

# 高活性纳豆激酶工艺改进研究

张浩, 王家林 (青岛科技大学生物工程实验室, 山东青岛 266042)

**摘要** [目的]优化高活性纳豆激酶的纳豆生产工艺条件。[方法]从市售纳豆产品中分离筛选出高活性的菌株作为试验菌株,采用固态发酵的方法制备纳豆,对影响纳豆激酶产量的主要因素浸泡时间、接种量、发酵时间等进行考察,研究高活性纳豆激酶的工艺条件。[结果]利用对甲基苯磺酰 L 精氨酸甲酯(TAME)法测定纳豆激酶活性,确定最佳纳豆激酶酶活的纳豆生产工艺条件为浸泡时间 8 h、接种量 10%、发酵时间 48 h。[结论]该研究可为高活性纳豆激酶的生产提供参考。

**关键词** 纳豆;纳豆激酶;活性测定;工艺优化

中图分类号 TQ925 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)10-0093-02

## Study on the Improvement of High Activity Natto Kinase

ZHANG Hao, WANG Jia-lin (Biological Engineering Lab of Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042)

**Abstract** [Objective] To optimize the process conditions of high activity natto kinase. [Method] Natto was isolated from commercial natto products and used as the experimental strain. Natto was prepared by solid-state fermentation. The process conditions of high activity natto kinase were studied. The main factors affecting the yield of natto kinase were as follows: immersion time, inoculation amount and fermentation time. [Result] The activity of natto kinase was determined by TAME method. The optimum natto kinase production process conditions were determined as 8 h soaking time, 10% inoculation amount, 48 h fermentation time. [Conclusion] The study can provide reference for production of high activity natto kinase.

**Key words** Natto; Natto kinase; Activity determination; Process optimization

纳豆是经过蒸煮的大豆在纳豆芽孢杆菌的发酵作用下产生的发酵食品<sup>[1]</sup>。纳豆含有多种生理活性物质,具有扩张血管、溶解血栓、促进血液循环、抗癌、抗菌、抗氧化、延缓衰老、预防骨质疏松、改善肠道环境等生理功能。纳豆激酶是由纳豆芽孢杆菌分泌的具有溶栓作用的碱性丝氨酸蛋白酶<sup>[2]</sup>,是由 275 个氨基酸残基组成的单链多肽,属于胞外酶,其相对分子质量不大,具有溶解血栓的作用,并且在人体内作用迅速、半衰期短,因此近年来受到世界各国医学界的广泛关注。

该试验是在成品纳豆中提取纳豆芽孢杆菌,经过逐级放大培养后接种到高温蒸汽灭菌的黄豆中,通过改变浸泡时间、接种量、发酵时间、后熟时间等条件进行发酵培养。将纳豆碾碎后加生理盐水溶解,通过冷冻离心保留上清液,再经过 2 次硫酸铵沉淀分离提纯得到纳豆激酶粗酶,再利用 pH 6.5 的磷酸缓冲液溶解得到粗酶液<sup>[3]</sup>。利用对甲基苯磺酰 L 精氨酸甲酯(TAME)法测定纳豆激酶活性,确定最佳纳豆激酶酶活的纳豆生产工艺条件。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 大豆,海琴利群超市购买;芽孢杆菌<sup>[4]</sup>。主要仪器:T6 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;LRH-250 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;YXQ-LS-18SI 不锈钢手提式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电子调温万用电炉等。

**1.2 方法** 该试验以 TAME 法测定纳豆激酶的活性,纳豆激酶对精氨酸羧基端肽有较强的切割作用,因此以 TAME 为底物,在一定条件下纳豆激酶将 TAME 切割为对甲基苯磺酰 L

精氨酸和甲醇,高锰酸钾具有强氧化性,可以将甲醇氧化为甲醛,甲醛再与变色酸在沸水浴中发生显色反应,生成蓝紫色复合物<sup>[5]</sup>。该复合物颜色稳定,在 574 nm 处有最大的吸光度,因此可以作为常规检测纳豆激酶酶活的方法。

**1.2.1 大豆浸泡时间对纳豆激酶酶活的影响。**取 4 个试剂瓶,分别加入 10 g 大豆,按照豆水比为 1:2(g:mL)的比例加入蒸馏水,盖上瓶塞进行浸泡并计时,浸泡时间依次为 6、8、10、12 h;浸泡完成后进行 115 °C 高温灭菌 30 min;按照 6% 的接种量依次接种芽孢杆菌,接种完后将瓶口封好并在外部附上一层保鲜膜防止其在生化培养箱中水分蒸发,放入生化培养箱中 39 °C 发酵 48 h<sup>[6]</sup>,然后取出放入冰箱 4 °C 保鲜层后熟 24 h;之后提取出纳豆激酶<sup>[7]</sup>,采用 TAME 法测定其活性。

**1.2.2 发酵接种量对纳豆激酶酶活的影响。**取 6 个试剂瓶,分别加入 10 g 大豆,按照豆水比为 1:2(g:mL)的比例加入蒸馏水,盖上瓶塞进行浸泡并计时,浸泡时间为 10 h;浸泡完成后进行 115 °C 高温灭菌 30 min;按照 2%、4%、6%、8%、10%、12% 的接种量依次接种芽孢杆菌,接种完后将瓶口封好并在外部附上一层保鲜膜防止其在生化培养箱中水分蒸发,放入生化培养箱中 39 °C 发酵 48 h<sup>[6]</sup>,然后取出放入冰箱 4 °C 保鲜层后熟 24 h;之后提取出纳豆激酶,采用 TAME 法测定其活性。

**1.2.3 发酵时间对纳豆激酶酶活的影响。**取 4 个试剂瓶,分别加入 10 g 大豆,按照豆水比采用 1:2(g:mL)加入蒸馏水,盖上瓶塞进行浸泡并计时,浸泡时间为 10 h;浸泡完成后进行 115 °C 高温灭菌 30 min;按照 6% 的接种量依次接种芽孢杆菌,接种完后将瓶口封好并在外部附上一层保鲜膜防止在生化培养箱中水分蒸发,放入生化培养箱中 39 °C 发酵时间依次为 24、36、48、60 h,然后取出放入冰箱 4 °C 保鲜层后熟 24 h;之后提取出纳豆激酶,采用 TAME 法测定其活性。

## 2 结果与分析

作者简介 张浩(1993—),男,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向:酿酒科学与技术。\* 通讯作者,教授,硕士生导师,从事酒类与食品科学研究。

收稿日期 2017-01-13

**2.1 不同大豆浸泡时间对发酵酶活的影响** 由图1可知,随着浸泡时间的增加,检测到的吸光度呈先增加后降低的趋势。这是由于浸泡时间短,大豆吸水不充分,发酵过程中水分不足,导致拉丝物质少且黏性较差,出现各部分传质不均匀的现象,限制了纳豆菌的生长繁殖;当浸泡时间过长,大豆吸水膨胀,发酵过程中得不到足够的氧气,也会影响纳豆激酶的酶活。因此选择浸泡时间为8 h时作为最佳工艺控制点。

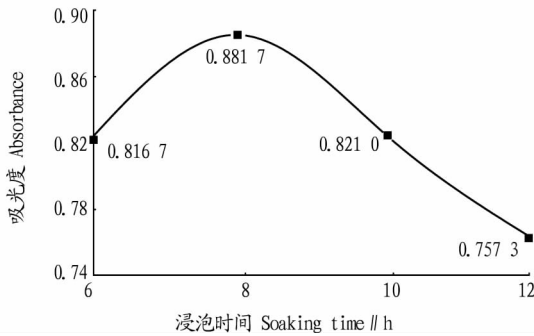


图1 不同大豆浸泡时间对发酵酶活的影响

Fig.1 Effects of different soybean soaking time on natto kinase activity

**2.2 不同发酵接种量对发酵酶活的影响** 由图2可知,吸光度的峰值位于接种量10%处,这是由于如果接种量过小,纳豆菌种会用较长时间来适应新的环境,从而延长发酵时间,而接种量过大,纳豆菌种会因为生长过快消耗大量营养

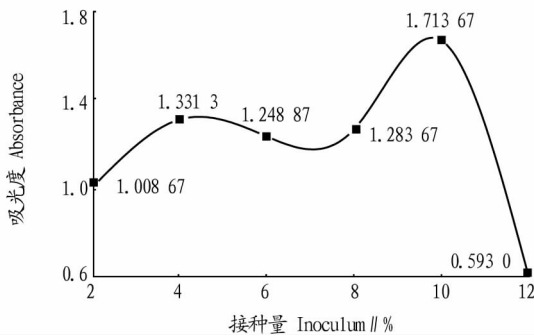


图2 不同发酵接种量对发酵酶活的影响

Fig.2 Effects of different fermentation inoculum on natto kinase activity

物质,并且氧气量不足。考虑到营养成分的利用率,因此选择接种量10%作为最佳工艺点(前提是菌群密度为 $1.93 \times 10^7$ 个/mL菌液)。

**2.3 不同发酵时间对发酵酶活的影响** 由图3可知,在发酵时间为24~48 h时检测出的吸光度呈不断增加的趋势,发酵时间48 h时达到最高,之后随着发酵时间增加,检测到的吸光度逐渐降低。这是由于随着发酵时间的增加,发酵后期营养物质减少,纳豆菌体逐渐老化,因此将48 h作为最佳发酵时间。

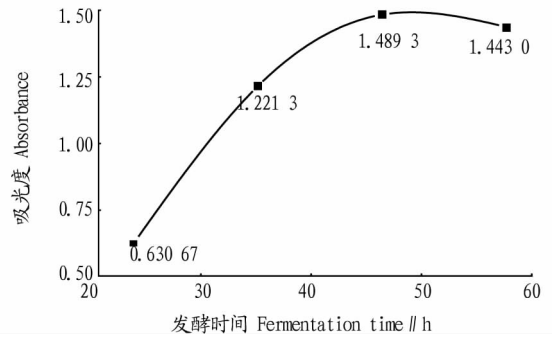


图3 不同发酵时间对发酵酶活的影响

Fig.3 Effects of different fermentation time on natto kinase activity

### 3 结论

该试验通过改变大豆浸泡时间、芽孢杆菌接种量、发酵时间3个因素制作纳豆,利用TAME法测定纳豆中纳豆激酶酶活,最终确定高产纳豆激酶最佳工艺条件为浸泡8 h,接种量为10%,发酵时间48 h,制得纳豆的纳豆激酶酶活最高。

### 参考文献

- [1] 苏雪燕. 纳豆激酶分离、纯化及其酶学性质研究[D]. 曲阜:曲阜师范大学,2013.
- [3] 梁一博,白亮,唐鑫媛,等. 纳豆激酶产品研究现状及其进展[J]. 农产品加工·学刊,2011(4):23-25.
- [2] 付利,杨志兴. 纳豆激酶的研究与应用[J]. 中国生物工程杂志,1995,15(5):46-49.
- [4] 奚晓琦,王加启,卜登攀,等. 纳豆芽孢杆菌的分离鉴定及纳豆激酶高产菌株的筛选[J]. 东北农业大学学报,2009,40(11):69-75.
- [5] 熊迎新,尹宗宁,杨超,等. 纳豆激酶活性测定方法的研究[J]. 药物生物技术,2006,13(2):140-143.
- [6] 孙清荣. 纳豆食品生产状况调研[J]. 食品工程,2010(4):16-18.
- [7] 李睿,阮文辉. 纳豆激酶NKII分离纯化及其酶促动力学研究[J]. 中国酿造,2016,35(7):89-92.

(上接第77页)

(3) 流量峰值产生时间、电导率峰值产生时间、退水时间退水量和径流系数则主要取决于下垫面性质,入渗性能强、坡度小的下垫面的流量峰值和电导率峰值均出现延后,径流系数变小,降雨停止以后,迅速退水且退水量少。

(4) 降雨动能的影响大于下垫面的入渗量,是影响溶解性污染物冲刷效率的最主要因素,降雨动能较小,入渗量较强的草地和透水砖的冲刷效率更高。

### 参考文献

- [1] 李立青,尹澄清,何庆慈,等. 城市降水径流的污染来源与排放特征研

究进展[J]. 水科学进展,2006,17(2):288-294.

- [2] 任玉芬,王效科,欧阳志云,等. 北京城市典型下垫面降雨径流污染初始冲刷效应分析[J]. 环境科学,2013,34(1):373-378.
- [3] 张千千,李向全,王效科,等. 城市路面降雨径流污染特征及源解析的研究进展[J]. 生态环境学报,2014,23(2):352-358.
- [4] 李倩倩,李铁龙,刘大喜,等. 天津市不同土地利用类型雨水径流污染特征[J]. 环境污染与防治,2011,33(7):22-26.
- [5] 车伍,张伟,李俊奇. 城市初期雨水和初期冲刷问题剖析[J]. 中国给水排水,2011,27(14):9-14.
- [6] 李立青,尹澄清,孔玲莉,等. 2次降雨间隔时间对城市地表径流污染负荷的影响[J]. 环境科学,2007,28(10):2287-2293.
- [7] 孙艳伟,魏晓妹, POMEROY C A. 低影响发展的雨洪资源调控措施研究现状与展望[J]. 水科学进展,2011,22(2):287-293.