

## 纳豆菌分离、鉴定及纳豆激酶高产菌株的正向选育

方 祥 周焕彩 王忠霞 孙丽娜 李 彬

(华南农业大学食品学院, 广州, 510642)

**摘 要** 从日本纳豆食品中分离到 1 株枯草芽孢杆菌纳豆亚种 (*Bacillus subtilis natto*) Bs01-1 菌株, 根据纳豆芽孢杆菌产纳豆激酶与蛋白酶活性的正相关关系, 采用紫外线直接照射涂菌蛋白平板进行诱变育种的, 成功地筛选到 2 株突变株 MBS04-6 和 MBS04-9, 其溶纤活性分别比出发菌株提高了 87% 和 69%, 达到 4 179 IU/mL 和 3788 IU/mL。该法筛选菌株的正向突变率达到 10%。

**关键词** 枯草芽孢杆菌纳豆亚种, 纳豆激酶, 突变率, 诱变育种

纳豆具有溶解血栓的效果, 其活性物质纳豆激酶 (Nattokinase, NK)<sup>[1]</sup>。纳豆激酶来源于食品, 是一种安全、廉价且口服有效的酶制剂<sup>[2]</sup>, 口服纳豆激酶制剂, 不但能够激活血纤维蛋白溶酶活性<sup>[3]</sup>, 也可直接溶解血纤维蛋白<sup>[4]</sup>, 其溶纤活性约为血纤维蛋白溶酶的 4 倍<sup>[5]</sup>, 其溶纤活性在血液中可保留超过 3 h 以上<sup>[6]</sup>。Fujita<sup>[7]</sup>研究表明, 纳豆激酶是一种丝氨酸蛋白酶, 具有 275 个氨基酸残基, 其氨基酸序列与枯草杆菌蛋白酶具有高度同源性。李立民等<sup>[8]</sup>发现, 酪蛋白或明胶液化能力强的分离株通常溶血纤维蛋白溶解能力也强, 即菌株的纳豆激酶与蛋白酶活性有正相关关系。笔者利用这一相关关系, 对传统的紫外诱变筛选方法进行改进, 即将涂菌蛋白平板经过紫外直接照射诱变, 然后遮光培养, 根据纳豆芽孢杆菌菌落周围形成的蛋白水解透明圈的大小进行正向筛选, 获得 1 株高产纳豆激酶菌株, 编号为 MBS04-6。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

纳豆(原产日本), 尿激酶(沈阳光大制药厂), 冻干人纤维蛋白原(上海莱士血制品有限公司), 凝血酶(三九集团昆明白马制药有限公司), 其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 培养基

营养琼脂蛋白胨: 1.0%, 牛肉膏 0.5%, NaCl 0.5%, 琼脂 2.0%, pH 7.2~7.4, 用于纳豆菌保藏。

种子培养基: 蛋白胨 1.0%, 酵母膏 0.5%, NaCl 0.6%, 葡萄糖 0.5%, pH 7.2~7.4。

蛋白培养基: 脱脂乳粉 5.0%, NaCl 0.5%, 葡萄糖 1.0%, 琼脂 2.0%, pH 7.4。

发酵培养基: 豆乳 5%, 蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.2%, NaCl 0.4%, MgSO<sub>4</sub> 0.03%, CaCO<sub>3</sub> 0.05%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, 自然 pH。

以上培养基均采用蒸馏水进行配制。

### 1.3 菌种分离与鉴定

#### 1.3.1 菌种分离

称取纳豆 10 g 置于装有 90 mL 无菌生理盐水的 500 mL 三角瓶中, 充分振荡均匀后, 用装有 9 mL 无菌生理盐水的试管梯度稀释菌悬液至 10<sup>-8</sup>后, 取 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>和 10<sup>-8</sup>三个稀释度的菌悬液各 1 mL 入融化并冷却至 45~50℃ 的蛋白培养基, 混合均匀后倒平板。凝固后倒置培养 48 h, 挑取蛋白水解透明圈较大的菌落。

#### 1.3.2 菌种的鉴定

对菌落形态、菌体形态和生理生化特征的鉴定参照文献[9]提供的方法。

### 1.4 紫外诱变的方法

分别将纳豆芽孢杆菌的 16 h 和 24 h 斜面培养物 (>90% 为芽孢) 梯度稀释成浓度约为 1×10<sup>3</sup>/mL 的菌悬液, 取 100 μL 注入直径 9 cm 的蛋白培养基平板, 并涂布均匀。立即放入暗室中的紫外光下照射 (距离为 25 cm), 诱变时间设置 1 min, 2.5 min, 5 min, 7.5 min, 10 min 五个处理, 每个处理设 3 个重复。处理时间一到立即用黑布包裹后放入 37℃ 恒温箱, 倒置培养 24 h 后, 挑取透明圈大者转接到营养琼脂斜面 37℃ 培养 24 h 后保藏。

### 1.5 纤维蛋白平板的制作

称取 0.4 g 冻干人纤维蛋白原, 溶解于 100 mL pH7.8 的磷酸缓冲液, 并分装入大试管中 (10 mL/管); 称取 0.3 g 琼脂粉入大试管, 加入 10 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 加热溶解; 将 2 管放入 50℃ 水浴中, 温度平衡后混合, 并加入 0.5 mL 凝血酶溶液 (10

第一作者: 博士研究生, 讲师。

收稿日期: 2005-09-20

IU/mL) 混匀后立即倒入无菌培养皿(9 cm),冷却至呈现乳白色后打孔备用。

1.6 尿激酶活性标准曲线的制作

取尿激酶倍比稀释至 5 000、2 500、1 250、625、312.5 IU 后,分别取 20  $\mu$ L 注入纤维蛋白平板的小孔内,37℃温育 18 h 后用游标卡尺测量透明圈相互垂直的 2 个直径,同时测量透明圈和孔的直径,并分别计算两者面积后,以面积之差(S)的对数为纵坐标,酶活单位(U)的对数为横坐标作图,得标准曲线。

1.7 纳豆菌的液体发酵

将纳豆菌斜面菌种接种到装有 20 mL 液体种子培养基的 300 mL 三角瓶中,37℃,200 r/min 下振荡培养活化 20 h 后,按 2% 的接种量接种到装有 30 mL 发酵培养基中,在 30℃下,采用 200 rpm 的摇床转速振荡培养,72 h 后中止发酵,测定发酵液中的纳豆激酶活性。

1.8 纳豆激酶活性测定方法

将纳豆豆乳发酵液静置 10 min,取上清液 20  $\mu$ L 注入纤维蛋白平板的小孔,37℃温育 18 h,用游标卡尺测量透明圈及中间小孔的相互垂直的两个直径,计算出 2 者面积差的对数值,根据标准曲线得样品酶活。

1.9 纳豆芽孢杆菌 MBS04-6 菌株传代实验

取 MBS04-6 菌株在营养琼脂斜面上每隔 24 h 划线接种 1 次,并在 37℃恒温培养进行连续传代实验,每隔 5 代测定 1 次菌株发酵液的纳豆激酶酶活,以观察该菌株的产纳豆激酶能力的遗传稳定性。

1.10 纳豆激酶冻干制剂的试制及其酶活测定

将纳豆菌株 MBS04-6 的豆乳发酵液与冻干保护剂混合后,在 -50~-60℃抽真空冻干,密封袋包装贮藏。精确称取 1.00g,用 10 mL 无菌生理盐水混合充分振荡重悬浮后,采用倾注平皿法测活菌数,然后静置 10 min 后,取 20  $\mu$ L 上清液按 1.8 所述的方法测定纳豆激酶活性。

2 结果与分析

2.1 纳豆菌的分离与鉴定

从日本纳豆中共分离得到 7 株菌落和细胞形态与枯草芽孢杆菌标准菌株相似的芽孢杆菌,经菌体形态和生理生化特征鉴定,可确定为枯草芽孢杆菌纳豆亚种(*Bacillus subtilis natto*)。结果见图 1 和图 2。

2.1.1 菌落及个体形态

在营养琼脂平板上,37℃恒温培养 24 h 后,菌落圆形、表面粗糙有皱褶、微突起、边缘不整齐、无光泽、

呈乳白或灰白色,菌落直径 2.0~5.4 mm。菌体杆状,(2.2~3.0) $\mu$ m $\times$ (0.6~0.8) $\mu$ m,革兰氏染色阳性,有鞭毛,能运动,芽孢呈椭圆或柱状、无明显膨大、中生或近中生。

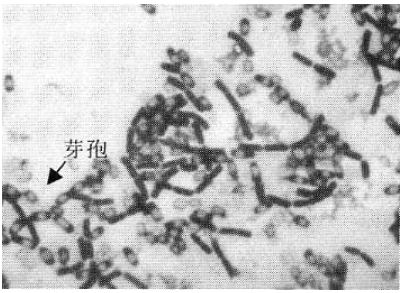


图 1 菌株 MBS04-6 菌体及芽孢形态

1-MBS04-6; 2-BS01-7; 3-BS01-1;  
4-BS01-5; 5-BS01-9; 6-BS01-2

图 2 纳豆激酶溶纤平板

2.1.2 菌体生理生化特性

以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为标准对照菌株,共同进行生理生化特性的试验。鉴定结果表明,BS01-1 等 7 株菌株与对照菌株生理生化特性相同(表 1),因此,可以认定该菌株为枯草芽孢杆菌纳豆亚种(*Bacillus subtilis natto*)。

表 1 BS01-1 菌株生理生化鉴定结果

实验项目	反应或特性	实验项目	反应或特性
厌氧生长	-	葡萄糖产酸	+
运动性	+	木糖产酸	+
过氧化氢酶	+	阿拉伯糖产酸	+
NaCl 7% 生长	+	甘露醇产酸	+
pH5.7 营养肉汤	+	葡萄糖产气	-
pH6.8 营养肉汤	+	利用柠檬酸盐	+
V.P 反应	+	水解明胶	+
V.P 中的 pH	6.2~6.5	水解淀粉	+
生长温度/℃	15~50	水解酪蛋白	+
粘性物质产生	+	硝酸盐还原	+
		到亚硝酸盐	+

## 2.1.3 7株纳豆芽孢杆菌发酵液酶活比较

由表2可知,不同菌株间发酵液酶活有一定差

表2 7株纳豆芽孢杆菌发酵液酶活比较 ( $n=3$ )

菌株编号	BS01-1	BS01-2	BS01-5	BS01-7	BS01-8	BS01-9	BS01-11
酶活/ $\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$	2234 $\pm$ 216	2156 $\pm$ 145	1894 $\pm$ 110	1789 $\pm$ 74	1940 $\pm$ 132	2095 $\pm$ 114	1332 $\pm$ 55

## 2.2 BS01-1 菌株紫外诱变的结果

由于传统的紫外诱变育种方法繁琐且容易造成杂菌污染。本实验采用简化了试验程序,即用菌悬液涂抹平板后直接在紫外光下照射后,用黑布包裹于37℃恒温培养48 h,然后分别测量并记录蛋白水解透明圈和菌落的直径,并采用纤维蛋白平板法测定相应菌株发酵酶活。

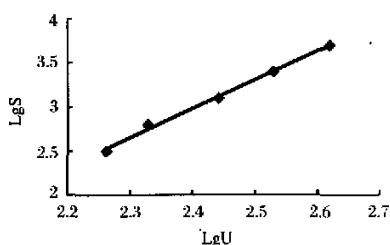


图3 尿激酶活性的标准曲线

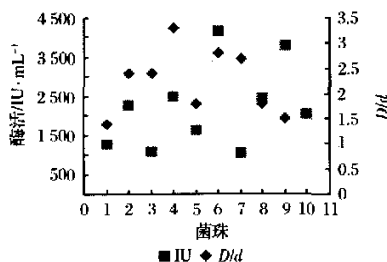


图4 蛋白酶与纳豆激酶活性散点图

( $D$  - 透明圈直径,  $d$  - 菌落直径)

由图4可见,紫外诱变后,根据蛋白水解透明圈面积筛选的20株纳豆芽孢杆菌,有2株芽孢杆菌的产纳豆激酶能力与出发菌株比较有显著提高,即MBS04-6和MBS04-9,2菌株的产酶活性达到4179 IU/mL和3788 IU/mL,分别比出发菌株(2234 IU/mL)的提高了87%和69%,有7株芽孢杆菌的产酶活性无明显改变,有11株芽孢杆菌产酶活性明显低于出发菌株,正向筛选成功率为10%,高于梁思宇报道的4.44%的正向突变率<sup>[10]</sup>。对20株菌株蛋白水解能力与溶纤活性的相关性分析表明,纳豆芽孢杆菌的蛋白水解能力与其发酵液溶纤活性表现并不完全一致,其中有8株芽孢杆菌两者的活力表现出较大的

离散性,可能是由于紫外诱变导致基因突变,致使不同菌株的产纳豆激酶和蛋白酶的能力发生改变。

## 2.3 MBS04-6 菌株溶纤酶活性的传代稳定性

对诱变后产酶活最高的菌株MBS04-6进行传代实验,即每24 h传代1次,每连续传代5次后测定发酵酶活1次,以研究该菌株产纳豆激酶能力的遗传稳定性。结果表明,20代之之前该菌株的产酶活性无明显改变,传代30代时酶活共降了近4%,但并未达到5%的显著水平(见图5),说明MBS04-6菌株的遗传特性是相对稳定的。

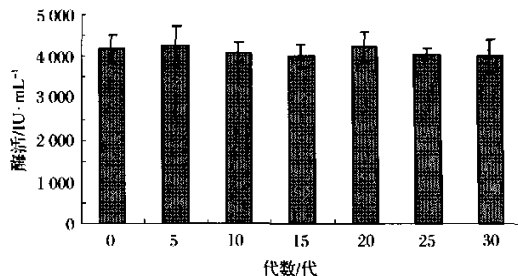


图5 纳豆芽孢杆菌MBS04-6传代稳定性试验结果

## 2.4 纳豆激酶冻干粉

对MBS04-6菌株纳豆激酶冻干粉稀释液上清液的酶活性测定结果表明,其10倍稀释液的纳豆激酶活性为(2394 $\pm$ 154) IU/mL,即每克纳豆激酶冻干粉中纳豆激酶活性高达近2.4万单位。活菌含量为(2.4 $\pm$ 0.2) $\times 10^9$  CFU/g(冻干粉)。

## 3 结论与讨论

将涂板后的有菌平板直接在紫外光下照射诱变,根据溶纤活性与蛋白酶活性的相关性选择溶蛋白圈大的菌株,方法简便且能有效的对高产纳豆激酶菌株进行正向筛选,避免筛选的随机性,提高筛选成功率。采用该方法诱变后筛选的突变株MBS04-6发酵液的溶纤活性明显提高,且该菌株的遗传性能稳定。

Kunst等<sup>[11]</sup>对枯草芽孢杆菌全序列的测定分析并证实了DNA编码了11种胞外蛋白酶。其中,主要的2种蛋白酶分别为由 $apr$ 和 $npr$ 基因编码的枯草杆菌蛋白酶和碱性蛋白酶,它们的蛋白酶活性占到

所有胞外蛋白酶活性的 90%<sup>[12]</sup>。由此可见,紫外诱变后可能造成不同菌株的蛋白酶基因的突变和表达量的此消彼长,从而导致本试验中出现纳豆芽孢杆菌的蛋白水解能力与其发酵液溶纤活性表现并不完全一致的现象。

### 参 考 文 献

- Sumi H Hamadah, Tsushima. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43: 1 110~1 111
- 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
- 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: 1 387~1 391
- Chang CT, Fan MH, Kuo FC, et al. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3 210~3 216
- Fujita M, Ito Y, Hong K, et al. Characterization of Nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin[J]. Fibrinolysis, 1995(9): 157
- Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18: 1 194~1 196
- Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197: 1 340~1 347
- 李立民,惠洪文,郭 军. 纳豆激酶生产菌的定向筛选[J]. 内蒙古农业大学学报, 2002, 23(4): 107~109
- 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001. 43~63
- 梁思宇. 枯草芽孢杆菌溶纤酶高产菌株选育及发酵条件研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2000: 29
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al., The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1997, 390: 249~256
- Kawamura F, Doi R H. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deWcient in extracellular alkaline and neutral proteases[J]. J Bacteriol, 1984, 160: 442~444

## Isolation and Forward Breeding of *Bacillus subtilis* natto with High Fibrinolytic Activity Nattokinase

Fang Xiang Zhou Huancai Wang Zhongxia Sun Lina Li Bin

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**ABSTRACT** *Bacillus subtilis* natto Bs01-1 strain was isolated from Natto, a Japanese traditional fermented soy food. According to the relationship of the proteinase activity and fibrinolytic activity of nattokinase, two mutants, MBS04-6 and MBS04-9 were selected from Bs01-1 strain by the UV radiation. The fibrinolytic activities of nattokinase from of these two mutants were up to 4179IU/mL and 3788IU/mL, respectively. The forward mutation radio of *Bacillus subtilis* natto with nattokinase fibrinolytic activity was 10%.

**Key words** *Bacillus subtilis* natto, nattokinase, fibrinolytic activity, mutation radio, mutation breeding

### 市 场 动 态

### 乳品市场出新品——植物酸乳

乳制品又出现新概念,经过科技攻关,一种以大豆为原料的植物蛋白经过合成发酵而成的新型乳制品——植物酸乳在南汇一家新生物科技企业研制诞生。

根据中国人的饮食习惯,历来是以植物性食物为主食,因此开发植物蛋白产品会更受大家欢迎。在这样的市场需求下,利用植物蛋白通过特殊的发酵工艺制成植物酸乳乳制品应运而生。植物蛋白特别是大豆含蛋白质 40% 左右,在量和质上均可与动物蛋白媲美,大豆蛋白含人体必需氨基酸较多,尤其与生长发育密切相关的赖氨酸远高于谷类。大豆蛋白在发酵后能使氨基酸含量增加 11 倍,而一般酸乳仅增加 4 倍,所以是生产植物酸乳的上佳原料。

同时,大豆蛋白中不饱和脂肪酸含量低,产品本身就不易变质。加之在产品包装上,采用了耐温、密封性好的材料,产品在常温下保质期可达 10 个月,也改变了牛乳酸乳在配送上的不便。在工艺上,“完全脱腥”的专利技术解决了传统豆类抗营养性、致甲状腺肿大、肠胃不适、胀气以及豆腥等对营养吸收具有的副作用。