶量的影响

选择葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖 ,可溶性淀粉及甘油作为碳源 ,浓度为 2 % ,甘油为 4 mL/100 mL。其他发酵条件相同 ,分别在 2~6 d 测定各酶活 ,其结果如表 1。以葡萄糖为碳源最高产酶量出现在第 3 和第 4 天 ;以蔗糖和木糖为碳源最高产酶量出现在第 4 天 ;可溶性淀粉的最高产酶量出现在第 3 和第 4 天 ,为 2 333 IU/mL ,无论经济上 ,或发酵周期长短来看可溶性淀粉都是可取的 ,因而选择其为最佳碳源。用甘油作碳源时 ,从第 2~6 天 ,NK 量上升缓慢 ,发酵周期较长 ,发酵液较粘稠 ,不利于供氧 ,故不宜做为碳源。这与日本竹内尚等人^[7]的报道不一致 ,可能是菌株不同所致。

表 1 不同碳源对纳豆激酶的影响

碳 源	发酵 NK 酶活/(IU·mL ⁻¹)				
	2d	3d	4d	5d	6d
葡萄糖	1857	1952	1952	1904	1761
蔗 糖	1952	1952	2090	2047	1857
麦芽糖	2095	2142	2047	2000	1761
木 糖	1809	2047	2190	2095	2047
可溶性淀粉	2000	2333	2247	2000	1714
甘 油	1904	1952	2042	2166	2190

2.2.2 可溶性淀粉浓度的确定

确定可溶性淀粉为碳源后 ,比较其以 1 %~5 %几个浓度对产酶的影响 ,分别于第 2、3、4、5 天测定发酵产酶 ,结果如图 5。

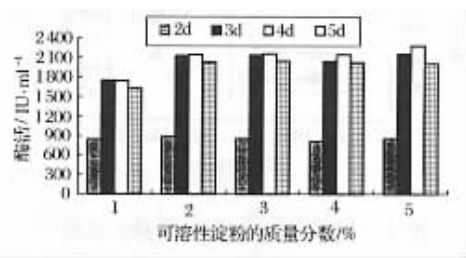


图 5 可溶性淀粉质量分数对发酵产酶的影响

从图 5 可见 ,不同浓度的可溶性淀粉 ,第 2 天的产酶量无差异 ,且产酶量均在第 3 天或 4 天达到最高值。比较可溶性淀粉质量分数为 2 %、3 %、4 %时产酶量相差不大 ,5 %的可溶性淀粉在第 4 天达到最大值 ,而且黏度很大。同时也说明高浓度的淀粉对 BSN 产酶无抑制作

用。发酵液残糖量(数据未给出)表明 ,当淀粉的质量分数超过 3 %时 ,残糖量较高。综合实验结果和下游提取 ,以 2 %为宜。

2.2.3 不同氮源对发酵产酶量的影响

用蛋白胨、胰液、豆粕粉作为氮源 ,质量分数为 1 % ,比较不同氮源的差异。分别在第 2~6 天测定 NK 活性 ,结果如图 6。从图 6 可知 ,以不同氮源进行发酵 ,第 3 天产酶量均达到最高 ,其中又以胰液为佳 ,为 2 200 IU/mL ,蛋白胨次之 ,豆粕粉最低。因而选择胰液为氮源。

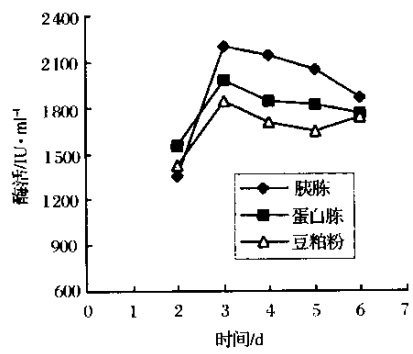


图 6 不同氮源对发酵产酶的影响

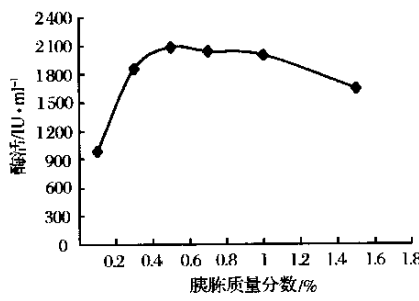


图 7 不同胰液质量分数对发酵产酶的影响

比较表 1 和图 5、图 6 ,还可以发现 ,发酵至第 3 天时产酶量最高 ,延长发酵时间 ,NK 含量降低 ,从而确定 NK 发酵时间为 3 d。

2.2.4 胰液质量分数的确定

选择质量分数分别为 0.1 %、0.3 %、0.5 %、0.7 %、1.0 %和 1.5 %的胰液 ,发酵 3 d 后 ,测定 NK 酶活 ,结果如图 7。从图 7 中可知 ,随着胰液质量分数的增加 ,发酵产酶开始上升 ,当达到 0.5 %时 ,酶活最大 ,0.5 %与 0.7 %时的产酶量相差不大 ,但当胰液的质量分数 > 1 %

时,产酶下降很快。这是因胰豚浓度过高,抑制BSN生长,导致产酶量较低。

2.2.5 金属离子对发酵产酶的影响

表 2 几种金属离子对菌体生长和产酶的影响

金属离子	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	对照
酶活/IU·mL ⁻¹	2000	2000	2344	2289	0	1100	0	2050
OD _{660 nm}	1.255	1.232	1.266	1.336	1.139	1.221	1.114	1.184

从表 2 可以看出,Ca²⁺、Mg²⁺对发酵产NK有利,K⁺、Na⁺对NK基本没有影响;加入Fe²⁺、Cu²⁺发酵液无NK活性,可能是其使NK失活,或抑制菌株产酶;而加入Mn²⁺也使NK活性降低。可在发酵培养基中加入一定的Ca²⁺、Mg²⁺提高产量。同时,加入Ca²⁺、Mg²⁺也利于菌体生长,但各金属离子对NK激酶的合成起关键作用。

2.2.6 正交实验优化发酵培养基的组成

在分析发酵条件以及单因素如氮源、碳源的基础上,选择可溶性淀粉为碳源,胰豚为氮源,同时考察Ca²⁺和Mg²⁺对纳豆激酶的影响,设计了正交实验,见表3。所得结果如表4所示。从中可知,R值的大小分别为B>C>A>D,各因素适宜的配比为A₂B₂C₂D₁。氮源的浓度和Ca²⁺浓度对发酵产酶影响较大,碳源的浓度次之。而表中没有按A₂B₂C₂D₁的配比,需要做补充实验加以证实。最终酶活为2358IU/mL,说明该配比确实为最适产酶培养基。综合各个方面的因素,以A₂B₂C₂D₁配方为基础,确立了以BSN发酵生产NK激酶的适宜培养基组成为:可溶性淀粉2%,胰豚0.5%,CaCl₂0.02%,酵母膏0.2%,K₂HPO₄0.25%,KH₂PO₄0.1%,pH7.0。

2.2.7 纳豆激酶5L发酵罐放大实验

以优化后的发酵培养基、发酵条件进行发酵放大实验,5L的发酵罐配置发酵培养基3L,

表 3 正交实验设计

水平	可溶性淀粉(A)	胰豚(B)	CaCl ₂ (C)	MgSO ₄ (D)
	/%	/%	/%	/%
1	1	0.0	0.00	0.00
2	2	0.5	0.02	0.05
3	3	1.0	0.04	0.10

选择K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺,其浓度均为0.002mol/L。考察几种金属离子对发酵NK产量的影响,结果如表2。

表 4 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	NK 酶活 /IU·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	1786
2	1	2	2	2	2150
3	1	3	3	3	1877
4	2	1	2	2	2050
5	2	2	1	3	2059
6	2	3	3	1	1968
7	3	1	3	1	1850
8	3	2	1	2	1968
9	3	3	2	3	1968
K ₁	1938	1895	1938	1989	
K ₂	2026	2059	2056	196	
K ₃	1929	1938	1989	1938	
R	97	164	158	51	

接种量为2%,转速为180r/min。实验结果表明,BSN在5L发酵罐上的生长无明显的延滞期,在发酵罐里菌体生长较快,发酵周期缩短近1d。残糖含量迅速下降,从3.31%下降到0.54%。pH值是先下降后缓慢上升,最后与初始值接近。检测发酵液的酶活,60h时的酶活达到最高2250IU/mL。与摇瓶发酵比较,发酵产酶有所提前,到60h可以认为发酵结束。

3 结 论

(1)优化后的发酵培养基最佳组成配方为:可溶性淀粉2%,胰豚0.5%,CaCl₂0.02%,酵母膏0.2%,K₂HPO₄0.25%,KH₂PO₄0.1%,pH7.0。

(2)纳豆菌的摇瓶发酵产酶最佳温度为30℃,在转速150r/min条件下,装液量为100mL/500mL,接种量2%,适宜纳豆激酶的生产。

(3)在优化发酵条件和培养基的基础上进行5L发酵罐放大实验,纳豆激酶产量达2250

IU/mL,且可缩短发酵时间。

参 考 文 献

- 1 须见洋行. 纳豆キナーゼと线溶系[J]. 化学と生物, 1991 ,29(2) :119
- 2 杜平中. 溶栓药物的研究进展[J]. 国外医药—合成药、生化药、制剂分册, 1998 ,19(2) :67~71
- 3 付 利 杨志兴. 纳豆激酶的研究与应用[J]. 生物工程进展 1995 ,15(5) :46~49
- 4 Fujita M , Hong K , Ito Y et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. Biol Pharm Bull , 1995 ,18(10) : 1387
- 5 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1997,168~170
- 6 李建武等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994,174~176
- 7 竹内尚,三迟悟. 纤溶活性蛋白制造法[P]. 日本公开特许,1994,153 977

Optimization of Nattokinase Production Using Liquid Fermentation

Xiong Xiaohui Liang Jianguang Xiong Qiang

(College of Pharmacy and Life Science , Nanjing University of Technology , Nanjing , 210009)

ABSTRACT Nattokinase production using liquid fermentation by *Bacillus subtilis* natto BSN is investigated. The fermentation conditions including temperature , inoculation quantity , initial pH value and volume of the medium were studied. The effects of carbon source , nitrogen source and ion composition on production of Nattokinase were also studied. The yield of Nattokinase of 2250 IU Urokinase/ mL in supernatant in a 5 L fermentor was obtained at the optimized conditions.

Key words *Bacillus subtilis* natto , Nattokinase , liquid fermentantion

市场动态

我国番茄酱出口价格攀升

由于 2003 年我国番茄产量大大低于预计水平,且同期世界其他主要番茄酱生产国产量也出现下滑,我国番茄酱出口价格迅速攀升。

据我国番茄酱加工企业反映,2003 年新疆开春比较晚,而且还受到低温、雨水和大风天气的影响,番茄收获期推迟,番茄成熟度不够。预计 2003 年的番茄产量和加工量不会超过 2002 年的水平,产量约为 270 万 t。

由于番茄成熟度不够,固形物含量低,使得加工成品率下降,我国新疆等番茄主产区前期普遍出现原料供应紧张,工厂开工不足的情况。同时,欧洲主要番茄酱生产国意大利、西班牙和希腊普遍受到高温和干旱天气的影响,番茄减产幅度也比较大。

由于国际市场番茄酱供应不足,我国番茄酱出口价格迅速上升。来自加工企业的消息称,9 月初,我国 36% / 38% 浓度番茄酱出口价格已经达到 600 美元/(FOB), 28% / 30% 浓度的番茄酱出口价格达到 550 美元/(FOB)。

在国际市场上,几个主要番茄酱生产国之间依然存在价格差距,中国的产品有一定的价格优势,美国、土耳其和欧洲产品的价格则相对较高。

中国和美国的产品受汇率变化的影响要大于其他影响(如包装、运输和付款条件等)。中国番茄酱在意大利南部(用于再加工)、俄罗斯和东南亚等市场的份额快速增长,并且逐步向中欧、中东和中亚等地扩展。

根据中国海关统计,2002 年,我国出口番茄酱 37.3 万 t,创汇 1.89 亿美元。2003 年 1~8 月,我国番茄酱出口量为 16.58 万 t,基本与去年持平。按照这一发展趋势,预计今年出口量与去年相比变化不大,或略低于 2002 年。

英国《食品新闻》最新报道,2003 年全球番茄酱产量约为 2 600 万 t,与已签合同之间存在 300 万 t 的差额。

预测显示,欧洲最大的番茄酱产地意大利 2003 年的番茄产量将比预期减少 30%~40%。意大利北部主产区的新鲜番茄价格已经由最初的 87 欧元/t 上涨到了 98 欧元/t。世界另一大番茄主产区美国加利福尼亚州 2003 年的番茄产量将不足 1 000 万 t,至少比预期下降 50 万 t。美国番茄酱 2002 年在欧洲市场的销量不错,但是欧洲买家近日表示,由于美国番茄酱价格较高,他们可能会减少采购量。