

市售川产水豆豉分离株中高产蛋白酶与 β -葡萄糖苷酶菌株的菌属鉴定与产酶能力评价*

庞钰鑫^{1,2}, 刘雪薇^{1,2}, 黄嘉玲^{1,2}, 左浩江^{1,2}, 许欣^{1,2}, 裴晓方^{1,2,△}

1. 四川大学华西公共卫生学院(华西第四医院)卫生检验与检疫系(成都 610041);

2. 食品安全检测与风险评估四川省重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 筛选并鉴定 72 株川产水豆豉分离株中高产蛋白酶及 β -葡萄糖苷酶的菌株,为深入研究水豆豉的营养价值及开发其发酵菌株提供实验依据。方法 采用酪蛋白法和对硝基苯- β -D 半乳糖吡喃糖苷(pNPG)法分别测定菌株产蛋白酶和 β -葡萄糖苷酶的能力,选出优势菌株,通过形态学、生化特征、16S rRNA 和基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对其进行鉴定。绘制菌株生长曲线和产酶曲线并测得其遗传稳定性。结果 选择产蛋白酶能力前 10 名菌株中 β -葡萄糖苷酶活力最高者(0.084 U/L)作为优势菌株,表型及分子生物学法鉴定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。菌株生长曲线、产酶曲线符合枯草芽孢杆菌特性,遗传稳定性结果显示其产酶能力能稳定遗传至第 9 代并于第 10 代开始下降。结论 从 72 株川产水豆豉分离株中筛选出的高产蛋白酶和 β -葡萄糖苷酶菌株经鉴定为枯草芽孢杆菌。

【关键词】 川产水豆豉 菌属鉴定 枯草芽孢杆菌 MALDI-TOF-MS 发酵菌株 产蛋白酶 产 β -葡萄糖苷酶

Identification of the Strain Which Highly Produces Protease and β -D-glucosidase Isolated from Shuidouchi Produced in Sichuan and Evaluating Its Ability of Producing Protease PANG Yu-xin^{1,2}, LIU Xue-wei^{1,2}, HUANG Jia-ling^{1,2}, ZUO Hao-jiang^{1,2}, XU Xin^{1,2}, PEI Xiao-fang^{1,2,△}. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Food Safety Monitoring and Risk Assessment Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: xxpeiscu@163.com

【Abstract】 **Objective** To select and identify the bacterium which highly produces protease and β -D-glucosidase from 72 strains of Shuidouchi from Sichuan, and to provide evidence for further research on its nutritional value and fermentation strain exploiting. **Methods** Casein degradation test and pNPG chemical test were applied respectively to detect the capacity to produce protease and β -D-glucosidase of each strain. Characteristics of morphology, biochemistry, 16S rRNA and MALDI-TOF-MS were used to identify the fermentation strain, which genetic stability, curves of growth and enzyme producing were also obtained. **Results** The strain with the highest enzyme activity of β -D-glucosidase (0.084 U/L) among the top 10 strains for producing protease was selected as the fermentation strain and was identified as *Bacillus subtilis*, which curves of growth and enzyme producing conformed as well. The result of genetic stability showed that capacity of enzyme producing was stable until the 10th generation. **Conclusion** The fermentation strain which highly produced protease and β -D-glucosidase was selected from 72 strains of shuidouchi from Sichuan and was identified as *Bacillus subtilis*.

【Key words】 Shuidouchi from Sichuan Genus identification *Bacillus subtilis* MALDI-TOF-MS Fermentation strain Producing protease Producing β -D-glucosidase

水豆豉是我国传统大豆发酵产品之一,其风味独特并具有营养保健功能。在发酵微生物蛋白酶的作用下,大豆中的蛋白质被分解为利于肠道吸收的小分子物质。大豆中的主要抗癌物质大豆异黄酮,在微生物产 β -葡萄糖苷酶的作用下,由结合型糖苷

转化为游离型苷元,发挥出更强的生物活性^[1-2]。但国内仅有少量对水豆豉的发酵微生物种类、生产工艺优化的研究^[3-4],其生产方式多为家庭自制的自然发酵法,至今未能开发出可用于其工业化生产的发酵菌株。每年都有因进食被污染的豆豉而发生的食物中毒事件,严重者甚至造成人员死亡^[5-6]。

因此,开发高效且安全的发酵菌株,既能提升水豆豉的营养价值,也能在一定程度上避免家庭自制

* 国家重点研发计划(No. YFZ1200203)资助

△ 通信作者, E-mail: xxpeiscu@163.com

方式产生的微生物隐患。本研究利用酪蛋白平板法和硝基苯-β-D 半乳糖吡喃糖苷(pNPG)化学法,从购买的市售川产水豆豉中分离得到72株菌株并筛选出高产蛋白酶与β-葡萄糖苷酶的菌株,在表型及分子生物学层面进行菌属鉴定,研究其生长曲线、产酶曲线及遗传稳定性等特征,为深入研究水豆豉的营养价值及进一步开发其发酵菌株提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 购买市售11种品牌的川产水豆豉,由本实验室前期研究分离得到72株实验菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器 酪蛋白培养基、BL肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司);pNPG(上海生工生物工程股份有限公司);PCR试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];色谱级乙腈(美国SIGMA-ALDRICH公司);大肠杆菌标准菌株(ATCC 8739,广东环凯微生物科技有限公司);CHCA基质、iDplusPerformance MALDI-TOF-MS仪(日本SHIMADZU公司);全波长酶标仪multiskan GO 1510(美国Thermo Fisher Scientific公司);体视显微镜(德国Leica公司)。

1.1.3 引物 采用细菌16S rRNA基因引物(由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成)序列进行实验:F, 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', R, 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。

1.2 方法

1.2.1 实验菌株的分离 11种品牌的川产水豆豉分别取3g置于装有营养肉汤的锥形瓶中,37℃、150 r/min摇床增菌培养24h。取菌液平板划线分离,37℃恒温培养24h,挑取形态、颜色不同(即可能为不同菌属)的菌落于营养琼脂斜面并编号,共得72株菌。37℃恒温培养24h,分别挑取少量菌落置于装有脱脂牛奶的2mL EP管中,-80℃冰箱保存,斜面培养基置于4℃冰箱保存待用。

1.2.2 产蛋白酶能力的检测 从斜面培养基上按编号分别挑取72株实验菌株点种于酪蛋白琼脂培养基,点与点间距相等。测量第1~4天的透明圈直径与菌落直径,以第4天透明圈直径与菌落直径的比值大小为产蛋白酶能力的评价指标,将结果按从大到小排序。

1.2.3 产β-葡萄糖苷酶能力的检测

1.2.3.1 液体发酵培养基的配制 黄豆粉4g,酵母膏4g,KH₂PO₄0.4g,NaCl2g,pH7.2~7.4,高

压灭菌备用。

1.2.3.2 操作方法 选取产蛋白酶能力前10名的菌株接种于液体发酵培养基中培养24h,取2mL菌液4000 r/min离心20min。上清液即待测酶液和pNPG溶液50℃水浴预热后,各取0.5mL加入离心管,50℃水浴10min,2mL1mol/L的Na₂CO₃溶液终止反应,室温放置5min,80℃加热使酶液失活,410nm处测其吸光度(A)。用培养液重复以上步骤进行空白实验。分别计算10支菌株的酶活力并以最高者作为优势菌株。酶活力定义:一定条件下,每分钟每毫升酶液水解1μmol pNPG所需要的酶量为一个酶活力单位,用U/mL表示。其计算公式为:

$$\text{产酶能力} = \frac{[A - A_0] \times V}{t \times m}$$

式中:A为样品的吸光度值;A₀为空白对照的吸光度值;V为反应溶液的总体积,单位为mL;t为反应时间,单位为min;m为酶体积,单位为mL。

1.2.4 优势菌株鉴定

1.2.4.1 形态学鉴定 采用优势菌株平板划线法纯培养,观察单个菌落特征(包括颜色、形态、边缘、透明度等),并用体视显微镜进一步观察菌落形态;挑取少量单个菌落进行革兰氏染色,油镜下观察细菌染色情况及形态。

1.2.4.2 生化鉴定 依据《伯杰细菌鉴定手册》(第九版)和《常用细菌系统鉴定手册》上芽孢杆菌的鉴定方法对待鉴定菌株进行生化鉴定,主要包括:触酶、氧化酶、淀粉酶、厌氧生长、VP、甲基红、硝酸盐还原、50℃生长、7%氯化钠生长、明胶液化、分解酪素实验与糖、醇类发酵实验等。

1.2.4.3 16S rRNA鉴定 挑取单个菌落PCR扩增模板。PCR反应参数:预变性94℃、3min;变性94℃、40s,退火56℃、60s,延伸72℃、60s,共30个循环;后延伸72℃、10min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物并送至成都擎科梓熙生物技术有限公司进行16S rRNA测序,其结果在NCBI上进行BLAST相似序列检索,Mega6.0构建菌株系统发育树、获得菌株同源图谱。

1.2.4.4 MALDI-TOF-MS鉴定 挑取适量菌落,70%甲酸和乙腈1:1分别超声提取10min,取上清液定容备用;依次取1μL上清液、基质点种,自然晾干后上机测定。用大肠杆菌ATCC 8739进行校正,校正菌株前处理同上。校正菌和待测菌各点3个平行复孔,实验重复3次。

1.2.5 菌株生长曲线 挑取适量菌株接种于营养肉汤培养基,37℃、150 r/min 摇床培养,前 30 h 每隔 2 h 测定一次,后 70 h 每隔若干小时测定,以培养液为空白对照。以时间(t)为横坐标、吸光度值(A_{600})为纵坐标绘制菌株生长曲线。

1.2.6 菌株产酶曲线 挑取适量菌株接种于液体发酵培养基,37℃、150 r/min 摇床培养,前 12 h 每隔 1 h 取样,14 h、24 h、36 h、48 h、60 h 时分别取样,以培养液为空白对照,测量样品中 β -葡萄糖苷酶活力。以时间(t)为横坐标、酶活力为纵坐标绘制菌株产酶曲线。

1.2.7 菌株遗传稳定性实验 挑取适量菌株接种于斜面培养基,37℃恒温培养 24 h,挑取适量菌株接入发酵培养基,37℃、150 r/min 摇床培养 24 h,连续培养 10 代。每代取 2 mL 培养液于 EP 管中,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液 pNPG 法(见 1.2.3.2)测定酶活力。

2 结果

2.1 优势菌株

第 4 天时,72 株实验菌株透明圈直径与菌落直径比值为 0~7.00,其中 29 号产蛋白酶能力最强,10 号最弱,整体平均值为 2.70,标准偏差为 1.34。产蛋白酶能力的前 10 名的菌株编号为:29、49、52、54、19、70、64、65、12、66。

产蛋白酶能力前 10 名的菌株酶活力为 0.024~0.084 U/mL,其中,酶活力最强的为 19 号菌株,最弱的为 49 号菌株,酶活力平均数为 0.050 7 U/mL,标准偏差为 0.021。因此后续实验中选取产 β -葡萄糖苷酶能力最强的 19 号菌株作为优势菌株进行鉴定。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学鉴定结果 19 号菌株在营养琼脂平板上 37℃培养 24 h 后,呈淡黄色、扁平状菌落;体视显微镜下观察到的单个菌落特征为:边缘不规则、略湿润,菌落表面粗糙、不透明,菌落内部有分支状,呈硬结样。见图 1、图 2。

显微镜下观察到 19 号菌株为革兰阳性菌,杆状,中部或中部稍偏位置带有芽孢,无荚膜,菌体大小为(0.3~0.6) μm ×(0.9~1.5) μm ,可初步鉴定为芽孢杆菌。见图 3。

2.2.2 生化鉴定结果 19 号菌株基本符合枯草芽孢杆菌的生化反应特征,可初步鉴定为枯草芽孢杆菌,其具体生化鉴定结果见表 1。

2.2.3 16S rRNA 鉴定结果 19 号菌株的 16S rRNA 电泳条带为 293 bp。见图 4。获得序列片段为: GTGCCAGCCGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG

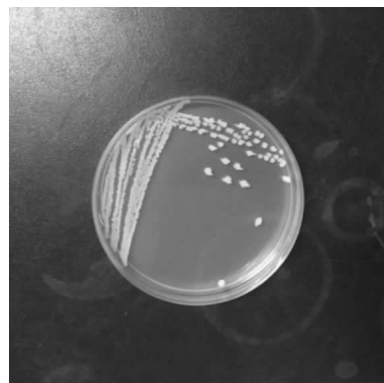


图 1 营养琼脂培养基上菌落形态

Fig 1 Colony morphology on nutrient agar medium

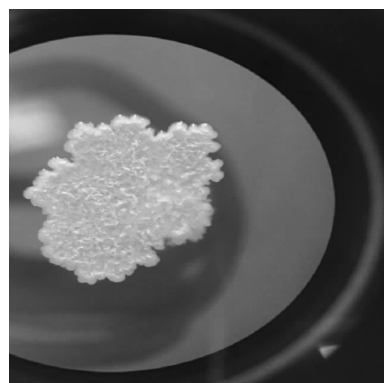


图 2 体视显微镜下菌落形态

Fig 2 Colony morphology under stereo microscope

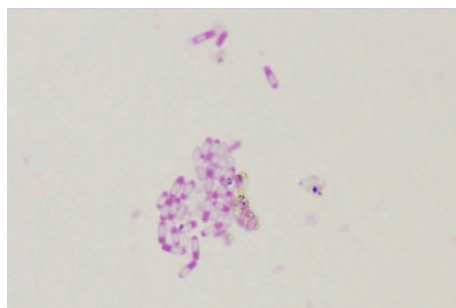


图 3 19 号菌株革兰染色结果

Fig 3 Gram staining results of strain No. 19

表 1 19 号菌株生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification results of strain No. 19	
Test	Result
Catalase	+
Oxidase	+
Anaerobic fermentation	—
VP test	+
MR test	—
Dextrose fermentation	+
Fermentation of dextrose producing gas	—
Xylose fermentation	+
L-arabinose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
nitrate reduction	+
Growth test at 50 ℃	+
Growth test with 7% sodium chloride	+
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Casein decomposition	+

AAGAGGAGAGTGAATTCACGTG TAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG TGGGGAG
CGAACAGGATTAGAAACCCCGGTAGTCCC。

经 BLAST 比对,该序列与枯草芽孢杆菌的
16S rRNA 基因相同性最高,达 99%,可判定该序列

所属菌株是枯草芽孢杆菌的成员。通过 Mega6.0
构建菌株系统发育树。见图 5。

2.2.4 MALDI-TOF-MS 鉴定结果 质控菌株大
肠杆菌 ATCC 8739 检测结果稳定,19 号菌株的 3
个平行样本检测结果一致,均为枯草芽孢杆菌且匹
配程度较高。见表 2。

综合以上数据,19 号菌株的形态学特征、生化
特征及分子生物学特征鉴定结果均互相符合,可判
断其为枯草芽孢杆菌。

2.3 菌株生长曲线

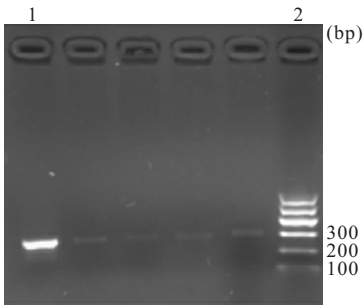
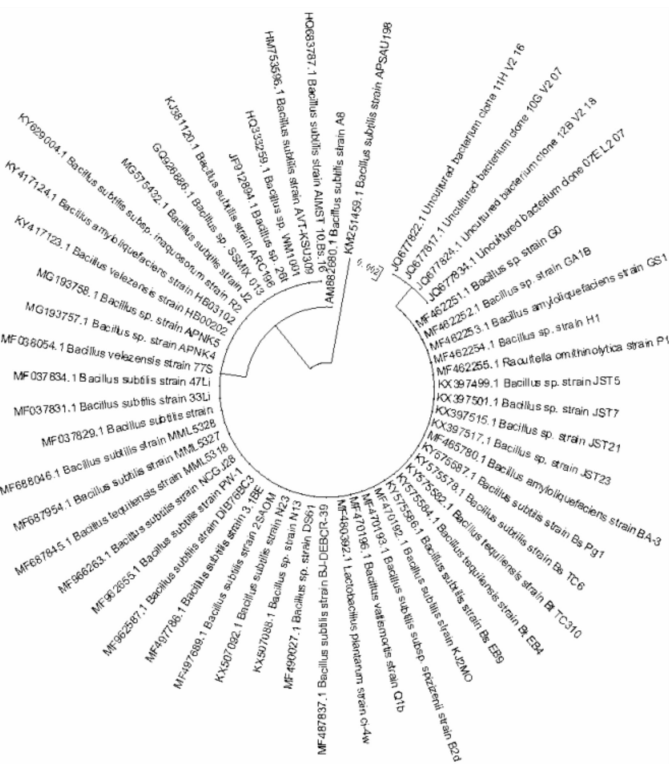


图 4 19 号菌株 16S rRNA 电泳条带

Fig 4 16S rRNA electrophoresis strip of strain No. 19

1: 16S rRNA product of strain No. 19; 2: DNA marker



该菌株在 0~5 h 处于适应期,5~22 h 处于对数生长期,22~30 h 处于平台期,培养 30 h 后开始逐渐衰亡。见图 6。

表 2 19 号菌株 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

Table 2 MALDI-TOF-MS identification results of strain No. 19

ID	Identified specy	Scoring/%
Strain No. 19 #1	<i>Bacillus subtilis</i>	93.6
Strain No. 19 #2	<i>Bacillus subtilis</i>	88.0
Strain No. 19 #3	<i>Bacillus subtilis</i>	99.9
ATCC 8739 #1	<i>Escherichia coli</i>	98.0
ATCC 8739 #1	<i>Escherichia coli</i>	99.9
ATCC 8739 #1	<i>Escherichia coli</i>	99.9

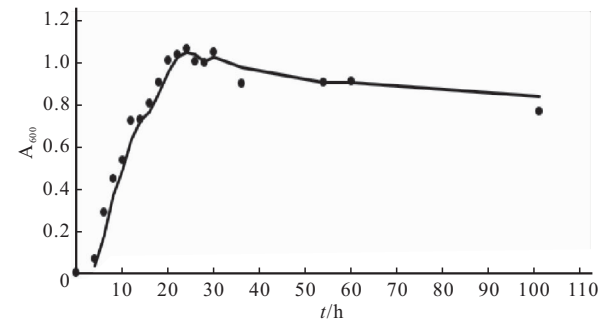


图 6 19 号菌株生长曲线
Fig 6 Growth curve of strain No. 19

2.4 菌株产酶曲线

该菌株在 3~15 h 时处于产酶对数期,15 h 后处于产酶能力趋于平稳且有缓慢增长的趋势。见图 7。

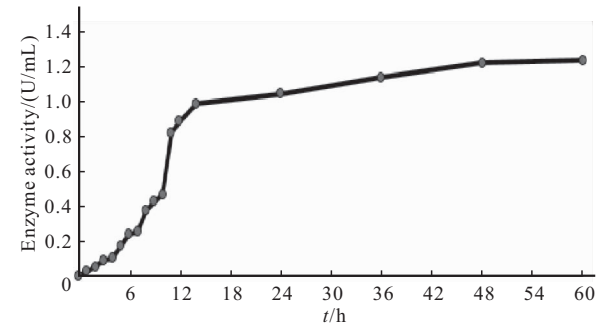


图 7 19 号菌株产酶曲线
Fig 7 Enzyme production curve of strain No. 19

2.5 遗传稳定性实验结果

该菌株从第 1 代至第 9 代产酶遗传较稳定,至第 10 代开始产酶能力有下降趋势。见表 3。

表 3 19 号菌株各代吸光度及酶活力
Table 3 Absorbance and enzyme activity of each generation of strain No. 19

Generation	A ₆₀₀		Enzyme activity/ (U/mL)
	No. 19	Blank control	
P1	0.569 6	0.084 4	0.970
P2	0.537 4	0.086 1	0.900
P3	0.587 8	0.079 8	1.020
P4	0.460 4	0.091 2	0.740
P5	0.584 7	0.085 1	1.000
P6	0.464 6	0.084 6	0.760
P7	0.484 4	0.079 8	0.810
P8	0.509 0	0.087 5	0.840
P9	0.516 2	0.090 8	0.850
P10	0.710 1	0.089 4	0.620

3 讨论

豆豉的发酵过程中,微生物产生的蛋白酶和 β -葡萄糖苷酶使得大豆中的营养物质转换为更易于吸收、生物活性更强的形式。因此要利用大豆中的营养成分,发酵微生物分泌蛋白酶和 β -葡萄糖苷酶的能力是必备条件。

酪蛋白平板法在检测产蛋白酶的方法中最为便捷和直观,适用于大批量筛选。接种细菌后,细菌产生的蛋白酶会将平板上的酪蛋白分解,因此可以在平板上观察到分解后的透明圈直径与菌落直径的大小。我们在连续观察 7 d 的过程中,发现第 4 天时透明圈直径与菌落直径的比值基本稳定,不会继续扩大,因此选择第 4 天时透明圈直径与菌落直径的比值作为细菌产蛋白酶能力的评价指标。DNS 法与 pNPG 法是常用的 β -葡萄糖苷酶检测方法,但后者的灵敏度和便捷度都更高^[7],因此选择 pNPG 法。综合考虑产蛋白酶和产 β -葡萄糖苷酶能力,选择产蛋白酶能力前 10 名菌株中 β -葡萄糖苷酶的酶活力最高者(0.084 U/L),即 19 号菌株,作为优势菌株。酶活力测定的结果显示:72 株分离菌株中产蛋白酶能力最强的透明圈直径与菌落直径的比值为 7.00,能力最差的菌株不产蛋白酶。所选择的 19 号菌株透明圈与菌落直径的比值为 5.07,有其他学者利用酪蛋白平板法检测细菌产蛋白酶能力,透明圈与菌落直径的比值最高为 4.6^[8],与之相比本研究所分离出的细菌产蛋白酶能力更好。

菌株鉴定从表型及分子生物学两个层面进行,前者包括形态学和生化特性,后者为 16SrRNA 和 MALDI-TOF-MS。两个层面都印证 19 号菌株为枯草芽孢杆菌。鉴定的难点在于 MALDI-TOF-MS 检测,其作为一种新兴方法,在鉴定常见细菌上具有

前处理简单、鉴定快速等优点。但对于枯草芽孢杆菌这类细胞壁较厚的细菌,常规前处理过程不容易得到准确结果,需进行条件优化。已有报道^[9]利用 MALDI-TOF-MS 和 16SrRNA 分别鉴定 96 株枯草芽孢杆菌,在种的水平上两方法结果一致,亚种的水平上两方法相似性达到 90%,说明 MALDI-TOF-MS 技术在芽孢杆菌的快速鉴定中存在一定的应用价值;该团队还优化了枯草芽孢杆菌的前期培养条件,仅通过常规前处理就可得到 MALDI-TOF-MS 高分鉴定结果。而本研究利用营养琼脂 37℃ 恒温培养 24 h,前处理时通过多次超声和离心来增加破壁效果,释放胞内蛋白质以增加特异性。但是 SHU 等^[10]学者的研究表明,培养条件是枯草芽孢杆菌分类的重要因素。因此,在今后的实验中,可在本研究优化的前处理方式的基础上继续优化枯草芽孢杆菌的培养条件。生长曲线和产酶曲线表明,19 号菌株在培养 12~15 h 处于对数生长期,产酶能力在 15 h 达到平台期,这与其他已知报道^[11]基本相同,产酶能力达到平台期的时间则相对较短。

本研究从 72 株川产水豆豉分离株中筛选出高产蛋白酶和 β -葡萄糖苷酶的 19 号菌株,形态学特征、生化特征、16SrRNA 和 MALDI-TOF-MS 鉴定其为枯草芽孢杆菌,并获得其生长曲线、产酶曲线及遗传稳定性特征,为深入研究水豆豉的营养价值及开发其发酵菌株提供理论依据及数据参考。然而,本研究未检测全部的 72 株菌株的 β -葡萄糖苷酶的含量,因此有可能存在单产 β -葡萄糖苷酶能力强的菌株,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 蔡娟,卢建,施寿荣,等. 大豆、大豆异黄酮研究历程. 饲料

工业,2013,34(3):17-20.

[2] 齐斌,刘贤金. 产大豆异黄酮 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及酶学性质研究. 食品科学,2007,28(8):290-293.

[3] 李华,李铎,沈立荣,等. 细菌型豆豉纯种发酵工艺优化. 中国粮油学报,2009,24(2):50-54.

[4] 贾东旭,吴拥军,李耀中,等. 细菌型豆豉发酵芽孢杆菌的筛选与鉴定. 食品科学,2009,30(5):217-221.

[5] 杨海霞,李慧. 家庭自制豆豉引发 B 型肉毒杆菌食物中毒事件调查分析. 中国初级卫生保健,2012,26(5):57-58.

[6] 杨蓉,董立伟,李云峰,等. 一起蜡样芽孢杆菌食物中毒的调查分析. 疾病监测,2010,25(1):77-78.

[7] 梁华正,刘富梁,彭玲西,等. 京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法. 食品科学,2006,27(4):182-185.

[8] 李小永. 细菌型豆豉后发酵期间菌相分析及产蛋白酶菌种的筛选. 泰安:山东农业大学,2011[2018-12-21]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=degree&id=D143995.

[9] HUANG C H, HUANG L, CHANG M T, et al. Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of *Bacillus subtilis* group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology. Mol Cell Probes,2016,30(5):312-319.

[10] SHU L J, YANG Y L. Bacillus classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry-effects of culture conditions. Sci Rep,2017,7(1):15546.

[11] 林榕姗. 细菌型豆豉发酵机理及功能性研究. 泰安:山东农业大学,2012[2018-12-21]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=degree&id=Y2117066.

(2019-01-12 收稿,2019-06-11 修回)

编辑 汤 洁