

纳豆激酶产生菌——纳豆菌对木糖和葡萄糖的利用

谢秋玲¹ 郭勇² 林剑¹

(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)¹ (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)²

摘要: 在纳豆激酶 (Nattokinase, 简称 NK) 发酵条件研究中, 我们发现木糖是较葡萄糖更佳的产酶碳源。进一步的试验证明, NK 的发酵菌种——*Bacillus subtilis* var. *natto* 在混合碳源中没有二次生长现象, 对木糖和葡萄糖的吸收是同时的, 且互不干扰, 葡萄糖对木糖的吸收利用没有分解代谢阻遏。

关键词: 纳豆菌, 纳豆激酶, 木糖, 葡萄糖, 分解代谢阻遏

中国分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0009-04

THE UTILIZATION OF GLUCOSE AND XYLOSE BY *BACILLUS SUBTILIS* VAR. *NATTO* WHICH CAN PRODUCE NATTOKINASE

XIE Qiu-Ling¹ GUO Yong² LIN Jian¹

(Bio-Engineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632)¹

(Food & Biotech College of South China University of Technology, Guangzhou 510641)²

Abstract: Xylose is a better carbon source than glucose for nattokinase fermentation. The strain of bacteria which

收稿日期: 2000-06-05, 修回日期: 2000-09-27

could produce NK-B. subtilis natto neither showed diauxic growth nor a substrate preference when growing on mixed carbon source of xylose and glucose. Glucose and xylose were uptaken simultaneously and there was no catabolic repression.

Keywords: *Bacillus subtilis* var. natto, Nattokinase, Xylose, Glucose, Catabolic, Repression

对于大多数微生物来说，葡萄糖是易被利用的碳源，而葡萄糖对其他一些不易利用的糖类的代谢产生阻遏作用，这一现象被称为分解代谢阻遏。

在纳豆激酶的发酵条件研究中，我们发现木糖是较葡萄糖更佳的碳源^[1]。因而我们进一步探索纳豆激酶产生菌——纳豆菌 (*Bacillus subtilis* var. natto) 对木糖和葡萄糖的利用模式。

1 材料与方 法

1.1 NK 的液体发酵

取一环菌种，接入 50mL/250mL 种子培养基的三角瓶中，37℃振荡扩大培养，然后按 2% 接种量接入发酵培养基中发酵产酶。

发酵培养基：碳源（木糖，葡萄糖或混合糖）20g，大豆蛋白胨 20g，Na₂HPO₄·12H₂O 5g，NaH₂PO₄·2H₂O 1.3g，CaCl₂ 0.2g，MgSO₄·7H₂O 1g，蒸馏水 1000mL，pH7.0~7.2。

1.2 NK 活性测定^[2,3]

发酵液离心取上清，经适当稀释，做为粗酶液。测定时，依次加入 0.3mL 纤维蛋白原（6.67mg/mL 可凝结蛋白）、1.0mL 巴比妥钠缓冲液、0.2mL 酶液、0.2mL 凝血酶（6 单位/mL），从加入凝血酶时刻起，到凝块内小气泡上升至系统体积一半时作为反应终点，记为 CLT 时间。以尿激酶标准品作标准曲线。

1.3 糖的测定

3, 5-二硝基水杨酸法测定单一木糖、单一葡萄糖和混合糖，蒽酮法测定混合糖中的葡萄糖^[4]。

2 结果

2.1 生长的比较

以 1% 木糖和 1% 葡萄糖作混合碳源，观察细菌在混合碳源上与在单一碳源生长的情况。结果发现，细菌在混合碳源上的生长趋势与在单一碳源上的生长趋势没有明显不同。其达到生长最高峰的时间与木糖同步，略晚于葡萄糖，而且没有二次生长现象出现（见图 1）。

2.2 糖的消耗

从碳源的消耗来看，混合碳源的

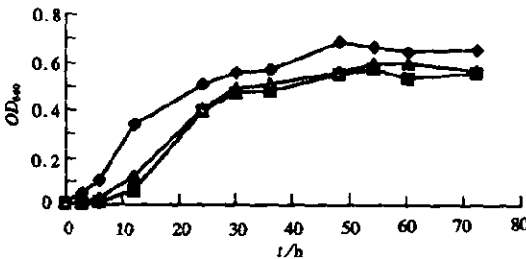


图 1 *B. subtilis* Var. natto 在单一碳源与混合碳源上生长的比较

◆ 葡萄糖, ■ 木糖, ▲ 混合碳源

消耗速度要低于葡萄糖,但要高于木糖(见图2),最终在发酵96h时,培养基内残糖含量,3种碳源没有大的差别。

木糖与蒽酮试剂反应显色甚微,而蒽酮可以与葡萄糖发生显色反应。利用这一特性,用蒽酮法测得培养基中葡萄糖含量,用水杨酸法测得培养基中的总糖含量。用总糖量减去葡萄糖量即得木糖含量。因此获得混合碳源中两种糖各自的消耗情况(见图3),可以看出,葡萄糖的消耗速率大于木糖,这与单一碳源时的情况是相似的。

2.3 产酶的比较

另外还检测了混合碳源对产酶的影响,从图4中可看出,混合碳源对产酶量没有影响,其产酶总量介于木糖与葡萄糖之间;产酶高峰期的到达时间略早于木糖,略晚于葡萄糖。综合以上试验结果得出,葡萄糖对纳豆激酶的合成不产生分解代谢阻遏作用。

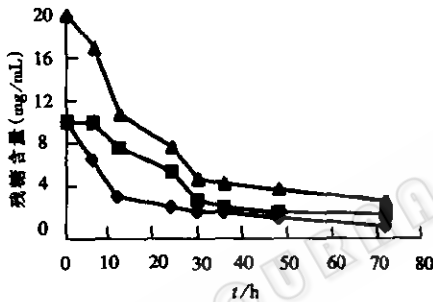


图3 混合碳源中总糖与单种糖的变化曲线
—●—葡萄糖, —■—木糖, —△—混合碳源

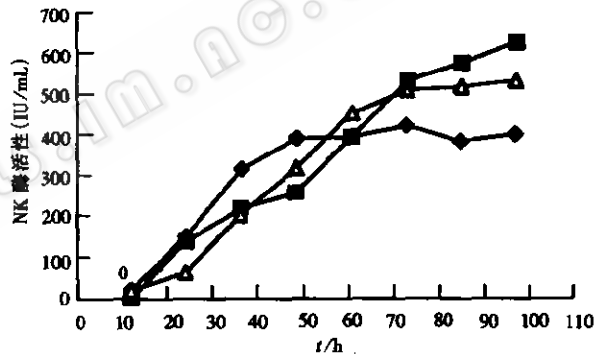


图4 混合碳源与单一碳源产酶的比较
—●—葡萄糖, —■—木糖, —△—混合碳源

3 讨论

木糖是一个五碳糖,是纤维素的组成糖,因此一些栖息于木材上的微生物,包括细菌、丝状真菌和酵母都可以利用木糖。但这些微生物对木糖的利用模式不同。如:*Bacteroides xyloxyticus* X5-1 既没有二次生长,也不显示对底物的偏爱^[4],而*Selenomonas ruminantium* D和*Clostridium acetobutylicum* ATCC824 则会有分解代谢阻遏^[5,6]。即使同一种枯草芽孢杆菌,*Bacillus subtilis* 168和*B. subtilis* BR151的木糖异构酶会受到葡萄糖阻遏,而*B. subtilis* BW23则不会^[7]。对于本试验中的纳豆菌,葡萄糖与木糖同时被菌体吸收,其吸收速率与单一碳源时没有明显差别。这与*Bacteroides xyloxyticus* X51的情况是相同的。

关于木糖的吸收机制,真菌类则研究较多。如酵母*Pichi stipitis*对木糖的吸收机制已得到了研究,*P. stipitis*是利用质子同向转运的方式来吸收木糖的,共有两个系统。一个是低亲和性的,一个是高亲和性的,而葡萄糖则只有一个。高亲和性系统会被葡

萄糖抑制,低亲和性系统则为木糖和葡萄糖共用,不为葡萄糖所抑制;而 *Pichi. heedii* 的葡萄糖运输系统与木糖运输系统是截然不同的^[8]。从本试验的试验结果来看,纳豆菌在混合碳源中没有二次生长现象,从糖的消耗来看,该菌种对木糖和葡萄糖的吸收是同时的,且互不干扰,葡萄糖对木糖的吸收利用不产生代谢阻遏作用。可能是完全不同的两个系统在同时进行的。具体的吸收机制和途径还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 谢秋玲, 郭 勇. 华南理工大学学报(自然科学版), 1999, 5: 127-131.
- [2] 须见洋行, 中岛伸佳, 田谷直俊. J. Brew. Soc. Japan, 1993, 88(6): 482-486.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 广州: 广东科技出版社, 1995: 320-321.
- [4] Biesterveld S, Stefanie J W, Elferink H O, et al. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(2): 576-580.
- [5] Oumine K, Petitedemange H, Raval G, et al. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 40-46.
- [6] Strobel H J. Appl. Environ. Microbiol, 1993, 59: 40-46.
- [7] Gartner D, Geissendorfer M, Hillen W J. Bacteriol, 1988, 170(7): 3102-3109.
- [8] Does A L, Bisson L F. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(1): 140-144.