

高产中性蛋白酶菌株的筛选及其产酶条件的研究

鲁 珍¹, 湛馥佳¹, 李恩中¹, 刘家扬¹, 卢自周¹, 张建设², 郜胜勤²

(1. 黄淮学院 生物工程系, 河南 驻马店 463000; 2. 河南豫坡酒业有限责任公司, 河南 西平 463900)

摘要:为从高温大曲中筛选出高产中性蛋白酶菌株, 利用生理生化实验和 16S rDNA 序列同源性鉴定和分析产酶条件。结查表明: 从已获得的 8 株产酱香菌株筛选得到高产中性蛋白酶菌株为 GX03(706.13 U·g⁻¹), 并鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。通过单因素和正交试验得到最适产酶条件: 含水量为 35%, 接种量为 11%, 氮源为硝酸钠, 初始 pH 5.5, 培养时间为 6 d, 经优化后该菌产酶性能大幅度提高, 可达 567.30 U·g⁻¹。

关键词:微生物; 酱香菌; 中性蛋白酶; 酶活

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)05-0110-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0110

高温大曲是酱香型白酒酿造过程中的重要的动力源和酿酒品控的核心指标, 其中含有的复杂多变的微生物群系和产酶的多样性赋予了酱香型白酒独特的酱香风味^[1-2]。由于传统的制作高温大曲的工艺容易受地域环境条件的影响, 大曲的质量波动较大, 每批次产酒的质量和风格上都会有一定的差异, 目前许多酒厂都会分离筛选出本酒厂的产酱香菌株强化应用到传统大曲中, 提高酱香型白酒的风味和稳定性, 提高了经济价值。

本试验从企业提供的高温大曲中分离出产中性蛋白酶活力高的酱香细菌, 并对其产酶性能进行优化, 以期为后期强化大曲生产提供高产中性蛋白酶的菌株, 并对酱香酒的产酱香机理奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大曲由河南省豫坡酒业责任有限公司提供; 麸皮、黄豆: 市售; 8 株产酱香菌: 前期实验室分离纯化得到; 平板分离培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基; 固体发酵培养基: 黄豆粉: 麸皮 = 3:2, 含水量 20%, pH 自然, 高温灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 高产中性蛋白酶菌株的获得 将初筛得到的 8 株产酱香菌株接种到种子液培养基中, 37℃ 摇床振荡培养 12 h, 之后分别以 10% 的接种量接入到固体发酵培养基中, 45℃ 培养 96 h。从

发酵好的固体发酵物中取 10.0 g 发酵物于 35 mL pH7.2 的磷酸盐缓冲溶液中, 在恒温振荡水浴锅中振荡 1 h(40℃)。最后混合液通过纱布过滤获得滤液, 供测定用(4℃ 保存), 测定中性蛋白酶的活力, 从中选出高产中性蛋白酶活力的菌株^[3]。

1.2.2 中性蛋白酶活力的测定 具体测定方法参考国标 GB/T 10317-1999。酪氨酸标准曲线方程为 $y = 0.0105x - 0.0019$ (x : 酪氨酸毫克数, $y = OD_{660\text{nm}}$, $R^2 = 0.9991$)^[4]。

中性蛋白酶活力 = $A / (10 \times 4 \times N \times 1 / (1 - W))$

式中, A 为样品在 660 nm 下测得的 OD 值; 10 为反应时间, 4 为 4 mL 反应液取出 1 mL 测定, N 为酶液的稀释倍数, W 为样品水分含量。

1.2.3 高产中性蛋白酶菌株的鉴定 首先将筛选得到的高产中性蛋白酶菌株经过分离培养后在显微镜下观察该菌株的形态特征, 并对该菌株进行生理生化实验^[5]。其次对该菌株进行分子生物学鉴定, 采用 SDS-酚抽提法^[6] 提取该菌株的 DNA, 设计特异性引物(引物名称: 27F, 1492R), 合成引物, 扩增 16S 全序列并得到扩增结果, 经 PCR 产物纯化后测序, 这些实验均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 将测序的结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 测定, 并保存比对结果。

1.2.4 高产中性蛋白酶发酵条件优化 通过单因素试验, 分别研究不同氮源(硝酸钠, 碳酸铵, 硝酸铵, 尿素, 硫酸铵)、初始 pH 值(5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5)、不同含水量(10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%)、不同接种量(3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%)、不同发酵时间(24、48、72、96、120、144、168、192 h)对产中性蛋白酶活力的

收稿日期: 2016-04-01

基金项目: 国家青年自然科学基金资助项目(51503074); 2015 年河南省重点科技攻关资助项目(152102210025)

第一作者简介: 鲁珍(1987-), 女, 硕士, 助教, 从事食品科学研究。E-mail: lzz937272481@163.com。

影响,将 GX03 菌株活化后,按 11% 的接种量接入 250 mL 三角瓶固体发酵培养基中。根据单因素试验结果确定正交试验所需的因素与水平,确定最优发酵培养基。

2 结果与分析

2.1 高产中性蛋白酶菌株的筛选结果

前期高温大曲经分离纯化培养、形态学观察并经过产香试验得到 8 株产酱香的菌株,编号分别为 GX01、GX02、GX03、GX04、GX05、GX06、GX07、GX08,将这 8 株菌接种固体发酵培养基后测定其中性蛋白酶的活力并进行比较(见表 1)。

8 株产酱香菌株产中性蛋白酶的活力各不相同,可以看出 GX03 菌株产中性蛋白酶的活力最高,GX01 菌株产中性蛋白酶的活力最低。高温大曲中的酶系和酱香型白酒独特的风格特点有着直接而复杂的联系,特别是高产中性蛋白酶活力的菌株可以帮助霉菌中的酶降解原料中的蛋白质,提高原料的利用率,同时可以生成美拉德反应的前提呈香物质^[7]。因此,本试验选择 GX03 菌株为后续研究的菌株材料。

表 2 菌株生理生化特征

Table 2 Characteristics of biochemistry and physiology

菌株 Strains	接触酶 Contact enzyme	芽孢染色 Spore staining	pH5.6 生长 Growth in pH5.6	V.P	酪蛋白水解 Casein hydrolysis	柠檬酸盐利用 Using of citric acid
GX03	+	+	+	+	+	-

2.2.2 GX03 菌株分子生物学鉴定结果 对产中性蛋白酶活力高的 GX03 菌株进行 DNA 提取,其 PCR 产物扩增的结果如图 1 所示,在 1 600 bp 处有一条特异性条带,该引物符合对扩增片段的应有长度。将扩增测序结果与 NCBI 中的 GenBank 中的数据库进行比对,并用 Mega 5.0 进行多序列比对后构建系统发育树(见图 2)。由图 2 看出,菌株 GX03 与菌株 *Bacillus amyloliquefaciens*. P-329 (KJ438702)、*Bacillus amyloliquefaciens*. B21 (KJ631112)、*Bacillus amyloliquefaciens*. H19 (KJ149809) 位于同一族群,亲缘关系最近,说明 GX03 菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.3 高产中性蛋白酶发酵条件优化

2.3.1 氮源种类对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响 由图 3 可知,当培养基的氮源为硝酸钠时,菌株 GX03 所产中性蛋白酶的活力最高,尿素和碳酸钠次之,而硫酸铵、硝酸铵为生理酸性物质,作为氮源时则会影响产酶环境的 pH,从而抑

2.2 GX03 菌株的鉴定结果

2.2.1 形态学观察及生理生化实验鉴定结果

将 GX03 菌株活化后进行培养,观察到其菌落形态周围呈圆锯齿状,表明平坦,颜色为灰白色,质地是湿润有光泽,接种时不易挑。另外,革兰氏染色的结果为紫色,镜检为杆状菌。GX03 部分生理生化试验结果见表 2,初步确定 GX03 菌株为芽孢杆菌类,还需要借助分子生物学手段进行精确鉴定。

表 1 8 种菌株产中性蛋白酶活力比较

Table 1 Comparison of neutral protease activity from the 8 bacterial Strains

菌株 Strains	中性蛋白酶酶活/(U·g ⁻¹) Neutral protease enzyme activity
GX01	31.14
GX02	64.11
GX03	137.02
GX04	94.52
GX05	40.29
GX06	82.80
GX07	61.92
GX08	75.47

制中性蛋白酶的分泌和酶的活力。因此,可以选择硝酸钠作为最佳氮源进行后续试验。

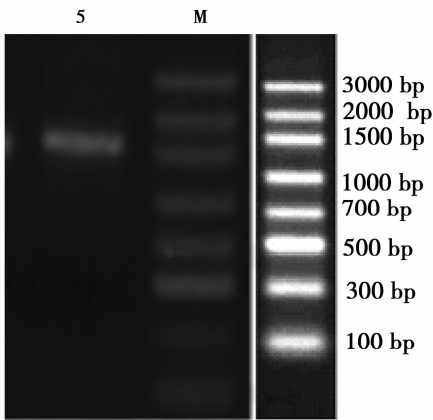


图 1 GX03 菌株 PCR 产物电泳

Fig.1 PCR products of the strain GX03

2.3.2 初始 pH 对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响 由图 4 可以看出初始 pH 对 GX03 产中性蛋白酶酶活的影响很明显,随着初始 pH 的

不断升高,酶活力也逐渐增加,当增加到 5.5 时,酶的活力最高($137.02 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),再增加后,酶的活力不断下降,因此选择初始 pH 为 5.5 作为发酵培养基初始的 pH。

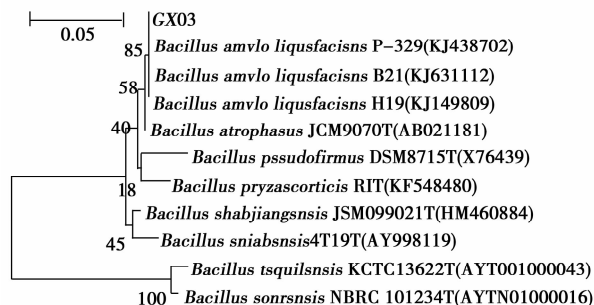


图2 GX03菌株的16S rDNA系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of GX03

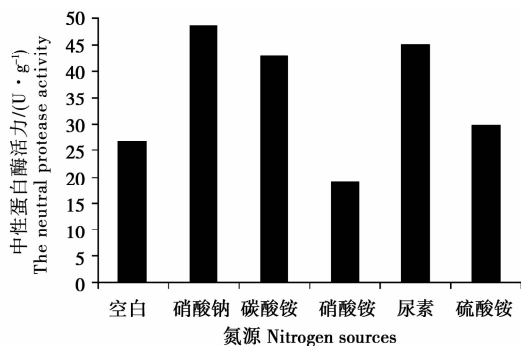


图3 氮源种类对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响
Fig. 3 The effect of nitrogen sources on the neutral protease activity of the strains

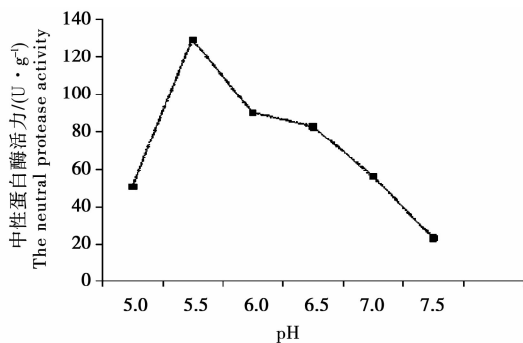


图4 初始pH值对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响
Fig. 4 The effect of the initialpH on the neutral protease activity of the strains

2.3.3 发酵培养基含水量对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响 由图5可知,GX03产中性蛋白酶酶活力随着发酵培养基含水量的增加而逐渐增加,当含水量为35%时,酶的活力最高,此后,水分含量的再增加就抑制了GX03菌株产中性蛋白酶的活力,因此,发酵培养基的含水量应该控制在35%左右。

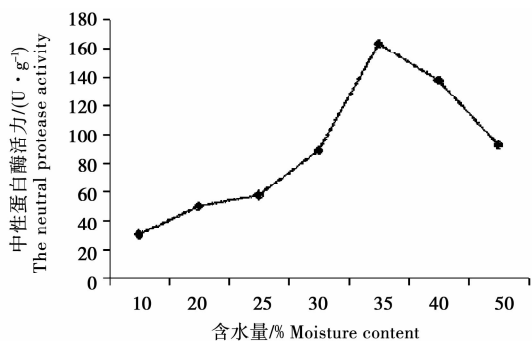


图5 发酵培养基含水量对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响
Fig. 5 The effect of moisture content on the neutral protease activity of the strains

2.3.4 菌株GX03接种量对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响 从图6可以看出,刚开始随着接种量的增加,酶的活力也是逐渐增加的,当接种量为11%时,酶活力增加的效果最好,因此GX03菌株最佳接种量可以考虑在11%左右。

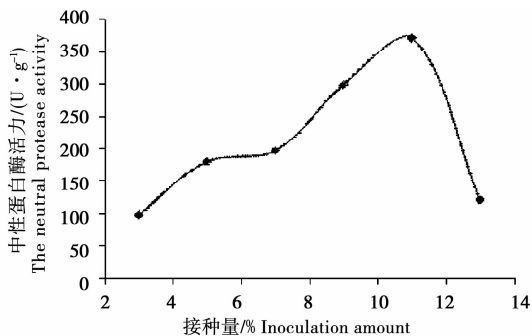


图6 菌株GX03接种量对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响
Fig. 6 The effect of the strain inoculation amount on the neutral protease activity of the strains

2.3.5 发酵时间对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响 由图7可知,随着发酵时间的延长,GX03产中性蛋白酶酶活力总体上是在逐渐增加的,当发酵到144h左右时,产中性蛋白酶的活力最高,而后随着时间的延长,酶活力逐渐下降,因此,可以选择6d左右为最佳的发酵时间,减少时间成本。

2.4 正交试验结果

根据单因素试验的结果,选取影响菌种GX03菌株产生中性蛋白酶酶活各因素中有意义的水平做正交试验,对结果进行极差分析,以确定最佳的发酵条件。以含水量(A)、接种量(B)、发酵时间(C)作为3个因素,选取3个水平进行试验。

由表4和表5可以看出,含水量、接种量、发酵时间这3个因素对中性蛋白酶酶活的影响大小依次为:含水量(A)>发酵时间(C)>接种

量(B)。三因素中,含水量的影响较为显著。经验证试验得出,在试验设计范围内,优化得到菌种GX03菌株产中性蛋白酶最佳条件为 $A_2B_2C_2$ 即含水量35%,接种量11%,培养时间6d时,中性蛋白酶的酶活可到 $567.3\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

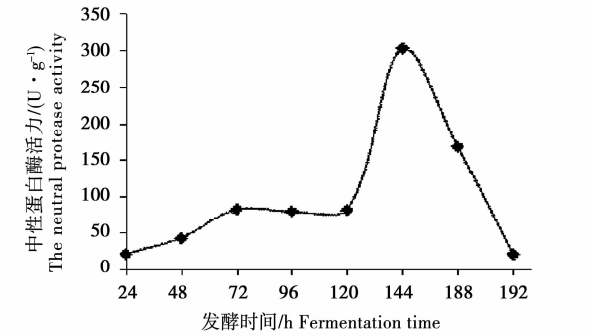


图7 发酵时间对解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶的影响
Fig. 7 The effect of the fermentation time on the neutral protease activity of the strains

表3 正交试验因素水平

因素 Factors				
水平 Levels	A 含水量/% Water content	B 接种 量/% Quantity	C 发酵时间/d Fermentation time	D 试验误差 Error
1	25	9	5	0
2	35	11	6	0
3	45	13	7	0

表4 正交试验设计结果分析

项目 I tems	A	B	C	酶活力/(U·g ⁻¹) Enzyme activity
1	1	1	1	248.00
2	1	2	2	360.40
3	1	3	3	113.73
4	2	1	2	545.20
5	2	2	3	514.00
6	2	3	1	363.20
7	3	1	3	250.67
8	3	2	1	174.27
9	3	3	2	294.17
均值 1	240.710	347.957	261.823	
均值 2	474.133	349.557	324.757	
均值 3	239.703	257.033	292.800	
极差	234.430	92.524	138.100	

表5 酱香菌发酵条件方差分析
Table 5 The results of variance analysis of the orthogonal experients

因素 Factors	偏差平方和 Deviation square sum	自由度 Degrees of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	109444.891	2	12.906	9.000	*
B	16830.180	2	1.985	9.000	
C	31506.572	2	1.000	9.000	
D	8480.442	2			

3 结论与讨论

本试验以高温大曲为原料,从前期已筛选出的8株产酱香菌进一步筛选出解淀粉芽孢杆菌产中性蛋白酶活力最高($137.02\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)。而后又通过单因素和正交试验得到最适产酶条件为含水量为35%,接种量为11%,氮源为硝酸钠,pH5.5,培养时间为6d,经优化后该菌产酶性能大幅度提高,可达 $567.30\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。从高温大曲中筛选出高产中性蛋白酶活力的解淀粉芽孢杆菌,对于优化大曲质量和制备强化大曲有着很重要的意义。如张应莲等^[8]从高温大曲中分离得到产蛋白酶活力高达 $3\,387.61\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白地霉菌株,该菌株在发酵过程中加速了蛋白质的分解和增加了美拉德反应的前体物质,促进了酱香风味的形成。本试验将分离出的解淀粉芽孢杆菌作为功能菌加入模拟的白酒固态发酵过程中,发现随着时间的延长,发酵物的酱香味也更加浓郁,其分泌的中性蛋白酶加速了原料蛋白质的降解和产生了酱香物质的前体物质。

参考文献:

[1] 张志刚,吴生文,陈飞.大曲酶系在白酒生产中的研究现状及发展方向[J].中国酿造,2011,226(1):13-16.

[2] 王耀,张龙飞,张春林,等.有益功能微生物在强化大曲生产中的应用[J].酿酒科技,2014,246(12):53-62.

[3] 曾德勇,方镒,刘涛,等.酱香型高温大曲中高产蛋白酶细菌的分离及鉴定[J].酿酒科技,2015,249(3):27-30.

[4] 吴晖,卓林霞,解检清,等.发酵条件对枯草芽孢杆菌发酵豆粕中的蛋白酶活力的影响[J].现代食品科技,2008,24(10):973-976.

[5] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社,1994.

[6] 王世宽,侯华,袁金成,等. PCR-DGGE 用于浓香型大曲微生物群落分析的条件优化[J]. 四川理工学院学报:自然科学版,2012,25(3):5-8.

[7] 袁超,崔乐芳,王瑞明. 地衣芽孢杆菌在麸曲中产中性蛋白酶发酵工艺条件的研究[J]. 酿酒科技,2011(3):40-42.

[8] 张应莲,黄永光,邱树毅,等. 酱香型白酒大曲中白地霉产蛋白酶液态发酵条件优化[J]. 酿酒科技,2012(6):32-35.

紫外分光光度法测定八角枫中水杨苷的含量

斯佳丽¹, 翟科峰^{1,2,3}, 徐佳佳¹, 胡梦雪¹, 张振馨¹, 马海洋¹, 王青遥²

(1. 宿州学院 特色种植业苗种生产工程技术研究中心, 安徽 宿州 234000; 2. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 3. 宿州学院 药物生物技术研究, 安徽 宿州 234000)

摘要:为建立紫外分光光度法测定八角枫中水杨苷的含量,以水为溶剂,回流提取八角枫中水杨苷,采用香草醛-高氯酸法显色,紫外分光光度法扫描,确定最大吸收波长,通过精密度试验,稳定性试验,加样回收试验建立水杨苷含量的测定方法。水杨苷的紫外扫描的结果表明:水杨苷的最大吸收波长为 281 nm,水杨苷标准液浓度在 34.40~172.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时浓度与吸光度呈现良好的线性关系,线性回归方程为 $Y=0.0063X-0.0107$, $r=0.999\ 3$,加样回收率为 100.29%。该方法操作简便、准确、快速,可用于八角枫中水杨苷的定量检测。

关键词:八角枫;水杨苷;紫外分光光度法;含量测定

中图分类号:S567.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)05-0114-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0114

八角枫 (*Alangium Chinese* (Lour.) Harms)
属八角枫科八角枫属植物,别名华瓜木,柽木等,

主要分布于珠江流域及长江流域各省区均,东南亚及非洲东部,且资源丰富^[1]。八角枫的根有祛风,通络,散瘀,镇痛,并有麻醉及松弛肌肉作用,主治风湿疼痛,麻木瘫痪,心力衰竭,劳伤腰痛,跌打损伤的疗效^[2]。八角枫含有糖及其苷类、氨基酸、酚类和鞣质、皂苷、甾体、三萜、强心甘、萜醌及其苷类、生物碱、有机酸等生物活性成分^[1-2]。研究显示以水杨苷为代表的苷类成分为八角枫主要活性成分^[3]。水杨苷类化合物具有解热、镇痛的功效,且在人体类的毒副作用小于其它萜醌类和吡唑酮类解热镇痛药而受到极大的关注,同时也广泛用于食品、美容等领域^[4],因此,国内外的需求量也越来越大。

收稿日期:2016-03-13
基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1608085QH185);安徽省教育厅自然科学研究重点资助项目(KJ2015A220);安徽省高校省级优秀青年人才支持计划重点资助项目(gxyq ZD2016348);宿州学院博士启动基金资助项目(2015jb12);安徽省大学生创新创业计划资助项目(201510379120);宿州区域发展协同创新中心开放课题资助项目(2015SZXTZXK-FYB03,2015SZXTXSKF03)
第一作者简介:斯佳丽(1995-),女,安徽省望江县人,在读学士,从事中药效应物质基础与作用机理研究。E-mail:sijiali@126.com。
通讯作者:翟科峰(1981-),男,安徽省无为县人,博士,讲师,从事中药效应物质基础与作用机理研究。E-mail:kefengzhai@163.com。

Screening and Isolation of High Neutral Protease Yielding Strains and Study on the Best Fermentation Performance

LU Zhen¹, CHEN Fu-jia¹, LI En-zhong¹, LIU Jia-yang¹, LU Zi-zhou¹, ZHANG Jian-she², GAO Sheng-qin²

(1. Biological Engineering Department of Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000; 2. Henan Yupo Limited Company, Zhumadian, Henan 463900)

Abstract: In order to extract the strains with high yield neutral protease from high temperature Daqu, enzyme production conditions were studied and authenticated. 8 Jiangxiang bacterial strains were isolated from the high temperature Daqu before, and the strain GX03 with high-yield of neutral protease was isolated from the 8 Jiangxiang bacterial strains. It was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through the physiological and biochemical characteristics and molecular identification. The optimal condition for the fermentation were as follows: moisture content 35%, the strain inoculation amount 11%, NaNO_3 as nitrogen source, the initial pH 5.5, fermentation time for 6 days. Under this conditon, the neutral protease was $567.30\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$.

Keywords: microorganism; sauce bacterium; neutral protease; enzyme activity