

引用格式:

杨嘉琪, 赵玲艳, 邓雪盈, 邓放明. 产黑芥子酶乳酸菌的筛选与鉴定及产酶条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 43–53.

YANG J Q, ZHAO L Y, DENG X Y, DENG F M. Screening and identification of myrosinase-producing lactic acid bacteria and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(6): 43–53.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



产黑芥子酶乳酸菌的筛选与鉴定及产酶条件的优化

杨嘉琪¹, 赵玲艳¹, 邓雪盈², 邓放明^{1*}

(1.湖南农业大学食品科学与技术学院, 湖南长沙 410128; 2.湖南省产商品质量检验研究院, 湖南长沙 410007)

摘要: 为了筛选产黑芥子酶的乳酸菌, 利用氯化钯检测法测定黑芥子酶活力, 从39株植物源乳酸菌中筛选产黑芥子酶菌株, 通过形态特性、生理生化试验结合16S rDNA序列分析进行菌株鉴定, 采用单因素试验和响应面法优化了菌株产酶条件。结果显示: 3株编号分别为B244、161和602的乳酸菌能有效降解生长环境中硫代葡萄糖苷, 经鉴定B244为戊糖片球菌, 161和602菌株均为发酵粘液乳杆菌; 戊糖片球菌(B244)具有较强的产黑芥子酶能力, 在最优产酶条件(在LB培养基中添加4.2 mmol/L硫代葡萄糖苷, 调整蛋白胨质量浓度至14.3 g/L, 初始pH为6.9, 于40 °C培养16 h)下黑芥子酶活力达117.2 U/L, 较优化前(76.65 U/L)提升52.9%。

关键词: 乳酸菌; 黑芥子酶; 硫代葡萄糖苷; 产酶条件优化; 响应面法

中图分类号: TS205

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2024)06–0043–11

Screening and identification of myrosinase-producing lactic acid bacteria and optimization of enzyme production conditions

YANG Jiaqi¹, ZHAO Lingyan¹, DENG Xueming², DENG Fangming^{1*}

(1.School of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Commodity Quality Inspection Institute, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: In order to screen myrosinase-producing lactic acid bacteria, palladium chloride assay was used to determine the myrosinase enzyme activity, and the myrosinase-producing strains were screened from 39 strains of plant-derived lactic acid bacteria. The screened strains were identified by morphological characteristics, physiological and biochemical experiments in combination with 16S rDNA sequence analysis, and the enzyme-producing conditions of the strains were optimized by using the single-factor experiment and response surface method. The results showed that three strains of lactic acid bacteria(named as B244, 161 and 602, respectively) could effectively degrade glucosinolates in the growth environment. Strain B244 was identified as *Pediococcus pentosaceus*, and 161 and 602 were both identified as *Limosilactobacillus fermentum*. *Pediococcus pentosaceus* had a strong ability to produce myrosinase, and the optimal culture conditions for the myrosinase production were as follows: 4.2 mmol/L glucosinolates was added to LB medium, the mass concentration of peptones was adjusted to 14.3 g/L with the initial pH of 6.9 and incubation time of 16 h at 40 °C. The myrosinase activity of B244 under the optimized condition reached 117.2 U/L, which was 52.9% higher than that(76.65 U/L) before optimization.

Keywords: lactic acid bacteria; myrosinase; glucosinolates; optimization of enzyme producing; response surface method

收稿日期: 2024–03–06

修回日期: 2024–04–16

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30315); 国家现代农业特色蔬菜产业技术体系建设专项(CARS–24–E–02); 长沙市2023年知识产权公共项目(长知发[2023]33号–3–3)

作者简介: 杨嘉琪(1999—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事食品科学研究, 1764517753@qq.com; *通信作者, 邓放明, 博士, 教授, 主要从事食品科学研究, fmdenghnan@sina.com

硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GSL, 简称硫苷)是十字花科植物中重要的次生代谢产物。硫代葡萄糖苷性质比较稳定,难以被人体直接吸收利用,但硫代葡萄糖苷可以被酶解或微生物转化^[1],水解产物主要包括异硫氰酸盐、硫氰酸酯、腈类物质等,其中异硫氰酸酯类物质具有重要的生物活性,例如抗氧化、抗癌、缓解肥胖等^[2]。硫代葡萄糖苷及其降解产物也是发酵十字花科蔬菜香气的重要来源。

黑芥子酶是一种硫代葡萄糖苷水解酶,能有效降解硫代葡萄糖苷类物质^[3]。大多数十字花科植物中含有黑芥子酶,但该酶在蔬菜加工过程中容易变性失活,导致蔬菜中硫苷类物质不能被有效降解利用。以十字花科植物为食的昆虫体内也存在黑芥子酶,但其活性较低,并且难以提取^[4]。植物来源的黑芥子酶活力较高,但存在提取难度大、流程复杂等缺点;微生物分解硫苷具有反应条件易于控制以及成本低等优点^[5],因此,产黑芥子酶微生物的筛选及其应用受到人们的重视。人们在人体肠道菌群与土壤中已经发现多种微生物具有降解硫代葡萄糖苷的能力^[6-8],WATANABE等^[9]从日本的腌制萝卜中也分离了一株香肠伴生乳杆菌,具有降解硫代葡萄糖苷的能力。ALBASER等^[10]筛选出了产黑芥子酶的土壤细菌柠檬酸杆菌 Wye1,分离纯化出黑芥子酶,并研究了该酶的酶学性质。CEBECI等^[11]将细菌来源的黑芥子酶在大肠埃希菌中异源表达,用于酶解硫代葡萄糖苷。李德修等^[12]综合分析了国内利用微生物转化硫代葡萄糖苷的研究现状,总结归纳了定向生成萝卜硫素的研究进展。黄河鸥等^[13]将不同来源黑芥子酶分别在毕赤酵母和大肠埃希菌中克隆表达,利用重组酶催化生成萝卜硫素,发现其对硫代葡萄糖苷的转化率较高。但从发酵十字花科蔬菜中筛选产黑芥子酶乳酸菌的相关研究较少。

本文作者以发酵十字花科蔬菜为分离源,筛选产黑芥子酶的乳酸菌菌株,并通过单因素试验与响应面法优化其产酶条件,以期提高菌株产黑芥子酶能力,为丰富产黑芥子酶微生物资源及其应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵蔬菜样品采自湖南岳阳、浏阳、望城的发酵芥菜及贵州凯里的发酵萝卜叶。芥菜种子由湖南省华容县芥菜种植基地提供,作为制备硫代葡萄糖苷提取物的原料。

MRS 液体培养基、LB 培养基、琼脂粉、革兰染色试剂盒购自广东环凯生物科技有限公司;正己烷、甲醇(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;黑芥子硫苷酸钾、PdCl₂(分析纯)购自上海麦克生化科技股份有限公司;DNA 提取试剂盒(TSINGKE)购自北京擎科生物科技有限公司;2.5%戊二醛电镜固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 仪器

本研究所用仪器主要包括 PHS-2F pH 计、ULTS1368 超低温冰箱、全套精密移液枪、SQ810C 自动高压蒸汽灭菌器、YP-B10002 电子天平、HCB-1300V 洁净工作台、CX31 光学显微镜、Heraeus MultifugeX1R 高速冷冻离心机、赛默飞涡旋振荡仪、SPL250 生化培养箱、TECAN spark 多功能酶标仪、KQ-250DE 型数控超声波清洗器、NovaNanoSEM450 扫描电子显微镜和 DNA Engine 2 Opticon 实时荧光定量聚合酶链式反应仪。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的富集与分离

取约 1 g 发酵十字花科蔬菜放入 10 mL 生理盐水中,于 37 °C 充分振荡,之后吸取 1 mL 液体置于 MRS 培养基中,37 °C 培养 24 h,将培养后的样品按浓度梯度稀释后涂布在添加有氯化钙的 MRS 固体培养基上,于 37 °C 培养箱中培养,观察是否产生沉淀圈。挑取形态学特征不同的单菌落进行多次培养划线,直至划线后菌落形态一致;挑取单菌落接种至液体 MRS 培养基中,在 37 °C 培养 18 h 后与 50% 甘油以 1:1 体积比混合,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.3.2 产黑芥子酶乳酸菌菌株的筛选

芥菜种子硫苷提取物的制备:将芥菜种子用粉碎机粉碎,过孔径为 210 μm 的筛;取 40 g 粉末,加入 100 mL 正己烷,超声浸提 30 min,除去

油脂；过滤，滤渣再次用正己烷超声浸提，过滤，使滤渣干燥；在干燥滤渣中加入 100 mL 甲醇，在 60 °C 水温条件下，超声振荡混匀 30 min，采用真空抽滤法得到硫代葡萄糖苷甲醇提取溶液。重复提取 3 次后合并硫代葡萄糖苷甲醇提取溶液，采用旋转蒸发仪将溶液浓缩至膏状，用蒸馏水溶解硫代葡萄糖苷甲醇提取物并定容至 30 mL。采用氯化钼分光光度计法测定硫苷类物质含量^[4]，采用 DNS 法测定葡萄糖含量^[15]。

将分离出的菌株活化 2 次，然后接种在含硫苷提取物 5 mmol/L 的 LB 改良培养基中，于 37 °C 培养 24 h，之后在 8 000g、4 °C 条件下离心 10 min 得到上清液，使用氯化钼测定法测定培养基中硫苷类物质的残留量，通过菌株对培养基中硫苷类物质的利用率来筛选得到产黑芥子酶的菌株。

1.3.3 黑芥子酶活力测定

将产黑芥子酶菌株接种于 MRS 液体培养基中培养 18 h，取 30 mL 菌液冷冻离心(8 000g, 4 °C, 10 min)得到菌泥，用无菌生理盐水洗涤 2 遍，冷冻离心，然后将菌泥悬浮于 5 mL 含有 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液(KCl 2.7 mmol/L, NaCl 140 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, KH₂PO₄ 1.8 mmol/L, pH 7.4)中。菌悬液在冰浴条件下用超声波细胞粉碎机破碎 12 min (功率 150 W, 超声 3 s, 间停 5 s)，破碎后离心得到上清液。取 200 μL 上清液与 200 μL 10 mg/mL 黑芥子硫苷酸钾混合，于 37 °C 反应 20 min，用氯化钼法测定 540 nm 处的溶液吸光度，测定各菌株产黑芥子酶的活性。

本研究中酶活力单位定义如下：在 37 °C 下，每 1 min 催化生成 1 nmol 产物所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.4 形态学观察与生理生化试验鉴定

将分离纯化获得的菌株接种在 MRS 平板上培养 1~2 d，观察其单个菌落的形状、颜色、光滑度、透明度及边缘整齐度。革兰染色后观察菌体形态。各项生理生化试验参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》及《伯杰细菌鉴定手册》。取对数生长期的乳酸菌，用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 2 遍后，用 2.5%戊二醛电镜固定液固定，真空冷冻

干燥后得到菌体粉末，通过扫描电镜观察细菌菌体特征。

1.3.5 16S rDNA 序列分析

通过 16S rDNA 对筛选得到的产黑芥子酶的菌株进行分子生物学鉴定，用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA，用通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rDNA 序列，之后将测序得到的序列通过 BLAST 进行序列比对分析；对于同源性较高的参考菌株的 16S rDNA 序列，采用 MEGA 构建系统发育树。

1.3.6 菌株生长曲线及黑芥子酶活力测定

活化菌株按 2% 体积比的接种量接种到含 5 mmol/L 硫苷提取物的 LB 培养基中，于 37 °C 条件下培养 32 h，每个菌株设置 3 个重复，每 2 h 用酶标仪测定培养液在 600 nm 处的吸光度(OD)值。吸取 10 mL 培养液，粗提乳酸菌胞内酶液，并测定黑芥子酶活力，绘制酶活力曲线。

1.3.7 乳酸菌产酶条件优化单因素试验

以 LB 培养基为基础，菌株接种量为 2%，培养时间为 24 h，分别测定不同浓度 (2、3、4、5、6 mmol/L) 硫苷提取物、初始 pH(4、5、6、7、8)、不同蛋白胨质量浓度(8、12、16、20、24 g/L)、不同温度(25、31、37、43、49 °C)下细胞破碎上清液中黑芥子酶的活力。

1.3.8 响应面优化试验

在单因素试验基础上，以产酶能力较强的 B244 菌株为试验对象，分别选取培养基中蛋白胨质量浓度(因素 A)、培养温度(因素 B)、硫苷提取物浓度(因素 C)、初始 pH(因素 D)4 个试验因素，培养 16 h 后，以黑芥子酶活力为评价指标，通过响应面优化试验优化菌株产黑芥子酶的培养条件，响应面优化试验设计因素与水平见表 1。

表 1 产酶条件优化响应面优化试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiments for enzyme production conditions optimization

| 因素 | 水平 | | |
|---------------------------|----|----|----|
| | -1 | 0 | 1 |
| A/(g·L ⁻¹) | 12 | 16 | 20 |
| B/°C | 37 | 40 | 43 |
| C/(mmol·L ⁻¹) | 4 | 5 | 6 |
| D | 6 | 7 | 8 |

1.3.9 试验数据处理

利用 Design-Expert V13. 软件进行 Box-Behnken 试验设计与数据分析。用 Origin 8.0 软件绘制数据图。

2 结果与分析

2.1 产黑芥子酶乳酸菌菌株的分离与筛选结果

经测定, 芥菜种子硫代葡萄糖苷提取物中 GSL 总浓度为 119.6 mmol/L。以发酵十字花科蔬菜为分离源, 通过稀释平板初筛, 之后在添加有

氯化钙培养基上培养, 获得产生溶钙圈的菌株 39 株。将初筛获得的菌株接种到添加硫苷提取物(浓度为 5 mmol/L)的 LB 改良培养基中, 于 37 °C 培养 24 h, 使用氯化钡测定法测定培养基中硫苷类物质的残留量, 并计算菌株对硫苷物质的降解率, 结果如表 2 所示。结果显示, 不同菌株对硫代葡萄糖苷的降解率有较大差异, 其中 B244、161 和 602 菌株对硫苷提取物的降解率较高, 分别达到了 56.75%、78.09%、88.70%。因此, 挑选这 3 株乳酸菌进行后续试验。

表 2 乳酸菌菌株对硫代葡萄糖苷的降解率

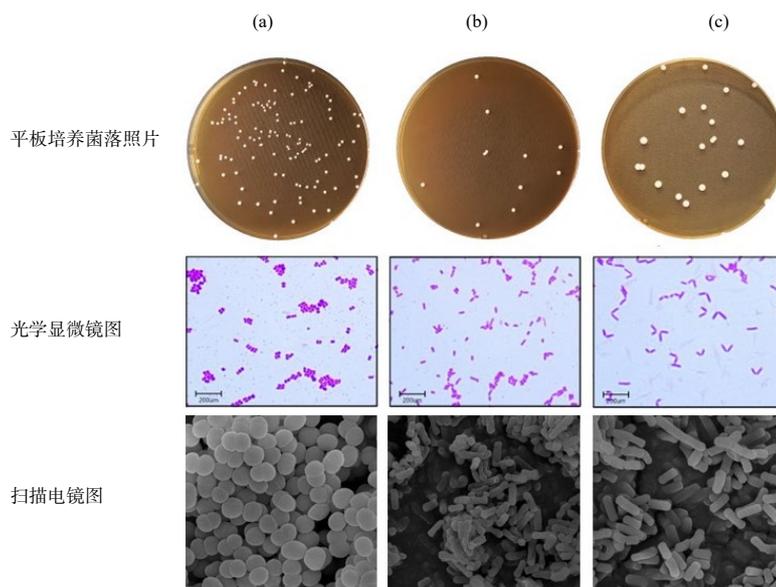
Table 2 Degradation rates of glucosinolates by screened strains of lactic acid bacteria

| 菌株编号 | GSL 降解率/% | 菌株编号 | GSL 降解率/% | 菌株编号 | GSL 降解率/% |
|------|--------------|------|--------------|-------|---------------|
| 202J | 0.62±0.003 7 | 210 | 2.65±0.027 4 | 169 | 5.01±0.100 3 |
| 255 | 0.78±0.002 0 | 195 | 2.92±0.021 4 | 261 | 8.14±0.038 2 |
| 159 | 1.08±0.004 4 | 198 | 3.26±0.023 8 | 251 | 11.51±0.003 5 |
| 340 | 1.32±0.008 7 | 430 | 4.14±0.004 8 | T244 | 42.67±0.005 7 |
| 207 | 2.35±0.001 9 | H3D | 3.23±0.033 3 | 661 | 49.64±0.246 8 |
| 375 | 2.27±0.010 5 | 331 | 3.62±0.023 7 | 684 | 56.13±0.069 3 |
| 343 | 2.05±0.023 7 | T216 | 3.72±0.024 6 | T198 | 51.69±0.350 7 |
| 378 | 2.94±0.002 1 | 356 | 4.59±0.000 3 | 球 198 | 61.46±0.108 3 |
| 199 | 2.11±0.028 0 | 202 | 4.66±0.006 8 | 206 | 56.01±0.440 2 |
| 348 | 2.66±0.017 7 | 156 | 3.87±0.048 0 | 602 | 88.70±0.558 7 |
| 166 | 2.51±0.025 7 | B198 | 5.48±0.000 2 | 63 | 50.75±2.210 2 |
| 257 | 1.94±0.042 6 | 658 | 3.96±0.072 4 | 161 | 78.09±0.288 3 |
| 163 | 3.04±0.009 8 | 268 | 6.49±0.016 9 | B244 | 56.75±0.424 8 |

2.2 产黑芥子酶乳酸菌菌落形态学观察结果

通过平板涂布法培养单一菌株观察菌落形

态, 如图 1 所示。由图 1 可见 B244 菌株菌落呈乳白色, 圆形, 菌落直径较小, 湿润黏稠; 161 菌株



(a) B244 菌株; (b) 161 菌株; (c) 602 菌株

图 1 产黑芥子酶乳酸菌菌落形态及镜检结果

Fig. 1 Colony morphology and microscopic examination results of myrosinase-producing lactic acid bacteria

菌落呈乳白色，圆形，菌落直径较 B244 菌株菌落的大，但比 602 菌株菌落的小；602 菌株菌落呈淡黄色，圆形，菌落中间凸起，菌落直径较大。

分离纯化后的菌株在光学显微镜(1 000 倍)和扫描电镜(4 000 倍)的形态如图 1 所示，B244 菌株为球状菌株，成对排列，不形成链状；161 菌株为短杆菌株，多呈不规则排列；602 菌株为长状杆菌，多为成对排列。

2.3 产黑芥子酶乳酸菌菌株生理生化试验与 16S rDNA 鉴定结果

参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》，依据糖发酵试验产酸时的变色情况以及菌株的表型特征，对菌株进行鉴定，结果如表 3 所示。结果显示，B244、161 和 602 这 3 株菌的葡萄糖产气、产硫化氢、明胶水解、吲哚试验结果均为阴性。3 株菌对纤维二糖、果糖、半乳糖和蜜二糖的发酵结果为阳性，表明三者均能发酵利用上述碳源。根据其菌落形态特征、革兰染色结果及生理生化鉴定结果并参考《细菌伯杰鉴定手册》，初步判断 B244、161 和 602 这 3 株菌为乳酸菌。

表 3 菌株生理生化试验结果

Table 3 Physiological and biochemical experimental results of the strains

| 试验指标 | B244 | 161 | 602 |
|---------|------|-----|-----|
| 葡萄糖酸盐产酸 | + | + | + |
| 葡萄糖产气 | - | - | - |
| 产硫化氢 | - | - | - |
| 明胶水解 | - | - | - |
| 纤维二糖 | + | + | + |
| 吲哚 | - | - | - |
| 果糖 | + | + | + |
| 半乳糖 | + | + | + |
| 鼠李糖 | - | + | + |
| 乳糖 | - | + | + |
| 蔗糖 | + | - | + |
| 山梨醇 | + | - | - |
| 麦芽糖 | + | - | + |
| 甘露糖 | + | - | + |
| 甘露醇 | + | - | - |
| 蜜二糖 | + | + | + |
| 七叶苷 | + | + | - |
| 阿拉伯糖 | - | + | + |

注：“+”表示阳性结果；“-”表示阴性结果。

经过 16S rDNA 序列扩增后，将目标片段的测序结果在 NCBI 的 BLAST 中进行核苷酸同源性对比，结果表明 B244 菌株与戊糖片球菌同源性达到 99%；161 菌株与 602 菌株与发酵黏液乳杆菌同源性高达 99%。运用 MEGA 分别构建 B244、161 和 602 菌株的系统发育树，结果如图 2 所示。

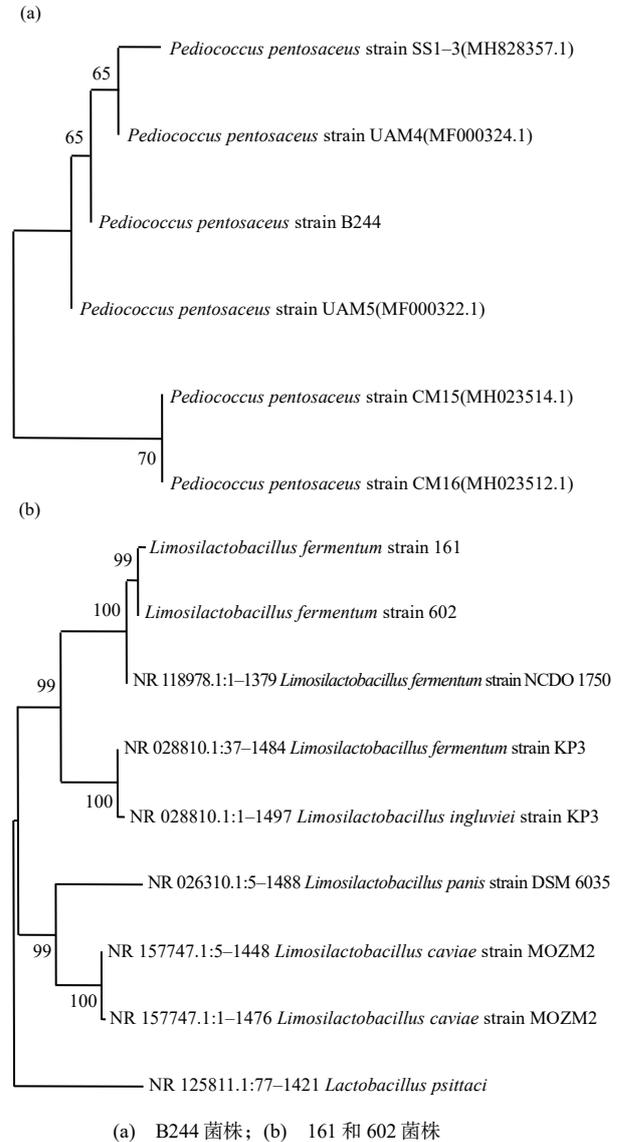


图2 B244、161与602菌株的系统发育树

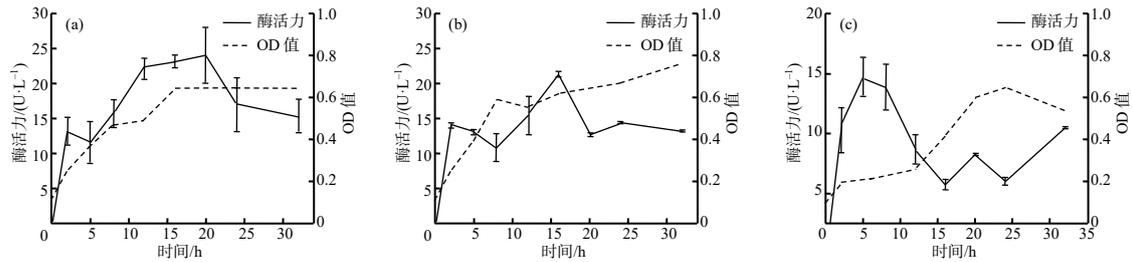
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain B244, 161 and 602

2.4 产黑芥子酶乳酸菌菌株生长曲线和酶活力曲线

将 B244、161 与 602 菌株分别接种到含 5 mmol/L 硫苷提取物的 LB 培养基中，于 37 °C 培养 32 h，其生长曲线和酶活力曲线如图 3 所示。

由图 3 可知，B244 与 161 菌株接种到培养基后生长速度快，无迟缓期。0~8 h 为 B244 菌株的对数生长期，然后进入稳定期，在 32 h 的培养过

程中 B244 未进入衰亡期。161 菌株的对数生长期为[0, 16] h, (16, 24] h 为稳定期, 之后进入衰亡期。602 菌株在接入培养基后[0, 12] h 为生长迟缓期, (12, 20] h 为对数生长期, (20, 24] h 为稳定期, 然后进入衰亡期。602 菌株在发酵后期能观察到菌体的裂解, 表明 602 菌株不能长期以硫代葡萄糖苷这类物质作为碳源进行生长繁殖, 这与文献[7]中的试验结果一致。



(a) 161 菌株; (b) B244 菌株; (c) 602 菌株

图3 菌株生长曲线与酶活力曲线

Fig.3 Growth and enzyme activity curves of strains

2.5 硫代葡萄糖苷对菌株产黑芥子酶活力的影响

KOZŁOWSKI 等^[16]在研究菜籽粕的营养时指出, 当食物中具有较高含量的硫代葡萄糖苷类物质会对动物甲状腺等器官有负面影响或抑制动物食欲。为探索硫代葡萄糖苷对菌株产黑芥子酶活力的影响, 将 B244、161 与 602 菌株分别接种到添加不同浓度硫苷提取物的 LB 培养基中, 于 37 °C 培养 24 h, 硫代葡萄糖苷浓度对 3 株菌产黑芥子酶活力的影响如图 4 所示。由图 4 可见: 在不同硫苷提取物浓度条件下培养时, B244 菌株产黑芥子酶活力

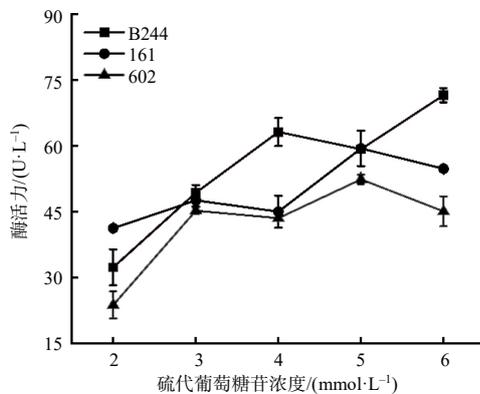


图4 硫代葡萄糖苷浓度对菌株产黑芥子酶活力的影响

Fig.4 Effect of glucosinolates concentration on the myrosinase activity of strains

由图 3 还可以发现, 3 株菌在培养过程中其黑芥子酶活力均呈现先上升后下降的趋势。161 菌株在培养 20 h 时黑芥子酶活力达到最高, 为 24.11 U/L, 20 h 后酶活力逐渐下降。B244 菌株在培养 16 h 时黑芥子酶活力达到最高, 为 21.40 U/L, 随后酶活力逐渐降低。161 与 B244 菌株都在菌密度较高时出现较高酶活力。

整体上随着硫代葡萄糖苷浓度升高而升高, 在硫苷提取物浓度为 4、6 mmol/L 时, 其酶活力均明显高于相同条件下 161 菌株与 602 菌株的酶活力。161 菌株与 602 菌株在硫苷提取物浓度小于等于 5 mmol/L 时其酶活力整体随着硫代葡萄糖苷浓度升高而升高, 在硫代葡萄糖苷浓度为 5 mmol/L 时二者酶活力达到最高, 随后酶活力降低。

2.6 初始pH对菌株产黑芥子酶活力的影响

使用柠檬酸-柠檬酸钠对培养基初始 pH 进行调节, 试验过程中发现, 161 菌株在添加柠檬酸盐缓冲液的培养基中培养时, 菌体发生裂解死亡。解寒等^[17-18]试验发现乳酸菌会受到环境中柠檬酸的胁迫作用, 导致乳酸菌不能正常生长。据此, 推测 161 菌株缺少柠檬酸转运酶等关键酶, 不适宜在含柠檬酸盐缓冲溶液的培养基中生长。

B244 菌株在初始 pH 为 4~7 时、602 菌株在初始 pH 为 4~6 时其酶活力整体上均随 pH 的增大而上升(图 5)。B244 在初始 pH 为 7 时酶活力最高, 为 76.65 U/L。602 菌株在 pH 为 6 时酶活力最高, 为 75.78 U/L。

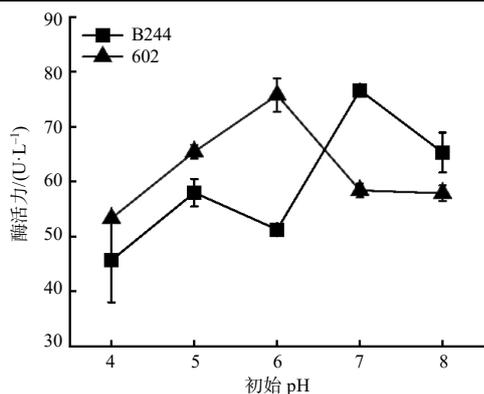


图5 初始pH对菌株产黑芥子酶活力的影响

Fig.5 Effect of the initial pH on the myrosinase activity of strains

2.7 培养温度对菌株产黑芥子酶活力的影响

培养温度对 B244、161、602 这 3 株乳酸菌产黑芥子酶活力的影响如图 6 所示。由图 6 可见：当培养温度为 25~43 °C 时 3 株菌的黑芥子酶活力整体上均呈上升趋势；当温度高于 43 °C 时黑芥子酶活力下降。培养温度对 B244 产生的黑芥子酶活力影响较大，当温度为 43 °C 时黑芥子酶活力最高，达到 61.34 U/L；培养温度对 161 菌株的影响最小，不同温度下的黑芥子酶活力无显著差异。张静雯^[19]研究发现当乳酸菌培养温度较高时，乳酸菌能在更短时间内进入生长对数期。在短时培养时，使用较高培养温度能提高培养的效率^[20]。

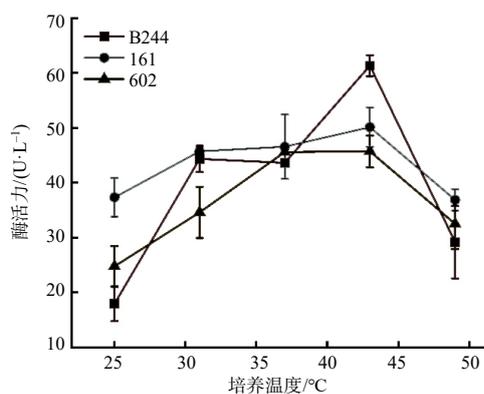


图6 培养温度对菌株产黑芥子酶活力的影响

Fig.6 Effect of incubation temperature on the myrosinase activity of strains

2.8 蛋白胨质量浓度对菌株产黑芥子酶活力的影响

氮源作为营养物质广泛参与微生物的生长代谢与次生代谢产物的合成，培养基中蛋白胨的质量浓度对 B244、161、602 这 3 株菌产黑芥子酶活力的影响如图 7 所示。由图 7 可见：当培养基中蛋白胨的质量浓度为 8~16 g/L 时，B244 菌株产黑芥子酶活力随着蛋白胨质量浓度增大而升高；当培养基中蛋白胨的质量浓度大于 16 g/L 时，其黑芥子酶活力随着蛋白胨质量浓度增大而降低。当培养基中蛋白胨的质量浓度为 8~20 g/L 时，161 菌株和 602 菌株产黑芥子酶活力均随着蛋白胨质量浓度增大而升高；当培养基中蛋白胨的质量浓度大于 20 g/L 时，二者产黑芥子酶活力随着蛋白胨质量浓度增大而降低。B244 菌株黑芥子酶活力受蛋白胨质量浓度影响最显著，在蛋白胨质量浓度为 16 g/L 时 B244 菌株的酶活力达到最大，为 53.52 U/L。

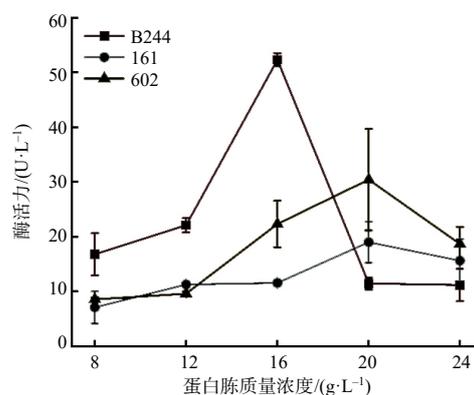


图7 蛋白胨质量浓度对菌株产黑芥子酶活力的影响

Fig.7 Effect of peptone mass concentrations on the myrosinase activity of strains

2.9 B244菌株产酶条件优化结果

用 Design-Expert V13.软件设计 4 因素 3 水平的响应面试验，具体设计方案及试验结果见表 4，方差分析结果见表 5。

表4 响应面试验设计方案及结果

| 试验编号 | A/(g·L ⁻¹) | B/°C | C/(mmol·L ⁻¹) | D | 酶活力/(U·L ⁻¹) | 试验编号 | A/(g·L ⁻¹) | B/°C | C/(mmol·L ⁻¹) | D | 酶活力/(U·L ⁻¹) |
|------|------------------------|------|---------------------------|---|--------------------------|------|------------------------|------|---------------------------|---|--------------------------|
| 1 | 16 | 37 | 5 | 8 | 65.126 | 16 | 12 | 37 | 5 | 7 | 102.638 |
| 2 | 20 | 40 | 6 | 7 | 113.524 | 17 | 20 | 40 | 5 | 6 | 67.982 |
| 3 | 16 | 40 | 5 | 7 | 127.485 | 18 | 16 | 37 | 6 | 7 | 89.828 |
| 4 | 12 | 40 | 5 | 6 | 66.772 | 19 | 20 | 43 | 5 | 7 | 115.511 |
| 5 | 16 | 40 | 5 | 7 | 126.151 | 20 | 16 | 40 | 5 | 7 | 132.661 |
| 6 | 12 | 40 | 6 | 7 | 93.146 | 21 | 16 | 40 | 6 | 8 | 90.025 |
| 7 | 12 | 43 | 5 | 7 | 105.248 | 22 | 12 | 40 | 4 | 7 | 112.182 |
| 8 | 16 | 43 | 5 | 8 | 93.310 | 23 | 16 | 40 | 5 | 7 | 126.972 |
| 9 | 12 | 40 | 5 | 8 | 76.601 | 24 | 16 | 40 | 4 | 8 | 87.967 |
| 10 | 20 | 37 | 5 | 7 | 105.525 | 25 | 16 | 37 | 5 | 6 | 86.297 |
| 11 | 16 | 43 | 5 | 6 | 71.345 | 26 | 16 | 40 | 4 | 6 | 77.660 |
| 12 | 16 | 43 | 4 | 7 | 112.359 | 27 | 16 | 37 | 4 | 7 | 110.112 |
| 13 | 16 | 43 | 6 | 7 | 107.497 | 28 | 20 | 40 | 5 | 8 | 81.665 |
| 14 | 16 | 40 | 5 | 7 | 128.890 | 29 | 20 | 40 | 4 | 7 | 91.648 |
| 15 | 16 | 40 | 6 | 6 | 64.541 | | | | | | |

表5 响应面回归模型方差分析结果

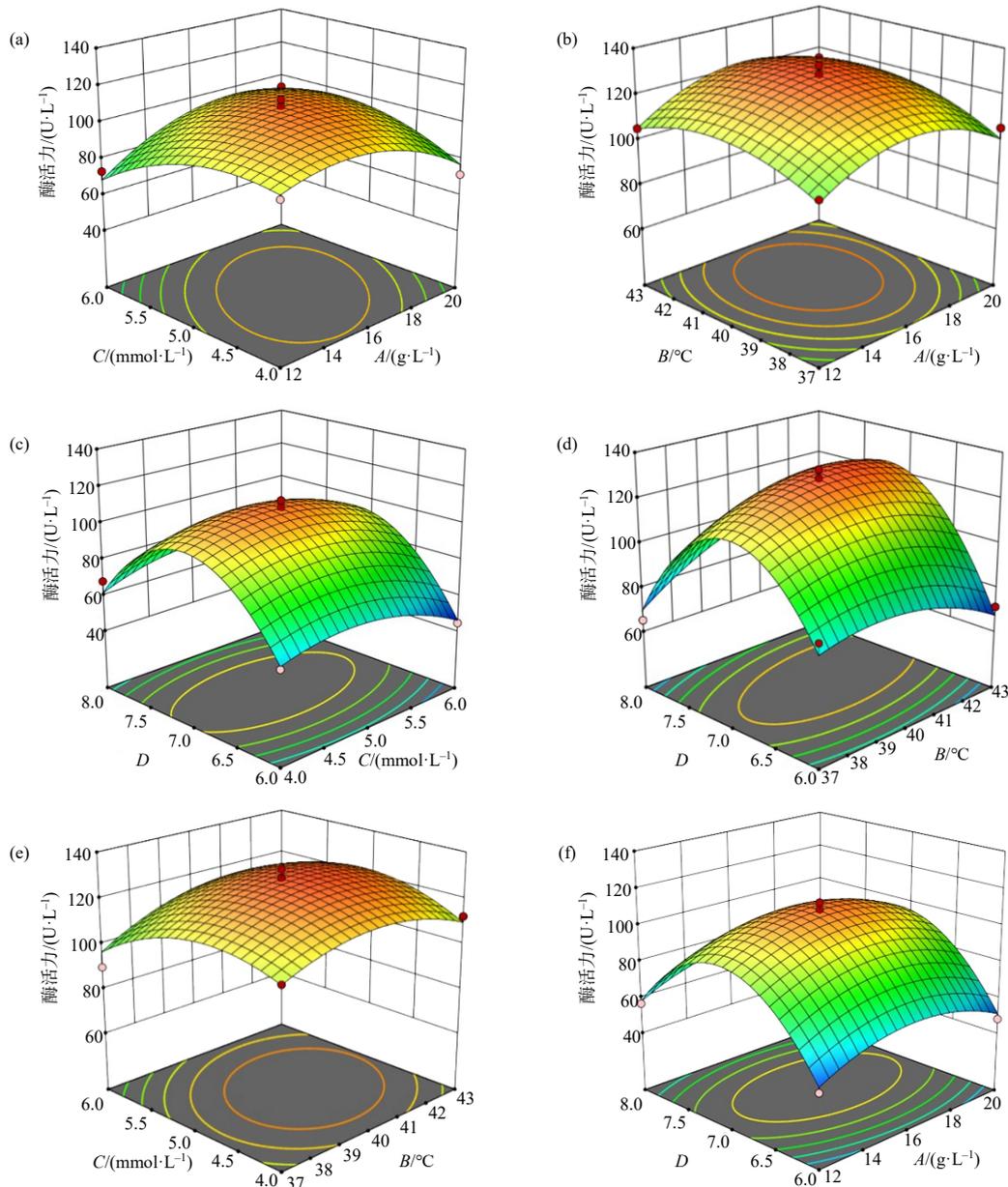
| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
|----------------|-----------|-----|----------|--------|--------|
| 模型 | 11 957.97 | 14 | 854.14 | 30.18 | <0.001 |
| A | 30.94 | 1 | 30.94 | 1.09 | 0.314 |
| B | 174.39 | 1 | 174.39 | 6.16 | 0.026 |
| C | 92.78 | 1 | 92.78 | 3.28 | 0.092 |
| D | 300.99 | 1 | 300.99 | 10.64 | 0.006 |
| AB | 13.61 | 1 | 13.61 | 0.48 | 0.499 |
| AC | 418.44 | 1 | 418.44 | 14.79 | 0.002 |
| AD | 3.72 | 1 | 3.72 | 0.13 | 0.723 |
| BC | 59.47 | 1 | 59.47 | 2.10 | 0.170 |
| BD | 465.18 | 1 | 465.18 | 16.44 | 0.001 |
| CD | 57.58 | 1 | 57.58 | 2.03 | 0.176 |
| A ² | 1 243.99 | 1 | 1 243.99 | 43.96 | <0.001 |
| B ² | 623.50 | 1 | 623.50 | 22.03 | <0.001 |
| C ² | 871.72 | 1 | 871.72 | 30.80 | <0.001 |
| D ² | 9 988.88 | 1 | 9 988.88 | 352.98 | <0.001 |
| 残差项 | 396.18 | 14 | 28.30 | | |
| 失拟项 | 369.86 | 10 | 36.99 | 5.62 | 0.055 |
| 误差项 | 26.32 | 4 | 6.58 | | |
| 总离差 | 12 354.16 | | | | |

经分析,各试验因素对响应值 y (即黑芥子酶活力)的综合影响的多元二次回归方程为

$$y=128.43+1.61A+3.81B-2.78C+5.01D+1.84A\times B+10.23A\times C+0.96A\times D+3.86B\times C+10.78B\times D+3.79C\times D-13.85A^2-9.80B^2-11.59C^2-39.24D^2$$

由表5可知,失拟项 P 值为 0.055,大于 0.05,说明差异显著;模型的 F 值为 30.18,回归方程的决定系数 $R^2=0.9679$,表明其拟合度较好;校正系数 $R^2_{Adj}=0.9359$,表明本研究选择的因素与模型变化具有高相关性,模型预测值具有高度可靠性,可以使用该模型来预测。

根据获得的二次回归方程及试验方差分析结果,借助 Design-Expert V13 软件绘制不同因素之间的响应面分析图(图8),分析各试验因素之间的交互作用对 B244 菌株产黑芥子酶活力的影响。



(a) 蛋白胨质量浓度与硫代葡萄糖苷浓度交互作用；(b) 蛋白胨质量浓度与培养温度交互作用；(c) 硫代葡萄糖苷浓度与初始 pH 交互作用；(d) 初始 pH 与培养温度交互作用；(e) 硫代葡萄糖苷浓度与培养温度交互作用；(f) 初始 pH 与蛋白胨质量浓度交互作用

图8 各因素交互作用对B244菌株产黑芥子酶活力的影响

Fig.8 Influence of the interactive effects of each factor on the myrosinase activity of the strain B244

从图 8 可知, 蛋白胨质量浓度、培养温度、硫代葡萄糖苷浓度、初始 pH 交互作用的响应曲面均是开口向下的凸面, 说明响应值(黑芥子酶活力)在各因素下存在最优解。综合方差分析结果与响应曲面图可知, 蛋白胨质量浓度与硫代葡萄糖苷浓度互作的 P 值为 0.001 8, 小于 0.05, 说明二者具有显著交互作用。同理, 温度与初始 pH 互作的 P 值为 0.001 2, 小于 0.05, 说明交互作用显著。蛋白胨质量浓度与培养温度、硫代葡萄糖苷浓度与培养温度交互作用不显著。初始 pH 与硫代葡萄糖

糖苷浓度、蛋白胨质量浓度之间的交互等高线图虽均呈椭圆形, 结合方差分析结果可知, 其交互作用不显著。综合分析可知, 4 个试验因素对 B244 菌株产黑芥子酶活力的影响程度按从大到小排序依次为初始 pH、蛋白胨质量浓度、硫代葡萄糖苷浓度、培养温度。

通过软件预测得到 B244 菌株即戊糖片球菌发酵产黑芥子酶的优化培养条件为: 在 LB 培养基中添加 4.2 mmol/L 硫代葡萄糖苷浓度, 调整蛋白胨质量浓度至 14.3 g/L, 初始 pH 为 6.9, 40 °C 培养

16 h, 该条件下黑芥子酶活力预测值为 108.7 U/L。根据该优化条件进行 3 组平行试验, 得到黑芥子酶活力平均值为 117.2 U/L。由此可见, 黑芥子酶活力实际值与预测值有良好的拟合性。

3 结论与讨论

硫代葡萄糖苷是十字花科植物中广泛存在的次生代谢产物, 其水解产物中的异硫氰酸酯类物质具有重要的生物活性。来源于动植物的黑芥子酶都存在明显的应用弊端, 而微生物生长快, 易于工业化生产制备, 相对于制备动植物源黑芥子酶, 具有较明显的优势。本研究从发酵十字花科蔬菜分离的乳酸菌中筛选获得了 B244、161 和 602 这 3 株能有效降解生长环境中硫代葡萄糖苷的乳酸菌, 其中, B244 菌株经鉴定为戊糖片球菌, 具有较强的产黑芥子酶能力, 为工业生产黑芥子酶提供了新的菌种资源。

本研究发现随着发酵时间的延长, 3 株菌黑芥子酶活力整体上均呈现先上升后下降的趋势, 但均在菌密度较高时出现较高酶活力, 这与 WANG 等^[21]的研究结果一致, 说明活菌数的增加与酶活力密切相关。602 菌株在生长迟缓期具有较高的黑芥子酶活力, 进入生长对数期后酶活力反而降低, 推测该菌株可能将培养基中硫代葡萄糖苷类物质分解为对自身生长繁殖不利的毒性物质^[22]。

影响乳酸菌生长及其产酶能力的因素有两类: 一类为培养条件如(温度、pH 等), 另一类是培养基组分(如碳源、氮源^[23])及其浓度。温度会显著影响微生物的蛋白质和酶的合成及活力, 影响微生物的生理生化活动, 较高温度能促进微生物的高密度培养, 较低温度利于酶的合成^[24]。本研究发现当培养温度为 25~43 °C 时 3 株菌的黑芥子酶活力整体上均呈上升趋势; B244 菌株在初始 pH 为 7 时酶活力最高, 602 菌株在初始 pH 为 6 时酶活力最高, 而 161 菌株在添加柠檬酸盐缓冲液的培养基中培养时菌体发生裂解死亡; 硫代葡萄糖苷浓度对 3 株乳酸菌产黑芥子酶活力有显著影响。B244 菌株产黑芥子酶活力随着硫代葡萄糖苷浓度升高而升高, 161 菌株与 602 菌株在硫苷提取物浓度为 5 mmol/L 酶活力达到最高, 随后酶活力降低。这是因为硫苷类物质及其降解产物具有抑

菌作用^[25], 较高浓度的硫代葡萄糖苷可能导致菌体生长发育较缓。当培养基中蛋白胨质量浓度较低时, 3 株乳酸菌的黑芥子酶活力随蛋白胨质量浓度增大而升高; 但当蛋白胨的质量浓度过高时, 其黑芥子酶活力随着培养基中蛋白胨质量浓度增大而降低。这是由于在低氮条件下, 微生物缺少养分, 不能进行正常的生长和代谢, 而过量的蛋白胨也会引起代谢物的过量累积, 致使菌株产酶能力下降^[26]。可见, 在 LB 培养基中添加适量的硫苷提取物以及提高蛋白胨用量均有利于提高乳酸菌黑芥子酶活力。本研究在单因素试验的基础上, 采用响应面试验优化了戊糖片球菌(B244)产黑芥子酶的条件, 其最适产酶条件如下: 在 LB 培养基中添加 4.2 mmol/L 的硫代葡萄糖苷, 调整蛋白胨质量浓度至 14.3 g/L、初始 pH 为 6.9, 在 40 °C 培养 16 h。优化后酶活力提高到 117.2 U/L, 较优化前的酶活力(76.65 U/L)提高 52.9%。本研究不仅丰富了产黑芥子酶的微生物种质资源, 而且通过发酵工艺优化使其酶活力得到大幅提高, 为其后续的工业应用及酶纯化提取提供了参考, 但有关戊糖片球菌产黑芥子酶的酶学性质及其应用有待进一步研究。

参考文献:

- [1] NARBAD A, ROSSITER J T. Gut glucosinolate metabolism and isothiocyanate production[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(18): e1700991.
- [2] 王伟杰, 禹艳坤, 谭小力. 十字花科植物次生代谢物硫代葡萄糖苷生物合成运输分解的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(2): 1-10.
- [3] ROMÁN J, CASTILLO A, COTTET L, et al. Kinetic and structural study of broccoli myrosinase and its interaction with different glucosinolates[J]. *Food Chemistry*, 2018, 254: 87-94.
- [4] 赵吉春, 余洁, 谭正卫, 等. 发酵十字花科蔬菜中硫代葡萄糖苷代谢研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 381-389.
- [5] 阳晖, 卢凌霄, 王晴, 等. 发酵法制备萝卜硫素的工艺优化[J]. *食品工业*, 2021, 42(12): 218-223.
- [6] TIE Y, ZHU W Y, ZHANG C, et al. Identification of two myrosinases from a *Leclercia adecarboxylata* strain and investigation of its tolerance mechanism to glucosinolate hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(47): 14151-14164.
- [7] ZHANG Y, HUANG S S, SUN J, et al. Isolation and

- characterization of glucosinolate-hydrolysis *Enterococcus gallinarum* HG001 and *Escherichia coli* HG002 from C57BL/6 mouse microbiota[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2022, 62(2): 273–279.
- [8] MULLANEY J A, KELLY W J, MCGHIE T K, et al. Lactic acid bacteria convert glucosinolates to nitriles efficiently yet differently from enterobacteriaceae[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(12): 3039–3046.
- [9] WATANABE H, USAMI R, KISHINO S, et al. Enzyme systems involved in glucosinolate metabolism in *Companilactobacillus farciminis* KB1089[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 23715.
- [10] ALBASER A, KAZANA E, BENNETT M H, et al. Discovery of a bacterial glycoside hydrolase family 3(GH3) β -glucosidase with myrosinase activity from a *Citrobacter* strain isolated from soil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(7): 1520–1527.
- [11] CEBECI F, MAYER M J, ROSSITER J T, et al. Molecular cloning, expression and characterisation of a bacterial myrosinase from *Citrobacter* Wye1[J]. *The Protein Journal*, 2022, 41(1): 131–140.
- [12] 李修德, 王一涵, 夏怡然, 等. 萝卜硫素高效制备技术研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(8): 335–341.
- [13] 黄河鸥, 郑璞, 吴丹, 等. 异源表达黑芥子酶及其用于制备萝卜硫素的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(22): 76–81.
- [14] 黄继英, 王绥璋, 李素梅. 氯化钡—分光光度法测定油菜籽硫苷含量的研究[J]. *西北农业大学学报*, 1995, 23(6): 104–107.
- [15] 刘彩华, 曾嘉童, 包竹君, 等. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(9): 2892–2900.
- [16] KOZŁOWSKI K, JEROCH H. Enhancing the nutritional value of poultry feedstuffs using the example of rapeseed products: a review[J]. *Annals of Animal Science*, 2014, 14(2): 245–256.
- [17] 解寒. 乳酸菌耐受柠檬酸的适应性进化及其机制解析[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [18] 金君华, 张昊, 郭慧媛, 等. 乳酸菌酸胁迫应答机制研究进展[J]. *中国乳业*, 2011(11): 32–35.
- [19] 张静雯. 温度对副干酪乳酪杆菌高密度培养过程中生长特性的影响机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [20] BENGGOA A A, LLAMAS M G, IRAPORDA C, et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains[J]. *Food Microbiology*, 2018, 69: 212–218.
- [21] WANG L L, JIANG H, LIANG X X, et al. Preparation of sulforaphene from radish seed extracts with recombinant food-grade *Yarrowia lipolytica* harboring high myrosinase activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(18): 5363–5371.
- [22] WU J Y, CUI S M, LIU J S, et al. The recent advances of glucosinolates and their metabolites: metabolism, physiological functions and potential application strategies[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(20): 4217–4234.
- [23] 孙竹萍, 张莉力, 王玉田. 副干酪乳酸菌 L1 产淀粉酶条件优化及温度、pH 对淀粉酶活力的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(1): 144–149.
- [24] 冯镇, 张兰威. 变温培养对乳酸菌高密度培养的影响[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(7): 4–7.
- [25] 张睿, 于建丽, 宋璇, 等. 西兰花萝卜硫苷提取物的抑菌及体外免疫活性探究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(4): 1–7.
- [26] MIDIK F, TOKATLI M, BAĞDER ELMACI S, et al. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(4): 875–885.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 柳正