

纤溶菌固态发酵条件及溶栓作用的研究

李宝库¹, 马珣玻², 路新利³, 崔哲¹

(1.河北大学药学院,河北保定 071002;2.河北大学医学部,河北保定 071002;

3.河北省疾病预防控制中心,河北石家庄 050000)

摘要: 分离出一株能产纤溶酶的芽孢杆菌菌株,以大豆为原料对其产纤溶酶的固态发酵工艺进行研究,对发酵产物进行了提取。结果表明,最适培养基组成为面粉:大豆(W/W)=1:8,培养基加水量为 0.75 mL/g 物料,初始 pH 自然,接种量为 2 mL/100 g 物料,培养基厚度为 18 g/250 mL 三角瓶,培养时间为 60 h,温度 37 ℃。优化条件下的固体发酵纤溶酶产量平均达 580.52 U(尿激酶单位)/g 物料。

关键词: 微生物; 纤溶酶; 酶活性; 固态发酵

中图分类号: TQ920; Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)07-0027-03

Investigation on the Solid Fermentation Conditions of Bacillus strain & Study on the Thrombolysis of Fibrinolytic Enzyme

LI Bao-ku¹, MA Xiang-bo², LU Xin-li³ and CUI zhe¹

(1. Pharmacy College of Hebei University, Baoding, Hebei 071002; 2. Medical College of Hebei University, Baoding,

Hebei 071002; 3. Hebei Centre for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

Abstract: A bacillus strain producing fibrinolytic enzyme was separated successfully and its solid fermentation conditions were investigated by using soybean as raw materials and the fermented products were extracted finally. The best technical parameters were summed up as follows by experiments: culture medium composed by flour and soybean (the ratio of flour to soybean was 1:8), water addition level was 0.75 mL/g raw material, initial pH value was the natural value, the inoculation quantity was 2 mL/100 g materials, the thickness of the culture medium was 18 g/250 mL triangle flask, the culture time was 60 h, and the culture temperature was at 37 ℃. Under the above conditions, the average yield of fibrinolytic enzyme could reach 580.52 urokinase units per gram materials.

Key words: microbe; fibrinolytic enzyme; enzyme activity; solid fermentation

血栓症(如急性心肌梗塞、静脉血栓等)是严重危及人类健康及生命的心血管疾病。目前,溶栓疗法已是心肌梗塞和其他血栓性疾病的常规急救疗法,其手段之一是注射溶栓剂使血管再通。微生物能够产生纤溶酶^[1~2],是因为其生长环境中存在和血纤维蛋白结构类似的诱导物,而且此时环境中又缺乏可利用的其他氮源。诱导物的选择首先着眼于大豆蛋白,大豆中蛋白质含量高,种类多,结构复杂,有较多的位点与血纤维蛋白结构相似或一致,而且纤溶菌在利用大豆发酵过程中产生的蛋白酶可以水解大豆蛋白质生产大豆肽,近年来的研究表明,大豆肽可降低胆固醇、抑制血压升高、抗过敏性、增强免疫功能和抗自由基损伤^[3]。

本研究是基于大豆原料对纤溶菌产生纤溶酶有诱导作用,而且该菌株以大豆和面粉为原料发酵可产生纤溶活性组分,并可以水解大豆蛋白产生大豆肽,其干基可制成功能性食品,故选用大豆作氮源进行固态发酵,并对发

酵条件进行了优化,为今后工业化生产提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

芽孢杆菌 HF3;本实验室筛选。

1.2 主要试剂

纤维蛋白原、凝血酶、酪蛋白、琼脂糖(购自中国药品生物制品检定所,纤维蛋白原为 Sigma 公司产品),尿激酶(50 万国际单位/支 1.25 g)(丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司)。

1.3 主要培养基^[4]

①斜面培养基:葡萄糖 30 g,酵母膏 20 g,琼脂 20 g,用 10%豆汁配制,pH 自然(10%豆汁制作:黄豆 100 g,用 1000 mL 水浸泡 24 h,文火煮沸 30 min,取汁定容至 1000 mL)。

②发酵培养基:将大豆用水浸泡 24 h 后,砸碎去皮,

基金项目 河北省教育厅 2006 年资助项目(编号 Z2006306)。

收稿日期:2009-04-01

作者简介 李宝库(1966-)男,副教授。从事微生物发酵及生物制药方面研究。

与面粉原料按一定比例混合,加水量为 0.75~1.00 mL/g 物料,pH 自然。

1.4 纤溶活性测定方法

采用纤维蛋白平板法^[5]。

1.4.1 标准酶活力测定

将尿激酶标准液 (20 U/mL, 40 U/mL, 60 U/mL, 80 U/mL, 100 U/mL, 120 U/mL, 140 U/mL, 160 U/mL) 各取 10 μ L 点样于新配置的纤维蛋白平板上,37 $^{\circ}$ C 保温 16 h。测定溶圈的垂直直径,计算溶圈面积。并以溶圈面积为纵坐标,以标准酶活力为横坐标作图,得到尿激酶活力单位与溶圈面积关系公式,由此可计算出样品相当于尿激酶的酶活力。

1.4.2 样品酶活力测定

使用以上方法取待测样品 10 μ L 点在纤维蛋白平板上,37 $^{\circ}$ C 保温 16 h 后测量溶圈直径,通过回归方程计算待测样品的酶活力。

1.5 pH 的测定

用酸度计测量。

1.6 发酵条件的优化

先进行单因素实验,以确定各因素水平,通过正交实验确定最适发酵条件。

2 结果与分析

2.1 纤溶酶活性标准曲线 (图 1)

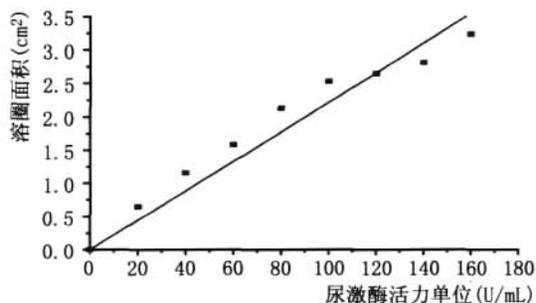


图 1 纤溶酶活性标准曲线

由图 1 可知,尿激酶活力 (U/mL) 与溶圈面积的关系为 $y=45.147x$ ($r=0.9817$), 其中 y : 尿激酶活力 (U/mL), x : 溶圈面积 (cm^2), r : 准确率。根据这个公式可计算出与样品相当的尿激酶单位,即酶活力。

2.2 最适发酵条件的确定

2.2.1 碳源的选择

在蛋白酶的发酵生产中,代谢缓慢的碳源有利于蛋白酶的生产,而葡萄糖、蔗糖等容易代谢利用的碳源对蛋白酶生产有阻遏作用^[6]。本实验以面粉作碳源进行固态发酵,有利于产纤溶酶,面粉来源丰富、价格低廉,除含有淀粉等碳水化合物以外,还含有维生素和金属离子,除提供微生物生长的碳源外,其中的 B 族维生素和生物素以及镁、锌、铁、钙等金属离子是微生物必需的生长因子。

2.2.2 适宜物料比的确定

选用不同的面粉与大豆质量比(即面粉:大豆质量比为 1:8、1:4、1:1、4:1 和 8:1)进行固态发酵。确定接种量为 2 mL/100 g 物料,发酵时间为 60 h,培养基加水量为 1 mL/g 物料,pH 自然,实验结果见图 2。

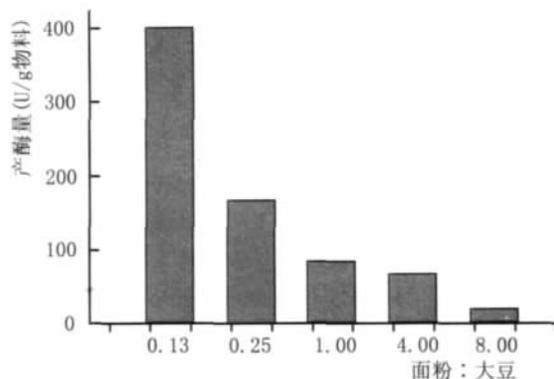


图 2 不同物料比对纤溶酶产量的影响

由图 2 可知,当面粉:大豆(W/W)等于 1:8 时,纤溶酶产量最高为 405.8 U/g。以下均采用面粉:大豆为 1:8。

2.2.3 培养基初始 pH 对产纤溶酶的影响

取不同初始 pH 的发酵培养基进行固态发酵,其他条件同上,结果见图 3。

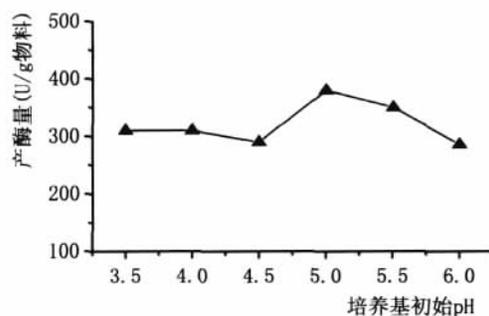


图 3 培养基初始 pH 对纤溶酶产量的影响

由图 3 可知,以大豆为原料进行固态发酵产生纤溶酶的适宜初始 pH 为 5.0,而大豆面粉固态发酵培养基的自然 pH 在 5.0~5.3 范围内,因此培养基 pH 不必调整。

2.2.4 培养温度对产酶的影响

由于固态发酵过程中微生物代谢产生的热量难以快速散出,因此控制发酵过程温度是固态发酵条件控制的一个重要因素。对一般的细菌而言,最适生长温度为 30~37 $^{\circ}$ C,但在发酵过程特别是产酶中,为了保持酶的最高活性,温度不宜过高。选择 32 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 和 42 $^{\circ}$ C,结果见图 4。由图 4 可知,菌株的最适温度为 37 $^{\circ}$ C。

2.2.5 培养基加水量对纤溶酶产量的影响

多数细菌正常生长的水活度范围在 0.75~0.95 之间,配制物料加水量 (mL/g 物料) 分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 和 2.00 的培养基,pH 自然,其他条件同上,比较不同加水量对产纤溶酶的影响,结果见图 5。由图 5 可知,在大豆面粉发酵培养基中,加水量为 0.75 mL/g 物料

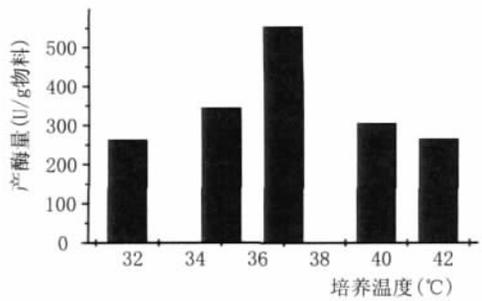


图4 温度对菌株产酶的影响

时,产酶量最大。

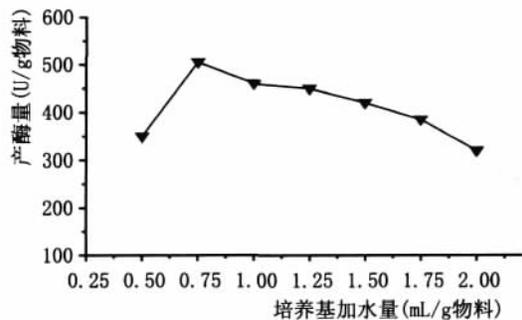


图5 培养基加水量对纤溶酶产量的影响

2.2.6 发酵时间对纤溶酶产量的影响

采用浅盘固态发酵,37 °C培养,加水量为 0.75 mL/g 物料,其他条件同上,每隔 10 h 取样,测定其产酶曲线,结果见图 6。

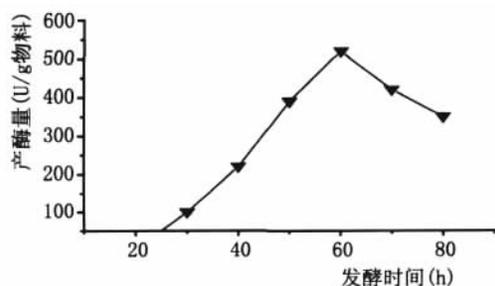


图6 发酵时间对纤溶酶产量的影响

由图 6 可知,菌体在 60 h 出现产酶高峰;在 60 h 后,酶活出现下降;到 80 h 后,发酵浸提液酶活下降剧烈,这主要是因为是在发酵 60 h 后,培养基中堆积的纤溶酶被菌体生长所利用,故选择发酵时间为 60 h。

2.2.7 接种量和通气量对纤溶酶产量的影响

固态发酵应选择合适的接种量以配合适宜的发酵周期,提高通风量不仅可以满足微生物对氧的需求,同时还带走发酵过程中产生的热量。本文的通气量用培养基厚度表示。

接种量和通气量对纤溶菌固体发酵产生纤溶酶有很大的影响,而且这两个因素常存在交互作用。采用正交试验确定适宜的接种量和通气量,结果见表 1。

由表 1 可知,最优条件是 A2B1,即培养基的量为 18 g/250 mL 三角瓶,接种量为 2 mL/100g 物料,产酶量

表 1 菌株正交实验结果

序号	A:培养基厚度 (g/250mL 三角瓶)	接种量 B (mL/100g 物料)	A×B	产酶量 (U/g 物料)
1	10	2	1	368.9
2	10	4	2	426.8
3	10	8	3	489.4
4	18	2	3	580.5
5	18	4	1	400.1
6	18	8	2	435.8
7	25	2	2	158.5
8	25	4	3	333.2
9	25	8	1	98.6
K ₁	428.367	369.300	379.300	
K ₂	472.133	386.700	368.633	
K ₃	196.767	341.267	349.333	
R	275.366	45.433	29.967	

注: K₁、K₂、K₃分别表示实验结果的极差分析数据, R 表示实验的极差值。

高达 580.5 U/g 物料。

2.2.8 优化条件下的固态发酵结果

采用优化后发酵实验结果培养基和培养条件,进行 3 个批次的固态发酵实验,产酶量依次为 578.02 U/g 物料、584.26 U/g 物料和 579.28 U/g 物料。

3 讨论

通过各单因素实验,并结合正交实验,发现该芽孢杆菌产纤溶酶的最适固态发酵条件是:面粉:大豆(W/W)=1:8,培养基加水量为 0.75 mL/g 物料,培养基初始 pH 自然;适宜培养条件为:接种量 2 mL/100 g 物料,培养基量为 18 g/250 mL 三角瓶,培养时间为 60 h,温度 37 °C。优化条件下的固体发酵纤溶酶产量平均达 580.52 U/g 物料。与国内外文献^[7-9]比较可知,其活力是比较高的。

参考文献:

- [1] 李宝库,周岩,靳玉卯,等. 纤溶酶产生菌液体培养条件的研究[J].中国酿造,2008,(14):29-31.
- [2] FUJITA M,HONG K,ITO Y. Transport of Nattokinase across the rat intestinal tract[J].Biopharm Bull., 1995, 18(9):1194-1196.
- [3] 赵芳芳,张日俊.大豆肽研究进展[J].中国饲料,2004,(1):22-23.
- [4] 李建武,萧能赓,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,2002.
- [5] 丁贵平,蔡正森,王正刚.纳豆激酶的分离纯化及生化研究[J].氨基酸和生物资源,2001,23(3):13-16.
- [6] 张树政.酶制剂工业(下册)[M].北京:科学出版社,2001.
- [7] 谢秋玲,郭勇.纳豆激酶液体发酵条件的优化[J].华南理工大学学报(自然科学版),2005,27(5):127-131.
- [8] 傅利,杨志兴.纳豆激酶的研究与应用[J].生物工程进展,1995,15(5):46-49.
- [9] 彭勇,张义正.豆豉溶栓酶产生菌的筛选及其酶学性质初步研究[J].高技术通讯,2006,12(2):30-34.