

# 脉孢霉发酵豆渣产纤溶酶研究

许爱清<sup>1,2</sup>, 刘晓兰<sup>2</sup>

1(湖南科技大学生命科学学院, 湖南湘潭, 411201) 2(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔, 161006)

**摘要** 以好食脉孢霉为产纤溶酶菌种, 选用廉价物料新鲜豆渣和麸皮为初始发酵底物(15g(干重)/500 mL三角瓶), 试验确定发酵培养基的组成是: 豆渣: 麸皮(4:1)+CaCl<sub>2</sub>(0.75%)+FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.045%)。每瓶培养基接种 $3.4 \times 10^5$ 个孢子, 在28℃恒温箱培养48h, 然后用生理盐水(100 mL/瓶)浸提4~6 h。摇瓶优化后的酶产量约为220 U/g, 浅盘发酵放大结果为330 U/g, 10倍于初始产量。

**关键词** 豆渣, 脉孢霉, 固体发酵, 纤溶酶

纤溶酶是酶解血纤维蛋白, 促使血栓疾病中血栓再通的重要药物。目前, 以黄豆、豆豉、豆饼酱为主要原料寻找纤溶酶资源的研究较多<sup>[1]</sup>, 而对豆渣产纤溶酶的开发研究较为少见。豆渣是大豆制品生产时的剩余物, 具有丰富的营养<sup>[2]</sup>, 可以作为微生物生长的良好基质。本文主要研究了好食脉孢霉利用以豆渣为主要原料的培养基的组成和发酵控制条件, 研究结果为豆渣的综合利用提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1.1 菌种

好食脉孢霉(*Neurospora sitophila*), 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院保藏。

### 1.1.2 试剂

新鲜豆渣、麸皮: 市售; 牛血纤维蛋白原: 中国医学科学院血液研究所; 牛凝血酶, 中国医学科学院血研所科技公司; 注射用尿激酶, 南京大学制药厂; 琼脂糖, 天象人生物工程有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

### 1.1.3 固体发酵初始培养基

新鲜豆渣(含水量80%)与麸皮(过16~20目筛)按一定比例混匀, 加水适量, 以用手抓起成团, 按之散开为度, 500 mL三角瓶中盛装培养基15 g(折合干重), pH自然, 121℃灭菌30 min。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 纤溶酶活力检测

菌种接入固体初始培养基发酵后, 用100 mL生理盐水浸提每瓶发酵物并静置4 h, 采用双层纱布过滤去除固体基质, 滤液经 $10\,000 \times g$  10 min离心, 取

上清液, 适当稀释, 血纤维蛋白平板<sup>[3]</sup>法测定粗酶液酶活力。

### 1.2.2 固体发酵条件

#### 1.2.2.1 基质中豆渣含量对产酶的影响

豆渣与麸皮分别按干重比为9:1, 4:1, 7:3, 6:4, 1:1混匀配制固体发酵培养基。接种量为 $5 \times 10^6$ 个/瓶, 28℃恒温培养72 h, 每隔6 h振摇翻动1次。测定粗酶液活力。

#### 1.2.2.2 氮源和无机盐的筛选

采用SAS系统<sup>[4]</sup>生成11因素的Plackett-Burman设计表1, 各因素的试验测试水平如表2。

表1 Plackett-Burman 设计表

OBS	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
2	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
4	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
7	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
11	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
12	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1

#### 1.2.2.3 发酵控制条件的正交试验

选用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表<sup>[5]</sup>, 安排各因素的水平如表3。培养基组成为豆渣: 麸皮(质量比4:1)+0.75% CaCl<sub>2</sub>+0.045% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。试验中各因素的选取水平按表3进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 基质中豆渣含量对产酶的影响

第一作者: 硕士, 讲师。

收稿日期: 2007-08-06

表 2 试验设计因素与水平

因素	添加物	添加水平(W/W)	因素	添加物	添加水平(W/W)
X <sub>1</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-1(0),1(1%)	X <sub>7</sub>	NaCl	-1(0),1(0.5%)
X <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	-1(0),1(1%)	X <sub>8</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-1(0),1(0.05%)
X <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-1(0),1(1%)	X <sub>9</sub>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-1(0),1(0.05%)
X <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	-1(0),1(1%)	X <sub>10</sub>	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-1(0),1(0.05%)
X <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	-1(0),1(0.5%)	X <sub>11</sub>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-1(0),1(0.05%)
X <sub>6</sub>	CaCl <sub>2</sub>	-1(0),1(0.5%)			

表 3 因素的选取水平

因素	编码值与实际值		
	1	2	3
接种量/个·瓶 <sup>-1</sup>	3.4×10 <sup>4</sup>	3.4×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>6</sup>
温度/℃	24	28	32
发酵时间/h	36	48	64

采用过 16~20 目筛筛后的颗粒较粗的麸皮,经过加水浸润预处理后与豆渣混和,灭菌处理后作为发酵基质。结果显示,豆渣的百分比含量越高,基质单位干重产生的纤溶酶活力单位越高,可能原因是发酵过程中豆渣作为脉孢霉营养物质的主要来源,其含量越高时能为霉菌提供的营养越多。但是,过高(90%)的豆渣含量使基质粘稠成团,翻动基质困难。当豆渣与麸皮的配比为 4:1 时(豆渣含量为 80%),基质显得比较疏松,传质传热较好,平均产酶量约为 30 U/g。发酵结果见图 1。

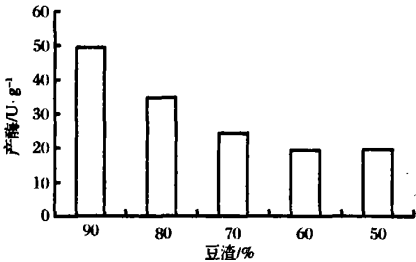


图 1 干基豆渣含量百分比对产酶的影响

2.2 氮源和无机盐的筛选实验

Plackett-Burman 设计的产酶试验结果见表 4。

经 SAS V6.12 分析得出的各个因素对纤溶酶产量的影响效应及其重要性见表 5。结果显示,所选用的 4 种速效氮源均对产酶有显著抑制效应,原因可能是向培养基中添加氮源后降低了培养基的碳氮比,而一般豆渣干品含纤维素 51.80%,蛋白质 19.32%,脂类 12.40%和灰分 3.54%<sup>[2]</sup>。所选用的 7 种无机盐中,CaCl<sub>2</sub> 和 Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对产酶有显著促进作用,原因可能与 Ca<sup>2+</sup> 及 Fe<sup>2+</sup> 的生理功能有关:细胞内 Ca<sup>2+</sup> 在信号传导和对多种蛋白质功能调节方面起到重要作用,

生长中的菌丝顶端保持较高的 Ca<sup>2+</sup> 梯度对菌丝顶端的组织化、形态建成及生长来说是必需的<sup>[6]</sup>。另一方面 Ca<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 是一些蛋白酶的结构组成成分,在维持蛋白酶的活性方面有重要意义。MnSO<sub>4</sub> 对产酶有显著抑制效应,其他无机盐的影响效应不明显。原因可能是豆渣中的无机盐成分复杂,一般情况下能够满足脉孢霉生长的营养需求,过高的离子强度反而出现离子毒害。

CaCl<sub>2</sub> 添加量对产酶的影响如图 2 所示,CaCl<sub>2</sub> 的最适水平为 0.75%,产量为 189.08U/g,较对照产酶增加 31.5%;FeSO<sub>4</sub> 为 0.045%时最高,产酶为 193.66U/g,较对照增加 34.7%。

表 4 Plackett-Burman 设计各处理得纤溶酶产量

处理	第 1 组	第 2 组	产量平均值 /U·g <sup>-1</sup>
1	313.76	311.25	312.51
2	178.96	240.79	209.88
3	144.11	134.08	139.10
4	99.65	115.12	107.39
5	112.39	88.35	100.37
6	339.96	326.6	333.28
7	78.97	94.96	86.97
8	342.7	345.46	344.08
9	80.89	84.88	82.89
10	129.84	162.54	146.19
11	94.96	102.07	98.52
12	173.31	177.53	175.42
平均	174.12	181.97	178.05

2.3 发酵控制条件

采用了三因素三水平的正交设计测验接种量、发酵温度与发酵时间对产酶的综合影响,结果见表 6。

表 5 Plackett-Burman 设计各因素对纤溶酶产量的影响效应

因素	影响效应估计	T-值	大于 T-值重要性的概率	重要性排序
X <sub>1</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-21.60	-6.508	0.0001	6
X <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> Cl	-61.51	-18.537	0.0001	1
X <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-44.48	-13.403	0.0001	2
X <sub>4</sub> KNO <sub>3</sub>	-28.43	-8.566	0.0001	3
X <sub>5</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	-3.08	-0.927	0.3720	10
X <sub>6</sub> CaCl <sub>2</sub>	26.07	7.855	0.0001	5
X <sub>7</sub> NaCl	-6.47	-1.949	0.0750	9
X <sub>8</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-8.35	-2.517	0.0270	8
X <sub>9</sub> FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	21.27	6.410	0.0001	7
X <sub>10</sub> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-26.58	-8.011	0.0001	4
X <sub>11</sub> ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-2.08	-0.627	0.5426	11

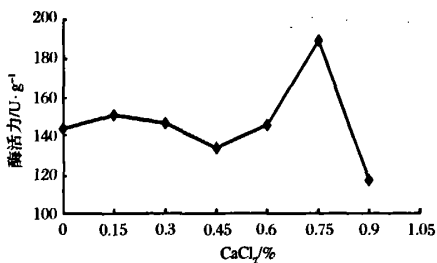


图2  $\text{CaCl}_2$  对产酶的影响

表6  $L_9(3^4)$  正交设计的发酵结果分析表

试验组	因素			酶活力 /U·g <sup>-1</sup>
	接种量	温度	发酵时间	
1	1	1	1	0.00
2	1	2	2	173.83
3	1	3	3	36.86
4	2	1	2	101.03
5	2	2	3	59.70
6	2	3	1	107.89
7	3	1	3	50.81
8	3	2	1	87.67
9	3	3	2	16.53
$T_1$	70.23	50.61	65.19	
$T_2$	89.54	107.06	97.13	
$T_3$	51.67	53.48	49.12	
R	37.87	56.45	48.01	

结果表明,各因素的影响效应的主次顺序为温度>发酵时间>接种量。最佳水平组合为接种量(2)×温度(2)×发酵时间(2),即每瓶培养基接种  $3.4 \times 10^5$  个孢子在  $28^\circ\text{C}$  恒温箱培养 48 h 的处理。该组合没有包含在试验组中,按照这一最佳组合发酵,摇瓶

发酵试验的产酶量为  $219.36 \text{ U/g}$ ,浅盘放大发酵后的产酶量为  $330 \text{ U/g}$ 。

### 3 结 论

以好食脉孢霉为产酶菌种,选用廉价物料新鲜豆渣和麸皮为初始发酵底物( $15 \text{ g}$  干重/ $500 \text{ mL}$  三角瓶),试验确定发酵培养基的组成是:豆渣:麸皮(4:1)+ $\text{CaCl}_2$  (0.75%) +  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.045%)。每瓶培养基接种  $3.4 \times 10^5$  个孢子在  $28^\circ\text{C}$  恒温箱培养 48 h,然后用生理盐水( $100 \text{ mL/瓶}$ )浸提 4~6 h。摇瓶优化后的酶产量约为  $220 \text{ U/g}$ ,浅盘发酵放大结果为  $330 \text{ U/g}$ ,10 倍于初始产量。豆渣作为发酵原料有其独特的资源优势 and 低成本优势,利用安全微生物好食脉孢霉来发酵豆渣生产纤溶酶是外源溶栓剂的一个新途径。

### 参 考 文 献

- 1 罗文华,郭 勇. 食品纤溶酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(8):111~114
- 2 高金燕. 豆渣的营养与药用价值[J]. 中国食物与营养,2003,(11):49~50
- 3 郑延斌,路福平,杜连祥. 根霉纤溶酶发酵条件的优化[J]. 工业微生物,2000,30(4):28~31
- 4 彭昭英著. 希望图书创作室改编. 世界统计与分析全才 SAS 系统应用指南[M]. 北京:北京希望电子出版社,2000
- 5 郁 昭,李树航,邵本力,等. 田间试验与统计分析[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1997
- 6 Jackson S L, Heath I B. Role of Calcium Ions in Hyphal Tip Growth[J]. Microbiol Rev,1993,57:367~382

## Fibrinolytic Enzyme Produced by *Neurospora sitophila* from the Solid Fermentation of Soybean Residue

Xu Aiqing<sup>1,2</sup>, Liu Xiaolan<sup>2</sup>

1(School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

2(Life Science and Engineering College, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

**ABSTRACT** Studies on producing fibrinolytic enzyme from *Neurospora sitophila* were carried out in this paper. Based upon experimental designs, the optimized medium containing soybean residue: wheat bran (4:1),  $\text{CaCl}_2$  (0.75%) and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.045%). Fifteen gram (dry weight) substrate was fermented in  $500 \text{ mL}$  flask.  $3.4 \times 10^5$  spores per flask were inoculated and cultured under  $28^\circ\text{C}$  for 48 h followed by extracted with  $\text{NaCl}$  solution (0.9%,  $100 \text{ mL/flask}$ ) to obtain crude enzyme solution. The optimized enzyme productivity was 220 Unit per gram substrate in flask and  $330 \text{ U/g}$  when scaled-up in shallow tray, which was ten-fold of the productivity on primary medium.

**Key words** soybean residue, *Neurospora sitophila*, solid-state fermentation, fibrinolytic enzyme