

金黄节杆菌 DR-536 分泌新型溶栓酶 FA- I 发酵条件的优化

张 明, 黄海洪, 王高学

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对金黄节杆菌 DR-536(*Arthrobacter aureescens* strain DR-536)分泌产生新型溶栓酶 FA- I 的发酵条件进行优化。【方法】通过纤维蛋白平板法,测定不同氮源、碳源、复配氮源、金属离子、NaCl、初始 pH、接种量、装液量、发酵时间和培养温度条件下菌株 DR-536 分泌的溶栓酶产量。【结果】菌株 DR-536(*A. aureescens* strain DR-536)分泌产生溶栓酶 FA- I 的最佳发酵培养基配方为:黄豆粉 1.0%,酵母膏 1.0%,NaCl 2.0%,FeSO₄ 0.05%,pH 6.0。最佳发酵条件为:接种量 4%,装液量 20 mL/150 mL,发酵时间 72 h,发酵温度 30 ℃。【结论】金黄节杆菌 DR-536(*A. aureescens* strain DR-536)在普通培养条件下能够大量分泌溶栓酶 FA- I,适于大规模发酵,便于该酶的开发利用。

【关键词】 金黄节杆菌;溶栓酶;发酵条件;优化

【中图分类号】 Q93-335

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0033-07

Optimization on fermentation of *Arthrobacter aureescens* strain DR-536 to secrete a novel fibrinolytic enzyme FA- I

ZHANG Ming, HUANG Hai-hong, WANG Gao-xue

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The fermentation conditions of *Arthrobacter aureescens* strain DR-536 to secrete a novel fibrinolytic enzyme FA- I were optimized. 【Method】 Through the fibrin plate method, the productivity of fibrinolytic enzyme FA- I secreted by strain DR-536 under different nitrogen sources, carbon sources, combined nitrogen sources, metal ions, NaCl, initial pH, inoculation volume, medium volume, fermentation time and temperature was measured. 【Result】 The optimal components of medium for strain DR-536 secreting FA- I were as follows: soybean powder 1.0%, yeast extract 1.0%, NaCl 2.0%, FeSO₄ 0.05% and pH 6.0. The optimal fermentation conditions were as follows: inoculation volume 4%, medium volume 20 mL/150 mL flask, incubation time 72 h and temperature 30 ℃. 【Conclusion】 *A. aureescens* strain DR-536 could produce a large number of fibrinolytic enzyme FA- I under normal fermentation conditions, making it convenient to utilize FA- I as a thrombolysis agent.

Key words: *Arthrobacter aureescens*; fibrinolytic enzyme; fermentation; optimization

心脑血管疾病是一种世界性疾病,每年导致大量病人死亡,严重危害人类健康。血栓形成是引起

该病的一个重要原因,所以溶栓疗法是治疗血栓症的有效手段之一。通过注射或口服溶栓类药物(如

* [收稿日期] 2010-03-26

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2006K02-G14-03)

[作者简介] 张 明(1973—),男,甘肃甘谷人,实验师,硕士,主要从事微生物药物研究。E-mail: zhangming730303@163.com

[通信作者] 王高学(1965—),男,陕西富平人,教授,博士,硕士生导师,主要从事生物工程制药研究。

E-mail: wanggaoxue@126.com

溶栓酶),使作为血栓骨架的纤维蛋白降解,导致血栓崩解,从而使血管重新畅通,达到治疗效果^[1]。但是目前的一些溶栓药物,如组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶(Urokinase, UK)等,会引起出血、过敏等副作用^[2]。因此,寻找无毒副作用的溶栓酶对人类的健康具有重大意义。微生物是溶栓酶的重要来源,如 β -溶血链球菌(*Streptococcus homolyticus*)^[3]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[4-6]、镰孢菌(*Fusarium pallidoroseum*)^[7]、链霉菌 Y405 (*Streptomyces* sp. Y405)^[8]和嗜麦芽寡单胞菌 DR-929 (*Stenotrophomonas maltophilia* DR-929)^[9]等,都能够分泌溶栓酶。Chitte 和 Dey^[10]还从高温温泉分离获得了 1 株链霉菌 SD5 (*Streptomyces megaloporus* strain SD5),该菌能够分泌一种耐高温的溶栓酶。据报道,微生物能够在极端环境(如低温、高温、高盐等)中存活下来,在很大程度上与其分泌的酶有关,这些酶在极端环境中经过长期的进化,往往具有特殊的生物学活性^[11-12],如上述的链霉菌 SD5 (*S. megaloporus* strain SD5)分泌的溶栓酶,能够耐受 60 ℃ 的高温^[10]。最近,本实验室从青藏高原海拔 4 300 m 的山体表层冻土中筛选获得 1 株新型溶栓菌金黄节杆菌 DR-536 (*Arthrobacter aureus* strain DR-536)^[13],动物模型试验表明,该菌分泌的溶栓酶 FA-I,经口服或注射,均具有良好的体内溶栓效果^[14],有望开发为新型溶栓药物。本试验对溶栓酶 FA-I 的发酵条件进行了初步研究,旨在为该酶的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 金黄节杆菌 DR-536 (*A. aureus* strain DR-536),由本实验室筛选获得,4 ℃ 斜面保存。

1.1.2 主要试剂 凝血酶(牛血)、纤维蛋白溶酶原(牛血)和纤维蛋白原(牛血),均购自 Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA);尿激酶标准品购于中国药品生物制品检定所(北京);其他试剂均为分析纯。

1.1.3 基础培养基 酵母膏 1.0%,氯化钠 1.0%,pH 值 7.0。

1.1.4 发酵培养基 在基础培养基的基础上,按各自的要求制备发酵培养基,分装于 150 mL 三角瓶

中,20 mL/瓶,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.1.5 纤维蛋白平板 参照文献[13]制备。取 4 mL 2.0% 琼脂糖溶液,100 ℃ 加热 30 min,冷却至 45 ℃ 左右,加入 16 μ L 牛凝血酶溶液(1 000 IU/mL)、80 μ L 纤维蛋白溶酶原溶液(10 IU/mL)以及 4 mL 0.2% 纤维蛋白原溶液,混匀,制备纤维蛋白平板(75 mm)。上述 4 种溶液均用巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH 7.8, 0.04 mol/L)配制。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备 将斜面保存的菌种接种于 20 mL LB 培养基(150 mL 三角瓶),25 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h,制备种子液。

1.2.2 发酵培养 除特殊说明外,金黄节杆菌 DR-536 的发酵培养按如下操作进行:2.0% 种子液接种于发酵培养基,25 ℃、150 r/min 摇床振荡发酵 72 h。

1.2.3 纤溶活性测定 参照文献[13]进行。发酵液 6 000 $\times g$ 离心 15 min,上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,纤维蛋白平板测定其纤溶活性。取 5 μ L 过滤除菌的发酵液滴加到纤维蛋白平板上,25 ℃ 孵育 24 h,测量水解圈直径,计算水解圈面积,以尿激酶标准品为对照计算发酵液中溶栓酶的纤溶活性,最后计算出溶栓酶相对产量。

2 结果与分析

2.1 培养基对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶的影响

2.1.1 氮源 配制 6 份不含酵母膏的基础培养基,然后分别添加 1.0% 的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、黄豆粉和小麦粉作为氮源,制备发酵培养基,研究不同氮源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA-I 的影响。由图 1 可知,利用黄豆粉为氮源时,菌株 DR-536 分泌的溶栓酶产量最高,然后依次为蛋白胨、牛肉膏、酵母膏和大豆蛋白胨,小麦粉作氮源时产量最低。

2.1.2 碳源 分别以葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉和糊精为碳源,按 1.0% 比例添加到基础培养基中制备发酵培养基,以基础培养基为对照,研究不同碳源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA-I 的影响。从图 2 可以看出,与对照相比,除乳糖能够促进溶栓酶分泌,使溶栓酶产量提高了 10.56% 外,各试验组的溶栓酶产量均有所下降,蔗糖甚至能完全抑制溶栓酶的分泌。

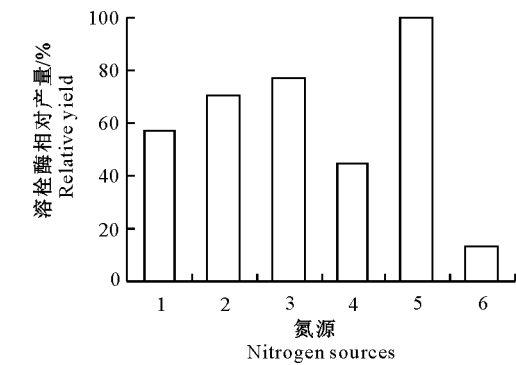


图 1 氮源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响
1. 酵母膏;2. 牛肉膏;3. 蛋白胨;4. 大豆蛋白胨;
5. 黄豆粉;6. 小麦粉

Fig. 1 Effect of nitrogen sources on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I
1. Yeast extract;2. Beef extract;3. Peptone;
4. Soybean peptone;5. Soybean powder;6. Flour

2.1.3 复配氮源 以 1.0% 黄豆粉为基础氮源,再分别添加 1.0% 的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨和小麦粉作为复配氮源,制备发酵培养基,以黄豆粉(1.0%)单一氮源培养基为对照,研究不同复配氮源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 3 表明,当黄豆粉与酵母膏复配时,溶栓酶产量提高了 7.98%,而其他复配氮源培养基中溶栓酶产量均下降。

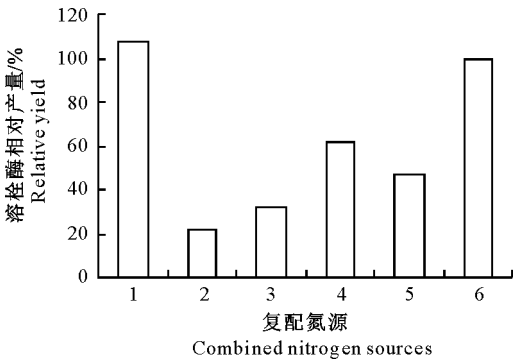


图 3 复配氮源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响
1. 酵母膏;2. 牛肉膏;3. 蛋白胨;4. 大豆蛋白胨;
5. 小麦粉;6. 对照

Fig. 3 Effect of combined nitrogen sources on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I
1. Yeast extract;2. Beef extract;3. Peptone;
4. Soybean peptone;5. Flour;6. Control

2.1.4 最佳复配氮源比 在上述各种复配氮源中,黄豆粉和酵母膏的复配效果最好。为了找出黄豆粉和酵母膏的最佳添加比例,本试验考察了黄豆粉和酵母膏添加量的变化对金黄节杆菌 DR-536(*A. au-*

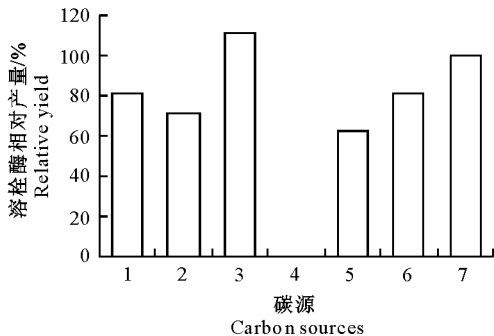


图 2 碳源对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响
1. 葡萄糖;2. 麦芽糖;3. 乳糖;4. 蔗糖;5. 可溶性淀粉;
6. 糊精;7. 对照

Fig. 2 Effect of carbon sources on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I
1. Glucose;2. Maltose;3. Lactose;4. Sucrose;
5. Soluble starch;6. Dextrine;7. Control

rescens strain DR-536) 发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。从表 1 可以看出,溶栓酶产量随着黄豆粉添加量的增加而降低,当黄豆粉添加量 $\geq 5.0\%$ 时,菌株 DR-536 基本上不分泌溶栓酶;而溶栓酶产量随着酵母膏添加量的增加而先升后降,当酵母膏添加量为 1.0% 时溶栓酶产量最高,而且当黄豆粉和酵母膏的添加量均为 1.0% 时,溶栓酶产量最高,达到 95.70 IU/mL。

表 1 黄豆粉和酵母膏不同添加量下溶栓酶 FA- I 的产量
Table 1 Yield of fibrinolytic enzyme FA- I under different concentrations of soybean powder and of yeast extract
IU/mL

酵母膏/% Yeast extract	黄豆粉/% Soybean powder			
	1.0	3.0	5.0	7.0
0.5	0	37.00	0	0
1.0	95.70	51.80	24.59	0
1.5	72.12	41.67	0	0
2.0	78.52	0	0	0

2.1.5 金属离子 分别将 CoCl_2 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 FeSO_4 、 CuSO_4 和 ZnSO_4 按 0.05% 的比例添加到基础培养基中,制备发酵培养基,以基础培养基为对照,研究不同金属离子对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 4 显示, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 能促进菌株 DR-536 分泌溶栓酶,使溶栓酶产量分别提高了 27.37%、33.22% 和 45.33%,而 Cu^{2+} 强烈抑制溶栓酶的分泌, Co^{2+} 和 Zn^{2+} 甚至完全抑制其分泌。
2.1.6 NaCl 以 0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 和 5.0% NaCl 的基础培养基为发酵培养基,考察

NaCl 对金黄节杆菌 DR-536 (*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 5 表

明,在不含 NaCl 的培养基中,菌株 DR-536 不分泌溶栓酶,NaCl 含量为 2.0%时,溶栓酶产量最高。

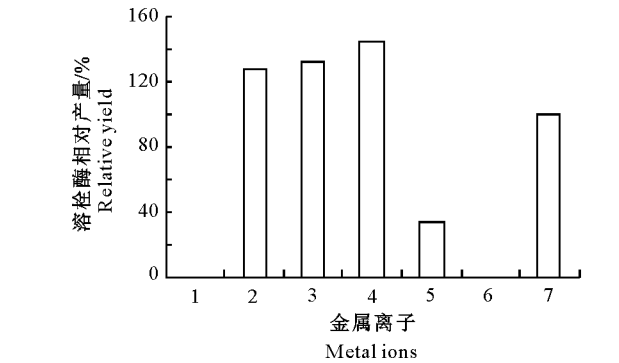


图 4 金属离子对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响

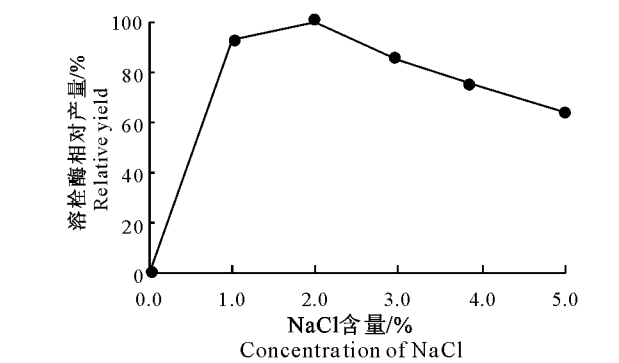


图 5 NaCl 对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响

1. Co²⁺; 2. Ca²⁺; 3. Mg²⁺; 4. Fe²⁺; 5. Cu²⁺; 6. Zn²⁺; 7. 对照
Fig. 4 Effect of carbon sources on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

Fig. 5 Effect of NaCl on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

2.1.7 初始 pH 以初始 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0 的基础培养基为发酵培养基,考察 pH 对金黄节杆菌 DR-536 (*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 6 显示,培养基 pH 为 4.0 和 5.0 时,菌株 DR-536 不分泌溶栓酶,在初始 pH 为 6.0 时溶栓酶产量达到最高,然后又随着初始 pH 值的升高逐渐降低。

产量也能达到一个较高的水平(88%~92%)。

2.2 发酵条件对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶的影响

2.2.1 接种量 20 mL 基础培养基中分别接种 2.0%, 4.0%, 6.0%, 8.0% 和 10.0% 的种子液,于 25 ℃、150 r/min 振荡发酵 72 h,考察接种量对金黄节杆菌 DR-536 (*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 7 显示,接种量为 4% 时,溶栓酶产量最高,但在其他接种量条件下,溶栓酶

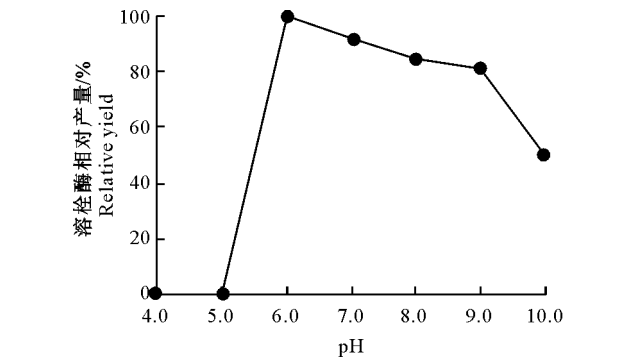


图 6 培养基初始 pH 对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响

Fig. 6 Effect of initial pH on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

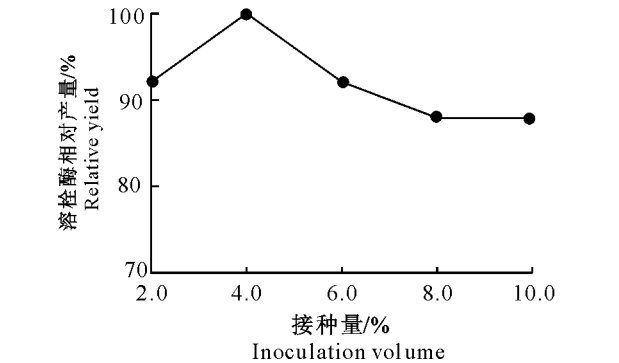


图 7 接种量对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响
Fig. 7 Effect of inoculation volume on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

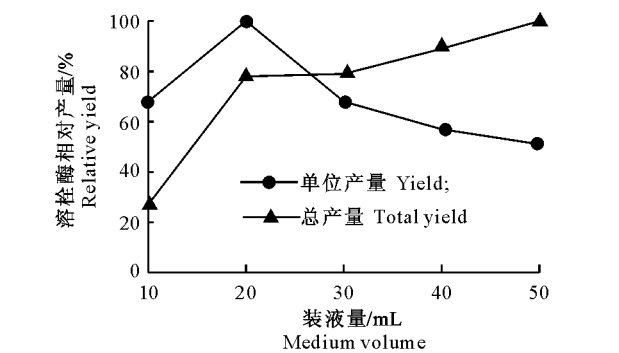


图 8 装液量对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响
Fig. 8 Effect of medium volume on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

2.2.2 装液量 150 mL 三角瓶中分别装入 10, 20,30,40 和 50 mL 基础培养基,接种 2.0% 种子液,于 25 ℃、150 r/min 振荡发酵 72 h,考察装液量对金黄节杆菌 DR-536(*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。结果(图 8)显示,溶栓酶总产量随着装液量的增加而升高,当装液量为 50 mL(150 mL 三角瓶)时,溶栓酶总产量达到最高,但其单位产量,即每 mL 发酵液中溶栓酶产量却最低;装液量为 20 mL(150 mL 三角瓶)时,溶栓酶的单位产量最高。

2.2.3 发酵时间 20 mL 基础培养基中接种 2.0%

种子液,于 25 ℃、150 r/min 分别振荡发酵 24,48, 72,96,120 和 144 h,考察发酵时间对金黄节杆菌 DR-536(*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。图 9 显示,发酵 48 h 后,溶栓酶产量迅速增加,至 72 h 时达到最高,之后开始下降。

2.2.4 发酵温度 20 mL 基础培养基中接种 2.0% 种子液,分别在 4,20,25,30,35 和 40 ℃ 下发酵 72 h,考察发酵温度对金黄节杆菌 DR-536(*A. aurescens* strain DR-536)发酵分泌溶栓酶 FA- I 的影响。结果(图 10)表明,菌株 DR-536 在 20~35 ℃ 分泌溶栓酶 FA- I,30 ℃ 时产量最高。

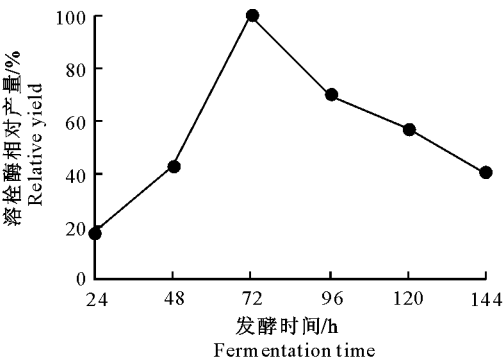


图 9 发酵时间对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响

Fig. 9 Effect of fermentation time on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

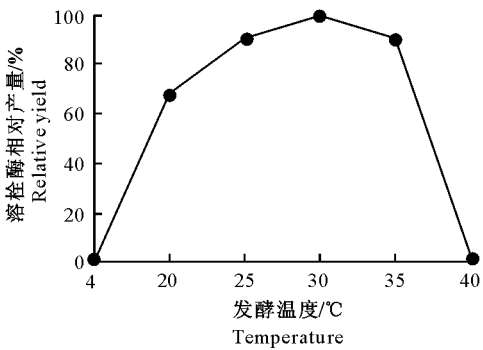


图 10 发酵温度对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶 FA- I 的影响

Fig. 10 Effect of temperature on *A. aurescens* strain DR-536 to secrete fibrinolytic enzyme FA- I

3 讨论

微生物合成次级代谢产物的能力与培养基条件密切相关,培养条件的优化与否直接影响到代谢方式及代谢物产量的变化,从而影响目标产物的产量^[15]。保证菌体生长和发酵生成目标产物所必需的各种最佳条件可以大幅度提高目标产物产量,培养基中化合物的种类和浓度对菌体生长繁殖、产物的质量和产量都有重要影响^[16],因而微生物发酵是一个受诸多环境条件影响的复杂过程,营养条件是极其重要的因素之一。培养基成分以及发酵环境条件的选择也是溶栓酶发酵制备的关键,不同溶栓菌的生理特点不同,其细胞生长和分泌溶栓酶所需的营养成分和发酵条件也会不同^[17-18]。如:对解淀粉芽孢杆菌 DC-4(*Bacilli amylolique faciens* DC-4)来说,可溶性淀粉或糊精是最佳的碳源,因为该菌株具有很强的淀粉酶分泌功能^[19];而对于链霉菌 SD5(*S. megasporus* SD5),在 55 ℃ 时其溶栓酶的产量最高,因为 SD5 是一株嗜热菌^[10]。另外,溶栓菌不

同,采取的发酵策略也不一样。如果溶栓酶产生菌属于真菌类,固体发酵(solid-state fermentation, SSF)是优先考虑的溶栓酶制备方法^[18,20-21];如果菌株属于细菌类,则应用液体发酵方法进行溶栓酶制备的效果较好^[7,22]。培养基成分和发酵条件确定后,再应用统计学的方法,通过试验设计来考察条件间的相互作用。例如,Liu 等^[23]应用数理统计方法 FFD(fractional factorial design)法和 CCD(central composite design)法优化了制备纳豆激酶(Nattokinase,NK)的培养基配方。本文初步研究了金黄节杆菌 DR-536(*A. aurescens* strain DR-536)分泌溶栓酶 FA- I 对培养基和发酵条件的要求,为应用统计学方法进一步优化溶栓酶 FA- I 的发酵条件提供了参考。

本研究氮源试验结果表明,黄豆粉最有利于菌株 DR-536 分泌溶栓酶,这可能是由于黄豆粉属于天然成分,与酵母膏、牛肉膏、蛋白胨和大豆蛋白胨等提取物相比,其营养更加丰富,而且其中含有一些成分还可能是其代谢物产生的前体物或促进剂

等^[24],因而促进了溶栓酶的分泌。但试验结果也表明,过多的黄豆粉也会抑制该酶的分泌,当黄豆粉添加量 $\geq 5.0\%$ 时,菌株 DR-536 基本上不分泌溶栓酶。同时,过多的酵母膏也会抑制溶栓酶分泌,尤其当酵母膏添加量达到 2.0% 时,添加 3.0% 的黄豆粉就能够完全抑制溶栓酶的分泌,这也说明过多的酵母膏不利于菌株 DR-536 分泌溶栓酶 FA-I。试验结果显示,适量的酵母膏(1.0%)能够促进溶栓酶的分泌,此时即使黄豆粉的添加量达到 5.0% ,菌株 DR-536 仍然分泌溶栓酶。这可能是由于过多的黄豆粉或酵母膏均增大了发酵液的黏稠度,使发酵过程中氧气供应不足,细菌生长受到抑制所致。

本研究碳源试验结果显示,除乳糖外,其他各种碳源均抑制菌株 DR-536 分泌溶栓酶 FA-I,蔗糖甚至能够完全抑制其分泌。乳糖不会抑制溶栓酶 FA-I 的分泌,这可能与菌株 DR-536 适于在中性稍偏酸性的环境中分泌溶栓酶有关,因为乳糖被分解后形成乳酸,使培养基稍呈酸性。但麦芽糖抑制溶栓酶的产量,这可能与菌株 DR-536 分解麦芽糖产生了过量的酸有关,因为在研究 pH 对金黄节杆菌 DR-536 分泌溶栓酶的影响时发现,过酸的环境会抑制溶栓酶的分泌。前期研究表明,菌株 DR-536 只在麦芽糖培养基中表现出明显的产酸性能^[13]。其他糖类均会稍微抑制溶栓酶的产生,蔗糖甚至完全抑制了溶栓酶的分泌,其中原因有待进一步研究。据彭勇等^[19]报道,解淀粉芽孢杆菌 DC-4 (*B. amyloliquefaciens* DC-4)能够利用可溶性淀粉以及糊精为碳源,分泌大量的溶栓酶^[14]。这是因为该菌分泌了淀粉酶,很好地利用了培养基中的淀粉和糊精。但本试验的金黄节杆菌 DR-536 (*A. aureus* strain DR-536)不具有水解淀粉的能力^[11],因此在培养基中添加淀粉不会促进溶栓酶分泌。

本试验还发现, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 能促进溶栓酶的分泌,但是 Cu^{2+} 对溶栓酶的分泌具有强烈的抑制效果,而 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 甚至完全抑制其分泌,这可能与这 3 种离子本身的细胞毒性有关,如 CuSO_4 一直被作为消毒剂和杀菌剂使用,所以在添加这 3 种离子的培养基中,菌株 DR-536 生长被抑制,阻碍了溶栓酶的分泌。

除营养条件影响外,菌株 DR-536 分泌溶栓酶 FA-I 还受 pH、培养时间和培养温度等诸多因素的影响。本试验结果显示,菌株 DR-536 适于在 pH 6.0、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 等条件下分泌产生溶栓酶 FA-I。试验结果还表明,随着装液量的升高,溶栓酶总产量也不

断增高,这可能是因为随着装液量的升高,向发酵液中添加的 DR-536 绝对数量也在不断增加(种子液的添加量均为 2%),因而分泌了更多的溶栓酶。试验结果还表明,菌株 DR-536 发酵培养 72 h 后分泌的溶栓酶产量最高,可能的原因是,72 h 后菌株 DR-536 的生长进入平台期,其数量不再增加,导致溶栓酶产量下降。

4 结 论

金黄节杆菌 DR-536 (*A. aureus* strain DR-536)分泌溶栓酶 FA-I 的最佳条件为:黄豆粉 1.0% ,酵母膏 1.0% , FeSO_4 0.05% , NaCl 2.0% ,起始 pH 6.0,接种量 4.0% ,装液量 $20\text{ mL}/150\text{ mL}$,发酵温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,发酵时间 72 h。因此该菌适于大规模发酵,便于溶栓酶 FA-I 的开发利用。

[参考文献]

- [1] Mine Y, Wong A H K, Jiang B. Fibrinolytic enzyme in Asian traditional fermented foods [J]. Food Res Int, 2005, 38: 243-250.
- [2] Peng Y, Yang X J, Zhang Y Z. Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties and thrombolytic activity *in vivo* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69(2): 126-132.
- [3] 梁剑光,熊晓辉,熊 强. 微生物代谢产物在溶栓药物制备中的应用研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 73-76.
Liang J G, Xiong X H, Xiong Q. Application of microbial metabolites to preparation of plasmin medicine [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2003, 25(2): 73-76. (in Chinese)
- [4] 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 diet [J]. Cell Mol Life Sci, 1987, 43: 1110-1111.
- [5] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197: 1340-1347.
- [6] 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 [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2482-2488.
- [7] El-Aassar S A. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum* [J]. Biotechnol Lett, 1995, 17: 943-948.
- [8] 王 骏,王 敏,王以光. 链霉菌产生的新型溶栓酶的纯化和性质的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 147-153.
Wang J, Wang M, Wang Y G. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. [J]. Chin J Biotechnol, 1999, 15(2): 147-153. (in Chinese)

- [9] 王高学,黄海洪,梁朝军,等.一株溶纤维蛋白细菌的筛选、鉴定及体外溶栓的研究[J].安徽农业科学,2007,35(4):964-965.
Wang G X,Huang H H,Liang C J,et al. Research on screening,identification and thrombolysis *in vitro* of a fibrinolytic bacterium[J]. Journal of Anhui Agri Sci,2007,35(4):964-965. (in Chinese)
- [10] Chitte R R,Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5[J]. Lett Appl Microbiol,2000,31:405-410.
- [11] Herbert R A. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles[J]. Trends Biotechnol,1992,10:395-401.
- [12] Burg B V D. Extremophiles as a source for novel enzymes[J]. Curr Opin Microbiol,2003,6:213-218.
- [13] 王高学,黄海洪,张 明.一株青藏高原冻土溶栓菌的筛选及鉴定[J].微生物学报,2010,50(2):148-154.
Wang G X,Huang H H,Zhang M. Isolation and identification of a fibrinolytic bacterium strain from frozen soil in the Tibetan Plateau[J]. Acta Microbiol Sinica,2010,50(2):148-154. (in Chinese)
- [14] 王高学,梁朝军,姚嘉赞,等.新型溶栓酶 FA- I 抗血栓形成和溶栓作用研究[J].四川大学学报:医学版,2009,40(2):288-291.
Wang G X,Liang C J,Yao J Y,et al. Effect of a novel fibrinolytic enzyme FA- I on thrombosis and thrombolysis[J]. J Sichuan Univ; Med Sci Edi,2009,40(2):288-291. (in Chinese)
- [15] 钱铭镛.发酵工程最优化控制[M].南京:江苏科学技术出版社,1998:46-58.
Qian M Y. Optimal control of fermentation engineering[M]. Nanjing,Jiangsu Science and Technology Press,1998:46-58. (in Chinese)
- [16] Sergio S,Arnold L. Demain metabolic regulation of fermentation processes[J]. Enzyme Microb Technol,2002,31:895-906.
- [17] Lee J,Park S,Choi W A,et al. Production of a fibrinolytic enzyme in bioreactor culture by *Bacillus subtilis* BK-17[J]. J Microbiol Biotechnol,1999,9(4):443-449.
- [18] Seo J H,Lee S P. Production of fibrinolytic enzyme from soybean grits fermented by *Bacillus firmus* NA-1[J]. J Med Food,2004,7(4):442-449.
- [19] 彭 勇,张义正.豆豉溶栓酶产生菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J].高技术通讯,2002(2):30-34.
Peng Y,Zhang Y Z. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme-producing strain DC-4 from Chinese Douchi and primary analysis of the enzyme property[J]. High Technol Lett,2002(2):30-34. (in Chinese)
- [20] Sun T,Li P,Liu B H,et al Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum* [J]. Biotechnol Lett,1997,19(5):465-467.
- [21] Sun T,Li P,Liu B H,et al. Successive cultivation of *Fusarium oxysporum* on rice chaff for economic production of fibrinolytic enzyme[J]. Bioprocess Eng,1998,18(5):379-381.
- [22] EI-Aassar S A,EI-Badry H M,Abdel-Fattah A F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9[J]. Appl Microbiol Biotchnol,1990,33:26-30.
- [23] Liu J G,Xing J M,Chang T S,et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods[J]. Process Biotech,2005,40:2757-2762.
- [24] 刘永齐,刘慧平,张 姝,等.番茄内生放线菌 Fq24 发酵条件的优化[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(7):110-114,121.
Liu Y Q,Liu H P,Zhang S,et al. Optimization of fermentation conditions of tomato *Endophytic actinomyces* Fq24[J]. Journal of Northwest A&F University; Nat Sci Ed,2009,37(7):110-114,121. (in Chinese)