

解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 固体发酵产 谷氨酰胺酶的优化研究

Optimization on glutaminase production from *Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22 by solid-state fermentation

周池虹伶 崔春 赵谋明

ZHOU Chi-hong-ling CUI Cun ZHAO Mou-ming

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641)

(School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

摘要:以南海海泥中筛选出来的解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 (*Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22) 为菌种, 优化固体发酵产谷氨酰胺酶的工艺。选择发酵条件(接种量、发酵时间、发酵温度)和发酵培养基(淀粉原料、料水比、产酶诱导剂)进行单因素试验, 通过正交试验对料水比、产酶诱导剂、接种量进行进一步优化, 将谷氨酰胺酶活力从 (83.10 ± 4.64) U/mg 干基提高到了 (2690.02 ± 28.80) U/mg 干基。优化后的发酵条件为: 接种量 2.0% (V/m), 温度 37 °C, 时间 48 h; 优化后的发酵培养基为: 豆粕 20 g, 小麦粉 5 g, 蔗糖脂肪酸酯 (SE-1170) 0.02 g, 料水比 1.0 : 0.6 (m : m)。对固体曲料中的谷氨酰胺酶进行提取工艺的优化, 在料液比为 1 : 8 (m : V)、37 °C 下摇床提取 1 h 最优。将粗酶液与同等酶活力的商业酶对谷氨酰胺进行酶解, 通过测定谷氨酸和谷氨酰胺的含量变化, 验证了粗酶液将谷氨酰胺转化成谷氨酸的能力较强。

关键词:解淀粉芽孢杆菌; 谷氨酰胺酶; 固体发酵

Abstract: A *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWJS22 isolated from deep sea mud of the South China Sea was used to produce glutaminase by solid-state fermentation. Using single factor test and orthogonal test, including culture media and the fermentation parameters, was applied to optimize glutaminase production technology; optimal fermentation conditions were: 2% (V/m) seed liquid was inoculated in a culture medium composed of 20 g soy flakes, 5 g wheat flour, 0.02 g SE-1170, water to solid in a ratio of 1.0 : 0.6 (m : m), and fermented at 37 °C for 48 h. Under this optimized condition, the L-

glutaminase activity was increased from (83.10 ± 4.64) U/mgds to (2690.02 ± 28.80) U/mgds. The extraction of glutaminase was also optimized, the optimal extraction technology was to add 8 volume of water to the culture and shaking in a vibrator at 37 °C for 1 h. It was shown that the crude enzyme can transform glutamine to glutamic acid.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; glutaminase; solid state fermentation

海洋拥有着地球上 80% 的生物资源, 因海洋具有高盐、高压、寡营养、低温等极端环境, 在微生物长期生存过程中, 会形成一些与陆地微生物所不同的特点, 而这些微生物所产的酶类, 通常也会具有更强的耐受力 and 适应能力^[1]。

谷氨酰胺酶 (EC 3. 5. 1. 2) 是催化谷氨酰胺水解生成谷氨酸和氨的一种酶, 是控制食品鲜味的关键酶, 在食品、医学等领域都有广泛的应用^[2]。谷氨酰胺酶在酱油中应用广泛, 而发酵酱油所用的米曲霉所产的谷氨酰胺酶, 不耐盐不耐热, 酶活力不高^[3]。这与米曲霉的产酶特性有关, 也是因为谷氨酰胺酶的产生条件与中国酱油的制曲工艺相矛盾。日本学者^[4]将枯草菌液体发酵所制得的谷氨酰胺酶制剂运用到酱油发酵中, 取得了一定的效果。叶茂等^[5]采用添加粗酶粉的方法研究了谷氨酰胺酶对酱油发酵过程的影响, 验证了该方法能改善酱油风味。目前尚未发现有关混合不同的曲料进行酱油发酵的研究。

本研究旨在用一株从南海海泥中筛选到耐盐性好的解淀粉芽孢杆菌 SWJS22, 在不改变酱油发酵原有的原料配比的基础上, 通过单因素和正交试验进行固体发酵的培养基和培养条件的优化, 以提高曲料中的谷氨酰胺酶活力。优化后的固体曲料, 能直接应用于酱油发酵, 提高酱油鲜味。不仅有耐受力更好的谷氨酰胺酶作用, 还有高耐盐性的解淀粉芽孢杆菌作用于酱油发酵, 意在改善酱油鲜味。同时, 研究酶的提取方法, 验证其将谷氨酰胺转化为谷氨酸的能力, 为谷氨酰胺酶的分离纯化以及商业化生产打下基础。

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(编号:2014ZZ0053); 海洋公益性行业科研专项(编号:201305018-7); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项(编号:GD2012-D01-002)

作者简介:周池虹伶(1992-), 女, 华南理工大学在读硕士研究生。
E-mail:1992.elf@sina.com

通讯作者:崔春

收稿日期:2015-10-09

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料

菌种:从中国南海海泥中筛选出的解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 (*Bacillus amyloliquefaciens* SWJS22, CGMCC No. 8425),由华南理工大学轻工与食品学院食品生物技术实验室提供。菌种保存于斜面培养基(4℃),每3个月转接一次。

斜面培养基:牛肉浸膏4 g/L,蛋白胨6 g/L,浸出酵母粉2 g/L,氯化钠5 g/L,琼脂20 g/L,pH 7.0。

ZoBell2261E培养基:酪蛋白10 g/L,牛肉浸膏3 g/L,氯化钠5 g/L,磷酸二氢钾2 g/L,琼脂15 g/L,pH 7.4±0.1。

种子培养基:胰蛋白胨10 g/L,酵母抽提物5 g/L,蔗糖10 g/L, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L,pH 7.0。

豆粕、面粉、麦麸、小麦粉:市购;

吐温60、吐温80:纯度≥98%,天津市科密欧化学试剂有限公司;

甘油:纯度≥99%,国药集团化学试剂有限公司;

蔗糖酯(SE-1170):食品级,日本三菱化学食品株式会社;

L-谷氨酰胺:纯度≥98.5%,上海博奥生物科技有限公司;

L-谷氨酸检测试剂盒:德国 R-Biopharm 公司。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台: SXZ 型,上海浦东跃新科学仪器厂;

霉菌培养箱: ZJP-A1430 型,上海智诚分析仪器制造有限公司;

全波长扫描多功能读数仪: VARIOSKAN FLASH 型,赛默飞世尔科技公司;

台式离心机: 3-18K 型,德国 Sigma 仪器公司;

氨基酸分析仪: A300 型,德国 Membra Pure 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 取出实验室保藏的解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 试管斜面,在无菌操作台中,刮取少许菌落,在 Zo-Bell2261E 平板上划线。37℃ 恒温培养箱中培养 24 h,挑取单菌落转接到另一平板进行培养,如此重复 3 次,使菌株完全复壮。

1.2.2 种子液制备 挑取已活化的菌落,接入 25 mL 种子液培养基于锥形瓶(250 mL)中,37℃、180 r/min 条件下恒温摇床培养 6 h,得到种子液。

1.2.3 固体发酵产酶条件的单因素试验研究

(1) 淀粉原料对酶活力的影响:选用小麦粉、面粉和麦麸为淀粉原料,按照豆粕:淀粉原料=4:1($m:m$)的比例,在料水比为 1.0:0.7($m:m$),接种量为 1.0%($V:m$),37℃ 条件下发酵 48 h,测定酶活力。

(2) 发酵温度对酶活力的影响:将豆粕和小麦粉以 4:1($m:m$)的比例混合,按照料水比 1.0:0.7($m:m$)制作固体培养基,种子液添加量为 1.0%($V:m$),在不同的发酵温度下(30,35,37,40,45℃)发酵 48 h,测定酶活力。

(3) 发酵时间对酶活力的影响:将豆粕和小麦粉以 4:1

($m:m$)的比例混合,按照料水比 1.0:0.7($m:m$)制作固体培养基,种子液添加量为 1.0%($V:m$),在 37℃ 下发酵不同时间(24,48,72,96 h),测定酶活力。

(4) 接种量对酶活力影响:将豆粕和小麦粉以 4:1($m:m$)的比例混合,以料水比 1.0:0.7($m:m$)制作固体培养基,分别添加以 0.5%,1.0%,2.0%,3.0%,5.0%(V/m)的比例往培养基中添加种子液,37℃ 条件下发酵 48 h,测定酶活力。

(5) 料水比对酶活力影响:将豆粕和小麦粉以 4:1($m:m$)的比例混合,按照不同的料水比(1.0:0.4,1.0:0.5,1.0:0.6,1.0:0.7,1.0:0.8, $m:m$)制作发酵培养基,固定种子液接种量为 1.0%(V/m),在 37℃ 下发酵 48 h,测定酶活力。

(6) 产酶促进剂对酶活力的影响:将豆粕和小麦粉以 4:1($m:m$)的比例混合,以料水比 1.0:0.7($m:m$)制作固体培养基,添加 1.0%(V/m)的种子液,分别添加表面活性剂:0.10%(m/m)的吐温 60、吐温 80、蔗糖酯(SE-1170)、甘油以及 0.02%(m/m)的 SDS;产酶诱导物:分别添加 0.05%,0.10%(m/m)的谷氨酰胺和 0.05%,0.10%(m/m)的天冬酰胺。根据试验结果,对具有一定促进效果的产酶促进剂进行浓度的梯度试验和互配试验,37℃ 条件下发酵 48 h,测定酶活力。

1.2.4 产酶条件的正交试验设计 根据单因素试验结果,选取料水比、SE-1170、接种量 3 因素 3 水平设计正交试验 $L_9(3^3)$,以酶活力为指标,探究这 3 因素之间的交互作用,进一步提高酶活力。

1.2.5 酶活力的测定 将曲料混合均匀。称取 3 000 mg 曲料均匀分散到 50 mmol/L,pH 6.98 的磷酸盐缓冲溶液中,37℃ 下保温,加入 3 mL 1.0%的 L-谷氨酰胺底物,酶解 30 min 后,加入 15 mL 10%的 TCA 终止反应,然后用 50 mmol/L,pH 6.98 的磷酸盐缓冲溶液定容至 100 mL,4 层纱布过滤后,滤液备用。空白将 L-谷氨酰胺底物和 TCA 的添加顺序交换即可。分别测定 0.006,0.010,0.020,0.040,0.060 g/L 的 L-谷氨酸含量在 492 nm 下的吸光值,以 L-谷氨酸浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线(用 R-biopharm 公司的 L-谷氨酸检测试剂盒,测定 L-谷氨酸含量)。在 37℃,pH 6.98 的条件下,每毫克酱油曲料(干基)每分钟催化 L-谷氨酰胺(浓度 1.0%)分解生成 1 μmol L-谷氨酸,即为一个酶活力单位,以 U/mg 干基表示。

1.2.6 谷氨酰胺酶的提取 称取适量的曲料于 pH 6.98 的磷酸盐缓冲溶液中,按照料液比 1:4,1:6,1:8,1:10($m:V$),在 37℃,150 r/min 的摇床条件下提取 90 min,4 层纱布过滤定容后,1 000 r/min 离心 15 min,测上清液酶活力。

按优化后的料液比 1:8($m:V$),称取一定质量的曲料于 pH 6.98 的磷酸盐缓冲溶液中,在 37℃,150 r/min 的摇床条件下,提取 30,60,90,120,180 min,4 层纱布过滤定容后,1 000 r/min 离心 15 min,测上清液酶活力。

1.2.7 粗酶液的功能验证

(1) 谷氨酰胺酶酶解谷氨酰胺:以 1%的谷氨酰胺为底物,添加 1.0,2.0 U 的酶活力梯度的粗酶液以及同等酶活力

梯度的商业酶,37℃下反应 1 h 后,测谷氨酸和谷氨酰胺的含量。

(2) 谷氨酸和谷氨酰胺的测定:采用 A300 氨基酸分析仪对谷氨酸和谷氨酰胺的含量进行测定。

氨基酸检测条件:4 mL 样品与 1 mL 15% 的磺基水杨酸溶液混合沉淀样品中大分子的蛋白和多肽,4℃下反应 1 h,4℃,10 000×g 离心 15 min,样品经过微滤膜(0.22 μmol)处理。用液相离子交换柱(分离柱 TS263,Membra Pure)分离氨基酸,茚三酮显色,流速为 60 μL/min,570 nm 处检测,氨基酸浓度采用外标计算。

1.2.8 数据分析 每次试验重复 3 次,结果表示为平均值±标准偏差,使用 EXCEL 2013 和 SPSS 19.0 软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 固体发酵培养基及培养条件的单因素优化

2.1.1 淀粉原料对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 由图 1 可知,淀粉原料产酶能力依次为:小麦粉>面粉>麦麸。麦麸做淀粉原料产酶活力最低,仅 83.10 U/mg 干基,小麦粉的产酶活力为 416.51 U/mg 干基,是麦麸的 5.01 倍,有显著性差异($P<0.05$)。

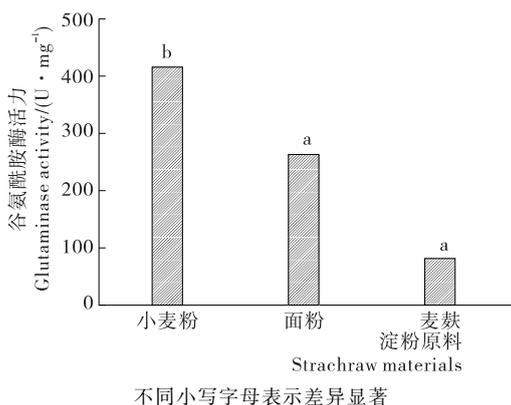


图 1 淀粉原料对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响
Figure 1 Effects of starch raw materials on the glutaminase activity of SWJS22

小麦粉中含有 70% 左右的淀粉,蛋白含量约为 10%~14%,麦胶蛋白和谷蛋白含量丰富,而谷蛋白中的谷氨酰胺含量约占 40%^[6]。面粉是将小麦去掉麦麸之后,研磨而成,其蛋白质含量比小麦粉要高^[7]。麦麸是小麦最外层表层,空隙大,能起到透气的作用。小麦粉相较于面粉而言,透气性要更强,更有利于微生物的生长与产酶;相较于麦麸而言,营养物质更丰富,故选用小麦粉为固体发酵的淀粉原料。

2.1.2 发酵温度对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 由图 2 可知,37℃时最高酶活力达到 2 166.75 U/mg 干基,与该菌的最适生长温度保持一致^[8]。温度的细微差别,都会对酶活力有较大影响,35,40℃与 37℃相比,酶活力均有显著性差异($P<0.05$);当温度从 40℃提高到 45℃时,酶活力急剧下降,从 1 503.89 U/mg 干基下降到 483.43 U/mg 干基。

温度是影响微生物生长繁殖和生存的最重要因素之一,微生物只有在繁殖状况良好的前提下,才能生产目的代谢产

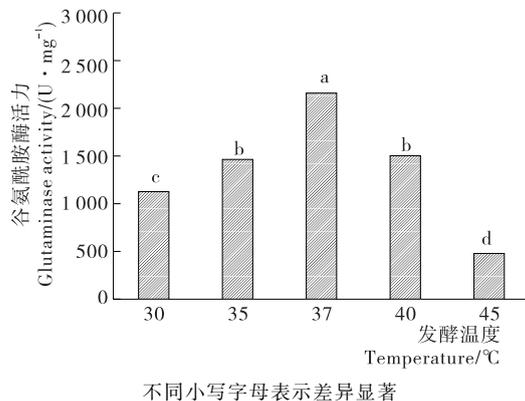


图 2 发酵温度对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响
Figure 2 Effects of fermentation of temperature on the glutaminase activity of SWJS22

物^[9]。生长温度低,菌体生长缓慢,酶活力不高;生长温度高,菌体生长周期缩短,过早老化,细胞功能急剧下降,不利于产酶,且温度高于目标酶耐受温度时,也会对酶活力产生负面影响。选用 37℃作为发酵温度。

2.1.3 发酵时间对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 由图 3 可知,发酵时间对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响明显。发酵时间为 24 h 时,菌体还处于生长适应期,其酶活力不高,仅 618.18 U/mg 干基,发酵时间达到 48 h 时,豆粕提供的营养物质丰富,菌群大量繁殖,达到饱和,酶活力达到最大值,为 2 120.12 U/mg 干基,显著高于其他发酵时间($P<0.05$)。随着时间的延长,营养物质消耗过量,豆粕颜色变深,解淀粉芽孢杆菌分泌的物质和酶系使豆粕黏度增大,曲料的水分含量下降,氨味增加^[10],不利于微生物产谷氨酰胺酶,其酶活力一直处于下降趋势,故选择最优发酵时间为 48 h。

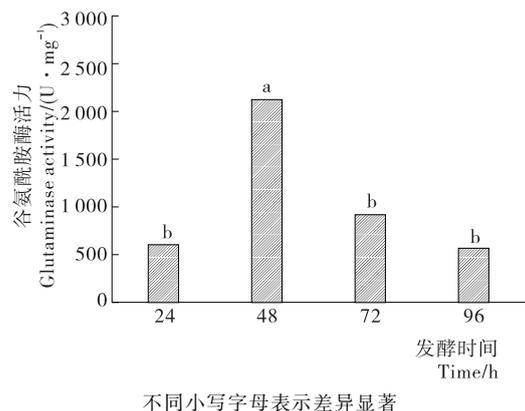
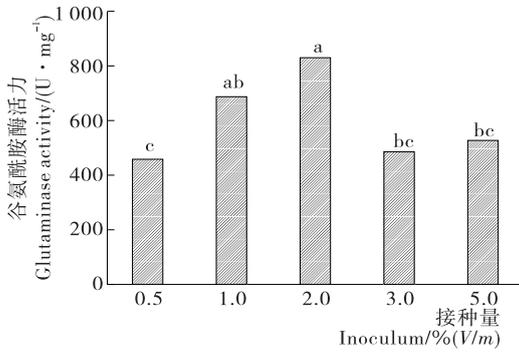


图 3 发酵时间对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响
Figure 3 Effects of fermentation time on the glutaminase activity of SWJS22

2.1.4 接种量对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 由图 4 可知,随着接种量的增加,谷氨酰胺酶活力先增高后降低,与文献^[11]报道的解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶活力的趋势一致。当接种量为 2.0% (V/m) 时,谷氨酰胺酶活力最高,为 832.98 U/mg 干基。当接种量为 0.5%,5.0% (V/m) 时,酶活力分别为 458.12,532.15 U/mg 干基,两个接种量相差 10 倍,酶活力并无显著性差异($P>0.05$)。可知,并不是接种



不同小写字母表示差异显著

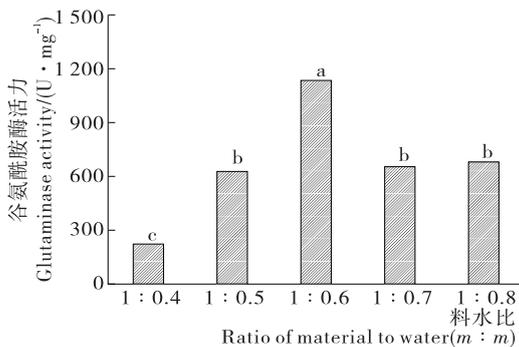
图4 接种量对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响

Figure 4 Effects of the amount of inoculum on the glutaminase activity of SWJS22

量越大,酶活力越高。接种量低时,营养物质虽然丰富,而微生物的基数小,生长达不到饱和状态;接种量高时,竞争激烈,抑制了解淀粉芽孢杆菌的生长和繁殖,不利于微生物产谷氨酰胺酶。因此,接种量对谷氨酰胺酶活力有一定影响,接种量为2.0%(V/m)时最优。

2.1.5 料水比对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 水分对细菌的生长提供了一个正常的生理需求,因此,料水比是影响谷氨酰胺酶活力的一个重要因素,对酶活力的提高有显著影响。由图5可知,当料水比为1.0:0.6(m:m)时,谷氨酰胺酶活力最高,为1 135.17 U/mg干基,有显著性差异(P<0.05),与文献[12]报道的复合益生菌发酵豆粕中,在料水比1.0:0.6(m:m)的情况下,豆粕的多个品质指标均维持在最高水平的结果一致。当料水比为1.0:0.4(m:m)时,水分含量太低,菌体不能正常生长,酶活力仅为219.39 U/mg干基;当料水比为1.0:0.8(m:m)时,水分含量太高,营养物质易结块,附在锥形瓶底部,曲料不易晃动,没有空隙,影响微生物的通气 and 散热^[9],酶活力也不易提高,仅为689.56 U/mg干基。因此,料水比为1.0:0.6(m:m)时最优。

2.1.6 产酶促进剂对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响 少量的产酶促进剂会显著提高酶活,选用一些表面活性剂来提高细胞膜的通透性,和底物诱导剂来诱导谷氨酰胺酶的生成。以0.10%(m/m)的蔗糖脂肪酸酯(SE-1170)和0.05%(m/m)的谷氨酰胺的促进效果最为明显,有显著性差异(P<0.05)。在此条件下,对SE-1170进行浓度梯度试验,将最优



不同小写字母表示差异显著

图5 料水比对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响

Figure 5 Effects of ratio of material to water on the glutaminase activity of SWJS22

的表面活性剂和最优的诱导物进行混合,结果见表1。由表1可知,互配效果并没有得到进一步提高,故选用0.05%(m/m)的SE-1170作为最终的产酶促进剂。

表1 产酶促进剂对菌株产谷氨酰胺酶活力的影响[†]

Table 1 Effects of enzyme production promoter on the glutaminase activity of SWJS22

组别(m/m)	酶活力/(U · mg ⁻¹)
对照组	1 143.41 ± 270.99 ^b
0.05% SE-1170	2 453.52 ± 334.43 ^a
0.10% SE-1170	1 754.46 ± 70.28 ^b
0.15% SE-1170	1 760.69 ± 70.57 ^b
0.05% 谷氨酰胺	1 877.07 ± 340.40 ^{ab}
0.05% SE-1170+0.05% 谷氨酰胺	1 388.24 ± 1.99 ^{ab}

[†] 不同小写字母表示差异显著。

2.2 固体发酵培养基及培养条件的正交试验优化

根据上述单因素的结果,选取对酶活力影响较明显的料水比、接种量、SE-1170含量(见表2)来进行L₉(3³)正交试验,进一步提高酶活力。由表3可知,酶活力影响顺序为料水比>SE-1170>接种量,最优条件组合为料水比1.0:0.6(m:m),SE-1170 0.5%(m/m);接种量2.0%(V/m),酶活力最高能达到(2 690.02 ± 28.80) U/mg干基。与韩敏海等^[13]通过液体发酵得到的356 U/mL相比有明显的优势,高于邹敏娟^[14]测的不同曲料中最高的谷氨酰胺酶活力(2 580 U/mg干基)。

表2 L₉(3³)正交试验因素与水平

Table 2 L₉(3³) The factors and levels of orthogonal test

水平	A 料水比(m:m)	B SE-1170/%	C 接种量/%
1	1.0:0.5	0.05	1.0
2	1.0:0.6	0.10	2.0
3	1.0:0.7	0.15	3.0

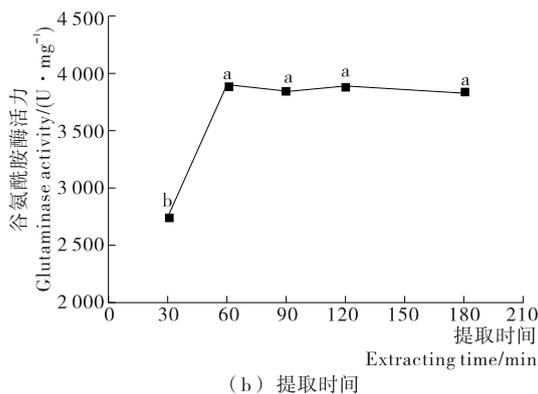
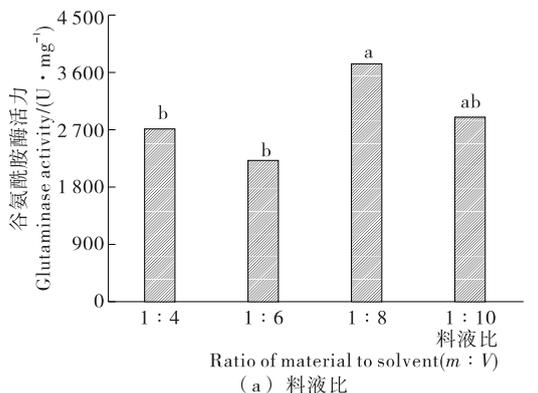
表3 L₉(3³)正交试验优化结果

Table 3 L₉(3³) The optimization results of orthogonal test

序号	A	B	C	酶活力/(U · mg ⁻¹)
1	1	1	1	675.63 ± 56.34
2	1	2	2	804.16 ± 24.36
3	1	3	3	566.98 ± 28.66
4	2	1	2	2 690.02 ± 28.80
5	2	2	3	2 093.72 ± 209.86
6	2	3	1	1 810.59 ± 70.57
7	3	1	3	1 799.66 ± 174.07
8	3	2	1	1 754.46 ± 60.18
9	3	3	2	1 092.10 ± 19.11
k ₁	682.256	1 721.771	1 413.560	
k ₂	2 198.113	1 550.781	1 528.762	
k ₃	1 548.741	1 156.558	1 486.788	
R	1 515.857	565.213	115.202	

2.3 固体曲料中谷氨酰胺酶的提取

对固体曲料中的谷氨酰胺酶进行提取,对提取过程中的料液比和提取时间进行优化。由图 6(a)可知,当料液低时,固体曲料体积大,不利于提取;料液比增加,酶浓度降低,导致酶比活力下降,不利于后面进一步的分离纯化试验,因此确定最佳料液比为 1:8($m:V$)。由图 6(b)可知,酶活力随着提取时间的增加,呈现先提高后平稳的趋势。当提取时间超过 1 h 后,其提取酶活力趋于平缓,没有显著性差异($P>0.05$),为了保险起见,选用提取 2 h 进行后续试验。



不同小写字母表示差异显著

图 6 料液比及提取时间对谷氨酰胺酶活力的影响

Figure 6 Effect of the exaction of glutaminase on ratio of material to solvent and extracting time

2.4 粗酶液和商业酶对谷氨酰胺的酶解效果比较

本试验将提取得到的谷氨酰胺酶的粗酶液,按照表 4 所示的量,添加到 1% 的谷氨酰胺中酶解,比较谷氨酰胺和谷氨酸的含量变化。对于该反应体系,谷氨酸和谷氨酰胺的摩尔数是一个定值,因此选用谷氨酸和谷氨酰胺的摩尔数百分比,直观观察到谷氨酰胺转化为谷氨酸的情况。1.0 U 的粗酶液在 1 h 内能够将底物中 0% 的谷氨酸含量提高到 44.37%,2.0 U 的粗酶液能在 1 h 内能够将谷氨酸含量提高到 88.74%,而 2.0 U 的商业酶则 100% 的将谷氨酰胺转化成谷氨酸。可见,解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 所产的谷氨酰胺酶有一定的酶解效果,相较于同等酶活力的商业酶来讲,效果差别不大,要使其酶活力提高,还需要进行进一步的分离纯化及研究。

表 4 酶解液中谷氨酸和谷氨酰胺的摩尔数百分比

指标	1.0 U 粗酶液	1.0 U 商业酶	2.0 U 粗酶液	2.0 U 商业酶
谷氨酸	44.37	52.46	88.74	100
谷氨酰胺	55.63	47.56	11.26	0

3 结论

本试验通过单因素和正交试验对解淀粉芽孢杆菌 SWJS22 的发酵条件和发酵培养基进行优化。结果表明,在料水比 1.0:0.6($m:m$),SE-1170 0.5%(m/m),接种量 2.0%(V/m),37 °C 的条件下,发酵 48 h,酶活力可达到 2 690.02 U/mg 干基。对固体曲料进行酶的提取和粗酶液的作用效果验证。优化后的曲料能直接用于酱油发酵,胞内、胞外和细胞间的谷氨酰胺酶都能作用于提高酱油鲜味,为酱油发酵提供了一个新思路,其作用效果还有待进一步的探索。

参考文献

- Chi Zheng-ming, Liu Zhi-qiang, Gao Ling-mei, et al. Marine yeasts and their applications in mariculture[J]. Journal of Ocean University of China (English Edition), 2006, 5(3): 251~256.
- Nandakumar R, Yoshimune K, Wakayama M, et al. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23(2): 87~100.
- 康立. 蛋白质谷氨酰胺酶的发酵纯化及其应用的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2014.
- 康维民, 刘绍军. 一种新型谷氨酰胺酶在酱油酿造中的应用[J]. 中国调味品, 2003(4): 33~35.
- 叶茂, 张远平, 邓毛程. 一种耐盐性谷氨酰胺酶在高盐稀态酱油酿造过程中的应用研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(7): 5~7.
- 廖兰. 湿热有机酸脱酰胺改性小麦面筋蛋白及作用机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 211~222.
- 钟泓波. 产蛋白酶海洋菌株的选育及发酵豆粕的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- 江汉湖. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 70~71.
- 吴晖, 卓林霞, 解检清, 等. 发酵条件对枯草芽孢杆菌发酵豆粕中的蛋白酶活力的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(10): 973~976.
- 柴海云. 解淀粉芽孢杆菌菌溶酶的发酵优化, 酶学性质及其基因的表达[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- 胡瑞, 陈艳, 王之盛, 等. 复合益生菌发酵豆粕生产工艺参数的优化及酶菌联合发酵对豆粕品质的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(8): 1 896~1 903.
- 韩铭海, 赵娟娟, 华盛龙, 等. 一株高产谷氨酰胺酶菌株的鉴定和酶活特性的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1 037~1 040.
- 邹敏娟. 酱油曲中谷氨酰胺酶酶活测定条件优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 89~93.