

基于木屑发酵的蛋白酶活性分析

杨颜沁, 廖 珍, 伍景艳, 李 昭, 董宁文, 朱晓冬, 刘 玉*

(东北林业大学 材料科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:木屑是木材使用过程中的废弃物,但是在一定的环境条件下发酵可产生有益于人体的蛋白酶。采用枯草芽孢杆菌、水果酵素与桉木醇作为发酵菌进行核桃楸木屑发酵试验,通过对比不同发酵方法产生蛋白酶的活性,研究适合木屑的发酵方法。结果表明,不同发酵菌作用下核桃楸木屑发酵后蛋白酶的活性都有所增加,其中在加入枯草芽孢杆菌发酵剂的同时还分别加入等量的水果酵素和桉木醇可以有效提高蛋白酶的活性,比未发酵蛋白酶的活性提高了 8.1%。本项目的研究工作可以更高效地利用木屑资源,使木材资源的作用不仅仅局限于材料层面而进一步的扩展至人体生物学层面。

关键词:木屑;发酵;蛋白酶;活性分析

中图分类号: **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2015)01-0219-03

Protease Activity Analysis Based on Sawdust Fermentation

YANG Yan-qin, LIAO Zhen, WU Jing-yan, LI Zhao, DONG Ning-wen, ZHU Xiao-dong, LIU Yu*

(College of Material Science and Engineering, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: Sawdust is the waste products in the process of wood. But in certain conditions of fermentation, it can produce protease beneficial to human beings. *Bacillus subtilis*, fruit enzymes and hinokitol were used as fermentation of *Juglans mandshurica* sawdust. The protease activities were compared between different fermentation methods. The results showed that the protease activity all increased after the addition of different bacterial during fermentation. In which joined addition of the equal amounts of fruit enzymes and hinokitol with *B. subtilis* can effectively improve the activity of protease by 8.1%. The research in this paper can use wood resources more efficiently, and make the use from the material aspect to the human biology level.

Key words: sawdust; fermentation; protease; activity analysis

木屑作为木材使用上的剩余资源,虽然也有一些其他方面的应用,但在我们国家利用还是很不充足。与此同时,护肤品中加入的植物提取物提取比较困难,并且很多都是珍贵的植物,导致这类护肤品价格持续走高。橡木、核桃楸、桉木、柳树等树种的木屑曾用于化妆品的制备提取,具有一定的杀菌保护作用以及美容健体作用。若能从木屑中找到那些珍贵植物中成分的有效替代品,研究它们对皮肤有利的作用原理,对于美容护肤领域也是一个新的研

究方向。木屑在一定的温暖潮湿环境中可产生许多作用于人体的有益物质^[1-4]。木屑浴是通过严格工艺自然萃取上百种植物酵素,添加混合在天然柔软的松柏木屑中,与其发酵自然产生热能,温度高达 60°以上。将身体埋入木屑中利用热能提供温浴,被公认为最健康的干式温浴法。高效营养酵素浴主要以纳豆激酶为主要霉菌发酵,这种高效营养酵素浴主要是针对心脑血管方面疾病的各类慢性病客户,效果很明显,患者洗过 10~30 次这种酵素浴,能很

收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-04-23

基金项目:东北林业大学大学生创新训练项目(201310225133)。

作者简介:杨颜沁,女,研究方向:生物质材料利用。E-mail: 524266923@qq.com

* 通信作者:刘玉,女,讲师,博士,研究方向:生物质复合材料。E-mail: liuyu820524@126.com

快的发挥溶解血栓的功能。木屑酵素浴主要以纳豆激酶为主要霉菌发酵,有改善体质、预防疾病、美白护肤,增强免疫力等功效。纳豆激酶作为一种蛋白酶有促进人体微循环,改善代谢的功能,不但可以起到健体的作用,也可以起到美容护肤的作用。通过做对比的木屑发酵试验,引入有益菌,通过检测对皮肤及身体有益处的蛋白酶酶的活性,研究适合的发酵方法。本项目的研究可以更高效地利用自然资源,对于增加木屑的利用领域方面有一定的意义,为探索环境友好型的创新方式奠定了基础。使木材资源的作用不仅仅局限于材料层面而进一步的扩展至人体生物学层面,使其更加全方位的为人类的生活服务。

1 材料与方法

1.1 试验材料

木屑:本试验所选树种为核桃楸,易于发酵,能与菌群产生良好的共生共容关系,所制成的木屑无明显的毒副作用,将所选树种核桃楸打成木屑状备用。

发酵剂:选用的是枯草芽孢杆菌纳豆激酶(nat-tokinase,简称 NK)。变量剂选用水果酵素与桉木醇。

仪器:分析天平(美国华志,PTX-FA-110),精度 0.000 1 g;恒温水浴箱(天津奥特赛恩斯,WB-5100A),精度±0.2℃;计时表(中国上转,CZ-72);分光光度计(HITACHI,F-2500);沸水浴槽(北京同德,KY/SBB26);振荡混合器(北京中西远大,BJH63-MID600);pH 计(美国 Thermo Eutech,A301681),精度 0.01 pH。

1.2 发酵方法

试验总共分为 3 个小组进行:空白组,水果酵素添加组,水果酵素与桉木醇共同添加组,每组重复 3 次。空白组发酵方法是将所制备的核桃楸木屑高温蒸煮 20 min 灭菌,在无菌的干燥箱中晾干。按木屑使用量的千分之一添加枯草芽孢杆菌,把枯草芽孢杆菌、红糖和水按 1:1:20 的比例浸泡 8~24 h 进行活化,然后与木屑搅拌均匀,建立木屑发酵堆^[5-8]。因为纳豆激酶比较适合在 40~50℃ 的环境中产生作用,本试验温度控制在 45~50℃ 左右。温度达到 40℃ 时进行第 1 次翻堆,1 周后进行第 2 次翻堆,之后便进入木屑发酵阶段,温度在 45~50℃。在此阶段,可根据需要对发酵堆再翻 1~2 次,最终到发酵过程结束。水果酵素添加组的试验是在加入发酵剂的同时还分别加入等量的水果酵。水果酵素与桉木醇混合添加组的试验是同时加入等量的水果酵素和

桉木醇。

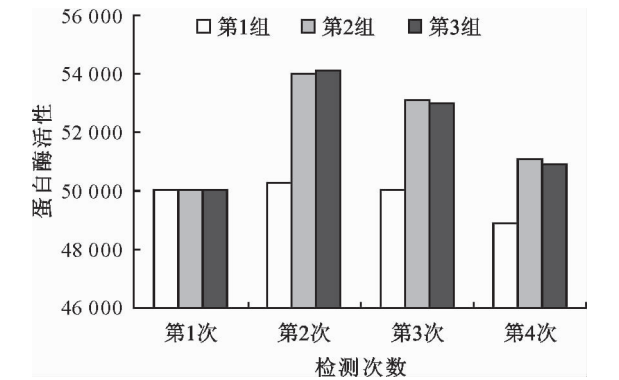
1.3 检测方法

纳豆激酶与酪蛋白在一定条件下作用会产生可溶性低分子物质,根据国家专业标准(SB/T 10317-1999)通过分光光度计检测其浓度,计算取得相应纳豆激酶活力。对于每次的单组试验发酵堆分 4 次检测蛋白酶的活性变化。第 1 次测试是在未发酵前(温度 35°);第 2 次测试是在建堆后的 2 d,温度达到 40°左右时;第 3 次检测是在第 1 次翻堆时(温度 45℃),第 4 次检测是在第 3 次翻堆时(温度 45℃)^[9-10]。

2 结果与分析

对空白组,水果酵素添加组,水果酵素与桉木醇共同添加组这 3 组试验发酵产生的蛋白酶活性进行检测(图 1)。由图 1 结果可得:空白组木屑发酵堆中蛋白酶的活性在有木屑堆的作用下有一定的提高,从未发酵前的 50 000/10 g 提高到 50 268/10 g,提高了 0.5%。而在温度达到一定后蛋白酶的活性也将达到初步稳定,但是而后随着发酵时间的增长,酶的活性又慢慢的减弱,最后降至 48 903/10 g,低于发酵前的蛋白酶活性。这是因为在发酵后阶段,枯草芽孢杆菌开始衰亡,产酶能力下降,酶活力也随之逐渐降低。这也就证明了木屑浴一般应控制在升温后的一定的时间内使用的才能发挥其最大的效果。

而加入水果酵素的对比组酶的活性相对空白组有了一定的提高。在第 2 次检测时达到 53 987/10 g,比未发酵蛋白酶的活性提高了 8.0%。这是因为水果酵素作为催化剂,本身就含有一定的对皮肤有益的蛋白酶,可以使更多反应粒子能拥有更多的动能,加快反应速率,从而进一步提升了酶的活性,但是而后随着发酵时间的增长,酶的活性又慢慢的减弱,最后降至 51 098/10 g。第 3 组的水果酵素与桉木醇的混合组在第 2 次检测时达到 54 070/10 g,比未发酵蛋白酶的活性提高了 8.1%,但与第 2 组相比提高程度不大。桉木醇作为一种单萜类的天然化合物,属托酚酮族化合物,具有良好的抗菌性、保湿性和害虫忌避效果,是高安全性的植物成分,可做抗菌、防虫剂,是台湾扁柏精油的主要成分,具有较为广泛的生物活性,有强力的杀菌能力,目前已经用于生产沐浴露、化妆品、医药等产品。但是桉木醇的加入对于蛋白酶的活性影响不大。所以在今后的研究中如果只是要提高蛋白酶的活性,只要加入水果酵素就可以。



第 1 组:空白组;第 2 组:水果酵素添加组;第 3 组:水果酵素与松木醇共同添加组。

图 1 不同发酵堆的蛋白酶活性

Fig. 1 Protease activity in different fermentation groups

3 结论

采用 3 种不同的发酵方法对核桃楸木屑进行发酵,结果表明发酵后蛋白酶的活性都有所增加,其中在加入枯草芽孢杆菌发酵剂的同时还分别加入等量的水果酵素可以有效提高蛋白酶的活性,比未发酵蛋白酶的活性提高了 8.1%。

参考文献:

[1] 徐勇,焦杰,徐斌伟,等. 杨木屑低浓度硫酸中温预处理提取木糖及其发酵[J]. 林产化学与工业,2011,31(5):11-17.
XU Y, JIAO J, XU B W, *et al.* Extraction and fermentation of xylose from poplar sawdust by hot sulfuric acid pretreatment at low concentration[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2011, 31(5): 11-17. (in Chinese)

[2] 付雯,张晓勇,周金燕,等. 固定化枯草芽孢杆菌发酵生产捷安肽素[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(2):230-234.
FU W, ZHANG X Y, ZHOU J Y, *et al.* Jean-peptide production by immobilized cell fermentation of bacillus subtilis[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(2): 230-234. (in Chinese)

[3] 刘建伟,卢伟东,贾培培,等. 松木屑不同处理方法对绣球菌生长的影响[J]. 中国食用菌,2010,29(1):70-71.

[4] 徐勇,顾依娜,范丽,等. 杨木稀酸预处理液木糖发酵产乙醇工艺条件的研究[J]. 林产化学与工业,2010,30(3):19-23.
XU Y, GU Y N, FAN L, *et al.* Study on the processing conditions of xylose fermentation to produce fuel ethanol from dilute-acid pretreated poplar[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2010, 30(3): 19-23. (in Chinese)

[5] 谢小林,顾振红,陈美标,等. 潮湿纤维单胞菌和绿色木霉混合接种对不同食用菌菌渣相关酶活性的影响[J]. 生物技术通报,2013(12):162-166.
XIE X L, GU Z H, CHEN M B, *et al.* Study on the related enzyme activities in the residues of different mushroom substrates inoculated with *Cellulomonas uda* and *Trichoderma viride*[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(12): 162-166. (in Chinese)

[6] 艾斌凌. 纤维素酶的液体发酵与杨木生物转化乙醇[D]. 长沙:中南林业科技大学,2009.

[7] 徐璐,文连奎. 固定化醋酸菌发酵人参醋饮料加工工艺优化[J]. 食品工业科技,2012,33(24):311-314.
XU L, WEN L K. Optimization of immobilization of acetic acid bacteria for ginseng vinegar drinks[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(24): 311-314. (in Chinese)

[8] 周如宝. 用木屑碱熔法制草酸[J]. 适用技术之窗,1994(6):10.

[9] 杜甫佑. 白腐菌木质纤维素降解次序研究[D]. 武汉:华中科技大学,2004.

[10] 宋卡魏. 枯草芽孢杆菌 B68 发酵培养的优化及两种剂型的初步研究[D]. 广州:华南热带农业大学,2007.

[11] 龚黛,郭蔚,王华,等. 葡萄枝条栽培白玉菇的营养成分研究[J]. 西北林学院学报,2013,28(6):121-124.
GONG D, GUO W, WANG H, *et al.* Nutrition components in white *Hypsizygus marmoreus* cultivated with vine pruning stalks[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6): 121-124. (in Chinese)

[12] 邹勇,尉芹,赵忠,等. 木屑快速热解生物油中酚类提取物的抗氧化及抑真菌活性研究[J]. 西北林学院学报,2014,29(1):116-121.
ZOU Y, WEI Q, ZHAO Z, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of phenolic extract from bio-oil by fast pyrolysis of sawdust[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(1): 116-121. (in Chinese)

[13] ELISASHVILI V, PARLAR H, KACHLISHVILI E. Ligninolytic activity of basidiomycetes grown under submerged and solid-state fermentation on plant raw material (sawdust of grapevine cuttings) [J]. Advances in Food Sciences, 2001, 23(3), 117-123.

[14] IMMANUEL G, BHAGAVATH C, RAJ P I. Production and partial purification of cellulase by aspergillus niger and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust[J]. Internet Journal of Microbiology, 2007, 3(1):101-113

[15] OJUMU T V, SOLOMON B O, BETIKU E. Cellulase production by aspergillus flavus linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob[J]. African Journal of Biotechnology, 2003, 2(6):150-152.