

# 一株纤维蛋白溶解酶产生菌的鉴定及其产酶条件初步研究

刘柱 华颖 江波\* 沐万孟

(食品科学与技术国家重点实验室 江南大学 无锡 214122)

**摘要:** 从亚洲传统发酵食品——虾酱中筛选到一株产纤维蛋白溶解酶能力较强的菌株, 通过形态和常规生理生化性质鉴定, 发现该菌株与芽孢杆菌属细菌的特征很相近, 结合 16S rDNA 序列分析, 构建系统发育树, 确定其分类地位, 由中国典型培养物保藏中心定名为 *Bacillus* sp. nov. SK006 (CCTCC No. M 205071), 并优化了发酵培养基组成及培养条件, 本研究为该菌株的深入研究和广泛应用提供了理论依据。

**关键词:** 纤维蛋白溶解酶, 芽孢杆菌, 鉴定, 发酵优化

## Identification of a *Bacillus* sp. Strain with Fibrinolytic Activity and Primary Study on Fermentation Process

LIU Zhu HUA Ying JIANG Bo\* MU Wan-Meng

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

**Abstract:** An extracellular fibrinolytic strain was isolated from fermented shrimp paste. In addition to general physiological and biochemical properties, the strain was identified by 16S rDNA sequence and systematic analysis. The results showed that 16S rDNA sequence of the strain had high similarity with AY601723 and AB195282, suggesting that the strain is a subspecies of *Bacillus* sp. It was named as *Bacillus* sp. nov. SK006 by CCTCC. The medium composition and fermentation conditions for fibrinolytic enzyme production were also optimized in the research.

**Keywords:** Fibrinolytic enzyme, *Bacillus* sp., Identification, Fermentation optimization

血栓性疾病正日益严重危害着人们的健康和生命, 已成为造成人类死亡和残疾的主要原因之一<sup>[1]</sup>。利用纤维蛋白溶解酶(纤溶酶)化解血栓使血管再通, 是目前防治此类疾病的广为流行的方法。自 20 世纪 80 年代以来, 从不同国家的传统食品中发现了纤溶酶, 如从日本传统食品纳豆中发现的一种具有较强

纤溶活性的纳豆激酶(NK)<sup>[2,3]</sup>, 韩国传统食品 Chung-kook-Jang 和 Doen-Jang 中的纤溶酶 CK 和 Sub-tilisin DJ-4<sup>[4,5]</sup>, 从我国发酵大豆食品豆豉中分离到具有溶栓作用的豆豉纤溶酶<sup>[6]</sup>以及从台湾大豆发酵食品中发现的纤溶酶原<sup>[7]</sup>。

酶类药物的制备方法有从动物或植物中提取和

利用微生物发酵生产,但生产大量治疗用酶制剂的主要来源是微生物。在纤溶酶的生产方面,除了早期发现的 $\beta$ -溶血链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)产生的链激酶和金黄色葡萄球菌产生的葡激酶外,研究者陆续筛选了可以产生纤溶物质的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、放线菌(*Actinomyces thermovulgari*)和镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)等<sup>[4,8,9]</sup>。

本文对从亚洲传统发酵食品虾酱中筛选到的一株纤溶酶产生菌,进行形态学和生理生化特性鉴定及 16S rDNA 序列分析,并对其发酵产酶过程中各因素的变化作进一步研究,得到了适宜的产酶条件,为新型抗栓溶栓药物的开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

菌株 SK006 由本课题组从虾酱中分离。

### 1.2 培养基与试剂

种子培养基(g/L):蛋白胨 10, 葡萄糖 10, 酵母膏 5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  12,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3, pH 7.2。

发酵基础培养基(g/L):蛋白胨 15, 葡萄糖 15,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1, pH 7.2。

Plasmin (3.9 U/mg), 购自 Sigma 公司(St Louis, MO, USA); 牛血纤维蛋白原和凝血酶购自中国生物制品检定所; 其它试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 纤溶活性测定法

采用改进的标准纤维蛋白平板法<sup>[10]</sup>。将 1.5 mL 0.75% (W/V) 纤维蛋白原溶液、100  $\mu\text{L}$  凝血酶溶液(42 U/mL)和 8.3 mL 0.1% 的琼脂糖溶液(加热使完全溶解,并冷却至约 40 $^{\circ}\text{C}$ )混合均匀,倒入直径 6 cm 的医用无菌培养皿,室温下放置 1 h~2 h。在检测平板上打孔,孔径 2 mm,滴注酶液和标准 Plasmin 溶液于孔内,37 $^{\circ}\text{C}$  放置 18 h。依据 Plasmin 标准曲线,计算纤溶活力。

取 150  $\mu\text{g}$  (3.9 U/mg) 人血纤溶酶(Plasmin)标准样品,加磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)将其稀释,分别制成不同浓度的溶液,点样方法同上。37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 18 h 后观察并测量透明圈的垂直直径(mm),作出人血纤溶酶标准曲线。计算公式为:  $y = -2.205x + 7.0378$ , 其中  $y: -\log U$ ,  $x: \log d^2$ ,  $U$  为纤溶酶活单位,  $d$  (mm) 为溶圈直径。

酶活性单位  $U$ : 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 条件下,水解 $\alpha$ -

酪蛋白生成可溶于高氯酸的酶解产物,20 min 内使 5 mL 体系的  $\Delta A_{275}$  增加 1.0 所需要的酶定义为一个酶活性单位,以  $U$  表示。

### 1.4 形态学、生理生化特性

普通琼脂营养平板接种 SK006, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h, 观察菌落的形态特征,在投射电子显微镜下观察新鲜培养物中细胞芽孢和细胞形态和鞭毛等。参考文献[11]所述芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)典型的菌体、菌落形态特征,对菌株进行鉴定。生理生化特性鉴定由中国典型培养物保藏中心完成。

### 1.5 菌株的 16S rDNA 序列分析

引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (正向), 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3' (反向)。

反应体系: 取 DNA 模板 5 ng, STR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , 引物各 100 ng, dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 补无菌水至 20  $\mu\text{L}$ 。

温度循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min。

用 Qiagen 胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物,电泳验证。16S rDNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成。将测得的序列在 NCBI 核酸数据库中进行 Blast 搜索与其相似性最高的序列,用 ClustalX 软件进行同源性分析,校准排齐后构建系统发育树。

### 1.6 发酵产酶研究

1.6.1 生物量测定: 取 0.5 mL 发酵液,用去离子水稀释 20 倍,测定细胞悬浮液的  $OD_{600}$ ,以未接种的培养基等量稀释作为对照。

1.6.2 残糖含量测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法<sup>[12]</sup>。

1.6.3 最适培养基组成确定: 保持基础培养基其它成分和浓度不变,改变培养基氮源、碳源的种类,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养,测定不同氮源、碳源对 *Bacillus* sp. nov. SK006 产酶的影响。

1.6.4 营养条件单因子试验和正交试验: 在确定氮、碳源基础上,胰蛋白胨(浓度 0%~4%,按 1%递增)、葡萄糖(浓度 0%~4%,按 1%递增)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (浓度 0%~2%,按 0.5%递增)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (浓度 0%~0.2%,按 0.05%递增)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (浓度 0%~0.2%,按 0.05%递增)进行单因素试验。在此基础上选择  $L_{16}(4^5)$  正交表,发酵试验重复 3 次取平均值作为试验结果。

1.6.5 最适培养条件的确定: 在培养基成分确定后,

先固定装样量为 30 mL/250 mL 三角瓶, 选择 1%、2%、3%、4%的接种量, 在其它培养条件不变的条件下发酵。在确定接种量的基础上, 在 250 mL 的三角瓶中分别装入 20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL 和 70 mL 发酵培养基进行发酵, 确定最佳装样量。调节培养基的初始 pH 值为 5.0~10.0 进行发酵, 确定最佳培养基初始 pH。将接种后的种子培养基分别培养不同时间后, 接种到发酵培养基, 以确定最佳种龄。

2 结果与分析

2.1 形态和生长特征

普通琼脂营养平板 37℃ 培养 18 h 后的单菌落为乳白色, 圆形, 边缘不光滑呈裂叶状, 中央突起有褶皱, 或呈火山口状, 不透明, 无光泽, 生长迅速, 菌落粘稠, 拉长丝, 菌落形态如图 1。细胞为接触酶阳性的杆状革兰氏阳性菌, 有芽孢, 且芽孢侧端生, 芽孢形态为卵圆形(图 2)。进一步对该菌株进行常规生理生化特征鉴定, 结果见表 1。

由上述鉴定结果, 参照《伯杰氏细菌手册》(第九版)可以看出, 菌株 SK006 与芽孢杆菌属细菌的特征很相近, 由于 16S rDNA 进化缓慢, 在不同物种间



图 1 菌株 SK006 菌落形态  
Fig. 1 Colony of strain SK006



图 2 菌株 SK006 菌体形态  
Fig. 2 Morphological characteristics of strain SK006

表 1 菌株 SK006 的常规生理生化性质 Table 1 Biochemical and physiological characteristic strain SK006			
特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
β-环状糊精 β-Cyclodextrin	+	糊精 Dextrin	+
糖原 Glycogen	-	吐温 40 Tween 40	-
吐温 80 Tween 80	-	D-甘露糖 D-Mannitol	-
苦杏仁苷 Amygdalin	-	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-
D-阿拉伯醇 D-Arab alcohol	+	对苯二酚葡萄糖苷 Arbutin	+
纤维二糖 Cellobiose	-/+	果糖 Fructose	-
D-半乳糖 D-Galactose	-	α-环状糊精 α-Cyclodextrin	+
龙胆二糖 Gentiobiose	-	L-天冬酰胺 L-Asn	-
α-D-葡萄糖 α-D-Glucose	-	D-葡萄糖酸 D-Glucose acid	-
α-D-乳糖 α-D-Lactose	-	M-肌醇 M-Inositol	-
麦芽三糖 Maltotriose	+	麦芽糖 Maltose	+
α-甲基-D-葡萄糖苷 α-methyl-D-Glucoside	-	N-乙酰-L-葡萄糖胺 N-acetyl-L-Glucosamine	-
D-阿洛酮糖 D-Allulose	-	D-棉子糖 D-Raffinose	-
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	D-核糖 D-Ribose	-
甘露醇 Mannitol	-	D-山梨醇 D-Sorbitol	-
蔗糖 Sucrose	+	海藻糖 Trehalose	-
松二糖 Turanose	-	木糖醇 Xylitol	-
D-木糖 D-Xylose	-	乙酸 Acetic acid	-
L-谷氨酸 L-Glu	+	L-丝氨酸 L-Ser	-
腺苷 Adenosine	-	甘油 Glycerol	-
肌苷 Inosine	-	α-酮戊二酸 α-Ketoglutaric acid	-
尿苷 UDP	-	丙酮酸 Pyruvic acid	-
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	-	r-羟基-丁酸 r-hydroxy-Butanoic acid	-

注：+：生长；-：不生长  
Note: +: Positive; -: Negative

高度保守，受环境影响的可能性很小，对菌株 SK006 进行 16S rDNA 序列同源性分析。PCR 获得了 SK006 的 16S rDNA 基因的部分片段，通过序列分析获得该片段的序列，将该序列与 GenBank 库收录的 DNA 序列进行比对，结果表明，其序列与 AY601723 和 AB195282 序列相似性最高，同源性为 100%，鉴定为芽孢杆菌，经过中国典型培养物保藏中心鉴定并命名为 *Bacillus* sp. nov. SK006 (CCTCC No. M 205071)。

2.2 系统发育树的构建

参考 *Bacillus* sp. nov. SK006 的 16S rDNA 序列在 GenBank 的比对结果，用 ClustalX 做系统发育树(图 3)。由图 3 可知，*Bacillus* sp. nov. SK006 与 *Bacillus subtilis* MA139 的亲缘关系最近。这与 GenBank 比对结果不同，这是由于 Blast 时取的是序列的全长，而 ClustalX 做系统发育树时系统会截去某些长序列两端的一些短片段，使最终参与排序比对的片段长度相同。把 16S rDNA 作为鉴定依据的是其中的可变区，因此截去序列两端保守区的一些小片段不会影响结果，所以利用 ClustalX 做的系统发育树较为可信。

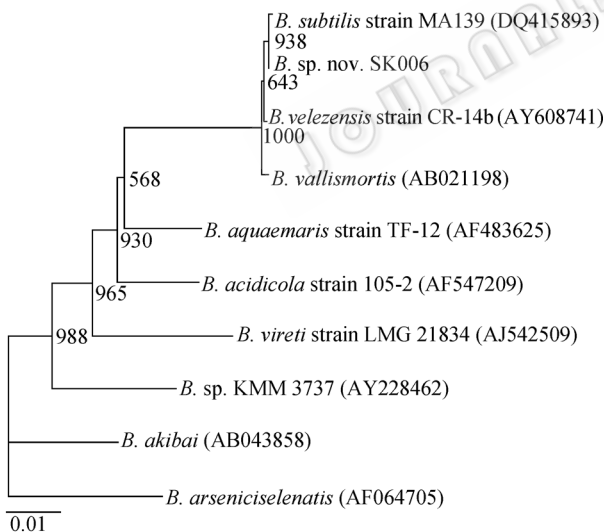


图 3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA gene sequences

2.3 发酵条件的研究

2.3.1 不同氮、碳源对产酶的影响：由表 2 可知，以胰蛋白胨为氮源时产酶量最高，且产酶迅速，在 24 h 达到产酶最高峰，因此选择胰蛋白胨作为最佳

氮源。从表 3 可以看出选择的碳源都能被 *Bacillus* sp. nov. SK006 利用，这与谢秋玲从纳豆中分离得到的芽孢杆菌不能利用果糖<sup>[13]</sup>不同。由于不同的糖在结构和性质上的差异，使得它们的产酶最高所需时间有所不同。从实际应用和发酵成本考虑，选择葡萄糖作碳源，并且葡萄糖是速效碳源，有利于菌体的生长和代谢物的分泌。

表 2 不同氮源对产酶的影响 Table 2 Effect of different nitrogen source on fermentation		
氮源 Nitrogen source	产酶高峰期 Peak time (h)	产酶量 Fibrinolytic activity (U/mL)
酵母膏 Yeast extract	36	0.90
牛肉膏 Beef extract	48	0.42
干酪素 Casein	—	—
大豆粕 Soybean meal	—	—
玉米浆 Corn steep liquor	12	0.02
胰蛋白胨 Tryptone	24	1.05
蛋白胨 Peptone	48	0.70
大豆蛋白胨 Soy peptone	36	0.36
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—
NH <sub>4</sub> Cl	—	—

注：—：无酶活  
Note: —: No fibrinolytic activity

表 3 不同碳源对产酶的影响 Table 3 Effect of different carbon source on enzyme production		
碳源 Carbon source	产酶高峰期 Peak time (h)	产酶量 Fibrinolytic activity (U/mL)
麦芽糖 Maltose	12	0.82
乳糖 Lactose	12	0.96
D-果糖 D-Fructose	12	0.92
D-甘露糖 D-Mannitol	12	0.96
蔗糖 Sucrose	18	0.96
葡萄糖 Glucose	24	1.04
D-木糖 D-Xylose	12	0.58
可溶性淀粉 Soluble starch	30	1.00

2.3.2 氮源、碳源的浓度及碳氮比对产酶的影响：以葡萄糖为碳源，胰蛋白胨为氮源，碳、氮浓度各设置 5 个水平进行比较，结果如表 4，最佳碳氮比为 2:3，葡萄糖浓度为 2%，胰蛋白胨浓度为 3%时产酶量最大。

2.3.3 营养条件的正交实验结果：上述实验结果表

明发酵培养基组成为：胰蛋白胨 3%，葡萄糖 2%， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1%， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%。在此基础上，以纤溶酶的活性为指标，选择 $\text{L}_{16}(4^5)$ 进行正交试验，结果用DPS5.0 进行分析和统计，得到发酵培养基的最佳组成为胰蛋白胨 3.12%，葡萄糖 1.95%， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.2%， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.13%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.09%。

表 4 碳源、氮源及 C/N 比对产酶的影响 Table 4 Effect of concentration of C, N nutrients and C/N on enzyme production					
氮源(%) Nitrogen source	碳源(%) Carbon source				
	0.5	1	2	3	4
0.5	—	0.74	0.82	0.58	0.88
1	—	0.64	0.74	0.94	0.90
2	—	0.82	0.94	0.53	0.78
3	0.44	0.96	1.13	0.58	0.96
4	0.03	0.74	0.12	0.19	0.24

注：表中酶活单位为：U/mL  
Note: Activity unit: U/mL

2.3.4 接种量和装液量对产酶的影响：分别在 30 mL/250 mL 发酵培养基中接入培养 12 h 的种子培养基，24 h 后测定其细胞量和产酶量，结果如图 4 所示，以接种量为 3% 时的细胞量和产酶量最大。

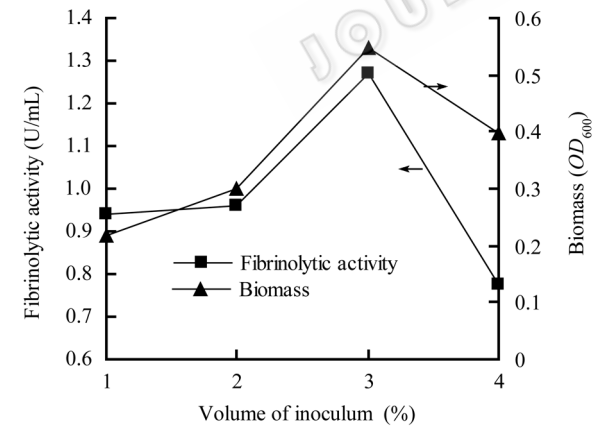


图 4 接种量对产酶的影响  
Fig. 4 Effect of volume of innoculum on enzyme production

图 5 表明，在装样量为 50 mL 时产酶量达到最高，可见，*Bacillus* sp. nov. SK006 的产酶量并没完全随着细胞量的增加而增大，而从纳豆中分离得到的菌株产酶量完全随着细胞量增加而增加<sup>[13]</sup>。由此可看出该菌株为好氧菌，溶氧量增加有利于细菌生长，

而过大的溶氧量能使细菌产生产物抑制或产物消耗作用，影响纤溶酶产生，所以要控制一定的溶氧量才能达到最大产酶量。

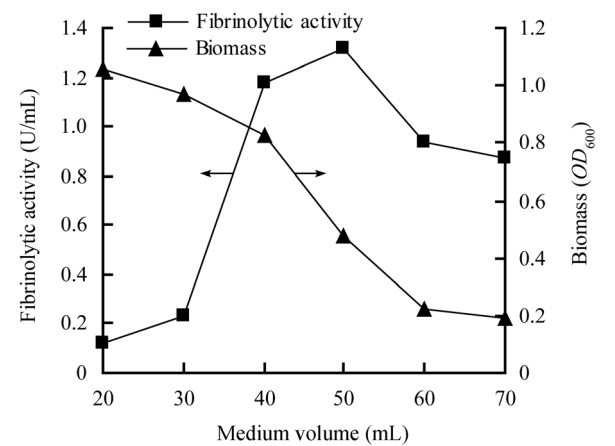


图 5 装样量对产酶的影响  
Fig. 5 Effect of volume of medium on enzyme production

2.3.5 培养基初始 pH 值和种龄对产酶的影响：如图 6 所示，初始 pH 10.0 时细胞量最大，因为 pH 10.0 的培养基灭菌后 pH 7.54，微碱性的环境最适宜芽孢杆菌生长；但产酶量以 pH 7.0 为最高，培养基在 pH 7.0 以上都有部分金属离子变成沉淀，影响细菌产酶。

从图 7 可以看出，无论是生长还是产酶都以种龄为 18 h 为最佳。

2.4 优化后 *Bacillus* sp. nov. SK006 发酵过程曲线以优化的培养基和培养条件进行发酵，每隔 4 h 取样，由图 8 可知，发酵 24 h 时，生物量和纤溶酶的积累量均达到最高，此时纤溶酶产量达 2.63 U/mL，

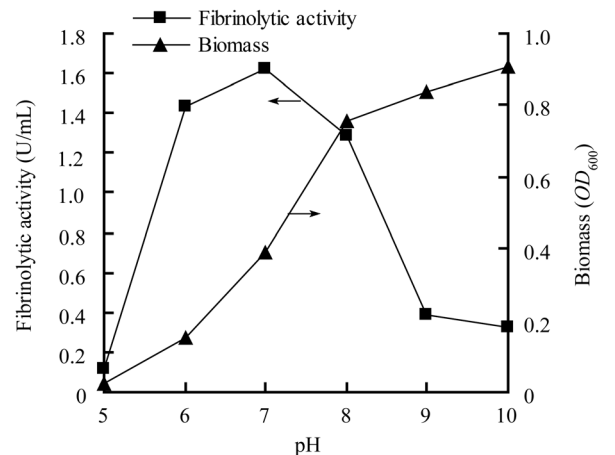


图 6 初始 pH 值对产酶的影响  
Fig. 6 Effect of pH on enzyme production

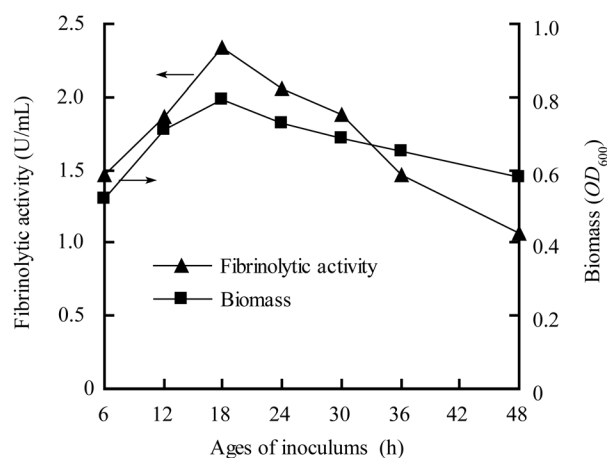


图7 种龄对产酶的影响

Fig. 7 Effect of age of inoculum on enzyme production

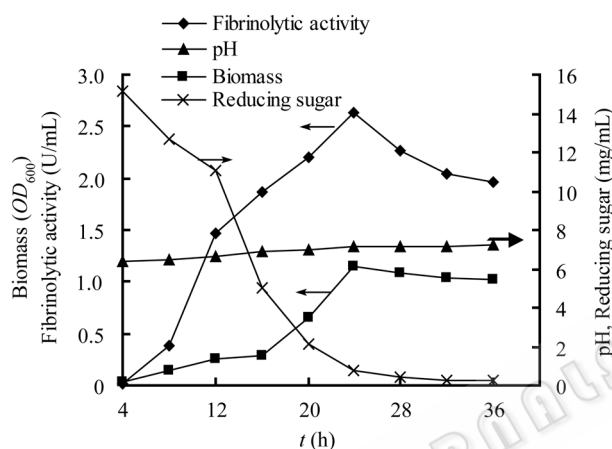


图8 优化后的发酵过程曲线

Fig. 8 Fermentation curve of fibrinolytic enzyme production

在发酵过程中, pH 值从 6.42 升高到 7.22, 在发酵 36 h 时发酵液中的还原糖含量几乎为 0。

### 3 结论与展望

本研究从亚洲传统发酵食品虾酱中筛选出的一株纤溶酶高产菌, 经 16S rDNA 序列分析鉴定发现, 该菌株与 AY601723 和 AB195282 序列相似性为 100%, 初步鉴定为芽孢杆菌。此结果与形态和常规生理生化鉴定结果相吻合, 由中国典型培养物保藏中心命名为(CCTCC No. M 205071)。初步发酵实验表明, 该菌最高产酶量达到 2.63 U/mL, 与国内外文献报道的溶栓活性比较(以 Plasmin 为标准), 属于高产菌株。

由于芽孢杆菌具有发酵周期短, 产物丰富, 可利用开发价值高以及作为食品药品安全性好(公认

的安全性细菌)等显著优点, 而且该菌株又来源于食品, 因此, *Bacillus* sp. nov. SK006 完全可以直接用于保健食品和溶栓剂的生产和开发。有理由相信其在心脑血管栓塞症及血栓性老年痴呆症预防方面将起到一定的积极作用, 为开发出一种新型、安全、实用的食品级功能性添加剂和药用溶栓剂提供必要的科学依据。

### 参考文献

- [1] 罗明典. 微生物制药研究进展. 微生物学通报, 1998, 25(1): 61-62.
- [2] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 1987, 43: 1110-1111.
- [3] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, *et al.* Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol*, 1990, 84: 139-143.
- [4] Kim W, Choi K, Kim Y, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2482-2488.
- [5] Kim SH, Choi NS. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 1722-1758.
- [6] 李江伟, 冉国侠, 陈新梅. 豆豉溶栓酶的分离纯化及其体外溶栓作用. 中国生化医药杂志, 1999, 20(3): 148-150.
- [7] Chang CT, Fan MH, Kuo FC, *et al.* Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3210-3216.
- [8] Egorov NS, Kochetov GA, Khaidarova NV. Isolation and properties of the fibrinolytic enzyme from the *Actinomyces thermovulgaris* cultural broth. *Mikrobiologiya*, 1976, 45: 455-459.
- [9] Sun T, Liu H, Li P, *et al.* New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem*, 1998, 33(4): 419-422.
- [10] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346-351.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.43-63.
- [12] 北京大学生物系化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1984, p.2.
- [13] 谢秋玲, 郭 勇. 纳豆激酶液体发酵条件的优化. 华南理工大学学报(自然科学版), 1999, 27(5): 127-131.