

# 纳豆菌产糖苷酶的发酵工艺优化

林治鑫<sup>1</sup>, 张丽妍<sup>2</sup>, 谷宇<sup>3</sup>, 芦明春<sup>3\*</sup>

(1. 大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连 116011;

2. 大连市第三人民医院, 辽宁 大连 116031; 3. 大连工业大学, 辽宁 大连 116034)

**[摘要]** **目的:** 优选纳豆菌产糖苷酶的发酵工艺。**方法:** 采用 TLC 检测发酵后纳豆中大豆异黄酮变化情况。以酶活力为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察发酵时间、加水量、接种量、初始 pH 对发酵工艺的影响。**结果:** TLC 确定使用纳豆菌产的糖苷酶为胞内酶。最佳发酵工艺为发酵时间 36 h, 加水量 70%, 接种量 10%, 初始 pH 7.5, 酶活力达 205 U·mL<sup>-1</sup>。**结论:** 大豆异黄酮经纳豆菌发酵能由糖苷形式转化为苷元形式, 纳豆菌所产的胞内酶转化染料木苷为染料木素的酶活力高于胞外酶。

**[关键词]** 纳豆菌; 糖苷酶; 大豆异黄酮; 薄层色谱; 发酵

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0023-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013120023

## Optimization of Fermentation Technology of Bacillus Natto Producing Glycosidase

LIN Zhi-xin<sup>1</sup>, ZHANG Li-yan<sup>2</sup>, GU Yu<sup>3</sup>, LU Ming-chun<sup>3\*</sup>

(1. First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China;

2. The Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116031, China;

3. Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize fermentation technology of bacillus natto producing glycosidase. **Method:** Conversion of isoflavones in fermented natto was analyzed by TLC. With enzyme activities as index, based on single factor test, effect of fermentation time, the amount of water, inoculum size and initial pH on fermentation technology was investigated by orthogonal test. **Result:** Glycosidase produced from natto was determined as intracellular by TLC. Optimum fermentation technology was as following: fermentation time 36 h, the amount of water 70%, inoculum size 10%, initial pH 7.5. Enzyme activities was up to 205 U·mL<sup>-1</sup> under these conditions. **Conclusion:** After fermented by bacillus natto, isoflavones could be aglycone from glycosidic, intracellular enzyme producing from bacillus natto showed higher enzyme activities than extracellular for transforming genistin to genistein.

**[Key words]** bacillus natto; glycosidase; soybean isoflavones; TLC; fermentation

发酵豆制品如豆豉、天培、东方 cheese 中大豆异黄酮多为苷元形式<sup>[1]</sup>, 纳豆亦如此, 且均为不同微生物发酵而成。纳豆菌在发酵过程中可产生糖苷酶<sup>[2]</sup>, 进而水解大豆异黄酮糖苷<sup>[3]</sup>。染料木素具有抗肿瘤抗氧化、保护同型半胱氨酸诱导的 SH-SY5Y 细胞的退行性变化作用<sup>[4]</sup>。大豆异黄酮(ISO)是大豆中异黄酮类物质, 具有抗氧化作用, 可消除一些有害的氧自由基及过氧化导致的 DNA 损伤, 对脑缺血

**[收稿日期]** 20121120(003)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅创新团队项目(2008T009)

**[第一作者]** 林治鑫, 副主任药师, 从事药物分析研究, Tel: 0411-83635963, E-mail: 13591758517@139.com

**[通讯作者]** \* 芦明春, 教授, 从事天然产物提取与分离研究, Tel: 0411-86323533, E-mail: slmchun@sina.com

也有保护效应<sup>[5]</sup>。为进一步提高所用菌株产糖苷酶的能力,本实验选取纳豆生产的培养基,通过单因素试验和正交试验优选其发酵条件,以获得较高酶活的生产条件,为生产高纯度大豆异黄酮苷元的纳豆提供参考。

### 1 材料

大豆(市售),染料木苷和 98% 染料木素(北京中天微维生物技术有限公司),枯草芽孢杆菌亚种纳豆菌(*Bacillus natto*, 分离自雁鸣湖纳豆,吉林省雁鸣湖大豆生物科技有限责任公司),Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> 薄层色谱板(德国 Merck 公司),薄层色谱使用 Bandscan 图像分析软件进行处理。

### 2 方法与结果

**2.1 菌种与培养基** 斜面培养基:蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、葡萄糖及 NaCl 各 0.5%,琼脂 2%,pH 7.2~7.4,121℃ 灭菌 20 min。种子培养基:葡萄糖 1%,蛋白胨 0.5%,NaCl 0.5%,蒸馏水溶解,调 pH 7.2~7.4,121℃ 灭菌 20 min。发酵培养基:大豆 10 g 加适量水浸泡 10 h,调节 pH,121℃ 灭菌 30 min。

**2.2 纳豆菌生长曲线的测定** 于恒温振荡箱(37℃,150 r·min<sup>-1</sup>)培养纳豆菌,每 2 h 测定 1 次吸光度( $A_{600}$ ),以时间为横坐标, $A_{600}$ 为纵坐标绘制生长曲线,见图 1。

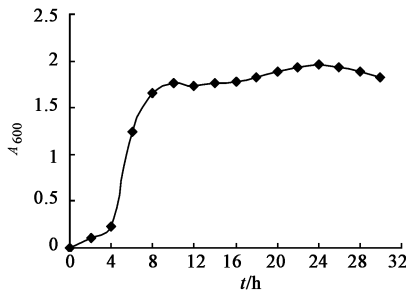


图 1 纳豆菌生长曲线

由图 1 可知,0~4 h 为延滞期,菌体对新环境有短暂的适应过程,繁殖较慢;4~10 h 为对数期,菌体以几何级数快速增长;10~26 h 为稳定期,24 h 时菌体浓度最大,26 h 后进入衰亡期。因此选用种龄 24 h 的种子液为菌种。

**2.3 种子液的制备** 将已活化的斜面菌种接入种子培养基中,于 37℃,150 r·min<sup>-1</sup> 恒温振荡培养 24 h。

**2.4 糖苷酶的提取** 以一定接菌量将种子液接入发酵培养基进行发酵,发酵结束后,按培养物 3 倍体积加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 的 HAc-NaAc 缓冲溶液(pH 5.0),振荡提取 3 h,菌液于 4℃ 离心 10 min(8 000

r·min<sup>-1</sup>),得上清液 a,即为胞外酶液。将菌体重悬于 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,制得 50 g·L<sup>-1</sup> 菌悬液(以菌体湿重计),置超声波破碎仪上进行细胞破壁,离心,收集上清液 b,即为胞内酶液。

**2.5 酶活力的测定及纳豆菌所产糖苷酶属性的确定** 用 pH 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液溶解染料木苷底物,制成 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的底物溶液。取 50 μL 底物溶液,加入酶液 200 μL,于 40℃ 反应 2 h,加入乙酸乙酯终止酶 400 μL 反应并萃取异黄酮,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上层液作薄层色谱检测,点样量 10 μL,展开剂为乙酸乙酯-丁酮-甲醇-水 10:7:1:1。通过 TLC 检测发现所选纳豆菌菌种在发酵生产纳豆过程中,其大豆异黄酮由糖苷型转变成苷元<sup>[6]</sup>。发酵 24 h 的纳豆中大豆异黄酮有一部分转化为苷元形式,发酵 36 h 的纳豆中大豆异黄酮糖苷完全转化为大豆异黄酮苷元,见图 2(“原”为大豆异黄酮)。

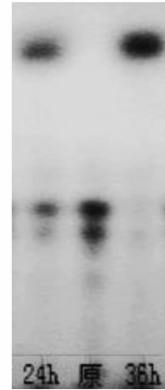


图 2 不同发酵时间纳豆的 TLC



a. 胞外酶;b. 胞内酶;底:染料木苷

图 3 胞内酶与胞外酶的 TLC

微生物产生的酶若分布在菌体细胞内,称为胞内酶,若分泌到菌体外,则为胞外酶<sup>[7]</sup>。为确定纳豆菌所产糖苷酶的属性,对 2.4 项下酶液 a, b 水解底物染料木苷进行 TLC 检测,以定性研究两部分的酶活力情况,见图 3。结果表明,底物与酶液 a 反应

后,产生微量苷元;而经酶液 b 作用的底物有大量苷元生成,即胞内酶的酶活力高于胞外酶。故确定使用该纳豆菌所产的胞内糖苷酶。

取薄层色谱板上含染料木素的硅胶,溶于适量无水乙醇中,振荡使其溶解完全,离心,上清液用紫外分光光度计测定,与标准曲线对照,确定染料木素含量。上述测定条件下 40 ℃, pH 5.0, 每小时释放 1 nmol 染料木素所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力} = [W / (M \times V \times t)] \times 10^3$$

其中  $W$  为产物生成量;  $M$  为产物相对分子质量;  $t$  为反应时间;  $V$  为反应中酶的体积。

## 2.6 纳豆菌产糖苷酶的发酵条件优选

**2.6.1 接种量对纳豆菌产酶的影响** 在加水量 60%, 初始 pH 7.5 的发酵培养基中, 分别按 3%, 5%, 10%, 15% 的接种量(以大豆质量计, 下同)接入种子液, 于 37 ℃ 恒温培养箱中发酵 24 h。发酵结束, 按 2.4 项下方法制备糖苷酶, 按 2.6 项下方法测得不同接种量下所产酶的酶活力分别为 70.27, 118.72, 149.63, 130.16  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.6.2 初始 pH 对纳豆菌产酶的影响** 在加水量 60%, 初始 pH 分别为 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 的发酵培养基中, 以 10% 接种量接入种子液, 其他条件同 2.6.1 项, 测得酶活力分别为 80.21, 139.47, 153.23, 139.22  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.6.3 加水量对纳豆菌产酶的影响** 在加水量(以大豆质量计)分别为 50%, 60%, 70%, 80%, 初始 pH 7.5 的发酵培养基中, 按 10% 的接种量接入种子液, 于 37 ℃ 恒温培养箱中发酵 36 h, 测得不同含水量下所产酶的酶活力分别为 140.21, 188.68, 189.13, 102.45  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.6.4 发酵时间对纳豆菌产酶的影响** 在加水量 60%, 初始 pH 7.5 的发酵培养基中, 按 10% 的接种量接入种子液, 于 37 ℃ 恒温培养箱中, 分别发酵 12, 18, 24, 36, 48 h, 测得不同发酵时间下所产酶的酶活力分别为 102.26, 130.45, 60.51, 190.00, 186.48  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。故确定发酵时间达 36 h, 因为可能发酵时间过长, 发酵过程所产酶已用于水解大豆异黄酮, 导致可检测的酶活力反而降低。

**2.7 正交试验设计** 在单因素试验基础上, 选择四因素三水平正交试验, 以所产酶的酶活力为指标, 确定纳豆菌产糖苷酶的最佳条件, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

由直观分析可知, 发酵因素对产酶影响顺序为发酵时间 > 初始 pH > 加水量 > 接种量, 确定最佳水

表 1 纳豆菌产糖苷酶发酵工艺正交试验因素水平

水平	A 发酵时间/h	B 加水量/%	C 接种量/%	D 初始 pH
1	24	50	3	6.5
2	30	60	5	7.5
3	36	70	10	8.5

表 2 纳豆菌产糖苷酶发酵工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	酶活力 $/\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	1	1	1	1	32.04
2	1	2	2	2	162.81
3	1	3	3	3	178.43
4	2	1	2	3	52.44
5	2	2	3	1	56.04
6	2	3	1	2	112.43
7	3	1	3	2	190.43
8	3	2	1	3	186.88
9	3	3	2	1	149.63
$K_1$	124.43	91.24	110.45	79.24	
$K_2$	73.64	135.24	121.63	155.22	
$K_3$	175.65	146.83	141.63	139.25	
R	102.01	55.19	31.18	75.98	

平为  $A_3B_3C_3D_2$ , 即发酵时间 36 h, 加水量 70%, 接种量 10%, 初始 pH 7.5。按该工艺进行验证试验, 结果所产酶的酶活力达 205  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 效果良好。

## 3 讨论

接种量考察时发现, 在一定范围内, 接种量越大, 更有利于发酵产酶; 但接种量过大, 可能引起发酵初期较高的细胞浓度, 进而引起底物的大量消耗, 易造成产物合成阶段营养物质供应不足, 促使菌体“早衰”、“自溶”, 不利于目的产物的合成及提取分离, 导致酶活力降低<sup>[8]</sup>。

培养基 pH 会影响细胞表面带电基团的解离及其微观结构, 进而影响营养物的吸收和代谢物的分泌, 导致微生物的生长和代谢发生变化<sup>[9]</sup>。

结合培养基状态进行分析, 培养基加水量为 50% 时, 大豆吸水不足, 不能很好地提供营养, 不利于纳豆菌生长, 酶活力较低。加水量为 60% 时, 大豆吸水完全, 有利于纳豆菌的生长, 酶活力高。加水量为 70% 时, 水分略有剩余, 同样酶活力很高, 与 60% 加水量的酶活力基本相等。加水量为 80% 时, 水分剩余过多, 在发酵时, 纳豆菌不能附着于大豆

# 银杏内酯 B 自微乳的处方优选及质量、安全性评价

杨鹏飞<sup>1,2</sup>, 丁兰萍<sup>1,2</sup>, 蔡晓蕾<sup>1,2</sup>, 鲁传华<sup>1,3\*</sup>, 陈卫东<sup>1,3\*</sup>

- (1. 安徽中医学院药学院药代动力学研究室, 合肥 230038;
2. 安徽省中药制剂工程技术研究中心, 合肥 230038;
3. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥 230038)

**[摘要]** 目的: 优化银杏内酯 B(GB)自微乳药物传递系统(SMEDDS)的处方, 并初步评价其质量和安全性。方法: 以微乳粒径、Zeta 电位、药物平衡溶解度为指标, 油相质量分数、混合表面活性剂比例、表面活性剂和助表面活性剂的比例为考察因素, 采用伪三元相图结合星点设计-效应面法优选 GB-SMEDDS 的处方工艺。采用 HPLC 测定 GB 含量, 并对自微乳的 pH、形态学、粒径分布、Zeta 电位、稳定性及部分安全性等进行评价。结果: 最优处方为辛酸/癸酸三甘油酯、聚氧乙烯 35 蓖麻油、卵磷脂、乙醇质量比 25.99:39.47:9.87:24.67, 载药量( $24 \pm 1.4$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 粒径 30 ~ 60 nm, GB-SMEDDS 于 1 周内常温、高温及低温状态下稳定性良好, 通过溶血试验、血管刺激、急性毒性评价给药安全性良好。结论: 星点设计-效应面法适用于 GB-SMEDDS 的处方优化, 所建模型预测性良好, 且 GB 自微乳制备工艺简单、性质稳定、质量易控。

**[关键词]** 银杏内酯 B; 自微乳给药系统; 星点设计-效应面法; 质量评价

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0026-08

**[doi]** 10.11653/syfy2013120026

## Optimization of Prescription and Evaluation of Quality and Security of Ginkgolide B Self-microemulsifying Drug Delivery System

YANG Peng-fei<sup>1,2</sup>, DING Lan-ping<sup>1,2</sup>, CAI Xiao-lei<sup>1,2</sup>,  
LU Chuan-hua<sup>1,3\*</sup>, CHEN Wei-dong<sup>1,3\*</sup>

**[收稿日期]** 20121128(005)

**[第一作者]** 杨鹏飞, 硕士, 药师, 从事药物制剂方向研究, Tel:0551-5136810, E-mail:89246681@qq.com

**[通讯作者]** \* 陈卫东, 博士, 教授, 从事临床药学研究, Tel:0551-5136810, E-mail:anzhongdong@126.com;

\* 鲁传华, 教授, 从事生物材料、制剂学研究, Tel:0551-5169146, E-mail:lchchem@126.com

上, 故不能有效利用大豆的营养成分, 不利于产酶, 导致酶活力降低<sup>[10]</sup>。因此, 确定培养基加水量 60%。

### [参考文献]

- [1] 钱丽丽, 张永忠, 左锋. 提高大豆异黄酮活性作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2005, 26(3): 180.
- [2] 李华, 高丽.  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107.
- [3] 井乐刚, 张永忠. 微生物发酵制备大豆异黄酮的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 86.
- [4] 胡志苹, 黄志华, 吴亮亮, 等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 165.
- [5] 龙军, 袁冬平, 周玲玲, 等. 大豆异黄酮对大鼠海马神经干细胞分化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,

2011, 17(17): 168.

- [6] 张亮, 王清章, 李洪, 等. 莲子  $\beta$ -葡萄糖苷酶提取及酶学性质研究[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 142.
- [7] 叶海梅. 米曲霉 FZ58  $\beta$ -葡萄糖苷酶固体发酵优化及酶学特性的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2008.
- [8] 吕晓莲, 樊利青, 贾建会, 等. 大豆异黄酮糖苷转化酶产生菌株的筛选及培养条件的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 56.
- [9] 王海燕, 孙建义, 刘福柱, 等. 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮的最佳参数[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(2): 42.
- [10] 孙丽艳, 崔洪斌, 赵琪. 发酵罐制备大豆异黄酮糖苷转化酶( $\beta$ -糖苷酶)条件的研究[J]. 大豆通报, 2006(3): 17.

[责任编辑 仝燕]