

菊芋小孢根霉固态发酵纤溶酶的工艺优化

孙哲, 孙瑶, 王海宽

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 从酒曲中分离得到一株纤溶酶产生菌, 经鉴定为菊芋小孢根霉. 现对其固态发酵工艺的碳源、氮源、碳氮比、初始 pH、含水量、无机盐、接种量、发酵时间、发酵温度和培养基厚度进行研究. 结果表明, 该菌株固态发酵工艺为: 麸皮与豆粕比例 2 : 1, 初始 pH 5.0, 含水量(干基) 1 mL/g, MgSO₄ 10 mmol/kg, (NH₄)₂SO₄ 200 mmol/kg, FeSO₄ 3 mmol/kg, 接种量为 6×10^6 g⁻¹, 培养基厚度为 2 cm, 29 °C 恒温发酵 72 h. 最佳发酵条件下酶活力为 684.39 U/g, 是未优化时产酶量的 8.2 倍. 通过对培养基的优化研究, 使产酶量大幅提高, 说明菊芋小孢根霉固态发酵纤溶酶具有工业潜力, 也为工业化提供数据基础.

关键词: 菊芋小孢根霉; 纤溶酶; 固态发酵; 工艺优化

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2013)02-0001-05

Solid-state Fermentation of *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* for Production of Fibrinolytic Enzyme

SUN Zhe, SUN Yao, WANG Haikuan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A strain producing fibrinolytic enzyme was isolated from starter. The strain was identified as *Rhizopus microspores* var. *tuberosus*. The effects of carbon source, nitrogen source, carbon nitrogen ratio, moisture of culture, initial pH, inorganic salts, inoculum size, fermentation time, temperature and medium thickness on the production of fibrinolytic enzyme were investigated with solid-state fermentation. The results show that the appropriate conditions are as follows: carbon (bran) to nitrogen (bean pulp) ratio is 2 : 1, initial pH 5.0, moisture of culture 1 mL/g dry basis, MgSO₄ 10 mmol/kg, (NH₄)₂SO₄ 200 mmol/kg and FeSO₄ 3 mmol/kg. The optimized inoculum size, fermentation time, temperature and medium thickness are 6×10^6 spores/g solid substrate, 72 h, 29 °C and 2 cm, respectively. Under the optimized conditions the average fibrinolytic enzyme activity reached 684.39 U/g. It is 8.2 times that of the original enzyme activity. All this indicates that solid-state fermentation of *rhizopus microsporus* var. *tuberosus* for production of fibrinolytic enzyme has industrial potential, and provides the basic data foundation for industrialization.

Key words: *Rhizopus microspores* var. *tuberosus*; fibrinolytic enzyme; solid-state fermentation; optimization

近年来我国心血管疾病的发病率大大增加, 特别是脑血栓严重威胁我国人民的生命安全. 因此如何防治, 如何提高血栓病的防治水平, 是医药学界亟需解决的问题. 目前溶栓治疗方法主要有 3 种: 外科手术疗法、器械疗法、药物疗法^[1-2]. 其中, 外科手术见效快, 可是手术操作复杂、费用高、有创伤、术后复发

率也高^[3]; 器械疗法受到一定的设备局限, 其本身不影响血栓的凝血机制, 并且作用时间短, 所以需要与其他疗法结合, 一般不单独使用; 而药物溶栓法是通过使用溶栓药物, 使血凝块中的纤维蛋白降解成可溶物质促使循环再通^[4-5], 它与外科手术相比费用低, 与保守疗法相比死亡率低. 因此, 研究廉价、溶栓效

收稿日期: 2012-11-06; 修回日期: 2013-01-17

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目(09ZCKFNC00800)

作者简介: 孙哲(1987—), 男(满族), 辽宁人, 硕士研究生; 通信作者: 王海宽, 副教授, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

果好且安全的溶栓药物具有重大的现实意义。

溶栓药物来源广泛,动物、植物、微生物都有产纤溶酶的相关报道。自1987年日本学者 Sumi 等^[6]发现纳豆激酶(Nattokinase, NK)以后,通过微生物发酵方式获得廉价、高效纤溶酶的方法引起业内人士的兴趣。1996年 Kim 等^[7]从韩国传统食品豆酱中分离到有纤溶活性的蛋白酶,命名为枯草激酶(CK)。杜连祥等^[8]从南方小酒药中发现具有纤溶酶活性的根霉(*Rhizopus chiensis*) 12[#],根霉纤溶酶仅作用于枯草杆菌蛋白酶和胰蛋白酶的底物,而不作用于凝血酶、尿激酶和胰蛋白酶的底物,底物专一性好。2011年,Choi 等^[9]从蛹虫草中分离得到纤溶活性很强的溶栓酶,相对分子质量为 3.4×10^4 ,能充分降解血纤维蛋白的 α 、 β 和 γ - γ 链。同年, Mander 等^[10]从链霉菌(*Streptomyces* sp. CS624)中分离得到一种纤溶酶,其相对分子质量较小,为 1.8×10^4 ,N 端 15 氨基酸序列为 APNVD AIYLPQYRLS,与其他纤溶酶报道不同。2012年 Rashad 等^[11]从生长在葵花籽油蛋糕上的念珠菌中分离得到一种高相对分子质量 7.244×10^4 的纤溶酶,被 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和碘乙酸完全抑制,但酶活力较强,是一种有潜力的溶栓药剂。

本实验室从酒曲中分离出一株可降解纤维蛋白菌株,经鉴定为菊芋小孢根霉。前期实验工作已经证明该菌株所产蛋白酶为纤溶酶^[1,12]。纤维蛋白平板实验证明具有很强纤溶活性,作为新一代溶栓抗凝药物具有开发潜能。由于菊芋小孢根霉在初始固态发酵培养基上产酶量仅为 (83.46 ± 8.34) U/g,产量低,因而本文对菊芋小孢根霉的固态发酵生产工艺进行研究,旨在提高酶产量。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

由本实验室从酒曲中分离得到菊芋小孢根霉 *Rhizopus microspores* var. *tuberosus*^[1]。

牛血纤维蛋白原、凝血酶和琼脂糖, Sigma 公司;其余试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 培养基与培养方法

斜面培养基: PDA 培养基。保存菌种接入斜面培养基, 29 °C 恒温培养 5 d。

发酵培养基: 麸皮 25 g, 豆粕 25 g, 加水 50 mL, 121 °C 灭菌 20 min。用无菌水将斜面上的孢子洗下, 转入装有玻璃珠的无菌生理盐水中, 振荡, 计数。用

灭菌后的双层纱布过滤得到孢子悬液, 将其接入灭过菌的发酵培养基中(孢子浓度 10^6 g^{-1}), 29 °C 恒温培养 72 h。

1.3 粗酶液制备方法

发酵结束后, 按 1 : 5 的比例向发酵物中加入无菌生理盐水, 充分振荡, 使发酵物均匀分散到生理盐水中, 4 °C 浸提 5 h 之后将浸提物在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 20 min, 取上清液即为粗酶液。

1.4 酶活测定方法

纤维蛋白平板法, 参考 Astrup 等^[13]与 Walton^[14]方法, 用尿激酶标准品作纤溶酶活性标准曲线, 37 °C 保温 16 h, 其回归方程为 $Y = 1.624 X - 1.666$, $R^2 = 0.994$, 其中 Y 为酶活力(U/mL)的常用对数, X 为溶圈最大与最小直径乘积的常用对数。取待测样品 10 μL 点在血纤维蛋白平板上, 37 °C 保温 16 h 后测定溶圈最大与最小直径, 通过上述回归方程计算待测样品酶活力, 再换算出每克干基酶活力(U/g)。

2 结果与讨论

2.1 培养基优化

2.1.1 碳源的选择

分别取麸皮、玉米粉、大米粉、面粉 25 g, 与 25 g 豆粕配制成不同碳源的发酵培养基, 加水 50 mL, 拌匀, 29 °C 发酵 72 h。按 1.4 方法测酶活力, 结果见表 1。结果表明, 麸皮作为碳源时酶活力最高, 其活力为 (134.57 ± 13.26) U/g。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Tab. 1 Effect of different carbon source on production of fibrinolytic enzyme

碳源	酶活力/(U·g ⁻¹)
麸皮	134.57 ± 13.26
玉米粉	50.46 ± 5.86
大米粉	30.97 ± 3.43
面粉	20.64 ± 2.86

2.1.2 氮源的选择

分别取大豆粉、豆粕粉、花生饼粉、棉子饼粉 25 g 作为氮源, 另加入 25 g 麸皮配制成不同氮源的培养基, 其他条件同上, 测得酶活力见表 2。结果表明, 豆粕粉作为氮源时酶活力最高, 为 (201.46 ± 20.14) U/g。

2.1.3 碳氮比的确定

以麸皮为碳源, 豆粕粉为氮源, 按比例 1 : 1、1 :

2:1:3、2:1:3:1 分别配制总量为 50 g 的培养基,其他条件同上. 不同碳氮比对产酶的影响如图 1 所示. 结果表明,当碳氮比为 2:1 时产酶量达到最大,其活力为 (254.64 ± 25.32) U/g.

表 2 不同氮源对产酶的影响

Tab. 2 Effect of nitrogen source on production of fibrinolytic enzyme

氮源	酶活力/(U·g ⁻¹)
大豆粉	150.34 ± 15.38
豆粕粉	201.46 ± 20.14
花生饼粉	140.47 ± 14.43
棉子饼粉	170.68 ± 17.46

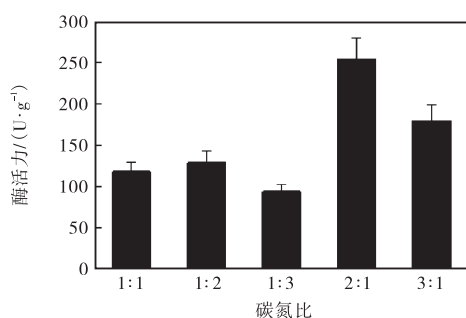


图 1 不同碳氮比对产酶的影响

Fig. 1 Effect of different carbon nitrogen ratio on production of fibrinolytic enzyme

2.1.4 培养基含水量对产酶的影响

水是生命生长所必需的,菊芋小孢根霉发酵也不例外,尤其是好氧固态发酵对水量的要求相对更高,少量的水不能保证微生物体内生化反应的正常进行,也就不能大量产酶;相反,水过量会使培养基黏稠,氧供应困难,不利于菌体生长. 为确定最适宜的水含量,本实验向每克干基中分别加水 0.5、0.75、1.00、1.25、1.5、1.75、2.00 mL,发酵后测其活力,结果如图 2 所示. 结果表明:培养基中加水 1 mL/g(干基)酶产量最高,最高活力为 (289.76 ± 28.98) U/g.

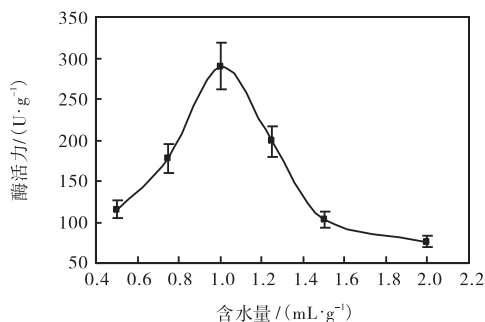


图 2 不同含水量对产酶的影响

Fig. 2 Effect of moisture of culture on production of fibrinolytic enzyme

2.1.5 培养基初始 pH 对产纤溶酶的影响

用 HCl 或者 NaOH 调节培养基,使 pH 在 4~10 范围内,发酵后分别测酶活力,结果如图 3 所示. 结果表明,当发酵培养基初始 pH 为 5 时,酶活力最高,达到 (302.46 ± 15.12) U/g. 由于原始培养基 pH 为 5.3,与最适 pH 接近,所以 pH 不用调节.

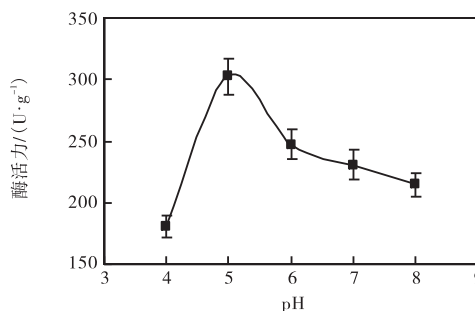


图 3 不同发酵初始 pH 对产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on production of fibrinolytic enzyme

2.1.6 无机盐对产酶的影响

微生物在生长和产酶的过程中需要某些无机盐和微量元素作为各种酶的激活剂或辅助因子,这些物质一般在较低且合适的浓度下才对产酶起促进作用,而在较高浓度下将会抑制产酶,因而很有必要研究常见无机盐对产酶的影响,且需要确定其最适浓度.

选择 CaCl_2 、 MnSO_4 、 KCl 、 MgSO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 、 CuSO_4 、 FeSO_4 进行单因素实验,考察这些无机盐对菊芋小孢根霉产生纤溶酶的促进作用. 加入量为 10 mmol/kg,结果见表 3.

表 3 无机盐对产酶的影响

Tab. 3 Effect of inorganic salts on production of fibrinolytic enzyme

无机盐	酶活力/(U·g ⁻¹)
CaCl_2	288.38 ± 14.42
MgSO_4	324.46 ± 16.22
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	334.26 ± 16.57
KCl	278.96 ± 13.54
NaCl	264.65 ± 13.23
CuSO_4	201.34 ± 10.05
FeSO_4	318.47 ± 15.59
MnSO_4	246.58 ± 12.33

结果表明, MgSO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 FeSO_4 对产酶有很好的促进作用,故选择这 3 种无机盐进行正交优化实验,确定其最佳加入量. 正交实验设计与实验结果见表 4,通过分析可知,最优无机盐配比为 MgSO_4 10 mmol/kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mmol/kg, FeSO_4 3 mmol/g; 观察 R 值,可知 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对产酶影响最大.

表 4 正交实验结果

Tab. 4 Orthogonal experiment results

实验号	MgSO ₄ / (mmol·kg ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ / (mmol·kg ⁻¹)	FeSO ₄ / (mmol·kg ⁻¹)	酶活力/ (U·g ⁻¹)
1	10	100	1	217.296
2	10	200	3	887.546
3	10	300	5	223.384
4	20	100	3	171.672
5	20	200	5	193.797
6	20	300	1	312.300
7	30	100	5	146.859
8	30	200	1	166.855
9	30	300	3	195.590
K ₁	1 328.2	381.8	696.5	
K ₂	677.8	1 248.2	1 254.8	
K ₃	509.3	731.3	564.0	
R	245.9	288.8	230.3	

2.2 培养条件优化

在以上实验确定的最佳培养基(麸皮与豆粕比例 2 : 1、初始 pH 5.0、含水量(干基) 1 mL/g、MgSO₄ 10 mmol/kg、(NH₄)₂SO₄ 200 mmol/kg、FeSO₄ 3 mmol/kg)条件下进行以下实验。

2.2.1 接种量对产酶的影响

向每克培养基中分别接入 2×10^6 、 6×10^6 、 10^7 个孢子,测定酶活力的结果分别为 (386.48 ± 19.33) U/g、 (468.34 ± 23.42) U/g 和 (349.58 ± 17.48) U/g,表明接种量为 6×10^6 g⁻¹ 时酶活力最高,为 (468.34 ± 23.41) U/g。

2.2.2 发酵时间对产酶的影响

在以上最佳条件下,分别发酵 48、60、72、80 h,结果如图 4 所示。结果表明:发酵时间达到 72 h 产酶量最大,为 (588.54 ± 29.42) U/g。

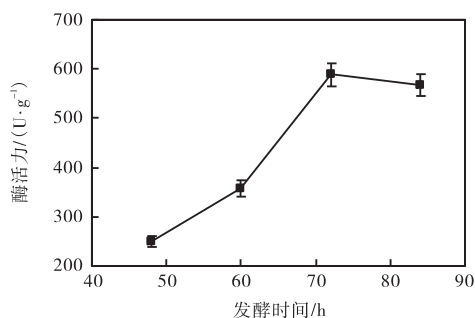


图 4 发酵时间对产酶的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on production of fibrinolytic enzyme

2.2.3 发酵温度对产酶的影响

在以上最佳发酵条件下,将配好的发酵培养基分别放置在 24、29、33、37、42 °C 恒温培养箱中进行发

酵,72 h 后分别测酶活力,结果如图 5 所示。结果表明:最佳发酵温度为 29 °C,最高酶活力为 (654.19 ± 32.71) U/g。

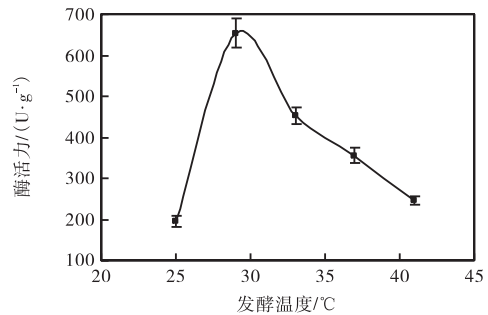


图 5 发酵温度对产酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature on production of fibrinolytic enzyme

2.2.4 培养基厚度对产酶的影响

在以上最佳条件下,配制厚度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 cm 的固态培养基,考察培养基厚度对产酶的影响,结果如图 6 所示。结果表明:当培养基厚度为 2 cm 时产酶量最大,达到 (668.76 ± 33.38) U/g。

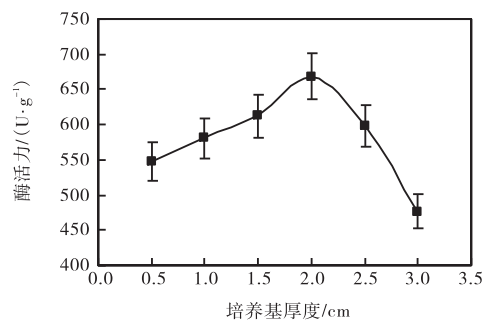


图 6 培养基厚度对产酶的影响

Fig. 6 Effect of medium thickness on production of fibrinolytic enzyme

2.3 验证实验

在以上实验确定的最佳培养基(麸皮与豆粕比例 2 : 1, 初始 pH 5.0, 含水量(干基) 1 mL/g, MgSO₄ 10 mmol/kg, (NH₄)₂SO₄ 200 mmol/kg, FeSO₄ 3 mmol/kg)及最适培养条件(接种量 6×10^6 g⁻¹, 培养基厚度 2 cm, 29 °C 恒温发酵 72 h)下发酵菊芋小孢根霉,测得平均酶活力为 (684.39 ± 34.22) U/g, 是未优化条件下产酶量的 8.2 倍。

3 结论

菊芋小孢根霉最适发酵培养基配料组成及培养

条件:麸皮与豆粕的比例为2:1;含水量(干基)为1 mL/g;初始pH 5.0,由于与原始pH接近,故不用调节;无机盐加入量为MgSO₄ 10 mmol/kg, (NH₄)₂SO₄ 200 mmol/kg, FeSO₄ 3 mmol/kg,其中(NH₄)₂SO₄对产酶影响最大;孢子最佳接入量为 $6 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$,发酵时间为72 h,发酵温度29℃,培养基厚度2 cm。在最佳条件产酶量大幅度提高,从开始的(83.46 ± 8.34)U/g提高到(684.39 ± 34.22)U/g,效果显著,为进一步放大探索工业化产酶方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] 曹兴南,王海宽,孙岩,等.一株来源于酒曲的纤溶酶产生菌的鉴定及其酶学性质[J].天津科技大学学报,2011,26(5):13-18.
- [2] 黄继林.脑血栓溶栓疗法的现状与进展[J].血栓与止血学,2001,22(5):214-216.
- [3] Kinsara A J, Al-Bogami S. Prosthetic valve thrombosis-case report and literature review[J]. European Journal of Internal Medicine, 2003, 14(7):438-440.
- [4] Khan I A, Gowda R M. Clinical perspectives and therapeutics of thrombolysis[J]. International Journal of Cardiology, 2003, 91(2/3):115-127.
- [5] 李鹤,郝晓元,雷田香,等.中药抗血栓的实验研究进展[J].湖南中医学院学报,2006(3):63-64.
- [6] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. 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.
- [7] Kim W, Choi K, Kim Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7):2482-2488.
- [8] Liu Xiaolan, Du Lianxiang, Lu Fuping, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(2):209-214.
- [9] Choi D, Cha W S, Park N, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3):3279-3285.
- [10] Mander P, Cho S S, Simkhada J R, et al. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(7):1449-1455.
- [11] Rashad M M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme by *Candida Guilliermondii* grown on dunflower oil cake[J]. Journal of Applied Sciences Research, 2012, 8:635-645.
- [12] 曹兴南.菊芋小孢根霉产纤溶酶的发酵工艺和纯化研究[D].天津:天津科技大学,2012:37-42.
- [13] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2):346-351.
- [14] Walton P L. An improved fibrin plate method for the assay of plasminogen activators[J]. Clinica Chimica Acta, 1966, 13(5):680-684.

责任编辑:郎婧