

## 1 株纳豆激酶高产菌株的分离·筛选与复合诱变研究

巩涛, 魏传军, 安明理, 宁萌, 周伏忠 (河南省科学院生物研究所有限责任公司, 河南郑州 450008)

**摘要** 为选育纳豆激酶(Nattokinase, NK)高活性菌株, 从4种不同风味食品中分离得到26株菌株, 通过酪蛋白平板初筛和液体发酵复筛, 得到2株纳豆激酶高产菌株, 利用分子生物学技术鉴定为2株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。采用氯化锂-紫外与亚硝基胍(NTG)复合诱变的方式, 最终获得1株纳豆激酶活性达到2 338.01 U/mL的高产菌株SD3-3-6, 该突变菌株纳豆激酶酶活相较于初始菌株SD3提高了1.93倍, 是1株具有应用前景的高产菌株。

**关键词** 纳豆; 纳豆激酶; 多肽; 复合诱变; 芽孢杆菌

中图分类号 Q936.96 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)15-0159-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.15.042



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Isolation, Screening and Compound Mutagenesis of a Nattokinase Producing Strain

GONG Tao, WEI Chuan-jun, AN Ming-li et al (Institute of Biology Co., Ltd., Henan Academy of Science, Zhengzhou, Henan 450008)

**Abstract** In order to select nattokinase high activity strains, 26 strains were isolated from four different samples. Two nattokinase high-yield strains were screened through primary screening and rescreening, and identified as two *Bacillus subtilis* strains by molecular biology technology. A high-yield strain SD3-3-6 with nattokinase activity of 2 338.01 U/mL was obtained by lithium chloride UV and NTG compound mutagenesis. The final activity of nattokinase of SD3-3-6 was 1.93 times higher than that of the original strain SD3.

**Key words** Natto; Nattokinase; Polypeptide; Mutagenesis; *Bacillus subtilis*

纳豆激酶(natto kinase, NK)是纳豆在发酵过程中由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的一种具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶<sup>[1]</sup>。大量研究结果显示, 纳豆发酵过程中, 不仅生成大量的短肽、多肽等具有特殊生理功能的生物活性肽, 还能产生具有强溶栓功能的纳豆激酶, 可以被开发为功能性食品、营养食品和天然药物等, 具有广泛的应用前景<sup>[2-5]</sup>。纳豆激酶作为一种潜在的溶栓药物, 与目前临床使用的链激酶、尿激酶等溶栓药物相比, 除具有更好的安全性等诸多优点外, 成本也更加低廉<sup>[6-10]</sup>。然而, 目前国内筛选到的纳豆激酶菌种的产酶活性和国外相比还存在较大差距, 国内报道的多数为500~3 200 U/mL<sup>[11-15]</sup>, 如何分离与选育出纳豆激酶高活性菌种是亟需解决的问题。笔者从4种纳豆与豆豉食品中分离得到了26株产纳豆激酶的菌株, 对2株酶活较高的菌株通过氯化锂-紫外与NTG复合诱变的方法实施多次诱变, 最终得到纳豆激酶酶活较高的高产菌株, 旨在为纳豆激酶的生产奠定良好基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

**1.1.1 菌株来源。**分别从购于日本的山大纳豆、滨莉纳豆, 中国的惟一斋八宝豆豉、永川豆豉中分离。

**1.1.2 培养基。**酪蛋白初筛培养基<sup>[16]</sup>: 酪蛋白5 g/L, 葡萄糖1 g/L, 酵母提取物1 g/L,  $K_2HPO_4$  1 g/L,  $KH_2PO_4$  0.5 g/L,  $MgSO_4$  0.1 g/L, 琼脂15 g/L, pH 7.0~7.5。LB培养基: 蛋白胨5 g/L, 酵母粉5 g/L, NaCl 10 g/L。液体发酵培养基: 蛋白胨25 g/L, 葡萄糖20 g/L,  $MgSO_4$  0.5 g/L,  $CaCl_2$  0.2 g/L,

$K_2HPO_4$  2 g/L,  $KH_2PO_4$  1 g/L。以上培养基于121 °C灭菌20 min, 备用。

**1.1.3 主要试剂。**尿激酶、纤维蛋白原(血)、凝血酶, 均购自中国药品生物制品检定所, 亚硝基胍(北京华越洋生物科技有限公司产品, 中国), 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 纳豆激酶产生菌株的分离与初筛。**根据文献[17]的方法稍作修改, 取5 g样品用灭菌研钵磨碎, 加入20 mL无菌生理盐水混匀, 85 °C水浴10 min杀死营养体及杂菌, 5 000 r/min离心10 min, 取上清。将上清进行10倍梯度稀释, 吸取适当稀释后的样品0.2 mL涂布酪蛋白平板, 37 °C培养24 h, 选择透明圈较大的菌落作为初筛菌株。

**1.2.2 液体发酵复筛。**将初筛菌株的种子液以5%接种量接种于LB液体培养基中, 37 °C 180 r/min振荡培养72 h, 5 000 r/min离心10 min, 取适当稀释后的上清液10 μL于琼脂糖-纤维蛋白平板, 室温下放置3~5 h, 测量比较溶纤圈直径, 选择纳豆激酶酶活较高的菌株, 作为诱变育种的出发菌株。

**1.2.3 生长曲线绘制。**将待诱变菌株以5%接种量分别接种到装有LB液体培养基的三角瓶中, 37 °C, 200 r/min摇瓶培养, 每隔2 h取样1次, 在OD<sub>600</sub>下测定吸光值。以菌体生长时间为横坐标, OD<sub>600</sub>值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线图。

**1.2.4 氯化锂-紫外复合诱变。**根据文献[18]描述略做修改, 将菌株接种于含有0.8%氯化锂的LB培养基, 37 °C 200 r/min培养至对数生长期, 5 000 r/min离心10 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤菌体细胞并稀释为10<sup>-8</sup> CFU/mL的菌悬液, 取制备好的菌悬液10 mL于无菌9 cm培养皿中, 置于距20 W紫外灯30 cm处的磁力搅拌器上, 开启磁力搅拌器, 分别照射30、60、90、120、150、180 s, 将诱变后的菌悬液移入

**基金项目** 河南省科技攻关项目(212102310541); 河南省科学院科研项目(190305003, 18JK16012)。

**作者简介** 巩涛(1982—), 男, 山东临沂人, 助理研究员, 博士, 从事农业微生物学研究。

**收稿日期** 2021-01-03

无菌试管中,避光冰浴 1 h,冰浴后的菌液适当稀释,取 200  $\mu\text{L}$  涂布酪蛋白平板,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,选取透明圈较大的菌落进行液体发酵复筛。

**1.2.5 亚硝基胍(NTG)诱变。**将氯化锂-紫外复合诱变处理之后的高活性菌株接入 LB 培养基培养至对数生长期,用灭菌的 0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸钠盐缓冲液(PBS)制备  $10^{-8}$  CFU/mL 的菌悬液,加入用上述 PBS 配制的亚硝基胍(NTG)溶液,制作终浓度 0.1~1.0 mg/mL 的诱变液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中振荡处理 20 h,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用缓冲液洗涤 3 次,适当稀释涂于酪蛋白平板,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,选取透明圈较大的菌落进行液体发酵复筛<sup>[19]</sup>。

**1.2.6 致死率的测定。**将未经诱变处理的菌液(A)与诱变处理的菌液(B)适当等量稀释后,涂布于酪蛋白平板上计算菌落数。取致死率为 60%~90%的组别进行下一步试验<sup>[20]</sup>。致死率的计算公式如下:

$$\text{致死率}(\%) = (A - B) / A \times 100$$

表 1 纳豆激酶产生菌株筛选结果

Table 1 Screening results of starting strains for mutation breed

菌株编号 Strain No.	菌种来源 Strain source	菌种 16SRNA 鉴定结果 Identification results of strain 16SRNA	NK 活性 NK activity//U/mL
SD3	大山纳豆	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	1 203.56
SD9	大山纳豆	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	1 103.24
BL1	滨莉纳豆	解淀粉芽孢杆菌( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	1 028.24
WYZ6	惟一斋八宝豆豉	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	924.58
WYZ14	惟一斋八宝豆豉	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	1 167.36

**2.2 SD3、WYZ14 生长曲线绘制** 菌株 SD3、WYZ14 生长曲线(图 1)显示,接种后 4 h 菌株 SD3、WYZ14 进入对数生长期,4~18 h 是菌株的对数生长期,20 h 后菌体进入稳定期。加入氯化锂的菌体生长稍延后。由于对数生长期的细胞处理,菌体活力旺盛,突变率高,重现性好,故后续试验选择培养 16 h 的菌体进行诱变处理。

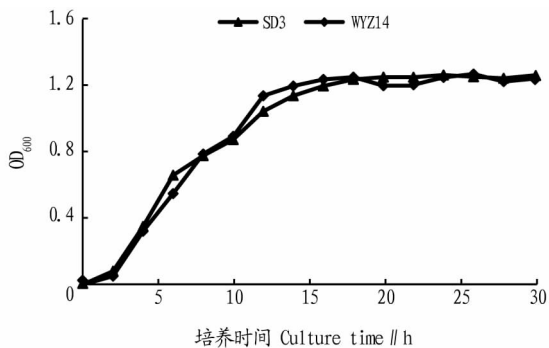


图 1 菌株 SD3、WYZ14 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain SD3 and WYZ14

**2.3 氯化锂-紫外复合诱变筛选结果** 文献报道,一般选择致死率为 70%~80%的剂量,诱变效果较好。从图 2 可见,当处理时间为 120 s 时,SD3 与 WYZ14 致死率分别达到 76.5% 与 78.2%。因此,氯化锂-紫外复合试验选择 120 s 作为最佳诱变剂量。

通过对氯化锂-紫外复合诱变,筛选出 22 株透明圈与

**1.2.7 高活性菌株遗传稳定性验证。**对经诱变处理之后筛选到的高活性菌株进行传代试验,连续传 8 代,每次传代后的菌株经液体发酵,测量比较溶纤圈直径,筛选纳豆激酶活高的菌株。

**1.2.8 高活性菌株的鉴定。**按细菌 DNA 提取试剂盒(Omega)操作手册提取基因组 DNA,用细菌 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增 16S rDNA 基因序列<sup>[21]</sup>。将 PCR 产物送华大基因进行测序。将测序序列进行 BLAST 同源性对比分析,运用 Mega 7.0 构建系统发育树,确定所选菌株种属<sup>[22]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 纳豆激酶高活性菌株的初筛与复筛** 通过酪蛋白平板初步筛选出了 26 株长势良好且透明圈明显的菌落。经过琼脂糖-纤维蛋白原平板对 26 株菌进行复筛,最终得到 5 株具有较大透明圈的菌株(表 1),按照“1.2.8”进行了菌株的鉴定,综合考虑选择菌株 SD3 与 WYZ14 作为诱变育种出发菌株。

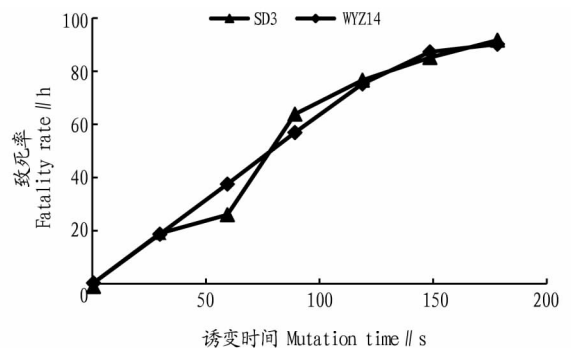


图 2 紫外诱变时间对菌株 SD3、WYZ14 致死率的影响

Fig. 2 Effect of mutation time on the lethal rate of strains SD3 and WYZ14

菌落直径比值较 CK 有所增大的菌株,每出发菌株选择 1 株酶活最高的诱变菌株分别进行摇瓶发酵,传代培养后对酶活进行测定,测定结果见表 2。表 2 显示,诱变菌株 SD3-3 液体发酵液纳豆激酶酶活较出发菌株提高了 40.3%,为摇瓶发酵酶活最高的菌株,选用菌株 SD3-3 进行 NTG 诱变育种。

**2.4 NTG 诱变筛选结果** 由图 3 可见,随着诱变剂量的增加与处理时间的延长,菌株致死率不断增大。低剂量时,诱变效果不佳,高剂量会影响菌落再生。综合考虑致死率与正突变范围后,选择 NTG 浓度 0.4 mg/mL,处理时间 20 min 进行诱变筛选。

表2 氯化锂-紫外复合诱变结果

Table 2 Results of LiCl-UV compound mutagenesis

U/mL

样品编号 Sample No.	NK 酶活 NK Enzyme activity							
	1代 Generation 1	2代 Generation 2	3代 Generation 3	4代 Generation 4	5代 Generation 5	6代 Generation 6	7代 Generation 7	8代 Generation 8
SD3-3	1 688.64	1 685.23	1 676.56	1 686.54	1 673.58	1 665.52	1 860.34	1 678.38
WYZ14-2	1 437.26	1 428.9	1 392.13	1 423.14	1 362.72	1 333.48	1 340.52	1 298.58

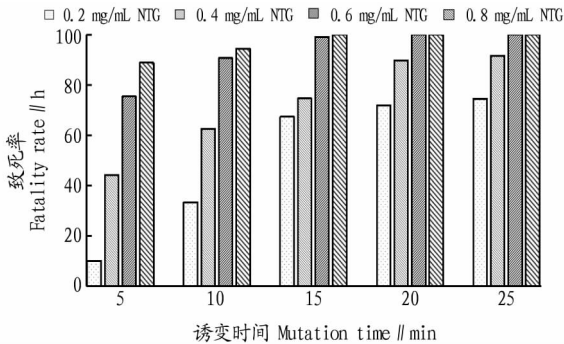


图3 NTG 诱变浓度和诱变时间对 SD3-3 致死率的影响

Fig. 3 Effect of NTG concentration and treatment time on the lethal rate of SD3-3

通过 NTG 诱变筛选得到 10 株高产菌株,结果见图 4,菌株 SD3-3-2,SD3-3-6,SD3-3-8 与 SD3-3-10 的酶活较高,比出发菌株 SD3-3 分别提高 42.3%、39.5%、47.4% 与 38.5%。

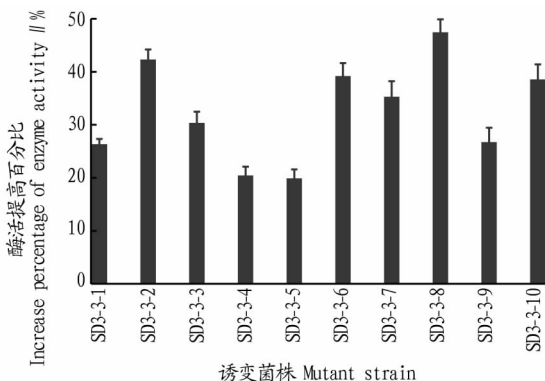


图4 NTG 诱变结果

Fig. 4 Results of NTG mutation

**2.5 高产菌株的遗传稳定性** 将诱变高产菌株进行传代试验,结果见图 5,菌株 SD3-3-4,SD3-3-6 与 SD3-3-9 传代 8 次遗传稳定性仍然较好,其他菌株从第 3 代开始就回落,传代 6 次以上菌株的高产特性基本消失。高产菌株 SD3-3-6 不仅遗传稳定,且酶活较高,传代 8 次后,酶活稳定在 2 327.18 U/mL,是 1 株具备生产潜力的高产菌株。

### 3 结论

紫外与亚硝基胍诱变技术是传统诱变育种技术,具有快速、安全、有效、操作简便、正突变率高等优点,已被广泛用于微生物诱变育种<sup>[23-24]</sup>。采用多种诱变剂交替的复合诱变通常比单一诱变剂处理能取得更好的结果,如彭钰媛等<sup>[25]</sup>选用 NTG 和紫外处理蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 获得了解钾能力提高了 63.64% 的诱变菌株。钱娟娟等<sup>[26]</sup>利用 ARTP-亚硝基胍 (NTG) 复合诱变方法对中性蛋白酶出发菌株进行

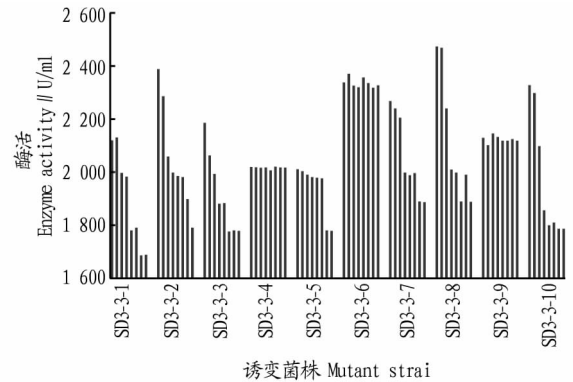


图5 高产菌株遗传稳定性试验结果

Fig. 5 Results of genetic stability test of high yield strains

复合诱变,选育出 1 株酶活较出发菌株提高 90% 左右的高产菌株。

笔者通过对 SD3 菌株进行氯化锂-紫外和 NTG 复合诱变,酪蛋白平板初筛,液态发酵复筛,从大量突变株中筛选到 1 株稳定、高产纳豆激酶的突变菌株 SD3-3-6,其产酶能力从最初的 1 203.56 U/mL 提高到 2 327.18 U/mL,提高了 1.93 倍。连续培养 8 代均维持较高的酶活水平,说明该突变菌株遗传性稳定,是 1 株具有应用前景的高产菌株,同时也说明氯化锂-紫外和 NTG 复合诱变是一种针对纳豆激酶产生菌株有效的诱变技术。

### 参考文献

- [1] 须见洋行,李国超. 神奇的纳豆激酶 (NK)——终结心脑血管疾病的奥秘 [M]. 大连:大连出版社,2009:1-14.
- [2] JU S Y, CAO Z L, WONG C, et al. Isolation and optimal fermentation condition of the *Bacillus subtilis* subsp. *natto* strain WTC016 for nattokinase production [J]. *Fermentation*, 2019, 5(4): 1-12.
- [3] 朱俊丰,刘帅,赵鹏燕,等. 纳豆枯草芽孢杆菌 LNUB236 所产纳豆激酶的溶栓活性 [J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 148-159.
- [4] VIANNEY Y M, TJOA S E E, ADITAMA R, et al. Designing a less immunogenic nattokinase from *Bacillus subtilis* subsp. *natto*: A computational mutagenesis [J]. *Journal of molecular modeling*, 2019, 25(11): 1-12.
- [5] ZHANG B, CHAI J, HE L M, et al. Nattokinase produced by natto fermentation with *Bacillus subtilis* inhibits breast cancer growth [J]. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2019, 12(12): 13380-13387.
- [6] 刘璐. 纳豆菌液态发酵产纳豆激酶及其代谢特性分析 [J]. *化工管理*, 2020(29): 43-44.
- [7] 满雨莉,向殿军. 传统发酵豆制品中纳豆激酶产生菌的筛选及发酵培养基的优化 [J]. *中国调味品*, 2019, 44(6): 44-49, 55.
- [8] 张海粟,王家林,于江淼. 纳豆激酶的研究及展望 [J]. *食品与发酵科技*, 2019, 55(4): 92-95, 111.
- [9] YOO H J, KIM M, KIM M, et al. The effects of nattokinase supplementation on collagen-epinephrine closure time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in nondiabetic and hypercholesterolemic subjects [J]. *Food and function*, 2019, 10(5): 2888-2893.
- [10] 薛莹莹,林福兴,别小妹,等. ARTP 诱变联合抗生素抗性选育纳豆激酶高产菌株 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 93-97.

(下转第 175 页)

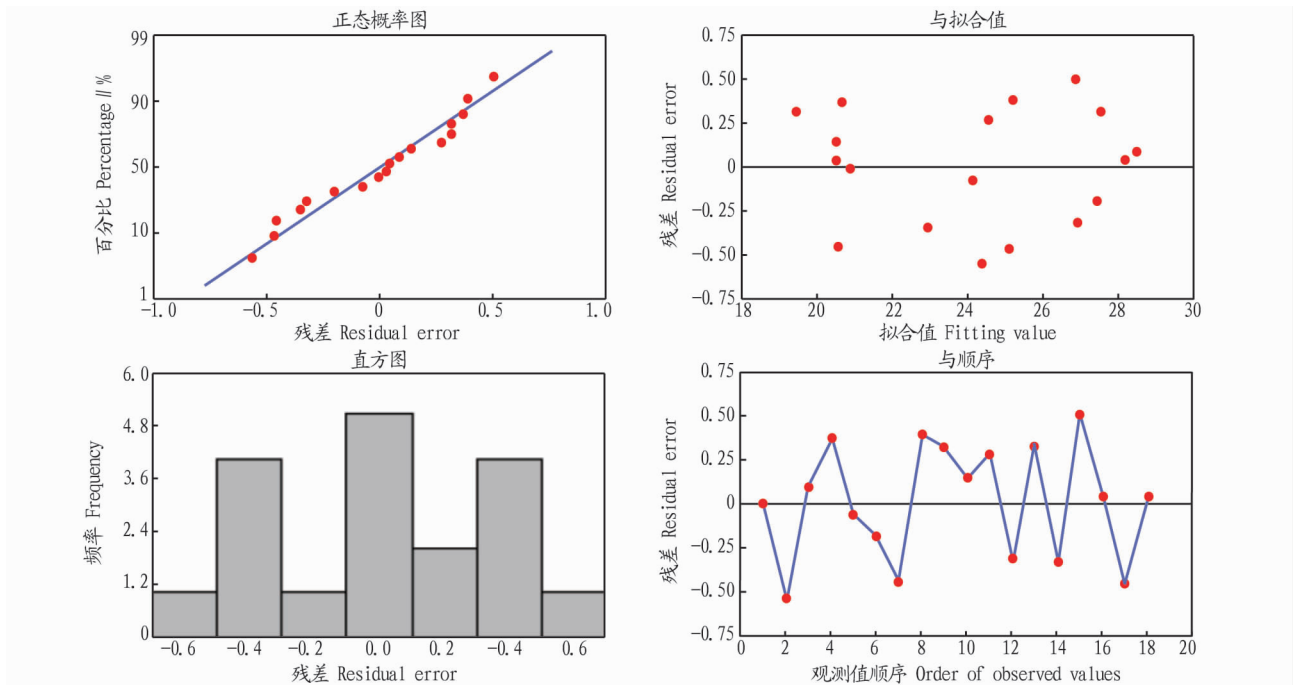


图 4 梗签含丝率残差分析

Fig. 4 Residual error diagram of filament percentage of stem stick

## 参考文献

- [1] 张永岗,乔月梅,云瑞刚,等.降低 A 牌号细支卷烟含梗签烟支数[J].科技与创新,2018(19):137-138.
- [2] 胡中军,李江,陈智鸣,等.优化 ZJ17 卷接机参数降低烟支中梗签含量研究[J].科技创新导报,2017,14(8):79-80.
- [3] 彭永刚,刘德凯,杨华伦,等.降低卷烟机剔除梗签中含丝量[J].齐鲁工业大学学报(自然科学版),2015,29(1):50-55.
- [4] 卢新万,罗登炎,常明彬,等.卷烟机梗签剔除效果评价方法的对比研究[C]//中国烟草学会工业专业委员会.中国烟草学会工业专业委员会烟草工艺学术研讨会论文集.北京:中国烟草学会,2010.
- [5] 张波,黄超,杨建启,等.探索卷烟机梗签剔除量与烟支重量关系的方
- [6] 红云红河烟草(集团)有限责任公司.一种快速检测梗签中烟丝含量的方法:CN201910750790.8[P].2019-11-26.
- [7] 曾静,李斌,冯志斌,等.卷烟机剔除梗签物中含丝量的检测[J].烟草科技,2012,45(8):5-7,11.
- [8] 国家烟草专卖局.卷烟工艺规范[M].北京:中国轻工业出版社,2016.
- [9] 安徽中烟工业有限责任公司.一种烟梗签的界定及检测方法:CN201910444543.5[P].2019-08-02.
- [10] 安徽中烟工业有限责任公司.一种烟梗签含量的检测方法:CN201910444484.1[P].2019-08-20.
- [11] 国家烟草专卖局.卷烟感官舒适性评价方法:YC/T 496—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [12] 陈晓飞,向凌云,李珊珊,等.液体发酵高产纳豆激酶菌株的复合诱变选育[J].河南科学,2020,38(5):715-720.
- [13] 雒焕贞,宋焕禄,陈存社,等.市售纳豆产品中菌株的分离、鉴定及纳豆激酶活力比较[J].食品工业科技,2017,38(1):141-146.
- [14] 明飞平,梁淑娃,夏枫耿,等.产纳豆激酶菌株液体及固体发酵工艺初步研究[J].中国食品添加剂,2009(2):103-107.
- [15] 王雪妍,孙玉飞,冯菲,等.一株高产纳豆激酶菌株的鉴定与分析[J].生物技术通报,2016,32(1):187-194.
- [16] LIU Z M,ZHENG W H,GE C L,et al. High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters[J]. BMC Microbiology, 2019,19:1-14.
- [17] 高泽鑫.高产纳豆激酶菌株的筛选及其酶学稳定性的研究[D].贵阳:贵州大学,2018:1-8.
- [18] 满丽莉,向殿军.枯草芽孢杆菌 MX-6 产纳豆激酶特性分析[J].食品与发酵工业,2019,45(6):42-47.
- [19] 王海燕,王鹏飞,王瑞明.基于氯化锂复合紫外诱变:10-HDA 高产菌株的筛选[J].食品科技,2007,32(12):29-32.
- [20] 王秀琴,娄忻,张雪霞,等.复合诱变法筛选产托霉素高产菌株[J].化学与生物工程,2015,32(8):60-62,66.
- [21] 夏俊芳,王小灵,古丽娜孜,等.递推式 ARTP-UV 复合诱变筛选高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株[J].食品工业科技,2020,41(15):129-134,142.
- [22] 杨金玉,杨焱蝶,陈相艳,等.食品检测用 4 种病原菌基因组试剂盒提取方法的比较与优化[J].中国食品学报,2020,20(4):246-253.
- [23] WANG Y N,HE W H,AN M L,et al. *Chryseobacterium zhengzhouense* sp. nov., isolated from groundwater of the well in a vegetable field, and emended description of the genus *Chryseobacterium*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2016,109:1299-1306.
- [24] 刘文龙,王兴吉,曹世源,等.亚硝基胍与紫外线复合诱变选育高产乳糖酶菌株的研究[J].食品与发酵科技,2017,53(4):73-76.
- [25] 陈婕,王旭荣,张景艳,等.紫外线和亚硝基胍对益生菌 FGM 发酵提取黄芪多糖的影响[J].西北农业学报,2015,24(4):25-30.
- [26] 彭钰媛,易浪波,彭清忠,等.亚硝基胍与紫外线复合诱变选育高效解钾菌株[J].吉首大学学报(自然科学版),2016,37(6):62-67.
- [27] 钱娟娟,王克芬,宋静静,等. ARTP-NTG 复合诱变选育高产中性蛋白酶菌株[J].安徽农业科学,2019,47(21):5-7.

(上接第 161 页)