

# 江米酒中凝乳酶产生菌的分离及产酶条件的优化

程巧玲, 白小佳, 王艳萍

天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津 300457

**摘要:** 江米酒是我国南方的一种传统食品, 江米酒中微生物所产凝乳酶具有凝乳作用。从江米酒中分离纯化得到 4 株菌, 经菌落分离计数和酪蛋白平板实验研究确定产凝乳酶的优势菌为其中的霉菌, 并对该霉菌产凝乳酶条件进行了初步优化, 结果表明: 2 倍浓度的 PDA 培养基中添加 5% 葡萄糖而不添加氮源是霉菌产凝乳酶的最佳培养基, 在此条件下其所产凝乳酶活力可比优化前提高 144%。

**关键词:** 江米酒, 凝乳酶产生菌, 分离, 产酶条件

## Isolation and Fermentation Condition of Milk-clotting Enzyme Producing Strain from Glutinous Rice Wine

Qiaoling Cheng, Xiaojia Bai, and Yanping Wang

Tianjin Key Laboratory of Food nutrition & safety, Department of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Glutinous rice wine is a traditional food in south of China and it can coagulate milk. It has been proved that its function of coagulating milk is because of the presence of milk-clotting enzyme produced by microorganisms in glutinous rice wine. The aim of this work is to isolate milk-clotting enzyme producing strain from glutinous rice wine and study the fermentation condition. We screened out four bacteria and fungus by gradient dilution. It was proved that mold played the most important role in the production of milk-clotting enzyme. This is further confirmed by casein plate method. The optimization of fermentation conditions revealed that two times concentrated potato medium supplemented with 5% glucose without additional nitrogen was better for production of the enzyme. The enzyme activity was increased 144% under the conditions established.

**Keywords:** glutinous rice wine, milk-clotting enzyme producing strain, isolation, fermentation condition

凝乳酶(*EC* 3.4.23.4)是干酪生产中的关键性酶, 是食品领域中重要的酶制剂<sup>[1]</sup>。凝乳酶的传统制备方法是将出生 10~30 d 的小牛屠宰, 从其第四胃中用盐将凝乳酶浸提出来<sup>[2]</sup>。随着世界干酪工业的不断发展, 尽管每年为获得凝乳酶而宰杀的犊牛已达 5000 万头, 其仍不能满足生产需要<sup>[3]</sup>。因此, 各国研

究者都在不断寻找凝乳酶新的来源。

利用微生物生产凝乳酶是目前最有前途的发展方向<sup>[4]</sup>。但由于微生物也产生其他非酶类代谢产物, 因此一般的微生物来源酶在成为商品时, 都要进行毒性、致癌性以及皮肤过敏性测试, 使得真正用于工业化生产凝乳酶的菌株很受限制。

**Received:** January 15, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

**Supported by:** the grant from Science and Technology Supporting Project of National Eleventh Five-Year-Plan (No. 2006BAD04A06).

**Corresponding author:** Yanping Wang. Tel: + 86-22-60601400; E-mail: ypwang40@yahoo.com

国家十一五计划支撑项目(No. 2006BAD04A06)资助。

江米酒是我国南方的一种传统食品,具有凝乳作用,江米酒中的凝乳酶是江米酒发酵剂酒药中微生物的代谢产物<sup>[5]</sup>。江米酒本身为一种传统食品,采用从发酵江米酒中得到的菌株发酵生产凝乳酶,无须考虑非酶类代谢产物的安全性问题。

本研究将江米酒中的微生物进行分离纯化,确定出产凝乳酶的优势菌,并对其产酶条件进行初步优化。该研究为寻找新的凝乳酶生产菌株奠定了一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

江米面:由购自当地市场的新鲜糯米粉碎得到;酒药:在湖北省荆州市购买4个厂家的市售酒药;江米酒:以购买的不同市售酒药发酵江米面培养基,制备江米酒,选取凝乳活力最高的江米酒用于本实验;本实验所用药品均为分析纯或生化试剂。

### 1.2 培养基

马铃薯培养基(PDA):取去皮马铃薯200g,切成黄豆大小的碎块,加蒸馏水500mL煮沸1h后,单层纱布过滤,补充蒸馏水至1L,115℃灭菌20min。

江米面培养基:在250mL摇瓶中加入10g/100mL的江米面溶液50mL,摇匀后于115℃灭菌20min,室温下冷却至30℃左右。

其他培养基按照文献<sup>[6]</sup>所述方法制备。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 凝乳酶活力测定

采用 Arima 的方法<sup>[7]</sup>。取5mL 100g/L的脱脂乳,在37℃保温5min,加入0.5mL适当稀释并经预温的待测江米酒或发酵液,迅速混合均匀,准确记录从加入待测液到乳凝固的时间。

以40min凝固100g/L的脱脂乳1mL所需的酶量定义为一个索氏单位(Soxhelt unit, SU)。

$$SU=2400/T \times 5/0.5 \times D$$

式中:  $T$  为凝乳时间(s);  $D$  为稀释倍数。

以相对活力(Relative unit, RU, %)表示各因素的影响效果。

$RU(\%) = \text{某实验条件下 } SU / \text{对照实验条件下 } SU \times 100\%$

#### 1.3.2 江米酒的制备

按0.32g酒药/L江米面培养基的接种量将受试

酒药加入冷却好的江米面培养基中,30℃、140r/min振荡培养。

#### 1.3.3 江米酒中微生物的分离纯化

采用倍比稀释法<sup>[8]</sup>将江米酒倍比稀释,分别取 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 稀释液各100μL涂布于细菌基本培养基、完全培养基和马铃薯培养基三种固体培养基,将此三种培养基分别置于37℃、30℃和28℃培养箱内培养,并于第2d、3d、5d挑取不同菌落进一步纯化。

#### 1.3.4 产凝乳酶优势菌的确定

(1) 江米酒发酵过程中微生物菌落计数与凝乳酶活力测定: 江米酒发酵过程中的细菌、霉菌和酵母菌活菌总数的测定采用菌落计数法。将适当稀释的发酵江米酒分别涂布于细菌基本培养基、马铃薯培养基、YEPD培养基固体平板上,进行菌落计数统计。凝乳酶活力测定见1.3.1。

(2) 酪蛋白平板验证产凝乳酶优势菌: 将分离纯化得到的细菌、霉菌和酵母菌分别以三点法点接于酪蛋白平板上,分别置于37℃、30℃和28℃培养箱内培养2d,观察不同菌株产白色沉淀圈的能力和沉淀圈的大小。

#### 1.3.5 摇瓶发酵产凝乳酶条件的优化

(1) 添加不同碳源对霉菌产凝乳酶活力的影响: 向PDA培养液中分别添加3%(W/V)的江米面、可溶性淀粉及葡萄糖作为碳源,于115℃、20min灭菌处理。培养基冷却后,接入霉菌孢子悬液,接种量为0.1%(V/V),于30℃、140r/min振荡培养,摇瓶发酵48h后取样,测定凝乳酶活力。

(2) PDA培养液中不同葡萄糖浓度对霉菌产凝乳酶活力的影响: 分别将PDA培养液中葡萄糖浓度调整为2%、3%、5%、7%和10%(W/V),同上方法1.3.5(1)进行发酵并测定凝乳酶活力。

(3) 添加不同氮源对霉菌产凝乳酶活力的影响: 向PDA培养液中分别添加0.5%(W/V)的胰蛋白胍、动物水解蛋白、大豆蛋白、硫酸铵、柠檬酸铵和硝酸铵作为氮源,同上方法1.3.5(1)进行发酵并测定凝乳酶活力。

(4) PDA培养液浓度对霉菌产凝乳酶活力的影响: 用旋转蒸发器分别将PDA培养液浓缩至2倍、3倍和4倍,同上方法1.3.5(1)进行发酵并测定凝乳酶活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 江米酒中微生物的分离纯化

利用倍比稀释法从江米酒中分离纯化得到了四株菌,如图 1 所示。从菌落和菌体特征可以判断出这四株菌分别为一株霉菌、一株酵母菌和两株细菌。

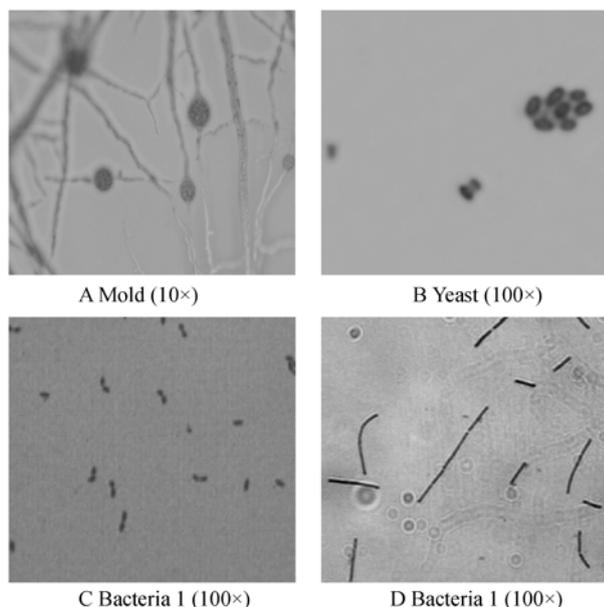


图 1 江米酒中微生物菌体形态

Fig. 1 Morphology of microorganisms isolated from glutinous rice wine

实验以发酵的江米酒为分离源,纯化得到的微生物数目比直接从酒药中分离得到的微生物数目少。这主要是由于酒药生产完全依靠微生物之间对生存环境和空间的竞争来维持菌数平衡,而且其在敞开体系中进行,易引入杂菌。江米酒发酵过程中的优势菌群能抑制一些杂菌的生长,因此选择发酵的江米酒进行微生物分离纯化可以减小工作量,有利于我们较快地找到实际起作用的产凝乳酶优势菌。

### 2.2 江米酒中产凝乳酶优势菌的确定

#### 2.2.1 江米酒发酵过程中菌落计数与凝乳酶活力测定

按照 1.3.4(1)方法对江米酒发酵过程中的微生物菌落进行计数、分析,并同时考查发酵过程中凝乳酶活力变化情况,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,在江米酒发酵初期细菌数量较多,随着发酵时间的增加,细菌数量呈下降趋势,这可能是因为随着发酵的进行,发酵体系的酸度逐

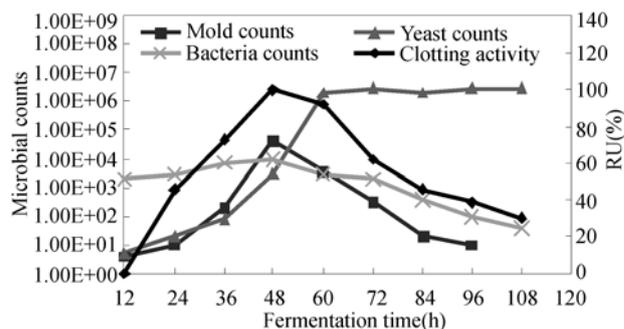


图 2 江米酒发酵过程中细菌、酵母菌、霉菌菌数变化与江米酒凝乳活力的关系

Fig. 2 Relation between the change of bacteria, yeast, mold counts and milk-clotting activity during fermentation of glutinous rice wine

渐增加,不适合细菌生长,同时由于生物体之间的竞争关系,随着酵母菌和霉菌数量不断增加,细菌生长环境也不断被破坏。在发酵前 48 h 内霉菌数量随着发酵的进行而增加,在 48 h 时达到一个峰值后开始下降,酵母菌数量在发酵的前 60 h 内同样表现出增加的趋势,在 60 h 增加到一定的水平,随后保持稳定。分析原因,主要是由于霉菌能将淀粉分解产生大量的单糖,使得酵母菌能利用其进行繁殖,但是酵母菌增殖代谢时产生的乙醇抑制了霉菌的生长,所以当酵母菌增殖到一定水平的同时,霉菌数量开始下降。

值得注意的是,霉菌菌数的变化与江米酒凝乳活力的变化趋势一致,发酵 48 h 霉菌数量最多,而江米酒凝乳活力此时最大,由此可以初步判断霉菌是米酒发酵过程中产凝乳酶的优势菌。

#### 2.2.2 酪蛋白平板验证产凝乳酶优势菌

按照 1.3.4(2)方法,将四株菌分别接种于酪蛋白平板上,培养发现两株细菌和酵母菌都能生长,但是无沉淀圈出现,霉菌周围可以观察到直径大约为 1 cm 的白色沉淀圈,进一步可以确定在上述分离所得四菌株中产凝乳酶的优势菌是霉菌。

### 2.3 霉菌摇瓶发酵产凝乳酶条件的优化

微生物发酵所产酶的活性高低除了与菌种本身的性质有关以外,培养方式及培养条件等也对微生物的产酶情况影响较大。一般来说液体深层发酵具有操作简单、易于实现自动化、有利于工艺过程的无菌控制等优点。本试验对霉菌摇瓶发酵产凝乳酶的条件进行了优化,在一定程度上提高了霉菌产酶活力。

### 2.3.1 添加不同碳源对摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响

按照 1.3.5(1)方法进行试验, 得到结果如图 3 所示。

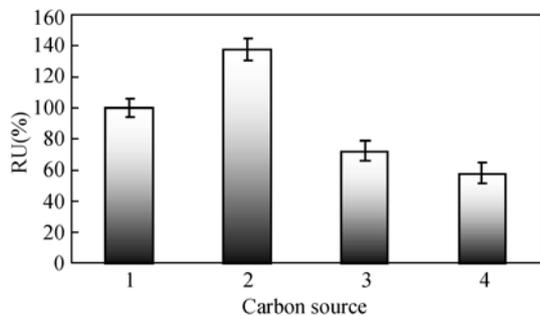


图 3 不同碳源对霉菌产凝乳酶活力的影响

Fig. 3 Effect of different carbon source on activity of milk-clotting enzyme produced by mold

1: blank; 2: glucose; 3: glutinous rice power; 4: soluble starch

图 3 结果表明: PDA 培养液中添加江米面和可溶性淀粉作碳源时对霉菌产凝乳酶能力均有轻微的抑制作用, 而添加葡萄糖具有明显的促进作用, 添加 3%葡萄糖时, 其相对活力为添加前的 137%, 这表明葡萄糖作为易于利用的碳源可以促进霉菌的增殖, 有利于产酶活力的提高。所以选用葡萄糖作为培养基添加的碳源。

### 2.3.2 葡萄糖浓度对霉菌摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响

按照 1.3.5(2)方法在 PDA 培养液中添加不同浓度的葡萄糖, 研究其对霉菌产凝乳酶的影响, 结果如图 4 所示。

图 4 结果表明, 当 PDA 培养液中葡萄糖浓度为 5%, 霉菌发酵所产凝乳酶活力最大, 随着葡萄糖浓度的继续增大, 虽然霉菌的生长旺盛, 但是所产凝乳酶的活力逐渐下降, 这可能是因为霉菌生长所需要的营养物质与霉菌产凝乳酶所需要的营养物质不同, 适当的营养比例是获得较高酶活的必要条件, 当产酶活力最大时其菌体量并不能达到最大, 选择 5%为葡萄糖最适浓度。

### 2.3.3 不同氮源对摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响

按照 1.3.5(3)方法对添加不同氮源对霉菌产凝乳酶的活力影响进行了研究, 得到结果如图 5 所示。图 5 实验结果表明 PDA 培养液营养丰富, 本身的氮源就能够满足菌体生长的需要, 向 PDA 培养液中添加

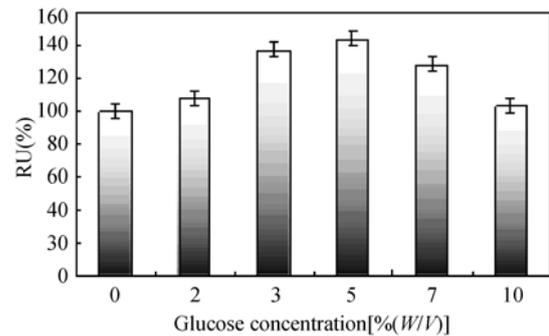


图 4 葡萄糖浓度对霉菌摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响  
Fig. 4 Effect of different concentration of glucose in PDA on activity of milk-clotting enzyme

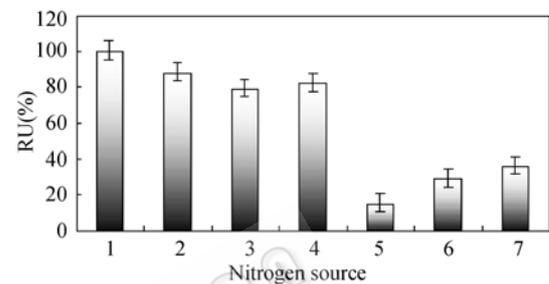


图 5 不同氮源对霉菌发酵产凝乳酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different nitrogen source on activity of milk-clotting enzyme produced by mold

1: blank; 2: tryptone; 3: animal protein hydrolysate; 4: soybean protein; 5:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 6:  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ; 7:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

氮源对霉菌产凝乳酶能力都有一定的抑制作用, 无机氮源的抑制作用比有机氮源的抑制作用更强, 这主要与霉菌生长特性及霉菌产凝乳酶所需的营养物质有关, 实验结果表明培养液中无需添加氮源。

### 2.3.4 不同PDA浓度对霉菌摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响

图 4 结果表明 PDA 培养液中的葡萄糖浓度对霉菌产凝乳酶的能力有明显的影响作用, 因此我们实验考察 PDA 培养液中其他营养成分的浓度对霉菌产凝乳酶能力的影响。按照 1.3.5(4)进行实验, 得到如图 6 所示。

图 6 实验结果表明: 与 PDA 培养液原液相比, 2 倍 PDA 培养液较有利于凝乳酶的合成, 霉菌发酵所产凝乳酶活力较高, 但随着 PDA 浓度继续增大, 虽然霉菌生长状况良好, 发酵能获得较大的菌体量, 但是较高浓度的 PDA 培养液对凝乳酶的合成不利, 所产凝乳酶活力较低, 所以选择最适 PDA 培养液为 2 倍 PDA 培养液。

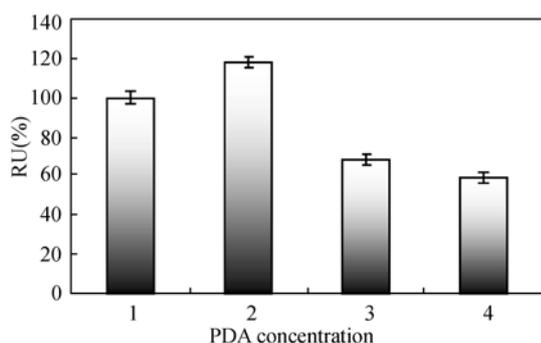


图6 PDA浓度对霉菌摇瓶发酵产凝乳酶活力的影响  
Fig. 6 Effect of different concentration of liquid PDA on activity of milk-clotting enzyme

### 3 结论

本实验对发酵的江米酒中的微生物进行了分离纯化, 并通过分析江米酒发酵过程中微生物菌数的变化与江米酒的凝乳活力之间的关系初步确定霉菌为产凝乳酶的优势菌, 利用酪蛋白平板法进一步对该结论进行了验证。对该霉菌的产酶条件进行了初步优化, 结果表明, 2倍浓度的PDA培养基中添加5%葡萄糖而不添加受试氮源是该霉菌产凝乳酶的最佳培养条件, 在此条件下其所产凝乳酶活力可提高144%。对该霉菌的鉴定工作及摇瓶发酵工艺条件的进一步优化由本课题组继续在进行。

### REFERENCES

[1] Dao RN. New dairy product of home market-cheese.

*China Dairy Cattle*, 2000, 2: 47-48.

道日娜. 国内新型乳品—干酪. 中国奶牛, 2000, 2: 47-48.

[2] Zhang FX. Studies on extraction technology of calf rennet. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2002, 30(1): 24-26.

张富新. 小牛皱胃酶提取技术的研究. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(1): 24-26.

[3] Meng GZ. Progress in research of milk clotting enzymes. *Micorbiology*, 1987, 14(2): 35-37.

孟广震. 凝乳酶研究进展. 微生物学通报, 1987, 14(2): 35-37.

[4] Zhou JQ, Lin QL, Zhao MM. Studies on the production of chymosin by microorganisms. *China Food Additives*, 2004, 2: 6-9.

周俊清, 林亲录, 赵谋明. 微生物源凝乳酶的研究进展. 中国食品添加剂, 2004, 2: 6-9.

[5] Liu ZM, Luo CY. Studies on milk-clotting mechanism of glutinous rice wine. *Food Science*, 2000, 1(21): 13-16.

刘振民, 骆承痒. 江米酒乳凝固机理的研究. 食品科学. 2000, 1(21): 13-16.

[6] Du LX. *Protocols for Industrial Microbiology*. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1992, 87-88.

杜连祥等. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992, 87-88.

[7] Arimk K, Iwasake K. Milk-clotting enzyme from microorganisms part I screening test and the identification of the potent fungus. *Agric Biol Chem*, 1967, 31(5): 540-545.

[8] Zhang JZ. *Microbiology Chemotaxonomy*. Beijing: China Light Industry Press, 1996, 154-156.

张纪忠. 微生物分类学. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, 154-156.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 植物免疫与植物疫苗——研究与实践

邱德文 主编

978-7-03-021271-9 ¥38.00 2008年4月1日出版

本书从植物与激发子物质或微生物互作角度系统介绍了植物疫苗在植物免疫诱导中的作用机理和应用实践。本书共分15章, 主要论述了生化类激发子, 如病毒衣壳蛋白、蛋白类激发子、壳寡糖、脱落酸和聚 $\gamma$ -谷氨酸等, 以及具有诱导免疫功能的微生物, 如木霉、枯草芽孢杆菌、病毒弱毒株系等研究与应用的现状及发展趋势。

本书适合从事植物诱导免疫、生物制药、分子植物病理学、分子生物学、化学生物学等领域研究和教学工作的教师、研究生及科研人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>