

解淀粉芽孢杆菌诱变菌株 NCU116-1 的生物学特性及其酶系分析

赵荣彬^{1,2,3}, 鄢祥辉¹, 龙俊敏⁴, 余平^{1,2,3,*}, 曾诚⁵, 欧阳少林⁶, 曾哲灵^{1,2,3,*}

(1.南昌大学资源环境与化工学院,江西南昌 330031;

2.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047;

3.江西省食用药食同源植物资源高值化利用重点实验室,江西南昌 330031;

4.江西生物科技职业学院动物科学系,江西南昌 330200;

5.南昌大学第一临床医学院,江西南昌 330031;

6.吉安林业科学研究所,江西吉安 343000)

摘要:以解淀粉芽孢杆菌诱变菌株 NCU116-1 为出发菌,对其生物学特性和培养特征进行研究。并用国标法、羧甲基纤维素糖化法等对该突变株的主要酶系的发酵时间和酶学性质进行分析测定。结果表明,淀粉酶、糖化酶和纤维素酶的最佳发酵时间是 40 h;中性蛋白酶最佳发酵时间是 44 h,果胶酶最佳发酵时间是 42 h。中性蛋白酶在 50 ℃ 时活力最高, Mn^{2+} 对其有激动作用,最适宜酶解温度为 40~45 ℃、适宜酶解 pH 为 8;糖化酶在 35 ℃ 时活力最高, Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 对其有激动作用,最适宜酶解温度为 35 ℃ 左右、适宜酶解 pH 为 8.0;果胶酶在 40 ℃ 时活力最高, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对其有激动作用,最适宜酶解温度为 35~40 ℃、适宜酶解 pH 为 6.0;纤维素酶在 50 ℃ 时活力最高, Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 对其有激动作用,最适宜酶解温度为 40~45 ℃,适宜酶解 pH 为 7.0。该菌株生产的胞外酶符合水酶法提取植物油脂复合酶制剂的要求,本文为该类菌株的应用奠定理论基础。

关键词:解淀粉芽孢杆菌,复合酶,发酵时间,酶系分析

Biological characteristics and exoenzymes analysis of a mutated strain *Bacillus amyloliquefaciens* NCU116-1

ZHAO Rong-bin^{1,2,3}, YAN Xiang-hui¹, LONG Jun-min⁴, YU Ping^{1,2,3,*},
ZENG Cheng⁵, OU YANG Shao-lin⁶, ZENG Zhe-ling^{1,2,3,*}

(1.School of Resource, Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3.Jiangxi Province Key Laboratory of Edible and Medicinal Plant Resources, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

4.School of Animal Science, Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200, China;

5.School of Medicine, The First Clinical Medical College, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

6.Ji'an Forestry Science Research Institute, Ji'an 343000, China)

Abstract: The biological characteristics and culture characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* NCU116-1 were studied. Nation-standard method and carboxymethyl cellulose saccharification method were used to analyze the enzymes production fastigium and their properties. The result showed that the optimal fermentation time of amylase, amylase and cellulase was 40 h. The optimum fermentation time of the neutral protease was 44 h. The optimum fermentation time of pectinase was 42 h. The neutral protease had the maximum activity at 50 ℃. Mn^{2+} was an activator of neutral protease. Its optimum temperature and pH value were 40~45 ℃ and 8 respectively. The glucoamylase had the maximum activity at 35 ℃, and was activated by Ca^{2+} , Fe^{3+} and Mn^{2+} . Its optimum temperatures and pH value were 35~40 ℃ and 8.0 respectively. The pectase had the maximum activity at 40 ℃, and was activated by Mn^{2+} and Ca^{2+} . Its optimum temperatures and pH value were 35~40 ℃ and 6.0 respectively. The cellulase had the maximum activity at 50 ℃, and was activated by Ca^{2+} and Cu^{2+} . Its optimum temperatures and pH value were

收稿日期:2016-11-04

作者简介:赵荣彬(1990-)男,硕士研究生,研究方向:应用微生物学,E-mail:robin0391@163.com。

* 通讯作者:余平(1982-)男,博士,研究方向:天然产物研究与开发,E-mail:cpu_yuping@126.com。

曾哲灵(1965-)男,博士,教授,研究方向:食物资源开发与生物质转化,E-mail:zljzhengjx@163.com。

基金项目:国家国际科技合作专项项目(2011DFA32770);江西省国际科技合作项目(20112BDH80004,20123BDH80011);食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-ZZA-201303);江西省科技支持计划重大项目(20143ACG70015);江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD12012);重点实验室目标导向项目(SKLF-ZZA-201610)。

40~45 ℃ and 7.0 respectively. The extracellular enzymes produced by the strain meet the requirements of aqueous enzymatic method and this paper lays a theoretical foundation for the application of this kind of strain.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; fermentation time; complex enzyme; enzyme analysis

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)10-0221-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.034

出于对食品安全、环境保护和油料资源综合利用等方面的深度需求,水酶法提取植物油脂技术已成为国内外研究热点。水酶法提取植物油脂的原理是:油料经过机械破碎后,加入生物酶充分破坏油料细胞组织释放油脂,最后经离心分离得到植物油脂和水解蛋白质^[1]。根据其原理,能够破坏植物油料细胞组织的生物酶(除脂肪酶外)都可应用于水酶法提取植物油脂,多种生物酶的复合水解更有利于植物油脂的释放。该观点已被相关的文献报道证实,例如慧君等^[2]将中性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶等用于水酶法提取菜籽油,结果显示上述几种酶都有提高油脂提取率的作用,其中中性蛋白酶作用最为明显。赵玮等^[3]将蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶及这些酶的混合酶等用于水酶法提取玉米胚油,结果显示纤维素酶:淀粉酶为4:3的混合酶提油效果最好。刘志强等^[4]将蛋白酶、纤维素酶、果胶酶和复合酶(蛋白酶:纤维素:果胶=5:3:2)用于水酶法提取菜籽油,结果显示使用复合酶的提取效果最好,油脂提取率与蛋白质提取率较空白组(无酶)分别提高了30%和20%,较使用单一酶分别提高了5%和6%以上。目前水酶法使用的复合酶基本上是由几种纯种酶制剂按一定比例配制而成,该方法制得的复合酶生产工艺复杂、成本高。因此,研究选育酶系丰富、产酶量大且不产脂肪酶的菌株,并由该菌株生产成本低、酶系全面的复合酶制剂是当前水酶法提取植物油脂研究的迫切任务。

解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 是由本课题组从樟树籽仁油生产废渣中筛选并通过物理诱变和化学诱变后得到的产中性蛋白酶能力强、产脂肪酶能力很弱的耐中碳链脂肪酸型菌株,非常适用于水酶法提取樟树籽仁油等中碳链油脂^[5-6]。将该菌株生产的酶制剂用于水酶法提取樟树籽仁油工艺中,可显著提高樟树籽仁油和水解蛋白的得率。解淀粉芽孢杆菌,拉丁名 *Bacillus amyloliquefaciens*,属于芽孢杆菌属,与枯草芽孢杆菌的亲缘关系很高,在自然界分布广泛,常见于土壤、植物根部体表和植物体内,易分离培养,对人畜无毒无害,由解淀粉芽孢杆菌制成的菌制剂已获得我国农业部的认可。根据相关文献报道^[7-8],解淀粉芽孢杆菌可能产的胞外酶有蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、糖化酶、果胶酶等,但未曾有文献系统的分析报道解淀粉芽孢杆菌胞外酶酶系。本实验测定分析了解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 生物学特性,系统分析了胞外酶的种类及其与发酵时间之间的关系,并对其主要酶系的性质进行分析,为该菌株的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 课题组从樟树籽

油生产废渣中筛选出,经诱变获得;玉米粉、麦麸、豆粕、脱脂奶粉 均为市售; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 Na_2CO_3 、 NaCl 、 NaOH 、 H_2SO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、琼脂、干酪素、福林酚、三氯乙酸、果胶 均为分析纯;LB 肉汤培养基;营养琼脂培养基;发酵培养基:玉米粉 4.5%,麸皮 2.5%,豆粕 4%, CaCl_2 0.2%, KH_2PO_4 0.03%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.4%,pH7.5。以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

WFZ765PC 型紫外可见分光光度计 重庆光电仪器有限公司;CT-6023 型 pH 计 深圳鑫宝莱检测仪器有限公司;XMTI-8112 电热恒温水浴锅、SKP-02420 型电热恒温培养箱、TQZ-312 型台式全温振荡器、全自动高压灭菌锅 上海精宏实验设备有限公司;超净工作台 吴江市净化设备总厂;FA1604 电子天平 德国赛多利斯有限公司;XSZ-4G 型中级生物显微镜 重庆光电仪器有限公司;JSM 6701F 型场发射扫描电镜带能谱仪 日本电子株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵培养条件 取一环已经活化好的解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1,接入到 50 mL 肉汤培养基中,37 ℃、220 r/min 摇瓶培养 24 h,制得种子液。向发酵培养基中接入 1% 的种子液,37 ℃、220 r/min 摇瓶发酵培养至所需时间,取出发酵液 8000 r/min 离心分离 10 min,所得上清液即为发酵复合酶液。

1.2.2 酶活力测定方法

1.2.2.1 中性蛋白酶活力测定 参照国标 GB 23527-2009 规定的福林酚法测定^[9]。中性蛋白酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.2.2 脂肪酶活力测定 参照国标 GB 23535-2009 测定^[10]。脂肪酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,1 min 水解底物产生 1 μmol 可滴定脂肪酸,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.2.3 淀粉酶活力测定 采用碘比色法测定,参照国标 GB 8275-2009 测定^[11]。淀粉酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,1 h 液化 1 g 可溶性淀粉,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.2.4 糖化酶活力测定 参照国标 GB 8276-2006 中规定的碘量法测定^[12]。糖化酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,1 h 水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖,即为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.2.5 果胶酶活力测定 参照轻工业标准 QB1502

-92 中规定的碘量法测定^[13]。果胶酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,1 h 分解果胶产生 1 mg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.2.6 纤维素酶活力测定 采用 CMC-DNS 法测定^[14]。纤维素酶活力定义:1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在一定温度和 pH 条件下,每分钟水解羧甲基纤维素钠(CMC-Na),产生 1.0 μg 的葡萄糖,即为 1 个酶活单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

1.2.3 发酵时间对解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 胞外酶活力影响 摇瓶培养至 38~48 h 时,每隔 2 h 取样一次。将发酵液 8000 r/min 离心分离 10 min,所得上清液即为不同发酵时间的发酵酶液,40 ℃ 条件下分别测定各胞外酶活力。因为在水酶法提取植物油脂工艺中,酸性或碱性酶解条件都会促进油脂水解从而导致酸价升高。实践表明在中性条件下进行酶解催化,所得油脂酸价增加幅度最小,最适合用于水酶法提取植物油脂工艺^[15]。为了尽量贴近实际使用环境,各胞外酶活力都是在中性条件(pH = 7.0)下测定的。

1.2.4 解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 胞外酶系分析 取发酵 44 h 制得的发酵酶液,在不同 pH(4、5、6、7、8、9、10)条件下分别测定菌株所产胞外酶活力,确定其最适作用 pH;在不同温度(35、40、45、50、55、60、65 ℃)条件下分别测定菌株所产胞外酶活力,确定其最适作用温度;在不同温度(35、40、45、50、55 ℃)保温不同时间(30、66、90、120 min)后测定菌株所产胞外酶活力,确定其热稳定性能;在菌株所产粗酶液中添加 10 mmol/L 不同的金属离子(Mn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺)后检测菌株所产胞外酶活力,确定不同金属离子对其激动作用^[16]。

2 结果与讨论

2.1 菌株生物学特性

解淀粉芽孢杆菌拉丁名为 *Bacillus amyloliquefaciens*,属于细菌界(Subkingdom),细菌门(Bacteriophy),芽孢亚门(*Bacillus subphylum*),枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* Cohn),同枯草芽孢杆菌有很高的亲缘性。

菌株在营养琼脂培养基上生长迅速(图 1),培养 18 h 后,菌落呈圆形、大小 5.0~9.0 mm、厚度约 2 mm,表面光滑,颜色为浅黄色、边缘有不规则波状圆形突起,菌苔粘稠,革兰氏染色为阳性(图 2)。用分析型扫描电子显微镜下观察(图 3),菌株形态为杆状,直或略带弯曲,表面光滑,两端呈钝圆形态,菌体较细长,单个或多个首尾相连排列,无荚膜,长度在 1.5~2.5 μm 之间,直径为 0.4~0.5 μm。菌株的菌落形态、革兰氏染色结果、电镜下的形态与原始菌株相比并无明显差异,但胞外酶活力发生较大变化^[6]。这样的结果可能是由于物理化学诱变对该原始菌株胞外酶的基因产生影响较大,使控制胞外酶性状的 DNA 发生了一定程度的突变,而对其菌落和细胞形态并无引起较大改变^[17-18]。

2.2 最佳发酵时间的确定

解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产中性蛋白酶活

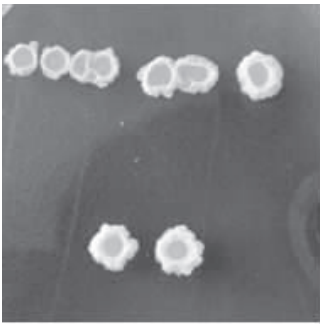


图 1 菌株 NCU116-1 菌落形态
Fig.1 Colony morphology of strain NCU116-1

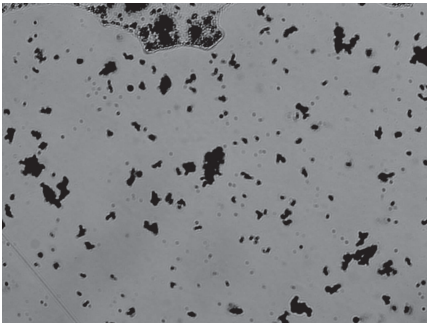


图 2 菌株 NCU116-1 革兰氏染色
Fig.2 Gram staining results of strain NCU116-1

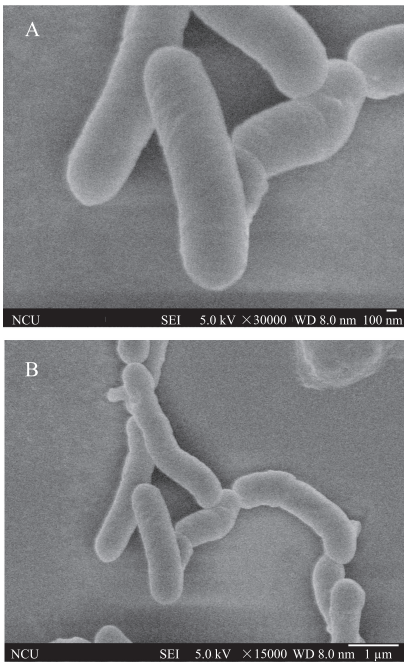


图 3 菌株 NCU116-1 在扫描电镜下形态
Fig.3 Shape of strain NCU116-1 observed by transmission electron microscope

注:图 3(A)为放大 30000 倍图像,图 3(B)为放大 15000 倍图像。

力与发酵时间的关系列于图 4(A)和图 4(B)中。由图可知,NCU116-1 胞外酶分别为蛋白酶、糖化酶、果胶酶、纤维素酶、淀粉酶。糖化酶、淀粉酶和纤维素酶的最佳发酵时间是 40 h;中性蛋白酶最佳发酵时间是 44 h,果胶酶最佳发酵时间是 42 h。蛋白酶和糖化酶的产量较高,其次是果胶酶和纤维素酶,淀粉酶

的产量不是很高,未测出脂肪酶活力。接下来对酶活力较高的蛋白酶、糖化酶、果胶酶、纤维素酶进行酶学性质分析。

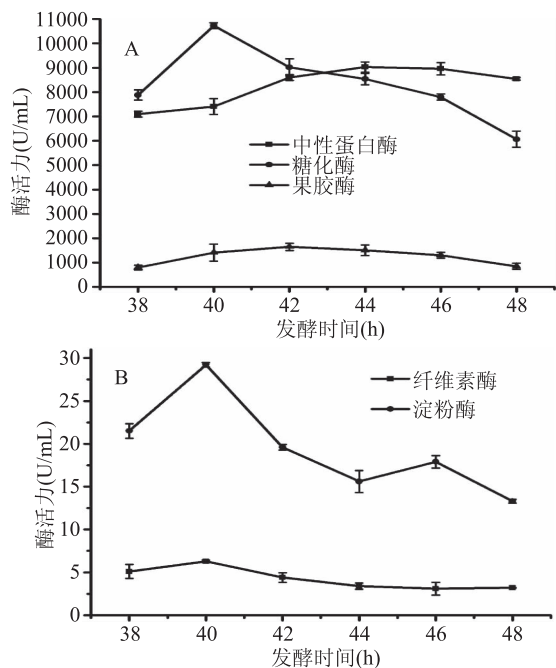


图4 解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产胞外酶活力与发酵时间的关系

Fig.4 The relationship between fermentation time and the exoenzyme activity

注:图4(A)中包括蛋白酶、糖化酶、果胶酶;
图4(B)中包含纤维素酶和淀粉酶。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 胞外酶系分析

2.3.1 蛋白酶的酶学性质 pH、温度、保温时间和金属离子对菌株 NCU116-1 所产蛋白酶活力的影响

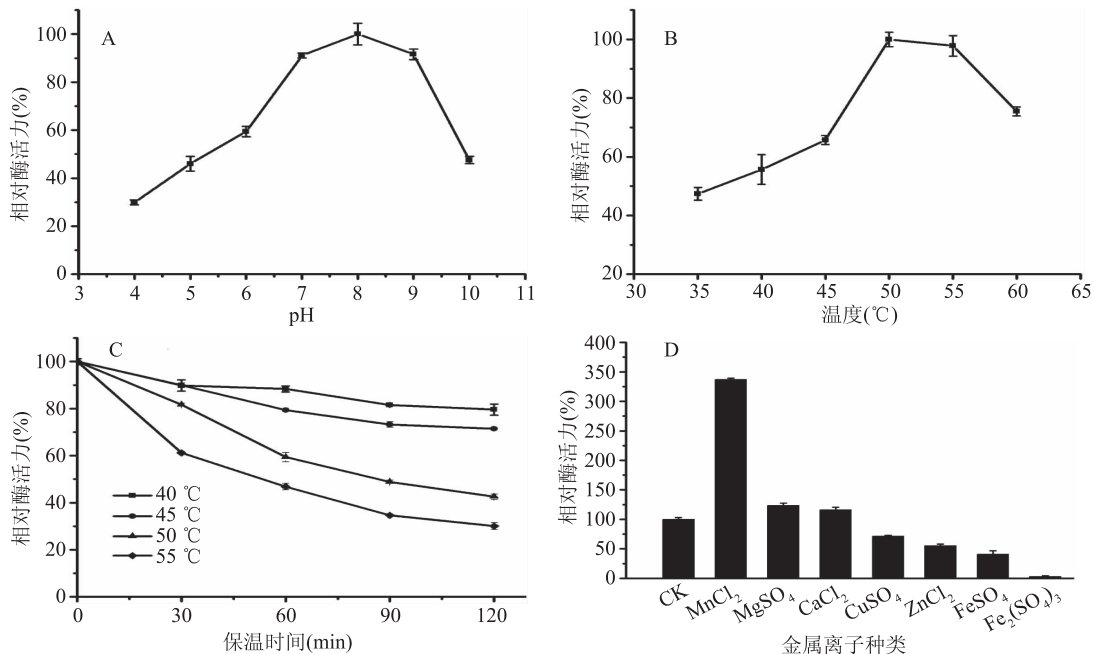


图5 蛋白酶的酶学性质

Fig.5 Enzymatic properties of proteinase

注:图5(A)表示 pH 对蛋白酶活力影响,图5(B)表示温度对蛋白酶活力影响,
图5(C)表示蛋白酶的热稳定性,图5(D)表示金属离子对蛋白酶活力的影响。

属离子对菌株 NCU116-1 所产蛋白酶活力的影响分别绘于图 5(A~D)中。由图 5(A)可知,当 pH 为 8 时,解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产蛋白酶活力最高,适宜水酶法提取植物油脂的 pH 环境。由图 5(B)可知,菌株 NCU116-1 所产蛋白酶活力在 50 °C 时最高。由图 5(C)可知,当温度达到 50 °C 及以上时,解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产蛋白酶活力随着时间的延长而快速降低。结合图 5(B)可确定,菌株 NCU116-1 所产蛋白酶的最适宜作用温度为 40~45 °C。由图 5(D)可知, Mn²⁺ 可以显著提高菌株 NCU116-1 所产蛋白酶活力。这是因为大多数微生物所产中性蛋白酶都是金属蛋白酶,其活性中心常含有一个金属离子如 Co²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Mg²⁺ 等。金属蛋白酶中的金属离子可被透析或者金属螯合物所螯合而失活,而这一过程通常是可逆的,可通过重新加入金属离子恢复部分或者全部蛋白酶活力^[19]。

2.3.2 糖化酶的酶学性质 pH、温度、保温时间和金属离子对菌株 NCU116-1 所产糖化酶活力的影响分别绘于图 3A~3D 中。由图 6(A)可知,当 pH 为 8 时,菌株 NCU116-1 产酶活力最高。由图 6(B)可知,菌株 NCU116-1 所产糖化酶活力在 35 °C 时最高。由图 6(C)可知,当温度分别为 30 °C 和 35 °C 时,保温 120 min 后,菌株 NCU116-1 所产糖化酶的活力与初始菌株相比保持稳定,当温度达到 40 °C 及以上时,菌株 NCU116-1 所产糖化酶活力随着时间的延长而快速降低。结合图 6(B)可确定,菌株 NCU116-1 所产糖化酶的最适宜作用温度为 35 °C 左右。该酶属于低温糖化酶。低温糖化酶在自然温度条件下仍具有高酶解活力及高催化效率,可大大降低能源消耗、简化工艺流程,同时温和的热处理即可使其失活,易于产品质

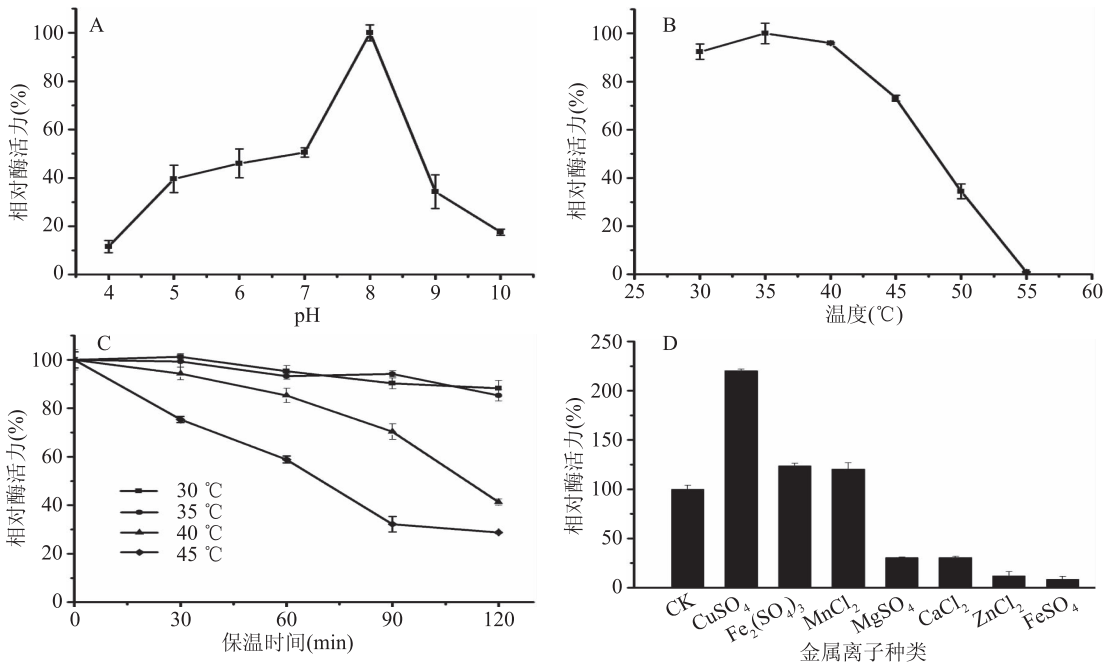


图 6 糖化酶的酶学性质

Fig.6 Enzymatic properties of glucoamylase

注:图 6(A)表示 pH 对糖化酶活力影响,图 6(B)表示温度对糖化酶活力影响,图 6(C)表示糖化酶的热稳定性,图 6(D)表示金属离子对糖化酶活力的影响。

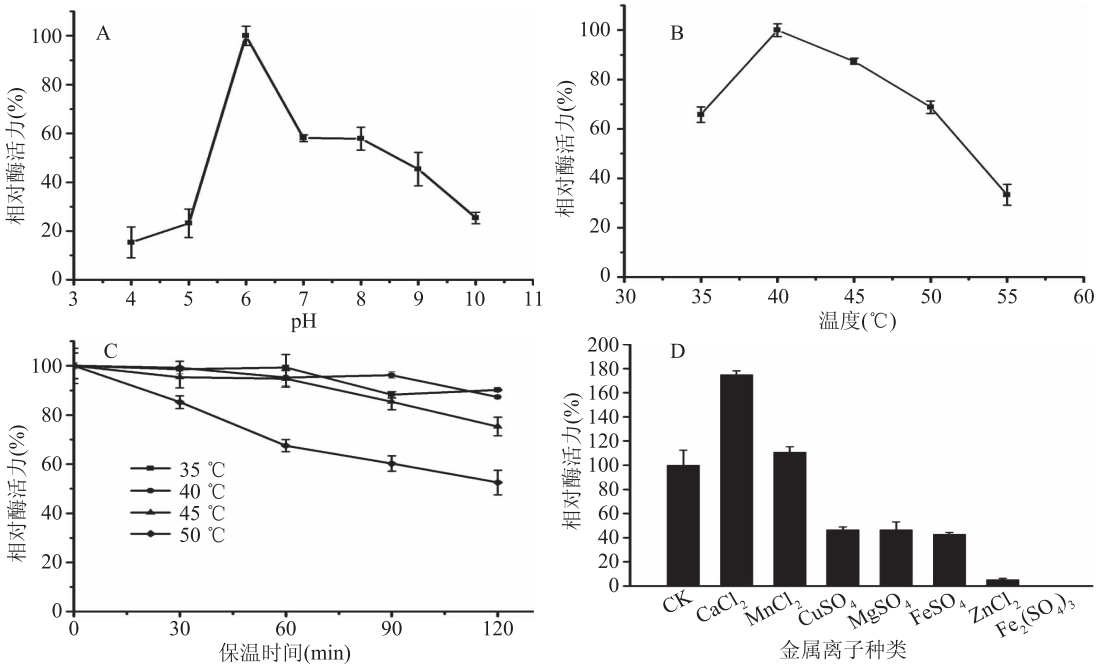


图 7 果胶酶的酶学性质

Fig.7 Enzymatic properties of pectase

注:图 7(A)表示 pH 对果胶酶活力影响,图 7(B)表示温度对果胶酶活力影响,图 7(C)表示果胶酶的热稳定性,图 7(D)表示金属离子对果胶酶活力的影响。

量控制,因此在水酶法提油、饲料加工等的许多领域较中温糖化酶更有优势^[20]。由图 6(D)可知,Cu²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺可以提高菌株 NCU116-1 所产糖化酶活力。

2.3.3 果胶酶的酶学性质 pH、温度、保温时间和金属离子对菌株 NCU116-1 所产果胶酶活力的影响分别绘于图 7(A~D)中。由图 7(A)可知,当 pH 为 6

时,菌株 NCU116-1 所产果胶酶活力最高。该酶的适宜 pH 为 5.5~6.5。由图 7(B)可知,菌株 NCU116-1 所产果胶酶活力在 40 °C 时最高。由图 7(C)可知,当温度达到 45 °C 及以上时,菌株 NCU116-1 所产果胶酶活力随时间的延长而降低。结合图 7(B)可确定,菌株 NCU116-1 所产果胶酶的最适宜作用温度为 35~40 °C。由图 7(D)可知,Mn²⁺和 Ca²⁺都可以提高菌

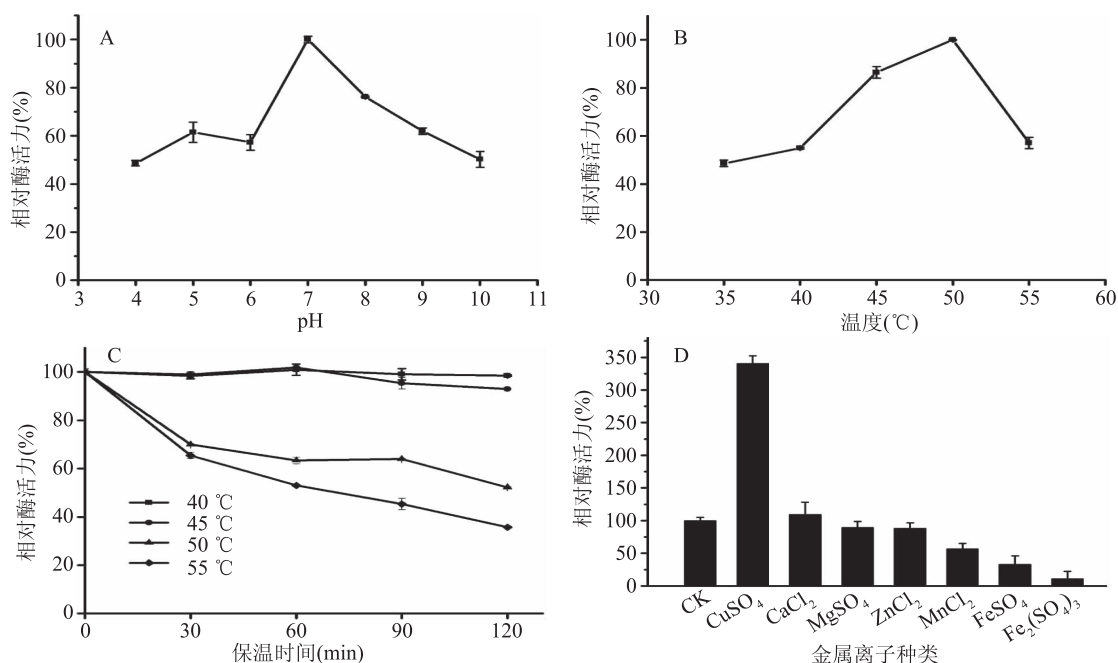


图8 纤维素酶的酶学性质

Fig.8 Enzymatic properties of cellulase

注:图8(A)表示 pH 对纤维素酶活力影响,图8(B)表示温度对纤维素酶活力影响,图8(C)表示纤维素酶的热稳定性,图8(D)表示金属离子对纤维素酶活力的影响。

株 NCU116-1 所产果胶酶活力。

2.3.4 纤维素酶的酶学性质 纤维素酶是酶工业制剂中重要的酶,用于饲料添加剂、纤维素饲料、生物制品等领域^[21]。pH、温度、保温时间和金属离子对菌株 NCU116-1 所产纤维素酶活力的影响分别绘于图 8(A~D)中。由图 8(A)可知,当 pH 为 7 时,菌株 NCU116-1 所产纤维素酶活力最高。该酶的适宜 pH 为 6~8,最佳 pH 为 7。由图 8(B)可知,菌株 NCU116-1 所产纤维素酶活力在 50 °C 时最高。由图 8(C)可知,当温度分别为 40 °C 和 45 °C 时,保温 120 min 后,菌株 NCU116-1 所产纤维素酶的活力较初始菌株保持稳定,当温度达到 50 °C 及以上时,菌株 NCU116-1 所产纤维素酶活力随时间的延长而降低。结合图 8(B)可确定,菌株 NCU116-1 所产纤维素酶的最适宜作用温度为 40~45 °C。该纤维素酶在中低温下能保持较高活性,在低温生物加工等领域起到重要应用价值。由图 8(D)可知,Ca²⁺ 和 Cu²⁺ 可以提高菌株 NCU116-1 所产纤维素酶活力。

3 结论与讨论

对解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 菌株形态和细胞形态进行了观察,并分析了该菌株胞外酶活力随发酵时间的关系,以及蛋白酶、糖化酶、果胶酶、纤维素酶的酶学性质,包括 pH、温度、热稳定性和金属离子的影响。在 pH 为 7,温度为 40 °C,发酵时间为 42 h 的条件下,解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产的胞外酶的酶活力都比较高,且无脂肪酶活性,在该温度下进行酶解反应有利于降低水酶法提取植物油脂工艺中的能源消耗,符合水酶法提取植物油脂复合酶制剂要求。

解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 所产的酶液为复合酶,与由多种单一酶混合的复合酶相比,其生产工艺

更简单、生产成本更低;与近些年报道的复合酶生产菌^[22-24]相比,这些复合酶生产菌大都为霉菌,所产酶系以纤维素为主,主要应用于饲料行业;解淀粉芽孢杆菌 NCU116-1 的所产酶系以中性蛋白酶为主,其中性蛋白酶和糖化酶能力高于前者,其中性蛋白酶能力甚至高于现在国内常用的中性蛋白酶生产菌^[25],是更适合生产用于水酶法提取植物油脂用的复合酶制剂。

参考文献

- [1] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjana K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(6): 402-420.
- [2] 于慧君, 周建平, 黄耀武. 酶对油菜籽油水酶法提取率的影响研究[J]. *现代食品科技*, 2011(3): 328-331.
- [3] 赵玮, 王大为, 李倩. 水酶法提取玉米胚芽油工艺优化[J]. *食品科学*, 2010(24): 206-209.
- [4] 刘志强, 贺建华, 曾云龙, 等. 酶及处理参数对水酶法提取菜籽油和蛋白质的影响[J]. *中国农业科学*, 2004(4): 592-596.
- [5] 曾诚, 马毛毛, 肖彦骏, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Z16 的产酶条件优化及应用[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(3): 196-200.
- [6] 肖彦骏, 曾诚, 马毛毛, 等. 用于水酶法提取中碳链油脂菌株的筛选与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(22): 173-178.
- [7] Deb P, Talukdar S A, Mohsina K, et al. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 [J]. *Springerplus*, 2013, 2(154).
- [8] Schallmeyer M, Singh A, Ward O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(1): 1-17.

(下转第 246 页)

的8.92%,说明采用酶法提取黄酮耗时较短,得率、纯度较高,优于有机溶剂浸提法。酶法辅助提取菠萝蜜果皮黄酮浸提物清除 DPPH 与 ABTS 自由基 IC₅₀ 分别为 0.041、0.092 mg/mL,低于有机溶剂浸提法的 0.072、0.116 mg/mL,说明酶法提取菠萝蜜果皮黄酮浸提物的抗氧化性强于有机溶剂浸提法。综上,酶法辅助提取菠萝蜜果皮黄酮优于传统有机溶剂浸提法。

3 结论

以菠萝蜜果皮为原料,采用酶法和传统溶剂浸提法提取黄酮类化合物,在单因素的基础上,通过正交实验优化提取工艺。比较了酶法与有机溶剂浸提法提取菠萝蜜果皮黄酮类化合物得率、纯度与体外抗氧化性。酶法提取菠萝蜜果皮黄酮最佳工艺条件为果胶酶用量 300 U/g、乙醇浓度 80% (v/v)、温度 55 ℃、pH5.5、底物质量浓度 45 g/L、时间 2.0 h;传统有机溶剂提取最佳条件为乙醇浓度 80% (v/v)、温度 55 ℃,料液比 1:20 (g/mL),时间 2.5 h;酶法提取黄酮类化合物得率和纯度分别为 4.98%、12.60%,高于有机溶剂浸提法的 3.05%、8.92%,提取物的抗氧化性强于有机溶剂浸提法,说明酶法提取菠萝蜜果皮黄酮优于传统有机溶剂浸提法。

参考文献

- [1] Jagtap U B, Waghmare S R, Lokhande V H, et al. Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) wine and its protective role against radiation induced DNA damage[J]. Industrial Crops and Products, 2011, 34 (3): 1595-1601.
- [2] 张星启, 宋贤良, 陈颖森, 等. 响应面优化菠萝蜜果皮果胶的酶法提取工艺[J]. 广东农业科学, 2015, 11 (3): 89-93.
- [3] 姚定. 菠萝蜜果皮果胶提取及特性研究[D]. 合肥: 安徽农

(上接第 226 页)

- [9] GB/T 23527-2009, 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] GB/T 23535-2009, 脂肪酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] GB 8275-2009, 食品添加剂 α -淀粉酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [12] GB 8276-2006 食品添加剂糖化酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [13] GB 1502-92, 食品添加剂果胶酶制剂[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- [14] 穆春雷, 武晓森, 李术娜, 等. 低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质[J]. 微生物学通报, 2013 (7): 1193-1201.
- [15] 王素梅, 王璋. 水酶法提油工艺对玉米胚油质量的影响[J]. 食品科技, 2002 (9): 9-11.
- [16] 陈营, 桂远明, 陈晓刚. 几种离子和有机化合物对枯草芽孢杆菌蛋白酶活力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2001, 16 (2): 125-129.

业大学, 2009.

- [4] Tan Y, Li H, Lai W, et al. Crude Dietary Polysaccharide Fraction Isolated from Jackfruit Enhances Immune System Activity in Mice[J]. Journal of Medicinal Food, 2013, 16 (7): 663-668.
- [5] Lin Yuheng, Shen Xiaolin, Yuan Qipeng, et al. Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxy-coumarin[J]. Nature Communications, 2013 (4): 2603.
- [6] Baliga M S, Shivashankara A R, Haniadka R, et al. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review [J]. Food Research International, 2011, 44 (7): 1800-1811.
- [6] 宋佳. 芦笋废弃物中黄酮化合物的纯化及性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [7] 罗塔子, 张弘, 郑华, 等. 响应面分析法优化微波提取密蒙花总黄酮工艺[J]. 中国食品学报, 2011, 11 (8): 79-86.
- [8] 郝倩. 菠萝蜜叶黄酮类化合物的提取及其浸膏的应用[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [9] 邓梦琴, 何夏怡, 何慕怡, 等. 响应面法优化菠萝蜜果皮黄酮提取工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37 (5): 222-227.
- [10] 邓梦琴, 林晓瑛, 张明, 等. 超声波辅助提取菠萝蜜果皮黄酮工艺优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37 (24): 288-293.
- [11] 李石容. 金花茶花黄酮类化合物的分离纯化及抗氧化活性的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- [12] 段宙位, 申铨日, 李鹏, 等. 罗非鱼尾色素中抗氧化成分的提取及活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33 (10): 143-150.
- [13] Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57 (5): 1768-1774.

- [17] 程明, 崔承彬, 李长伟, 等. 化学诱变技术在微生物育种研究中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36 (6): 412-417.
- [18] 熊俐, 杨跃寰, 胡洋. 物理诱变技术在食品工业微生物育种上的应用进展[J]. 江苏农业科学, 2010 (5): 457-459.
- [19] 马宏颖. 中性蛋白酶高产菌株的诱变选育及发酵条件研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [20] 朱非, 王珊, 周培瑾. 低温酶冷适应的分子机制及其在生物技术中的应用[J]. 微生物学报, 2002 (5): 640-644.
- [21] 林祥木, 童金秀, 陈汉清, 等. 产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件的选择[J]. 福建农业大学学报, 2003 (4): 510-513.
- [22] 陈曦, 赵建国. 饲用酶高产菌株的筛选[J]. 饲料工业, 2006 (6): 14-15.
- [23] 宋鹏, 黄亮, 陈亮. 产复合酶枯草芽孢杆菌 QLB6 的激光诱变育种[J]. 食品科学, 2011 (9): 222-224.
- [24] 王水顺, 林进哲, 张金玮, 等. 复合酶高产菌株选育的研究[J]. 药物生物技术, 2001 (6): 317-321.
- [25] 胡学智, 王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. 工业微生物, 2008 (4): 49-61.