

浓香型大曲中优势蛋白酶产生细菌的 分离及产酶条件研究

袁先铃¹, 黄丹¹, 彭建²

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.白象食品集团四川分公司,四川 成都 611430)

摘要: 对浓香型大曲中蛋白酶产生细菌进行分离,并对其最适产酶条件进行研究。采用酪素培养基,从大曲中分离出5株产蛋白酶菌株,筛选出酶活力最高的菌株,其酶活为53.40 U/mL。以小麦为固体培养基,从pH值、培养基水分含量、碳源添加量、氮源添加量、接种量、培养温度和培养时间等方面研究此菌株的最适产酶条件。结果表明,在水分含量65%、初始pH6.0、蔗糖添加量6%、硫酸铵添加量1%、接种量12%、温度40℃、培养时间5d的条件下,其酶活可达262.18 U/mL,为菌种复筛时的4.91倍。

关键词: 浓香型大曲; 蛋白酶; 芽孢杆菌; 发酵条件

中图分类号:Q814;TS261.1;TS261.3;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)08-0054-04

Isolation of Protease-producing Bacteria Strains from Luzhou-flavor Daqu and Study on Its Protease-producing Conditions

YUAN Xianling¹, HUANG Dan¹ and PENG Jian²

(1.School of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2.Sichuan Branch of Baixiang Food Group, Chengdu, Sichuan 643000,China)

Abstract: Protease-producing *Bacillus* strains were isolated from Luzhou-flavor Daqu and its optimum protease-producing conditions were investigated. 5 protease-producing *Bacillus* strains were isolated from Daqu by use of casein agar culture mediums and the strain with the highest protease activity (53.40 U/mL) was screened out. Then wheat was used as solid culture medium to investigate the optimum protease-producing conditions and the optimum conditions were summed up as follows: moisture content was 65 %, initial pH value was 6.0, sugar addition level was 6 %, ammonium sulfate addition level was 1 %, yeast inoculating quantity was 12 %, culture temperature was at 40 °C, and culture time was 5 d. Under the above conditions, the produced protease activity could reach up to 262.18 U/mL, 4.91 times of that before secondary screening.

Key words: Luzhou-flavor Daqu; protease; *Bacillus*; fermentation conditions

中国传统白酒被称为世界六大蒸馏酒之一,其中以浓香型白酒为主。浓香型,又称泸香型,以泸州老窖特曲为代表。浓香型白酒具有芳香浓郁、绵柔甘冽、香味协调、入口甜、落口绵、尾净余长等特点^[1]。大曲对酒体风味的重要作用主要表现在大曲微生物的种类及用曲量,两者相互关联,曲药质量对形成酒的风格和提高酒质起着决定性作用^[2]。白酒生产中酒醅酸度较高,曲在培养过程中亦要生酸,白酒生产中存在的蛋白酶主要是酸性蛋白酶,具有溶解发酵原料颗粒、促进微生物繁殖、分解蛋白质生成香味前体物质和香味物质、降解酵母菌体蛋白等多种功能,并以此提高白酒产量和质量^[3]。

本实验从浓香型大曲中分离出高产蛋白酶菌株,并模拟制曲固态培养条件。通过改变产酶的影响因素,了解细菌生长习性,得到最优产酶条件,使之在酿酒生产上更好地发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大曲:浓香型大曲,四川某浓香型酒厂。

牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、氯化钠 5 g、蒸馏水 1000 mL、琼脂 20 g、pH7.4~7.6。

平板筛选培养基^[4]:牛肉膏蛋白胨培养基 1000 mL、

基金项目 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室(NJ2011-12)。

收稿日期:2012-06-20

作者简介:袁先铃(1979-),女,重庆梁平人,讲师,硕士,主要从事食品工程的教学和研究工作。

优先数字出版时间:2012-07-20;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120720.1017.006.html>。

干酪素 4 g。

液态发酵培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(不加琼脂)。

固态发酵培养基:将小麦打磨成“肉烂皮不烂”并呈“梅花瓣”状,以小麦干重按一定比例加水浸润 4 h,制备固态发酵培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白酶活力测定

蛋白酶活力测定参见 Folin-酚法^[5-6]。

1.2.2 蛋白酶产生菌分离纯化

菌种分离:将浓香型大曲制成 10 倍稀释系列菌悬液,接种于牛肉膏蛋白胨平板,分离出特征菌。

菌种初筛:将分离所得菌株于选择培养基上划线培养,观察其菌落形态及透明圈大小,选择透明圈直径(D)与菌落直径(d)比值较大的菌株经多次划线纯化,接斜面低温保存。

菌种复筛:将初筛得到的菌株以 1%接种量接种于 30 mL 液态发酵培养基中。以 37℃、130 r/min 振荡培养 48 h,再以 3500 r/min 离心 10 min 取上清液,采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力。选择蛋白酶活力最高的菌株为产酶条件的研究目标菌。

1.2.3 菌种初步鉴定

观察菌落形态;革兰氏染色。

1.2.4 产酶条件研究

将目标菌接种固态发酵培养基,以蛋白酶活力为指标,研究不同初始 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0),不同培养基含水量(35%、45%、55%、65%、75%),5%的不同碳源(玉米粉、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉),1%的不同氮源(尿素、蛋白胨、酵母粉、硝酸铵、硫酸铵),不同接种量(8%、10%、12%、14%、16%),不同培养温度(30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃),不同培养时间(2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d)7 个因素对目标菌产酶能力的影响^[7]。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

将分离得到的菌株于选择培养基上涂布,37℃培养 48 h,结果表明,有 5 株长出了肉眼清晰可见的透明圈,其透明圈大小与直径大小之比及其与酶活的关系见表 1。

从表 1 结果可以看出:酶活与 D/d 呈正比关系,5 株菌酶活都较低,可能是选用的液态发酵培养基与实际制曲工艺有差异。A3 菌酶活最高,故选择 A3 为产酶条件研究目标菌。

2.2 菌种初步鉴定

表 1 菌株复筛结果表

菌株编号	透明圈直径 D (cm)	菌株直径 d (cm)	直径比 D/d	酶活 (U/mL)
A1	11	5	2.20	41.75
A2	11	4	2.75	31.90
A3	12	3	4.00	53.40
A4	12	4	3.00	46.10
A5	11	3	3.67	44.55

观察 A3 菌落特征并对其进行革兰氏染色,结果见图 1。

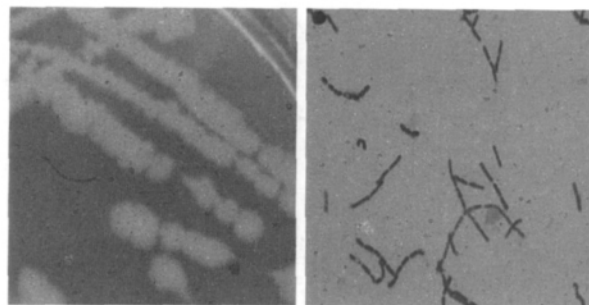


图 1 A3 菌落及细菌形态特征图

A3 菌落呈圆形或椭圆形,大而扁平,边缘不齐整,直径 4 mm 左右,菌落表面粗糙,不透明、不粘稠、易挑取。细菌呈短杆状,单个或联杆,大小为 0.6~0.8 μm×3.0~5.0 μm,呈革兰氏阳性。

2.3 产酶条件研究

2.3.1 pH 值对产酶能力的影响

将 A3 以 10%的接种量接种于不同初始 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0),45%含水量的固态发酵培养基中。于 45℃恒温恒湿培养 72 h,所测酶活见图 2。

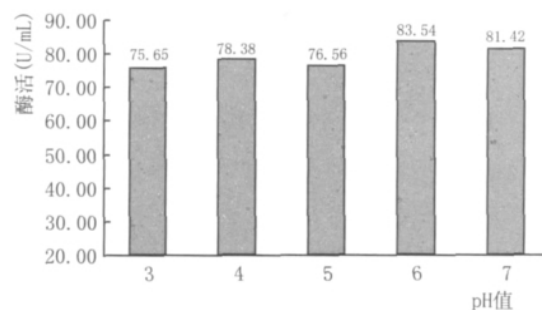


图 2 pH 值对菌株产酶能力的影响

从图 2 可以看出,在各个初始 pH 值条件下酶活相差不大,酶活最高与最低只相差 7.89 U/mL,说明 pH 值对 A3 产酶影响不大。初始 pH 值偏弱酸性时酶活要稍大一些,这是因为和细菌的最适生长 pH 值 7.4~7.6 较接近。初始 pH6.0 时产酶效果最好。

2.3.2 培养基水分含量对产酶的影响

将 A3 菌以 10%接种量接种于不同培养基水分含量(35%、45%、55%、65%、75%),pH 值 6.0 的固态发酵培养基,45℃恒温恒湿培养 72 h,结果见图 3。

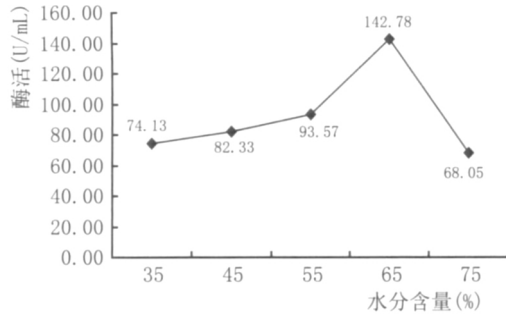


图3 培养基水分含量对菌株产酶能力的影响

图3表明,培养基水分含量低于65%时,酶活呈上升趋势,高于65%时,酶活急剧下降,培养基水分含量65%时,最有利于A3代谢产酶。这与不同水分含量改变了细菌细胞周围的渗透压有关,当培养基水分含量低时,细胞失水而使得生长受抑制;当培养基水分含量高时,细胞吸水膨胀而死亡,导致酶活急剧下降;培养基水分含量为65%时,渗透压平衡,最有利于细菌代谢。

2.3.3 不同碳源对产酶的影响

将A3以10%的接种量接种于含5%的不同碳源(玉米粉、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉),45%含水量的固态发酵培养基,45℃恒温恒湿培养72h,结果见图4。

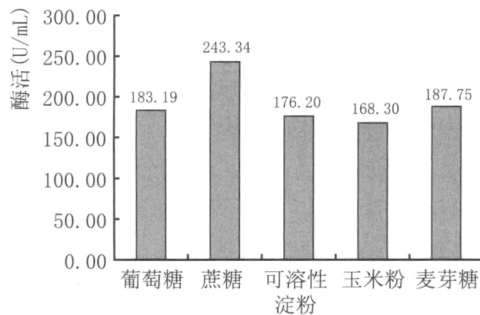


图4 不同碳源对菌株产酶能力的影响

由图4可知,外加碳源对A3菌产酶能力影响的强弱顺序为:蔗糖>麦芽糖>葡萄糖>可溶性淀粉>玉米粉。选择蔗糖为后续产酶条件研究的外加碳源。

2.3.4 不同氮源对产酶的影响

将A3菌以10%的接种量接种于含1%不同氮源(尿素、蛋白胨、酵母粉、硝酸铵、硫酸铵),45%含水量的固态发酵培养基,45℃恒温恒湿培养72h,结果见图5。

图5表明,外加氮源对A3菌产酶能力影响的强弱顺序为:硫酸铵>硝酸铵>尿素>酵母粉>蛋白胨。选择硫酸铵为下一步产酶条件研究的外加氮源。说明A3菌利用等量无机氮的能力强于有机氮。

2.3.5 正交试验

结合以上单因素试验结果,选择蔗糖为外加碳源、硫酸铵为外加氮源,并与pH值、培养基水分含量4个因素

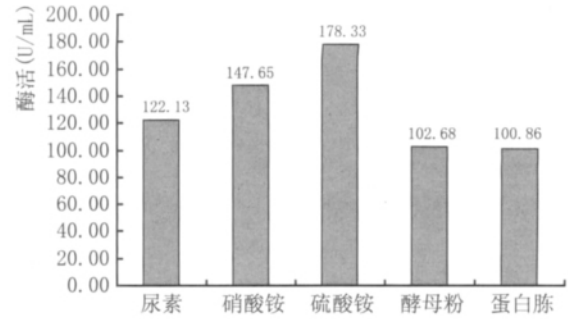


图5 不同氮源对A3产酶能力的影响

进行 $L_9(3)^4$ 正交试验。试验结果见表2。

表2 $L_9(3)^4$ 正交试验结果

试验号	因素				酶活 (U/mL)
	A: 蔗糖	B: 硫酸铵	C: 水分	D: pH值	
1	1 (4%)	1 (1%)	1 (45%)	1 (4)	198.99
2	1	2 (2%)	2 (55%)	2 (5)	204.76
3	1	3 (1%)	3 (65%)	3 (6)	218.73
4	2 (5%)	1	2	3	228.15
5	2	2	3	1	243.04
6	2	3	1	2	175.59
7	3 (6%)	1	3	2	240.00
8	3	2	1	3	208.10
9	3	3	2	1	210.84
\bar{K}_1	207.49	222.38	194.23	217.62	
\bar{K}_2	215.58	218.63	214.58	206.78	
\bar{K}_3	219.65	201.72	233.92	218.33	
极差 R_i	12.16	20.66	39.69	11.55	
最优水平	A_3	B_1	C_3	D_3	

由表2可知,各种因素对A3产酶影响的强弱顺序为:水分含量>氮源>碳源>pH值,产酶条件最优产酶组合为 $A_3B_1C_3D_3$,即6%蔗糖添加量、1%硫酸铵添加量、65%培养基水分含量、pH值6.0。经验证试验,此条件下菌株酶活为245.26 U/mL,大于正交试验组中最大酶活243.04 U/mL,故此为A3菌最优产酶条件。

2.3.6 接种量对产酶的影响

将A3菌按不同接种量(8%、10%、12%、14%、16%)接种于上述最优组合的培养基中,45℃、80%湿度培养72h,接种量对产酶的影响结果见图6。

由图6可知,接种量为12%时其酶活最高,表明30g固态发酵培养基中的营养成分只能维持12%接种量细菌的生长,再增加接种量就会对菌株生长产生抑制。故最佳接种量为12%。

2.3.7 培养温度对产酶的影响

将A3菌以上述得到的12%的最佳接种量接种于优化后的固态发酵培养基中,以不同温度(30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃),80%湿度条件下培养72h。所得结果见图7。

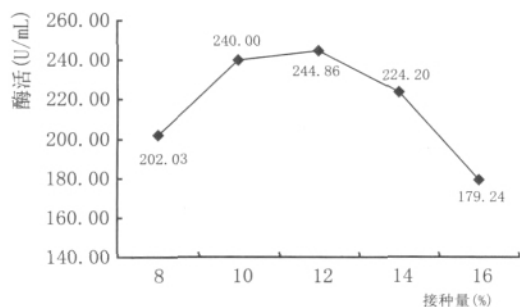


图6 接种量对菌株产酶的影响

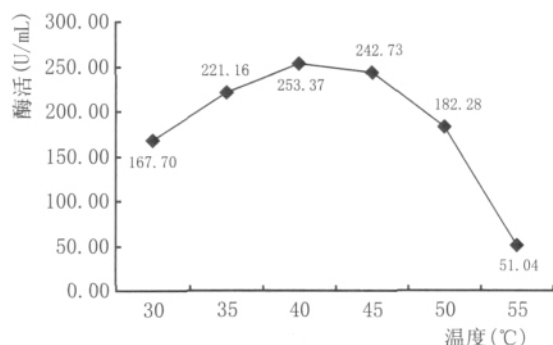


图7 培养温度对菌株产酶能力的影响

由图7可知,A3菌最适宜的产酶温度也是A3菌适宜的生长温度,为35~45℃,且40℃为A3菌的最适培养温度。

2.3.8 培养时间对产酶的影响

将A3菌以12%的接种量接种于正交试验最优固态发酵培养基中。在最适温度40℃下,恒温恒湿,不同时间(2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d)进行培养,其试验结果见图8。

由图8可知,酶活随着培养时间的推移呈现先增大后减小的趋势,培养时间为5 d时酶活最高为262.18 U/mL。故最佳培养时间为5 d。

3 结论

通过实验从浓香型大曲中分离得到1株较强蛋白酶产生细菌。经菌种复筛,酶活为53.40 U/mL。经革兰氏染

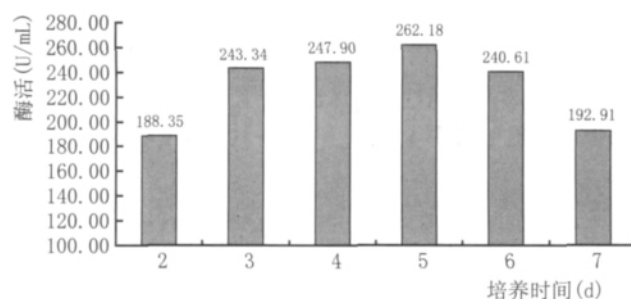


图8 培养时间对菌株产酶能力的影响

色初步鉴定为革兰氏阳性芽孢杆菌。

对其产酶条件进行研究发现:培养基水分含量对其影响最大,其次为氮源添加量,再次为碳源添加量,pH值对产酶的影响较小。进一步得到了A3菌在30 g固态发酵培养基中的最佳产酶条件为:65%水分含量、初始pH6.0、6%蔗糖添加量、1%硫酸铵添加量、12%接种量、温度40℃,发酵5 d。在此条件下酶活可达262.18 U/mL,为菌种复筛时的4.91倍。

通过对浓香型大曲中蛋白酶产生菌产酶条件的研究,有助于进一步控制原料中蛋白质的降解,增加酒体中特殊香味物质,保证酒体的芳香浓郁、绵柔甘冽、香味协调、入口甜、落口绵、尾净余长等特点,对提高浓香型白酒的优质品率具有重要意义。

参考文献:

- [1] 敖宗华, 陕小虎, 沈才洪, 张良, 王小军. 我国浓香型大曲产业发展概况[J]. 酿酒科技, 2011(1): 78-80.
- [2] 信春晖. 对浓香型白酒的几点思考[J]. 酿酒, 2006(4): 34-35.
- [3] 马加军, 屈庆民. 酸性蛋白酶在浓香型酒发酵中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2000(2): 29-33.
- [4] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 114-116.
- [5] 张学英. 蛋白酶及其活力的测定[J]. 酿酒, 2008(6): 100-102.
- [6] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 16-20.
- [7] 方尚玲, 吉园. 弹性蛋白酶产生菌的分离鉴定和发酵条件研究[J]. 食品科学, 2007(11): 306-309.

上半年茅台酒产量2.4万吨

本刊讯 据中国贵州茅台酒厂有限责任公司董事长袁仁国2012年7月16日在贵阳透露,今年1~6月,集团公司白酒总产量4.2万吨,其中茅台酒产量2.4万吨,同比增长15.3%。

据茅台集团统计,今年1~6月,公司实现销售收入(含税)178亿元,同比增长38%;实现利税139亿元,增长37%。

袁仁国介绍,为应对欧债危机和国内经济下行的影响,公司坚持“八个营销”的策略,加大网络销售力度,茅台酒销售“两条腿走路”,以经销商、专卖店为主,自营店为辅,已在全国建立自营店31家,有效稳定了终端销售价格。今年将确保茅台酒产量达到3.3万吨,系列酒(白酒)产量4.2万吨,确保集团公司实现销售收入(含税)350亿元。

统计数据显示,茅台集团各项工程建设全面铺开,上半年完成固定资产投资18.8亿元,增长超过1倍,新增2500吨/年茅台酒生产项目预计将于今年8月底投产。根据规划,到2015年,茅台酒产量将达到4.5万吨,系列酒(白酒)产量7万吨以上,实现销售收入800亿元。(小小)