

腐乳毛霉 AS3.2778 产蛋白酶特性研究

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510641) 潘进权 刘耘

摘要 研究了影响腐乳毛霉 AS3.2778 产蛋白酶的一些因素, 包括培养基的组成、发酵温度、pH 以及发酵时间等。结果表明, 毛霉蛋白酶是一种诱导酶, 较合适的发酵条件为温度 28℃, pH5~6, 发酵时间 48h。

关键词 毛霉 蛋白酶 产酶条件

中图分类号: TS201.2'5 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2002)11-0023-03

大豆多肽由于其优良的物化特性以及生理活性而受到众多食品科学家的广泛关注。从上世纪四、五十年代起, 人们对它进行了大量的研究, 从水解方法、酶的选择、水解工艺到苦味脱除。然而, 迄今为止, 尚未找到一种较为理想的大豆蛋白水解方法, 使所得到的大豆多肽既具有其良好的特性, 又有较好的风味, 尤其是不具有苦味。

最近的研究表明^[1], 我国传统食品腐乳中的蛋白质主要是以多肽的形式存在的, 而对众多腐乳产品感官分析表明, 它们并不具有蛋白质酶法水解的苦味, 这可能与腐乳毛霉的蛋白酶系有关。鉴于此, 我们对腐乳毛霉的产蛋白酶特性进行了研究, 希望找到一种或多种合适的蛋白酶用于大豆肽的生产。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 雅致放射毛霉 AS3.2778 菌株, 学院菌种保藏室提供; **斜面种子培养基** 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基; **液体种子培养基** 葡萄糖 1.5%, 玉米淀粉 3%, 硝酸钠 0.3%, 大豆分离蛋白(SPI)0.1%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.05%, 氯化钙 0.03%, pH 自然; **发酵培养基** 蔗糖 2%, SPI3%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.05%, 硫酸锌 0.03%, 氯化钙 0.03%, pH6.0, 以上培养基的灭菌条件均为 121℃, 20min; 试剂均系食品级或生化试剂。

电子天平 JJ500 型(美国双杰集团有限公司); **烘箱** 上海锦屏仪器仪表有限公司; **控温摇床** 江

苏富华仪器有限公司; 生化培养箱 LRH-150B 型, 广东省医疗器械厂。

1.2 蛋白酶活力测定方法^[2]

采用福林试剂法, 40℃下每分钟水解酪蛋白产生 1mg 酪氨酸定义为一个酶活力单位。本实验以每瓶发酵滤液的总酶活表示。

1.3 液体种子培养

接种一环斜面孢子于 50ml 种子培养液中, 250ml 三角瓶, 28℃于 250r/min 转速下培养 48h。

1.4 摇瓶发酵

按 10%接种量接种液体种子于 50ml 发酵培养基中, 250ml 三角瓶, 28℃于 250r/min 培养。

2 结果与分析

2.1 培养基组成对蛋白酶合成的影响

2.1.1 不同碳源对蛋白酶合成的影响 分别以不同的碳源: 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米淀粉、大米粉替代发酵培养基中的蔗糖做发酵试验, 测定 48h 后每瓶发酵液的蛋白酶总活力, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 不同的碳源对蛋白酶的合成有一定的影响, 但不是很显著, 相比而言, 蔗糖较有利于蛋白酶的合成。

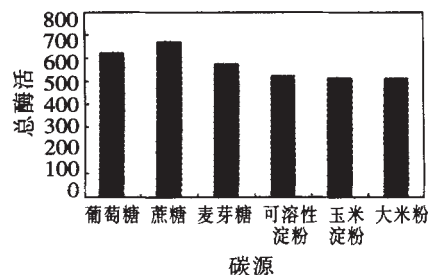


图 1 碳源对产酶的影响

2.1.2 不同氮源对蛋白酶合成的影响 分别以浓度 0.5% 的不同氮源: 硝酸钠、尿素、蛋白胨、酪蛋白、SPI 水解物替代发酵培养基中的 SPI 做发酵试验, 测定 48h 后发酵液的蛋白酶总活力, 结果见图 2。由实验结果可以看出, 毛霉蛋白酶是一种诱导性很强的酶类, 仅有在培养基中有蛋白质时才能诱导酶的合成,

收稿日期: 2002-06-20

作者简介: 潘进权(1978-), 男, 在读硕士, 研究方向: 微生物与发酵食品。

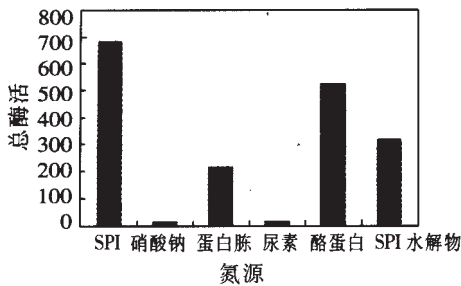


图2 氮源对产酶的影响

无机氮或小分子有机氮源能抑制酶的合成，这与其它作者的报道相一致^[3]。

2.1.3 无机盐对蛋白酶合成的影响 通过以下简单的正交实验研究了常见几种无机盐对毛霉 AS3.2778 产蛋白酶的影响。结果表明,添加 0.03%的磷酸二氢钾及硫酸锌对蛋白酶的合成有显著的促进作用。另外硫酸镁对蛋白酶的合成也有一定的作用;而磷酸氢二钠的加入则会抑制该酶的合成,其原因可能与

表1 几种无机盐对毛霉 AS3.2778 产蛋白酶的影响

实验号	Na ₂ HPO ₄ (%)	KH ₂ PO ₄ (%)	MgSO ₄ (%)	ZnSO ₄ (%)	FeSO ₄ (%)	MnSO ₄ (%)	CaCl ₂ (%)	总酶活
1	0	0	0	0	0	0	0	545
2	0	0	0	0.03	0.03	0.03	0.03	556
3	0	0.03	0.03	0	0	0.03	0.03	627
4	0	0.03	0.03	0.03	0.03	0	0	680
5	0.03	0	0.03	0	0.03	0	0.03	456
6	0.03	0	0.03	0.03	0	0.03	0	572
7	0.03	0.03	0	0	0.03	0.03	0	446
8	0.03	0.03	0	0.03	0	0	0.03	630
K ₁	2408	2128	1278	2074	2375	2312	2243	
K ₂	2104	2384	2334	2438	2137	2200	2269	
R	304	256	156	364	238	112	26	

发酵液的 pH 调节有关。

通过以上试验,初步确定了发酵培养基的组成,在此基础上通过正交优化确定最终的发酵培养基组成为:蔗糖 3%,SPI3%,KH₂PO₄0.2%,MgSO₄0.05%,ZnSO₄0.03%。

2.2 发酵条件对蛋白酶合成的影响

2.2.1 培养基 pH 对产酶活力的影响 通过前期对种子培养条件的探讨得知,毛霉 AS3.2778 较为合适的生长 pH 在 6.0 左右。因此我们选择 pH 在 4.5~8.0 范围对培养基 pH 与产酶活力之间的关系进行了实

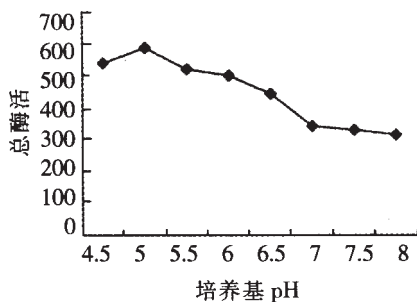


图3 培养基 pH 与总酶活的关系

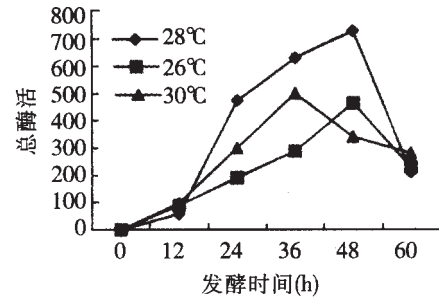


图4 发酵温度与总酶活的关系

验。结果表明,培养基的 pH 对毛霉 AS3.2778 产蛋白酶有很明显的影响,较为合适的产酶 pH 在 5~6 之间,与其它作者的结果相吻合^[4,5]。

2.2.2 发酵温度对毛霉产蛋白酶的影响 将接种好的摇瓶分别置于 26、28、30°C 下培养,每间隔 12h 取样测定蛋白酶总活力,结果见图 4。由图 4 可以看出,发酵温度对于毛霉产蛋白酶有较大的影响,温度过低则蛋白酶的合成滞后;而温度过高则菌体生长受

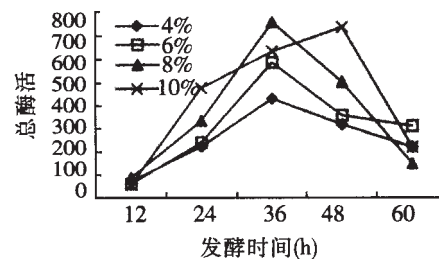


图5 接种量与总酶活的关系

到影响(该菌体较合适的生长温度在 26~28°C),蛋白酶的合成也受到相应的影响。因此,毛霉 AS3.2778 较合适的发酵温度为 28°C。

2.2.3 接种量与蛋白酶总酶活的关系 在发酵培养基中分别按 4%、6%、8%、10%的接种量接种,做不同接种量试验。由图可以看出,接种量对产酶有一定的影响,接种量大时酶的合成相对提前,但过大的接种量又会影响到菌体后期的生长,而供氧不足反过来也会影响产酶。结果表明,发酵培养基较合适的接种量在 8%~10%。

2.2.4 发酵时间与产酶的关系 测定不同发酵时间

草酸在江蓠藻漂白中的应用研究

(湛江海洋大学, 湛江 524025) 蔡 鹰 黄家康 吴湛霞

摘 要 $H_2C_2O_4$ 既是弱酸又是还原剂, 以 $H_2C_2O_4$ 作酸化液提取的琼胶凝胶强度明显高于用 HCl 、 H_2SO_4 作酸化液的琼胶凝胶强度, 且有明显的增白作用。本文对 $H_2C_2O_4$ 在 $NaClO$ 法漂白江蓠藻中的应用进行了研究, 提出了在 $NaClO$ 漂白江蓠藻后再用稀 $H_2C_2O_4$ 溶液进行二次酸化处理, 可提取得到高强度的琼胶, 同时产品白度、出胶率也比较理想。

关键词 草酸 江蓠藻 漂白

Abstract $H_2C_2O_4$ is a weak acid as well as a reducer. The gel strength of agar extracted with $H_2C_2O_4$ as acidifier is obviously higher than that of agar extracted with HCl or H_2SO_4 as acidifier. Meanwhile, $H_2C_2O_4$ has an effect of bleaching. The paper explores the application of $H_2C_2O_4$ in bleaching gracilaria in the way of $NaClO$. The study shows that high gel strength agar can be obtained by acidifying in $H_2C_2O_4$ solution after bleaching gracilaria, with ideal whiteness and extraction yield of agar.

Key words oxalic acid; gracilaria; bleaching

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2002)11-0025-03

收稿日期: 2002-05-22

作者简介: 蔡鹰(1964-), 男, 讲师, 研究方向: 水产品加工。

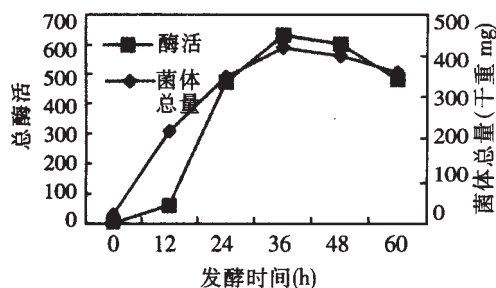


图6 发酵时间与总酶活的关系

发酵液的总酶活, 结果见图6。由图6可以看出, 毛霉蛋白酶与菌体的生长之间成生长-偶联关系, 酶的合成伴随菌体的生长过程, 较合适的发酵时间为36~48h。

3 小结

综上所述, 毛霉蛋白酶是一种诱导性很强的酶类, 只有在培养基中有大量的蛋白质作为诱导物时才可诱导酶的合成。蛋白酶合成较合适的发酵条件

漂白在江蓠藻提取琼胶的工艺中占有十分重要的地位, 直接影响到如产品凝胶强度、出胶率、白度等质量指标, 从而影响到产品的销售与价格。因此, 生产企业都希望能采用一种工艺比较稳定, 保证产品质量的漂白方法对江蓠藻进行漂白。目前国内对江蓠藻漂白主要是采用 $NaClO$ 法、 H_2O_2 法及 $KMnO_4-H_2C_2O_4$ 法, 这方面的研究已有不少报导^[1-3]。草酸作为一种还原剂及弱酸, 在工业上作为漂白剂使用比较广泛^[4], 本文对草酸在 $NaClO$ 漂白法中对江蓠藻的酸化漂白作用进行了研究, 并找出了比较合适的漂白方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细江蓠(*Gracilaria st*) 雷州半岛产;

细基江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*) 广东省湛江市东海岛产。

清洗除去杂藻、泥、砂、贝壳等杂物后晒干备用。

1.2 江蓠藻碱处理

将江蓠藻置于 65°C 的 $NaOH$ 溶液中(细江蓠 20% $NaOH$, 细基江蓠 28% $NaOH$) 16h, 取出, 水洗至中性。

为温度 28°C , pH5~6 之间, 发酵时间在 36~48h。与其它产蛋白酶的菌株相比, 毛霉蛋白酶的活力还是偏低, 但值得一提的是毛霉蛋白酶是一种复合酶, 其中包括内肽酶和端肽酶, 这对蛋白水解物的风味至关重要。作者用这种酶水解大豆分离蛋白得到了风味良好的蛋白水解物。

参考文献

- 倪莉, 饶平凡, 王璋. 腐乳中生理活性多肽的分离和表征. 浙江农业大学学报, 1997, 23(5): 93~97
- 张树政编. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 446~447
- 李理, 罗泽民, 卢向阳. 毛霉产蛋白酶的特性及其应用研究. 湖南农业大学学报, 1999, 25(3): 216~219
- 王磊, 张志光. 毛霉 M-9105 产蛋白酶的条件. 中国调味品, 1997(9): 14~15
- 胡巖, 赵学慧. 论耐热性毛霉菌株的筛选及酶学性质. 中国调味品, 1998(1): 2~6