

大曲来源淀粉利用型乳酸菌的筛选及其淀粉利用特性

崔丹曦¹, 李宁², 黄卫宁³, 任聪¹, 吴群^{*1}, 徐岩¹

1 江南大学生物工程学院酿造微生物与应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

2 广州焙乐道食品有限公司, 广东 广州 511400

3 江南大学食品学院 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

崔丹曦, 李宁, 黄卫宁, 任聪, 吴群, 徐岩. 大曲来源淀粉利用型乳酸菌的筛选及其淀粉利用特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4194-4208

Cui Danxi, Li Ning, Huang Weining, Ren Cong, Wu Qun, Xu Yan. Starch utilization characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Daqu*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4194-4208

摘要:【背景】乳酸菌是面包、馒头等发酵食品中的重要功能微生物, 对改善质地和风味均具有重要作用。淀粉利用能力高的乳酸菌, 因其能够在生面粉中更好地定殖而具有重要的应用价值。【目的】筛选获得淀粉水解型乳酸菌并研究其淀粉利用特性。【方法】以浓香型白酒大曲为筛选源, 采用淀粉基质碳源对大曲中乳酸菌进行定向富集, 结合淀粉发酵能力筛选高淀粉利用能力菌株, 并对筛选得到的优良菌株展开淀粉酶表达及其酶活力研究。【结果】以贮存 3-6 个月的大曲为优秀筛选源, 以生面糊传代富集方法可较快筛选出具有良好淀粉利用能力的乳杆菌, 主要物种为植物乳杆菌和类食品乳杆菌。对其中一株具有淀粉利用能力的类食品乳杆菌 LBM12001 的淀粉水解特征和淀粉酶活力展开研究, 该菌株淀粉水解能力达 10 g/L, 并且其在面糊中具有良好的定殖能力; 酶活力测定表明, 其 α -淀粉酶和麦芽糖淀粉酶为胞外酶; 麦芽糖淀粉酶水解淀粉的最适 pH 值为 3.5, 比酶活为 1 240 U/mg。【结论】建立起从我国传统白酒发酵大曲中高效筛选淀粉水解型乳酸菌的富集筛选方法, 以及菌株的水解能力评价方法, 获得的胞外麦芽糖淀粉酶分泌型乳杆菌在酸面团、馒头等需进行生面粉发酵食品的生产中具有重要应用前景。

关键词: 菌株筛选; 类食品乳杆菌; 淀粉水解

*Corresponding author: E-mail: wuq@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-02-22; Accepted: 2022-04-10

Starch utilization characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Daqu*

CUI Danxi¹, LI Ning², HUANG Weining³, REN Cong¹, WU Qun^{*1}, XU Yan¹

1 Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Guangzhou Puratos Food Limited Company, Guangzhou 511400, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Lactic acid bacteria (LAB) are important microorganisms which affect the texture and flavor of fermentation foods such as sourdough and steamed bun. Amylolytic LAB have enormous application possibilities owing to their ability to colonize in flour. [Objective] To screen amylolytic LAB and study their starch utilization characteristics. [Methods] The medium with starch as carbon source was used to enrich target strains from *Daqu* for strong aromatic Chinese spirit, followed by testing the starch hydrolysis ability. Then, expression level of amylase in the yielded strain and the enzyme activity were determined. [Results] *Daqu* which had been stored for 3–6 months was optimal for screening the bacteria. Amylolytic LAB can be quickly screened out by subculture with batter. The yielded strains were dominated by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paralimentarius*. The starch utilization characteristics and amylase activity in the amylolytic *L. paralimentarius* LBM12001 were analyzed. The findings showed that it can hydrolyze starch at 10 g/L and well colonize in batter. The α -amylase and maltogenic amylase were extracellular enzymes. The specific enzyme activity of maltogenic amylase reached 1 240 U/mg at pH 3.5. [Conclusion] We developed a method to enrich about screen amylolytic LAB from *Daqu* for traditional Chinese spirit and a method for evaluating the starch hydrolysis ability, and screened out the extracellular maltogenic amylase-secreting strain which had great potential in the production of sourdough, steamed bun, and other fermentation foods.

Keywords: strain screening; *Lactobacillus paralimentarius*; starch hydrolysis

乳酸菌在东、西方的发酵面制品方面均具有重要应用。我国传统发酵面制品,如馒头的发酵采用“酵子”,其中富含以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、旧金山乳杆菌(*Lactobacillus sanfranciscensis*)等为代表的乳杆菌^[1]。西方的传统酸面团与东方的发面馒头类似,由谷物粉、水和盐的混合物经长时间发酵而成^[2],乳酸菌是酸面团中丰度最高的微生物^[3]。乳酸菌的存在可对成品面包起到一系列的改良作用,包括增强风味,改善面团流变学特性和功能学

性质,延长面包保质期^[4]。当前工业化应用主要采用IV型酸面团发酵工艺,通过人工接种乳酸菌的方式进行大规模工业发酵^[5]。自然界中的乳酸菌通常优先利用葡萄糖、麦芽糖等糖类,淀粉利用能力较弱,因此,当前酸面团工业采用添加人工淀粉酶制剂的方式进行工业化生产。

近年来,发酵面制品行业从家庭作坊式生产逐步过渡到中央厨房式的生产方式,后者以预发酵冷冻面团、酸面团的制作方式为代表^[6]。为保证产品品质稳定,工业化规模生产方式对

酵母和乳酸菌的发酵性能都提出了更高的要求。其中对于乳酸菌的发酵性能,包括生长能力、产风味物质等提出了更高的要求,例如通过高淀粉水解活力乳酸菌的添加,在不添加人工酶制剂的条件下实现淀粉水解和发酵产酸一步生成^[7]。

虽然已有研究发现部分乳酸菌具有淀粉水解能力^[8-9],但目前对淀粉利用型乳酸菌的研究仍然处于初步阶段,仅发现嗜淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylophilus*)^[10]、植物乳杆菌^[4]等数种淀粉水解型乳酸菌。为适应现代化工业规模生产的需要,亟须选育具有更优淀粉利用能力的乳酸菌菌株。

我国传统白酒固态发酵体系为乙醇-乳酸发酵体系,乳酸菌存在于制曲^[11]和主发酵^[12]阶段,发酵体系中的乳酸浓度高达 36.20 g/kg^[13]。其中,大曲制作采用了生料发酵模式,采用小麦、大麦等谷物原料经破碎、压制后放入曲房进行自然发酵。长达数百年连续运行的制曲环境可能为乳酸菌在生淀粉基质上的生长提供了一定的驯化条件,我们推测从白酒大曲中有望筛选出具有优良生淀粉利用能力的乳酸菌菌株。

本研究通过扩增子测序手段对四川和安徽地区不同贮存期的浓香型大曲进行菌群结构解析,优选筛选源。模拟自然条件下酸酵头的发酵方式,将大曲粉接种入生面糊发酵,重复传代后结合淀粉发酵能力筛选出高淀粉利用能力的乳酸菌菌株,验证优势菌株的淀粉利用能力和淀粉酶系分泌能力,并对优良菌株展开淀粉酶表达及其酶活力研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大曲样品

大曲取材自四川及安徽地区浓香型白酒酒厂大酒曲堆积车间,样品包括贮藏 0、3 和 6 个月

3 种类型。

1.1.2 培养基

研究所使用培养基均采用自然 pH, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

MRS 培养基参照文献[14]配制。

筛选培养基(g/L): MRS 培养基配方, 碳酸钙 2.00, 琼脂粉 20.00。

水溶性淀粉培养基(g/L): 水溶性淀粉 20.00, 柠檬酸氢二铵 2.00, 吐温-80 1.00, 乙酸钠 5.00, 磷酸氢二钾 2.00, 硫酸镁 0.58, 硫酸锰 0.25。

LB 培养基参照文献[14]配制, 培养含有 pET-28a 及其衍生质粒的菌种时, 添加 50 mg/L 卡那霉素。

1.1.3 主要试剂和仪器

50 mmol/L 柠檬酸缓冲液, 中国医药集团化学试剂有限公司; 1% (质量体积比) 麦芽糖标准溶液、1% (质量体积比) G2- β -CD 溶液、1% (质量体积比) 水溶性淀粉溶液, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; PowerSoil DNA Kit, Qiagen 公司; MolPure Bacterial RNA Kit, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; TaKaRa 反转录试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Seamless Cloning Kit 和 BeyoMag™ 磁珠法胶回收试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司。AKTA avant 25 蛋白纯化仪, GE Healthcare 公司; Ni NTA Unionrose 6FF 金属螯合层析柱, 上海永联生物科技有限公司。

1.1.4 引物

研究所用引物见表 1, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 大曲菌群结构研究

称取 7 g 酒曲和 3 g 玻璃珠, 加入 15 mL PBS 缓冲液涡旋振荡 5 min。300 r/min 离心 5 min,

α -淀粉酶序列, LpaMA-F/LpaMA-R 扩增麦芽糖淀粉酶编码基因(*lpaMA*)序列, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17] 分析计算发酵过程中 α -淀粉酶基因和麦芽糖淀粉酶基因的表达变化。

1.2.6 乳酸菌粗酶活力测定

水溶性淀粉培养基培养至对数期(OD_{600} 为 0.5), 4 °C、8 000 r/min 离心 3 min, 上清为胞外酶粗酶液。沉淀菌泥用柠檬酸缓冲液洗涤, 冷冻压榨破壁, 4 °C、8 000 r/min 离心 3 min, 上清即为胞内酶粗酶液^[18]。

标准曲线采用 1% (质量体积比) 麦芽糖制作^[19], 以水溶性淀粉和 G2- β -CD 为底物研究粗酶活力。G2- β -CD 结构为麦芽糖以 α -1,6 糖苷键相连于 β 环糊精, 该淀粉酶不能水解 β 环糊精, 因此选用此底物验证 α -1,6 糖苷键的水解能力。

底物及粗酶液摇匀, 37 °C 水浴 2 h。反应液加入 DNS 溶液, 煮沸 5 min, 取出后冰上冷却, 540 nm 波长处比色测定。

在上述制定的酶活测定条件下, 每分钟催化底物分解生成相当于 1 μ mol 葡萄糖的还原糖所需要的酶量(mL)为 1 个酶活单位(U/mL), 计算公式^[20]: 比酶活(U/mL)=

$$\frac{(OD_{540\text{实验}} - OD_{540\text{对照}}) \times N_1 \times N_2 \times K \times V_{\text{总}}}{T \times V_{\text{酶}}}$$

式中, N_1 : 酶液稀释倍数; N_2 : 酶标仪测定稀释倍数; K : 标准曲线斜率; $V_{\text{总}}$ (mL): 反应液总体积; T (min): 反应时间; $V_{\text{酶}}$ (mL): 粗酶液体积。

1.2.7 淀粉酶纯化及酶活力测定

分别以引物对 pET28a-lpaMA-F/pET28a-lpaMA-R 扩增麦芽糖淀粉酶序列, 以引物对 pET28a-F/pET28a-R 线性化扩增 pET28a 质粒。BeyoMag™ 磁珠法胶回收试剂盒进行产物纯化, 采用 Seamless Cloning Kit 进行片段连接。

将重组菌接种于含有卡那霉素的 LB 培养

基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。培养至 OD_{600} 约 0.6, 加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导, 17 °C、200 r/min 培养 24 h。4 °C、12 000 r/min 离心 3 min 收集沉淀, 用柠檬酸缓冲液(pH 3.0)重悬后超声破碎细胞, 超声采用 400 W, 工作 5 s、间隔 5 s, 重复 5–10 次, 4 °C、8 000 r/min 离心所得上清液为粗蛋白液。

使用 AKTA avant 25 蛋白纯化仪和 Ni NTA Unionrose 6FF 金属螯合层析柱对粗蛋白液进行纯化, SDS-PAGE 确定目的蛋白大小。纯酶液测定酶活力, 反应条件同 1.2.6。

每分钟催化底物分解生成相当于 1 μ mol 葡萄糖的还原糖所需要的酶量(mg)为 1 个淀粉酶活单位, 计算公式^[20]: 比酶活(U/mg)=

$$\frac{(OD_{540\text{实验}} - OD_{540\text{对照}}) \times N_1 \times N_2 \times K \times V_{\text{总}}}{T \times V_{\text{酶}} \times C}$$

式中, N_1 : 酶液稀释倍数; N_2 : 酶标仪测定稀释倍数; K : 标准曲线斜率; $V_{\text{总}}$ (mL): 反应液总体积; T (min): 反应时间; $V_{\text{酶}}$ (mL): 粗酶液体积; C (mg/mL): 蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 大曲中乳酸菌类型分析

本研究通过扩增子测序手段对四川(SC)和安徽(AH)地区不同贮存期的浓香型大曲进行菌群结构解析。如图 1 所示, 相对丰度 1% 的细菌菌群可归属到 17 个属。随着成品曲贮存时间的延长(0–6 个月), 葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的相对丰度均逐渐降低, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)的相对丰度总体呈现升高趋势。四川和安徽大曲中乳杆菌属丰度分别从贮存 3 个月的 8.4% 和 5.2% 增加到贮存 6 个月的 19.6% 和 36.1%, 逐渐成为主体细菌(图 1A)。

对乳酸菌从种水平分析, 四川和安徽大曲在贮存 6 个月时乳酸菌总丰度分别高达 60% 和

52% (图 1B), 其中四川地区来源大曲主体乳酸菌为魏斯氏属(*Weissella*), 安徽地区来源大曲主体乳酸菌为明串珠菌属(*Leuconostoc*)和乳杆菌属。储藏 6 个月的安徽地区大曲中乳杆菌菌株占比高达 36.1%, 而且种类最多, 包括类食品乳杆菌、罗氏乳杆菌(*Lactobacillus rossiae*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、桥乳杆菌(*Lactobacillus pontis*)、植物乳杆菌、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*) 和 罗 伊 氏 乳 杆 菌 (*Lactobacillus reuteri*)。上述分析表明不同地区大曲在贮存过程中具有不同的菌群结构变化特征, 对于乳酸菌的筛选而言, 选择贮存 3-6 个月的大曲作为筛选源较为合适, 采用不同筛选源可增加乳酸菌类型的多样性。

2.2 淀粉基质下优良生长性能乳酸菌菌株的筛选

本研究选择安徽地区贮存了 6 个月的大曲为筛选源。预实验利用 MRS 培养基直接富集筛选, 得到的菌株大多为低淀粉利用型菌株。因此优化了筛选条件: 模拟自然条件下酸面团的发酵方式, 将大曲粉接种入生面糊体系发酵, 重复传代 3 次。测序结果如图 2A 所示。对传代时序进程的菌群变化分析可知, 通过连续传代, 乳杆菌属丰度随传代时序增加, 传代 3 次后, 相对丰度>1%的属主要为乳杆菌属和片球菌属, 其中乳杆菌属丰度高达 67% (图 2A)。

选用转接第 3 代的面糊进行多轮次筛菌实验, 在水溶性淀粉培养基中, 筛选到的菌株中约 88%的菌株发酵终点 $OD_{600} < 0.6$, 12%的菌株

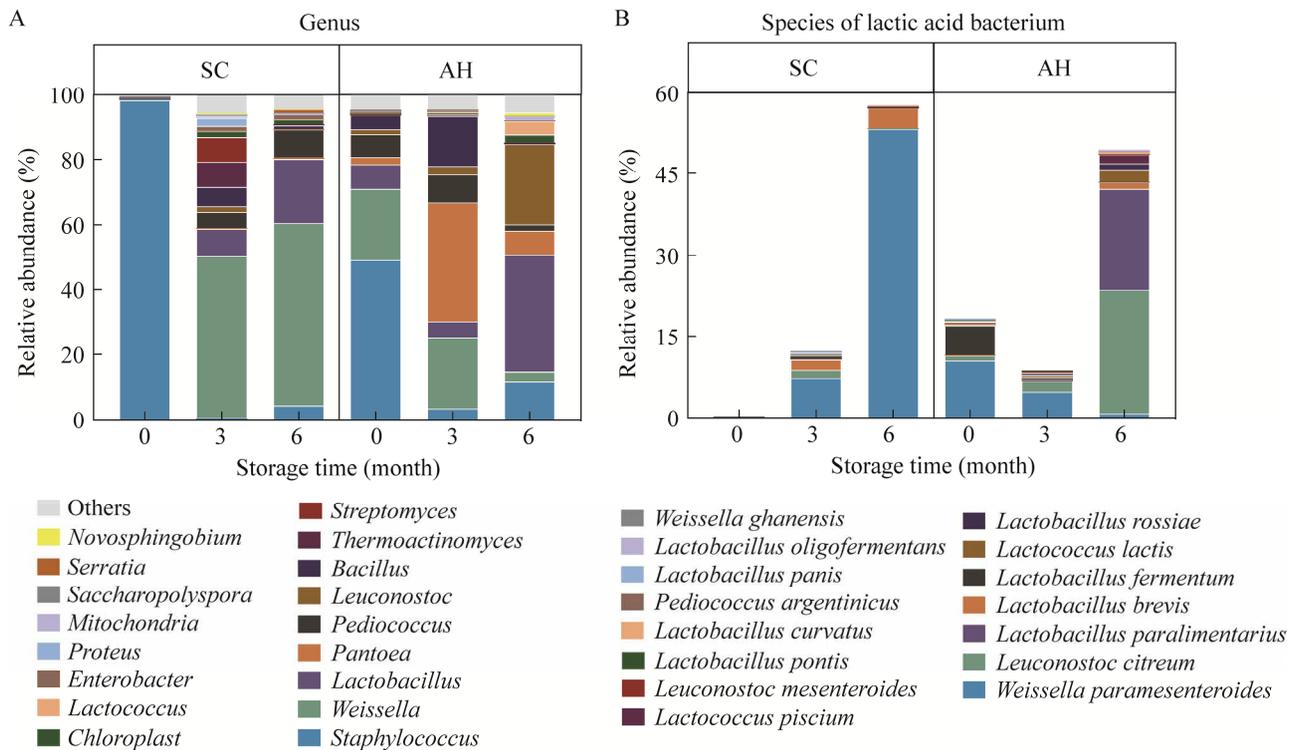


图 1 大曲贮存过程的群落结构组成 A: 属水平; B: 种水平

Figure 1 Microbial community structures of starter (*Daqu*) during storage. A: Genus level; B: Species level.

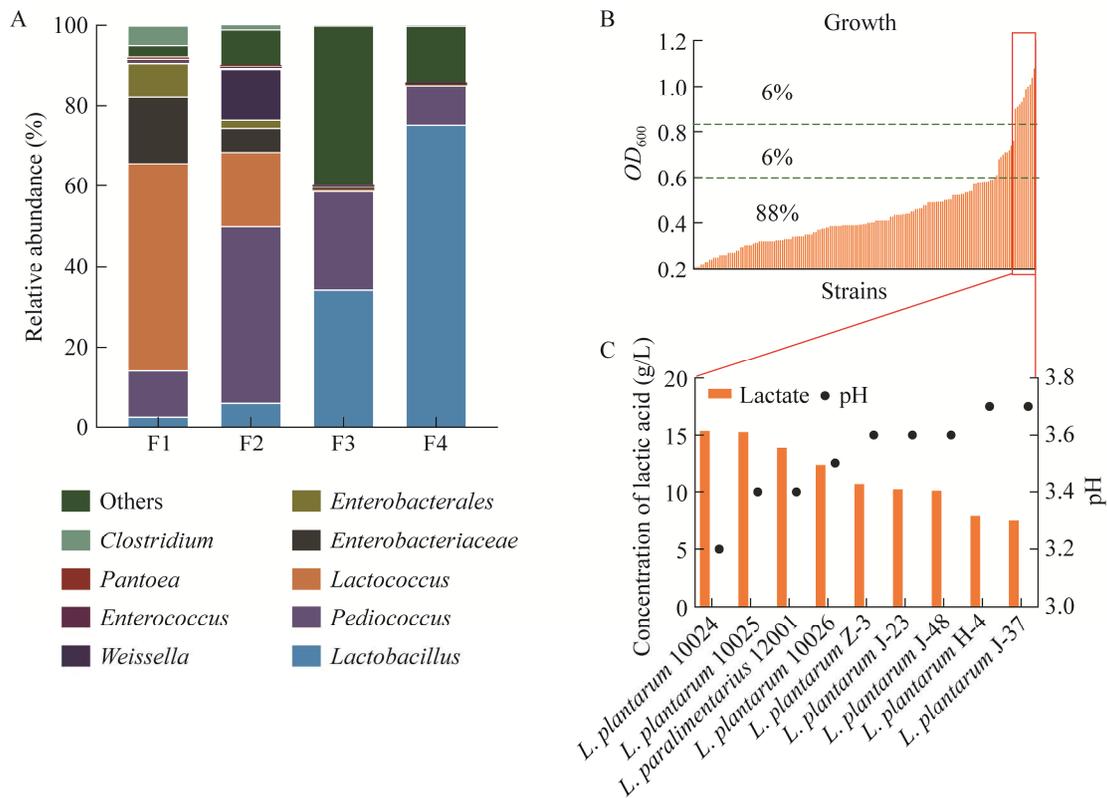


图 2 淀粉基质下优良生长性能乳酸菌的筛选 A: 大曲中菌群连续富集过程在属水平上的动态变化, F1–F4 表示连续传代; B: 初筛从第 F3 代分离得到的 LAB 菌株生长情况; C: 复筛研究了生长性能较好的菌株在水溶性淀粉培养基中的乳酸产率和发酵终点 pH

Figure 2 Screening of lactic acid bacteria with excellent fermentation performance in starch. A: Microbial dynamics of microbiota grown in dough inoculating with *Daqu* powder at genus level during successive enrichment. F1 to F4 indicates the successive passage; B: The growth of LAB strains isolated from the third passage (F3). A total number of 180 strains were examined; C: The lactate production and final culture pH of strains with strong growth performance in water soluble starch medium.

发酵终点 OD_{600} 介于 0.6–0.8 之间, 仅有 6% 的菌株发酵终点 $OD_{600} > 0.8$ (图 2B)。这表明首先从面糊中富集乳酸菌菌群, 然后结合水溶性淀粉培养基进行纯培养菌株筛选, 可以有效筛选出在淀粉基质中具有良好生长能力的菌株。

筛选到的在淀粉基质中具有良好生长能力的 9 株乳酸菌菌株为植物乳杆菌和类食品乳杆菌。再次发酵测试表明, 这 9 株乳杆菌在 20 g/L 的水溶性淀粉培养基中的乳酸产生能力 > 7 g/L, 对

应葡萄糖需要量为 7 g/L, 而培养基中可溶性糖含量仅为 5.8 g/L, 说明其能够水解淀粉供自身生长。

近年来, 高淀粉利用能力乳杆菌被广泛研究^[21-23]。本研究除了得到多株具有高淀粉水解能力的植物乳杆菌外, 还获得了在淀粉基质上生长和产酸性能优良的类食品乳杆菌 LBM12001, 类食品乳杆菌在酸面团、酸菜等天然发酵基质中广泛存在^[24-27], 但该菌株的淀粉利用能力及其他基本生理代谢特征至今鲜有研究。

2.3 类食品乳杆菌 LBM12001 菌株的淀粉利用能力和淀粉利用酶系表达特征

2.3.1 类食品乳杆菌 LBM12001 菌株的淀粉利用能力

我们以产酸速率和生长速率来评价类食品乳杆菌 LBM12001 菌株在淀粉基质上的生长能力。当以葡萄糖(对照组)为碳源时, LBM12001 生长迅速进入对数期(图 3A), 最高 OD_{600} 为 5.2, 最大比生长速率为 0.9(图 3B), 可将 20 g/L 葡萄糖转化为 19 g/L 乳酸(图 3C)。

相较于以葡萄糖为碳源, LBM12001 菌株在水溶性淀粉为碳源培养基中的生长远弱于葡萄糖为碳源的培养基, 最高 OD_{600} 为 0.89, 仅是葡萄糖为碳源时的 17.1%(图 3A)。最大比生长速率为 0.038, 仅为葡萄糖为碳源组数据的 4.75%(图 3B)。从乳酸及 pH 变化趋势可知, 虽然以淀粉为碳源时菌株的生物量远低于葡萄糖, 但其具有较高的乳酸产生能力。0–12 h 时, 乳酸产量以 0.36 g/(L·h) 的速度迅速增加; 12–24 h 乳酸产量保持在 0.083 g/(L·h) 缓慢增加; 24–48 h 乳酸生成速率达到最大值 0.38 g/(L·h); 48 h 后水解反应停止。乳酸终产量为 16 g/L, 略低于葡萄糖培养基(图 3C 和 3D)。对糖利用分析数据可得, 发酵前 24 h, 淀粉并未出现明显利用趋势, 水溶性淀粉中存在的少量还原糖供乳酸菌生长利用, 24 h 内消耗完可利用还原糖, 继而过渡到淀粉水解模式, 24 h 后培养基中淀粉含量迅速下降(图 3E–3G)。培养基中初始淀粉含量约 15 g/L, 发酵终点淀粉残余量约 5 g/L, 发酵过程淀粉总消耗约 10 g/L, 即 LBM12001 的淀粉利用率高达 66%, 表明该菌株具有高效的淀粉水解能力。根据 OD_{600} 和乳酸测试结果, 推测 LBM12001 在淀粉基质下水解淀粉很少用来生长, 主要用作代谢产物的生成。根据碳平衡计

算, 以水溶性淀粉为碳源时, 终浓度 16 g/L 的乳酸中约 71% 需由淀粉水解提供。

2.3.2 类食品乳杆菌 LBM12001 菌株在面糊中的定殖能力

上述淀粉利用能力测试底物为完全糊化的水溶性淀粉培养基, 而且培养基中含 MRS 配方中的矿质元素。但天然酸面团发酵的底物仅为生面粉, 不能添加其他促进乳酸菌生长的 MRS 培养基组分。为验证 LBM12001 在实际酸面团中的生长能力, 我们将 LBM12001 菌泥接种于面糊体系中, 通过检测乳酸产生和分析菌群结构, 判定菌株在酸面团中的定殖能力。如图 4A 所示, 菌株接种组乳酸在 0–36 h 间持续增加, 而对照组(不外源接种的面糊)的乳酸仅在 8–18 h 出现增长趋势, 18 h 后基本不再增加。如图 4B 所示, 发酵到 36 h 时, 接种组乳酸含量为 6.30 g/kg, 对照组为 1.86 g/kg, 仅为接种组的 1/3; 同时, 接种组的最低 pH 值为 3.41, 降低幅度为 2.81, 在发酵进程中低于对照组(最低值 4.83, 降低幅度 1.27), 结合数据统计结果证明, 实验组和空白组的 α 多样性存在显著性差异。

分析扩增子测序数据, 接种组在发酵起点类食品乳杆菌的相对含量为 30%, 36 h 时的相对含量增加到 47%(图 4B), 说明 LBM12001 能够在面糊中定殖。无外源接种的对照组中, 发酵过程中主要增长的乳酸菌为植物乳杆菌, 其相对丰度从初始的 41.3% 增加到 36 h 的 89.6%。以植物乳杆菌作为内参菌, 对类食品乳杆菌绝对含量进行校正, LBM12001 接种前后增长了 60%。同时, 接种组 36 h 时植物乳杆菌相对含量 < 1%, 表明 LBM12001 的生长抑制了植物乳杆菌的生长。酸面团发酵过程理化监测与菌群结构变化结果表明, 类食品乳杆菌 LBM12001 能够较好地 在面团中定殖。

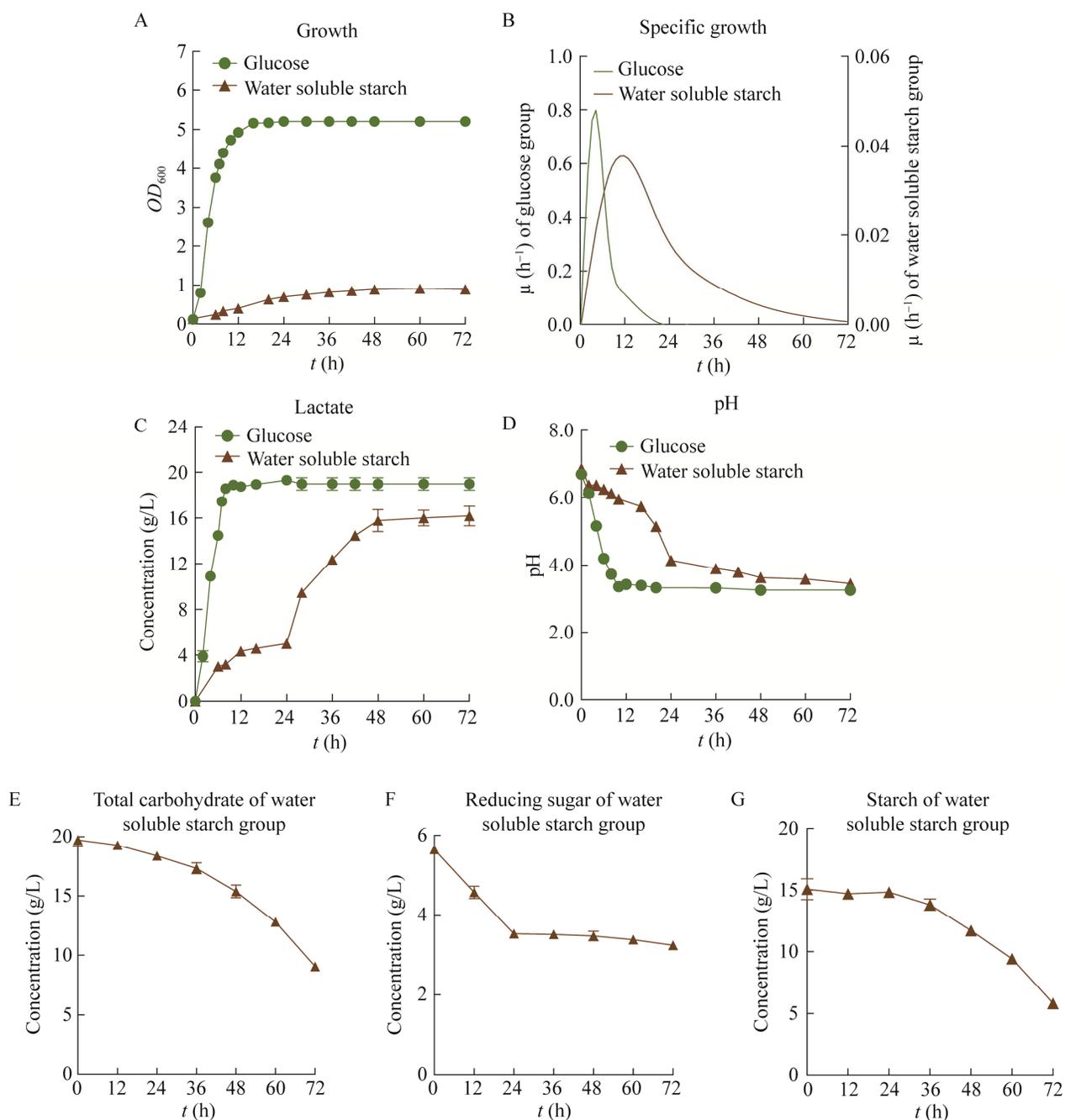


图 3 类食品乳杆菌 **LBM12001** 的生长、乳酸产生和碳水化合物利用能力 A 和 B: 菌株 **LBM12001** 在葡萄糖和水溶性淀粉培养基为底物的生长和比生长速率; C 和 D: 两种底物对菌株的乳酸产量和 pH 变化的影响; E-G: 水溶性淀粉为底物时菌株生长消耗总糖、还原糖和淀粉情况

Figure 3 Growth, lactic acid production and starch hydrolysis capacity of *Lactobacillus paralimentarius* **LBM12001**. A, B: The growth and specific growth of strain **LBM12001** grown in glucose and water soluble starch medium; C, D: The lactate production and final culture pH of strain with two substrates; E-G: The changes of total carbohydrate (E), reducing sugar (F) and starch (G), during the fermentation process in water soluble starch medium.

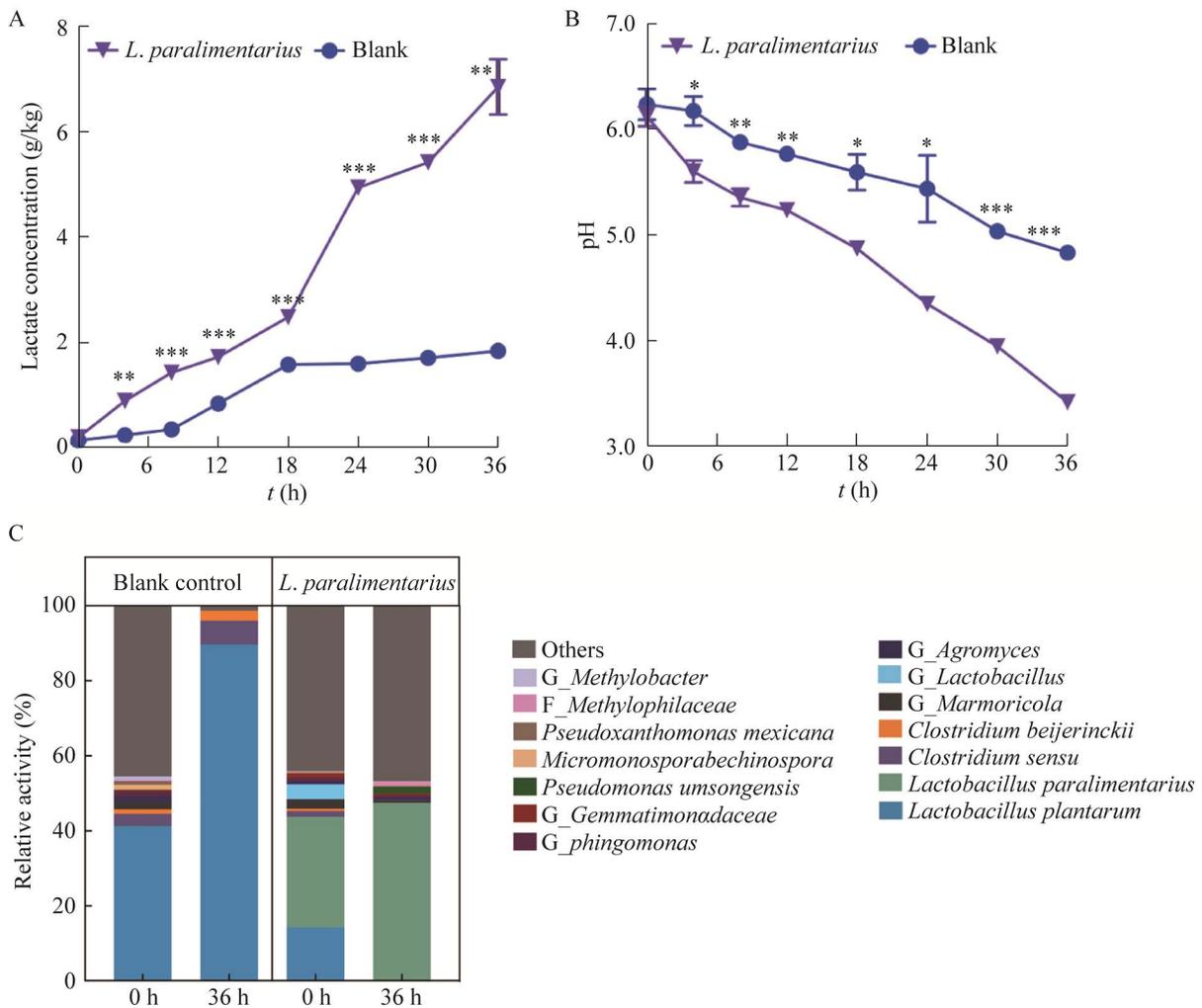


图 4 菌株 LBM12001 在生面糊中的定殖能力 A 和 B: LBM12001 在水溶性淀粉培养基为底物条件下的乳酸和 pH 变化情况, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; C: 生面团接种 LBM12001 后微生物菌群结构变化

Figure 4 Colonization ability of *L. paralimentarius* LBM12001 in uncooked flour batter. A–B: Lactate production and final culture pH of LBM12001 in water soluble starch medium; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; C: Microbial dynamics of microbiota grown in dough inoculating with LBM12001 at genus level.

2.3.3 类食品乳杆菌 LBM12001 淀粉利用酶系表达特征

类食品乳杆菌 LBM12001 具有较复杂的淀粉利用酶系编码基因簇, 该基因簇包含 12 个基因(图 5), 其中含有 2 个淀粉酶编码基因 *amyA* 和 *lpaMA*, 分别为编码 α -淀粉酶和麦芽糖淀粉酶。 α -淀粉酶蛋白序列与植物乳杆菌来源的 α -淀

粉酶蛋白序列相似度为 99%; 麦芽糖淀粉酶蛋白序列与植物乳杆菌来源的麦芽糖淀粉酶蛋白序列相似度为 45%。

RT-qPCR 数据如图 6 显示。在水溶性淀粉培养基中, 前 18 h 两种淀粉酶基因的相对表达水平均缓慢上升; *amyA* 基因在 18–24 h, *lpaMA* 基因在 18–36 h 的相对表达水平均快速上调。

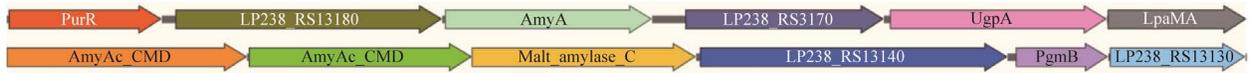


图 5 类食品乳杆菌 LBM12001 淀粉利用基因簇 PurR: LacI 家族蛋白结合转录调节因子; LP238_RS13180: α -葡萄糖苷酶; AmyA: α -淀粉酶; LP238_RS13170: 细胞外溶质结合蛋白; UgpA: ABC 转运蛋白通透酶; LpaMA: 麦芽糖淀粉酶; AmyAc_CMD: α -葡萄糖苷酶; LP238_RS13140: 糖苷水解酶; PgmB: 磷酸葡萄糖变位酶; LP238_RS13130: 半乳糖脱氢酶

Figure 5 The starch utilization cluster of *L. paralimentarius* LBM12001. PurR: LacI family DNA-binding transcriptional regulator; LP238_RS13180: α -glucosidase; AmyA: α -amylase; LP238_RS13170: Extracellular solute-binding protein; UgpA: ABC transporter permease; LpaMA: Maltogenic amylase; AmyAc_CMD: α -glucosidase; LP238_RS13140: Glycoside hydrolase family 65 protein; PgmB: β -phosphoglucomutase; LP238_RS13130: Galactose mutarotase.

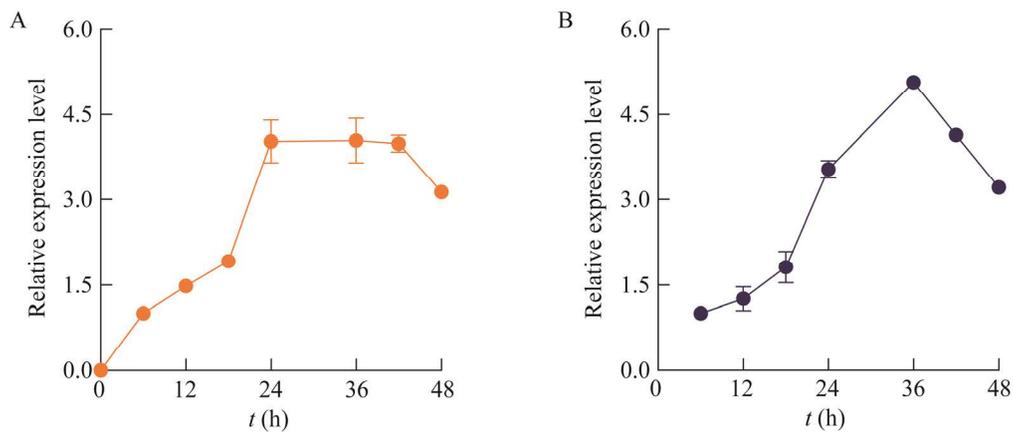


图 6 类食品乳杆菌 LBM12001 的 α -淀粉酶编码基因 *amyA* (A)和麦芽糖淀粉酶编码基因 *lpaMA* (B)的时序转录水平

Figure 6 The temporal transtription levels of *amyA* (A) and *lpaMA* (B) in *L. paralimentarius* LBM12001.

基因 *amyA* 在 24 h 时达到峰值并维持高表达至发酵 42 h, *lpaMA* 基因在 36 h 时达到峰值, 36 h 后逐渐下调。由数据结果推测, 在水溶性淀粉培养基中, 前 18 h 乳酸菌利用培养基中的少量还原糖进行生长, 18–36 h 处于淀粉水解状态, 与淀粉利用数据对应。

基于植物乳杆菌麦芽糖淀粉酶的研究表明, 植物乳杆菌麦芽糖淀粉酶同时具有高效切割 α -1,4 糖苷键和 α -1,6 糖苷键的特性^[9]。我们分别以水溶性淀粉和 G2- β -CD 为底物, 验证类食品乳杆菌淀粉酶的胞内和胞外水

解特性。

胞内和胞外粗酶的活力数据如图 7 所示, 以水溶性淀粉为底物时, 胞内酶活为 31 U/mL, 胞外酶活为 364 U/mL, 是胞内酶活的 12 倍。以 G2- β -CD 为底物时, 胞内酶活为 36 U/mL, 胞外酶活为 167 U/mL, 约为胞内酶活的 5 倍。该结果表明 LBM12001 不仅能水解 α -1,4 糖苷键, 也能水解 α -1,6 糖苷键, 并且 2 种水解能力主要表现为胞外水解活性。基于上述转录数据, 我们推测类食品乳杆菌的 α -1,6 糖苷键切割能力由 *lpaMA* 基因编码酶贡献。

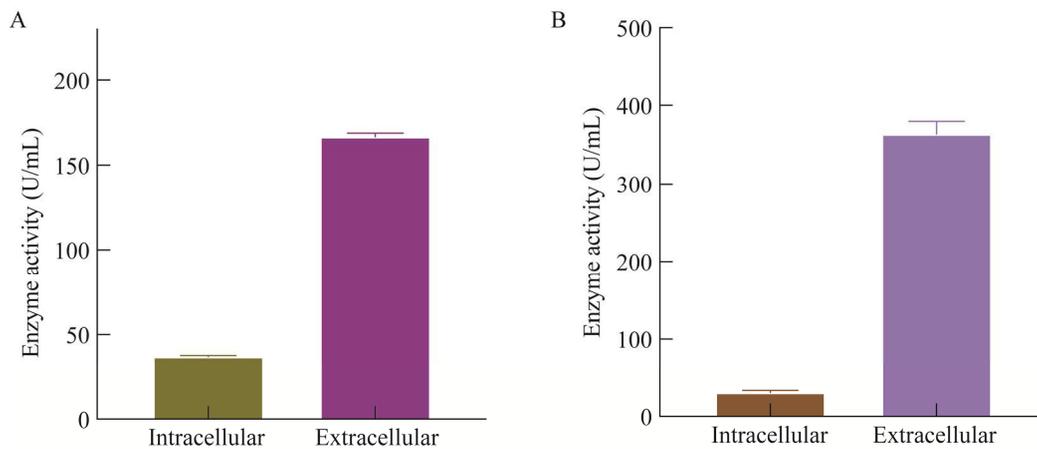


图7 类食品乳杆菌 LBM12001 在水溶性淀粉培养条件下的粗酶酶活 A: 以 G2-β-CD 为底物的酶活; B: 以水溶性淀粉为底物的酶活

Figure 7 The crude enzyme activity of *L. paralimentarius* LBM12001 cultured in water soluble starch medium. A: Enzymatic activity with G2-β-CD as substrate; B: Enzymatic activity with water soluble starch as substrate.

2.4 类食品乳杆菌麦芽糖淀粉酶(LpaMA)的基本酶学性质

2.4.1 蛋白纯化

由于至今尚无报道对类食品乳杆菌的 LpaMA 蛋白进行酶学性质研究, 为进一步确定 LBM12001 胞外的 α-1,6 糖苷键水解活性是否由 LpaMA 贡献, 我们对 *lpaMA* 基因进行异源表达纯化, His₆-LpaMA 的 SDS-PAGE 图见图 8。His₆-LpaMA 蛋白大小为 67.7 kDa, 目的蛋白定位在 55 kDa 与 70 kDa 之间, 与预测结果一致, 表明目的蛋白纯化成功。

2.4.2 His₆-LpaMA 的比酶活测定

测定不同 pH 条件, His₆-LpaMA 在水溶性淀粉和 G2-β-CD 两种底物下的比酶活变化。结果见图 9, 在以 G2-β-CD 为底物时, pH 3.0 时具有最高比酶活(3 400 U/mg), 随着 pH 值的升高酶活力逐渐下降; 在以水溶性淀粉为底物时, pH 3.5 时比酶活最高(1 240 U/mg), 随着 pH 值升高酶活力逐步下降。上述结果表明 LpaMA 只在酸性环境下表现出活性, 而且比活力随着 pH 值的降低逐渐升高。乳酸菌生长对数期胞外环境

pH 值逐渐降至 3.0, 结合上述胞外粗酶活测定表明了类食品乳杆菌胞外麦芽糖淀粉酶活力高于胞内, 我们推测 LpaMA 从胞内分泌到胞外, 在低 pH 值的胞外环境下行使水解淀粉的功能。

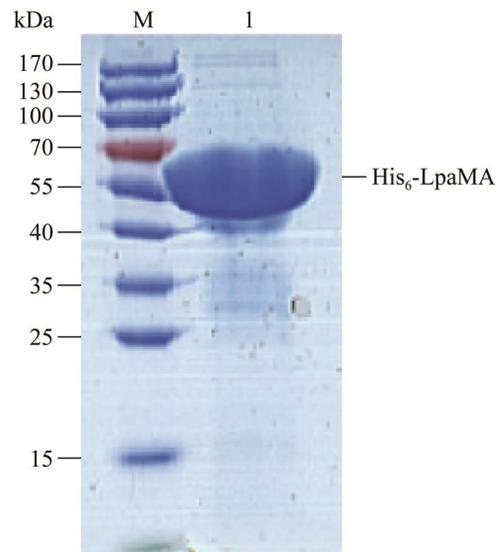


图8 类食品乳杆菌 LBM12001 麦芽糖淀粉酶的表达纯化 SDS-PAGE 图

Figure 8 SDS-PAGE analysis of purified His₆-LpaMA of *L. paralimentarius* LBM12001. M: Marker; 1: His₆-LpaMA.

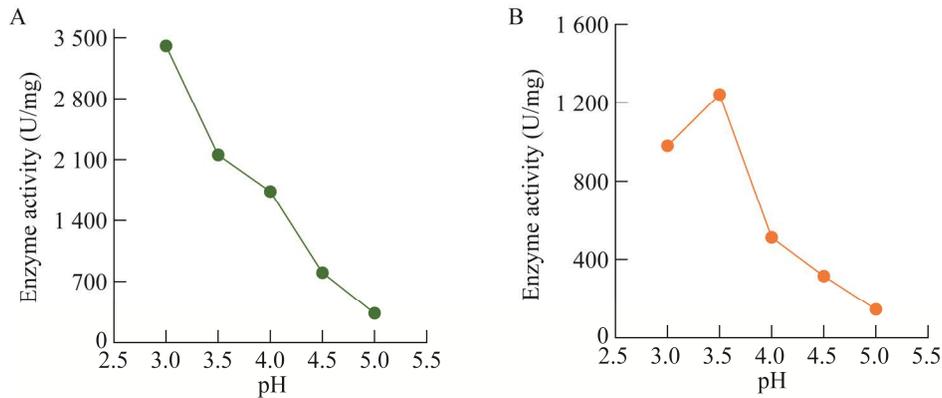


图9 类食品乳杆菌 His6-LpaMA 的比酶活随 pH 变化情况 A: 以 G2-β-CD 为底物下的酶活; B: 以水溶性淀粉为底物下的酶活

Figure 9 The specific enzyme activities of His6-LpaMA of *L. paralimentarius* LBM12001 with varied pH. A: The specific enzyme activity with G2-β-CD as substrate; B: The specific enzyme activity with water soluble starch as substrate.

3 讨论与结论

白酒大曲制作过程为自然接种的循环发酵过程^[28], 体系中存在丰富多样的乳酸菌资源, 结合本研究的测序结果分析可得, 大曲经过贮存工艺可增加体系内乳酸菌丰度, 贮存后大曲中存在更多的淀粉水解型乳酸菌, 是淀粉水解型乳酸菌的优质筛选源。而且, 白酒酿造体系与酸面团体系同属于食品发酵体系, 白酒酿造体系中已发现的乳酸菌大多为公认安全的益生菌, 为 generally recognized as safe (GRAS) 或 qualified presumption of safety (QPS) 列表中菌株, 从大曲中筛选得到的食品安全型乳酸菌可直接应用于酸面团发酵。

当前对于淀粉利用型乳酸菌的筛选方式大多采用样本直接稀释涂布法^[22,29], 耗时且缺乏靶向性。本研究建立的面糊传代培养方法可在保留大曲原位乳酸菌菌群的前提下, 高效靶向筛选得到高淀粉利用能力菌株。通过该方法除了筛选到多株具有高淀粉水解能力的植物乳杆菌外, 还得到了在淀粉基质上生长和产酸性能

优良的类食品乳杆菌 LBM12001, 为从复杂菌群中高效筛选淀粉水解型乳酸菌提供了新的思路和方法。

已有研究将类食品乳杆菌接种于酸面团体系, 发现实验菌株能够快速在面粉基质中实现定殖, 同时对面团的酸化起到积极作用^[25]。之前的多项研究采用 MRS 平板计数法表征接种乳酸菌的定殖能力, 但本研究的测序数据表明生面粉中存在着数量不可忽视的本底乳酸菌, MRS 平板计数法无法从外观上直接区分乳酸菌种属。本研究采用了扩增子测序方法对整个发酵体系的群落变化进行检测, 能够更准确地研究目标菌株在淀粉基质中的定殖能力, 结合本研究的测序结果分析可知, LBM12001 能够在淀粉基质中快速定殖。

当前对乳酸菌来源麦芽糖淀粉酶的研究尚浅, 仅 *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323^[7]、*Lactobacillus plantarum* ST-III^[9]、*Lactobacillus plantarum* WCFS1^[30] 和 *Lactobacillus plantarum* S21^[31] 这 4 株乳杆菌被报道存在麦芽糖淀粉酶基因, 而其他乳酸菌来源麦芽糖淀粉酶的表达、

分泌和酶学性质则鲜有系统研究。目前报道的乳酸菌菌株麦芽糖淀粉酶分泌能力较弱, 如 *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 难以在常规培养条件下产生可降解生淀粉的麦芽糖淀粉酶, 通过在大肠杆菌中异源表达才发现该种乳酸菌的潜在麦芽糖淀粉酶基因具有麦芽糖淀粉酶的特有酶学性质^[7], 这表明很多乳酸菌的麦芽糖淀粉酶编码基因的表达通常处于沉默状态。然而本研究获得的 LBM12001 可以分泌胞外型麦芽糖淀粉酶, 具有能够本源表达且胞外释放高酶活的优点, 在酸面团、馒头等需进行生面粉发酵食品的生产中具有重要的应用前景。典型小麦酸面团的 pH 值为 3.5–4.5^[32-33], 发酵前期 pH 值逐渐降至 3.8, 发酵后期 pH 值维持在 3.5–3.8^[34]。LBM12001 分泌的麦芽糖淀粉酶 LpaMA 最适 pH 值为 3.0–3.5, 能够在发酵后期低 pH 环境下持续表现高酶活。但因其最优 pH 过低, 如何在发酵前期和酸面团制作过程中发挥更大作用, 还需进一步探索最优酶表达量与胞外酶在酸面团中的水解能力。

综上所述, 本研究建立了大曲中淀粉水解型乳酸菌靶向筛选方法及菌株淀粉水解能力评价体系, 获得了一株具有胞外麦芽糖分泌能力的类食品乳杆菌 LBM12001, 该菌在酸面团等以谷物等淀粉基质作为发酵原料的领域具有应用前景。

REFERENCES

- [1] 刘同杰, 李云, 吴诗榕, 金乐天, 张国华, 杨浣漪, 何国庆. 传统酸面团中细菌与酵母菌的分离与鉴定[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 114-120, 148
Liu TJ, Li Y, Wu SR, Jin LT, Zhang GH, Yang HY, He GQ. Isolation and identification of bacteria and yeast from Chinese traditional sourdough[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 114-120, 148 (in Chinese)
- [2] Nionelli L, Curri N, Curiel JA, Di Cagno R, Pontonio E, Cavoski I, Gobetti M, Rizzello CG. Exploitation of Albanian wheat cultivars: characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation[J]. Food Microbiology, 2014, 44: 96-107
- [3] Corsetti A. Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications[M]. Handbook on Sourdough Biotechnology, 2013
- [4] Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor[J]. Cereal Chemistry, 2002, 79(1): 45-51
- [5] De Vuyst L, Kerrebroeck SV, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform[J]. Food Microbiology, 2014, 37: 11-29
- [6] Chavan RS, Chavan SR. Sourdough technology — a traditional way for wholesome foods: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011, 10(3): 169-182
- [7] Cho MH, Park SE, Lee MH, Ha SJ, Kim HY, Kim MJ, Lee SJ, Madsen SM, Park CS. Extracellular secretion of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 in *Lactococcus lactis* MG1363 and its application on the production of branched maltooligosaccharides[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(9): 1521-1526
- [8] Agati V, Guyot JP, Morlon-Guyot J, Talamond P, Hounhouigan DJ. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(3): 512-520
- [9] Jeon HY, Kim NR, Lee HW, Choi HJ, Choung WJ, Koo YS, Ko DS, Shim JH. Characterization of a novel maltose-forming α -amylase from *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(11): 2307-2314
- [10] Nakamura LK. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1981, 31(1): 56-63
- [11] Huang XN, Fan Y, Meng J, Sun SF, Wang XY, Chen JY, Han BZ. Laboratory-scale fermentation and multidimensional screening of lactic acid bacteria from *Daqu*[J]. Food Bioscience, 2021, 40: 100853
- [12] Wang XS, Du H, Zhang Y, Xu Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369-e02317
- [13] Zhang WX, Qiao ZW, Tang YQ, Hu C, Sun Q,

- Morimura S, Kida K. Analysis of the fungal community in *Zaopei* during the production of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(1): 21-27
- [14] Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2[M]. Williams & Wilkins, 1986
- [15] Wang SL, Wu Q, Han Y, Du RB, Wang XY, Nie Y, Du XW, Xu Y. Gradient internal standard method for absolute quantification of microbial amplicon sequencing data[J]. mSystems, 2021, 6(1): e00964-e00920
- [16] Nielsen S. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates[J]. Springer US, 2010
- [17] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR[J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1559-1582
- [18] Nair SU, Singhal RS, Kamat MY. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 856-859
- [19] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994
- Li JW. Experimental Principles and Methods of Biochemistry[M]. Beijing: Peking University Press, 1994 (in Chinese)
- [20] Kang J, Park KM, Choi KH, Park CS, Kim GE, Kim D, Cha J. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(3): 260-266
- [21] Sen S, Chakrabarty SL. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes: purification and characterization[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1986, 60(5): 419-423
- [22] Sanni AI, Morlon-Guyot J, Guyot JP. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(1/2): 53-62
- [23] Shibata K, Flores DM, Kobayashi G, Sonomoto K. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(1/2): 149-155
- [24] Cai Y, Okada H, Mori H, Benno Y, Nakase T. *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(Pt 4): 1451-1455
- [25] 李晨, 王松, 展海宁, 赵宏飞, 裴家伟, 张柏林. 类食品乳杆菌412对酸面团发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 99-104
- Li C, Wang S, Zhan HN, Zhao HF, Pei JW, Zhang BL. Roles of *Lactobacillus paralimentarius* 412 in sourdough fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 99-104 (in Chinese)
- [26] Yang HY, Zou HF, Qu C, Zhang LQ, Liu T, Wu H, Li YH. Dominant microorganisms during the spontaneous fermentation of Suan cai, a Chinese fermented vegetable[J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(5): 915-926
- [27] 胡金丽, 高庆超, 扎西巴藏, 曹效海, 王树林. 黑果枸杞酵素中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定和安全性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8207-8213
- Hu JL, Gao QC, Zha XBZ, Cao XH, Wang SL. Identification and safety evaluation of lactic acid bacteria and yeast in *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 8207-8213 (in Chinese)
- [28] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28
- [29] Lindgren S, Refai O. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1984, 57(2): 221-228
- [30] Bomrungnok W, Khunajakr, N, Wongwichan A, Dussadee T, Saiprajong R, Pinitglang S. Structure characterization and molecular docking studies of α -amylase family-13 glycosyl hydrolases from *Lactobacillus plantarum* complexed with maltoheptaose: a novel feature of α -amylase catalytic mechanism[J]. Thai Journal of Agricultural Science, 2011: 534-541
- [31] Apinun K, Saisamorn L, Thu-Ha N, Dietmar H, Chartchai K. Characterization of a maltose-forming alpha-amylase from an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21[J]. Journal of Molecular Catalysis, B. Enzymatic, 2015, 120: 1-8
- [32] Brümmer J, Lorenz K. European developments in wheat sourdoughs[J]. Cereal Foods World, 1991, 36: 310-314
- [33] Manini F, Casiraghi MC, Poutanen K, Brasca M, Erba D, Plumed-Ferrer C. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 275-283
- [34] 程晓燕. 酸面团乳酸菌优势菌群及发酵馒头品质与风味特性研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- Cheng XY. Research of dominant LAB in sourdough and its fermentation on the quality and flavor characteristics of steamed bread[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)