

文章编号:1000-5862(2020)02-0196-06

豆豉中 β -甘露聚糖酶高产菌的分离、鉴定及其酶学性质

赵文鹏,李浩,王筱兰*

(江西师范大学生命科学学院,江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,江西南昌 330022)

摘要:通过对传统曲霉型豆豉菌群分离纯化,结合刚果红显色及DNS筛选法,共得到高产 β -甘露聚糖酶且形态学差异较大的细菌4株、真菌1株,其中真菌的酶活力为 $2\ 016\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。经过序列鉴定与比对,细菌鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)不同种,真菌为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。酶学性质研究表明:黑曲霉的最适温度和pH值分别为 $60\ ^\circ\text{C}$ 和5.0;4株芽孢杆菌最适作用温度和pH值范围为 $40\sim 55\ ^\circ\text{C}$ 和 $6.0\sim 7.0$,其中1株芽孢杆菌在 $65\ ^\circ\text{C}$ 时保温240 min或在pH值为9.0时保留30 min,残留相对酶活仍可达61.4%或84.3%。

关键词: β -甘露聚糖酶;豆豉;分离筛选;酶学性质

中图分类号:TS 201 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.02.15

0 引言

豆豉是一种以大豆为主要原料,经过发酵而制成的传统调味副食品。依据制曲微生物的不同,豆豉主要可分为曲霉型、毛霉型、细菌型等类别,各类豆豉外在呈现为不同的营养风味^[1],其中一个重要原因是各类豆豉微生物分泌酶系的差异。而豆豉发酵微生物产酶往往以蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等主酶系为主,过去许多研究也针对豆豉产主酶系的微生物进行了报道^[2-3]。近年来,一些研究者利用高通量测序技术等研究了豆豉发酵中的微生物区系^[4-5],发现豆豉微生物种类往往比预期复杂得多,这就意味着豆豉发酵中的一些功能酶没有得到充分挖掘。

甘露聚糖是半纤维素主要成分之一,在自然中蕴含丰富。显然,若能借助 β -甘露聚糖酶使其得到充分开发,将带来巨大的社会和经济效益。就 β -甘露聚糖酶的来源来看,虽然植物、动物及微生物中都普遍存在,但微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有提取简单、低成本、高稳定性、高活性等诸多优点,故备受国内外研究者的关注,而研究的重点领域包括产酶菌株的选育、产酶条件的优化及酶基因的克隆表达、改造等方面,其中筛选性能良好的产甘露聚糖酶的

菌株一直是探索的重要方向^[6],如孙会忠等^[7]从牡丹内生菌中筛选出1株高酶活的产酶菌株,也有研究者从碱湖中筛选出产碱性甘露聚糖酶的菌种*Bacillus agaradhaerens*。然而,鲜见关于从豆豉发酵菌群中筛选出产 β -甘露聚糖酶菌株的报道。

本文以不同发酵期的豆豉为材料,基于分离纯化后的微生物,对其中产 β -甘露聚糖酶的菌株进行了筛选、鉴定,并对高产菌株的粗酶液的基本性质进行了探究,以期丰富产 β -甘露聚糖酶的微生物遗传资源,并为后续 β -甘露聚糖酶基因的克隆、改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料 豆豉样品采自南昌稻香园调味品有限公司,采集阶段为发酵1、3、6、10 d,样品采集完毕后装入灭菌自封袋并尽快运回实验室,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。

1.1.2 实验试剂 生理盐水,刚果红,DNS试剂,柠檬酸缓冲液, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 。

1.1.3 培养基 筛选平板培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):魔芋胶5.00, NH_4Cl 5.00, KH_2PO_4 1.00, MgSO_4 0.10,琼

收稿日期:2019-11-14

基金项目:国家自然科学基金(31760449)资助项目。

通信作者:王筱兰(1965-),女,江西景德镇人,教授,博士,主要从事食品生物化学及微生物发酵研究。E-mail:xlwang08@aliyun.com

脂 20.00, pH 值 6.0; 细菌种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 魔芋胶 5.00, 酵母抽提物 50.00, 蛋白胨 10.00, 氯化钠 5.00, 自然 pH 值; 细菌发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 魔芋胶 5.00, 酵母抽提物 50.00, 蛋白胨 10.00, KH_2PO_4 5.00, MgSO_4 0.25, 自然 pH 值^[9]; 真菌种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 魔芋胶 5.00, 酵母提取物 5.00, 蛋白胨 10.00, 葡萄糖 10.00, pH 值 6.0; 真菌发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 酵母膏 13.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.00, 魔芋胶 5.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CaCl_2 0.50, K_2HPO_4 7.54, KH_2PO_4 0.23, pH 值 6.0^[10]; BHI 培养基与 PDA 培养基为购置的成品, 灭菌后分别添加纳他霉素($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)及氯霉素($0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[11].

1.1.4 实验仪器 电子天平, pH 计, 移液器, 酶标仪, 电泳仪, 凝胶成像仪, 超净工作台, 高压蒸汽灭菌锅, 恒温培养箱, 恒温水浴锅, 恒温摇床, PCR 仪, 高速离心机.

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 称取 4 个发酵阶段的豆豉各 5 g, 分别加入 50 mL 生理盐水, 摇床振荡 30 min, 取适宜稀释度的菌液分别涂布在 BHI 或 PDA 固体培养基上, 用于细菌或真菌的分离. 细菌于 36 °C 培养 24 h, 真菌 30 °C 培养 72 h. 挑出若干单菌落再次分离划线, 直至得到单菌落.

1.2.2 菌株的初筛与复筛 将各阶段的细菌点接于筛选平板中, 另按同一布局点接于 BHI 平板中备用. 培养 16 h 后, 对筛选平板进行刚果红染色及生理盐水脱色. 按形态差异, 每个形态各挑选出透明圈直径(H)与菌落直径(C)比值较大的 4~5 株, 再次点接筛选平板复筛, 确定同一形态中最高酶活的细菌株. 由于真菌种类较少且大多数都有扩散生长、产色素的特性, 故采用种子液的摇瓶发酵法对其筛选.

1.2.3 产酶菌株的摇瓶发酵 挑取复筛后的细菌株及分离得到的真菌, 分别接入不同的种子培养基. 细菌于种子液中培养 12 h 后, 接入发酵培养基继续发酵 16 h 后离心得到粗酶液. 真菌于种子培养基中培养 72 h 后离心得到上清, 在按下述方法测定酶活力后, 选取最高酶活的菌株转入真菌发酵培养基培养 96 h, 离心后得到发酵上清液.

1.2.4 β -甘露聚糖酶活力的测定 (i) 甘露糖标准曲线的绘制: 参照文献[12]的方法绘制标准曲线, 每组 3 个平行. 以甘露糖浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标 x , 吸光度值为纵坐标 y , 绘制标准曲线; (ii) β -甘露聚糖酶活力测定: 参照文献[13]的方法适当修改, 取粗酶液 20 μL 与 80 μL 0.5% 的魔芋胶溶液

(Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液配制, pH 值为 6.0) 充分混匀并短暂离心, 置于 55 °C 水浴反应 30 min 加入 100 μL DNS 沸水浴 10 min, 冷却后定容至 1.0 mL 测定 OD_{540} , 以蒸馏水代替酶液作为对照组; (iii) β -甘露聚糖酶活力计算: 酶活力定义为在所选取的反应条件下, 以每分钟水解底物产生相当 1 μmol D -甘露糖所需要的酶液量定义为 1 个酶活力单位($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 具体计算方法参照文献[14].

1.2.5 高酶活菌株的鉴定 利用试剂盒提取复筛得到的各菌株的基因组 DNA, 通过 27F/1492R 及 ITS1/ITS4 2 对引物分别对细菌、真菌的基因保守片段进行 PCR 扩增, 具体条件参照文献[15], 扩增完毕使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物质量后, 送至上海生工测序. 源性序列比对分析用 NCBI 中的 BLAST 软件进行分析, 采用 MEGA 软件对各菌株进行系统发育分析, 系统发育树的构建采用 Neighbor-joining 法.

1.2.6 酶学性质研究 (i) 最适反应温度: 分别在 25、35、45、55、65、75 °C 下按照标准方法测定粗酶液的酶活, 以酶活力最高者为 100%; (ii) 酶的温度稳定性: 将酶液分别在 35、45、55、65 °C 温度下保温不同时长, 按标准方法测定残余酶活; (iii) 最适反应 pH 值: 用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液及 1/15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 - NaH_2PO_4 分别配制不同 pH 值的底物溶液, 按标准方法测定酶活. 以酶活力最高者为 100%; (iv) 酶的 pH 值稳定性: 将酶液分别于不同 pH 值的缓冲溶液(同(iii))中于 30 °C 放置 1 h, 按标准方法测定残余酶活, 以初始酶活为 100%. 每组 3 个平行, 取平均值计算相对酶活力.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化

稀释涂布后, 4 个发酵阶段(编号分别为 A、B、C、D)菌群总数存在较大差异, 其中发酵前期较高(约 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$). 各阶段菌落形态种类大致相当, 其中以芽孢菌属典型特征(表面粗糙、不透明、褶皱、乳白或褐色)的菌落为大多数, 而真菌则主要包括曲霉状真菌、部分毛霉状真菌及少量酵母菌.

2.2 产酶细菌株的初筛、复筛

每个发酵阶段各选择分离单菌株(40 株)进行点板初筛(见图 1(a)和图 1(b)). 初筛中选择每个形态 H_c (H/C) 值的前 4~5 株, 共 18 株进入复筛(见图 1(c)). 复筛中最终确定每个形态 H_c 值最高

的细菌株,各形态 H_c 值的最高株分别为 A-8、B-3、B-6、C-3(见表1),其中 B-3 的 H_c 值为 6.84,故选择

表1 产较大水解圈的细菌 H_c 值比较

| 编号 | H_c 值 |
|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| A-4 | 3.73 | B-3 | 6.84 | C-3 | 3.59 | D-5 | 2.89 |
| A-8 | 4.82 | B-6 | 4.16 | C-19 | 3.93 | D-14 | 3.65 |
| A-14 | 5.94 | B-21 | 4.75 | C-26 | 5.18 | D-22 | 5.81 |
| A-17 | 3.25 | B-28 | 3.06 | C-31 | 4.57 | D-37 | 6.40 |
| | | B-33 | 6.41 | C-36 | 5.37 | | |



图1 产酶细菌株初筛及复筛

2.3 摇瓶发酵与 β -甘露聚糖酶活力的测定

实验结果表明,甘露糖含量与吸光度 OD_{540} 值标准曲线方程为 $y = 1.0016x - 0.0098$,且相关性 ($R^2 = 0.9995$)良好(见图2),满足后续酶活力测定的要求.

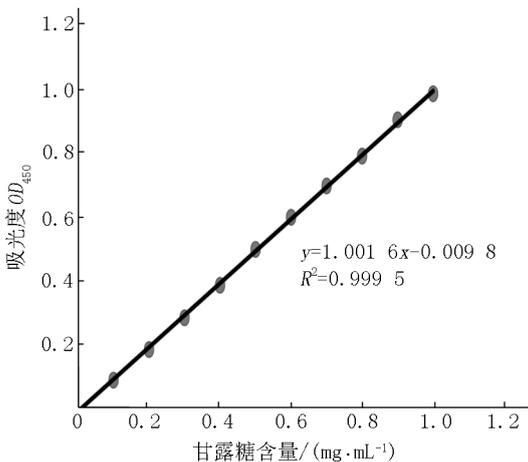


图2 甘露糖标准曲线

将各真菌接入种子液发酵后,结合标准曲线,通过 DNS 法筛选出 1 株最高酶活的真菌 Fu-2,该株真菌及 4 株细菌形态如图 3 所示.通过对 4 株细菌及该株真菌酶活进行测定发现:就细菌来看,B-3 酶活最高($1845 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$),与筛选平板结果基本一致,而从整体来看,真菌的发酵液酶活更高,达到 $2016 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (见图4).

2.4 高产酶菌株的分子鉴定

PCR 扩增结果表明:4 株细菌 16S 保守区域的 PCR 产物均为明亮单一条带,约为 1500 bp,真菌的 ITS 扩增产物大小约为 600 bp(见图5).

基于序列与 GenBank 中相关细菌菌株的对应序列比较的结果,建立系统发育树(见图6).分析表明:4 株细菌均属于 *Bacillus* 属,但分属于不同种.其中 A-8 菌株与 *Bacillus tequilensis* 相似程度最高,B-3、B-6、C-3 则分别与 *Bacillus. Velezensis*、*Bacillus. subtilis* 和 *B. licheniformis* 同源性最高.另外,根据 BLAST 在线分析结果,最高酶活的真菌鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*).



图3 5株高产酶菌株的基本形态特征

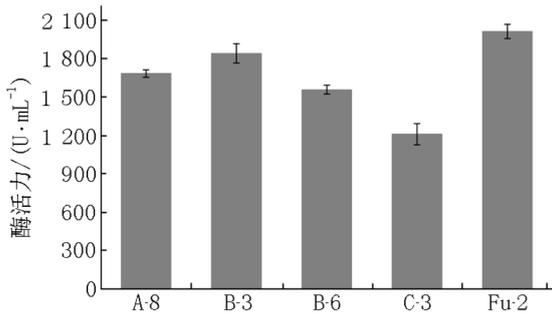


图 4 高产菌株酶活性的比较

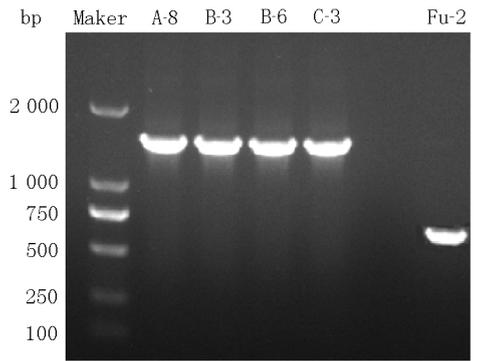


图 5 PCR 产物电泳图

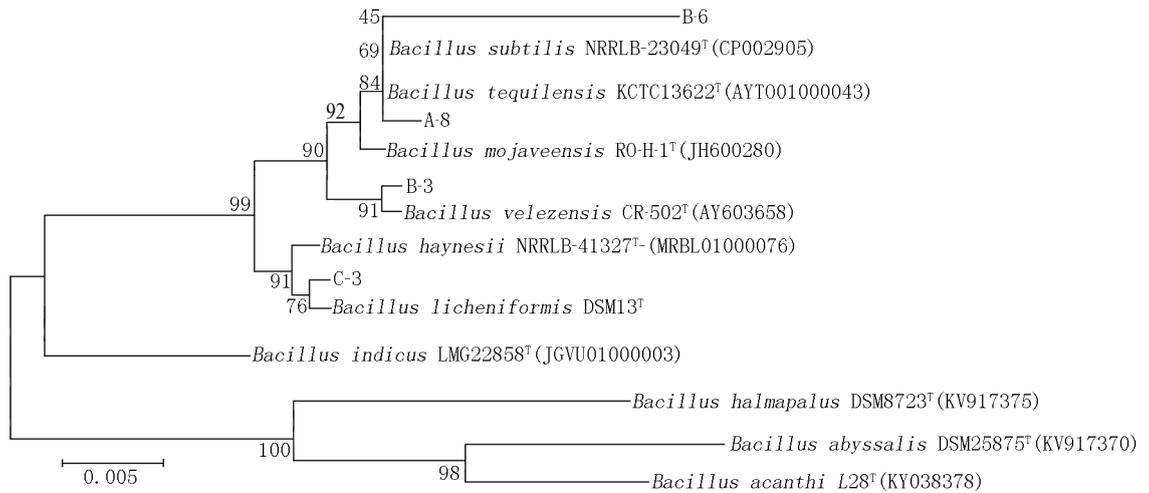
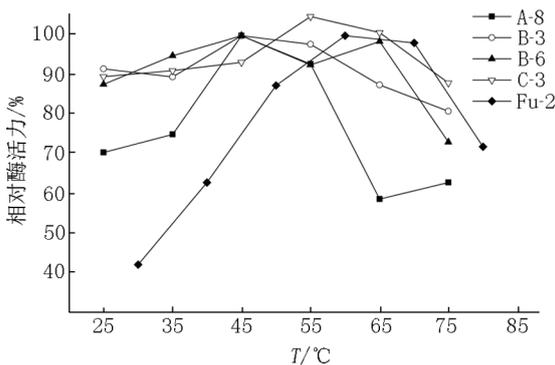


图 6 细菌株的 16S rDNA 系统进化树

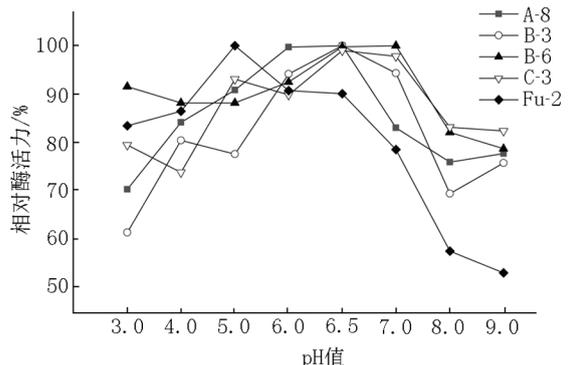
2.5 酶学性质研究

通过对比不同温度下相对酶活力发现:不同来源酶的最适宜反应温度为 40 ~ 60 °C (见图 7(a)), 且均呈先升后降趋势,其中黑曲霉的相对酶活力在 60 °C 时达到最高.就各不同 pH 值下各菌株酶活力的表现来看,细菌来源的相对酶活力最适 pH 值为 6.0 ~ 7.0,且在 pH 值为 4.0 ~ 8.0 时大致仍保留 80% 以上的酶活力(见图 7(b));黑曲霉的最适 pH 值则约为 5.0,且在碱性条件下相对酶活下降明显.

而就酶的稳定性的来看,不同细菌间差异化明显.其中菌株 B-6 的温度与 pH 值稳定性均为最佳,其在 65 °C 时保温 240 min 及在 pH 值 9.0 时保留 30 min,残留的相对酶活仍分别达 61.4% 与 84.3%.而 A-8、B-3 来源的酶的温度与 pH 值稳定性均较弱,酶活在 65 °C 及 pH 值 3.0 时尤其下降明显(见图 8(a) 和图 8(b)).另外,就黑曲霉而言,其温度与 pH 值稳定性则整体表现一般.



(a) 最适反应温度



(b) 最适反应 pH 值

图 7 温度及 pH 值对菌株甘露聚糖酶活力的影响

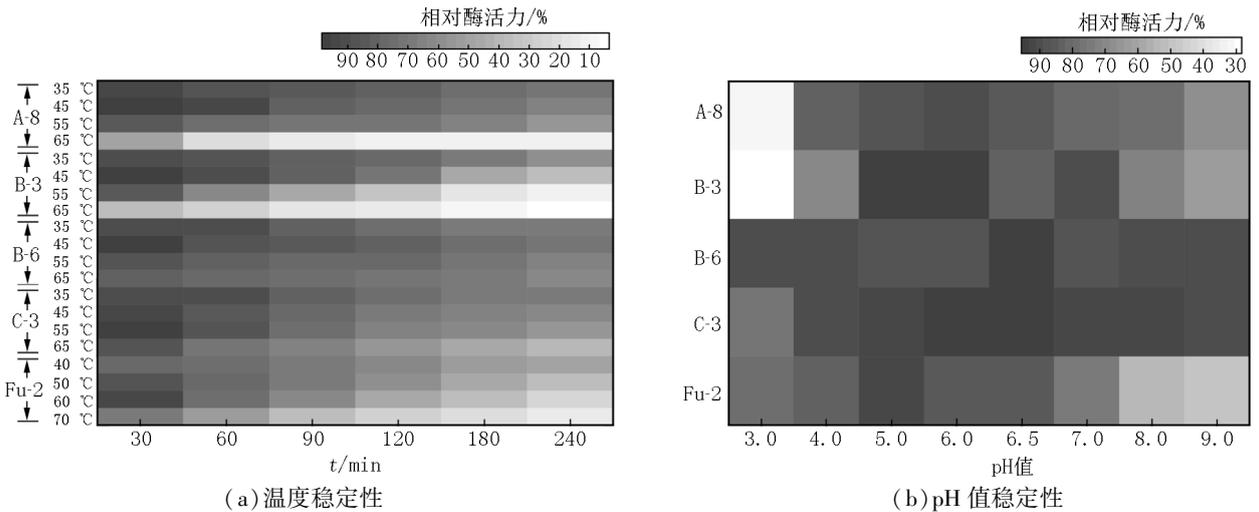


图8 温度及 pH 值对各菌株甘露聚糖酶稳定性的影响

3 讨论

由于 β -甘露聚糖酶在诸多工业领域中扮演重要角色,因此很多研究者对其从不同角度展开了大量研究,特别是产酶菌株的筛选与改良方向.本文通过从豆豉发酵环境中进行产酶菌株的筛选,最终获得了5株高产 β -甘露聚糖酶菌株并进行了分子鉴定,同时对不同菌源的粗酶液的基本性质进行了比较.

由于土壤、海洋及湖泊等环境中菌种资源丰富,过去很多研究者倾向于从该类生镜中筛选高酶活的菌株,如李云程等^[16]对海洋中细菌、真菌及放线菌产 β -甘露聚糖酶进行了筛选,得到1株酶活较高的芽孢杆菌.黄俊丽等^[17]从土壤中筛出1株酶活为 $50.36 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的假单胞菌,周芳等^[14]则从土壤中筛选出酶活为 $1487 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芽孢杆菌.本文通过借鉴前人优化后的培养基,共得到5株高酶活的菌株,且均在 $1200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上,4株芽孢杆菌酶活力与周芳等^[14]的研究数据大致相当,而高于其他大部分报道.而就黑曲霉来看,以往大部分学者往往采用固态发酵进行产酶试验,与以往利用突变或基因工程的部分黑曲霉液体发酵相比,本研究与其仍有一定差异^[18-19].需要指出的是,由于酶活方法的定义及具体试验条件不同,故这也是许多研究酶活力数据存在较大差异的重要原因.

另一方面,较高酶活力往往只是筛选产酶菌株的一个重要指标,良好的应用前景往往需考虑酶在不同环境中的稳定性.为此,本文针对不同产酶菌株的酶液的基本性质进行了探索.可以发现,真菌的在偏酸偏热的环境中达到最高酶活,而芽孢杆菌最高酶活更集中于温和的中性环境,这与之前的一些报

道类似^[14,17,20].同时,部分芽孢菌株来源的酶液(如B-6、C-3)在许多温度及酸碱度区间内均能保持较高酶活力,这说明其或许更能耐受严酷环境,可能具有较好的应用开发价值.此外,本文虽筛选到了一些高产 β -甘露聚糖酶菌株,但可培养法往往只能在特定培养基中筛选出易于培养的菌株,很多难于培养菌株的 β -甘露聚糖基因资源未能得到有效挖掘,未来有必要结合宏基因组策略进行更为广泛的筛选,并针对现有的产酶菌株进一步地改造.

4 参考文献

- [1] 胡会萍. 豆豉后酵中有益微生物及接菌发酵低盐豆豉品质、风味与功能性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2012.
- [2] 宋园亮, 张忠华, 熊骏, 等. 元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(1): 8-12.
- [3] 廖焰焰, 张菊, 李翔, 等. 传统曲霉型豆豉中高产脂肪酶的米曲霉筛选及鉴定[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2018, 42(5): 58-63.
- [4] 石聪, 李世瑞, 李跑, 等. 基于高通量测序浏阳豆豉不同发酵阶段微生物多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 27-32.
- [5] He Bin, Li Haoran, Hu Zhihong, et al. Difference in microbial community and taste compounds between *Mucor*-type and *Aspergillus*-type douchi during koji-making [J]. Food Research International, 2019, 121: 136-143.
- [6] 郭尚旭, 王瑶, 那金, 等. 细菌 β -甘露聚糖酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2017(27): 61-65.
- [7] 孙会忠, 李金萍, 陈旭, 等. 牡丹内生菌 JP13 的产 β -甘露聚糖酶活性及鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2702-2706.

- [8] 廖婷婷,翟磊,高成华,等. 1株产甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶的纯化与性质[J]. 微生物学报,2011,51(11):1520-1526.
- [9] 靖德军. β -甘露聚糖酶产生菌株的分离鉴定、产酶条件优化及其酶学性质研究[D]. 雅安:四川农业大学,2013.
- [10] 廖晓霞,张学武. 紫外线诱变对 β -甘露聚糖酶产酶菌株的影响研究[J]. 现代食品科技,2010,26(8):801-804.
- [11] Chen Tingtao, Wang Mengjuan, Li Shengjie, et al. Molecular identification of microbial community in surface and undersurface douchi during postfermentation [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(4): M653-M658.
- [12] 王静. 成团泛菌甘露聚糖酶的体外定向进化[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
- [13] Parker K N, Chhabra S R, Lam D, et al. Galactomannanases Man2 and Man5 from Thermotogaspecies: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 75(3): 322-333.
- [14] 周芳,牟海津,江晓路. 芽孢杆菌 M-21 产 β -甘露聚糖酶发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(2):10-14.
- [15] 侯爱香,刘静,李珂,等. 面筋食品中微生物群落分析及优势菌分离鉴定[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2017,43(1):79-86.
- [16] 李云程,林娟,梁燕辉,等. 产甘露聚糖酶海洋微生物的筛选及酶学性质研究[J]. 中国食品学报,2015,15(12):72-79.
- [17] 黄俊丽,包凌霞,王贵学. β -甘露聚糖酶产生菌的分离、鉴定及产 β -甘露聚糖酶最适条件的研究[J]. 生物技术通报,2009(7):166-170.
- [18] 盛金萍. 黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶液体发酵的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [19] 张娟,罗长财. 耐酸性黑曲霉 β -甘露聚糖酶的克隆及其在毕赤酵母中的表达分析[J]. 生物技术通讯,2011,22(2):182-187.
- [20] Naganagouda K, Salimath P V, Mulimani V H. Purification and characterization of endo- β -1,4 mannanase from *Aspergillus niger* gr for application in food processing industry [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(10):1184-1190.

The Isolation, Identification of β -Mannanase High-Yield Strains from Douchi and β -Mannanase Characterization

ZHAO Wenpeng, LI Hao, WANG Xiaolan*

(College of Life Science, Key Laboratory of the Conservation and Sustainable Utilization for Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: In this study, by microbial isolation and purification of traditional *Aspergillus*-type douchi, and following with Congo Red staining and DNS colorimetric methods, a total of four bacterial strains and one fungal strain with high β -mannanase and morphological differences are obtained with a highest enzyme activity of $2\ 016\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ for fungal strain, respectively. Through sequence identification and comparison, bacteria are identified as different species of *Bacillus* and fungi as *Aspergillus niger*. The results of enzymatic properties show that the optimum temperature and pH of *Aspergillus niger* are $60\ ^\circ\text{C}$ and 5.0 , respectively. And the optimum temperature range of four *Bacillus* strains is from $40\ ^\circ\text{C}$ to $55\ ^\circ\text{C}$ and pH range of four *Bacillus* strains is from 6.0 to 7.0 , among which one *Bacillus* strain keeps at $65\ ^\circ\text{C}$ for 240 min or pH 9.0 for 30 min, and the residual relative enzyme activity is 61.4% or 84.3% .

Key words: β -mannanase; douchi; isolation and screening; enzymatic properties

(责任编辑:刘显亮)