

文章编号: 1000-5862(2015)05-0497-05

1 株传统曲霉型豆豉中高活力蛋白酶产生菌的分离及其鉴定

杨林, 王筱兰*, 杨慧林, 张菊, 谢雅雯

(江西师范大学生命科学学院, 江西南昌 330022)

摘要: 豆豉是一种以大豆作为原料经过微生物发酵而形成的传统发酵食品. 在发酵过程中, 蛋白酶产生菌是其优势菌株并发挥着重要作用. 通过对传统曲霉型豆豉发酵过程中的微生物进行分离、初筛和复筛, 筛选获得1株高产蛋白酶的菌株. 经测定其酶活力为 $2\ 231\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$. 通过生理生化及16S DNA分子鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌. 获得的高活力蛋白酶产生菌将为后续制作风味良好的豆豉提供基础, 同时也为工业化生产蛋白酶提供菌种资源.

关键词: 豆豉; 蛋白酶产生菌; 筛选; 鉴定; 解淀粉芽孢杆菌

中图分类号: S 718.81 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.05.12

0 引言

传统豆豉按照制曲微生物的类型不同, 分为曲霉型豆豉、细菌型豆豉、毛霉型豆豉^[1], 在我国南方由于地理和气候的原因, 适合曲霉型豆豉的发酵, 曲霉型豆豉中含有很多对人体有益的营养成分^[2], 具有很高的药用价值^[3-4]. 传统曲霉型豆豉一般采用自然发酵法进行发酵, 由于自然发酵中的微生物来自于空气中, 种类繁多, 而且很不稳定, 发酵能力良莠不齐^[5], 生产能力不稳定, 导致传统曲霉型豆豉的质量容易受到各种因素的影响, 再加上产品运输和保藏不方便, 因此传统曲霉型豆豉的大规模工业化生产和纯种发酵受到一定的限制.

在其发酵过程中, 蛋白酶产生菌是发酵过程中的优势菌株, 并发挥着极其重要作用, 它分泌的胞外蛋白酶可直接作用于大豆蛋白, 将蛋白质水解成小分子肽类和游离态氨基酸, 这些小分子物质不仅容易被人体吸收, 而且还有较强的生物活性. 此外, 这些物质在豆豉的风味上也有很大的贡献^[6], 因此使用蛋白酶产生菌产生的胞外蛋白酶来缩短发酵周期和提高风味被认为是最简单和行之有效的方法^[7-10].

本文通过对传统豆豉发酵过程中的微生物进行分离纯化、初筛和复筛, 获得1株高产蛋白酶菌株,

经测定其酶活力为 $2\ 231\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$. 通过生理生化及16S DNA分子鉴定^[11]该菌株为解淀粉芽孢杆菌. 获得的高活力蛋白酶产生菌将为后续制作风味良好的豆豉提供基础, 同时也为工业化生产蛋白酶提供菌种资源.

1 材料与方法

1.1 材料和设备

1.1.1 实验原料 制曲阶段和发酵阶段的豆豉样品采自南昌稻香园食品有限公司, 采样后将样品用自封袋装好放置在 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻保藏.

1.1.2 实验试剂 福林酚试剂, $0.4\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液, $0.4\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸, pH 值为 7.5 的磷酸缓冲液, $10\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酪素溶液, $100\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酪氨酸溶液.

1.1.3 培养基 肉汤培养基: 蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 0.3%, 氯化钠 0.5%, pH 值为 7.2; 酪素筛选培养基: 干酪素 1.0%, 牛肉浸粉 0.3%, 磷酸氢二钾 0.2%, 溴百里香酚兰 0.005%, 琼脂粉 2.0%, pH 值为 7.4; 发酵培养基: 干酪素 0.5%, 葡萄糖 0.1%, 酵母浸粉 0.1%, K_2HPO_4 0.4%, KH_2PO_4 0.05%, MgSO_4 0.01%, pH 值为 7.4.

1.1.4 实验仪器 主要仪器有 pH 计、移液枪、恒

收稿日期: 2015-03-23

基金项目: 科技部 2014 农业科技成果转化项目, 国家自然科学基金 (31360217) 和江西省科技厅支撑计划 (20142BBG70016) 资助项目.

通信作者: 王筱兰 (1965-), 女, 江西景德镇人, 教授, 博士, 主要从事生物工艺原理、生物工程设备方面的研究.

温振荡器、显微镜、分光光度计、水式恒温培养箱、不锈钢高压蒸汽灭菌锅、恒温水浴锅、台式离心机、超净工作台、电炉、电热鼓风干燥箱、电子天平。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的分离和纯化 采集制曲阶段第4天和发酵阶段第4天的豆豉各1g,分别定容于10 mL生理盐水中,漩涡振荡30 min,采用平板稀释法,各取菌液200 μ L涂布在酪素筛选培养基上,在36 $^{\circ}$ C下培养48 h,挑出能后产生透明圈的菌落,在平板上重复划线3次以上,直到得到单菌落^[12]。

1.2.2 菌种初筛 将纯化的单菌落用点接法点接到酪素分离培养基中,挑选透明圈直径与菌落直径比值较大的菌落^[13]。

1.2.3 菌种复筛 将初筛所获得的菌株接种到肉汤培养基中,在36 $^{\circ}$ C、170 $r \cdot \min^{-1}$ 下摇床培养24 h,将培养好的菌液吸取1 mL放到含50 mL的酪素发酵培养基的250 mL三角瓶中,菌液的装液量为50 mL,在36 $^{\circ}$ C下振荡培养48 h^[14],于转速10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 下离心10 min,取上清液,采用福林酚法^[15]测定该菌株蛋白酶的活力。

1.3 形态学观察和生理生化实验

将获得的菌株进行革兰氏染色和芽孢染色,用显微镜观察菌株的形态^[16],并且对该菌株进行生理生化的鉴定。以枯草芽孢杆菌作为参照,对菌种进行部分生理生化特征的测定,包括明胶液化、糖发酵、吲哚试验、V-P试验、硝酸盐还原、丙二酸盐的利用、柠檬酸盐的利用、甘露醇试验、过氧化氢酶试验、甲基红试验、 $FeSO_4$ 试验、软磷脂酶试验、淀粉水解等试验。具体培养基配制和鉴定参见文献^[17-21]。

1.4 菌株分子鉴定

1.4.1 总DNA的提取 按照OMEGA公司的细菌基因组DNA提取试剂盒说明书上的方法来提取总DNA,对细菌进行基因DNA的提取纯化及后续16S rDNA序列分析。

1.4.2 PCR扩增16S rDNA及序列鉴定 依据细菌16S rDNA中最保守的序列设计引物,其中正向引物为27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为1492R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR反应体系50 μ L,采用宝生物的EX-taq酶进行PCR扩增。热循环参数95 $^{\circ}$ C预变性3 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,循环30次,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应结束后取3 μ L PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上进行电泳,然后再将产物送至上海生工进行测序。

1.4.3 系统发育树的构建 将细菌测序的16S rD-

NA核苷酸序列同GenBank数据库中的*Bacillus myloliquefaciens*(JX907998.11)、*Bacillus nemarorocia-ta*(AY820954)、*Bacillus vallismortis*(41172514)、*Bacillus arrophaeus*(AB363731.1)、*Bacillus pumilus*(KC953599.1)、*Bacillus acidicola*(AF547209.1)、*Bacillus mrisflavi*(JX009137.1)、*Bacillus merhanolicus*(AB112727.1)、*Bacillus thaonohiensis*(JQ796719.1)这10个细菌的16S rDNA核苷酸序列进行比较,采用MEGA6软件对菌株的序列进行了系统发育分析,采用Nerghbour-joining方法构建系统发育树,并进行Bootstrap分析,重复次数为1 000次。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化

用梯度稀释法在酪素筛选培养基上找到了10株产生水解透明圈的菌落,将其在肉汤固体培养基中进行划线分离纯化,酪素筛选培养基上产生透明圈的菌落见图1,分离纯化后的菌落见图2。

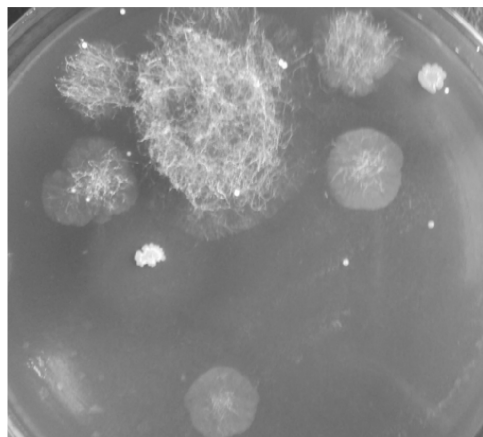


图1 产生透明圈的菌落

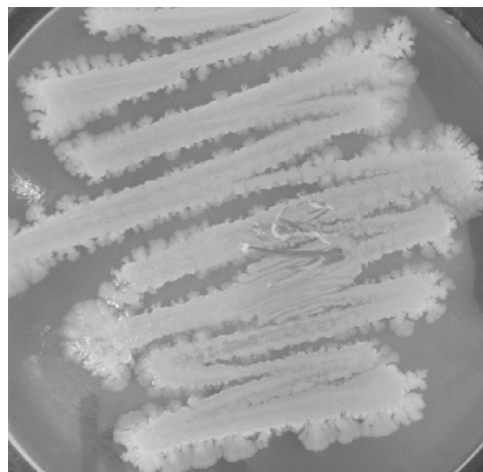


图2 分离纯化后的菌落

由图1可知,产生透明圈的菌落为目的菌落,共

分离出 21 株产透明圈的菌株,该菌落分离纯化后如图 2 所示,其菌落形态与枯草芽孢杆菌的菌落特征类似。

2.2 菌种的初筛

将分离纯化后的 21 株产透明圈的菌株进行初筛,比较菌落的 HC(D/d) 值,细菌 HC 值的比较见表 1。由表 1 可知,编号为 2、4、5、6、15、21 号的这 6 株菌株的菌落 HC 值较大,将这 6 株菌株进行复筛。

表 1 产生透明圈的细菌的 HC 值比较

编号	HC 值	编号	HC 值
1	4.40	12	4.25
2	5.97	13	4.83
3	4.35	14	4.43
4	4.92	15	5.73
5	5.06	16	4.22
6	5.45	17	4.63
7	4.46	18	4.92
8	4.88	19	3.01
9	4.66	20	3.02
10	4.61	21	5.15
11	4.76		

2.3 菌种的复筛

将编号为 2、4、5、6、15、21 的这 6 株菌用福林酚法测其蛋白酶的活性,结果如图 3 和表 2 所示。

由表 2 可知编号为 2 的菌株蛋白酶活力较高,酶活力达到 $2\ 231\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 2 号菌株进行形态学观察和生理生化实验。

2.4 菌种的形态学观察和生理生化实验

2.4.1 菌种形态学观察 2 号细菌菌落特征为:菌落直径 8~12 mm,呈白色不透明菌落,表面粗糙,菌落边缘不规则,在多种培养基上均不产色素。该细菌显微形态特征为:菌体呈短杆状,染色均匀,具运动性,兼性厌氧,可形成内生芽孢,芽孢囊膨大,呈椭圆形,游离芽孢表面着色弱,革兰氏染色阳性,用番红和孔雀绿染色后在 100 倍显微镜下观察到的芽孢形态和革兰氏染色后再 400 倍显微镜下观察到的菌体形态见图 4 和图 5。

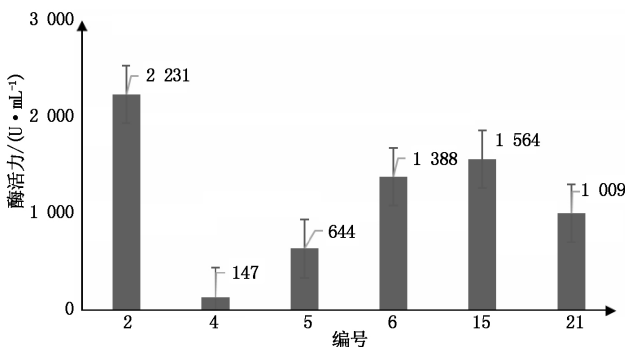


图 3 细菌蛋白酶活力比较

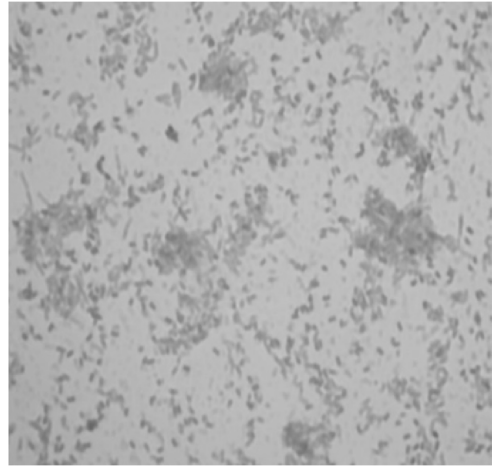


图 4 菌株芽孢染色

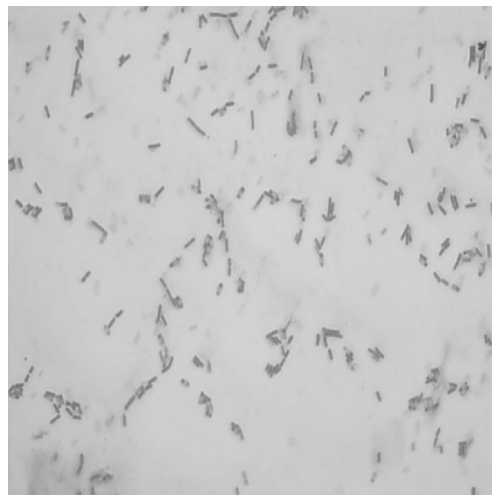


图 5 菌株革兰氏染色

2.4.2 菌种生理生化实验 对照《常见细菌鉴定手册》中对芽孢杆菌的特征描述,以及按照文献中提供地鉴定依据,初步鉴定 2 号菌株为芽孢杆菌科芽孢杆菌属。综合以上试验结果,选择 2 号进行分子生物学鉴定。

表 2 菌株生理生化实验

特性	结果	特性	结果
产 H ₂ S	-	酪素水解试验	+
V. P 试验	+	D-葡萄糖水解试验	+
吲哚试验	-	甘露醇水解试验	+
甲基红试验	+	乳糖水解试验	-
硝酸盐还原	+	蔗糖水解试验	+
过氧化氢酶试验	+	木糖水解试验	+
明胶水解试验	+	柠檬酸的利用	+
淀粉水解试验	+	丙酸盐的利用	+

注:表中“+”表示反应为阳性“-”表示反应为阴性。

2.5 分子生物学鉴定

2.5.1 PCR 扩增片段结果 对 2 号芽孢杆菌进行 16S rDNA 序列测定,重命名为 Jxnuwy-1,PCR 图谱

见图6.

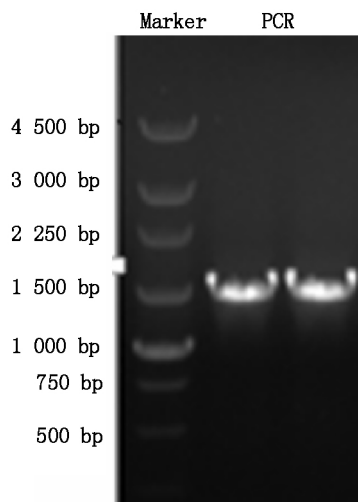


图6 PCR产物电泳图

由图6可知,约在1500 bp处出现PCR扩增产物条带,并送样测序.

2.5.2 测序及系统发育树的构建 基因序列分析显示,芽孢杆菌 Jxnuwy-1 的序列长度为1457 bp,芽孢杆菌 Jxnuwy-1 的基因登陆号为 KP419723. 将序列于 GenBank 中的相关菌株的对应序列进行比较,建立的系统发育树如图7.

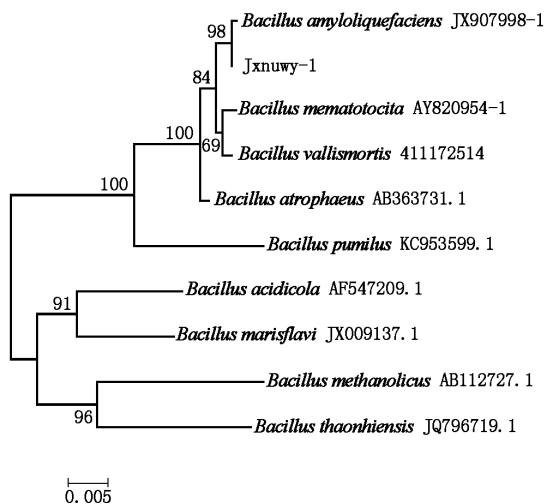


图7 采用 Nergbour-joining 方法构建的系统发育树

由图7可知芽孢杆菌 Jxnuwy-1 的16S rDNA 核苷酸序列与 *Bacillus amyloliquefaciens* (登记号为 JX907998.1) 的16S rDNA 核苷酸序列同源性最高,最大相似性(max ident)达到98%,证明此菌株为解淀粉芽孢杆菌.

3 结论

本实验以传统曲霉型豆豉作为样品,经过分离纯化得到1株产蛋白酶优势菌株,再以蛋白酶酶活

力为指标,筛选出酶活力较高的菌株.对这株菌株进行形态学、生理生化实验和分子生物学鉴定.综合菌株的形态学特征、生理生化特征及同源性和系统发育分析,将该菌株鉴定为芽孢杆菌属的亚种解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*).

本实验筛选的蛋白酶产生菌在豆豉发酵过程中起着非常重要的作用,如果能对蛋白酶产生菌产酶和生长条件等进行进一步了解,就有可能缩短发酵时间,调高豆豉的品质,这对于传统豆豉发酵迈向纯种发酵具有重大意义.因此,将进一步对该菌株最适生长条件、对所产蛋白酶进行分离纯化、氨基酸组成以及该菌株在豆豉中的复配实验进行研究,为改善传统豆豉的风味和对其更多的开发利用提供更多科学理论依据.

4 参考文献

- [1] 胡会萍,李秀娟,黄贤刚.传统豆豉微生物学研究综述[J].中国调味品,2012,37(6):4-7.
- [2] 张建华.曲霉型豆豉发酵机理及其功能性的研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [3] Fujita H, Yamagami T. Fermented soybean-derived Tou-chi-extract with anti-diabetic effect via α -glucosidase inhibitory action in a long-term administration study with KKA y mice [J]. Life Sciences 2001, 70(2):219-227.
- [4] Chen Yuchi, Sugiyama Y, Abe N, et al. DPPH radical-scavenging compounds from dou-chi, a soybean fermented food [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(5):999-1006.
- [5] 蒋立文,周传云,李宗军.传统发酵大豆制品的质量与安全控制探讨[J].中国酿造,2006,25(1):1-3.
- [6] 李小永,陈伟,程芳,等.1株细菌型豆豉发酵菌种的筛选及鉴定[J].食品工业科技,2011(11):212-215.
- [7] Tanous C, Kieronczyk A, Helinck S, et al. Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains [M]//Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Springer Netherlands, 2002:271-278.
- [8] Anjani K, Kailasapathy K, Phillips M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening [J]. International Dairy Journal 2007, 17(1):79-86.
- [9] Broncano J M, Timón M L, Parra V, et al. Use of proteases to improve oxidative stability of fermented sausages by increasing low molecular weight compounds with antioxidant activity [J]. Food Research International, 2011, 44(9):2655-2659.
- [10] Kilcawley K N, Nongonierma A B, Hannon J A, et al. Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening [J]. International Dairy Journal,

- 2012 26(1): 50-57.
- [11] Guan Yongyu ,Wu M ,Ge Q ,et al. The screening and identification of superior strains from *Aspergillus*-type Dou-chi [J]. Science and Technology of Food Industry 2012 23: 041.
- [12] 杨志波,王修俊,艾静汶等. 豆豉发酵优势菌种的筛选与鉴定 [J]. 中国调味品 2014 39(7): 13-17.
- [13] 成堃,路福平,李玉等. 产碱性蛋白酶菌株的筛选、分子鉴定及其酶学性质的初步研究 [J]. 中国酿造, 2009 28(2): 33-36.
- [14] 王长远,周静. 高产蛋白酶菌株的分离鉴定及诱变 [J]. 食品工业科技 2013 34(9): 172-174.
- [15] 任健,童应凯,黄亮等. 饲料发酵过程中蛋白酶活力的在线监测 [J]. 中国农学通报 2011 27(23): 25-28.
- [16] 权春善,王军华,徐洪涛等. 1株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究 [J]. 微生物学报 2006 46(1): 7-12.
- [17] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [18] Buchanan R E ,Gibbens N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [19] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] 黎小军,谢莲萍,刘建宏等. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2014 38(1): 14-18.
- [21] 曾庆桂,颜日明,张志斌等. 1株羊蹄强拮抗内生芽孢杆菌 Hg 的分离鉴定 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2011 35(1): 41-44.

A Strain of High Activity of Protease Producing Bacteria Isolation and Identification in the Traditional Type *Aspergillus Tempeh*

YANG Lin ,WANG Xiaolan* ,YANG Huilin ZHANG Ju ,XIE Yawen
(College of Life Sciences ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: Lobster sauce is a kind of soybean as raw material by microorganism fermentation and made of traditional fermented food. The proteinase strain is adominant bacteria and play an important role in the process of the fermentation. This article screen an strain of high yield protease through the process of separation ,the first screening and the second screening in traditional fermented soybean fermentation microorganisms. Through determination ,the enzyme activity $2\ 231\ \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$. Through the physiological and biochemical and 16S rDNA molecular identification ,the strain is *Bacillus amyloliquefaciens*. The high-yield alkaline protease producing strain that this study obtained will provide foundation for subsequent production good flavor fermented soya beans at the same time provide species resources for industrial production of protease.

Key words: type aspergillus tempeh screening; identification; *Bacillus amyloliquefaciens*

(责任编辑: 刘显亮)