

纳豆芽孢杆菌发酵生产 MK-7 的产物提取与检测

严为留¹, 张伟国^{*1}, 钱和², 鲁洋²

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从商品纳豆及中国豆豉中分离到了一株产 MK-7 的芽孢杆菌 Y-2。利用豆浆培养基摇瓶发酵, 在未优化的情况下, 24 h 后 MK-7 产量达到 1 178 $\mu\text{g/L}$ 。发酵液经萃取液萃取, 离心取上清液, 减压浓缩后再用另一种萃取液萃取, 上清液用 N_2 吹干, 得到黄色油状物, 加 1 mL 溶剂溶解, 用高效液相色谱检测。结果表明, 利用该方法, 能够有效地提取并检测发酵液中的 MK-7, 方法的回收率为 95%~101%, 表明其具有良好的准确度。

关键词: MK-7; 纳豆芽孢杆菌; 豆浆培养基; 高效液相色谱

中图分类号: Q 93 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)08—0891—05

Production Extraction and Detection of MK-7 Fermented by *Bacillus natto*

YAN Wei-liu¹, ZHANG Wei-guo^{*1}, QIAN He², LU Yang²

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A kind of *Bacillus natto*, Y-2, was separated from commodity natto and Chinese Douchi which has the ability to produce MK-7. The yield of MK-7 reached 1 178 $\mu\text{g/L}$ in soybean milk medium by shaking flask fermentation after 24 h. The fermentation broth was extracted by extract liquor. After centrifugation, the supernatant was collected. Subsequently, the supernatant was submitted to reduce pressure concentration. Thereafter, another extract liquor was added to extract the solution and blew to dryness with N_2 to get yellow oily liquor. Then, 1 mL solvent were added to get final sample, the sample was analyzed by HPLC. As a result, the MK-7 can be well isolated and detected by the method within a recovery of 95%~101%, which indicates a nice accuracy.

Keywords: MK-7, *Bacillus natto*, soybean milk medium, HPLC

纳豆作为日本传统食品, 和中国豆豉一样, 食用已有上千年的历史, 现在每年产量超过 30 万 t^[1]。1996 年, Sato T^[2] 等人从发酵纳豆中提取纯化到 MK-7。随后, 国内外研究人员对传统发酵食品中的 MK-7 进行了大量的研究, 结果表明, 纳豆中 MK-7 的含量较其他的食品要高很多 (约 900 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 纳

豆), 是世界上富含 MK-7 最多的食品。除了日本纳豆以外, 东南亚各国的印尼豆豉和中国豆豉中 MK-7 的含量也比较丰富^[3-4]。

MK-7, 又称甲萘醌-7, 是由一个甲基萘醌母环和七个异戊二烯侧链连接而成, 是维生素 K2 14 种同系物家族中的一员。和其他维生素 K2 同系物一

收稿日期: 2012-10-12

*通信作者: 张伟国(1963—), 男, 江苏张家港人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。

E-mail: zhangwg168@163.com

样, MK-7 是哺乳动物产生凝血因子 II、VII、IX 以及 X 的一个非常重要的辅因子, 是正常血液凝固时不可或缺的营养素^[2,5]。MK-7 还能够活化钙化抑制基质 Gla 蛋白质(matrix Gla protein MGP), 从而防止钙质在血管中沉淀而造成的动脉硬化^[6-7]。另外, MK-7 能够将骨髓中的骨钙素活化, 从而促进骨头的形成^[8-9]。最近的流行病学研究表明, 纳豆中的 MK-7 能够显著提高老年人骨头中的矿物质密度(BMD), 降低老年人的髌骨骨折风险^[4,10-11]。

作者从商品纳豆和商品豆豉中分离到一株产 MK-7 的解淀粉芽孢杆菌 Y-2, 利用豆浆培养基进行液态发酵, 原料和工序都与固态发酵生产纳豆和豆豉类似, 避免了因菌种和培养基成分不明而引起的毒性问题, 所得到的产品理论上安全无毒, 经过初步浓缩即可作为食品添加剂食用, 因此具有较大的应用潜力。但是存在一个明显的问题就是豆浆培养基成分复杂, 尤其是其中存在的大量油脂会干扰同样是脂溶性的 MK-7 的检测。因此如何从一种类似胶体的发酵液中提取、检测微量的 MK-7 成为首先要考虑的问题。作者摸索了一条萃取浓缩的提取方法, 经高效液相色谱检测, 能够较好地反映出 MK-7 的质量浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体 纳豆芽孢杆菌 Y-2: 由作者所在实验室筛选并保藏。

1.1.2 主要试剂 MK-7 标准品 (纯度 99.8%): 购自美国 ChromaDex 公司; 甲醇、乙腈和二氯甲烷: 色谱纯; 正己烷、异丙醇等其他试剂: 分析纯; 豆粉: 由市售大豆粉碎而成, 颗粒度 ≤ 40 目。

1.1.3 主要仪器 DIONEX 高效液相色谱仪 (DIONEX P-680 泵、ASI-100 自动进样器、TCC-100 柱温箱): 美国 DIONEX 公司; Thermo ST16 高速离心机: 美国 Thermo 公司; TECHNE TC-5000 PCR 仪: 美国 TECHNE 公司; PHS-2C 精密酸度计: 上海天达仪器有限公司; UNICO UV-2100 紫外-可见分光光度计: 美国 UNICO 公司; HYL-B 全温摇瓶柜: 太仓市强乐实验设备厂。

1.2 方法

1.2.1 培养基

1) 平板培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 牛肉膏

3, NaCl 5, 琼脂条 20。

2) 种子培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10, 牛肉膏 3, NaCl 5。250 mL 三角瓶装液量为 50 mL。

3) 发酵培养基(g/L): 豆粉 100, 大豆蛋白胨 5, 酵母膏 1.5, KH_2PO_4 1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.5, NaCl 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5。豆粉先用适量水煮沸成豆浆, 冷却备用。500 mL 三角瓶装液量为 100 mL。

三种培养基均以 200 g/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.0~7.2。平板和种子培养基在 0.1 MPa 灭菌 20 min, 发酵培养基在 0.07 MPa 灭菌 10 min^[12]。

1.2.2 培养方法

1) 平板培养方法: (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h。

2) 种子培养方法: (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 往复式摇床培养 10 h, 振荡 120 $\pm$ 2 次/min, 振幅 8 cm。

3) 发酵培养方法: 接种体积分数 2%, (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 往复式摇床培养 24 h, 振荡 120 $\pm$ 2 次/min, 振幅 8 cm。

1.2.3 溶液的配制

1) 萃取液: 正己烷: 异丙醇=2:1, 混匀后备用。

2) 标准品溶液: 准确称取 1 mg 的 MK-7 标样, 加入按乙腈: 二氯甲烷: 甲醇=3:1:1 的比例配制好的混合溶剂 1 mL, 充分溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 密封避光保存。

1.2.4 样品的处理 参照国外研究人员^[13-14]的处理方法, 并加以改进。发酵结束后, 按 4:1 的体积比加入萃取液, 即 4 体积的发酵液加入 1 体积的萃取液, 振摇 1 min, 5 000 g 离心 5 min 后取上清液, 减压旋转浓缩, 得到淡黄色油状物。加入 4 mL 正己烷溶解, 转移到 10 mL 离心管中, 并用 1.5 mL 异丙醇润洗后合并加入, 再加入 1 mL 水, 旋涡混匀 10 s, 5 000 g 离心 5 min。取上层有机相, 通 N_2 吹干, 加入 1 mL 混合溶剂 (乙腈: 二氯甲烷: 甲醇=3:1:1) 溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后得到最终的样品, 上机分析。

1.2.5 液相色谱条件

色谱柱: Waters AccQ·Tag (3.9 mm $\times$ 150 mm); 流动相: 甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 32 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 紫外检测波长: 270 nm。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

提取实验菌株 Y-2 的基因组, 并以此基因组为模板, 扩增其 16S DNA, 送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 将得到的序列在 NCBI 上进

行 BLAST 比对,得到一个登录号为 J0136083。结果表明,Y-2 与芽孢杆菌属同源性达到 99%,初步认定属于芽孢杆菌属的一种。

2.2 系统发育树的绘制

为进一步考察实验菌株与已知菌株的亲缘关

系及其分类地位,将实验菌株的 16S DNA 序列与同源菌株进行比较,用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 分析法构建系统进化树,结果见图 1。结果表明,没有一株菌与 Y-2 的亲缘关系最近,需要进一步进行生理生化鉴定来判断 Y-2 属于哪个种。

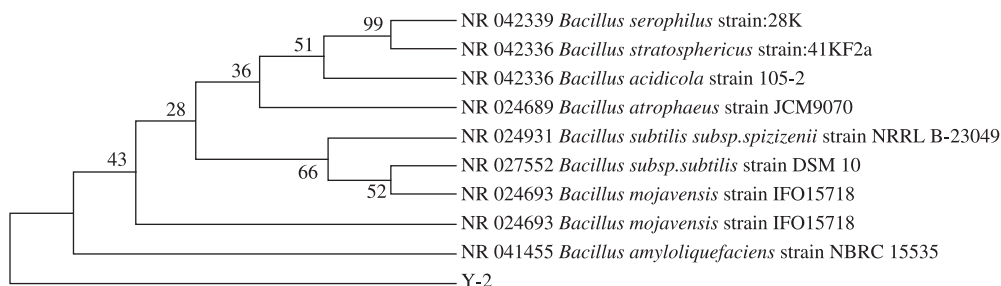


图 1 Y-2 基于 16S DNA 构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree inferred from 16S DNA of Y-2

2.3 MK-7 检测波长的确定

根据 MK-7 标准品的紫外吸收光谱,MK-7 在 190~400 nm 的波长范围都有不同程度的吸收强度。其中在 210 nm 附近吸收强度最大,在 246 nm 和 270 nm 附近也有较强吸收。文献中对 MK-7 的检测波长也大都设置在这三种波长附近^[14-15]。我们首先在 210 nm 波长下检测 MK-7 的质量浓度,结果见图 2。可以看出,样品峰拖尾现象比较严重,特别是样品中可以检测出的杂峰比较多,严重干扰 MK-7 的检测,检测结果的准确度不高。为了解决这个问题,作者随后比较了样品在 246 nm 和 270 nm 两个波长下的吸收情况,结果发现,在 246 nm(图 3)时,样品中可以检测出的杂峰明显减少,但是峰形拖尾,峰与峰之间分离效果不好。而在 270 nm(图 4)波长下,样品中可以检测出的杂峰进一步减少,峰与峰之间分离度较高,而且峰形拖尾现象有了比较好地改善。随后向样品中加入 MK-7 标准品作为内标进行验证,并进行 LC-MS 检测,结果进一步验证了样品中所分离到的色谱峰即 MK-7。因此,在接下来的实验中选择 270 nm 作为 MK-7 的检测波长。

2.4 流速和柱温的确定

在确定了检测波长之后,作者随后考察了流速和柱温对样品分离效果的影响。首先在 30 °C 柱温下,研究了样品在 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min 五个不同流速下的出峰效果。由结果可知,随着流速的提高,MK-7 的出峰时间也逐渐提前。当流速小于 1.0 mL/min 时,峰形拖尾较为严重;超过 1.0 mL/min

后,峰形并无多大变化。综合考虑,选择 1.0 mL/min 作为检测流速。然后在 1.0 mL/min 的流速下,分别研究了 28、30、32、34、36 °C 五个温度对 MK-7 出峰效果的影响。结果表明,温度对 MK-7 出峰效果的影响没有流速大,样品在几个温度下的出峰效果都比较理想。但是在同样的峰面积下,32 °C 条件下出的峰高度要较其他温度下的峰高要更高一点,即峰形要更好一点。由此可以判断,32 °C 是 MK-7 的最佳出峰温度。

2.5 标准曲线及检出限

在得到 MK-7 的最佳色谱检测条件后,以进样体积为横坐标、峰面积为纵坐标绘制 MK-7 的标准曲线,得到线性回归方程为 $y=39.035x-21.117$,线性相关系数 $R^2=0.9999$,线性范围为 70~500 $\mu\text{g/mL}$,检出限为 1 μg 。

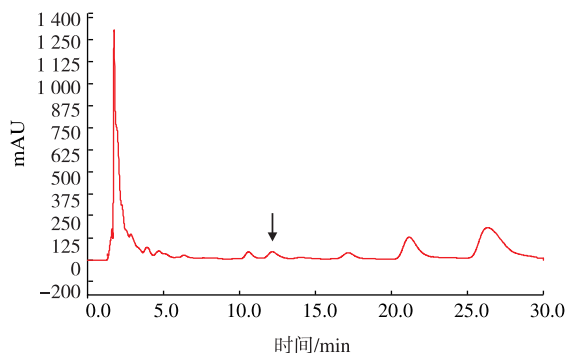


图 2 样品在 210 nm 波长下的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of sample detected in 210 nm

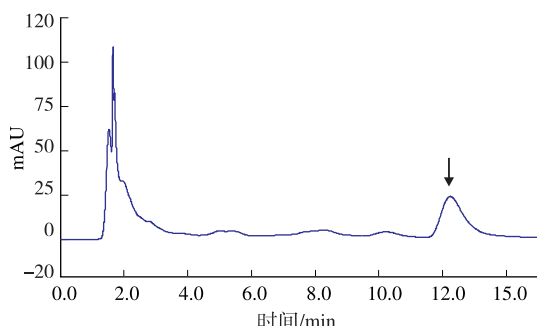


图 3 样品在 246 nm 波长下的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of sample detected in 246 nm

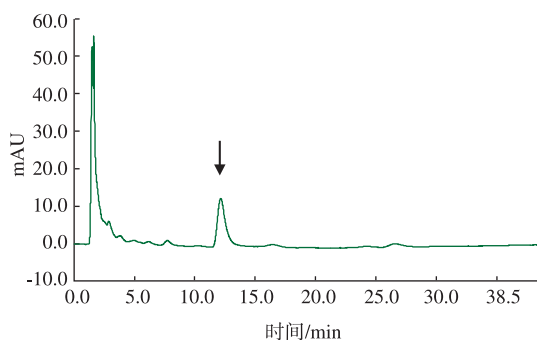


图 4 样品在 270 nm 波长下的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of sample detected in 270 nm

2.6 回收率实验

取 MK-7 的发酵液 3 份, 分别加入一定量的 MK-7 标准溶液, 按 1.2.4 的方法处理后检测, 平行测定 3 次。由结果可知, MK-7 的加标回收率为 95%~101%, 表明该方法的准确性较好。

2.7 发酵液中 MK-7 的分析

在 1.2.5 所述的色谱条件下对不同发酵周期的发酵液中 MK-7 的质量浓度进行检测, 结果见图 5。可以看出, 在未优化的情况下, 24 h 后 MK-7 的摇瓶产量达到 1178 $\mu\text{g/L}$ 。

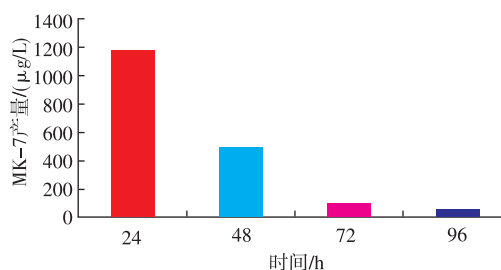


图 5 MK-7 在不同发酵周期中的产量

Fig. 5 Production of MK-7 in different fermentation periods

3 结 语

煮熟的大豆作为纳豆和豆豉芽孢杆菌的传统培养基已有悠久的历史, 菌体经过进化, 其代谢途径中的各种酶已经能充分利用大豆中的各种营养素来维持自身的生长并产生大量的 MK-7, 而且所得到的产品的安全性也毋庸置疑。这一点是我们选择豆浆作为培养基的一个重要原因, 因为豆浆也是由大豆加工而成的, 豆浆里面的营养素组成在理论上应该和大豆相近而且利用率应该更高, 作者的研究结果也证实了这一点, 同时建立了一种较为准确可靠的 MK-7 提取与检测方法, 为今后利用豆浆培养基进行大规模发酵扫清了障碍。

为了提高 MK-7 的产量, 同时节约发酵后 MK-7 的提取和纯化成本, 国外研究人员大多利用甘油作为碳源、大豆蛋白胨作为氮源, 以较澄清的发酵液进行发酵^[15-18]。但是本研究旨在获得一种将发酵液简单处理过后即可作为食品添加剂使用的 MK-7 粗制品, 并且这种粗制品在理论上具有较高的安全性。从目前的情况来看, MK-7 的产量还不够高, 今后研究的重点应该在如何优化发酵条件来进一步提高 MK-7 的产量上。

参考文献:

- [1] Hiroyuki Sumi, Shiori Ikeda, Tadanori Ohsugi. Increasing the production of nattokinase and vitamin k2 in natto with dipicolinic acid[J]. *The Open Food Science Journal*, 2009, 3: 10-14.
- [2] 许薇. 维生素 K2 的合成研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [3] 沙长青, 杨志兴, 赵长山. 纳豆芽孢杆菌发酵生产维生素 K2 的生物合成途径及其基因调控[J]. *生物技术*, 2004, 14(5): 55-57.
- SHA Chang-qing, YANG Zhi-xing, ZHAO Chang-shan. The biosynthetic pathway and gene regulation of vitamin K2 fermented by *Bacillus natto*[J]. *Biotechnology*, 2004, 14(5): 55-57. (in Chinese)
- [4] Fujita Y, Iki M, Tamaki J, et al. Association between vitamin K intake from fermented soybeans, natto, and bone mineral density in elderly Japanese men: the fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (FORMEN) study[J]. *Osteoporosis Int*, 2012, 23: 705-714.

- [5] 吴元锋,郑裕国. 微生物法生产维生素 K2(MK)[J]. 科技通报,2004,20(5):428-433.
WU Yuan-feng,ZHENG Yu-guo. The production of vitamin K2(MK) in the method of microbiology[J]. **Bulletin of Science and Techonology**,2004,20(5):428-433. (in Chinese)
- [6] Leon J Schurgers,Kersten J F Teunissen,Karly Hamulyak. Vitamin K-containing dietary supplements:comparison of synthetic vitamin K1 and natto derived menaquinone-7[J]. **Blood**,2007,109:3279-3283.
- [7] Kresimir pucaj, Henrik Rasmussen, Tom Preston. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2,menaquinone-7[J]. **Toxicology Mechanisms and Methods**,2011,21(7):520-532.
- [8] Yasuhide yanagisawa,Hiroyuki Sumi. *Natto bacillus* contains a large mount of water-soluble vitamin K (menaquinone-7)[J]. **Journal of Food Biochemistry**,2005,29:267-277.
- [9] T Sato,Y Yamada,Y Ohtani. Efficient production of menaquinone (vitamin k2) by a menadione-resistant mutant of *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2001,26:115-120.
- [10] Ellen M Apalset, Clara G Gjesdal, Geir E Eide. Intake of vitamin K1 and K2 and risk of hip fractures:The Hordaland Health study[J]. **Bone**,2011,49:990-995.
- [11] Masayoshi Yamaguchi,Hideaki Taguchi,Ying Hua Gao,et al. Effect of vitamin k2(menaquinone-7) in fermented soybean(natto) on bone loss in ovariectomized rats[J]. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**,1999,17:23-29.
- [12] 周勇,满云,张伟国. L-赖氨酸高产菌发酵的研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(6):924-927.
ZHOU Yong,MAN Yun,ZHANG Wei-guo. Study on the fermentation of L-Lysine hyper-producer[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):924-927. (in Chinese)
- [13] Toshiro Sato,Yohko Yamada,Yutaka Ohtani,et al. Production of menaquinone(vitamin k2)-7 by *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2001,91(1):16-20.
- [14] Sumi. Method for culturing *Bacillus subtilis* natto to produce water-soluble vitamin K and food product,beverage,or feed containing the cultured microorganism or the vitamin K derivative[P]. United States:US 6677143 B2,2004-01-13.
- [15] Aydin Berenjian,Raja Mahanama,Andrea Talbot. Efficient media for high menaquinone-7 production:response surface methodology approach[J]. **New Biotechnology**,2011,28:665-672.
- [16] Yoshinori Tsukamoto,Makoto Kasai,Hiroyuki Kakuda. Construction of a *Bacillus subtilis*(natto) with high productivity of vitamin K2(menaquinone-7) by analog resistance[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,2001,65(9):2007-2015.
- [17] Takaoka. Method for producing vitamin K2 from culture of *Bacillus natto*[P]. United States:US 2007/0254347 A1,2007-11-01.
- [18] Shimatani. Method for separating vitamin K2 from *Bacillus bacterium* culture[P]. United States:US2006/0057688 A1,2006-03-16.

科技信息

美国禁止双酚 A 用于婴儿配方食品包装材料

据美国联邦公报消息,应有关请求,7月12日美国食品药品监督管理局发布最终规定,禁止双酚 A 环氧树脂用于婴儿配方食品包装材料。

[信息来源]食品伙伴网. 美国禁止双酚 A 用于婴儿配方食品包装材料 [EB/OL]. (2013-7-15). <http://www.foodmate.net/news/yujing/2013/07/237639.html>.

欧盟就山梨酸钾作为动物青贮饲料添加剂的安全性与效能发布意见

7月9日,欧盟食品安全局(EFSA)就山梨酸钾作为动物(除狗和猫)青贮饲料添加剂的安全性与效能发布了意见。

欧盟食品安全局专家组认为,将山梨酸钾按照 90-300 mg/kg 新鲜草料的添加量,添加于饲料中不会对牲畜以及人的健康构成威胁,也不会对环境构成影响。七个实验室进行了青贮研究,每个研究至少持续 90 天,使用不同来源的饲料,一旦打开粮仓,检测其氧稳定性。结果表明:山梨酸钾 90 毫克/公斤新鲜材料有潜力提高青贮饲料的氧稳定性与干物质含量达 38%。

[信息来源]EFSA. Scientific Opinion on the safety and efficacy of potassium sorbate as a silage additive for all animals except dogs and cats [EB/OL]. EFSA Journal 2013;11(7):3283 [12 pp.].