

高效溶栓菌株的筛选鉴定及发酵条件优化*

王丽, 郝友进, 何正波, 和七一, 陈治霖, 陈斌

(重庆师范大学 活性物质生物技术教育部工程研究中心 重庆高校生物活性物质工程研究中心 昆虫与分子生物学研究所, 重庆 401331)

摘要:采用酪蛋白平板法,从纳豆激酶胶囊、纳豆及多种发酵食品中筛选出了146株产溶栓酶菌株;然后利用纤维蛋白平板法比较发酵后溶栓酶活力,并从初筛菌株中筛选出1株溶栓酶活力达1 637.6 IU/mL的高产菌株HT8;依据菌种形态和生理生化特征以及16S rRNA基因序列分析,鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。在此基础上,对此高效溶栓菌株的液体培养条件进行了单因素初步实验,方差分析后设计正交试验 $L_{18}(3^7)$,通过软件SPSS分析确定该菌最佳发酵条件为初始pH值8.0、温度40℃、培养体积90 mL(容量为500 mL的三角瓶装90 mL的培养液)、0.5%牛肉膏和2%大豆蛋白胨;优化后的相对酶活力达1 804.08 IU/mL。研究结果为进一步开发纳豆等保健食品提供理论基础。

关键词:溶栓菌;菌种筛选;枯草芽孢杆菌;发酵条件;纳豆激酶

中图分类号:Q503;Q556

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2013)03-0121-06

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*)是从日本传统大豆发酵食品纳豆中分离得到的一种产蛋白酶益生菌^[1]属好氧型革兰氏阳性菌^[2]。纳豆芽孢杆菌又称纳豆菌,除了具有抗菌、调节肠道微生态平衡、提高免疫力等益生功能外,在增殖过程中还产生的大量蛋白酶,能够提高蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶等酶活性,使发酵产品中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的成分,且使发酵产品具有多种保健功能,如抗肿瘤、降血压等作用,还可预防骨质疏松、抗氧化等^[3-6]。纳豆菌产生的这种蛋白酶最早由须见洋行博士发现,并命名为纳豆激酶,为纳豆菌发酵的胞外产物,是一种可溶解交联纤维蛋白的碱性丝氨酸蛋白酶^[7]。纳豆激酶除有效溶解血栓外,还可降低血液粘度、抑制血小板凝固、降血脂、降胆固醇、改善血液循环状况、维持血细胞的正常形态和功能等。作为新一代的抗血栓物质,具有较大的开发潜能。又因为纳豆激酶来源于食品,无毒副作用,而且价廉易得,为此开发溶栓保健食品具有实用价值^[8-10]。本研究采用酪蛋白平板法从纳豆、市售纳豆菌以及昆虫与分子生物学研究所保存的37株纳豆菌株中初筛,再通过纤维蛋白平板法复筛得到1株具有高溶栓活性的菌株,并对它生产溶栓酶的发酵条件进行优化,以确定该菌株产溶栓酶的最佳发酵条件,为今后开发溶栓保健食品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究用以分离溶栓菌的样品包括:将门纳豆(大连将门食品有限公司)、燕京纳豆(北京燕京中发生物技术有限公司)、高纯度纳豆菌(北京纳康保健销售中心)、佰禾美纳豆菌(北京源生素源生物科技有限公司)、天津百德永生肽纳豆菌(天津百德生物工程有限公司)、海摩尔纳豆菌(海摩尔(北京)生物食品有限公司)、常温纳豆菌(江苏创业园实验室)、川秀纳豆菌(江苏纳克生物工程有限公司)、第三代恒通纳豆菌(北京纳克生物工程有限公司)、易行纳豆菌(珠海市御品堂生物科技有限公司)、昆虫与分子生物学研究所保存的37株具有溶栓作用的菌株。尿激酶标准品(Urokinase, 1 280 IU/支),购于中国药品生物制品检定所;纤维蛋白原(Fibrinogen, 100 mg/支),购于Sigma公司;凝血酶(Thrombin),购于Sigma公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司;其他有关试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 高效溶栓菌株的分离与初筛 称取1 g或适量样品放入10 mL无菌生理盐水的试管中,于37℃、200 r/min摇床培养24 h。用移液器吸取1 mL的菌悬液到1.5 mL的离心管中,5 000 r/min离心5 min,

* 收稿日期:2012-12-18 修回日期:2013-02-27 网络出版时间:2013-05-20 18:04

资助项目:重庆市科技攻关重点项目(No. CSTC2012GG-YYJSB80002);重庆市自然科学基金重点项目(No. CSTC2008BA5030)

作者简介:王丽,女,硕士研究生,研究方向为生物化学分子生物学;通讯作者:陈斌,E-mail:c_bin@hotmail.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130520.1804.201303.121_024.html

倒掉上清,再用 1 mL 的无菌生理盐水将菌体悬起,85 °C 水浴 5 min,杀死大部分的营养体及杂菌^[11]。将菌液以 10 倍梯度稀释为原浓度的 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 。每个梯度吸取 100 μ L 涂酪蛋白平板,目测菌落与透明圈比值大的进行划线,分离纯化菌株,直至为单菌落;然后活化此菌株,一部分甘油保藏,一部分作为种子接入发酵培养基,发酵处理,保存粗酶液。

1.2.2 高效溶栓菌株的复筛 1) 粗酶液的制备。将初筛得到的菌株接入装有 10 mL LB 培养基的试管中,活化 12 h 后,再从试管中吸取 100 μ L 接入液体种子培养基摇菌 12 h 后,再按照 2% 的接种量接入液体发酵培养基,在 37 °C 下培养 48 h。8 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀。上清用 50% 的硫酸铵盐析过夜,10 000 g/min,离心 20 min,弃去上清液,沉淀用 1 mL PBS 缓冲液溶解,即为样品粗酶液,-20 °C 保存备用。

2) 蛋白质标准曲线的建立及样品含量的测定。蛋白质标准曲线的建立及样品浓度的测定为考马斯亮蓝法^[12-14]。每种样品取 20 μ L 到 96 孔酶标板中,测定吸光值。根据蛋白质标准曲线计算出未知样品的蛋白质含量(单位:mg/mL)。

3) 纤维蛋白平板法复筛。依据邵荣军的方法^[15],进行综合改进后,制备纤维蛋白平板方法。根据每一种样品中蛋白质含量,计算出每种样品合适的点样体积,在 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h,测定溶圈的直径。以尿激酶标准曲线计算样品的相对酶活力大小。

1.2.3 菌株鉴定 1) 菌株的形态与生化鉴定。将分离的菌株接种到酪蛋白平板上,观察菌落形态,并进行革兰氏染色。参照马明等菌种鉴定的方法^[16]进行菌种的生理生化的鉴定,包括厌氧生长、过氧化氢酶、糖发酵(如蔗糖、山梨醇、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉等)、运动性、酪蛋白水解试验、硝酸盐还原等。按照第 8 版《伯杰氏细菌鉴定手册》^[17]对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的描述,对比鉴定所筛选出的高效菌株。

2) 菌株的分子生物学鉴定。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,细菌 16S rRNA 基因的通用引物序列为正向序列:5'-CGTGGGCAACCTGCCTGTATGACA-3',反向序列:5'-GCGTGGTCAAGCCAATCCCAT-3'。PCR 反应体系包括上下游引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L,Taq 酶 0.2 μ L,dNTP 3 μ L,Mg²⁺ 1.5 μ L,buffer 2.5 μ L,无菌水补充至 25 μ L。扩增条件为 94 °C 预热 5 min;94 °C 变性 40 s;51.5 °C 退火 45 s;72 °C 延伸 1 min;如此进行 30 个循环。最后 72 °C 保温 10 min。反应后取出 10 μ L,产物用 1% 琼脂糖凝胶进行检测^[18-19]。将 PCR 扩增产物纯化后送华大测序公司进行测序。

1.2.4 菌株发酵条件的优化 1) 单因素实验。分别考察不同温度(28、31、34、37、40 °C)、不同 pH 值(5、

6、7、8、9)、不同的接种量(1%、2%、3%、4%)、不同转速(160、180、200、220、240 r/min)、不同培养体积(即容量为 500 mL 的三角瓶装培养液的体积,本实验中为 80、90、100、110、120 mL 等几个处理)等因素对产酶条件的影响。4 次重复试验,记录数据,利用 SPSS 软件进行单因素方差分析。参照大肠杆菌生长曲线制作的方法^[18]对菌株的接种时间进行优化。取出在 -80 °C 保藏的液体菌种,自然解冻,在超净工作台中,用移液枪取 100 μ L 接入装有 10 mL LB 的培养基的 11 支无菌试管中。上述试管分别被标记为 0、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h 和 24 h,于 37 °C、200 r/min 摇床培养,以标记为 0、盛有 LB 培养基但没有接种的试管调零点,测定完毕后,0 试管继续放置摇床培养,按照标记的时间在 600 nm 下测定每一支的 OD 值。

2) 正交试验 $L_{18}(3^7)$ 。根据单因素实验结果对实验进行正交设计(表 1),利用 SPSS 软件对正交结果进行有重复观察值无交互作用的多因素多水平方差分析,进而确定最佳发酵条件。

表 1 产溶栓酶菌株发酵条件优化的正交设计表

| 因素 | 水平 | | |
|------------|-------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 温度/°C | 34 | 37 | 40 |
| pH | 6 | 7 | 8 |
| 碳源 | 1%蔗糖 | 1%葡萄糖 | 0.5%牛肉膏 |
| 接种量 | 1% | 2% | 3% |
| 转速/(r/min) | 180 | 200 | 220 |
| 培养体积/mL | 90 | 100 | 120 |
| 氮源 | 2%蛋白胨 | 2%大豆蛋白胨 | 2%硫酸铵 |

2 结果与分析

2.1 高效溶栓菌株的初筛

将样品稀释液涂布于酪蛋白平板培养基上,37 °C 下培养 24 h 后,根据蛋白酶水解酪蛋白形成透明圈这一特点,挑取透明圈直径与菌落直径比值大的菌落,初步筛选出了 146 株产蛋白酶活力较高的菌株。初筛菌株水解酪蛋白形成的透明圈见图 1。

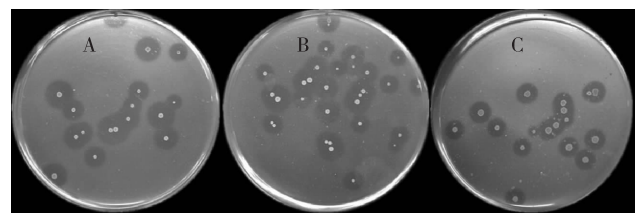


图 1 部分菌株水解酪蛋白形成的透明圈

2.2 高效溶栓菌株的复筛

绘制蛋白质标准曲线。以牛血清白蛋白标准溶液含量为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为 $Y=0.0088X+0.3453$ ($R^2=0.9897$),小

牛血清白蛋白含量在 0~70 μg/mL 内与对应吸光度呈良好的线性关系。将初筛得到的 146 株菌株活化,制备粗酶液,测定酶活力。

以纤维蛋白平板法对初筛的 146 株菌株进行复筛,分别测量溶栓圈直径,每个菌株重复测 3 次,按照平均值计算得出相对酶活力。从表 2 可知,来自恒通第三代纳豆胶囊中的 HT8 菌株活力最高,达到了 1 637.6 IU/mL。因此选择 HT8 菌株进行形态和生化鉴定。

表 2 复筛菌株的溶栓活力

| 复筛菌株编号 | 18 h 测量直径/mm | 18 h 相对酶活力/(IU/mL) | 24 h 测量直径/mm | 24 h 相对酶活力/(IU/mL) |
|--------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|
| HT8 | 29.20 | 1 459.57 | 30.44 | 1 637.60 |
| B18 | 28.90 | 1 442.60 | 30.36 | 1 624.79 |
| C6 | 28.18 | 1 396.69 | 30.30 | 1 615.21 |
| F3 | 27.72 | 1 220.50 | 28.98 | 1 408.91 |
| C7 | 27.32 | 1 162.51 | 29.52 | 1 492.16 |
| C11 | 27.10 | 1 130.95 | 29.20 | 1 445.73 |
| F5 | 27.02 | 1 119.53 | 29.10 | 1 427.28 |

2.3 菌株鉴定

1) HT8 菌株的形态与生化鉴定。HT8 菌株为短杆状,大小为(2.0~5.0) μm×(0.5~0.8) μm,革兰氏阳性(图 2 左)。在酪蛋白培养基上呈现白色,不透明,绒毛状,边沿不整齐,生长良好(图 2 右)。

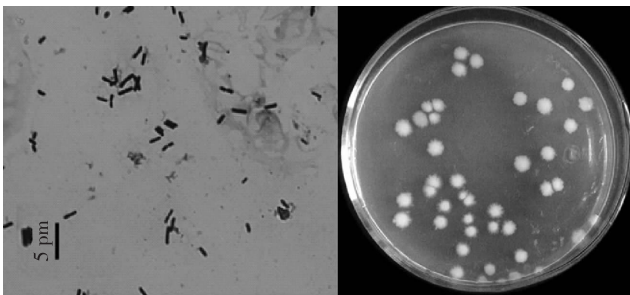


图 2 HT8 菌株的革兰氏染色(左)及菌落形态特点(右)

HT8 菌株的生理生化特征见表 3。根据对菌种个体形态、培养特征及生理生化实验的检测结果,参照第 8 版《伯杰氏细菌鉴定手册》^[17],初步确定选到的 HT8 菌株为枯草芽孢杆菌。

表 3 HT8 菌株的生理生化特征

| 实验项目 | 结果 | 实验项目 | 结果 |
|-------|----|----------------|----|
| 运动性 | + | 硝酸盐还原试验 | + |
| 蔗糖 | + | 渗透压实验 2% NaCl | + |
| 葡萄糖 | + | 渗透压实验 5% NaCl | + |
| 甘露醇 | + | 渗透压实验 7% NaCl | + |
| 山梨醇 | + | NaCl 渗透压实验 10% | + |
| 可溶性淀粉 | + | 耐高温 | + |
| 酪蛋白水解 | + | 对氧需求 | + |

注:“+”表明与第 8 版《伯杰氏细菌鉴定手册》对枯草芽孢杆菌的描述和生化特征一致。

2) HT8 菌株 16S rRNA 基因序列和系统发育树分析。将测序得到的序列通过 BLAST 进行同源序列检索发现,HT8 菌株与枯草芽孢杆菌属成员具有很高的相似性,相似性为 99%。选取芽孢杆菌内 20 个种的 16S rRNA 序列(登录号见图 3),利用 MEGA5.1 软件中的 NJ 法构建系统发育树,结果见图 3。其中可以看出,菌株 HT8 与枯草芽孢杆菌亲缘关系最近。

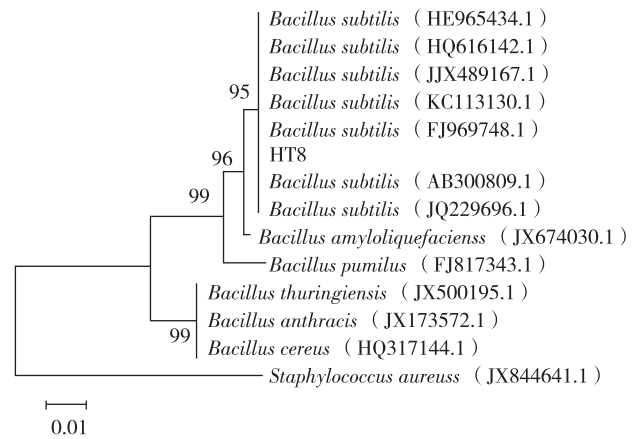


图 3 菌株 HT8 的系统发育树

2.4 HT8 菌株液体培养条件的初步研究

2.4.1 单因素的研究 1) 生长曲线的测定。从保藏的菌株吸取 100 μL 接入种子培养基中,测定波长 600 nm 处的 OD 值,绘制种子生长曲线。由图 4 可见,0~4 h 为延缓期,4~11 h 对数期,之所以在 8~10 h 出现菌体增长缓慢,应与芽孢开始逐渐形成,随后又开始快速生长有关。11~20 h 为稳定期,此时有芽孢大量形成。20 h 以后进入衰亡期,培养基中营养缺乏及有害代谢产物积累,菌体代谢活性逐渐降低,发生衰老并自溶。所以 11 h 为最佳移种时间。

2) 温度对菌种发酵产酶的影响。在温度实验中,将菌种以 2% 的接种量接入液体发酵培养中,分别在温度为 28、31、34、37、40 °C 的摇床中 200 r/min 发酵 48 h,饱和度 50% 硫酸铵盐析后,用纤维蛋白平板法

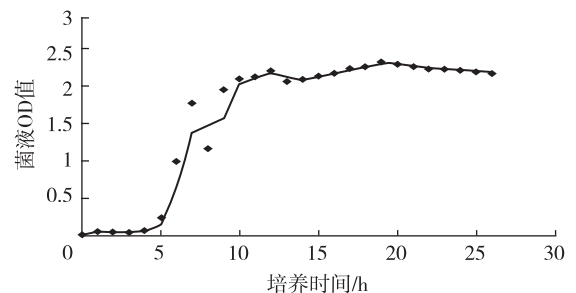


图 4 HT8 菌株的生长曲线

测定酶活力。从方差分析可以看出在 28、31 °C 下透明圈的直径相差不大,即可认为溶栓酶活力在 28~31 °C 之间差异不显著;31~34 °C 之间时酶活力增加较快,在 37~40 °C 之间酶活力无明显增加(图 5A)。

3) pH 对菌种发酵产酶的影响。在单因素 pH 实

验中,将发酵培养基的初始 pH 值分别调至 5、6、7、8、9,然后接入菌种进行发酵处理,测酶活力。方差分析可以看出 pH 值为 5 时溶栓圈很小,pH 值为 5~6 时直径明显增加,且有明显差异,pH 值为 6~9 时溶栓圈的直径无明显差异,且酶活力在重复试验中差异也不显著(图 5B)。

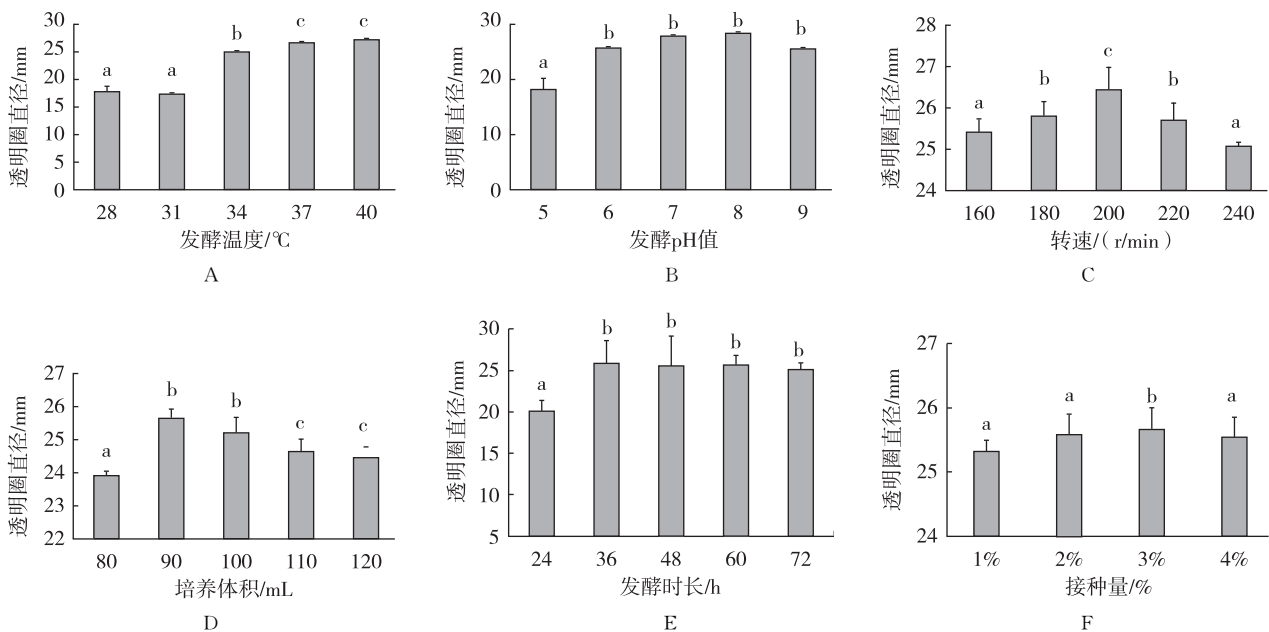
4) 转速对菌种发酵产酶的影响。图 5C 为转速对菌株产酶的影响结果。其中显示转速过快或者过慢对溶栓酶活力都有很大的影响。

5) 培养体积对菌种发酵产酶的影响。从图 5D 可以看出,培养体积在 90 mL 和 100 mL 与其他处理都有显著差异($p < 0.05$)。该实验目的在于了解溶氧量对菌株产酶的影响:培养体积太多,导致溶氧量降低,纳

豆激酶产量降低;培养体积过少,酶的产量也不会太高。

6) 发酵时长对菌种产酶的影响。通过改变菌种发酵的时间即 24、36、48、60、72 h,在发酵后测酶活力。具体结果见图 5E,其中 24 h 处理下酶活力较低,且与其余时间处理都有显著性差异($p < 0.05$);36~72 h 处理间则无显著性差异。考虑到经济效益节省时,在正交试验中均选用 48 h 作为菌种发酵的最佳时间。

7) 接种量对菌种发酵产酶的影响。按照单因素实验的要求,分别以 1%、2%、3% 和 4% 的接种量接种,处理后测酶活力。结果显示接种量之间并没有显著性差异,这一点与纤维蛋白定量点样的预测一致(图 5F)。



注:A:发酵温度;B:pH;C:转速;D:培养体积;E:时间;F:接种量。

图 5 各种因素对 HT8 菌株产酶的影响

2.4.2 正交试验 上述分析结果表明,发酵温度、pH、摇床转速和装液量对 HT8 菌株发酵产酶有很大的影响;另外有其他研究者实验结果表明碳源、氮源以及接种量对 *Bacillus natto* 液态发酵产纳豆激酶有很大的影响^[10]。故设计正交试验来确定 HT8 菌株适宜的发酵条件,分析结果如表 4 所示。从表中可知,温度、pH、碳源、装液量、氮源对试验结果影响显著($p < 0.05$);接种量与转速差异对试验结果影响不显著。因此应考察不同温度、pH、碳源、装液量、氮源产酶活性高低的多重比较结果。最终选出最优组合为:pH 值为 8,发酵温度为 40 °C,培养体积 90/500 mL,碳源为 0.5% 的牛肉膏以及氮源为 2% 的大豆蛋白胨。

3 讨论

菌体生长曲线测定表明,纳豆菌 HT8 的生长曲线和典型的细菌生长曲线有差异,呈现了二次生长现

表 4 正交试验统计分析

| 变差来源 | 平方和 | df | 均方 | F | p |
|--------------|------------|----|-----------|---------|-------|
| 温度 | 721.780 | 2 | 360.890 | 35.381 | 0.000 |
| pH | 338.904 | 2 | 169.452 | 16.613 | 0.000 |
| 碳源 | 980.340 | 2 | 490.170 | 48.055 | 0.000 |
| 接种量 | 9.444 | 2 | 4.722 | 0.463 | 0.633 |
| 转速 | 3.707 | 2 | 1.854 | 0.182 | 0.835 |
| 每 500 mL 装液量 | 318.905 | 2 | 159.452 | 15.632 | 0.000 |
| 氮源 | 3 478.936 | 2 | 1 739.468 | 170.533 | 0.000 |
| 重复实验 | 10.606 | 2 | 5.303 | 0.520 | 0.599 |
| 误差 | 377.406 | 37 | 10.200 | | |
| 总计 | 32 374.267 | 54 | | | |
| 校正的总计 | 6 240.027 | 53 | | | |

注: $R^2 = 0.940$ (调整 $R^2 = 0.913$)。

象^[20],该现象的产生应与培养基中酵母粉、蛋白胨中

含有丰富的氨基酸和肽类有关。菌体生长过程中首先利用氨基酸和肽类作为氮源;当该类氮源耗尽后,菌体生长经过短暂的停滞,再以蛋白胨为氮源重新快速生长,因此会出现二次生长现象。细菌生长受培养条件和菌种特性等许多因素影响,纳豆菌 HT8 菌体生长曲线与典型细菌生长曲线之间差异产生的具体原因还有待进一步研究。

在温度对菌种发酵产酶的影响中,34、37 和 40 °C 温度下,溶栓圈直径无明显差异,这与逯京华等^[21]所报道的纳豆激酶在温度低于 45 °C 时,酶活性相对稳定基本一致,与刘婷等^[22]所提到的蛋白酶最适反应温度一般在 30~50 °C 之间也不矛盾。

pH 对菌株产酶的影响中,pH 值为 6~9 时溶栓圈的直径无明显差异,且酶活在重复试验中差异也不显著。这与丁友学等^[23]所报道的纳豆激酶在室温 pH 值为 5~11 时酶活力相对稳定,在 pH 值为 6.3~10.8 时酶活力可保持 40 h 相似。

对 HT8 菌株培养条件单因素分析,能大致了解各因素对菌株生长情况的影响,而通过正交实验进行多因素分析,能得到该菌株比较合理的培养条件组合。由多因素分析结果可知,单因素培养的最佳组合,不一定为实际最佳培养条件。正交分析中接种量对产酶影响不大的原因在于,利用纤维蛋白平板法测酶活时,采取定量的方法点样,与接种量的多少无关。而正交分析中转速的作用与单因素所研究的结果一致,即在 180、200、220 r/min 时,对菌株产酶影响不大。

4 结论

本研究通过酪蛋白初筛和纤维蛋白复筛两种方法相结合筛选得到 1 株具有高效溶栓活性的菌株,命名为 HT8,相对酶活力达 1 637.6 IU/mL。通过形态学鉴定,确定 HT8 菌株属于杆状菌,革兰氏阳性,菌落形态与枯草芽孢杆菌相似;又通过 HT8 菌株的生理生化鉴定和分子鉴定,进一步确定 HT8 属于枯草芽孢杆菌属。

本研究对 HT8 进行了发酵条件的初步优化,使它的产酶活性进一步得到了提高,测量纤维蛋白培养 18 h 后的溶栓圈直径比优化前大了 2 mm,按 18 h 计算,相对活力达 1 804.08 IU/mL。最佳发酵条件为 pH 值为 8.0,温度为 40 °C,培养体积 90 mL,碳源为 0.5% 的牛肉膏,氮源为 2% 的大豆蛋白胨。

另外,本研究团队还计划从 HT8 菌株出发,利用蛋白纯化技术,对代谢产物进行纯化,以期获得纯度高的溶栓活性物质;并从此种物质的功能活性等方面进一步研究,开发出一种具有溶栓保健作用的食物。

参考文献:

[1] Gordon R E, Haynes W C, Pang C H N. *Bacillus* genus

[M]. Beijing: Agriculture Press, 1983: 42-43.

- [2] 张丽靖,杨郁. 纳豆菌作为食品防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 188-189.
Zhang L J, Yang Y. Progress to *Bacillus natto* as a food preservative[J]. Food Research and Development, 2008, 29(5): 188-189.
- [3] Sumi H, Hamada H, Tsushima H. 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.
- [4] Esaki H, Onozaki H, Osawa T. Antioxidative activity of fermented soybean products[J]. ACS Symposium Series, 1994, 546: 353-360.
- [5] Sumi H. Antibacterial activity of bacillus natto-growth inhibition against *Escherichia coli*-0157[J]. *Bioindustry*, 1997(14): 17.
- [6] Sumi H. Accumulation of vitamin K (menaquinone-7) in plasma after indigestion of natto and natto bacilli (*B. subtilis natto*) [J]. *Food Science and Technology Research*, 1999, 5(1): 48-50.
- [7] Hiroyuki S. The method of determination of the thrombolytic enzyme nattokinase[J]. *J Brew Soc Jap*, 1993, 88(6): 482-486.
- [8] 王旭冰, 娄永江. 纳豆芽孢杆菌的开发与利用[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 28-31.
Wang X B, Lou Y J. Development and application of *Bacillus natto* [J]. *Chinese Condiment*, 2010, 35(4): 28-31.
- [9] 杨郁, 张丽靖. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2007, 23(10): 22-25.
Yang Y, Zhang L J. Screening of high nattokinase-producing strains and optimization of the fermentation conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(10): 22-25.
- [10] 朱建辉, 杜连祥, 路福平, 等. 高产纳豆激酶液态发酵工艺的优化[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 20-24.
Zhu J H, Du L X, Lu F P, et al. Optimization of fermentation conditions for high-production nattokinase[J]. *Industrial Microorganisms*, 2007, 37(1): 20-24.
- [11] 霍金柱, 陈斌, 李莹, 等. 高效溶栓菌株的筛选鉴定及活性测定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(6): 85-93.
Huo J Z, Chen B, Li Y, et al. Screening and Determination of a Fibrinolytic Enzyme-Producing Strain of *Bacillus subtilis* and Its Activity Assay[J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2011, 33(6): 85-93.
- [12] 黄婉玉, 曹炜, 李菁, 等. 考马斯亮蓝法测定果汁中蛋白质的含量[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 160-162.
Huang W Y, Cao W, Li J, et al. Determination of the protein content in juice by coomassie brilliant blue[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(5): 160-162.
- [13] 郭庆恩, 张丽杰, 赵天涛, 等. 用索氏提取法从废酵母中提取海藻糖的工艺[J]. 重庆工学院学报: 自然科学, 2008, 22(12): 59-62, 70.
Guo Q E, Zhang L J, Zhao T T, et al. Study on extracting

- trehalose from beer waste yeast with soxhlet extraction method [J]. Journal of Chongqing Institute of Technology: Natural Science, 2008, 22(12): 59-62, 70.
- [14] 罗群, 唐自慧, 李路娥, 等. 干旱胁迫对 9 种菊科杂草可溶性蛋白质的影响[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(3): 356-359.
- Luo Q, Tang Z H, Li L E, et al. The effect of drought stress on soluble proteins in nine composite weeds [J]. Journal of Sichuan Normal University: Natural Science, 2006, 29(3): 356-359.
- [15] 邵荣军, 陈斌, 郝友进, 等. 中国传统发酵食品中溶栓酶活性检测方法比较[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2012, 29(4): 88-92.
- Shao R J, Chen B, Hao Y J, et al. Comparison between methods of detecting thrombolytic enzyme activity in chinese traditional fermented food [J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2012, 29(4): 88-92.
- [16] 马明, 杜金华, 于玲, 等. 高纳豆激酶酶活枯草芽孢杆菌的筛选及菌种鉴定[J]. 中国食物与营养, 2006(8): 29-32.
- Ma M, Du J H, Yu L, et al. Screening of high nattokinase enzyme activity of *Bacillus subtilis* strain identification [J]. Food and Nutrition in China, 2006(8): 29-32.
- [17] 布坎南 R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 735-792.
- Buchanan R E. Berger bacterial identification manual [M]. The Translation Group of *Berger Bacterial Identification Manual* in the Institute of Microbiology of the Chinese Academy of Sciences. 8th edition. Beijing: Science Press, 1984: 735-792.
- [18] Moreno C, Romero J, Romilio T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* [J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [19] Catia A, Miranda C, Orlando B. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2008, 93: 297-304.
- [20] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- Shen P, Chen X D. Microbiology experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.
- [21] 逯京华, 孙智杰. 纳豆激酶的研究现状与展望[J]. 生物技术通报, 2009(8): 41-45.
- Lu J H, Sun Z J. The Research advance and Prospect of nattokinase [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(8): 41-45.
- [22] 刘婷, 张天赋, 林元山, 等. 产中性蛋白酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 湖南农业科学, 2009(5): 102-107.
- Liu T, Zhang T F, Lin Y S, et al. Screening of a neutral protease strain and optimizing of fermentation conditions [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2009(5): 102-107.
- [23] 丁有学, 刘兰. 纳豆激酶的研究进展[J]. 中国生物制品杂志, 2008, 21(12): 1129-1131.
- Ding Y X, Liu L. The Research progress of nattokinase [J]. Chinese J Biologicals, 2008, 21(12): 1129-1131.

Screening and Determination of a Bacterium Strain with High Fibrinolytic Activities and the Optimization of Its Fermentation Conditions

WANG Li, HAO You-jin, HE Zheng-bo, HE Qi-yi, CHEN Zhi-lin, CHEN Bin

(Engineering Research Center for Bioactive Substance Biotechnology of Ministry of Education,

Chongqing Engineering Research Center for Bioactive Substances, Institute of Entomology and Molecular Biology,

Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract: In recent years, natto and natto bacteria have become a research hotspot in many countries because its metabolite nattokinase has high fibrinolytic activity. In the present study, 146 fibrinolytic enzyme producing bacterial strains were isolated from nattokinase capsules, natto, and a variety of fermented foods using casein-plate method. The fibrinolytic activities of the fermentation broth of these isolated bacteris were compared with the fibrin plate method, and one strain (named as HT8) with the highest fibrinolytic activity (1 637.6 IU/mL) was identified. It was classified as *Bacillus subtilis* based on the clony morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences. Based on this result, the fermentation conditions were determined, then orthogonal experiments using $L_{18}(3^7)$ array were performed and statistically analyzed by ANOVA in SPSS. The result showed that the optimal fermentation condition was medium's initial pH value 8.0, fermentation temperature 40 °C, medium volume 90/500 mL, 0.5% beef extract and 2% soybean peptone. The relative enzyme activity was 1 804.08 IU/mL under the optimal fermentation condition, which provided a theoretical basis for the further development of natto and of healthy food.

Key words: fibrinolytic enzyme; strain screening; *Bacillus subtilis*; liquid culture; Nattokinase

(责任编辑 方 兴)