

叶光斌,王彩虹,熊俐,等. 3 株芽孢杆菌产酶性质的初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):240-242.

3 株芽孢杆菌产酶性质的初步研究

叶光斌^{1,2}, 王彩虹¹, 熊俐¹, 王毅¹

(1. 四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川自贡 64300)

摘要:以实验室分离出的 3 株芽孢杆菌(*Bacillus axarqualiensis*)菌株 xym-1、xym-2、xym-4 为出发菌株,通过鉴定培养基(淀粉培养基、酪素培养基和 CMC-Na 培养基)分别对 3 菌株的产胞外淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的能力进行定性鉴定。通过 Yoo 改良法测得菌株 xym-1、xym-2、xym-4 淀粉酶活性分别为 13.13、14.15、10.35 U/mL; Folin-酚法测得其蛋白酶活性分别为 31.27、20.14、8.82 U/mL;DNS 法测得其羧甲基纤维素酶(CMC)活力分别为 21.61、18.37、13.84 U/mL,滤纸酶(FPA)活力分别为 14.35、14.05、12.24 U/mL。

关键词:芽孢杆菌;淀粉酶;蛋白酶;纤维素酶

中图分类号:Q936 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0240-03

窖池是中国浓香型白酒生产的基础,其微生物以细菌为主,现阶段已有很多关于芽孢杆菌、产甲烷菌、己酸菌的研究报道^[1-2]。芽孢杆菌多数为腐生菌,具有产生抗性芽孢、忍受多种不良环境等优点,还有很多潜在的特殊功能,在工农业生产以及科学研究中有广泛的应用价值^[3]。与此同时,芽孢杆菌能产生包括淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等在内的多种酶类。枯草芽孢杆菌产生淀粉酶、蛋白酶的能力已在工业生产中得到应用^[3-4]。现有研究表明,在浓香型大曲生产中适量添加淀粉酶可以降低大曲用量;添加蛋白酶可以提高酿造出酒率,同时增加浓香型白酒主体香味成分己酸乙酯的含量;添加纤维素酶可提高乙醇产率、缩短发酵周期^[5]。因此,对各种产酶功能微生物的筛选和实际应用就显得十分必要。本试验以窖泥中分离得到的 3 株芽孢杆菌为研究对象,分别对其进行酶学性质的初步研究,以期为大曲和白酒固态发酵的实际应用提供一定理论与数据支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

3 株芽孢杆菌(*Bacillus axarqualiensis*) xym-1、xym-2、xym-4 由四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室提供,均分离自泸州老窖窖泥。

1.2 主要仪器与设备

生化培养箱(MJ-250);高压灭菌锅(MLS-3020);超净工作台(SW-CJ-1F);恒温水浴锅(PHSJ-3F);紫外可见分光光度计(UV2000 型);电热恒温干燥箱(202-3AB)等。

1.3 主要培养基及试剂

试验所用培养基主要包括:营养琼脂培养基(牛肉膏 0.3%、蛋白胨 1.0%、NaCl 0.5%、琼脂 2.0%,pH 值 7.0~

7.2)^[6]、液体种子培养基(即不加琼脂的营养琼脂培养基)、淀粉培养基(加入 0.5% 可溶性淀粉的营养琼脂培养基)、产淀粉酶液体培养基(可溶性淀粉 1.0%、蛋白胨 0.5%、Na₂HPO₄·12H₂O 0.4%、KH₂PO₄ 0.03%,pH 值 7.0)^[7]、酪素琼脂培养基(分别配制 A 液和 B 液。A 液:称取 Na₂HPO₄·7H₂O 1.07 g、干酪素 5 g,加适量蒸馏水,并加热溶解。B 液:称取 KH₂PO₄ 0.36 g,加水溶解。最后将 A、B 液混合,加琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,调 pH 值 7.0~7.2)^[8]、产蛋白酶液体培养基(酪蛋白 10 g、酵母膏 1 g、Na₂HPO₄·7H₂O 1.07 g、KH₂PO₄ 0.36 g,加水溶解,最后用蒸馏水定容至 1 000 mL,调 pH 值 7.0~7.2)^[9]、CMC-Na 琼脂培养基(CMC-Na 10 g、酵母膏 1 g、KH₂PO₄ 0.25 g、琼脂 15 g,溶解后用蒸馏水定容到 1 000 mL,调 pH 值 7.0~7.2)^[10]、产纤维素酶液体培养基(CMC-Na 10 g、蛋白胨 5 g、酵母膏 5 g、KH₂PO₄ 1.0 g、NaCl 5 g,加水溶解后用蒸馏水定容至 1 000 mL,调 pH 值 7.0~7.2)^[11]。

其他试剂包括 0.5% 可溶性淀粉溶液、碘液、2% 酪蛋白溶液、100 μg/mL 酪氨酸溶液、1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)等。

1.4 菌株的活化培养及酶活性的初步鉴定

将 3 株芽孢杆菌分别接种于营养琼脂培养基,37℃培养 24 h,置于 4℃冰箱备用。将 3 株芽孢杆菌分别点接到淀粉培养基、酪素培养基和 CMC-Na 培养基上,37℃培养 48 h 后,测量并计算透明圈直径(d_1)和菌落直径(d_2)的比值(d_1/d_2),初步判定各菌株产淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶酶的能力。淀粉培养基采用碘熏蒸着色法^[12]着色后观察;酪素培养基上可直接观察透明圈的大小;CMC-Na 培养基采用刚果红染色法^[10]观察菌落周围的透明水解圈。

1.5 酶活性的检测

1.5.1 粗酶液的制备 将 3 株芽孢杆菌以 1 mL 接种量分别接种于液体种子培养基(装液量为 50 mL/250 mL,每个做 3 个重复),37℃、160 r/min 培养 72 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为粗酶液。然后分别取上清液测定淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的活性。

1.5.2 淀粉酶活性测定 淀粉酶活性定义为:在 37℃、pH

收稿日期:2013-05-21

基金项目:四川省教育厅重点项目(编号:12ZA099);泸州老窖奖学金项目(编号:091jzk06);四川理工学院人才引进项目(编号:2010XJKRL001)。

作者简介:叶光斌(1980—),男,安徽池州人,博士,讲师,从事酿酒生物技术及应用的教学与研究。E-mail:guangbin1980@126.com。

值 6.0 条件下,5 min 内水解 1 mg 淀粉(0.5% 淀粉)的酶量为 1 个活力单位。用 Yoo 改良法^[13]测定淀粉酶的活力。计算公式:

酶活性(U/mL) = $(D_0 - D) \times 50 \times n / D_0$ 。
式中: D_0 、 D 分别表示对照和反应液的听吸光度; n 为酶液的稀释倍数,调整 n 使 $(D_0 - D) / D_0$ 在 0.2 ~ 0.7 之间。

1.5.3 蛋白酶活性测定 蛋白酶活性定义为:在 40 ℃、pH 值 7.2 条件下,1 mL 酶液在 1 min 内水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个蛋白酶活性单位(U),单位为 U/mL。采用 Folin - 酚法^[14]测定蛋白酶活性。酶活性计算公式:

酶活性(U/mL) = $\Delta D \times K \times N \times V / t$
式中: ΔD 为样品液的吸光度与对照液的吸光度之差; K 为标准曲线上吸光度为 1 时的酪氨酸含量; t 为酶促反应时间,10 min; V 为酶促反应管总体积,4 mL; N 为酶液稀释倍数。

酪氨酸标准曲线的测定:参考文献[9]的操作方法。
1.5.4 纤维素酶活性测定 纤维素酶活性定义:1 mL 酶液于 50 ℃、pH 值 4.8 条件下,每分钟水解底物(CMC - Na 或滤纸)产生 1 μg 还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为 1 个酶活性单位(U),单位为 U/mL。计算公式:

酶活性(U/mL) = $B \times n \times 2 \times 1\,000 / 60$
式中: B 为吸光度在标准曲线上对应的葡萄糖量; n 为酶液稀释倍数。

CMC 酶活性的测定^[15]:粗酶液经适当稀释后取 0.5 mL,加入溶有 1% CMC - Na pH 值 4.8 的缓冲液 1.5 mL(先于 50 ℃水浴锅中预热 5 min),50 ℃反应 60 min 后,立即加入 1 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液和 2 mL DNS 试剂,摇匀后在沸水中显色 5 min,取出后流水迅速冷却,并用蒸馏水定容至 25 mL,摇匀后于 530 nm 下测定吸光度。另取一支试管先加入 1 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液使酶液失活作为对照。

滤纸酶活性(FPA)的测定:将底物改为(50 ± 0.5) mg 滤纸(1 cm × 6 cm)1 条,其他操作同 CMC 酶活性的测定。

葡萄糖标准曲线的制作:参照文献[11],加入 2.0 mL DNS 试剂。530 nm 波长下测吸光度,以葡萄糖含量为横坐标、以吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 各菌株产酶能力的初步鉴定

各菌株分别 3 点接种于淀粉培养基、酪素琼脂培养基和 CMC - Na 琼脂培养基,37 ℃恒温培养 48 h 后,各透明圈如图 1 所示。从图 1 可以看出,3 株芽孢杆菌均能产清晰的透明圈,说明各菌株均具备向外分泌淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的能力。

各菌株透明圈直径(d_1)、菌落直径(d_2)以及有效值比值(d_1/d_2)如表 1 所示。

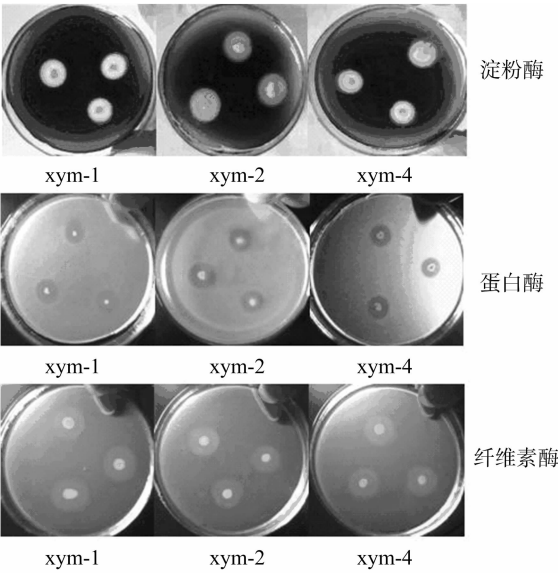


图1 3株芽孢杆菌产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶的透明圈

表 1 透明圈的有效值检测

菌株	淀粉酶			蛋白酶			纤维素酶		
	d_1 (mm)	d_2 (mm)	d_1/d_2	d_1 (mm)	d_2 (mm)	d_1/d_2	d_1 (mm)	d_2 (mm)	d_1/d_2
xym - 1	11.9	3.9	3.05	8.6	1.8	4.78	20.9	5.6	3.73
xym - 2	15.0	4.8	3.12	11.6	2.5	4.64	18.4	4.8	3.83
xym - 4	13.8	4.9	2.82	10.3	3.3	3.12	20.3	5.7	3.56

由表 1 可知,3 株芽孢杆菌产淀粉酶和纤维素酶的能力差距不大,产蛋白酶能力相差较大。菌株 xym - 2 产淀粉酶和纤维素酶的能力最强;菌株 xym - 1 产蛋白酶的能力最强。

2.2 各菌株产酶活性的测定

2.2.1 淀粉酶活性的测定 采用 Yoo 改良法测定淀粉酶活

性(表 2)。研究表明 3 株芽孢杆菌所产淀粉酶的活性相差不大。酶活性最大的是 xym - 2,为 14.16 U/mL;酶活性最小的是 xym - 4,为 10.35 U/mL。这一结果与透明圈有效值的检测结果基本一致。

2.2.2 蛋白酶活性的测定 酪氨酸标准曲线见图 2,得出酪

表 2 淀粉酶的酶活性检测

菌株	吸光度 <i>D</i>	对照 <i>D</i> ₀	酶活性 (U/mL)
xym-1	1.368	1.855	13.13
xym-2	1.330	1.855	14.16
xym-4	1.471	1.855	10.35

氨酸标准曲线方程式: $y = 0.009\ 9x + 0.016\ 6, r^2 = 0.998\ 1$ 。标准曲线线性关系良好,完全符合检测要求。当吸光度(y)为 1 时,酪氨酸含量(x)为 99.33 μg/mL,即 $K = 99.33$ 。采用 Folin-酚法测定各菌株的蛋白酶酶活性的 D 值,并根据公式换算对应的酶活性值(表 3)。由表 3 可知,3 株芽孢杆菌所产蛋白酶的酶活性相差较大,其中菌株 xym-1 的酶活性最大,为 31.27 U/mL;xym-4 酶活性最小,仅为 8.82 U/mL。这一结果也与透明圈有效值的鉴定结果相符。

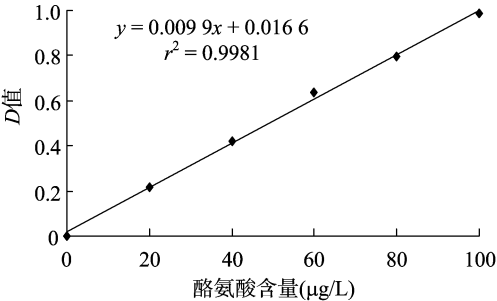


图2 酪氨酸标准曲线

表 3 蛋白酶的酶活性检测

菌株	吸光度 ΔD	酶活性 (U/mL)
xym-1	0.394	31.27
xym-2	0.254	20.14
xym-4	0.111	8.82

2.2.3 纤维素酶活性的测定 对照葡萄糖标准曲线(图 3),计算得出葡萄糖标准曲线方程式为: $y = 0.654\ 4x - 0.022\ 9, r^2 = 0.998\ 1$ 。标准曲线线性关系良好,完全符合检测要求。

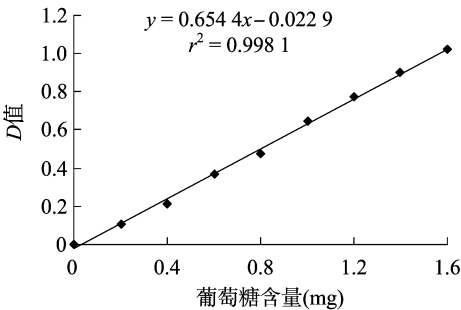


图3 葡萄糖标准曲线

采用 DNS 法分别测定各菌株 CMC 酶活性和 FPA(滤纸酶)酶活性(表 4),研究表明 3 株芽孢杆菌 CMC 酶的活力相差较大,酶活性最大的是菌株 xym-1,为 21.61 U/mL;酶活性最小的是菌株 xym-4,仅为 13.84 U/mL。3 株芽孢杆菌 FPA 酶的活性相差不大。对比 CMC 酶活性与 FPA 酶活性,可以看出 CMC 酶活性相对较高,为 FPA 酶活性的 1.5 倍左右。

表 4 CMC 酶和 FPA 酶的酶活性检测

菌株	吸光度	CMC 酶活性 (U/mL)	吸光度	FPA 酶活性 (U/mL)
xym-1	0.405	21.61	0.264	14.35
xym-2	0.342	18.37	0.258	14.05
xym-4	0.254	13.84	0.223	12.24

3 总结

本试验对从浓香型白酒窖泥内分离获得的 3 株芽孢杆菌 xym-1、xym-2、xym-4 的产淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的能力进行了初步研究,结果表明:3 株芽孢杆菌均能外泌产淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶。其中菌株 xym-2 所产淀粉酶活性最高,为 14.15 U/mL;菌株 xym-1 所产蛋白酶活性最高,达到 31.27 U/mL;菌株 xym-1 所产纤维素酶活性最高,其 CMC 酶活性与 FPA 酶活性分别为 21.61、14.35 U/mL,且 CMC 酶活性为 FPA 酶活性的 1.51 倍。

由于本试验只对这 3 株菌的单菌产酶能力做了初步研究,但浓香型白酒的生产及固态发酵是一个多菌共酵的结果,因此后期还需对微生物的代谢性质做进一步研究,为其在浓香型白酒生产中的强化应用打下更为坚实的基础。

参考文献:

[1] 张文学,乔宗伟,向文良,等. 中国浓香型白酒窖池微生态研究进展[J]. 酿酒,2004,31(2):31-35.
[2] 施 思,王海英,张文学,等. 浓香型白酒窖泥的微生物群落结构特征分析[J]. 酿酒科技,2011(5):38-41.
[3] 惠 明,窦丽娜,田 青,等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(27):11623-11624,11627.
[4] 胡德朋,唐家毅,曹 呈,等. 枯草芽孢杆菌的分离鉴定及酶系分布的研究[J]. 水产科学,2008,27(2):86-88.
[5] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009,187-191.
[6] 聂康康,姚大伟,马 琳,等. 苏云金芽孢杆菌 NJY1 发酵羊毛粉产角蛋白酶条件的初步研究[J]. 江苏农业科学,2010(3):261-263.
[7] 雷晓燕. 土壤中淀粉酶产生菌的筛选及产酶条件优化[J]. 沈阳化工大学学报,2010,24(3):203-208.
[8] 腾 超,李秀婷,朱运平. 传统豆豉中高产蛋白酶葡萄糖球菌的筛选及其产酶条件优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):305-308.
[9] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000:47-49.
[10] 吴敏峰,耿秀蓉,祝 小,等. 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴定[J]. 饲料工业,2006,27(20):21-24.
[11] 魏亚琴,李红玉. 纤维素酶产生菌——根霉的分离选育与鉴定[J]. 兰州大学学报:自然科学版,2008,44(增刊):102-106.
[12] 唐 嘉,陈朝银,赵声兰,等. 一种初筛产胞外淀粉酶菌株的简化方法[J]. 生物加工过程,2008,6(1):37-40.
[13] 姜涌明,史永昶,隋德新. 枯草芽孢杆菌 86315 α-淀粉酶的研究[J]. 江苏农学院学报,1992,13(2):47-56.
[14] SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定法[S]. 1999.
[15] 燕 红,杨 谦,王希国. 两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究[J]. 林产化学与工业,2006,26(2):83-86.