

酒曲中产凝乳酶微生物菌株的分离筛选及鉴定

腾军伟, 赵笑, 杨亚威, 张健, 赵爱梅, 姜芸芸, 李柳, 郑喆, 杨贞耐*
(北京食品营养与健康高精尖创新中心, 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京工商大学, 北京 100048)

摘要: 针对酒曲中的微生物进行分离纯化, 得到11株细菌和2株真菌, 并采用酪蛋白平板法和Arima时间法筛选出了1株产凝乳酶的细菌菌株编号为LB-51。通过形态学观察、生理生化实验和16S rDNA序列分析鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌, 将该产凝乳酶菌株命名为解淀粉芽孢杆菌GSBa-1。该菌株在液体LB培养基中发酵72 h产凝乳酶的凝乳活力为 (431.53 ± 15.89) SU/mL, 蛋白水解活力为 (5.05 ± 0.59) U/mL, 所产凝乳酶凝乳活力高而蛋白水解活力低, 凝乳酶粗酶单位酶活力为 1.54×10^5 SU/g。解淀粉芽孢杆菌GSBa-1是分离筛选自酒曲中的一株高产凝乳酶细菌, 因此其来源安全, 可作为工业化候选菌株进一步研究开发。

关键词: 酒曲; 凝乳酶; 分离鉴定; 解淀粉芽孢杆菌

Isolation and Identification of Microbial Strains Producing Rennet from *Jiuqu*, a Traditional Chinese Fermentation Starter

TENG Junwei, ZHAO Xiao, YANG Yawei, ZHANG Jian, ZHAO Aimei, JIANG Yunyun, LI Liu, ZHENG Zhe, YANG Zhennai*
(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology & Business University (BTBU), Beijing 100048, China)

Abstract: Eleven bacterial strains and two fungal strains were isolated from *Jiuqu*, a traditional Chinese fermentation starter for rice wine. Out of these, one bacterial strain, designated LB-51, capable of producing rennet was screened by the casein plate method and the Arima method. The strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by its morphological characteristics, physiological and biochemical tests (API 50CHB system) and 16S rDNA sequence analysis and species specific gene analysis and named as *B. amyloliquefaciens* GSBa-1. The rennet and proteolytic activities were (431.53 ± 15.89) SU/mL and (5.05 ± 0.59) U/mL, respectively, after 72 h shaking culture (120 r/min) at 30 °C for 72 h in liquid LB medium. The enzyme exhibited high milk-clotting activity and low protein hydrolysis activity. The milk-clotting activity was 1.54×10^5 SU/g. *B. amyloliquefaciens* GSBa-1, an efficient producer and a safe source of rennet activity, is worth further research and development as a candidate strain for industrial production of rennet.

Key words: *Jiuqu*; rennet; isolation and identification; *Bacillus amyloliquefaciens*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716004

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 16-0023-06

引文格式:

腾军伟, 赵笑, 杨亚威, 等. 酒曲中产凝乳酶微生物菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 23-38.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716004. <http://www.spkx.net.cn>

TENG Junwei, ZHAO Xiao, YANG Yawei, et al. Isolation and identification of microbial strains producing rennet from *Jiuqu*, a traditional Chinese fermentation starter[J]. Food Science, 2017, 38(16): 23-38. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716004. <http://www.spkx.net.cn>

凝乳酶 (EC 3.4.23.4) 是干酪加工时添加于原料乳中使乳液凝固的关键性酶^[1], 其凝乳及蛋白水解活性对干酪的得率、质构和特殊风味有着非常重要的影响^[2-5];

传统凝乳酶的制作是用盐从牛犊皱胃中浸提出来。随着世界干酪产量逐年上升, 传统凝乳酶的供应已无法满足现代干酪工业生产的需求。为此, 国内外科学家们进行

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371804); 北京市百千万人才工程资助项目 (B类);

国家自然科学基金青年科学基金项目 (31601488); 2016年北京工商大学研究生科研能力提升计划项目;

公益性行业 (农业) 科研专项 (201303085)

作者简介: 腾军伟 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: tengjunwei0221@163.com

*通信作者: 杨贞耐 (1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品加工及交叉学科的理论和应用。E-mail: yangzhennai@th.btbu.edu.cn

了大量的研究以寻找凝乳酶新的来源。微生物具有生长不受气候和地域的限制,来源广泛且发酵容易控制,生长周期短、产酶量大、经济效益高等优势,是目前最有发展潜力的酶制剂来源^[6-9]。目前微生物源凝乳酶的研究主要集中在真菌的固态发酵产酶方面^[10-12],工业上主要采用米黑毛霉、微小毛霉和粟疫霉等真菌发酵生产凝乳酶^[5];而细菌具有较真菌体积小、繁殖快、产物易于提取分离、适合高密度培养增殖产酶等优势^[13-14],因此利用细菌工业化发酵制备凝乳酶是近年来凝乳酶研究开发的热点问题。

江米酒是我国一种传统食品,由酒曲发酵江米制作而成。而宫廷奶酪是由江米酒凝固牛乳制作而成,口感细腻,具有良好的乳胶体稳定性。其凝乳过程主要与江米酒中的凝乳酶有关^[15-16];该酶是发酵剂酒曲中的微生物发酵江米代谢的产物^[17-18]。目前,研究者主要从酒曲中筛选得到产凝乳酶的霉菌,并进行了相关的研究^[19-22]。酒曲中的重要菌系——细菌,也属于酒曲中的正常菌相;但国内尚鲜有从酒曲中筛选高产凝乳酶细菌的相关报道。江米酒作为一种传统食品,采用其中筛选得到的菌株发酵生产凝乳酶,在食品卫生学上是安全的。

本研究拟从江米酒中筛选高产凝乳酶细菌,对其形态学、生理生化特征和16S rDNA序列分析进行鉴定,并对其产凝乳酶的凝乳活力及蛋白水解活力进行测定。该研究拓宽了微生物源凝乳酶产生菌的菌源,为进一步研究开发食用安全的干酪加工用细菌凝乳酶提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

酒曲产自江苏苏州;长江米购于北京市永辉超市;脱脂乳粉产自澳大利亚。

LB液体培养基:酵母提取物5 g/L、胰蛋白胨10 g/L、氯化钠10 g/L,121℃高压灭菌20 min。LB固体培养基:LB液体培养基添加15 g/L琼脂粉。YEPD培养基:酵母粉10 g/L、蛋白胨20 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂粉15 g/L,pH 6.0,115℃湿热灭菌20 min。PDA培养基:马铃薯浸粉15 g/L、葡萄糖3 g/L、琼脂粉15 g/L、蒸馏水1 L,121℃高压灭菌20 min。酪蛋白培养基:蛋白胨0.25%、葡萄糖1%、酵母膏0.1%、干酪素1%、琼脂2%、脱脂牛乳5%,pH 7.0,95℃灭菌15 min。

1.2 仪器与设备

HWS 12恒温水浴加热锅 上海一恒科学实验装备有限公司;HZQ-Q气浴恒温摇床 哈尔滨东联电子科技有限公司;高速离心机CR21GIII、U-3900分光光度计 日本日立有限公司;全自动凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 江米酒的制备

按5%的酒曲添加量接种于提前蒸熟冷却好的长江米中,接着把经灭菌冷却好的去离子水按40%添加到江米中,搅拌均匀,30℃、120 r/min摇床振荡培养3 d。

1.3.2 江米酒中微生物的分离纯化

采用梯度稀释法将江米酒倍比稀释,分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释液各50 μL涂布于LB、YEPD和PDA 3种固体培养基,将培养基放置于30℃恒温培养箱内培养,并于第2、3、5天挑取不同菌落进一步划线纯化,直至纯种,分别将其编号以作进一步研究。

1.3.3 产凝乳酶优势菌的确定

酪蛋白法初筛产凝乳酶优势菌株:将达到纯种的菌株分别以三点法接于酪蛋白平板上,放置于30℃恒温培养箱内培养2 d,观察不同菌株产白色凝乳圈的大小和水解圈的大小。

不同培养基发酵复筛菌株:在产生凝乳圈和水解圈的菌株中,分别从平板中挑取少量菌落接种于LB、YEPD和PDA 3种不同液体培养基中,30℃、120 r/min摇床振荡培养24 h作为活化种子液,然后按3%的接种量接于已灭菌的不同培养基中,30℃、120 r/min摇床振荡培养后测定凝乳活力和蛋白水解活力。

1.3.4 凝乳活力的测定

酶活力根据改进的El-Bendary等^[23]的方法测定,将脱脂乳粉溶于0.01 mol/L的CaCl₂溶液配制成10%的脱脂乳溶液,室温放置30 min;于35℃中保温5 min,35℃条件下,准确量取待测酶液0.2 mL加入2 mL 10%的脱脂乳溶液中,迅速混匀,开始计时,准确记录至絮状凝集颗粒出现为止。凝乳活力的定义:在40 min内凝固100 g/L的脱脂乳1 mL所要的凝乳酶量规定是一个索氏单位(Soxhelt unit, SU),按公式(1)计算:

$$\text{凝乳活力}/(\text{SU}/\text{mL}) = \frac{2400}{t} \times \frac{5n}{0.5} \quad (1)$$

式中: t 为凝乳时间/s; n 为酶液稀释倍数。

1.3.5 蛋白水解活力的测定

蛋白水解活力参考文献[24]测定。取2 mL 1.5%酪蛋白溶液于35℃保温5 min,加入0.5 mL预热好的待测酶液混匀后继续水浴恒温放置60 min,然后加入2 mL 8%的三氯乙酸终止反应,将沉淀过滤后测定滤液在280 nm波长处的吸光度,记为 A_1 。制备空白样品时,先取0.5 mL待测酶液直接与8%的三氯乙酸混合,使其立刻终止反应,后加入2 mL 1.5%酪蛋白溶液,重复过滤步骤,滤液作为空白对照,测定其在280 nm波长处的吸光度,记为 A_2 。

本实验条件下,60 min引起 $A_{280\text{ nm}}$ 增加0.001所需的酶量为1个酶活力单位,按公式(2)计算:

$$\text{蛋白水解活力}/(\text{U/mL})=2\times(A_1-A_2) \quad (2)$$

1.3.6 产凝乳酶菌株的鉴定

1.3.6.1 形态学观察

将产凝乳酶优势菌在LB固体平板上划线,于30℃恒温培养箱内培养2~3 d后观察菌落生长情况及菌落形态。将菌体进行芽孢染色及革兰氏染色后于高倍显微镜下观察菌体形态。

1.3.6.2 API试剂条法对菌株鉴定

将平板中培养好的新鲜菌体用无菌生理盐水溶解,根据API 50 CHB比浊法达到菌体浓度要求,然后分别加入API 50 CHB试剂盒各孔内,37℃静置培养24 h和48 h,观察试剂盒各孔颜色的变化。

1.3.6.3 菌株16S rDNA序列扩增与分析

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌DNA,根据上述菌株鉴定所得由杆菌科的16S rDNA序列设计引物:正向引物P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物P2:5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。以菌株基因组DNA作为PCR扩增的模板,PCR体系(20 μL)为:上下游引物各1 μL、DNA模板1 μL、超纯水7 μL、TaqDNA聚合酶10 μL。PCR参数为:95℃预变性3 min;95℃变性0.5 min,55℃退火0.5 min,72℃延伸2 min,30个循环;70℃末端延伸10 min,4℃保存。取5 μL产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,将大小正确的目的片段送至北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司测序。将测序结果提交到GenBank中选取相关菌株的16S rDNA基因序列进行比对分析,选取相似性较高的序列,与实验菌株一起用软件MEGA 6.0构建系统发育树,进行系统发育分析^[25]。

1.3.7 产凝乳酶菌株生长曲线和产酶活力曲线的测定

1.3.7.1 生长曲线的测定

从产凝乳酶菌株的平板中挑取少量菌体接种于已灭菌的液体LB培养基中,30℃、120 r/min恒温振荡培养,培养30 h,从2 h起每隔2 h测定菌体OD_{600 nm}值,实验重复3次,绘制菌株生长曲线。

1.3.7.2 酶活力曲线的测定

挑取少量LB-51菌体接入液体LB培养基中,30℃、120 r/min条件下恒温振荡12 h,作为活化种子液;以3%的接种量接种于已灭菌的LB液体培养基中,装液量为体积分数40%,30℃、120 r/min条件下恒温振荡培养,分别在培养0、12、24、36、48、60、72、84、96 h时,分别按照1.3.4和1.3.5节方法测定凝乳活力和蛋白水解活力,实验重复3次,绘制菌株产酶活力曲线图。

1.3.8 菌株发酵产凝乳酶及其分离提取

将活化的菌液以3%的接种量接种到已灭菌的LB液体培养基中,30℃、120 r/min条件下恒温振荡培养72 h。发酵液经8 000 r/min离心30 min以去除菌体,上清液放

置于4℃冰箱内冷却2 h。向4℃的发酵液中加入预冷的无水乙醇,使混合后的乙醇体积分数为70%,迅速搅拌均匀,于4℃冰箱中静置过夜,4℃、10 000 r/min离心30 min,沉淀用0.005 mol/L的pH 5.8的磷酸盐缓冲液溶解以防止蛋白质凝聚或变性,溶解液放置在4℃冰箱中冷藏,之后于4℃条件下透析除盐并冷冻干燥成酶粉。

1.3.9 冻干凝乳酶的凝乳活性评价

取0.01 g粗酶冻干粉于5 mL去离子水中,充分溶解后按照1.3.4节方法测定凝乳活力,根据公式(1)换算粗酶的单位酶活力,并与商业凝乳酶做对比。

2 结果与分析

2.1 酒曲中产凝乳酶优势菌株的确定

2.1.1 菌株初筛

利用倍比稀释法从发酵的江米酒中分离纯化得到13株不同菌落形态的纯种菌株,将分离纯化得到的13株不同菌株分别以三点法接种于酪蛋白平板上,置于30℃恒温培养箱内培养2 d,观察并测定菌株所产凝乳圈及水解圈直径(表1)。

表1 不同菌株在酪蛋白平板上凝乳圈和水解圈直径
Table 1 Diameters of hydrolysis and deposition zones of 13 strains isolated from *Jiuqu* in casein plate medium

菌株编号	凝乳圈直径/mm	水解圈直径/mm	菌体特征
LB-41	17.0	8	球状
LB-41D	0.0	0	球状
LB-51	21.5	5	短杆状,有芽孢
LB-51M	15.0	10	椭圆形
LB-61	12.0	9	短杆状,有芽孢
PDA-41	0.0	0	椭圆形
PDA-61	0.0	0	椭圆形
PDA-82	0.0	0	椭圆形
PDA-82M	16.0	11	孢子丝状
YD-41	14.0	4	短杆状,有芽孢
YD-41Y	16.5	7	短杆状,有芽孢
YD-42	0.0	0	球状
YD-61	18.0	7	短杆状,有芽孢

从表1可以看出, LB-41D、PDA-41、PDA-61、PDA-82和YD-42这5株菌所产凝乳圈和水解圈直径为0,表明这5株菌不产生凝乳酶。其余8株菌在酪蛋白平板上都有不同大小的凝乳圈和水解圈。白色凝乳圈大说明菌株产凝乳酶的凝乳活力高,水解圈大说明菌株产凝乳酶蛋白水解活力高。菌株所产凝乳酶蛋白水解活力的大小对干酪质构和特殊风味有着重要的影响,蛋白水解活力高使干酪中蛋白水解过度生成苦味肽而导致制作的干酪有苦味,使消费者难以接受^[3-5]。所以在筛选过程中应选取凝乳活力高而蛋白水解活力低的菌株。从有不同大小凝乳圈和水解圈的8株不同菌株来看,其中LB-51菌株所

产凝乳圈直径最大同时水解圈直径较小，由此可以初步选择LB-51菌株为产凝乳酶优势菌。

2.1.2 菌株的复筛

将有白色凝乳圈的8株菌分别接种于LB、YPD和PDA液体培养基中，在30℃、120 r/min条件下恒温振荡培养24 h，测定凝乳和蛋白水解活力，结果如表2所示。

表2 菌株在不同培养基中产酶活力
Table 2 Rennet and proteolysis activities of 8 strains screened

菌株	凝乳活力/(SU/mL)			蛋白水解活力/(U/mL)		
	LB	YPD	PDA	LB	YPD	PDA
LB-41	255.32	235.29	40.00	2.94	4.66	3.11
LB-51	320.00	266.67	218.18	1.48	3.22	2.88
LB-51M	282.35	0.00	92.31	1.57	0.00	4.76
LB-61	279.07	114.29	0.00	3.64	4.29	0.00
PDA-82M	37.50	0.00	94.12	6.45	0.00	3.64
YD-41	160.00	133.33	0.00	1.16	4.11	0.00
YD-41Y	137.14	73.85	0.00	2.34	3.98	0.00
YD-61	120.00	0.00	0.00	5.78	0.00	0.00

由表2可知，菌株在LB中产凝乳酶的凝乳活力相对较高，在液体PDA培养基中产凝乳酶的凝乳活力最低。其中LB-51菌株在LB中发酵24 h时产凝乳酶的凝乳活力可达320 SU/mL，在8株菌中产凝乳酶的凝乳活力最高，同时LB-51菌株在LB中发酵时蛋白水解活力相对较低。所以确定LB-51菌株是酒曲中产凝乳酶的优势菌。对于8株菌株选择了3种不同的液体发酵培养基，只有在LB中产凝乳酶的凝乳活力较为理想；部分菌株在YPD和PDA中产酶活力不高或不产凝乳酶，这与培养基中营养成分和比例有关^[26-27]，说明这2种培养基营养成分和比例不适合菌株产凝乳酶。所以3种液体培养基中选择LB作为基础培养基，可通过优化其营养成分和比例来进一步提高菌株的产凝乳酶的凝乳活力。

2.2 菌株初步鉴定

2.2.1 形态学观察

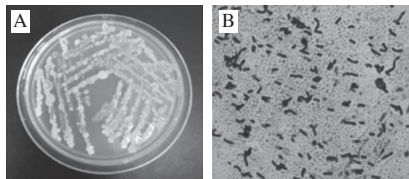


图1 LB-51菌株菌落形态(A)和革兰氏染色照片(B)

Fig. 1 Colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain LB-51

将菌株LB-51在LB固体平板上划线培养48 h后，其菌落为乳白色稍显微黄，菌落边缘不整齐，表面粗糙有黏液，不透明。通过革兰氏染色、芽孢染色和穿刺培养实验，菌株LB-51为革兰氏反应为阳性，短杆状，具有运动性，有芽孢，芽孢中生。

2.2.2 API生化试剂条法

将API生化试剂条法对菌株LB-51的发酵结果(表3)

提交ApiWeb软件中进行比对鉴定，结果可初步判定菌株LB-51为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)或地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。

表3 LB-51菌株的主要生理学特性
Table 3 Physiological characteristics of strain LB-51

生化分析	结果	生化分析	结果
对照	+	马栗树皮苷	+
甘油	+	水杨醇葡萄糖苷	+
赤藓糖醇	+	纤维二糖	+
D-阿拉伯糖	+	麦芽糖	+
L-阿拉伯糖	+	乳糖	+
核糖	+	蜜二糖	-
D-木糖	+	蔗糖	+
L-木糖	-	海藻糖	-
核糖醇	-	菊粉	-
β -甲基木糖	-	松三糖	-
半乳糖	-	棉子糖	-
葡萄糖	+	淀粉	+
果糖	+	肝糖	+
甘露糖	-	木糖醇	-
山梨糖	-	龙胆二糖	+
鼠李糖	-	D-松二糖	-
己六醇	-	来苏糖	-
肌醇	+	D-塔格糖	-
甘露醇	+	D-岩藻糖	-
山梨醇	+	L-岩藻糖	-
α -甲基-D-甘露糖	-	D-阿拉伯糖醇	-
α -甲基-D-葡萄糖	+	L-阿拉伯糖醇	-
N-乙酰葡萄糖胺	-	葡萄糖酸	-
苦杏仁苷	+	2-酮基-D-葡萄糖酸	-
熊果苷	+	5-酮基-D-葡萄糖酸	-

注：+，反应呈阳性；-，反应呈阴性。

2.2.3 菌株16S rDNA序列扩增结果

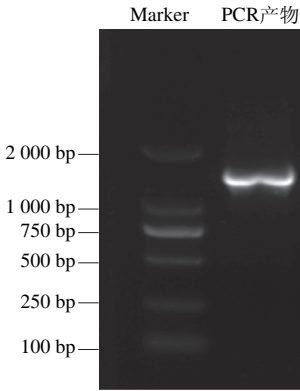


图2 菌株LB-51的16S rDNA琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR amplified product of 16S rDNA from strain LB-51

以菌株LB-51基因组DNA为模板，经PCR扩增后产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，结果在约1 500 bp处有一条特异性条带，结果见图2。将PCR产物回收纯化后进行测序，结果菌株LB-51的16S rDNA序列长度为1 450 bp。

2.2.4 基于16S rDNA序列同源性比对与系统发育分析

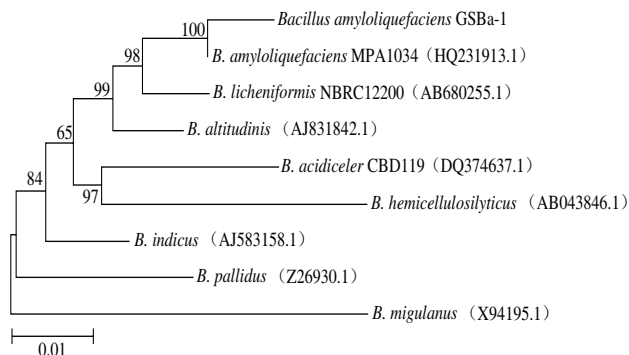


图3 以16S rDNA序列为基础的解淀粉芽孢杆菌GSBa-1菌株系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1 based on 16S rDNA sequence

将菌株LB-51的16S rDNA基因序列与在GenBank中序列大小相近的已知菌株的相应序列进行比对, 然后选取与LB-51序列同源性较高的菌株序列, 利用MEGA6.0软件进行分析, 构建系统发育进化树。结果如图3所示, 菌株LB-51与解淀粉芽孢杆菌MPA1034 (HQ231913.1) 在同一分支上, 并通过MEGA 6.0软件中Bootstrap的验证表明它们具有较高的置信度, 且支持率可达100%。结合上述形态学、生理生化实验结果可将菌株LB-51确定为解淀粉芽孢杆菌, 并进一步将此产凝乳酶菌株命名为解淀粉芽孢杆菌GSBa-1。

2.3 解淀粉芽孢杆菌GSBa-1的生长和产酶活力曲线图

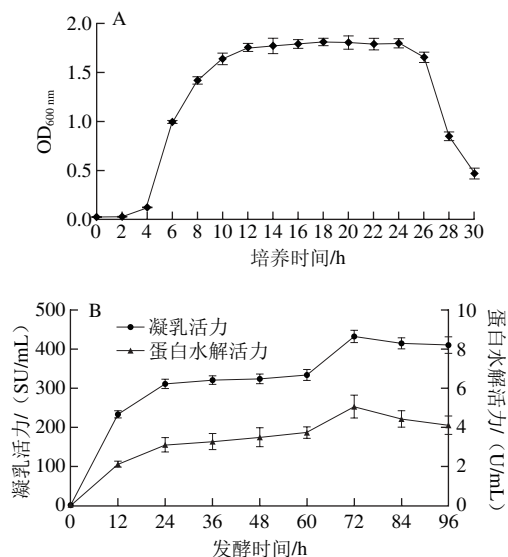
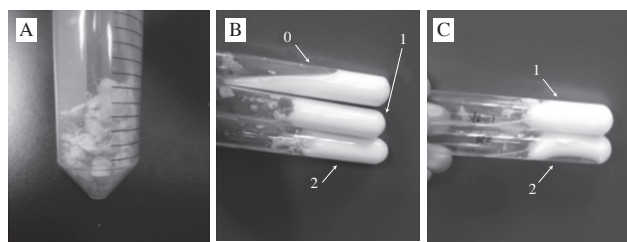


图4 解淀粉芽孢杆菌GSBa-1生长 (A) 和产酶活力 (B) 曲线
Fig. 4 Growth curve (A) and rennet activity curve (B) of *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1 as a function of culture time

由图4A可知, OD_{600 nm}值显示菌株LB-51在液体培养基中0~4 h生长速率缓慢, 菌体生物量几乎不增加, 处于迟缓期; 在4~12 h时生长速率最快, 菌体细胞以几何级

数速率分裂, 处于对数生长期; 在12~24 h时菌体量随时间变化不大, 基本保持平衡, 处于稳定期; 24 h以后菌体量迅速减少, 菌体死亡速率超过新生的速率, 处于衰亡期, 一般是由于营养成分不足和后期代谢产物的增加导致环境变化引起的^[6]。由图4B可知, 菌株GSBa-1产凝乳酶在其对数生长期产量很少, 随着发酵时间延长, 产酶量也逐渐增加, 在24~60 h之间产酶增加量不明显; 但随着时间继续延长, 产酶活力明显提高, 在72 h时达到最大值, 凝乳活力为(431.53±15.89) SU/mL, 同时蛋白水解活力为(5.05±0.59) U/mL; 之后酶活力逐渐降低, 蛋白水解活力与凝乳活力变化趋势基本相同。

2.4 解淀粉芽孢杆菌GSBa-1凝乳酶的凝乳活性评价



A. 菌株GSBa-1凝乳酶粗酶; B. 凝乳酶凝乳反应: 0.空白对照, 1. GSBa-1凝乳酶凝乳2 min, 2. 商业凝乳酶凝乳2 min; C. 1 h后乳清析出效果: 1. GSBa-1凝乳酶, 2. 商业凝乳酶。

图5 解淀粉芽孢杆菌GSBa-1凝乳酶、凝乳反应和乳清析出
Fig. 5 Rennet, curd reaction and whey syneresis from *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1

由图5A可知, 菌株GSBa-1凝乳酶粗酶为浅灰色, 蓬松棉絮状。由图5B可知, 相同的酶质量浓度条件下, GSBa-1凝乳酶比商业酶凝乳反应时间稍长, 凝块结实且富有弹性。由图5C可知, 凝块收缩且都伴有乳清析出现象, 和商业酶相比, 菌株GSBa-1凝乳酶乳清析出反应不明显。在凝乳反应中, 2 mg/mL GSBa-1凝乳酶液凝乳时间为78 s, 即凝乳活力为307.69 SU/mL, 菌株GSBa-1粗酶单位酶活力为 1.54×10^5 SU/g; 相同质量浓度条件下商业凝乳酶凝乳时间为36 s, 单位酶活力为 3.16×10^5 SU/g。

3 讨论与结论

从传统安全食品宫廷奶酪的凝乳剂(江米酒酒曲)中分离筛选产凝乳酶的优良菌株对发掘传统饮食文化遗产、丰富产凝乳酶微生物菌源和缓解干酪加工所需凝乳酶紧张的供应状态有着重要的理论和实践意义^[28]。国内已初步开展了酒曲中产凝乳酶微生物的分离筛选。刘振民等^[29]采用酒药作为分离源, 筛选出高产凝乳酶霉菌菌株M10, 并对该菌发酵产酶条件进行了优化研究。滕国新等^[30]对酒曲中产凝乳酶微生物进行了分离纯化研究, 结果表明根霉菌为酒曲中产凝乳酶优势菌。程巧玲等^[31]从酒曲中筛选得到一株霉菌、一株酵母菌和两株细菌,

并确定霉菌为产凝乳酶优势菌。本实验借鉴前人的研究经验,通过对酒曲中微生物的分离纯化,共得到11株细菌和2株真菌;采用酪蛋白平板法初筛和不同液体培养基发酵复筛出一株产凝乳酶优势菌株LB-51。根据形态学观察、生理生化实验和16S rDNA分子生物学鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌,并命名为解淀粉芽孢杆菌GSBa-1。此实验结果表明酒曲中存在高产凝乳酶细菌菌株,与前人报道的霉菌是产凝乳酶优势菌株不一致,这可能与酒曲来源及种类有关^[29-31]。

液体LB培养基作为实验菌株GSBa-1适宜的发酵产凝乳酶培养基,该菌株在此培养基中发酵产凝乳酶的凝乳活力于72 h时达到最大值,为(431.53±15.89) SU/mL,且蛋白水解活力为(5.05±0.59) U/mL。凝乳酶的C/P值(凝乳活力与蛋白水解活力的比值)是干酪加工中凝固剂的一个重要的效率指标^[32]。有研究表明凝乳酶的C/P值在100~200之间时,凝乳效果最佳^[30],本实验菌株GSBa-1所产凝乳酶的C/P值为85.45,与上述比值接近,说明该实验菌株所产凝乳酶适用于干酪的加工。将该菌株在最大产酶活力时进行凝乳酶的提取并冷冻干燥成凝乳酶冻干粉。通过菌株凝乳酶与商业凝乳酶做凝乳效果对比分析结果显示,该菌株凝乳酶与商业凝乳酶凝乳效果相接近,冻干粉酶活力为 1.54×10^5 SU/g与商业凝乳酶活力(3.16×10^5 SU/g)相差不大,后期可对菌株凝乳酶进行分离纯化以获得更高酶活力的纯凝乳酶,并进行酶学特性和相关的凝乳机理研究。此外,分离筛选的纯种解淀粉芽孢杆菌GSBa-1来源于酒曲,与同来源于酒曲中的真菌相比,具有发酵易于控制,产物易于提取分离等优势,更具备产业化开发应用的潜力。

参考文献:

- [1] 李亮, 吴丹, 宿玲恰, 等. 重组毕赤酵母生产凝乳酶发酵优化[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(5): 457-464. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2016.05.002.
- [2] 杭锋, 洪青, 王钦博, 等. 凝乳酶的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 273-279. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201603047.
- [3] 普燕, 张富春. 干酪用牛凝乳酶替代品的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(5): 227-234. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201505041.
- [4] 潘道东, 韩玲玲. 根霉凝乳酶的分离纯化及其酶学特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(2): 53-59. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2011.02.008.
- [5] 宋曦, 甘伯中, 贺晓玲, 等. 天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 158-162. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.11.035.
- [6] 丁明亮, 欧阳安然, 王望斐, 等. 枯草芽孢杆菌产凝乳酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 156-160.
- [7] 高维东, 甘伯中, 丁福军, 等. 微生物凝乳酶的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(5): 34-47. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2009.05.010.
- [8] 李学朋, 关明玲, 赵保堂, 等. 米黑毛霉酶凝干酪素生产工艺参数的优化研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 191-195. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.03.032.
- [9] ZHAO X, WANG J, ZHENG Z, et al. Production of a milk-clotting enzyme by glutinous rice fermentation and partial characterization of the enzyme[J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 39(1): 70-79. DOI:10.1111/jfbc.12108.
- [10] 韩玲玲, 潘道东. 根霉产凝乳酶的固态发酵条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 156-160.
- [11] 李俣林, 邵淑娟, 李铁柱, 等. 响应面法优化微小毛霉固态发酵生产凝乳酶工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 248-254.
- [12] 吴进菊, 徐尔尼, 陈卫平, 等. 酒曲根霉F34菌株凝乳酶的初步纯化及部分酶学性质的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 135-137.
- [13] DA SILVA R R, SOUTO T B, DE OLIVEIRA T B, et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(8): 1059-1069. DOI:10.1007/s10295-016-1780-4.
- [14] 李建涛, 陈历俊, 姜铁民. 响应面法优化解淀粉芽孢杆菌发酵产凝乳酶的工艺条件[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(6): 26-30. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2012.06.007.
- [15] 刘振民, 骆承彦. 江米酒凝乳酶机理研究[J]. 食品科学, 2000, 21(7): 13-15. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2000.07.003.
- [16] 薛璐, 陈历俊, 姜铁民, 等. 江米酒凝乳酶酶学特性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 259-262. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.04.054.
- [17] WANG Y P, CHENG Q L, AHMED Z, et al. Purification and partial characterization of milk-clotting enzyme extracted from glutinous rice wine mash liquor[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009, 26(5): 1313-1318. DOI:10.1007/s11814-009-0225-4.
- [18] 滕国新, 李里特. *Rhizopus* sp. 052凝乳酶的部分酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(7): 12-15. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2006.07.004.
- [19] 吴进菊, 徐尔尼, 张凤英, 等. 中国曲中凝乳酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 124-129. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2009.01.021.
- [20] 于振, 李建科, 马倩倩, 等. 响应面法优化红曲米中凝乳酶高产菌株的发酵条件[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 146-150.
- [21] 李子木, 陈强, 赵珂. 酒曲中凝乳酶产生菌的筛选及其培养条件研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(5): 32-35. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2007.05.009.
- [22] 姜铁民, 薛璐, 周伟明, 等. 江米酒凝乳酶的纯化及凝乳机制初探[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(7): 24-27. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2006.07.007.
- [23] EL-BENDARY M A, MOHARAM M E, ALI T H. Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*[J]. Journal of Applied Sciences Research, 2007, 3(8): 695-699. DOI:10.1007/s11814-009-0225-4.
- [24] 薛璐, 姜铁民, 任发政, 等. 江米酒凝乳机理的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 37-38. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2006.09.009.
- [25] LI C Q, LIU W C, ZHU P, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea[J]. Microbial Ecology, 2011, 62: 800-812. DOI:10.1007/s00248-011-9896-6.
- [26] LIU B L, TZENG Y M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology[J]. Bioprocess Engineering, 1998, 18(6): 413-418. DOI:10.1007/PL00008999.
- [27] 陈羽, 冯镇, 张宏伟, 等. 响应面法优化芽孢杆菌FC96培养基组分的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(6): 30-35.
- [28] ZHANG W B, HE X L, LIU H N, et al. Statistical optimization of culture conditions for milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* using wheat bran: an agro-industry waste[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(4): 492-495. DOI:10.1007/s12088-013-0391-2.
- [29] 刘振民, 刘辉, 骆承彦. 酒药中凝乳酶菌株筛选及产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(5): 8-11. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2001.05.003.
- [30] 滕国新, 全庆阳, 王玉林, 等. 传统清宫乳制品米酒奶(Guan-nai)的微生物学研究[C]//北京食品学会成立二十周年学术论文集. 北京: 北京食品学会, 1999.
- [31] 程巧玲, 白小佳, 王艳萍. 江米酒中凝乳酶产生菌的分离及产酶条件的优化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 999-1003. DOI:10.3321/j.issn:1000-3061.2008.06.015.
- [32] AHMED I A M, BABIKER E E, MORI N. Purification and characterization of milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds[C]//The 5th Annual Conference: Agricultural and Veterinary Research. Khartoum: University of Khartoum Dspace, 2014.