

地衣芽孢杆菌在麸曲中产中性蛋白酶 发酵工艺条件的研究

袁超¹, 崔乐芳², 王瑞明¹

(1. 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 山东 济南 250353; 2. 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 对地衣芽孢杆菌在细菌麸曲培养过程中的最佳培养基和最佳培养条件进行了研究。结果表明, 地衣芽孢杆菌麸曲产中性蛋白酶的最佳培养基为: 玉米粉 8 g/L, 黄豆粉 2 g/L, 麸皮 10 g/L; 最佳培养条件为: 温度 40 ℃, pH 7.0, 接种量 10%, 培养 60 h 时, 产中性蛋白酶活力达到最大, 为 192 U/mL。

关键词: 微生物; 地衣芽孢杆菌; 中性蛋白酶; 细菌麸曲; 培养条件

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.3

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2011)03-0040-03

Study on the Fermentation Conditions of *Bacillus Licheniformis* in Bran Starter to Produce Neutral Protease

YUAN Chao¹, CUI Le-fang² and WANG Rui-ming¹

(1. Food Science & Bioengineering College of Shandong Light Industry Institute, Ji'nan, Shandong 250353;

2. Life Science & Technology School of Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

Abstract: In this study, the best culture medium and the best culture conditions of *Bacillus licheniformis* in the culture process of bacteria bran starter were investigated. The results showed that the best culture medium of *Bacillus licheniformis* to produce neutral protease was comprised of maize 8 g/L, bean flour 2 g/L, and bran 10 g/L. The best culture conditions were temperature at 40 ℃, pH=7.0, 10% inoculating quantity, and 60 h culture time. Under the above conditions, the activity of produced neutral protease could reach the maximum as 192 U/mL.

Key words: microbe; *Bacillus licheniformis*; neutral protease; bran starter; culture conditions

地衣芽孢杆菌是芝麻香型白酒酿造过程中的重要功能菌, 该细菌可耐受较高的温度, 这适合芝麻香型白酒高温发酵的工艺。同时, 地衣芽孢杆菌也具有一定的糖化力和较高的蛋白质分解能力^[1]。

在芝麻香型白酒酿造过程中, 蛋白质的降解是典型香气成分形成的关键^[2]。细菌麸曲是芝麻香型白酒专用曲的重要组成部分, 在细菌麸曲的培养过程中, 提高地衣芽孢杆菌的产中性蛋白酶活力, 辅助河内白曲等霉菌所产的酸性蛋白酶对原料中的复杂蛋白质进行降解对于提高芝麻香型白酒的出酒率和品质具有重要的意义^[3]。

本实验对发酵工艺条件的优化包括培养基成分和培养条件两个方面。培养基成分主要考虑碳源、氮源、碳氮比等。培养条件主要考虑发酵培养基酸碱度、培养温度及时间等的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

地衣芽孢杆菌, 本实验室保藏菌种。

1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然, 121 ℃ 灭菌 20 min。

蛋白酶基础发酵培养基: 可溶性淀粉 10 g, 黄豆粉 20 g, 麸皮 10 g, 酵母粉 2 g, CaCO₃ 10 g, pH 7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.3 蛋白酶活力测定方法

接种后在指定的条件下摇瓶培养, 将发酵液过滤离心, 取上清液, 采用国家标准法(GB/T23527—2009) Folin-酚试剂显色法测定中性蛋白酶活力^[4]。

1.4 实验内容

收稿日期: 2010-12-09

作者简介: 袁超(1985-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物酶技术。

优先数字出版时间: 2011-02-22; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110222.1429.000.html?uid=>。

用单因素法控制地衣芽孢杆菌的发酵生产中性蛋白酶的培养基成分及培养条件,并通过对最终发酵液中的中性蛋白酶活力的测定,最终确定出最佳的蛋白酶发酵工艺条件。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株产中性蛋白酶的影响

分别以葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、蔗糖、玉米粉(浓度均为1%)作为碳源替换基础发酵培养基中的碳源接种^[5],摇床培养72 h后,离心取上清液测定中性蛋白酶活力,结果见表1。表1结果表明,玉米粉作为碳源产酶效果最佳。

表1 不同碳源对产中性蛋白酶的影响

项目	碳源				
	葡萄糖	麦芽糖	可溶性淀粉	蔗糖	玉米粉
吸光度 A	0.209	0.158	0.220	0.302	0.389
稀释倍数	10	10	10	10	10
蛋白酶活力(U/mL)	83	63	88	120	156

2.2 不同氮源对菌株产中性蛋白酶的影响

以玉米粉为碳源,麸皮添加量为1%,分别以浓度为1%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、黄豆粉、蛋白胨为氮源替换基础发酵培养基中的氮源成分,进行摇床培养,培养72 h后,取发酵上清液测定中性蛋白酶活力,结果见表2。由表2结果可知,黄豆粉作为氮源产中性蛋白酶效果最好。

表2 不同氮源对产中性蛋白酶的影响

项目	氮源				
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4NO_3	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	黄豆粉	蛋白胨
吸光度 A	0.199	0.152	0.290	0.420	0.258
稀释倍数	10	10	10	20	20
蛋白酶活力(U/mL)	79	61	116	167	103

2.3 不同的碳氮比对菌株产中性蛋白酶的影响

根据2.1和2.2实验的结果,以玉米粉和黄豆粉为碳氮源,选择不同的总含量和碳氮比进行摇床培养,麸皮添加量为1%,培养72 h后,以上清液中性蛋白酶活力大小为指标,测定结果见表3。由表3结果可知,确定出总含量为10 g,碳氮比为4:1时,发酵液中性蛋白酶活力最高,达174 U/mL。

表3 不同碳氮比对产中性蛋白酶的影响

C:N	总含量(g/L)				
	5	10	15	20	25
1:1	53	83	65	40	20
2:1	60	90	79	58	29
3:1	90	109	95	73	40
4:1	103	174	138	98	65

2.4 接种量对菌株产中性蛋白酶的影响

根据以上实验结果,可溶性淀粉8 g/L,黄豆粉2 g/L,麸皮添加量为1%,分别以接种量5%、7.5%、10%、12.5%和15%进行接种,摇床培养72 h后,测定清液中中性蛋白酶活力,结果见图1。由图1结果可知,10%的接种量条件下产中性蛋白酶最多。

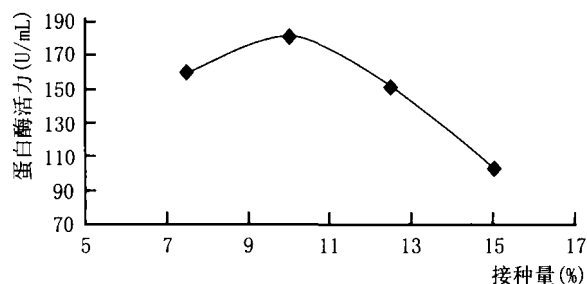


图1 不同接种量对产中性蛋白酶的影响

2.5 温度对菌株产中性蛋白酶的影响

以上面实验确定的培养条件为基础,分别在20℃、30℃、40℃、50℃和60℃下摇床培养,培养72 h后,测定上清液中中性蛋白酶活力,结果见图2。

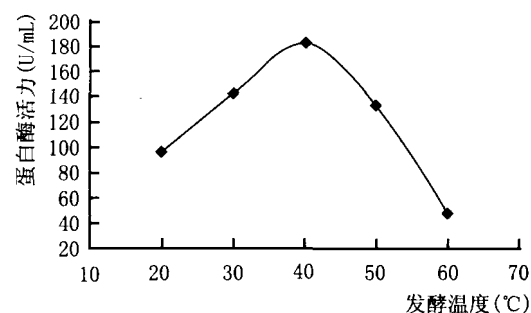


图2 不同温度对产中性蛋白酶的影响

由图2可以得出,地衣芽孢杆菌产中性蛋白酶的最佳发酵温度为40℃,在30~50℃范围内酶活力较为稳定,低于30℃或高于50℃都会使产酶能力大大降低。

2.6 不同发酵起始pH对菌株产中性蛋白酶的影响

以上面实验确定的培养条件为基础,分别调整发酵培养基的初始pH值为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0和11.0,在40℃下摇床培养^[6],培养72 h后,测定上清液中中性蛋白酶活力大小,结果见图3。由图3得出,最佳发酵培养基起始pH为7.0,发酵起始pH过大或者过小都导致产酶能力的迅速降低。

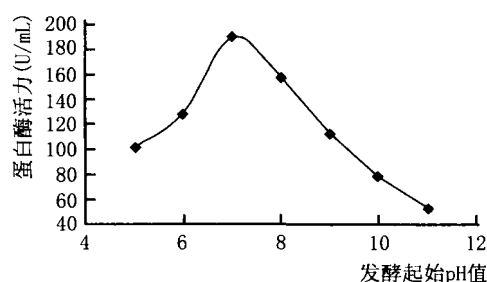


图3 不同发酵起始pH值对产中性蛋白酶的影响

2.7 中性蛋白酶酶活变化曲线的绘制

取7个三角瓶,以上面实验确定的最佳发酵培养条件为基础,在最佳培养条件下接种已在LB种子培养基中培养了18h的种子液,在最适温度下摇床培养,每12h取其中1瓶离心提取粗酶液,测定中性蛋白酶活力大小,然后根据酶活力与时间的关系作图,结果见图4。图4结果表明,在12h内基本不产蛋白酶,12h之后,蛋白酶活力迅速提高,发酵60h,蛋白酶活力达最大,随发酵时间的延长,酶活力有所下降。

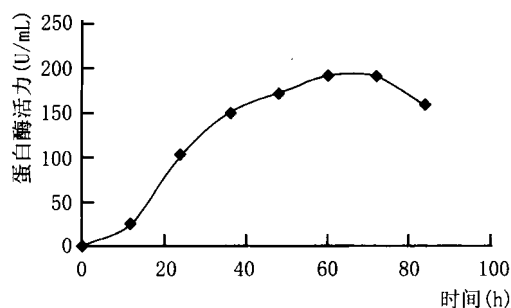


图4 中性蛋白酶的酶活增长曲线

3 结论

3.1 通过单因素培养条件对菌株产中性蛋白酶的影响研究,结果表明,地衣芽孢杆菌最适产中性蛋白酶的发酵培养基是玉米粉8g/L,黄豆粉2g/L,麸皮10g/L,此

时地衣芽孢杆菌发酵72h产中性蛋白酶的酶活力达最大,发酵上清液中,中性蛋白酶活力为180U/mL。

3.2 在单因素实验所得结果的基础上,选取接种量、培养温度和培养基初始pH3个对菌体量影响最大的因素,对地衣芽孢杆菌产中性蛋白酶培养条件进行分析,从而确定了产中性蛋白酶的最佳培养条件为40℃,发酵基质pH7.0,接种量为10%。

3.3 通过对不同时间发酵液中蛋白酶活力的测定发现,地衣芽孢杆菌在12h内基本不产蛋白酶,12h之后蛋白酶活力迅速提高,发酵60h,蛋白酶活力达最大,为192U/mL,随发酵时间延长,酶活力有所下降。

参考文献:

- [1] 信春晖,朱政,赵纪文,等.复粮芝麻香特征香味成分初探[J].酿酒科技,2008,(3):69-72.
- [2] 黄业立,张彬,武金华.试论芝麻香型白酒[J].酿酒科技,2007,(10):116-119.
- [3] 唐胜球,董小英,许梓荣.酒用酸性蛋白酶的研究进展[J].酿酒科技,2005,(1):41-44.
- [4] GB23527—2009 ICS67.220.22 X69—2009,蛋白酶制剂[S].
- [5] 胡承,彭勇,等.地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究[J].工业微生物,1999,29(4):27-30.
- [6] 黄红英,方海红,刘爱民,等.一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究[J].微生物学通报,2001,28(5):20-24.

(上接第39页)

综合产香闻味实验和甜味品尝实验结果,从12株拟内孢霉中筛选出1#、4#、9#、10#4株菌用于今后的生产实验。

5 总结与讨论

拟内孢霉糖化力较低,生长“泼辣”,以往认为对酿酒生产用处不大。但是这种菌数量众多,均有一定产香能力,能生成多种甜味物质,如甘油、阿拉伯糖等与酒甜味有关的物质。故其在酿酒生产中对原料的糖化和生香起

着重要作用,属于白酒生产中的“综合菌种”,对酒醅的健康发酵及生态稳定具有重要作用。实验筛选出的这4株拟内孢霉菌株显示出明显的醇甜、绵柔特性,对本厂醇甜型特色基酒的研发有着重要意义。

参考文献:

- [1] 白酒生产工艺和设备编写组.白酒生产工艺和设备[M].北京:轻工业出版社,1987.
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1996.

苏酒实业召开年度工作会议

本刊讯:据《华夏酒报》报道,2月9日,江苏苏酒实业股份有限公司年度工作会议在宿迁市召开。苏酒集团领导及苏酒实业领导杨廷栋、张雨柏、赵凤琦等人参加了会议。苏酒集团总裁、苏酒实业董事长兼总经理张雨柏在会上作苏酒实业2010年工作报告。

张雨柏在报告中用“一个突破”、“两个优化”、“三个增强”概括了苏酒实业2010年取得的突出成绩,即企业规模大突破,产品结构更优化、市场结构更优化,产品力增强、品牌力增强、渠道力增强。张雨柏还给全体营销人员详细分析了企业所面临的三大机遇和三大挑战,从目标制定科学化和目标落实五围绕等方面阐述了新一年的营销工作目标,并从营销转型常态化等八个方面全面部署了2011年营销工作。

会上,苏酒集团董事长杨廷栋充分肯定了苏酒实业过去一年取得的显著工作成绩,还分析了企业新时期所面临的新形势、新任务,并对苏酒集团新一年的总体工作思路进行了详细阐述,指出集团2011年要全力推进“五大工程”建设,即全力推进集团一体化工程、市场全国化工程、技改扩建工程、管理升级工程、资本市场建设工程,共同谱写苏酒发展新篇章。

苏酒实业年度工作会议表彰和嘉奖了苏酒实业2010年度销售能手、先进单位、先进工作者、先进党支部、优秀党员等,并进行了现场颁奖。(小小荐)

来源:华夏酒报 2011-2-18