

# 单曲霉菌与混合曲霉菌发酵对 纤溶酶活性的影响

周媛媛<sup>1</sup>, 孙楚<sup>2</sup>, 李永平<sup>3</sup>, 刘晓玲<sup>4</sup>, 李秋<sup>1</sup>, 吴非<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学经管学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

3. 黑龙江粮食职业学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

4. 黑龙江省质量监督检测研究院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**以三株经过筛选诱变得到的纤溶酶高产突变株作为实验菌株,以大豆为原料,选取诱变后纤溶酶活性较大的黑曲霉3.4309进行单因素实验,以纤溶酶活性为指标,确定其产纤溶酶活性的最适发酵温度为30℃、接种量为10%、料水比0.6mL/g、装料量20g/250mL、pH5.5,发酵72h纤溶酶活性达到1.16TAME U/mL。在此条件下,运用混料设计确定最适的混菌接入量为黑曲霉3.4309添加4.3%、米曲霉3.800添加2.1%、米曲霉3.5232添加3.6%,72h发酵纤溶酶活性最大达到1.311TAME U/mL,比最优条件下单菌发酵纤溶酶活性高13%。

**关键词:**大豆,单霉菌发酵,混合霉菌发酵,纤溶酶活性

## Effect of single and mixed moulds fermentation methods on fibrinolytic activity

ZHOU Yuan-yuan<sup>1</sup>, SUN Chu<sup>2</sup>, LI Yong-ping<sup>3</sup>, LIU Xiao-ling<sup>4</sup>, LI Qiu<sup>1</sup>, WU Fei<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Institute of economic management, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. Heilongjiang Grain Vocational College, Harbin 150030, China;

4. Institute of Quality supervision and Inspection, Heilongjiang province, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Three screened and mutagenesised species of moulds was selected as trial strains, and were cultured in soybeans. *Aspergillus niger* 3.4309 was used to do single factor test for its higher fibrinolytic activity, using fibrinolytic activity as index, determine its optimum fermentation temperature was 30℃, inoculation amount was 10%, the ratio of water was 0.6mL/g, loading capacity was 20g/250mL, the optimum pH was 5.5. Under these optimum conditons, the fibrinolytic activity could reach 1.16 TAME U/mL. Then used the mixture design method to determin the optimum mixed inoculation amount was: *Aspergillus niger* 3.4309 4.3% added, *Aspergillus oryzae* 3.800 2.1% added and *Aspergillus oryzae* 3.6% added. In this way, the fibrinolytic activity could reach 1.311 TAME U/mL, 13% higher than fibrinolytic activity of single mould fermentation.

**Key words:** soybean; single moulds fermentation; mixed moulds fermentation; fibrinolytic activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)08-0161-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.028

血栓病是涉及到血液和循环系统的一种疾病,严重危害人类健康,是对死亡威胁最大的疾病之一<sup>[1]</sup>。溶栓治疗即利用纤溶酶水解纤维蛋白原和纤维蛋白,使非纤维蛋白转变为可溶性碎片的过程,是治疗血栓性疾病安全有效的手段<sup>[2]</sup>。目前,国内外已正式批准的临床溶栓药物有尿激酶、链激酶<sup>[3]</sup>等,但这些药物尽管溶栓效果好,却还存在许多缺点且不能口

服。因此,寻找安全有效、无毒副作用<sup>[4-5]</sup>、服用方便的新型溶栓剂或溶栓保健食品具有重要意义。

具有溶栓作用的纤溶酶是一种蛋白酶,微生物以大豆为基质发酵能产生纤溶酶,是因为大豆中蛋白质含量高,结构复杂,导致其生长环境中存在和纤维蛋白结构类似或一致的诱导物。国际上,对于传统豆制品来源纤溶酶的发现最早开始于1987年日本学者从纳豆中分离出了纳豆激酶<sup>[6]</sup>,国内报道的产纤溶酶霉菌有根霉<sup>[7]</sup>、脉孢霉<sup>[8]</sup>和米曲霉<sup>[9]</sup>,本研究以大豆为原料,以经过筛选诱变的黑曲霉和米曲霉为实验菌株,采用固态发酵法应用混料设计确定最适的混菌接入比例,并分别对单菌、混菌发酵条件优化研

收稿日期: 2013-08-19 \* 通讯联系人

作者简介: 周媛媛(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:粮食、油脂与植物蛋白工程。

基金项目: 黑龙江省应用技术研究及开发计划项目(GC13B213)。

究进行比较。虽然目前对于微生物法产纤溶酶的研究较多,但是大多数都是通过单菌株发酵条件的优化提高酶活,而混菌发酵产纤溶酶的研究很少,本研究即是想通过寻找一种新的发酵方式,即混菌发酵来提高酶活,预实验表明同时接种发酵,产酶活性较高。其结果可应用于食品加工,为新型溶栓保健食品的开发,及纤溶酶的提取纯化以开发口服药提供基础,也为大豆的综合利用提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑曲霉3.4309、米曲霉3.800、米曲霉3.5232 均由东北农业大学实验室提供,经紫外、微波诱变后纤溶酶活力分别为0.737、0.721、0.686TAME U/mL;大豆培养基 取大豆加水浸泡6~8h,沥干后置于锅内煮熟,将煮熟的大豆碾碎,为霉菌的发酵基质;对甲基苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME) Sigma公司;变色酸、硫酸、甲醇等试剂 均为分析纯。

高压湿热灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗器械厂;722可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;振荡培养箱 常州国华电器有限公司;超净工作台 北京安泰科技有限公司;pHS-25型pH计 上海精科雷磁仪器厂;JD500-2型分析天平 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司;高速离心机 上海珂准仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 霉菌菌株活化 选取诱变后纤溶酶活性最高的黑曲霉3.4309作为实验菌株。从冻存管中取300 $\mu$ L菌液分别接入10mL PDA液体培养基中,30 $^{\circ}$ C下活化培养72h,然后分别吸取1.5mL菌液于50mL PDA培养基中,30 $^{\circ}$ C下活化培养60h,再分别吸取3mL菌液于100mL PDA培养基中,30 $^{\circ}$ C下活化培养54h待用。

1.2.2 纤溶酶活性的测定 纤溶酶能够特异地催化TAME的分解,用TAME底物法来测定纤溶酶的酶活性<sup>[10-11]</sup>。活性单位TAME U/mL是指每毫升发酵液催化TAME分解的单位数量,即每毫升发酵液的纤溶酶活性。

1.2.3 单霉菌发酵大豆产纤溶酶培养条件的优化 选取诱变处理后,纤溶酶活性最大的黑曲霉3.4309作为实验菌株。通过单因素实验,确定发酵温度、料水比、菌种添加量、装料量以及培养基初始pH对单霉菌发酵大豆产纤溶酶活性的影响。

1.2.3.1 发酵温度对纤溶酶活性的影响 在菌种添加量为10%的条件下,用黑曲霉3.4309发酵大豆,设定发酵温度分别为26、28、30、32、34 $^{\circ}$ C,在此条件下发酵72h,比色法测发酵液的纤溶酶活性,确定最佳发酵温度。

1.2.3.2 料水比对纤溶酶活性的影响 在菌种添加量为10%、发酵温度30 $^{\circ}$ C的条件下,分别向培养基中按0.2、0.4、0.6、0.8、1mL/g的量加入水,用黑曲霉3.4309发酵72h,比色法测发酵液的纤溶酶活性,确定最佳料水比。

1.2.3.3 菌种添加量对纤溶酶活性的影响 以黑曲

霉3.4309发酵大豆,在发酵温度30 $^{\circ}$ C,菌种的添加量分别为4%、6%、8%、10%、12%的条件下发酵72h,比色法测定发酵液中纤溶酶活性,确定最佳菌种添加量。

1.2.3.4 装料量对纤溶酶活性的影响 分别向250mL三角瓶中加入15、20、25、30g培养基,30 $^{\circ}$ C以黑曲霉3.4309添加量为10%发酵72h,比色法测定发酵液中纤溶酶活性,确定最佳装料量。

1.2.3.5 培养基初始pH对纤溶酶活性的影响 调节培养基的初始pH分别为4、4.5、5、5.5、6、7。30 $^{\circ}$ C以黑曲霉3.4309添加量为10%发酵72h,比色法测定发酵液中纤溶酶活性,确定培养基最佳初始pH。

1.2.4 混合霉菌发酵大豆产纤溶酶培养条件的优化 根据以上实验,以发酵温度30 $^{\circ}$ C,发酵时间72h,菌种添加量10%为固定值,采用混料实验设计<sup>[12-13]</sup>,混合霉菌发酵大豆,以A(黑曲霉3.4309添加量)、B(米曲霉3.800添加量)、C(米曲霉3.5232添加量)分别表示自变量,以纤溶酶活性为因变量,确定因素水平编码表如表1所示。

实验采用混料设计中的Simplex Centroid方法,应用Design-Expert软件进行分析,编码设置是系统自动生成的。实际生产中将百分比换算成L或g是可以达到的。

表1 因素水平编码表

Table 1 Encode table of factors and levels

编码水平	因素		
	A 黑曲霉 3.4309(%)	B 米曲霉 3.800(%)	C 米曲霉 3.5232(%)
0	0	0	0
0.167	1.67	1.67	1.67
0.333	3.33	3.33	3.33
0.5	5	5	5
0.667	6.67	6.67	6.67
1	10	10	10

1.2.5 验证实验 通过运用混料实验设计研究混菌不同配比参数对纤溶酶活性的影响,得到产纤溶酶活性的最优菌株配比值。考察最优混合菌配比参数工艺条件下,进行3次验证实验取平均值。对比最优混合菌配比条件下得到的验证值与预测值之间的标准偏差是否在合理范围内。

1.2.6 单霉菌与混合霉菌复合发酵对纤溶酶活性的影响 在分别确定单霉菌、混合霉菌最优发酵条件的基础上,分别在最优条件下进行发酵,测定产酶曲线,对比纤溶酶活性差异。

1.2.7 统计分析 单因素实验采用Microsoft Excel 2003进行数据处理,每组实验均做3组检测;混料设计采用Design Expert进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单霉菌发酵产纤溶酶条件的优化结果

2.1.1 发酵温度对单菌发酵纤溶酶活性的影响 由图1可知,发酵温度对纤溶酶活性影响的结果可知,

温度对纤溶酶活性的影响较大,当温度在28~30℃时,纤溶酶活性随着温度的升高而逐渐增大,30℃时发酵液纤溶酶活性最高,为0.965TAME U/mL,随后酶活逐渐降低,这与闵伟红等的研究结论一致<sup>[14]</sup>。

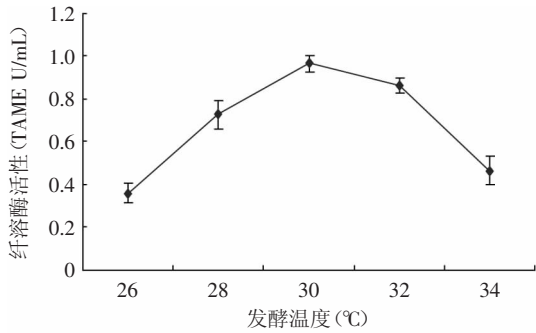


图1 温度对单菌发酵纤溶酶活性的影响

Fig.1 The influence of temperature to fibrinolytic activity

2.1.2 料水比对单菌发酵纤溶酶活性的影响 由图2可知,培养基的水分含量不同,纤溶酶活性大小也不相同。水分含量低时,霉菌菌丝生长不旺盛,产酶量低;水分含量高时,不利于通风,菌体生长不够旺盛,也不利于产酶。当料水比为0.6mL/g时为最优,此时纤溶酶活性达到0.864TAME U/mL。

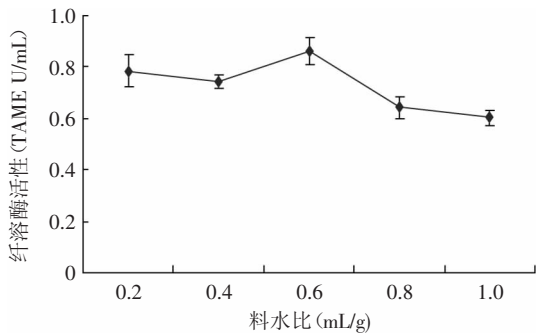


图2 料水比对单菌发酵纤溶酶活性的影响

Fig.2 The influence of water ratio to fibrinolytic activity

2.1.3 接种量对单菌发酵纤溶酶活性的影响 由图3可知,随着接种量的逐渐增加,菌群生长加快,大豆培养基的营养物质得到充分利用,纤溶酶活性逐渐升高。当接入10%的菌液时,纤溶酶活性最大达到

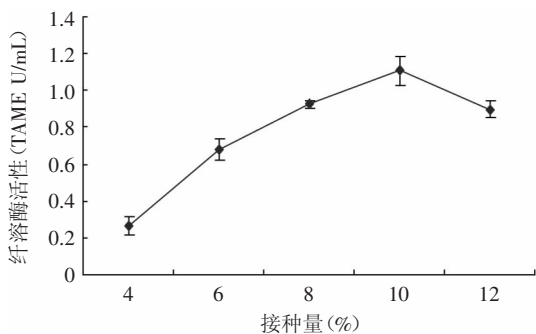


图3 接种量对单菌发酵纤溶酶活性的影响

Fig.3 The influence of adding amount of strains to fibrinolytic activity

1.116TAME U/mL。接种量继续增加,菌体生长过快,培养基黏性大,溶氧不足,影响菌株代谢产酶,纤溶酶活性降低。

2.1.4 装料量对单菌发酵纤溶酶活性的影响 图4为装料量对纤溶酶活性的影响,不同的装料量通过影响菌株的通气量,从而影响菌株的生长代谢。由图4可知,装料量为20g/250mL为宜,此时,纤溶酶活性最大为0.912TAME U/mL。

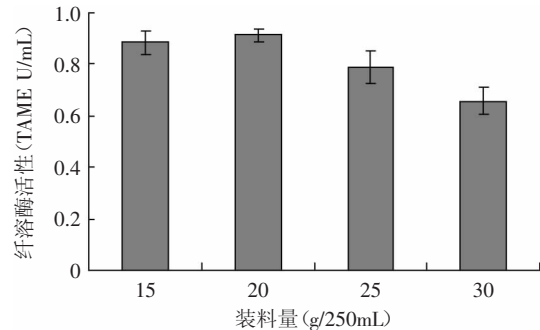


图4 装料量对单菌发酵纤溶酶活性的影响

Fig.4 The influence of loading capacity to fibrinolytic activity

2.1.5 培养基pH对单菌发酵纤溶酶活性的影响 图5为培养基初始pH对纤溶酶活性的影响,由图5可知,在大豆培养基的自然pH范围5~5.5范围内纤溶酶活性较大,当pH为5.5时,纤溶酶活性最大达到0.806TAME U/mL。因此,pH5.5为该菌株生长和生产纤溶酶的最佳初始pH,这与杨雪佳等<sup>[15]</sup>的研究结论一致。

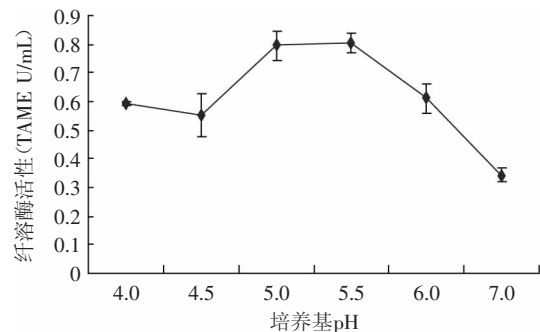


图5 培养基pH对单菌发酵纤溶酶活性的影响

Fig.5 The influence of pH to fibrinolytic activity

## 2.2 混合霉菌发酵大豆产纤溶酶培养条件的优化

2.2.1 混合霉菌发酵大豆对纤溶酶活性的影响 以黑曲霉3.4309添加量A(%)、米曲霉3.800添加量B(%)和米曲霉3.5232添加量C(%)分别代表的因素为自变量,以纤溶酶活性R为因变量,实验设计与数据处理采用统计软件Design-Expert来完成,实验设计及结果见表2。

通过统计分析软件Design-Expert进行数据分析,建立纤溶酶活性R回归模型如下:纤溶酶活性 $R=1.09A+0.95B+1.08C-0.14AB+0.10AC-0.57BC+9.93ABC$ 。采用Design-Expert软件对纤溶酶活性R模型方程进行方差分析,结果见表3。

表2 实验安排及结果

Table 2 Experiment plan and results

实验号	A	B	C	纤溶酶活性(TAME U/mL)
1	10	0	0	1.040
2	0.167	0.667	0.167	1.150
3	1	0	0	1.126
4	0.5	0	0.5	1.110
5	0.5	0.5	0	0.960
6	0.333	0.333	0.333	1.301
7	0	0	1	1.070
8	0.167	0.167	0.667	1.159
9	0	1	0	0.964
10	0	1	0	0.931
11	0.5	0.5	0	0.988
12	0.667	0.167	0.167	1.307
13	0	0.5	0.5	0.881
14	0	0	1	1.113

单一项都显著,表中只显示了交互项的显著性分析,未显示单一项。由表3可知,该模型回归显著( $p < 0.05$ ),失拟项不显著( $p > 0.05$ ),并且该模 $R^2=92.20\%$ ,说明该模型能很好地拟合该实验。通过 $F$ 值和 $p$ 值可知交互项之间的相互作用对纤溶酶活性 $R$ 影响显著性关系为:ABC>BC>AB>AC,也就是说黑曲霉3.4309添加量、米曲霉3.800添加量和米曲霉3.5232添加量三种菌株之间的交互作用比其中任意两种菌株之间

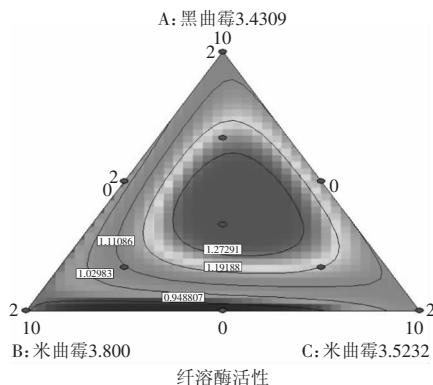


图6 混料设计因素交互项对纤溶酶活性的等高线分析  
Fig.6 Contours analysis for mixture design factor interaction to fibrinolytic activity

的交互作用对纤溶酶活性的影响显著,说明三种菌株的混合发酵对产品纤溶酶活性的影响较大。交互项对纤溶酶活性的等高线分析见图6。

由图6可以看出,A、B、C交互作用对纤溶酶活性的影响。三种菌株以一定的比例混合时的纤溶酶活性大小优于任意两种菌株混合的纤溶酶活性值,只有当三种菌株以一定的比例混合时,纤溶酶活性有较大值,这与方差分析的结果一致。

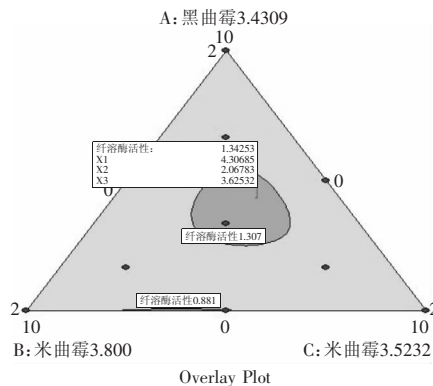


图7 混菌比例对纤溶酶活性的混料设计优化结果  
Fig.7 Mixing design optimization results of ratio of three moulds to fibrinolytic activity

图7为霉菌菌株混合发酵对纤溶酶活性的混料设计优化结果。由图7可知,黑曲霉3.4309、米曲霉3.800和米曲霉3.5232添加量分别为4.3%、2.1%和3.6%时,纤溶酶活性有最大值为1.343TAME U/mL。因此,当黑曲霉3.4309、米曲霉3.800和米曲霉3.5232分别接种4.3%、2.1%和3.6%时,发酵液的纤溶酶活性较高。

2.2.2 验证实验 为了验证模型预测的准确性,在最优混菌培养条件下,即黑曲霉3.4309、米曲霉3.800、米曲霉3.5232添加量分别为4.3%、2.1%、3.6%,重复进行3次平行实验,3次平行实验纤溶酶活性的平均值为1.320与预测值1.343较接近。说明响应值的实验值与回归方程预测值吻合良好。最终确定最适产纤溶酶的混合菌株添加量分别为:黑曲霉3.4309添加4.3%、米曲霉3.800添加2.1%、米曲霉3.5232添加3.6%。

### 2.3 单霉菌与混合霉菌复合发酵对纤溶酶活性的影响

根据以上实验结果,分别在最优产纤溶酶条件

表3 回归方程的方差分析结果

Table 3 Regression equation of the results of variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	p	
AB	1	1.532E-003	1.532E-003	0.64	0.4526	-
AC	1	5.642E-004	5.642E-004	0.24	0.6426	-
BC	1	0.017	0.017	7.06	0.0326	-
ABC	1	0.11	0.11	44.45	<0.0004	-
回归	6	0.20	0.033	13.79	<0.002	显著
剩余	7	0.017	2.400E-003	-	-	-
失拟	3	0.011	3.747E-003	2.70	0.1810	不显著
总和	13	0.22	-	-	-	-

下分别进行单菌、混菌发酵,测定发酵液的纤溶酶活性。结果如图8所示。

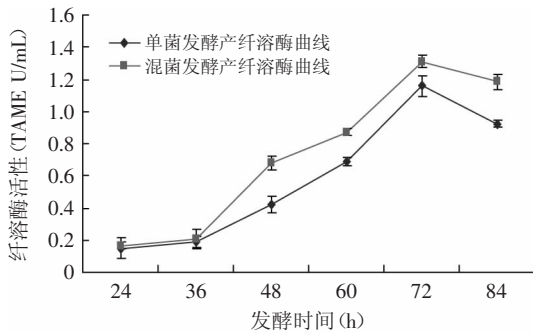


图8 对比不同发酵方式在最优条件下的产纤溶酶曲线  
Fig.8 Comparing the influence of different fermentation to plasmin curve under optimal conditons

由图8看出,由三种霉菌混合发酵与单霉菌发酵相比,纤溶酶活性有显著提高。分析可能是由于不同微生物发酵产生的纤溶酶分子量大小、结构、酶切位点均有差别,故三种霉菌混合发酵可以弥补相互间产酶的差异,产生多种不同的纤溶酶,充分发挥各酶间的协同作用,大幅度提高酶活性及产量。因此,混菌发酵比单菌发酵酶活性及产量要高。由图8可知,发酵24h,霉菌处于迟缓期,两种发酵方式产生的纤溶酶均较少,随着时间延长,菌株进入对数期和稳定期,此阶段酶活力显著提高而稳定,代谢旺盛。发酵至72h,两种发酵方式产纤溶酶活性分别达到最大,混菌发酵产纤溶酶活性为1.311TAME U/mL,单菌发酵产纤溶酶活性为1.16TAME U/mL,混菌发酵较单菌发酵方式产纤溶酶活性高13%。由此可知,混合霉菌发酵产纤溶酶优于单菌株发酵。

### 3 结论

由单霉菌发酵大豆产纤溶酶的优化结果可知:在接种量为10%、发酵温度为30℃、料水比为0.6mL/g,装料量为20g/250mL,培养基初始pH5.5时,纤溶酶活性最大,发酵72h达到1.16TAME U/mL;在相同条件下,利用混料设计优化得到的最适混合霉菌培养接菌量即黑曲霉3.4309添加4.3%、米曲霉3.800添加2.1%、米曲霉3.5232添加3.6%时,发酵72h,最终发酵液纤溶酶活性达到1.311TAME U/mL,高于任何一种单霉菌发酵时的纤溶酶活性。即混合霉菌发酵大豆

时纤溶酶活性得到了提高,此种发酵方式的发现为进一步纤溶酶的提取及高纤溶活性食品的开发提供了基础。

### 参考文献

- [1] 迟东升,阮新民. 新型溶栓剂--纳豆激酶[J]. 心血管病学进展,2007,28(4):545-550.
- [2] 王光利. 芽孢杆菌纤溶酶的纯化、性质及其发酵条件的研究[D]. 重庆:西南农业大学,2001.
- [3] SOSAKI K M, HATSUCKA N, TOKIETAL. Fibrinolytic and coagulation activity level during formation of experimental thrombus in dog's saphena vein[J]. Life Science,1960,77:1659.
- [4] SUMI H, HANMADA H, NAKANISHI H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase[J]. Acta Hamatol,1990,84(3):139-143.
- [5] MITSUGU F, KYOUGSU H, YAE I. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract[M]. Biol Pharm Bull,1995(9):1194-1196.
- [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[J]. Experientia,1987,43(20):1110-1111.
- [7] Liu xiao-lan, Du Lian-xiang. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12[J]. Microbiol Biotechnol,2005,67:209-214.
- [8] 许爱清,刘晓兰. 脉孢霉发酵豆渣产纤溶酶研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(1):77-79.
- [9] 高占争,赵允麟. 酱油曲中产纤溶酶微生物的分离筛选和初步鉴定[J]. 食品与药品,2006(1):61-63.
- [10] 李剑梅,苗玉琨,李鑫. TAME法对康脂口服液液中蚓激酶单位效价的测定[J]. 微生物学杂志,2001,21(3):61-62.
- [11] 王怡鑫,尹宗宁,张霞. 纳豆激酶体外活性测定及影响因素考察[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(3):168-171.
- [12] 童华荣,龚正礼. 茶叶拼配的混料设计研究[J]. 茶叶科学,2004,24(3):207-211.
- [13] 刘春光,周建斌,陈竹君. 混料实验设计在肥料配比研究中的应用[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(1):59-62.
- [14] 闵伟红,李佳,王影,等. 高产纤溶酶霉菌固体发酵工艺条件的优化[J]. 食品科学,2008,29(1):207-211.
- [15] 杨雪佳,曾志,路福平,等. 大豆为原料的根霉纤溶酶固态发酵工艺条件[J]. 天津科技大学学报,2006,21(4):51-54.

(上接第152页)

白成胶性的影响[D]. 南京:南京农业大学,2005.

[10] Hashimoto K, Watabe S, Kono M, et al. Muscle protein composition of sardine and mackerel[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,1979,45:1435-1441.

[11] 西元淳一,鈴木英昌. サメ肉すり身加熱中における伝熱とゲル強度について[J]. 水産ねり製品技術研究会誌,1989(9):537-544.

[12] Zayas, Joseph F. functionality of proteins in foods[M]. USA: Dept.of Foods and Nutrition,1997:310-320.

[13] Gossett P W, Rizvi, Baker R C. Quantitative Analysis of Gelation in Egg Protein System[J]. Food Technology,1984,38(5):67-96.

[14] 杨芳,潘思轶. 大豆蛋白凝胶复合体系水分状态的研究进展[J]. 食品科学,2008,29(10):680-684.