

酒曲源曲霉的分离 及其产蛋白酶条件优化

任文雅¹, 廖永红^{1,*}, 伍松陵², 沈 晗¹

(1.北京工商大学化学与环境工程学院,北京 100048;

2.国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:利用稀释平板法从曲样中分离获得4株曲霉1[#]、2[#]、3[#]和4[#],将各菌株分别制米曲后测定酶活力,并通过正交实验及单因素实验确定蛋白酶发酵的培养基和最佳工艺条件。在优化的发酵培养基和发酵条件下(温度、培养时间、培养基起始pH、接种量),产蛋白酶活力分别达到:1[#]菌11545.7U/g,2[#]菌8240.4U/g,3[#]菌9146.0U/g,4[#]菌4527.7U/g。最后,将活力比较高的三株菌进行Biolog微生物系统鉴定,分别为栖土曲霉(*Aspergillus terricola* Marchal),寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* Speare)和杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。

关键词:曲霉,分离,蛋白酶活力

Screening of *Aspergillus* strains from Qu powder and optimization of production condition of protease

REN Wen-ya¹, LIAO Yong-hong^{1,*}, WU Song-ling², SHEN Han¹

(1.College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2.Academy of Science Research of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

Abstract: *Aspergillus* were isolated by streak plate method, four *Aspergillus* strains were obtained named 1[#], 2[#], 3[#] and 4[#]. The enzyme activity were examined for each strain by koji-making, and the optimal conditions for liquor production and fermentation was determined by orthogonal test and single factor. The producing capability under the optimum ferment culture and ferment condition were 1[#] 11545.7U/g, 2[#] 8240.4U/g, 3[#] 9146.0U/g, 4[#] 4527.7U/g. The last, Biolog automated microbes identification system (Biolog System) was used to identify as *Aspergillus terricola* Marcha, *Aspergillus parasiticus* Speare and *Aspergillus versicolor*.

Key words: *Aspergillus*; isolation; protease activity

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)03-0212-04

酒曲中有丰富的微生物,能分泌各种酶,使酒曲具有液化、糖化和蛋白分解等能力^[1-3],其中曲霉是酒曲微生物混合体系中蛋白酶活性较强的一类菌。由于不同曲霉产生的蛋白酶性质和酶活性不同,使其对蛋白质降解的产物和水解度有差异,由此引起酒曲及发酵产物的营养和风味不同^[4],所以研究酒曲中产蛋白酶活性高的曲霉对于酒曲优势菌群的构建^[5]、降低生产成本、改进酿酒工艺、提高产品品质具有重要意义。本实验以不同企业提供的酒曲为材料,进行曲霉的分离纯化,获得纯菌株后再经发酵培养基和发酵条件的优化,筛选出产蛋白酶活力高的理想曲霉菌株。

1 材料与方法

收稿日期:2009-06-30 *通讯联系人

作者简介:任文雅(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:科技部工业微生物菌种资源标准化整理、整合及共享试点项目(2005DKA21204-07)。

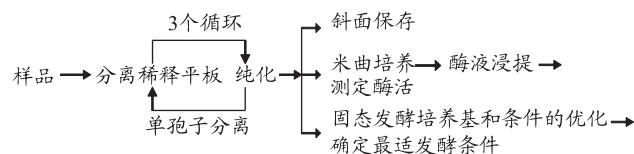
1.1 材料与仪器

酒曲,玉米粉,黄豆粉,福林酚试剂,马铃薯葡萄糖培养基,察氏培养基,牛肉膏蛋白胨培养基,麦芽汁培养基^[6-7],其他试剂均为生化试剂或分析纯试剂。

T6型新世纪紫外-可见分光光度计,DK-S22型数显恒温水浴锅,130s超净工作台,LRH-250型生化培养箱,Anymicro Dss显微镜,低温冷冻干燥机。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程



1.2.2 曲霉的分离与纯化 无菌条件下,将酒曲捣碎,称取适量样品,选取适宜的稀释度用生理盐水稀释后,以涂布平板法分别涂于马铃薯葡萄糖培养基、察氏培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基平

板上,35℃培养48h,检查菌落出现情况。取单菌落,用接种针挖掘一小块菌丝移植于另一平板培养基上,35℃培养72h,再从长有单菌落的平板中选取典型的毛霉菌落,取孢子体制成悬液,涂布培养、镜检,重复培养2~3次以分离纯化曲霉。将纯化了的曲霉转接到察氏斜面上培养,待生长完好后置于4℃冰箱中保存。

1.2.3 产酶培养及其测定

1.2.3.1 米曲的制作 取适量大米,洗净浸泡约14h,水蒸气蒸30min后,分装在锥形瓶中(每瓶装8g),0.1MPa灭菌30min。待其冷却至36℃,分别接入1mL孢子悬液(菌种来自分离纯化),充分混匀,在35℃恒温培养箱内培养16~18h,肉眼可见大米上长出了菌丝。培养4d后测定蛋白酶活力。

1.2.3.2 酶液浸提 取5g米曲样品于小烧杯中,加入100mL蒸馏水,于40℃水浴中保温30min,两层纱布过滤后,滤液立即使用或冷藏待用。

1.2.3.3 蛋白酶活力测定 按福林酚法^[8]进行。在10mL的刻度管中加入1mL已处理好的样品稀释酶液,置入40℃水浴加热3~5min,然后加入1mL 2%酪蛋白,准确保温10min,立即加入2mL 0.4mol/L三氯乙酸,静置15min后离心,取上清液,加5mL 0.4mol/L Na₂CO₃,再加1mL福林-酚并摇匀,放入40℃水浴加热显色20min,在680nm下测定OD值,测定酶活力。酶活力定义为:40℃时,每克曲体水解酪蛋白1min,若产生1μg酪氨酸,则定义为1个蛋白酶活力单位。

1.2.3.4 糖化酶活力测定 酶活力定义为:1g干曲,40℃、pH为4.6时,1h内将可溶性淀粉水解产生的葡萄糖毫克数(mg/h·g干曲)。本实验采用次碘酸钠法^[9]。

1.2.4 发酵实验

1.2.4.1 发酵方法 本实验采用的固体发酵培养基主要成分为麸皮、氮源、碳源以及水。各组分按比例混匀,每个平板分装5g,灭菌后接入1mL的孢子悬液,35℃培养4d后测定蛋白酶活力。

1.2.4.2 发酵培养基优化 碳源优化:固定了质量比为麸皮:酵母浸粉:水=9:1:9的基础上,碳源分别选用:玉米粉(4)、麦芽糖(0.5)、蔗糖(0.5)、可溶性淀粉(4)、葡萄糖(4),括号中为其相应的质量比例,空白对照实验为不添加任何碳源,优化出最佳碳源。氮源优化:固定了质量比为麸皮:玉米粉:水=9:4:9的基础上,氮源分别选用:黄豆粉(5)、硫酸铵(1)、蛋白胨(1)、酵母粉(1)、牛肉膏(1),括号中为其相应的质量比例,空白对照实验为不添加任何碳源,优化出最佳氮源。

采用单因素实验法,按1.2.4.1方法发酵培养,比较产蛋白酶活性差异,确定优化的发酵培养基。

1.2.4.3 发酵培养条件的优化 利用优化发酵培养基^[10-11],以温度、培养时间、培养基起始pH、接种量为因素,进行L₉(3⁴)正交实验,通过测定蛋白酶活力确定优化的发酵条件,因素水平见表1。

1.2.5 Biolog微生物鉴定^[12] 按照Biolog微生物自动分析系统的标准,对从样品中分离出的菌种作微生物鉴定。

表1 发酵条件的正交设计因素水平表

水平	因素			
	A 温度 (℃)	B 时间 (h)	C 起始 pH	D 接种量 (mL)
1	31	96	6	0.5
2	33	120	7	2.5
3	35	144	8	4.5

1.2.6 菌种保藏 对所得菌种采用真空冷冻干燥法保藏^[13]。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离与纯化^[14]

样品稀释后在马铃薯葡萄糖培养基、察氏培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基上培养,发现马铃薯培养基上主要是酵母菌和霉菌,其中霉菌主要为毛霉、根霉、曲霉;麦芽汁培养基上有较多的酵母菌生长;在察氏培养基上主要是霉菌;从4种培养基平板中共分离出霉菌6株,对其中四株曲霉进行研究,依次编号为1[#]~4[#]。

2.2 菌种的形态特征

观察形态变化,曲霉经过48h培养便形成明显的黄绿色菌落^[15-16],表面呈毛毡状,边缘整齐并有白色菌丝,先期生产为白色菌丝,后期的生长过程中孢子大量繁殖,显现为明显的、肉眼可见的黄绿色的小颗粒,所以很容易识别。

2.3 米曲培养

1[#]、2[#]、3[#]、4[#]菌种,按照1.2.3.1的方法制成米曲培养,16~18h可见米粒上长出菌丝。4d后,浸提酶液测定蛋白酶和糖化酶活力,实验结果见图1和图2。

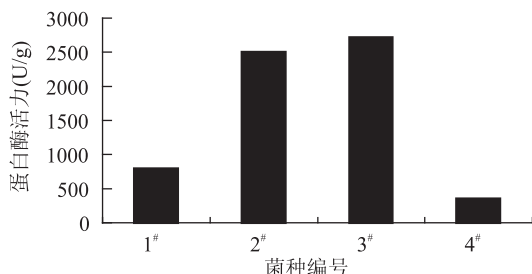


图1 蛋白酶活力测定结果

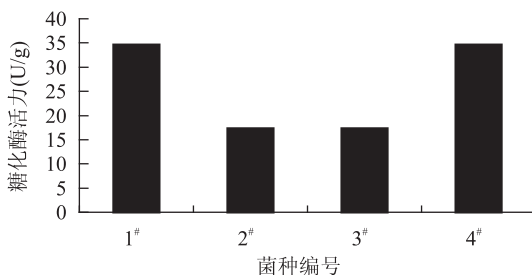


图2 糖化酶活力测定结果

由图1和图2可知,2[#]菌和3[#]菌的酶活力值远远超过其它菌。1[#]菌和4[#]菌糖化酶活力高,表明不同菌种的产酶能力不同。

2.4 单因素法优化发酵培养基

按1.2.4的方法对1[#]~4[#]菌进行不同的碳源和氮源培养基产蛋白酶活力比较,影响结果用OD测定值表示,结果见表2和表3。

表2 不同碳源下蛋白酶活力(OD值)

菌号	C源					
	玉米粉	麦芽糖	蔗糖	可溶性淀粉	葡萄糖	对照
1 [#]	0.004	0.118	0.028	0.029	0.027	0.101
2 [#]	0.002	0.017	0.033	0.043	0.003	0.031
3 [#]	0.019	0.004	0.055	0.031	0.014	0.021
4 [#]	0.035	0.036	0.001	0.01	0.007	0.014

注:表中加粗体为最适宜的碳源。

表3 不同氮源下蛋白酶活力(OD值)

菌号	N源					
	黄豆粉	硫酸铵	蛋白胨	酵母粉	牛肉膏	对照
1 [#]	0.054	0.02	0.011	0.026	0.02	0.004
2 [#]	0.024	0.04	0.001	0.056	0.047	0.027
3 [#]	0.017	0.017	0.049	0.007	0.008	0.0874
4 [#]	0.039	0.016	0.03	0.023	0.06	0.041

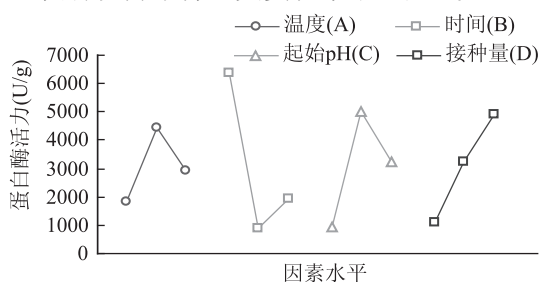
注:表中加粗体为最适宜的氮源。

从表2和表3中得出每种菌的较佳碳源、氮源培养基组分如下:1[#]菌发酵培养基的组分:麸皮、黄豆粉、麦芽糖、水(9:5:0.5:9);2[#]菌发酵培养基的组分:麸皮、酵母粉、可溶性淀粉、水(9:1:4:9);3[#]菌发酵培养基的组分:麸皮、蔗糖、水(9:0.5:9);4[#]菌发酵培养基的组分:麸皮、麦芽糖、水(9:0.5:9)。

2.5 发酵条件的确定

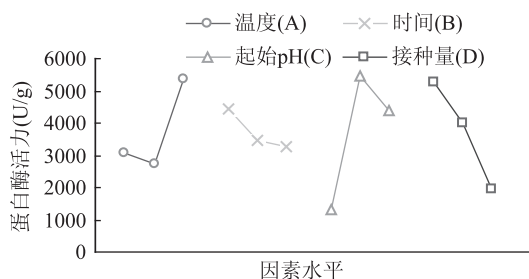
按1.2.4.3的方法对1[#]~4[#]菌的培养条件进行L₉(3⁴)正交实验,以蛋白酶活力为指标,利用方差分析的方法,确定各因素水平优化组合构成的菌种发酵条件,结果如下。

1[#]菌种发酵条件正交实验结果见图3。

图3 1[#]菌种发酵条件极差分析结果

由图3可知,对蛋白酶活力影响的主次顺序为B>C>D>A,即培养时间>起始培养基的pH>接种量>温度,优水平为A₂B₁C₂D₃,即温度33℃、培养时间96h、起始培养基的pH7、接种量4.5mL,蛋白酶活力达到了11545.7U/g。

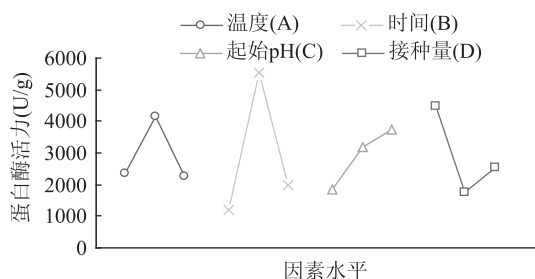
2[#]菌种发酵条件正交实验结果见图4。

图4 2[#]菌种发酵条件极差分析结果

由图4可知,对蛋白酶活力影响的主次顺序为C>D>A>B,即起始培养基的pH>接种量>温度

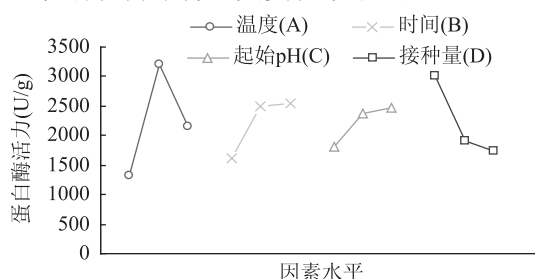
>培养时间,优水平为A₃B₁C₂D₁,即温度35℃、培养时间96h、起始培养基的pH为7、接种量0.5mL,蛋白酶活力达到了8240.4U/g。

3[#]菌种发酵条件正交实验结果见图5。

图5 3[#]菌种发酵条件极差分析结果

由图5可知,对蛋白酶活力影响的主次顺序为B>D>A>C,即培养时间>接种量>温度>起始培养基的pH,优水平为A₂B₂C₃D₁,即温度33℃、培养时间120h、起始培养基的pH为8、接种量0.5mL,蛋白酶活力达到了9146.0U/g。

4[#]菌种发酵条件正交实验结果见图6。

图6 4[#]菌种发酵条件极差分析结果

由图6可知,对蛋白酶活力影响的主次顺序为A>D>B>C,即温度>接种量>培养时间>起始培养基的pH,最佳的工艺条件为A₂B₃C₃D₁,即温度33℃、培养时间144h、起始培养基pH为8、接种量0.5mL,蛋白酶活力达到了4527.7U/g。

可以看出,通过发酵组分和培养条件优化,蛋白酶活力得到了很大的提高,显然,大米的成分比较单一,不能够满足菌种生长的需要。添加了碳源和氮源后,保证了营养成分的多样性,为菌种生长创造了优良的环境,四个菌种蛋白酶增长5~10倍。同米曲的蛋白酶活力比较见图7。

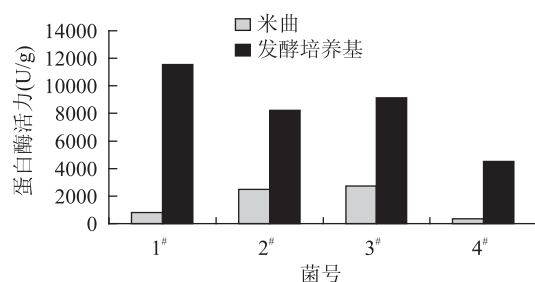


图7 米曲和发酵培养基测定蛋白酶活力比较

2.6 菌种冷冻干燥

将装有菌悬液的安瓿管直接放在低温冰箱中(-80℃)或放在干冰无水乙醇浴中进行预冻,然后置于真空干燥箱中,开动真空泵进行真空干燥,干燥后样品呈白色疏松状态,最后将安瓿管封口置于冰箱(5℃左右)中或室温下避光保存。

3 结论

采用常规“稀释平板涂抹法”与“稀释平板划线法”等两种方法从酒曲中分离出 4 株菌,通过单因素实验法,对 4 株菌的培养基碳、氮源进行研究,确定优化培养基组分:1[#]菌优化的发酵培养基的组分为麸皮、黄豆粉、麦芽糖、水(9:5:0.5:9);2[#]菌优化的发酵培养基的组分为:麸皮、酵母粉、可溶性淀粉、水(9:1:4:9);3[#]菌优化的发酵培养基的组分为:麸皮、蔗糖、水(9:0.5:9);4[#]菌优化的发酵培养基的组分为:麸皮、麦芽糖、水(9:0.5:9)。

采用 L₉(3⁴) 正交实验对 4 株菌的发酵条件进行研究,确定优化的培养温度、培养时间、起始 pH、接种量分别为:1[#]菌 33℃、96h、pH7、4.5mL;2[#]菌 35℃、96h、pH7、0.5mL;3[#]菌 33℃、120h、pH8、0.5mL;4[#]菌 33℃、144h、pH8、0.5mL。在最适条件下产蛋白酶活力分别达到 1[#]菌 11545.7U/g;2[#]菌 8240.4U/g;3[#]菌 9146.0U/g;4[#]菌 4527.7U/g,与利用米曲所测的蛋白酶相比增长了 5~10 倍,真正地做到了条件的优化。

后续工作中需进一步研究混合菌种的发酵特性和菌种的产香分析,为酒曲中优势微生物菌群的构建以及进一步优化蛋白酶提供实验依据。

参考文献

- [1]熊昌绪.发酵调味品工艺学[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1994:115-121.
- [2]高士昌,马春颖.固态低盐发酵法酿造酱油缩短发酵期的实验[J].中国调味品,2002(11):14-15.
- [3]邢来君,李明春.普通真菌学[M].北京:高等教育出版

(上接第 211 页)

尾及杂带,适合用做分子标记模板。该法实验过程耗时短,从而减少了 DNA 发生降解的机会,简便,易操作。PCR 扩增反应受多种因素影响,dNTPs 浓度较低或较高时,条带都易发生缺失,浓度过高加快反应速度,增加碱基的错误掺入率,而低浓度又导致反应速度下降,影响产物多样性;Taq 聚合酶用量过多易造成非特异性扩增,应在达到最优扩增的情况下尽可能减少用量;引物浓度过高,则其与模板 DNA 结合位点增多,导致扩增片段减小;过低则引物与模板 DNA 的结合位点少,导致扩增片段增大^[12]。

本实验通过严格控制反应条件,获得了较稳定的扩增结果,应用优化后的反应体系所获得的 RAPD 指纹图谱带型清晰,重复性好,为通过分子标记获得丰富的桑黄遗传信息奠定了良好基础,为下一步 RAPD 分析提供数据支撑。

参考文献

- [1]Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [2]Welsh J, Honeycutt R J, McClelland M, et al. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)[J]. TAC, 1991, 82: 473-475.

社,1999.

- [4]张玉涛,许学书.米曲霉诱变方法及其酶系分布对产氨基氮能力影响的研究[J].中国调味品,2003(7):26-28.
- [5]吴衍庸,等.酒曲微生物分析与白酒香型初探[J].酿酒科技,2004(5):38-39.
- [6]杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992:236-237.
- [7]陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:67-70.
- [8]孙清,夏蓉.制曲过程中蛋白酶活力的检测[J].中国调味品,2001(6):24-26.
- [9]郭勇.酶工程[M].北京:中国轻工业出版社,1994:311-313.
- [10]诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997:205-209.
- [11]高福成.新型发酵食品[M].北京:中国轻工业出版社,1998,12.
- [12]姚粟,程池,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统——丝状真菌鉴定操作规程的研究[J].生产与科研经验,2006,12(8):63-67.
- [13]钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1999.
- [14]牟志浩,罗光荣.酱油曲霉的选育[J].中国调味品,1991(2):19-20.
- [15]Brian J B Wood,徐岩.发酵食品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2001:10-63.
- [16]金朝霞,张春枝.酱油曲霉的选择及酱油发酵条件[J].大连轻工业学院学报,2003(1):32-35.

[3]朱永宏,李学敏,韩宝玲. RAPD 技术在中药材鉴定中的应用进展[J].中草药,2007,38(9):附 7-附 8.

- [4]戴玉成.药用担子菌-鲍氏层孔菌(桑黄)的新认识[J].中草药,2003,34(1):94-95.
- [5]Wang X B, Ng TB, Ooi VEC, et al. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immuno-enhancing and antitumor activities[J]. Biochem Cell Biol, 1996, 74(1): 95-97.
- [6]秦俊哲,姚艳芳.桑黄菌丝的最适培养条件研究[J].食用菌,2007,29(1):6-9.
- [7]任海霞,宫志远,等.平菇 RAPD-PCR 反应体系优化研究[J].山东农业科学,2009(3):43-44.
- [8]杨华,李联泰.食用菌 DNA 提取方法研究[J].中国食用菌,2003,22(1):19-21.
- [9]唐良华,苏敏,等.食用菌总 DNA 提取方法的研究[J].福建轻纺,2006,1(1):1-4.
- [10]李翠翠,郭立忠,卢伟东,等. RAPD 和 SRAP 分子标记在真姬菇菌种鉴定中的应用[J].食用菌学报,2009,16(1):21-25.
- [11]冯富娟,王凤友,刘彤.红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J].植物学通报,2004,21(3):326-331.
- [12]冯薪硕,朴敬淑,吕龙石.长白山林下参基因组 DNA 提取及 RAPD 体系的优化[J].延边大学农学报,2009,31(1):16-20.