

# 一株产纳豆激酶菌株的分离筛选及鉴定

马明<sup>1</sup>, 杜金华<sup>1,2</sup>, 王因<sup>1</sup>, 高洁<sup>2,3</sup>, 商曰玲<sup>1</sup>

1(山东农业大学生命科学学院, 山东泰安, 271018) 2(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安, 271018)

3(泰山学院生物科学与技术系, 山东泰安, 271021)

**摘要** 对能产生纳豆激酶的菌群进行了筛选, 分离得到了1株具有较高纤溶活性的菌株N391, 其纳豆激酶相当于1 722.4U/mL尿激酶的酶活。利用细菌16S rDNA通用引物对其16S rRNA进行PCR扩增, 得到1 511bp的片段, 该PCR产物序列通过Blast软件在NCBI网站中进行同源性比较, 通过DNA MAN和MAGE3.1软件绘制系统发育树, 结果表明, 菌株N391的16S rRNA序列(DQ906100)与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的16S rRNA序列的同源性在99%以上, 在系统发育树中, 菌株N391与*Bacillus subtilis*在同一分支, 且遗传距离最短。结合常规的形态、生理生化鉴定, N391的形态及大部分生理生化特征与*Bacillus subtilis*极为相似, 表明菌株N391属于*Bacillus subtilis*的1个菌株, 由此初步确定该菌在微生物系统发育学上的地位。

**关键词** 纳豆激酶, 筛选, 16S rRNA, 鉴定, 枯草芽孢杆菌

纳豆激酶(Nattokinase, NK), 经过研究确定其作为一种具有高凝溶活性的激酶, 可用于治疗和预防心脑血管栓塞性疾病的发生, 在国外, 2004年Omura K等人的临床试验已经证实了这一点<sup>[1]</sup>。纳豆是由枯草芽孢杆菌(*Acillus subtilis*)在一定温度、湿度条件下发酵大豆而来, 经发酵后的纳豆可溶性总氮及多种氨基酸含量明显增高, 富含包括纳豆激酶在内的多种生物活性酶以及多种维生素, 因而具有降血压、抗氧化、抗肿瘤及重要的溶血栓等医药功效<sup>[2]</sup>。纳豆激酶来源于食品, 无毒副作用, 而且价廉易得, 为此开发溶栓纳豆保健食品具有实用价值。本文对产纳豆激酶菌株进行筛选、鉴定, 以期获得理想的纳豆发酵生产用菌种。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

自行从纳豆中筛选的出发菌群N-B、N-3、N-4、N-Z、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌DH5a。

#### 1.1.2 主要试剂

纤维蛋白原(Fibrinogen)、凝血酶(Thrombin)均购自Sigma公司; 尿激酶(Urokinase)购自黑龙江迪龙制药有限公司, 克隆质粒PMD 18-T、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、*Hind*Ⅲ、*Xba*I限制性内切酶、PCR产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自

Sigma公司, 其他试剂均为市售分析纯。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基: 琼脂粉2%, 蛋白胨1%, 牛肉膏0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0~7.2。

初筛培养基(酪蛋白培养基): 琼脂2%, 酪素0.5%, 葡萄糖0.1%, 酵母膏0.1%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $KH_2PO_4$  0.05%,  $MgSO_4$  0.01%, 水1 000mL, pH 7.0~7.2。

种子培养基: 大豆蛋白胨1%, 葡萄糖1%,  $Na_2HPO_4$  0.2%,  $NaH_2PO_4$  0.1%,  $CaCl_2$  0.2%,  $MgSO_4$  0.05%, pH 7.0~7.2。

液态发酵培养基: 大豆蛋白胨2%, 葡萄糖2%,  $Na_2HPO_4$  0.2%,  $NaH_2PO_4$  0.1%,  $CaCl_2$  0.2%,  $MgSO_4$  0.05%, pH 7.0~7.2。

LB培养基: 酵母粉5g/L, 胰蛋白胨10g/L, NaCl 10g/L, pH 7.0(固体加1%琼脂粉)。抗性筛选时, 加氨苄青霉素(Amp)至100mg/L。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌株的分离与筛选

将菌种加入无菌生理盐水中振荡30min, 进行稀释平板分离, 涂布于酪蛋白平板, 37℃下培养36h, 选取透明圈直径与菌落直径比值较大的菌落进行连续分纯与继代后, 作为初筛得到的菌株保藏备用。

将初筛菌株接入液态种子培养基(装液量30mL/25mL) 37℃、180r/min恒温培养24h, 最终活菌数约为108cfu/mL。以2%接种量接种至液体发酵培养基(装液量50mL/250mL), 37℃、180r/min恒温培养。24h后取发酵液, 3 500r/min离心10min。

第一作者: 硕士研究生(杜金华教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-10-23, 改回日期 2006-12-29

取上清液 10  $\mu$ L 点样与纤维蛋白平板上,37℃,恒温 18h 后测量每个样品的溶解透明圈直径,计算酶活。

1.2.2 纳豆激酶活性的测定

采用凝维蛋白原平板法<sup>[9]</sup>。

1.2.3 菌体形态及生理生化实验

菌体形态特征和生理生化特征参照文献资料[4, 5,6]进行。

1.2.4 分子生物学(16S rRNA)鉴定

1.2.4.1 引物合成

采用扩增细菌 16S rRNA 的通用引物,由济南博亚生物技术有限公司合成

上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3';

下游引物:5'-GGCTACCTTGTTACGACT-3'。

1.2.4.2 序列的扩增

将 N391 在 LB 培养基平板上 37℃ 过夜培养,采取细菌菌落 PCR 直接扩增细菌 DNA。PCR 反应体系(25 $\mu$ L):MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 1.5 $\mu$ L,10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$ L,dNTP(2.5mmol/L)2 $\mu$ L,引物(0.5 $\mu$ mol/L)各 2 $\mu$ L,Taq 聚合酶(5U/ $\mu$ L)0.25 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 14.75 $\mu$ L。循环条件:94℃ 预变性 8min;94℃ 变性 1min,50℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1.5min,共进行 30 次循环;最后 72℃ 保温 8min。反应结束后,取 10 $\mu$ L PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶在 90V 电压下电泳 40min,以 DL2000 为 Marker 进行分析。用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit 回收目标 DNA 片段。

1.2.4.3 克隆与筛选

将纯化后的 PCR 产物与 PMD 18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5a,然后在加有 Amp 的 LB 平

板上进行筛选。挑取菌落作 LB 液体培养,用 E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit I 微量法提取质粒,分别进行 Hind III,XbaI I 酶切和 PCR 鉴定。然后做琼脂糖凝胶电泳,分析插入段的大小,挑出重组克隆。

1.2.4.4 16S rRNA 序列测定、分析及系统发育树绘制

重组克隆由上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果在 GenBank 中注册并通过 Blast 进行同源序列检索,然后采用 DNA MAN 和 MEGA3.1 软件进行同源性分析,构建系统发育树,1 000 次随机抽样,计算自引导值以评估系统进化树的置信度。

2 结果与分析

2.1 高酶活菌株的分离与筛选

纳豆激酶是一种中性丝氨酸蛋白酶<sup>[7]</sup>,可水解酪素形成透明圈,根据这一特性,采用水解酪蛋白平板从 4 株出发菌群中分离出 271 株具有较高蛋白酶活力的菌株,再经纤维蛋白平板复筛多次最终获得 1 株菌株,命名为 N391,其纳豆激酶相当于尿激酶的酶活达到了 1 722.4U/mL,与国内外相关文献<sup>[8~10]</sup>比较,属于高产菌株,因此作为进一步的研究菌株。没有进行发酵条件的优化,故仍有提高空间和潜力,但与酶活较高的报道<sup>[11]</sup>还有差距。

2.2 菌株的培养特征

2.2.1 个体形态

对培养 24h 的 N391 菌体细胞进行个体形态观察,并与枯草芽孢杆菌比较,可以发现革兰氏染色呈阳性,有芽孢,且芽孢中生,可将 N391 归为芽孢杆菌属,具体结果见表 1。

表 1 菌体特征比较

菌种	菌体			芽孢			鞭毛	运动性
	形状	长/ $\mu$ m	宽/ $\mu$ m	形态	位置	大小/ $\mu$ m		
N391	杆状	2.31	0.75	圆形或椭圆	中生	0.79 $\times$ 1.50	周生	运动
枯草杆菌	杆状	2.19	0.71	圆形或椭圆	中生	0.71 $\times$ 1.50	周生	运动

2.2.2 菌落形态

N391 和枯草芽孢杆菌的菌落形态特征,结果见表 2。

观察营养琼脂平板上和试管液体的培养 24h 的

表 2 菌落形态特征比较

菌种	琼脂平板上菌落特征							试管液体中培养特征		
	形状	质地	边缘	光学特征	颜色	分泌色素	菌落大小/mm	菌膜	浑浊	沉淀
N391	圆形	表面皱褶	不整齐	不透明	乳白	否	2.18 $\times$ 2.09	皱褶	否	无
枯草杆菌	圆形	表面皱褶	不整齐	不透明	乳白	否	1.94 $\times$ 2.01	皱褶	否	无

从表 2 可看出,筛选到的菌种在菌落形态上与枯草芽孢杆菌比较相似。

2.3 生理生化特征

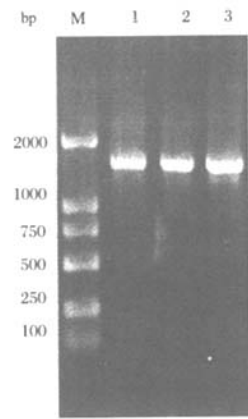
以枯草芽孢杆菌为参比菌株,对 N391 菌株进行了部分生理生化特征测定、糖发酵试验、渗透压试验,结果见表 3。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)对枯草芽孢杆菌的描述,确定 N391 为枯草芽孢杆菌,与参比菌株生化特征基本一致。

表 3 生理生化试验

	N391	枯草芽孢杆菌
革兰氏染色	+	+
对氧需求	+	+
酪蛋白水解	+	+
淀粉水解	+	+
明胶液化	+	+
硝酸盐还原	+	+
柠檬酸盐试验	+	+
过氧化氢酶试验	+	+
石蕊牛奶还原	+	+
V-P 测定	+	+
MP 试验	-	-
尿素利用	-	-
葡萄糖	+	+
果糖	+	+
蔗糖	+	+
麦芽糖	+	+
乳糖	+	+
木糖	+	+
甘露醇	+	+
糖发酵试验	0.5%NaCl	++
	3%NaCl	++
	6%NaCl	+
	9%NaCl	+
	12%NaCl	+
	15%NaCl	-
	18%NaCl	-

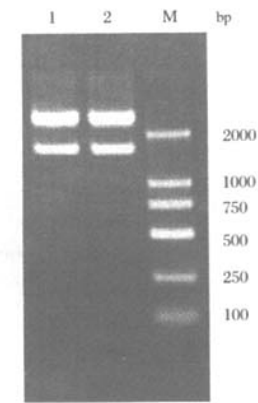
2.4 菌株 N391 的 16S rDNA 序列扩增及阳性克隆的鉴定

以菌株 N391 的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增后经电泳检测,得到 1 条大小约为 1.5kb 的特异性条带,见图 1,这与以往 16S rDNA 在所有细菌中都高度保守且长度恒定(约 1.5kb)的报道<sup>[12,13]</sup>相吻合。重组质粒经酶切后电泳检测,得到一大一小 2 个片段,较大的片段为 PMD18-T 载体,较小的片段长度约为 1.5kb,见图 2。这表明菌种 N391 的 16S rDNA 片段已经成功克隆到 PMD 18-T 载体中。



M-0.1~2kb 的分子质量 Marker;1~3-16SrDNA PCR 片断

图 1 菌株 16SrDNA PCR 扩增结果



M-0.1~2kb 的分子质量 Marker;1~2-PMD 18-T 的 Hind

III 和 XbaI 酶切产物

图 2 重组质粒酶切结果

2.5 16S rDNA 序列测定及分析

菌株 N391 16S rDNA 序列经测定,全长为 1511bp(登录号: DQ906100)。将该 16S rDNA 序列递交 Genbank 通过 Blast 进行同源序列检索,结果发现,在亲缘关系相近的前 100 个序列中,前 66 个均为芽孢杆菌属的菌株,其中同源性最高的前 10 个菌株中 9 个为枯草芽孢杆菌,N391 与它们都具有 99%以上的同源性,其中与 *Bacillus subtilis*(登录号: AB65370)的差异性最小,同源性水平最高,结果见表 4。

以 16S rDNA 同源性为基础,在前 100 个序列中选取 10 个菌株的 16S rDNA,用 DNAMAN 软件进行系统进化分析,结果得到了如图 3 所示的系统发育树状图。系统发育学分析结果表明,该系统树以 *Bacillus polymyxa* (D16276)作为一个单独的外群种,其中菌株 N391 与 *Bacillus subtilis* 单独构成一个分

表 4 N391 与 GenBank 中部分菌株 16S rDNA 序列进行同源性比较结果

菌种名	菌株名	登录号	分值	比对碱基数目	相似性
<i>Bacillus subtilis</i>	—	AB065370	2952	1505/1511	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	—	Z99104	2948	1505/1511	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	Setapak8	DQ401073	2948	1505/1511	99.60
<i>Bacillus</i> sp.	TUT1206	AB188212	2948	1505/1511	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	—	AB110598	2948	1505/1511	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	—	D26185	2948	1505/1511	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	IDCC1105	AY995572	2942	1502/1508	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	IDCC1103	AY995570	2942	1502/1508	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	IDCC1102	AY995569	2942	1502/1508	99.60
<i>Bacillus subtilis</i>	IDCC1101	AY995568	2942	1502/1508	99.60

支,其序列的相似性最大,为 99.60%、遗传距离最小,为 0.003,这反应出菌株 N391 与 *Bacillus subtilis* 的亲缘关系最近。

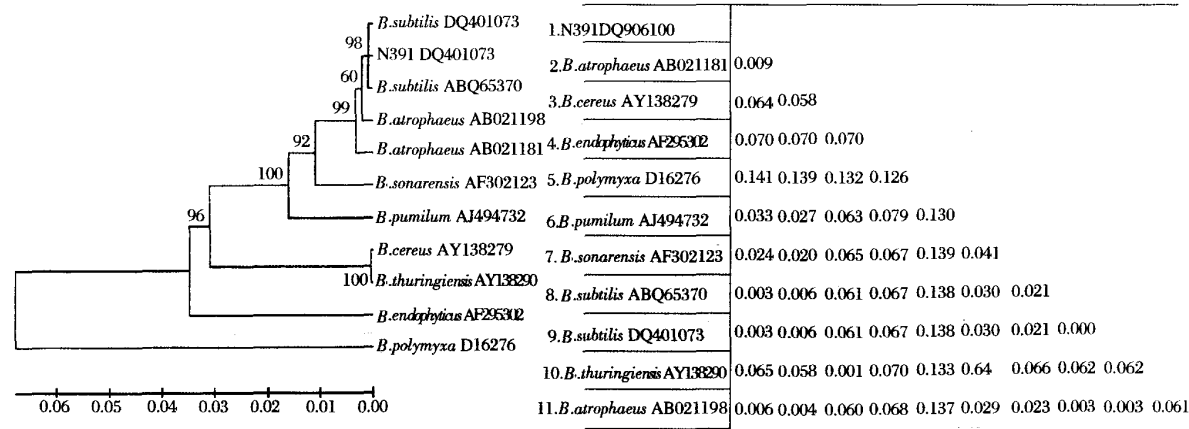


图 3 芽孢杆菌系统发育树状图及遗传距离分析

3 讨论

16S rRNA 基因具有高度的保守性、存在的普遍性,以及核酸序列本身的稳定性,序列分析的重现性极高,基于当今分析技术的改进,应用 16S rRNA 作为分子指标,可以实现快速、准确、微量、简便地对微生物进行分类鉴定。

本研究经过分离筛选,获得 1 株纳豆激酶酶活达到 1 722.4 U/mL 尿激酶的菌株 N391,利用 16S rRNA 基因序列,对其进行了细菌分类学鉴定。通过在 GenBank 基因库中进行同源性比较,发现和枯草芽孢杆菌的基因序列有 99% 以上的同源性,而且在系统发育树中同属于一小分支。通过系统的细菌学和生理生化鉴定表明,筛选分离到的菌株 N391 在培养特征和理化特性上与枯草芽孢杆菌比较,典型特征差异不明显,进一步证明了菌株 N391 在分类上归属枯草芽孢杆菌。对于菌株 N391 的 16S rDNA 序

列与所有已报道的 *B. subtilis* 菌株的同源性都没有达到 100% 的现象,这可能是由于同种细菌的种内差异造成,不同来源的菌株在遗传上存在的微小差异可以通过 16S rDNA 序列上的差异反映出来。

枯草芽孢杆菌由于其具有发酵周期短、产物丰富、可利用开发价值高以及作为食品药品安全性好等显著优点,在食品加工、农业生产、能源开发等方面已经得到了广泛的应用。初步研究表明,试验中分离和筛选出来的菌株 N391 具有较明显的纤溶活性,由于枯草杆菌是公认的安全性细菌<sup>[14]</sup>,而且该菌株又来源于食品,因此,N391 完全可以直接用于保健纳豆的生产和开发,但作为溶栓药物,其酶活还有待进一步的提高。

参 考 文 献

1 Omura K, Hitosugi M, Kaketani K, et al. Fibrinolytic and anti-thrombotic effect of NKCP, the protein layer from

- Bacillus subtilis* (natto) [J]. *Biofactors*, 2004, 22 (1-4): 185~187
- 2 宋永生, 张炳文. 中国豆豉与日本纳豆功能成分的比较[J]. *中国食物与营养*, 2004, (4): 22~24
  - 3 Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40(2): 346~351
  - 4 布坎南 R E, 吉本期 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第8版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984
  - 5 杜连祥. 工业微生物学试验技术[M]. 天津: 天津科技大学出版社, 1992
  - 6 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994
  - 7 周新萍, 徐尔尼, 曲涛, 等. 胃蛋白酶对纳豆激酶的化学修饰研究[J]. *食品技术*, 2005, 7: 19~21
  - 8 Junguo Liu, Jianmin Xing, Tianshi Chang, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2 757~2 762
  - 9 黄俊, 梅乐和, 胡升, 等. 纳豆中纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶的分离过程研究[J]. *高校化学工程学报*, 2005, 19(4): 518~522
  - 10 梅乐和, 胡升, 许静, 等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. *浙江大学学报(工业版)*, 2004, 38 (10): 1 355~1 360
  - 11 方祥, 周焕彩, 王忠霞, 等. 纳豆菌分离、鉴定及纳豆激酶高产菌株的正向选育[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31 (12): 26~29
  - 12 Ma Ying, Jiao Nianzhi. Molecular ecology studies of marine *Synechococcus* [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(8): 649~655
  - 13 王远亮, 李光玉, 东秀珠, 等. 中国大陆科学钻探(CCSN)微生物研究——地下 3900 米一株细菌的分离与鉴定[J]. *岩石学报*, 2005, 21(2): 540~544
  - 16 De Boer A S, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review[J]. *Appl Microbiol Biotectnol*, 1991, 36(1): 1~4

## Screening and Identification of a Strain Producing Nattokinase

Ma Ming<sup>1</sup>, Du Jinhua<sup>1,2</sup>, Wang Nan<sup>1</sup>, Gao Jie<sup>2,3</sup>, Shang Yueling<sup>1</sup>

1(College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

2(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

3(Department of Biology Science and Technology, Taishan University, Taian 271021, China)

**ABSTRACT** In order to develop natto health products with specific physiological activity, one fibrinolytic spore-forming strain named N391 was isolated by screening the microflora producing nattokinase, whose nattokinase production equals to 1722. 4U/mL of urokinase activity. A 1511bp fragment of 16S ribosomal RNA was obtained from total DNA of strain N391 by PCR amplification, using the universal primer of bacterial 16S ribosome DNA. Sequence analysis was carried out by Blast on NCBI website and the phylogenetic tree was constructed by DNA MAN and MEGA3.1 software. The results show that N391(DQ906100) shared 99. 60% 16S ribosomal RNA sequence homology with *Bacillus subtilis*. Strain N391 and *Bacillus subtilis* were in the same branch of the phylogenetic tree and their genetic distance was the shortest. Combining the similarity of morphological and physiological characters, strain N391 was identified as *Bacillus subtilis*, and the position of the strain in microbiological phylogeny was set up.

**Key words** nattokinase, screening, 16S rRNA, identification, *Bacillus subtilis*

### 新国标: 含淀粉太多的火腿肠 2007 年 6 月退市

国家质检总局已批准熏煮火腿和火腿肠两项新国标, 2007 年 6 月 1 日起正式实施。

新标准规定, 根据产品中蛋白质和淀粉含量, 把熏煮火腿分为三级, 即特级、优级和普通级, 特级熏煮火腿的蛋白质和淀粉含量, 分别应为  $\geq 18\%$  和  $\leq 2\%$ ; 普通级熏煮火腿应为  $\geq 12\%$  和  $\leq 6\%$ 。火腿肠则根据蛋白质、淀粉和水分的含量, 被分为特级、优级、普通级和无淀粉级。

新标准还严格了产品出厂检验和形式检验规则, 要求在这两项检验中, 菌落总数、大肠菌群和致病菌中有一项不符合标准要求, 即判为不合格产品, 不应复检。如果淀粉含量超标了就成了不合格产品, 淀粉火腿肠将没了市场空间。

此外, 根据新标准, 只有用鸡肉、鱼肉或牛肉等单一原料制成的产品, 其名称才可以命名为“鸡肉肠”、“鱼肉肠”、“牛肉肠”。