

蛹虫草液体培养产纤溶酶条件优化研究

林群英^{1,2}, 封义³, 姜艳³, 龙良鲲³, 丁少军³, 孙晓明^{1,2}

(1. 中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042; 2. 江苏鸿丰果蔬食品有限公司, 江苏 宿迁 223700;
3. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要:利用蛋白纤维平板法对1株蛹虫草(*Cordyceps militaris*)菌株液体发酵产生纤溶酶的碳氮条件进行系统优化;通过单因素试验筛选最佳碳源和氮源,再根据单因素试验结果进行正交设计实验优化该菌株产纤溶酶的最佳配方。结果表明:产纤溶酶的最佳碳源为乳糖,纤溶酶活性达118.69 U/mL,其次是不加碳源的空白对照,活性为109.12 U/mL;蚕蛹粉是该菌株产纤溶酶的最佳氮源,活性可达118.69 U/mL,其次是酵母浸膏,活性为29.10 U/mL;纤溶酶产量与菌丝体生物量之间无必然相关性;产纤溶酶的最佳培养基为乳糖10 g/L、蚕蛹粉10 g/L、酵母浸膏5 g/L,获得的纤溶酶活性高达142.26 U/mL。

关键词:蛹虫草;纤溶酶;营养条件;深层发酵

中图分类号:S 567.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0143-04

心脑血管疾病已成为威胁人类健康的常见疾病,临床上用于治疗溶栓药物由于纤维蛋白特异性不强,易引起组织出血的副作用,使用中存在体内半衰期短、生产成本高等缺点。因而,研发副作用小且高效价廉的新型溶栓药物已成为热点。纤溶酶作为天然来源的溶栓药物,具有重要的临床应用前景及价值。纤溶酶在微生物中广泛存在,且种类丰富。结合微生物易于大规模工业化生产的特点,微生物源的纤溶酶具有广阔的开发应用前景^[1-2]。

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)是著名的传统中药材,含有丰富的生物活性物质,受到国内外研究人员的广泛关注。现代药理学试验证明,蛹虫草具有抗菌、抗肿瘤、抗疲劳、抗衰老和调节机体免疫能力等作用^[3-4],含有虫草素、虫草酸、腺苷、虫草多糖、超氧化物歧化酶(SOD)等^[5-6]。2008年首次报道了蛹虫草能够产生纤溶酶,此后有关其产纤溶酶的条件及纤溶酶组分特性等备受关注^[7-10]。蛹虫草菌株的多样性可导致其产纤溶酶的培养条件各不相同。该研究对收集到的1株蛹虫草菌株发酵产生纤溶酶的条件进行了优化研究,为开发利用纤溶

酶资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试斜面菌株 以新鲜蛹虫草子实体为材料进行组织分离所得,接种于PDA培养基上,25℃培养14 d,用于液体培养,5℃保存。

1.1.2 液体菌种 将斜面菌种接入液体培养基:葡萄糖20 g/L,蛋白胨8 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, pH 6.5。25℃下,160 r/min振荡培养5 d,待菌丝球完全充满培养液,即可用于接种。

1.2 试验方法

1.2.1 纤溶酶活性测定 参照文献[11],以牛血纤维蛋白平板法进行纤溶酶活性测定。在1.0%琼脂糖平板上打孔,孔径为5 mm,孔内加入不同浓度的尿激酶标准品,于37℃保温18 h后测量纤维蛋白平板上溶解圈的直径。以溶解圈面积对数为横坐标,酶活力对数为纵坐标,建立标准曲线。以蛹虫草发酵液代替尿激酶标准品,测定纤溶酶活性。

1.2.2 碳源对蛹虫草液体培养产纤溶酶活性影响 利用各碳源代替1.1.2液体培养基中的葡萄糖,配制发酵培养基。按5%接种量(V/V)接入液体菌种,25℃下,160 r/min振荡培养6 d。用150目的尼龙布过滤收集菌丝体,60℃下烘干至恒重,称重。滤液用于纤溶酶活性测定。以不添加碳源的培养基为对照(CK-C),每处理重复3次。

1.2.3 氮源对蛹虫草液体培养产纤溶酶活性影响 利

第一作者简介:林群英(1979-),女,博士,高级工程师,现主要从事食用菌资源应用等研究工作。E-mail:linqunying1007@126.com

责任作者:孙晓明(1964-),男,硕士,研究员,现主要从事食用菌栽培与深加工等研究工作。E-mail:sunxm64@163.com

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2013BAD16B07)。

收稿日期:2015-09-22

用各氮源代替 1.1.2 液体培养基中的蛋白胨,配制发酵培养基。并按 1.2.2 的操作进行发酵试验。以不添加氮源的培养基为对照(CK-N),每处理重复 3 次。

1.2.4 正交实验优化纤溶酶发酵培养基 根据 1.2.2 和 1.2.3 试验的结果,确定最佳碳源和氮源,采用正交实验设计,按照表 1 和表 2 优化蛹虫草纤溶酶高产培养基配方。余下步骤按 1.2.1 操作。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平

Table 1 Levels and factors in orthogonal experimental design of $L_9(3^4)$ g/L

水平 Level	乳糖 Lactose	蚕蛹粉 Silkworm pupa powder	酵母浸膏 Yeast extract
1	10	5	5
2	20	10	10
3	30	15	15

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计

Table 2 Orthogonal experimental design of $L_9(3^4)$

试验号 Test No.	乳糖 Lactose	蚕蛹粉 Silkworm pupa powder	酵母浸膏 Yeast extract
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

2 结果与分析

2.1 碳源对蛹虫草液体培养产纤溶酶活性的影响

由图 1 可以看出,以乳糖为碳源获得的纤溶酶活性最高,达 118.69 U/mL,其次为对照组 CK-C,为 109.12 U/mL,而甘露醇、蔗糖、甘油和葡萄糖等碳源产纤溶酶活性分别为 82.74、9.09、7.43、6.87 U/mL。以糊精和可溶性淀粉为碳源时,未检测到纤溶酶活性。同时,测定了不同碳源发酵获得的菌丝体生物量,由图 2 可知,以甘油作碳源的菌丝生物量最高,达 11.8 g/L,而以乳糖为碳源时,菌丝体生物量仅为 4.5 g/L。可见,碳源是纤溶酶产量的重要影响因素,但纤溶酶产量与菌丝体生物量无必然相关性。

2.2 氮源对蛹虫草液体培养产纤溶酶活性的影响

由图 3 可知,氮源可明显影响蛹虫草产纤溶酶的活性。对 4 种氮源培养蛹虫草产纤溶酶活性进行比较后发现,以蚕蛹粉作氮源,蛹虫草产纤溶酶活性最高,可达 118.69 U/mL,其次是酵母浸膏、牛肉浸膏和蛋白胨,分别为 29.10、19.18、16.12 U/mL。氮源空白对照(CK-N)未检测得纤溶酶活性。由图 4 可知,以不同氮源进行培养时,蛹虫草菌丝体生物量与纤溶酶活性显示出较好的

正相关性,菌丝体生物量最高的氮源是蚕蛹粉,其次是酵母浸膏。

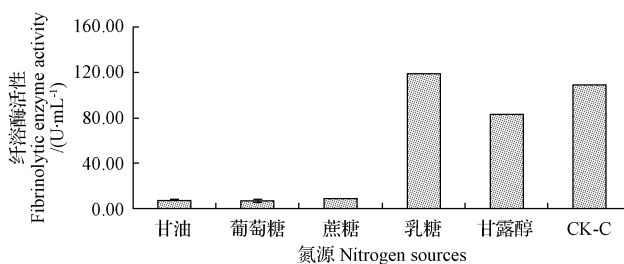


图 1 碳源对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on fibrinolytic enzyme activities from *Cordyceps militaris*

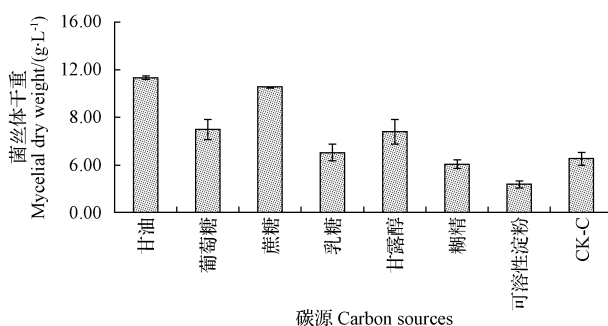


图 2 碳源对蛹虫草菌丝体生物量的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on mycelial biomass of *Cordyceps militaris*

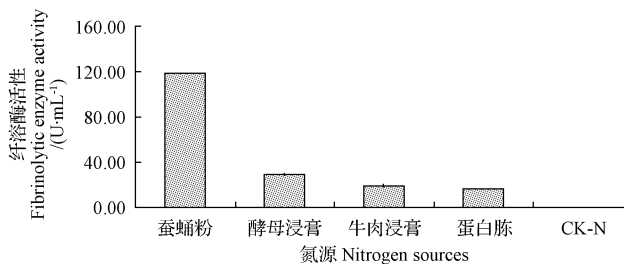


图 3 氮源对蛹虫草产纤溶酶活性的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on fibrinolytic enzyme activities from *Cordyceps militaris*

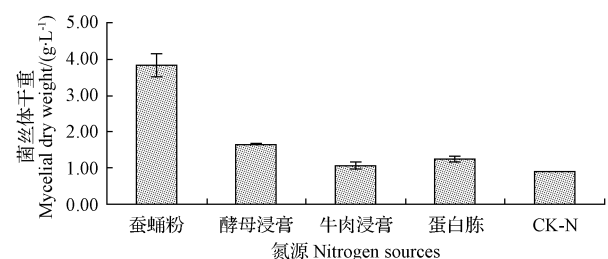


图 4 氮源对蛹虫草菌丝体生物量的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen sources on mycelial biomass of *Cordyceps militaris*

2.3 正交实验优化纤溶酶发酵培养基

根据碳源和氮源单因素试验结果,以乳糖为碳源,蚕蛹粉和酵母浸膏为氮源,利用正交实验设计优化蛹虫草产纤溶酶的最佳培养基。由表3可以看出,酵母浸膏对纤溶酶活性的影响最大($R=42.72$),其次是乳糖和蚕蛹粉(R 分别为15.71和12.67)。优化得最佳培养基为:乳糖10 g/L、蚕蛹粉10 g/L、酵母浸膏5 g/L。经试验验证,经优化的最佳培养基可获得蛹虫草纤溶酶活性达142.26 U/mL。

表3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果及直观分析

Table 3 Orthogonal experimental results and intuitive analysis

试验号 Test No.	乳糖 Lactose	蚕蛹粉 Silkworm pupa powder	酵母浸膏 Yeast extract	纤溶酶活性
1	1	1	1	124.06
2	1	2	2	107.26
3	1	3	3	57.17
4	2	1	2	54.51
5	2	2	3	91.14
6	2	3	1	134.22
7	3	1	3	72.96
8	3	2	1	91.14
9	3	3	3	77.25
K_1	288.50	251.53	349.43	
K_2	279.88	289.55	239.02	
K_3	241.35	268.65	221.28	
k_1	96.17	83.84	116.48	
k_2	93.29	96.52	79.67	
k_3	80.45	89.55	73.76	
R	15.71	12.67	42.72	

3 讨论与结论

蛹虫草液体培养产纤溶酶的条件主要包括碳源、氮源、无机元素等营养条件和温度、通气状况和pH值等环境因素。该研究主要针对碳源和氮源,对1株蛹虫草菌株产纤溶酶的培养条件进行了优化研究。经单因素试验和正交实验,确定该菌株产纤溶酶的最佳碳氮源分别是乳糖和蚕蛹粉。正交实验优化得最佳培养基配方为:乳糖10 g/L、蚕蛹粉10 g/L、酵母浸膏5 g/L,纤溶酶活性达142.26 U/mL。研究发现,蛹虫草产纤溶酶活性多为32.34~111.85 U/mL^[7,12],与之相比较,在该研究条件下获得了较高的纤溶酶发酵水平。由于培养的菌株不同,产酶条件也各异。葡萄糖、可溶性淀粉、面粉、玉米粉和蔗糖等被确定为不同菌株的最佳碳源,而蛋白胨、酵母粉、蚕蛹粉和豆饼粉等被确定为最佳氮源^[12-15]。而该研究采用的菌株可利用的最佳碳氮源与

这些报道并不相同。可见,针对不同来源的菌株,必须优化其产纤溶酶的关键因子,为纤溶酶资源的开发利用提供参考。

目前,蛹虫草产纤溶酶的相关研究还十分有限,获得高产纤溶酶的菌株并明确其发酵条件是亟需开展的工作。该研究发现了1株发酵产高活性纤溶酶的蛹虫草菌株,并确定了其产纤溶酶的关键影响因素。课题组将继续对纤溶酶进行分离纯化,明确其酶学特征,加快蛹虫草纤溶酶资源的开发应用。

参考文献

- [1] KOTB E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97: 6647-6665.
- [2] 艾瑞波,刘晓兰,邓永平,等. 微生物发酵法生产纤溶酶的研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 227-231.
- [3] AHN Y J, PARK S J, LEE S G, et al. Cordycepin, selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(7): 2744-2748.
- [4] 林群英,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 154-157.
- [5] MENG Z, KANG J, WEN T, et al. Cordycepin and N6-(2-Hydroxyethyl)-adenosine from *Cordyceps pruinosus* and their interaction with human serum albumin[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121669.
- [6] JING Y, ZHU J, LIU T, et al. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(13): 3464-3471.
- [7] CUI L, DONG M S, CHEN X H, et al. A novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*, a Chinese traditional medicinal mushroom[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(4): 483-489.
- [8] LIU X, KOPPARAPU N K, SHI X, et al. Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Cordyceps militaris*[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(8): 2215-2224.
- [9] 刘晓兰,张雯舒,郑喜群,等. 蛹虫草发酵产物新纤溶酶的分离纯化[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 107-114.
- [10] 徐同. 蛹虫草人工培育和蛹虫草纤溶酶部分性质的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2003.
- [11] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archive of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2): 346-351.
- [12] 白伟芳,郭丽琼,林俊芳,等. 蛹虫草产纤溶酶活性菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(5): 1014-1018.
- [13] 周伏忠,宁萌,程燕,等. 蛹虫草菌丝液体发酵产纤溶酶的实验研究[J]. 河南科学, 2014, 32(7): 1212-1218.
- [14] 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.
- [15] 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.

Optimization of Submerged Culture Conditions for Production of Fibrinolytic Enzyme by *Cordyceps militaris*

LIN Qunying^{1,2}, FENG Yi³, JIANG Yan³, LONG Liangkun³, DING Shaojun³, SUN Xiaoming^{1,2}

DOI:10.11937/bfyy.201524040

温度处理对不同种源玛咖发芽特性的影响

冯海萍¹, 牛敬娟², 谢 华¹, 雍纬基³, 丁自强³, 马八十³

(1. 宁夏农林科学院 种质资源研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏隆德县山河乡政府, 宁夏 隆德 756300;

3. 宁夏隆德县农牧局, 宁夏 隆德 756300)

摘 要:为探讨温度对不同种源玛咖种子萌发的影响,以玛咖种子为试材,采用单因子随机区组设计,研究了不同温度处理对不同种源玛咖种子发芽特性的影响。结果表明:秘鲁种源与云南种源的玛咖种子发芽特性对温度条件变化的反应基本一致,不同温度对玛咖种子发芽率、发芽势、发芽指数及胚根长度的影响均显著。在 15~35℃ 范围内,随温度的上升均呈先增后减趋势,其中 25℃ 时云南种源玛与秘鲁种源玛种子的发芽率、发芽势、发芽指数和胚根长度均达到最大值,分别为 89.33%、83.75%、14.88、22.10 mm 和 87.27%、83.44%、14.53、21.06 mm,且该温度下种子发芽所需时间较短,发芽速度最快,整体发芽效果最好。因此认为 25℃ 是玛咖种子发芽最适温度。

关键词:玛咖;种子;温度;发芽**中图分类号:**S 636.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0146-04

玛咖(*Lepidium meyenii* Walp)属十字花科独行菜属的一年生或两年生草本植物,英文俗称 Maca,原产秘

鲁海拔 3 500~4 000 m 安第斯山区,主要以收获根和种子为目的^[1-2]。根是主要食用部位,其含有多种营养和天然植物活性成分,且在提高免疫力、改善性功能、提高生育力、调节内分泌和抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤等方面有明显的药效^[3-7],被誉为“秘鲁国宝”。种子主要用于播种繁殖,国内采用植物组织培育技术开展了玛咖繁殖工作^[8]。联合国基因资源协会将玛咖列为濒危物种,并建议具备条件地区适度进行玛咖引种和推广种植,目前美国、加拿大、日本、澳大利亚、欧洲,中国的云南、西藏、吉林、新疆、四川、山西等国家和地区均有适度种植^[9-11],部

第一作者简介:冯海萍(1981-),女,宁夏盐池人,硕士,助理研究员,现主要从事设施蔬菜生理与无土栽培等研究工作。E-mail: fenghaiping2005@163.com.

责任作者:谢华(1965-),男,宁夏中卫人,本科,研究员,现主要从事蔬菜学等研究工作。E-mail: xiehua0002@163.com.

基金项目:宁夏农林科学院科技创新先导资金资助项目(NKYG-14-21)。

收稿日期:2015-07-27

(1. Nanjing Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing, Jiangsu 210042; 2. Jiangsu Hongfeng Fruit and Vegetable Co. Ltd., Suqian, Jiangsu 223700; 3. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: Liquid culture conditions of carbon and nitrogen sources for production of fibrinolytic enzyme by a *Cordyceps militaris* strain were optimized using fibrin plate method. The best carbon and nitrogen sources were screened out by single factor method. Based on the outcomes of the single factor method, an orthogonal test was designed to optimize the most suitable formula. The results showed that lactose was the best carbon source, with enzyme activity at 118.69 U/mL, followed by the control without carbon source supplement, having activity at 109.12 U/mL. The best nitrogen source was silkworm pupa powder, with the activity of 118.69 U/mL and followed by yeast extract, giving enzyme activities of 29.10 U/mL. There was no certain relevance between enzyme activities and mycelial biomass. The optimal medium for fibrinolytic enzyme production consisted of lactose 10 g/L, silkworm pupa powder 10 g/L, yeast extract 5 g/L. Highest activity of 142.26 U/mL was obtained.

Keywords: *Cordyceps militaris*; fibrinolytic enzyme; nutritional conditions; submerged culture