

蛹虫草产纤溶酶活性菌株的筛选及产酶条件的研究

白伟芳¹, 郭丽琼^{1,2}, 林俊芳^{1,2}, 康林芝¹, 曾厚儒¹

(1. 华南农业大学食品学院生物工程系, 广东广州 510640) (2. 华南农业大学生物质能研究所, 广东广州 510640)

摘要: 蛹虫草是著名的药用真菌, 具有扩张气管、镇静、抗心律失常、降血压、抗病原微生物、抗恶性肿瘤等多种药理活性。本研究采用蛋白纤维平板法筛选出具有溶纤活性的蛹虫草菌株, 通过综合分析, 选择产纤溶酶比活性最高的菌株, 并对该菌株的产酶条件进行了优化。研究结果显示: 菌株产酶最佳营养条件的组分为 2%葡萄糖, 2%蛋白胨, 碳氮比为 1/1; 最佳环境条件为温度 25 °C, pH 为 6, 装液量 60 mL, 发酵周期 9 d, 接种量 2%, 转速 150 r/min。在此条件下, 发酵液纤溶酶活力可达到 111.85 U/mL。

关键词: 蛹虫草; 纤溶酶; 产酶条件

文章编号: 1673-9078(2013)5-1014-1018

Screening and Fermentation of Fibrinolytic Enzyme-producing Strains from *Cordyceps militaris*

BAI Wei-fang¹, GUO Li-qiong^{1,2}, LIN Jun-fang^{1,2}, KANG Lin-zhi¹, ZENG Hou-ru¹

(1. Department of Bioengineering, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China) (2. Institute of Biomass Research, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Cordyceps militaris* was one of the most popular edible mushrooms. It is a nutritious food source and contains bioactive metabolites with several medicinal effects including anti-tumor, hypocholesterolemic, antioxidant and anti-diabetic activities. In this study, fibrinolytic enzyme-producing strains were screened from *Cordyceps militaris* by plate method and specific activity. The fermentation conditions of the fibrinolytic enzyme producing were investigated. The results showed that the best fermentation medium contained 2% glucose, 2% peptone and 1/1 the ratios of carbon to nitrogen. The optimum fermentation conditions were pH 6.0, the temperature 25 °C, the rotation speed 150 r/min, the fermentation time 9 d, the inoculum size 2% and medium volume 60 mL. Under such conditions, the fibrinolytic enzyme activity was 111.85 U/mL.

Key words: *Cordyceps militaris*; fibrinolytic enzyme; fermentating condition

血栓病是威胁人类健康和寿命最为常见和多发性的疾病, 如冠心病、心肌梗死、脑栓塞等均为血管内形成血栓而造成血管腔狭窄或堵塞, 血流不畅, 致使血管所在脏器和组织发生局部缺血、梗死而引起。这类疾病往往发病率高、急性发作, 危害性大, 死亡率已经超过癌症, 成为人类的“第一健康杀手”^[1]。目前临床治疗血栓性疾病最常用的溶栓剂并不理想: 或特异性较差有毒副作用; 或作用时间短、溶栓能力弱, 需长时间、大剂量使用; 或者生产不易, 物稀价昂^[2~3]。因此迫切需要开发溶栓特异性好, 作用时间长, 生产

收稿日期: 2013-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071837, 30371000), 广东省科技计划项目 (2010A020501001, 2011B090400412, 2012B020316004), 广东省科技攻关重点项目 (2012A020100010)

作者简介: 白伟芳, 博士, 主要从事食品生物技术研究

通讯作者: 林俊芳, 研究员, 博士生导师, 从事生物炼制 (保健功能食品 and 生物制品) 的研究与开发

制备容易、价格低廉的溶栓剂。纤溶酶是一种天然来源的溶栓药物, 它直接降解血块中的纤维蛋白或纤维蛋白酶原的蛋白水解酶, 溶解血栓达到临床治疗的目的^[4]。纤溶酶^[5]可来源于人体 (如尿激酶、组织纤溶酶原激活剂等)、动物 (如蝮蛇抗栓酶^[6]、蚓激酶^[7]等)、微生物^[8]等。其中, 微生物是溶栓剂的重要来源; 从作用机理上微生物来源的溶栓剂可以分成两类: 一类是纤溶酶原激活剂, 如链激酶 (SK)、葡激酶 (Staphylokinase); 另一类是纤溶酶类物质, 主要来源于枯草芽孢杆菌的纳豆激酶 (NK) 以及分别来源于芽孢杆菌、粪链球菌、链霉菌等的纤溶活性物质^[9]。

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又名北虫草^[10], 为麦角菌科的虫草属真菌, 是我国特有的名贵药用真菌, 具有扩张气管、镇静、抗心律失常、降血压、抗病原微生物、抗恶性肿瘤等多种药理活性^[11]。本研究从 7 种蛹虫草菌株中筛选出具有溶栓活性的菌株, 并对其活性较高的菌株进行产酶条件优化, 为研制新型的溶

栓保健品及药品打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*, 以下简称 *C. militaris*): *C. militaris* 01, *C. militaris* 02, *C. militaris* 03, *C. militaris* 04, *C. militaris* 05, *C. militaris* 06, *C. militaris* 07 由华南农业大学食品学院生物炼制实验室保存。

1.2 培养基

母种培养基(固体PDA培养基): 马铃薯块 200 g、葡萄糖 20 g、酵母膏 5 g、 KH_2PO_4 3 g、 MgSO_4 1.5 g、琼脂糖 20 g、水 1000 mL。

发酵基础培养基: 马铃薯汁20%、 KH_2PO_4 0.3%、 MgSO_4 0.15%。

1.3 主要试剂

尿激酶 (Urokinase, 6500 U), 牛血纤维蛋白 (Fibrinogen)、凝血酶 (Thrombin, 1000 U), 均由 sigma 公司提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 纤维蛋白平板的制作

参照郑延斌^[2]的方法略有改动。取 0.04 g 冻干的牛血纤维蛋白原, 溶解在 10 mL 的 pH=7.8 的磷酸盐缓冲液, 在 45 °C 保温 30 min。称取 0.1g 的琼脂粉装入溶解于 10 mL 的 pH=7.8 的磷酸盐缓冲液中, 加热溶解, 待冷却至 50 °C 左右时, 加入牛血纤维蛋白原试管中, 最后加入 0.5 mL 的凝血酶 (10 U/mL), 混匀, 迅速倒入无菌培养皿 (Φ9 cm), 冷却至呈现乳白色后打孔备用 (Φ3 mm)。以尿激酶为标准品得出标准曲线为 $y=1.8x-3.5791$, $R^2=0.991$, 其中 y 为酶活的对数值 $\ln U$, x 为溶菌圈的面积的对数值 $\ln S$ 。

1.4.2 测定发酵液中的蛋白质含量

参照 Bradford^[3]的方法得出标准曲线符合方程 $y=0.0026x-0.0093$, $R^2=0.9926$ 。

$$\text{发酵液中总蛋白含量}(\mu\text{g/mL}) = m \times \frac{1}{0.1} \times V \times \frac{1}{V_1}$$

注: m : 试样吸光度在标准曲线上查得的蛋白质质量 (μg); 0.1: 吸取待测样品的体积 (mL); V : 提取液总体积 (mL); V_1 : 量取的发酵液的体积 (mL)。

1.4.3 蛹虫草发酵培养以及样品粗酶液的制备

从分离到的各菌株取直径 0.5 cm 菌丝块, 接入 PDA 液体培养基, 每个 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 25 °C, 转速 120 r/min, 培养 7 d, 待出现米粒大小菌丝球, 观察菌液为黄色粘稠状得到发酵液。将发酵液在 4 °C, 3500 r/min 离心, 20 min, 收集上清液,

冷冻浓缩后, 定容至 10 mL 的容量瓶。10 μL 的样品注入纤维蛋白平板的小孔内, 37 °C 保温 18 h 后测量透明圈相互垂直的两个直径, 根据标准曲线计算酶活。

1.5 蛹虫草产纤溶酶环境条件的优化

对产纤溶酶条件的 6 个环境因素, 即转速 (r/min)、温度 (°C)、pH 值、装液量 (mL)、发酵时间 (d)、接种量 (%) 分别进行单因素试验, 研究各因素对蛹虫草产酶的影响。

1.6 蛹虫草产纤溶酶营养条件的优化

在发酵基础培养基中, 分别添加 2% 的碳源, 2% 氮源进行最佳碳源与氮源的优化。确定最佳碳源与氮源后再对碳氮比进行研究。

2 结果与分析

2.1 产纤溶酶活性菌株的筛选

由表 1 可见, 本实验选取的 7 个蛹虫草的菌株中, 具有纤溶活性的菌株分别为 *C. militaris* 01, *C. militaris* 05, *C. militaris* 07。从透明圈的直径大小直观分析, 可以看出, *C. militaris* 01 的溶纤能力较强, 为选取产酶活力较优的菌株, 对这三个菌株进行了进一步的研究。

表 1 蛹虫草发酵液纤溶酶活性的测定

Table 1 The fibrinolytic activity of the fermentation liquor of *C.*

| <i>militaris</i> | | |
|------------------------|---------------------------|------|
| 菌株名称 | 透明圈直径/cm | 透明程度 |
| <i>C. militaris</i> 01 | 1.32±0.022 ^a | 半透明 |
| <i>C. militaris</i> 02 | - | 无透明圈 |
| <i>C. militaris</i> 03 | - | 无透明圈 |
| <i>C. militaris</i> 04 | - | 无透明圈 |
| <i>C. militaris</i> 05 | 1.03±0.0208 ^{ab} | 半透明 |
| <i>C. militaris</i> 06 | - | 无透明圈 |
| <i>C. militaris</i> 07 | 0.85±0.014 ^b | 半透明 |

注: “-”表示未检测到活性”。a, b 表示各数据之间的差异显著性。

表 2 发酵液中纤溶酶比酶活的分析

Table 2 The specific activity of the fermentation liquor with

| fibrinolytic activity | | | |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 菌株 | <i>C. militaris</i> 01 | <i>C. militaris</i> 05 | <i>C. militaris</i> 07 |
| 总酶活/(U/mL) | 177.31 | 56.9 | 31.49 |
| 蛋白质浓度/($\mu\text{g/mL}$) | 68.57 | 112.81 | 37.42 |
| 比酶活/(U/ μg) | 2.58 ^a | 0.51 ^c | 0.84 ^b |

注: a, b, c 表示各数据之间的差异显著性, 下同。

根据表 1 的结果,对三种菌株的纤溶酶活力进行比酶活的分析。根据尿激酶活力标准曲线可以计算出蛹虫草蛋白质提取物的相对尿激酶活力。利用公式:蛋白质比活力=相对尿激酶活力(U/mL)/蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$),计算出蛋白质比活力。由表 2 可知,*C. militaris* 01 的比酶活最高,为 2.58 U/ μg ,因此,本实验选取 *C. militaris* 01 作为实验菌株。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 温度对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

本实验共设计了 20、25、30、37 $^{\circ}\text{C}$ 四个不同的温度发酵 7 d 后,检测纤溶酶活力。

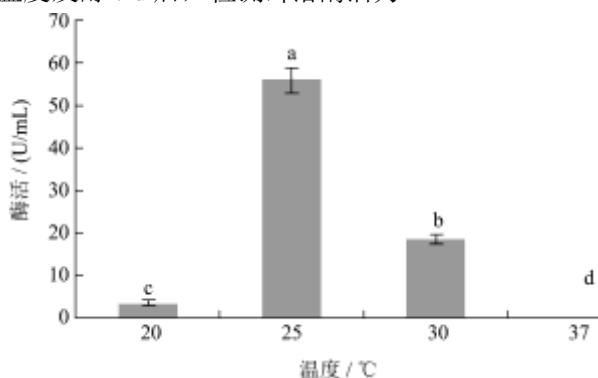


图 1 不同温度对 *C. militaris* 01 纤溶酶活力的影响

Fig.1 The effect of temperature on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

由图 1 可知,四个温度对产酶活力的影响差异显著。当培养条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌丝生长速度最快,且酶的活性最高为 55.9579 U/mL,优势明显;培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌丝停止生长。因此,选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 为发酵温度。

2.2.2 pH 值对蛹虫草产纤溶酶条件的的影响

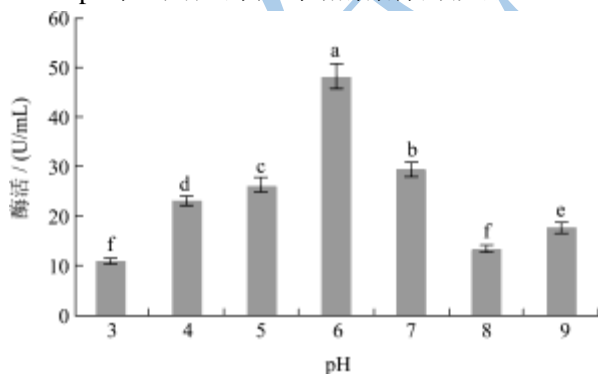


图 2 pH 值对 *C. militaris* 01 产纤溶酶条件的的影响

Fig.2 The effect of pH on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

由图 2 可以看出,pH 值对蛹虫草产酶活力的影响差异显著。当培养基初始 pH 值为 6 时,纤溶酶活性较高为 48.0936 U/mL。过高或过低的 pH 值都将降低菌丝生长过程中的酶活力,导致新陈代谢的减缓。同

时这也与蛹虫草菌丝最适生长 pH 值相符合。

2.2.3 装液量对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

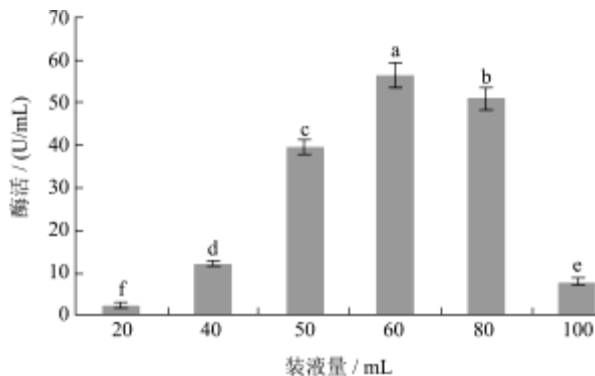


图 3 装液量对 *C. militaris* 01 产纤溶酶条件的的影响

Fig.3 The effect of medium volume on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

由图 3 可得知,不同的装液量之间对纤溶酶活力的影响差异显著,装液量为 60 mL 时,产纤溶酶活性最高为 56.5397 U/mL,此条件下菌丝获得的氧气和营养物质较为合适,利于菌丝生长。装液量过多会造成氧气缺乏,这容易造成菌球中心的菌丝缺乏氧气和营养物质,影响菌丝生长和正常代谢。

2.2.4 发酵时间对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

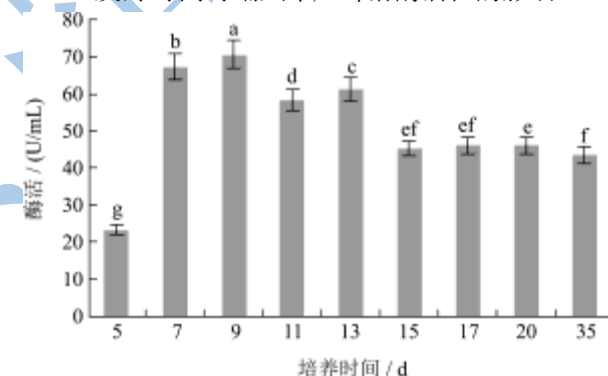


图 4 发酵时间对 *C. militaris* 01 产纤溶酶活性的影响

Fig.4 The effect of fermented time on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

由图 4 可见,发酵周期为 9 d 的酶活性最高,为 70.69 U/mL,其次是发酵了 11 d 的酶活性。发酵时间过短或过长的条件下酶活性不高,菌丝在第 9 d 时达到生长高峰,随后由于菌丝发生自溶等原因,菌体进入衰退期,从而降低了产酶量。

2.2.5 接种量对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

本实验研究了 5 个接种量条件(1%、2%、3%、4%和 5%)对蛹虫草产纤溶酶条件的的影响。结果如图 5 所示,不同的接种量对纤溶酶活性的影响差异显著。接种量为 2% 时,酶活最高为 93.2974 U/mL。接种量过低,菌体生长缓慢;接种量过大,菌体生长过快,培养液黏度增加,溶氧不足,影响产物的合成。

2.2.6 转速对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

本实验研究了5个摇床转速(90、120、150、180、200 r/min)对蛹虫草产酶活性的影响。

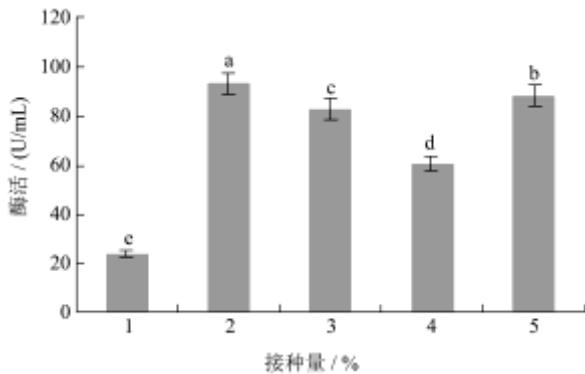


图5 接种量对 *C. militaris* 01 产纤溶酶活性的影响

Fig.5 The effect of inoculum size on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

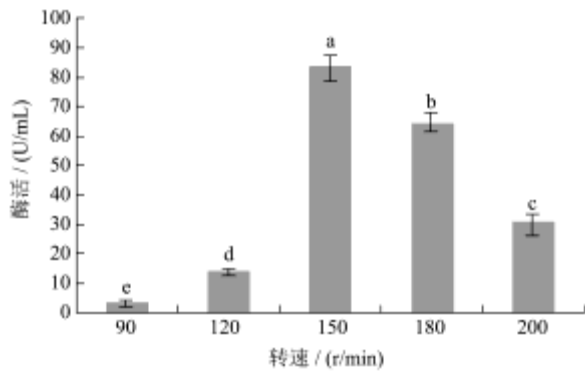


图6 转速对 *C. militaris* 01 产纤溶酶活性的影响

Fig.6 The effect of shaking speed on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

由图6可知,摇床转速对纤溶酶活力影响的差异显著。摇床的转数过高或者过低均不利于溶氧,当摇床转速为150 r/min时,纤溶酶活性最高,为83.26 U/mL。

2.3 营养条件的优化

2.3.1 碳源对蛹虫草产纤溶酶条件的影响

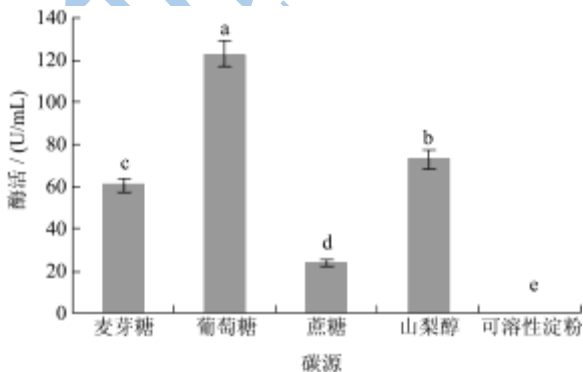


图7 碳源对 *C. militaris* 01 产纤溶酶活力的影响

Fig.7 The effect of carbon sources on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

本实验考察了5种不同的碳源对蛹虫草产纤溶酶活性的影响。结果如图7所示,碳源对纤溶酶活力的影响差异显著。5种碳源中产酶效果最佳的是葡萄糖,酶活可达122.59 U/mL。可溶性淀粉的酶活为0,因此可以推断,蛹虫草可以很好的利用单糖促进菌丝生长,从而提高代谢产物的量,而对大分子的多糖的利用能力较弱。

2.3.2 氮源对蛹虫草产纤溶酶条件的影响

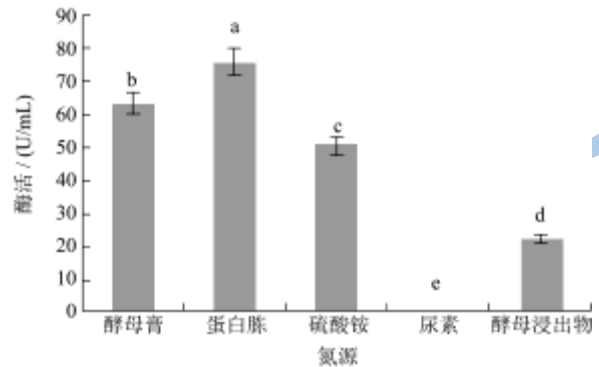


图8 氮源对 *C. militaris* 01 产纤溶酶条件的影响

Fig.8 The effect of nitrogen sources on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

氮是合成食用菌细胞壁、蛋白质以及核酸等重要的物质原料。由图8可以看出,氮源对纤溶酶活力的影响差异显著。当蛋白胨作为氮源时,蛹虫草产纤溶酶的活性是最高的,达到75.7513 U/mL。这可能是由于蛋白胨是有机氮的化合物,同时也含有一些维生素和糖类,因此有利于蛹虫草菌丝的生长,且为蛋白胨的合成提供了丰富的氮源。而以尿素为氮源时,蛹虫草菌丝无法正常正长,合成的纤溶酶也比较少,因此,无法检测到纤溶酶活。

2.3.3 最佳生长碳氮比对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

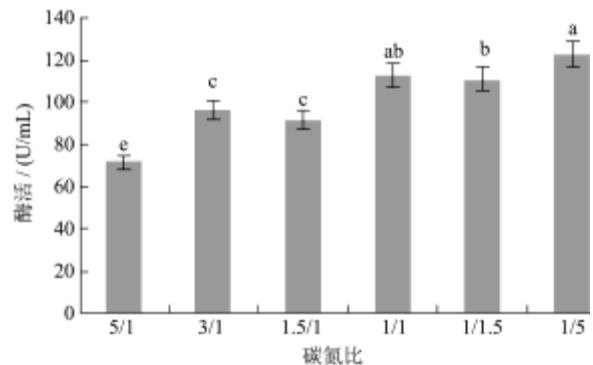


图9 不同碳氮比 *C. militaris* 01 对产纤溶酶活性的影响

Fig.9 The effect of C/N on fibrinolytic enzyme production of *C. militaris* 01

碳氮比还会直接影响菌丝按比例地吸收营养物质,从而影响到菌丝的生长和产物的形成。本实验以葡萄糖为碳源,蛋白胨为氮源,设计了6个水平的碳

氮比,结果如图9所示,随着碳氮比的降低,蛹虫草产纤溶酶的活性逐渐增加。当碳氮比为1/5时,达到最大值,为121.88 U/mL。当碳氮比为1/1时,酶活为111.85 U/mL,与碳氮比为1/5时有差异,但是显著。因此,综合考虑到成本以及酶活力,选择1/1为最佳碳氮比组合。

3 结论

3.1 本实验从营养成分和培养环境条件两方面考虑,对蛹虫草产酶条件进行了较为全面的分析与优化,结果表明以葡萄糖为碳源,蛋白胨为氮源,其碳氮比为1/1,温度25℃,pH为6,装液量60 mL,发酵周期9 d,接种量2%,转速150 r/min,优化后的酶活可达到111.85 U/mL,明显优于王磊^[8]、崔莉^[9]等人的研究结果。

3.2 引起酶活差异的原因可能有以下几个方面:1)菌种差异;2)由于菌株分解酶的强弱能力不同,因此对碳源及氮源利用能力也有所不同,因此,不同的菌株适合的碳源与氮源也不同;3)本实验中添加了马铃薯汁可能存在某种生长因子也会促进菌丝生长与代谢。

3.3 我国食用菌消费量日益增长,但在医药保健品方面开发利用程度依旧低,随着生活水平的提高,人们对健康追求更加注重,所以研究从食用菌中提取出纤溶酶对溶栓研究有重要的意义。

参考文献

- [1] 杜冰,姚汝华.血栓溶酶研究进展[J].广东药学院学报,2000,16(4):291-294
- [2] 黄炳辉,陈春麟.临床溶栓药物UK与SK生化、药理和临床应用比较[J].生化药物杂志,1990,2:19
- [3] J Emeis, J H Verheijen. Progress in clinical fibrinolysis [J]. Fibrinolysis & Proteolysis, 1997, 11(2): 67
- [4] 贾楠,牟光庆.纤溶酶分离纯化的研究进展[J].食品科技,2007,4:1-3
- [5] 汪世华,胡开辉,沙莉,等.溶栓酶的研究与开发[J].现代食品科技,2006,22(1):174-176
- [6] Alexopoulos C J, Blackwell M, Mims C W. Introductory mycology [M]. Beijing: China Agriculture Publishing Press, 2002
- [7] Nikai T, Mori N, Kishida M, et al. Isolation and Biochemical Characterization of Hemorrhagic Toxin from the Venom of *Crotalus atrox* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1984, 231: 309-319
- [8] Jeon O H, Moon W J, Kim D S. An anticoagulant fibrinolytic protease from *Lumbricus rubellus* [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 28: 138-142
- [9] Jeong Y K, Park J U, Baek H, et al. Purification and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 89-92
- [10] 陈俐彤,曹红锋,黄文芳.蛹虫草的化学成分、药效及应用[J].现代食品科技,2005,21(3):192-197
- [11] 张显科,刘文霞.蛹虫草化学成分测定[J].菌物系统,1997,16(1):78-83
- [12] 郑延斌,路福平,杜连祥.中国根霉12#纤溶酶活力单位的测定[J].氨基酸和生物资源,2000,22(1):45-47
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye-binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 1972: 248-254
- [14] 邹和昌.溶栓剂的发展及研究.中国药学杂志[J].1997,32(5):263-267
- [15] Chang Won Kho, Sung Goo Park, Sayeon Cho, et al. Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis* [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39:1-7
- [16] 高占争.微生物产纤溶酶的研究[D].无锡:江南大学硕士论文,2006
- [17] 赵洪,何执中.溶栓药物研究进展.中国生化药物杂志[J].2003,24(1):51-53
- [18] 王磊,宿红艳,陈维.蛹虫草纤溶酶液体发酵条件的优化[J].新乡学院学报:自然科学版,2010,27(6):47-49
- [19] 崔莉.蛹虫草纤溶酶分离纯化、酶学性质及溶栓抗栓作用研究[D].南京:南京农业大学,2008