

大曲发酵过程中微生物淀粉酶同工酶的研究

邓小晨 王忠彦 胡永松 门芸 汪红

(四川大学生物工程系, 成都 610064)

摘要 聚丙烯酰胺凝胶电泳结合淀粉酶同工酶染色, 分析不同发酵期曲样以及从中分离的菌株的淀粉酶, 结果表明: 不同微生物淀粉酶的 R_i 值不同。细菌淀粉酶分子量一般大于霉菌和酵母淀粉酶。曲心酶谱较稳定, 只含霉菌淀粉酶。曲皮含有霉菌和细菌两类淀粉酶。成品曲中以霉菌淀粉酶为主。本文的方法可用于研究自然发酵过程中微生物的变化和作用。

关键词 淀粉酶同工酶, 大曲发酵

我国传统酿造过程中, 制曲是重要的工艺环节。在微生物纯种发酵已高度发展的今天, 传统制曲工艺仍停留在自然发酵的水平上。影响制曲工艺发展的主要原因是曲内微生物复杂, 对其变化规律缺乏深入了解。本文将淀粉酶同工酶分析方法用于研究传统大曲发酵中微生物的作用, 目前国内尚未见同类报道。

1 材料与方法

1.1 曲样

取自四川宜宾五粮液酒厂的包包曲。

1.2 菌株

从五粮液酒厂大曲样品中分离以及本室保存菌株。

1.3 菌株鉴定

按文献 [1, 2]。

1.4 酶液制备

1.4.1 曲样粉碎后, 按 1:2 加水, 30℃ 浸泡 2—3h, 离心取上清液。

1.4.2 从曲样中分离菌株经液体或固体培养(浸泡同前), 离心取上清液。

1.5 PAGE 电泳及淀粉酶同工酶染色^[3]

按常规制备 7.5% 凝胶。电泳条件: 2mA/管。电泳后取出凝胶条于 1% 淀粉液(用生理盐水配制)中, 37℃ 保温 1h, 洗净多余淀粉液, 加入含 5% 乙酸的稀碘液(临时配制), 室温显色。

1.6 淀粉酶活力测定

液化型及糖化型淀粉酶活力测定均按文献 [4]。

1.7 糖类纸层析

按文献 [4]。

2 结果

2.1 分离菌株的特性

从大曲不同发酵阶段样品的分离平皿上, 挑取不同特征的菌落, 并从中选出能分泌淀粉酶的菌株, 共计 72 株, 其中细菌 37 株, 霉菌 27 株和酵母菌 8 株。

经初步鉴定, 细菌全部为芽孢杆菌。其中枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 30 株, 地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 4 株, 坚强芽孢杆菌 (*B. firmus*) 1 株, 其余 2 株未定种名。在霉菌中, 根霉占 18 株, 曲霉 9 株, 8 株酵母都是假丝酵母。这些菌株除均能产生淀粉酶外, 其显著特征是耐热能力很强, 或能产生耐热的芽孢或孢子, 或能在较高温度下生长, 8 株酵母的生长温度上限为 46℃。它们在大曲发酵高温期存活下来, 并成为大曲微生物区系的重要组成部分。

2.2 分离菌株的淀粉酶同工酶

2.2.1 分离菌株的淀粉酶同工酶电泳酶谱: 将不同菌株分别培养并收集酶液, 电泳分析其淀粉酶同工酶, 将位置相同的酶带归类, 同时用

已知保存菌株作对比, 结果表明: 不同类型微生物的淀粉酶有较大差异。细菌淀粉酶通常只

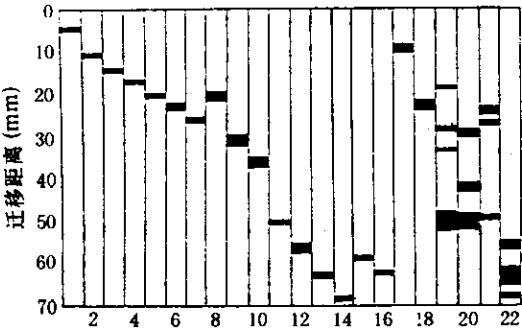


图1 分离菌株的淀粉酶同工酶谱带
1—7 细菌淀粉酶, 8—14 霉菌淀粉酶,
15—16 酵母菌淀粉酶, 17. 地衣芽孢杆菌,
18. 枯草芽孢杆菌, 19. 米曲霉,
20. 黑曲霉, 21、22. 根霉

有1—2条带(图1), 分子量较大, 迁移率在0.07—0.38范围内(表1); 霉菌的谱带较复杂, 分子量一般小于细菌, 迁移率在0.29—0.97范围内。霉菌中根霉和曲霉这两类产酶菌株的淀粉酶带明显不同。曲霉的酶带分布在0.38—0.72范围内, 主酶带迁移率在0.72左右, 根霉淀粉酶带有两种类型: 一类分子量较大, 由两条相距很近的酶带组成, 迁移率接近细菌淀粉酶分布范围; 另一类分子量很小, 有三条以上的酶带, 迁移率在0.81—0.97。所分离的酵母菌有两条酶带, 分子量很小, 迁移率在0.84—0.90。这几类主要产酶微生物的淀粉酶同工酶分子量差异较大, 特别是主酶带的迁移率各不相同, 容易识别, 从而能在混合酶样中区分开来。

表1 分离菌株淀粉酶同工酶的相对迁移率 (R_f)

谱带号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
R_f	0.07	0.15	0.20	0.24	0.29	0.33	0.38	0.29	0.45	0.52	0.72	0.81	0.90	0.97	0.84	0.90
$(\bar{X}+S)$	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
菌株数	6	6	7	7	4	4	3	3	3	3	3	5	5	5	4	4

2.2.2 分离菌株淀粉酶的作用类型: 纸层析的结果显示: 18株根霉的淀粉酶对淀粉水解后产物只有葡萄糖, 9株曲霉淀粉酶的水解产物大部分是葡萄糖, 有少量麦芽糖。37株细菌淀粉酶的水解产物大部分是麦芽糖, 有少量葡萄糖。表明在所研究范围内, 根霉只有糖化型淀粉酶, 曲霉以糖化酶为主, 而细菌产生液化酶。与图1的结果比较, 液化酶分子量较大, 糖化酶是中等及小分子酶。

2.3 大曲中淀粉酶同工酶

2.3.1 大曲不同发酵时期淀粉酶活性的变化: 大曲不同发酵时期样品淀粉酶测定结果见图2。干麦粒内淀粉酶活性很低。麦粒润水后, 糖化酶活性迅速增加。新曲入曲房发酵1d后, 糖化酶活性开始下降, 从第三天开始, 由于微生物酶的产生, 糖化酶活性逐渐回升。在以后的发酵时间内保持相对恒定。曲皮部分糖化酶活性在1200—1400u/ml。曲心酶活较低, 大约在

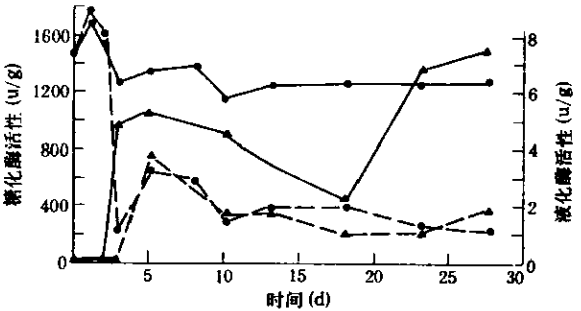


图2 大曲发酵过程中淀粉酶活性的变化
· 糖化酶, 一曲皮
▲ 液化酶, 一曲心

400—600u/ml。麦粒及新曲中测不到液化酶活性。发酵3—5d后, 液化酶开始出现, 在高温初期(约5—8d), 液化酶活性达到较高值, 以后逐渐下降, 曲心酶活始终低于曲皮。在曲房内发酵临近结束时(约23d), 由于温度适宜, 微生物代谢活跃, 曲皮液化酶明显增加。大曲在

半年多的贮存期内,淀粉酶活性大体维持不变。

2.3.2 大曲不同发酵时期淀粉酶同工酶电泳图谱:不同发酵时期曲样的淀粉酶同工酶谱见图3。麦粉和刚形成的新曲中微生物酶尚未产生,酶带由植物淀粉酶组成。发酵1d,原有植物淀粉酶逐渐消失,曲中出现新酶带,由微生物产生。随着发酵进程,曲块中酶带数量及位置发生变化。曲中最早出现的酶带分子量较大,稍后才出现低分子酶带。曲皮与曲心酶带明显不同。曲皮含有曲心所没有的分子量较大的酶,而曲心则含有曲皮所无,分子量较小的酶。与图1的谱带比较,提示分子量较大的酶带是细菌淀粉酶,而分子量较小的酶带是霉菌淀粉酶。细菌型淀粉酶与霉菌型淀粉酶在曲中出现的时间亦与这两类微生物生长和产酶规律一致。



图3 不同发酵时期曲样的淀粉酶同工酶谱

1. 麦粉, 2. 新曲, 3. 1d 曲皮, 4. 1d 曲心,
5. 2d 曲皮, 6. 2d 曲心, 7. 5d 曲皮, 8. 5d 曲心,
9. 8d 曲皮, 10. 8d 曲心, 11. 10d 曲皮, 12. 10d 曲心,
13. 13d 曲皮, 14. 13d 曲心, 15. 18d 曲皮, 16. 18d 曲心,
17. 23d (发酵终) 曲皮, 18. 23d 曲心,
19. 成品曲 (贮存6个月) 曲皮, 20. 成品曲心,
21. 成品曲混合样

曲心酶带位置和数量很稳定,在发酵中后期以及贮存期内基本不变,主要有三条酶带,均在霉菌淀粉酶分布范围内。曲皮酶带较复杂,既有细菌类型,也有霉菌类型。图谱中各酶带的宽窄可大致反映各类淀粉酶在曲内的相对活性。细菌酶随着发酵时间的推移有减少的趋势,但在第23天以及贮存期的曲皮样中,细菌酶在谱带中所占比重提高,这与测到的液化酶活性

变化相吻合。

曲皮与曲心的酶谱差异反映了微生物的分布和产酶条件不同。曲皮与外部环境接触多,养分充足,各类微生物生长良好,产酶量大且种类多。曲心的条件不利于细菌产酶,而霉菌可通过菌丝生长深入曲心,并从表皮获得养分。大约从第8天开始,各主要酶带已基本形成,表明在前期发酵中,特别是在高温的选择压力下,最初原料所带的微生物群体经过不断演替,已逐步形成大曲特有微生物区系,这些微生物以能够在生淀粉原料中生长和耐受高温为特征,在发酵第5和第8天的曲皮样中,出现与酵母淀粉酶一致的酶带并逐渐消失,说明酵母淀粉酶稳定性较差,在大曲淀粉酶中占有次要地位。大生产成品曲粉综合样(21[#]谱带)反映了不同微生物淀粉酶最终的分布和比率。与图1相比不难看出成品曲中霉菌型淀粉酶占优势,其中根霉淀粉酶占有相当比例。

3 讨论

(1) 淀粉的分解和利用是大曲发酵过程中的代谢主流。因此淀粉酶是影响发酵进程的重要因素。由于大曲生料发酵的特点,自然选择过程使曲内微生物区系中的淀粉酶产生菌成为优势群体,它们的消长和演替对其它群体的发展有重要影响。不同的淀粉酶同工酶在曲块中的分布和变化,在一定程度上反映了其产生菌的分布和变化。分析自然发酵过程中淀粉酶同工酶的变化可作为追踪微生物群体演替的重要指标,有助于阐明各类微生物在大曲发酵中的作用。

(2) 细菌淀粉酶的稳定性一般高于霉菌淀粉酶。但对贮存期以及成品曲样多次分析结果均显示,酶带主要是霉菌类型,而细菌酶很少或没有。可能的解释是霉菌蛋白酶分解了细菌淀粉酶,尚需进一步研究。

(3) 曲内产酶微生物种类很多,有不少淀粉酶带的分子量相差很小,由于淀粉酶同工酶染色的特点,曲样中迁移率相近的酶带可融合成一条较宽的带。另外,不同样品酶液的离子

强度和 pH 值有差异, 对迁移率有一定影响。

参 考 文 献

[1] Buchanan R E, Gibbons N E 等编. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版). 中国科学院微生物研究所“伯杰细菌鉴定手册翻译组”译, 北京: 科学出版社, 1984.

[2] [美] R. E. 戈登, W. C. 海恩斯, C. HN. 帕格著. 芽孢杆菌属. 蔡妙英等译, 农业出版社, 1983.

[3] 吴鹤龄, 林锦湖主编. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1980.

[4] 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院, 大连轻工业学院等编著. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1980.