

以豆粕为原料固态发酵产纳豆激酶工艺的优化

孙 岩, 王海宽, 王建玲, 戚 薇

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 以食品级豆粕为唯一培养基成分, 通过纳豆芽孢杆菌固态发酵产纳豆激酶的培养基的优化实验, 确定优化条件为: 接种量 5%, 装量为 40 g 于 250 mL 锥形瓶, 培养基含水量 60%, 浸泡水 pH 7.5, 发酵温度 37 °C. 在培养 24 h 后达到产酶高峰, 产酶活力达到 1 662 FU/g. 比较了在相同的发酵条件下, 以食品级豆粕为培养基比大豆为培养基获得的酶活力和活菌数, 都高出 50% 左右.

关键词: 纳豆激酶; 食品级豆粕; 固态发酵; 优化

中图分类号: Q815 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)06-0007-05

Optimization of Solid-State Fermentation Conditions of Soybean Meal to Produce Nattokinase

SUN Yan, WANG Hai-kuan, WANG Jian-ling, QI Wei

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The food-grade soybean meal as the only medium composition, the fermentation conditions were studied to improve quantity of nattokinase produced by *Bacillus natto* in solid-state fermentation. The optimized conditions were as follows: 5% inoculum, solid medium volume 40 g in 250 mL flask, the water-substance ratio 60%, pH of Soaking water 7.5, temperature 37 °C. The activity of nattokinase was 1 662 FU of each gram wet basis after 24 h. Under the same conditions of fermentation, the enzyme activity and living bacterium number obtained from food-grade soybean meal were 50% higher than soybean.

Keywords: nattokinase; food-grade soybean meal; solid-state fermentation; optimization

纳豆是日本一种历史悠久的传统大豆发酵食品^[1], 早在两千年前就已经被日本人食用, 近年来发现纳豆有溶解血栓^[2]、降血压^[3]、抗凝血^[4]等功效. 传统纳豆是以大豆为主要原料, 利用固态发酵的方式制成. 纳豆激酶(nattokinase, NK)是从日本传统食品纳豆中提取出来的一种具有溶血栓功能的丝氨酸蛋白酶^[5]. 最初, 获得纳豆激酶的方式是从纳豆中提取出来的. 目前, 大都采用以不同培养基发酵的方式获得纳豆激酶. 本实验借以发酵纳豆的方式, 以食品级豆粕为唯一原料, 旨在以豆粕替代大豆利用固态发酵方式发酵产纳豆激酶. 豆粕中蛋白质含量在 40% ~ 50%, 含水量在 10% 左右, 并含有大豆异黄酮, 发酵后

产生大豆活性肽等活性物质, 可以为纳豆激酶制品增添功效. 而且豆粕所含的蛋白质等营养物质容易被菌体利用, 价格低^[6]. 固态发酵是有悠久历史的发酵技术, 具有发酵设备简单、易操作、便于工业化生产及产酶活力高等优点, 在食品行业当中有着广泛的应用. 因此, 本文以纳豆激酶活力为指标, 对固态发酵参数进行研究.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*), 天津市百德生物

收稿日期: 2011-06-23; 修回日期: 2011-09-21

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目(10ZCKFNC01600, 09ZCKFNC00800)

作者简介: 孙 岩(1986—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 戚 薇, 教授, 博士生导师, qiwei@tust.edu.cn.

工程有限公司;食品级豆粕、大豆,东北市售;凝血酶与血纤维蛋白原, Sigma 公司;其他药品均为国产分析纯。

液态种子液培养基(g/L):食品级豆粕 10,葡萄糖 20,磷酸氢二钾 1,硫酸镁 0.5, pH 7.0~7.2。

发酵培养基:用一定 pH 的常温蒸馏水浸泡食品级豆粕或大豆至充分吸水,浸泡大豆需要沥干水分。浸泡好的培养基经 115 °C 高压蒸汽灭菌 25 min, 备用。

1.2 培养方法

斜面培养:将接种好的斜面放置于 37 °C 恒温培养箱培养 18 h。

液态种子培养:在 500 mL 三角瓶中 100 mL 液态种子培养基,接 1 环斜面菌种,于 37 °C 恒温摇床 150 r/min 培养 20 h。

1.3 纳豆芽孢杆菌生长曲线的绘制

取斜面保存的纳豆芽孢杆菌接种于盛有 100 mL 液体种子培养基的 500 mL 三角瓶中,37 °C、150 r/min 培养,每 2 h 取样,将样品用无菌生理盐水稀释 5 倍后,在 600 nm 条件下测定该样品稀释液的吸光度。

1.4 固体发酵

豆粕与 pH 7.0 的蒸馏水按照体积比为 1:1.5 混合后浸泡 12 h,分装到 250 mL 三角瓶中,经 115 °C 灭菌 25 min,待冷却备用。以一定接种量接种,接种后堆积培养,待见白膜生成,拍打瓶身,将培养基分散开,使菌体与发酵培养基接触更加均匀,37 °C 恒温培养 24 h。

1.5 活菌计数

将发酵后的豆粕用无菌生理盐水进行适当稀释,然后采用倾注法计数^[7]:按 10 倍稀释法制成不同浓度稀释液,从 3 个合适的稀释液中分别吸取 1 mL 置于无菌培养皿中,每一稀释度做 3 个平皿。将事先融化并冷却至 50 °C 左右的肉汤固体培养基,向每个培养皿中倒入约 10~15 mL,摇匀,待凝固后,倒置于 37 °C 培养箱中培养 18 h,进行菌落计数。

1.6 芽孢率测定

将一定稀释度的菌液置于 80 °C 水浴 10 min,然后采用倾注法计数^[7]。

$$\text{芽孢率} = \frac{\text{水浴后活菌数}}{\text{该稀释度下的活菌数}} \times 100\%$$

1.7 纳豆激酶活力测定

发酵结束后,每克固体发酵成熟物加入质量分数为 0.9% 生理盐水 5 mL,4 °C 浸提 4 h,4 500 r/min 离

心 20 min,上清液即为固体发酵粗酶溶液。纳豆激酶活力测定方法采用 FU^[8]法,其原理是:通过测定 275 nm 紫外光下的吸光度,定量纳豆激酶作用血纤维蛋白时,伴随肽键的分解而增加的酸溶性低分子产物含量,计算出纤维蛋白溶解酶活力。该方法测定的酶活力定义为:在 1 min 内使除去酸不溶性物质的反应液在 275 nm 的吸光度增加 0.01 所需的酶量为 1 个酶活力单位,即为 1 FU。

1.8 发酵产酶条件的优化

1.8.1 装量的确定

分别在 250 mL 三角瓶中加固体培养基 20、30、40、50、60 g,培养基含水量为 60%,浸泡水的 pH 7.0。按照固体发酵培养方法接种量为 10%,37 °C 培养 24 h,测定纳豆激酶酶活力、活菌数和芽孢率。

1.8.2 培养基含水量的确定

在 250 mL 三角瓶中加固体培养基 40 g,浸泡水的 pH 为 7.0,培养基灭菌后含水量分别为:50%、60%、70%、80%、90%。按照固体发酵培养方法接种量为 10%,37 °C 培养 24 h,测定纳豆激酶酶活力、活菌数和芽孢率。

1.8.3 培养温度的确定

在 250 mL 三角瓶中加固体培养基 40 g,培养基含水量为 60%,浸泡水的 pH 7.0。按照固体发酵培养方法接种量为 10%,分别在 35、36、37、38、39 °C 培养 24 h,测定纳豆激酶酶活力、活菌数和芽孢率。

1.8.4 浸泡水 pH 的确定

在 250 mL 三角瓶中加固体培养基 40 g,培养基含水量为 60%,浸泡水的 pH 分别为:5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,按照固体发酵培养方法接种量为 10%,37 °C 培养 24 h,测定纳豆激酶酶活力、活菌数和芽孢率。

1.8.5 接种量的确定

在 250 mL 三角瓶中加固体培养基 40 g,培养基含水量为 60%,浸泡水的 pH 7.0。按照固体发酵培养方法接种量分别为 1%、5%、10%、15%、20%,37 °C 培养 24 h,测定纳豆激酶酶活力、活菌数和芽孢率。

1.8.6 正交实验

根据单因素实验结果,利用正交实验确定发酵条件。

2 结果与讨论

2.1 纳豆芽孢杆菌液态种子液生长曲线

纳豆芽孢杆菌液态种子液的菌种生长曲线如图 1 所示。由图可以看出,0~12 h 为延滞期,12~26 h

为该菌的指数生长期,26 h 后进入稳定期,田艳等^[9]经研究认为,处于指数生长期尤其是中期的幼龄种子接种发酵培养基后的产酶活性高,适应性强,延滞期短,从而确定最适种龄为 20 h.

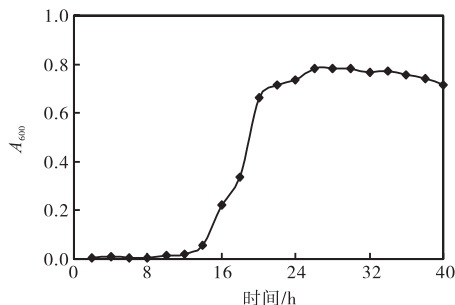


图1 纳豆芽孢杆菌液态种子液的菌种生长曲线
Fig.1 Growth curve of the liquid seed of *Bacillus natto*

2.2 固态发酵生长曲线

固态发酵生长曲线如图 2 所示. 由图中曲线可以看出,延滞期很短;2~14 h 为该菌的指数生长期,期间菌体快速生长,前段(2~8 h)活菌数和酶活增加很快,芽孢率较低,增加不大,后段(8~14 h)活菌数、酶活和芽孢率同时增加;14~24 h 为稳定期,这时期的活菌数较稳定,酶活和芽孢率增加很快;24 h 后进入衰亡期,这时期的培养基的营养成份消耗很大,菌体间的生长竞争激烈,活菌数逐渐减少,酶活也略有减少,芽孢率稳定在 70%左右. 因此选定固态发酵时间为 24 h.

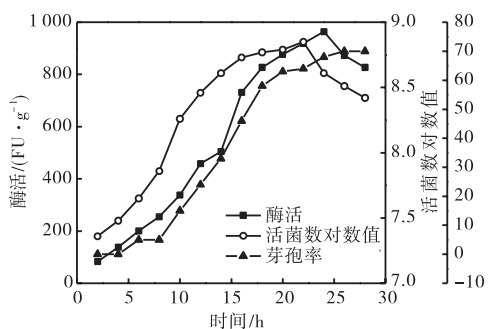


图2 纳豆芽孢杆菌固态发酵的生长曲线
Fig.2 Solid-state fermentation growth curve of *Bacillus natto*

2.3 装量对发酵产酶的影响

不同装量对发酵产酶的影响如图 3 所示. 由图 3 可以看出,纳豆激酶在装量为 40 g 时产量最高,此时活菌数也最高.

2.4 培养基含水量对发酵产酶的影响

培养基含水量对发酵产酶的影响如图 4 所示,最适的培养基含水量为 60%. 含水量低于 50%时,培养基较干燥,缺少水分,不利于菌体生长,高于 80%,培

养基水分高,成稀糊状,不利用附着在培养基表面上的白色菌膜的形成. 水分合适的培养基应达到捏之即散、握之成团的要求.

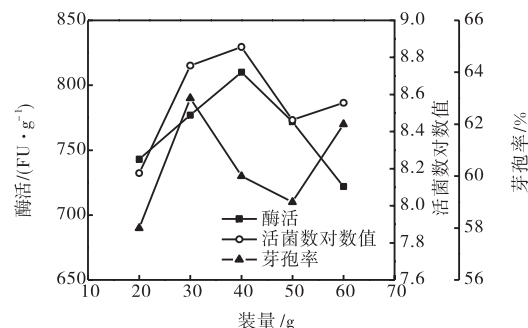


图3 不同装量对纳豆激酶活力、活菌数和芽孢率的影响
Fig.3 Influence of content on the natto kinase enzyme production, living bacteria number and spore rate of *Bacillus natto*

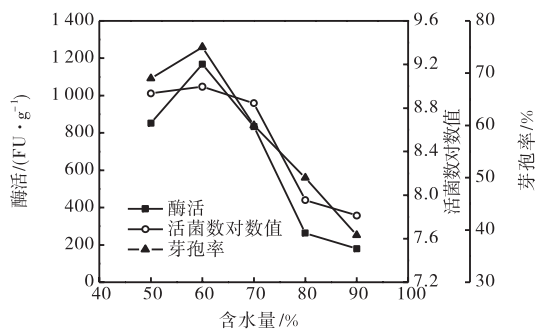


图4 不同含水量对纳豆激酶活力、活菌数和芽孢率的影响
Fig.4 Influence of water content on the natto kinase enzyme production, living bacteria number and spore rate of *Bacillus natto*

2.5 培养温度对发酵产酶的影响

不同温度对产酶的影响结果如图 5 所示. NK 在 37 °C 产量最高,温度高于或低于 37 °C 产量均降低,故 NK 的最适发酵温度为 37 °C.

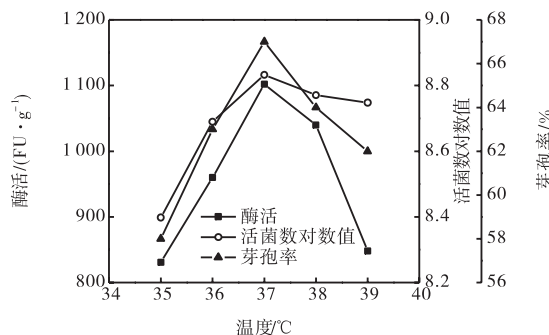


图5 不同温度对纳豆激酶活力、活菌数和芽孢率的影响
Fig.5 Influence of temperatures on the natto kinase enzyme production, living bacteria number and spore rate of *Bacillus natto*

2.6 浸泡水 pH 对发酵产酶的影响

浸泡水 pH 对产酶的影响如图 6 所示. 浸泡水 pH 为 7 时, 酶产量最高达到 1 566 FU/g. pH 过高或是过低均会导致酶合成的降低, 影响活菌数和芽孢率, 故浸泡水的最适 pH 确定为 7.

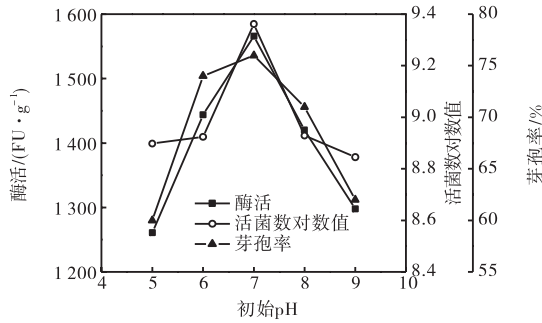


图 6 不同 pH 对纳豆激酶活力、活菌数和芽孢率的影响
Fig.6 Influence of pH value on the nattokinase enzyme production, living bacteria number and spore rate of *Bacillus natto*

2.7 接种量对发酵产酶的影响

不同接种量对产酶的影响如图 7 所示. NK 在 5%接种量时产量最高, 此时活菌数和芽孢率也最高. 过高的接种量, 会造成前期菌体生长过快, 产酶所需的养分就会减少, 产酶降低.

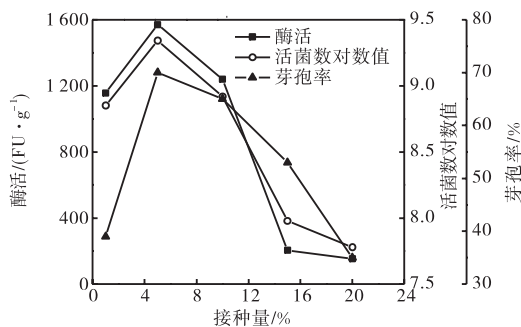


图 7 不同接种量对纳豆激酶活力、活菌数和芽孢率的影响
Fig.7 Influence of inoculum on the nattokinase enzyme production, living bacteria number and spore rate of *Bacillus natto*

2.8 培养基的优化

根据单因素实验结果, 遵循“均匀”和“整齐”

的原则, 选择培养基含水量、浸泡水 pH 和接种量为优化因素. 选取 $L_9(3^4)$ 正交表, 其结果见表 1.

表 1 正交实验结果

Tab.1 Output of experiment

实验号	含水量/%	接种量/%	pH	空白	酶活/(FU·g ⁻¹)
1	50	1	6.5	1	443
2	50	5	7.0	2	906
3	50	10	7.5	3	639
4	60	1	7.0	3	868
5	60	5	7.5	1	1 628
6	60	10	6.5	2	551
7	70	1	7.5	2	743
8	70	5	6.5	3	810
9	70	10	7.0	1	576
k_1	662.7	684.7	601.3	882.3	
k_2	1 015.7	1 114.7	783.3	733.3	
k_3	709.7	588.7	1 003.3	772.3	
R	353	526	402	149	

由方差分析表(2)可知, 影响因子主次顺序为: 接种量 > pH > 含水量, 即优化后的条件是接种量 5%, pH 7.5, 含水量 60%.

以含水量 60%、接种量 5%、pH 7.5 发酵条件进行验证实验, 接种纳豆芽孢杆菌, 在 37 °C 发酵 24 h, 用 4 倍无菌生理盐水 4 °C 浸提 4 h, 4 500 r/min 离心 20 min, 取上清液测定酶活, 结果得到的酶活平均为 1 662 FU/g. 确定最佳的培养条件为: 含水量 60%, 接种量 5%, pH 7.5.

表 2 方差分析

Tab.2 Analysis of variance on orthogonal experiment table

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
含水量	220 454	2	6.154	不显著
接种量	470 792	2	13.14	显著
pH	243 128	2	6.787	不显著
误差	35 822	2		
总和	970 196	8		

注: $F_{0.10}(2, 2) = 9.00$, $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

2.9 纳豆芽孢杆菌固态发酵大豆和豆粕的酶活比较

按照上述优化的发酵参数, 在相同的发酵条件下, 发酵大豆和豆粕, 比较其酶活、芽孢率、活菌数的高低及感官指标, 结果见表 3.

表 3 纳豆芽孢杆菌固态发酵大豆和豆粕的比较

Tab.3 Comparison on solid-state fermentation of soybean and soybean meal of *Bacillus natto*

培养基	活菌数/mL ⁻¹	芽孢率/%	酶活/(FU·g ⁻¹)	感官指标		
				色	味	口感
大豆	3.6×10^9	68	902	暗黄, 有光泽	纳豆特有香味, 略带氨味	较酥软, 湿润
食品级豆粕	6.6×10^9	70	1 662	浅黄	纳豆特有香味, 略带氨味	酥软, 有些干

从表3数据来看,以食品级豆粕为培养基发酵所获得的芽孢率较大豆稍高,但相差不大。相比之下,其活菌数和酶活力较大豆要高出50%左右。这是由于豆粕中蛋白质的含量较大豆高,可以为菌体的生长及产酶提供充分的营养物质。从感官评价来看,以大豆作为发酵培养基要优于豆粕,而两者都具有纳豆特有香味,略带氨味。

3 结 论

通过对固态发酵工艺参数的优化,确定了以豆粕为原料发酵纳豆的工艺:新鲜食品级豆粕经pH 7.5的蒸馏水按1:1.5的加水比浸泡过夜,分装40 g于250 mL锥形瓶,经过115℃灭菌25 min,以5%的接种量将液态种子液接入培养基,在37℃调温调湿箱中发酵24 h,发酵物以5倍无菌生理盐水在4℃浸提4 h,4 500 r/min离心20 min,取上清液测定酶活,该菌株纳豆激酶固态发酵产酶量达到1 662 FU/g。通过实验结果证明了在相同条件下,以豆粕为培养基较大豆有更高的纳豆激酶活力产出,活菌数和芽孢率也有着不同程度的提高。

参考文献:

- [1] 高瑞萍,刘辉,刘嘉,等. 纳豆的研究进展[J]. 食品与发酵科技,2011,47(1):23-26.
- [2] 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):1387-1391.
- [3] Ibe S,Yoshida K,Kumada K,et al. Antihypertensive effects of natto,a traditional Japanese fermented food,in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Science and Technology Research,2009,15(2):199-202.
- [4] Ohsugi T,Ikeda S,Sumi H. Anti-platelet aggregation and anti-blood coagulation activities of dipicolinic acid,a spore component of *Bacillus subtilis natto*[J]. Food Science and Technology Research,2005,11(3):308-310.
- [5] Sumi H,Hamada H,Tsushima H,et al. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase)in the vegetable cheese natto;a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia,1987,43(10):1110-1111.
- [6] Na Peng,Wang Kaifeng. Removal of reactive red 2 and methylene blue from aqueous solutions by adsorption using soybean meal as adsorbent[C]//2011 International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring(CDCIEM 2011). Changsha, China:IEEE Computer Society,2011:2193-2196.
- [7] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006.
- [8] Association Japan Nattokinase. Assay method of nattokinase[EB/OL]. [2011-06-23]. http://j-nattokinase.org/jnka_nk_english.html.
- [9] 田艳. 纳豆菌液体发酵产生纤溶酶的研究[D]. 海南:华南热带农业大学,2001.