

传统发酵酸牛奶中产蛋白酶酵母菌的筛选及产酶条件优化

乔传丽¹, 金丹², 蒋艾廷², 薛林林², 卢士玲², 李宝坤^{*1}

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 从新疆哈萨克族传统发酵酸牛奶中分离筛产蛋白酶酵母菌菌株,并确定了各菌株的产酶能力。试验从新疆塔城地区采集酸牛奶样品,以蛋白酶活性作为筛选指标进行初筛、复筛,得到5株高产蛋白酶菌株并对其产酶条件进行优化。经形态观察及26S rDNA序列分析鉴定菌株D1-3为*Pichia kudriavzevii*,E1-5为*Issatchenkia orientalis*,S1-7为*Kluyveromyces marxianus*,W1-10为*Candida parapsilosis*,S1-16为*Saccharomyces cerevisiae*。对其产酶条件优化得出:在最佳产酶发酵液条件下,菌株D1-3最佳产酶活力达78 U/m L、S1-7为79 U/m L、S1-16为55 U/m L、E1-5为82 U/m L、W1-10为64 U/m L,其最适产酶温度为28 ℃,W1-10为37 ℃;菌株最适产酶初始pH、接种量和时间分别为5.0、3%、48 h。

关键词: 酵母菌;筛选;蛋白酶

中图分类号:TS 252.1 文章编号:1673-1689(2019)05-0073-06 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.011

Screening of Yeast with High Protease Activities from Traditional Yogurt and Optimization of Enzyme Conditions

QIAO Chuanli¹, JIN Dan², JIANG Aiting², XUE Linlin², LU Shiling², LI Baokun^{*1}

(College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The strains of protease yeasts were isolated from the traditional fermented yoghurt of Xinjiang Kazak and ensure the protease activity. The protease activity was screened plates and shake flask fermentation, as the index. Five strains of high-yield protease were obtained and optimization of enzymological conditions were studied preliminarily. The results of morphological observation and 26S rDNA sequence analysis indicated that D1-3 was *Pichia kudriavzevii*, E1-5 was *Issatchenkia orientalis*, S1-7 was *Kluyveromyces marxianus*, W1-10 was *Candida parapsilosis* and S1-16 was *Saccharomyces cerevisiae*. Optimizing the conditions of producing enzymes, the strains D1-3 the highest protease activity of fermentation broth was reached to 78 U/mL, S1-7 was reached to 79 U/mL, S1-16 was reached to 55 U/mL, E1-5 was reached to 82 U/mL, W1-10 was reached to 64

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460007)。

* 通信作者: 李宝坤(1979—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事乳制品微生物研究。E-mail:45205350@qq.com

引用本文: 乔传丽,金丹,蒋艾廷,等. 传统发酵酸牛奶中产蛋白酶酵母菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(05): 73-78.

U/mL, we can indicated that the most proper temperature of all strains were 28 °C with one exception of W1-10 was 37 °C; The initial pH, inoculation amount of strain and incubation time were 5.0, 3%, 48h, respectively, in that case, enzyme production reached the best.

Keywords: yeast, screen, protease activity

酵母菌在发酵过程中具有改善风味、增加产品功能、抑制有害菌的生长、益生保健等作用^[1-2];随着发酵技术的进步及基因工程的发展,酵母菌也被应用于传统发酵乳制品中。在我国利用微生物产蛋白酶研究还处于初始阶段;蛋白酶是水解蛋白质的一大类酶的通称,广泛自然界和微生物中,在食品、制药、造纸、洗涤添加剂等行业具有极高的应用价值,其用酶量占世界总用酶量的 60% 以上^[3-4]。目前新的研究热点是从微生物中筛选新的活性物质^[5-6]。芽孢杆菌属是主要产蛋白酶菌株^[7-8]。产酶菌株种类的单一性不能满足工业化对各种酶类生产的需求^[9];另外,目前筛选的蛋白酶对于识别特定氨基酸序列的较少,从微生物中进行广泛从微生物中进行筛选是寻找特定蛋白酶的主要途径^[10-13]。但目前关于乳酸菌应用报道很多,但是对于酵母菌作为附属发酵剂的报道却很少,特别对产蛋白酶的酵母菌研究。

新疆地理环境独特,少数民族采用传统的方法制备奶酪、酸奶等乳制品,这些传统发酵乳制品中,蕴藏着大量具有优良特性和益生作用的酵母菌。作者从新疆传统酸牛奶中筛选出高产蛋白酶酵母菌株,分别采用透明圈法和 Folin-酚法对新疆传统酸牛奶中酵母菌高产蛋白酶菌株的分离和初步鉴定并对其酶学特性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源、培养基与试剂

1.1.1 菌种来源 新疆塔城地区不同牧场采集的哈萨克族传统酸牛奶样品,样品经采集后装入无菌灭菌袋密封,封口后立即放入液氮罐中,实验室放置-80 °C冰箱保存。

1.1.2 培养基 蛋白酶培养基:平板筛选培养基 葡萄糖 5 g/L,酪蛋白 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,KH₂PO₄ 1 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 20 g/L,pH 7.0。发酵培养基 葡萄糖 50 g/L,蛋白胨 10 g/L,KH₂PO₄ 2 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.4 g/L,pH 7.0。

1.1.3 试剂 2×Taq PCR MAsterMix,TIANamp

Yeast DNA kit(离心柱型):天根生化科技有限公司产品;GelRed 核染色剂:北京索莱宝科技有限公司产品;引物 NL-1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA AAAG-3'),NL-4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'):上海生物工程有限公司产品。Folin-酚、酪氨酸、酪蛋白:均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 产蛋白酶菌株的筛选 将分离、纯化得到的酵母菌株,接种在平板筛选培养基中,置于 28 °C 恒温培养箱中培养 2 d,测定其培养皿中菌株所产透明圈直径。培养皿中每 3 个透明圈的平均值记为该菌株的实验结果,计算 HE 值(HE 值=透明圈直径/菌落直径)。筛选出 HE 值较大的菌株进行复筛^[14-15]。将初筛中 HE 值较大的菌株,接种于液体发酵培养基中,置于摇床 100 r/min,28 °C 培养 2 d,5 000 r/min 离心取上清液,所得滤液即粗酶液,用于蛋白酶活力测定^[16]。将初筛得到的菌株,在液体发酵培养基中进行增殖培养(28 °C 2 d),离心取上清液。利用 Folin-酚法^[17-18]测定筛选出的酵母菌的蛋白酶活力。

1.3 产酶条件的优化

将筛选出来的菌株接种到液体发酵培养基中于,100 r/min 条件下摇床培养。测定粗酶液中蛋白酶活,考察初始 pH、培养温度和时间、接种量等发酵条件对菌株产酶活力的影响。

1.3.1 初始 pH 值对菌株产蛋白酶的影响 将培养基的初始 pH 值分别调节为 4、5、6、7、8、9,在 28 °C、100 r/min 条件下摇床培养 2 d,在 4 °C、5 000 r/min 条件下 10 min 离心,取上清液测蛋白酶活力。

1.3.2 温度对蛋白酶活的影响 在温度分别为 25、28、30、35、37、40、45、50 °C 下培养 2 d,在 4 °C、5 000 r/min 条件下 10 min 离心,除去菌体,测定上清液粗蛋白酶活力,以确定最适反应温度,绘制酶催化温度曲线。

1.3.3 接种量对菌株产蛋白酶活力的影响 将初始菌液按体积分数 1%、2%、3%、4%、5%接种量在最适温度和 pH 条件下将菌株在 100 r/min 条件下摇

床培养,每隔 12 h 取样,离心取上清液测定酶活力,计算其他条件下的酶活力,绘制酶活曲线图。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 菌株的形态及生理生化特性鉴定 菌株的形态和通过繁殖方式观察、碳源同化实验、氮源同化实验、糖发酵等生理生化特征进行鉴定。

1.4.2 26S rDNA 基因的扩增和系统进化分析

1) 酵母基因组总 DNA 的提取 依据酵母菌基因组 DNA 试剂盒(离心柱型)进行 DNA 提取。将提取得到的基因组 DNA 用灭菌的 1.5 mL EP 管收集, -20 °C 冰柜保藏备用。

2) 酵母 PCR 扩增及扩增产物的检测 将提取的基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板,使用引物 PCR 扩增目的片段引物序列为 NL-1 和 NL-4,引物扩增的目的片段大小在 300~700 bp 之间。PCR 采用 50 μL 体系:2 x Master Mix 25 μ, NL1 和 NL4(10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板 2 μ, Nuclease-Free Water to 50 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 7 min, 36 个循环 (94 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 1 min), 72 °C 延伸 8 min。

扩增反应完毕后,进行琼脂糖凝胶电泳,电压 100 V,电泳液为 1×TAE。电泳后,用 EB 染色 20 min,紫外灯下观察,目的条带在 300~700 bp 范围内出现明亮的条带,-20 °C 冰箱保存备用。

2 结果与分析

2.1 产蛋白酶酵母菌的筛选结果

各培养基中 HE 值越大其产蛋白酶活力越强。产蛋白酶菌株的初筛结果如图 1 所示,初步得到 5 株在培养基上酶活力较大,分别是 E1-5、D1-3、S1-16、S1-7、W1-10。根据酪蛋白标准曲线回归方程: $Y=0.0104X+0.00022 (R^2=0.9998)$ 得出菌株 D1-3 的蛋白酶活力较高 56.5 U/mL;其次为 E1-5,蛋白酶活力为 47.36 U/mL;最低的菌株是 S1-7,其蛋白酶活力为 14.56 U/mL,结果见图 2。

2.2 产酶条件的优化结果

2.2.1 培养基初始 pH 和培养温度对产酶活力的影响 培养基初始 pH 和培养温度对菌株产蛋白酶活力的影响如图 3 所示。研究得到初始 pH 偏高或偏低都不利于菌株产蛋白酶,本试验所得到的最适初始 pH 范围为 5~6,在 pH 5 时产酶量最大。国内关于常温产蛋白酶的报道较少,陈明霞^[19]从 68 株北极

产蛋白酶菌株中筛选高产蛋白酶菌株 11 最适酶活温度为 40 °C,最适酶活 pH 约为 8.5。温度对菌种的产酶量较明显,除 S1-17 菌株在 37 °C 产酶量较大,其余都在 28 °C 时产酶量最大与赵有婷等^[20]酵母菌最适产酶温度相适应。所筛菌株在低温和偏酸性条件下具有较好的蛋白酶生产能力。

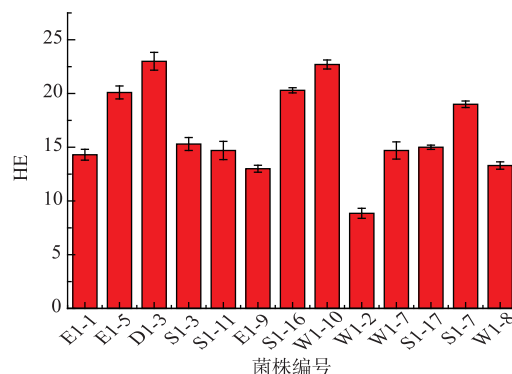


图 1 不同产酶菌株的透明圈与菌落直径比值

Fig. 1 Ratio of transparent circle diameter and the colony diameter

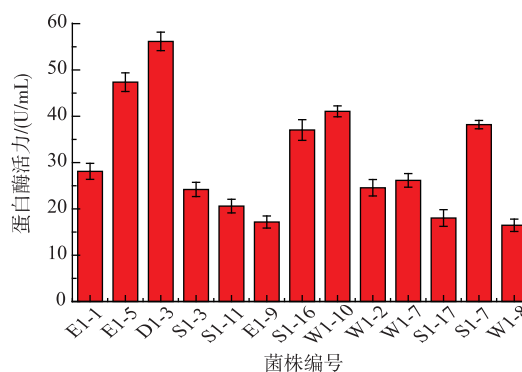
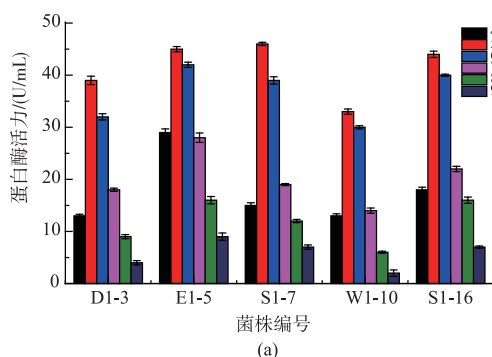


图 2 不同菌株产酶能力

Fig. 2 Enzyme activity of strains



(a)

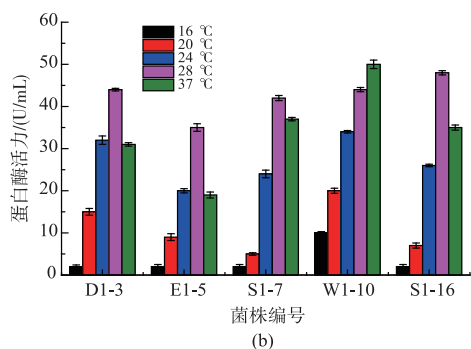


图3 初始 pH 和培养温度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH and temperature on the yield of protease

2.2.2 不同接种量对产酶的影响 将初始菌液按体积分数 1%、2%、3%、4%、5%接种量在 28 °C 条件下培养 48 h, 测定蛋白酶活力, 不同接种量对蛋白酶活力的影响如图 4 所示。在接种量 1% 时酶活最低; 随着接种量的增加酶活逐步上升在 3% 时酶活最大; 接种量的增加, 菌体生长旺盛导致培养基中营养物质快速消耗, 因此蛋白酶活力逐渐下降。宋园亮等^[21]元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究中初始 pH 5.0、接种量在 3%、培养温度 35 °C 培养 36 h 时达到了最佳产酶量 32.50 U/mL。因此根据以上优化条件添加量在 3% 时达到了最高。

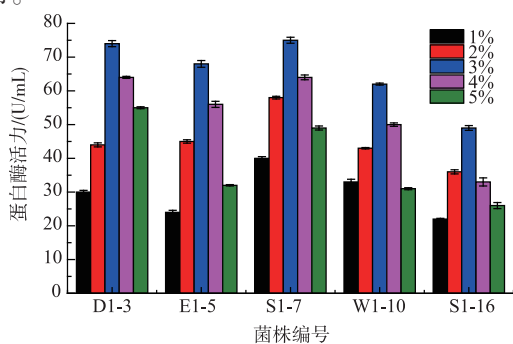


图4 不同接种量对产酶的影响

Fig. 4 Effect of different inoculation quantity on the yield of protease

2.2.3 培养时间对产酶的影响 在产蛋白酶最适初始 pH 和温度的条件下, 培养时间对菌种产蛋白酶的影响如图 5 所示。菌株在 12 h 以内产蛋白酶活力较低; 随着时间的增加, 发酵液中菌株产蛋白酶活力也逐渐增加, 48 h 时蛋白酶活力达到了最高; 随着时间的增产, 由于营养物质的减少蛋白酶活力逐渐减少。因此筛选出的产蛋白酶酵母菌株的最适产酶时间在 48 h 时最佳。

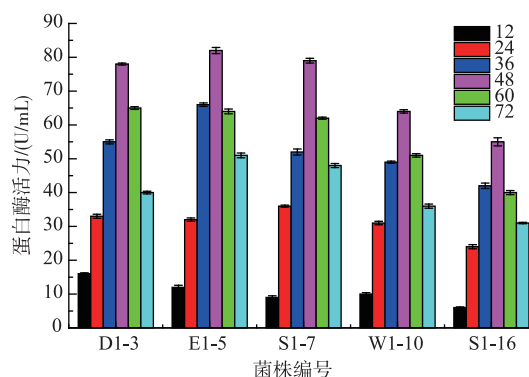


图5 时间对菌株产酶的影响

Fig. 5 Effect of different time on the yield of protease

2.3 高产蛋白酶菌株鉴定

2.3.1 菌落形态及生理鉴定 根据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[21-23] 和实验菌株的形态学和生理生化特性进行分析可得测试菌株中多为多端出芽的生殖方式, 菌落形态差异明显; 在碳源和氮源的同化上, 各菌株均表现出不同的生理特性。在形态学分类的基础上, 对以上酵母菌菌株进行初步的生理生化特性实验, E1-5 能发酵葡萄糖、半乳糖, 不进行乳糖、蔗糖和 D-半乳糖发酵。S1-7 和 S1-16 基本不能发酵糖类和硝酸盐类, 根据以上的生理生化特性可初步鉴定 W1-10 号菌株为近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis*; E1-5 为东方伊萨酵母 *Issatchenkia orientalis*。根据以上生理生化特性其它酵母菌株并不能将其准确的鉴定出来。

表 1 菌落形态特征

Table 1 Morphology of the strain

菌号	颜色	表面	边缘	形状	凸点	细胞形态	繁殖方式	菌丝
E1-5	乳白色	干燥	整齐	圆形	无	椭圆	芽殖	真菌丝
D1-3	乳白色	干燥	整齐	圆形	无	椭圆	芽殖	真菌丝
W1-10	乳白色	干燥	整齐	圆形	无	椭圆	芽殖	真菌丝
S1-7	乳白色	干燥	整齐	圆形	无	椭圆	芽殖	真菌丝
S1-16	乳白色	干燥	整齐	圆形	无	椭圆	芽殖	真菌丝

2.3.2 基于 26S rDNA 基因序列的酵母菌株系统发育分析 酵母菌的 PCR 扩增结果见图 6。将所提取的酸奶样品的总 DNA 用 26SrDNA 的区引物进行 PCR 扩增,扩增产物经质量浓度 1.0 g/dL 琼脂糖电泳检测,获得约 300~700 bp 左右的特异性扩增条带,并且空白组无条带出现,说明未出现污染、无非特异性扩增现象。

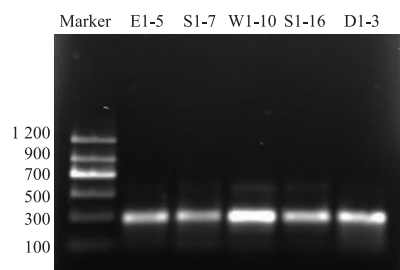


图 6 5 株酵母菌 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of PCR products from 5 yeast strains

依据酵母菌种类划分标准, 同源性低于 99%, 不能划为同一个种^[24]。根据生理生化鉴定和分子生物学鉴定结果, 作者分离的酵母菌株与对应的标准菌株的同源性均在 99% 及以上, 表明其具有较近的亲缘性。菌株 S1-7 为马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*); 菌株 S1-16 鉴定为单孢酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); W1-10 鉴定为近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*); D1-3 鉴定为库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*); E1-5 鉴定为东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*), 结果如图 7 所示。

参考文献:

- [1] DIAO Zhimin, YU Xuejun. Nutritive value and health protection of fermented milk [J]. *China Dairy Industry*, 1998, 5(26): 11-16. (in Chinese)
- [2] FLEET G, BALIAR. The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages [J]. *Yeasts in Food and Beverages*, 2006: 381-397.
- [3] NI Yongqing, GU Yanling. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(2): 164-172. (in Chinese)
- [4] LI Quanhai, ZHANG Li. Application of protease in wool fiber modification[J]. *Hebei Textile*, 2006, 25(2): 57-64. (in Chinese)
- [5] HU Xuezhi, WANG Jun. Advances in protease production and its applications[J]. *Industrial Microbiology*, 2008, 38(4): 49-61. (in Chinese)
- [6] FELLER G, LONHIENNE T, DE ROANNEC, et al. Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolabile α -protease from the Antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23[J]. *JBiol Chem*, 1992, 267: 5217-5221.

26S rDNA 基因序列的酵母菌株系统发育分析

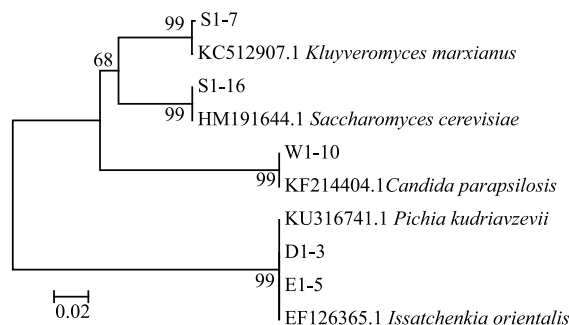


图 7 26S rDNA 序列比对生成的 5 株酵母菌系统发育进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of 5 yeast strains based on 26S rDNA domain sequences

3 结 语

从新疆哈萨克族传统发酵酸牛奶中分离筛选产蛋白酶酵母菌菌株。以蛋白酶活性作为筛选指标进行初筛、复筛得到 5 株高产蛋白酶菌株并对其产酶条件进行优化。经形态观察及 26S rDNA 序列分析鉴定菌株 D1-3 为 *Pichia kudriavzevii*, E1-5 为 *Issatchenkia orientalis*, S1-7 为 *Kluyveromyces marxianus*, W1-10 为 *Candida parapsilosis*, S1-16 为 *Saccharomyces cerevisiae*。将产酶条件优化得出: 菌株 D1-3、S1-7、S1-16、E1-5 的最适产酶温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, W1-10 为 37 $^{\circ}\text{C}$; 菌株最适产酶初始 pH、接种量和时间分别为 5.0、3%、48 h。作者在筛选酵母菌高产蛋白酶的基础上同时也对蛋白酶的耐低温、高活性、耐酸等特点进行了初步研究。

- [7] FANG Haihong, HU Haiyuan. Advances in microbial alkaline protease [J]. **Bulletin of Microbiology**, 2002, 29 (2): 57-59. (in Chinese)
- [8] WU Xin, ZHANG Xiaoyu. Screening of alkaline protease producing alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. **Journal of Microecology**, 2005, 25(2): 40-44. (in Chinese)
- [9] CHEN Jing, WANG Shujun, HUANG Wei, et al. Screening of a marine psychrophilic bacterium (SY) producing low-temperature alkaline protease [J]. **Journal of Microecology**, 2005, 25(4): 38-42. (in Chinese)
- [10] GAO Boyu, CHENG Xiaohang. Screening of yeast strains producing secretory proteinase [J]. **Journal of Fudan University**, 1999, 38(5): 537-539. (in Chinese)
- [11] HE Jie, ZENG Xiaoqun. Xiaoqun screening of lactic acid bacteria with high protease and lipase activities from Xinjiang traditional yogurt [J]. **Food Science**, 2015, 36(17): 130-133. (in Chinese)
- [12] ZHANG Xi, MU Zhishen. Identification of a bacterium isolated from raw milk and study on its heat-stable protease [J]. **Journal of food science and biotechnology**, 2013, 32(3): 272-278. (in Chinese)
- [13] ZHONG Hongbo, HUAN Huijie. Isolation of producing-proteases marine bacteria and characterization of the proteases in fermented liquid [J]. **Food And Fermentation Industries**, 2013, 39(8): 108-112. (in Chinese)
- [14] SB/T 235277-2009 蛋白酶活力测定法.
- [15] YANG Yong, CHENG Yan. Isolation and identification of proteinase and lipase producing mould from Sichuan sausages [J]. **Food Science**, 2015, 36(17): 130-133. (in Chinese)
- [16] YANG Tianbo. Condition exploration and application effect of the casein hydrolysis casein transparent ring [J]. **Journal of Hebei University**, 1982(2): 16-20. (in Chinese)
- [17] MATTA H, PUNJ V. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17 [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1998, 42: 139-145.
- [18] REN Pei, JIN Yulan, PIAO Meizi. Screening of protease-producing bacterium from octopus *vulgaris* intestine, fermentation conditions and enzymatic properties [J]. **Food Science**, 2003, 34(1): 189-193. (in Chinese)
- [19] CHEN Mingxia, LI Heyang. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2013, 53(7): 702-709. (in Chinese)
- [20] ZHAO Youting, SUN Hailong. Screening and phylogenetic analysis of yeast producing protease from permafrost of the glacier No.1 in the Tianshan mountains [J]. **Journal of Anhui Agri Sci**, 2015, 43(1): 248-250. (in Chinese)
- [21] SONG Yuanliang, ZHANG Zhonghua. Screening of high-yield proteinase producing Lactic acid bacteria from Yuan Yang Dou Chi and its conditions of enzyme production [J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2011, 1, 23(1): 9-12. (in Chinese)
- [20] ZHANG Xiaoyan, GU Linazi. Screening, identification and growth characteristics of a low-temperature proteinase producing strain [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35(5): 145-152. (in Chinese)
- [21] 李静. 新疆酸马奶中酵母菌分离鉴定及安全性分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.
- [22] 巴尼特 J A. 酵母菌的特征与鉴定手册 [M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [23] 吴阳. 赛里木酸奶中酵母菌筛选鉴定及发酵特性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [24] KURTZMAN C P, ROBNNETT C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts for analysis of nuclear large subunit ribosomal DNA partial sequence [J]. **Anton Leeuw**, 1998, 73: 331-371.