

Bacillus natto 918 蛋白酶水解玉米醇溶蛋白的研究

李志锐, 芦明春, 王 莉, 刘英新, 高 跃, 金凤婵

(大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁大连, 116034)

摘 要 酶解玉米醇溶蛋白获得生理功能短肽的研究, 多采用碱性蛋白酶和混合酶等商品酶制剂。通过培养 *Bacillus natto* 918 菌, 采用固态发酵方式生产蛋白酶, 测定水解度, 确定水解经碱处理的玉米醇溶蛋白最佳酶解条件为: 底物浓度 10%、加酶量 8 000 U/g、pH=9.5、反应温度 40℃、反应时间 3.0 h, 在此条件下水解率达到 33.8%。

关键词 *Bacillus natto* 918, 固态发酵, 玉米醇溶蛋白

玉米蛋白粉是玉米淀粉生产的主要副产物, 含有约 60% 的蛋白质, 主要为玉米醇溶蛋白(68%)和谷蛋白(22%)^[1,2]。玉米醇溶蛋白中含有高比例的疏水性氨基酸。近年来, 人们发现玉米醇溶蛋白经水解后可产生具有多种生理功能的短肽, 可以作为保健型功能食品的基料或辅料, 如具有抗疲劳作用的玉米肽饮料和抗高血压作用食品等^[3,4]。以玉米醇溶蛋白为底物进行酶解, 获得生理功能短肽的研究, 多采用碱性蛋白酶和混合酶等商品酶制剂, 成本高^[4]。采用固态培养微生物产酶水解玉米醇溶蛋白研究报道较少。纳豆菌(*Bacillus natto*)是日本传统发酵食品——纳豆的生产菌种^[6], 本文通过对 *Bacillus natto* 918 采用固态发酵方式产的酶进行水解玉米醇溶蛋白研究, 旨在为玉米蛋白的转化、利用及提高其附加值提供一条可行的途径。

1 材料与方法

1.1 材 料

玉米蛋白粉由沈阳军区淀粉厂提供, *Bacillus natto* 918 菌种朝鲜国家科学院发酵研究所提供。

1.2 仪器与设备

SPX-250 型培养箱, 上海跃进医疗器械厂; GL-21M 高速冷冻离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 722S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 *Bacillus natto* 918 菌株固态发酵

Bacillus natto 918 菌株经扩培后, 在豆粕、麦麸与水按一定的比例配置的培养基中接入菌种, 调整培养温度、pH, 水分含量、培养时间等条件采用固态发

酵。

1.4 试验方法

1.4.1 玉米醇溶蛋白的提取: 超声波萃取法

萃取条件为: 乙醇体积分数 95%、最佳料液比 1:10、提取时间 60 min、提取温度 40℃、提取次数 3 次。此时所得玉米醇溶蛋白的纯度达到 97.8%。

1.4.2 酶活的测定: Follin-酚法

酶活力定义: 每毫升酶制剂在 40℃, pH 9.0 条件下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的所需酶量为一个活力单位。

1.4.3 蛋白质含量的测定

凯氏及氮法。

1.4.4 蛋白酶活力测定

Folin-酚法^[7]。

1.4.5 蛋白水解度测定

茚三酮法^[8]。水解度的计算公式:

$$DH = h/h_{\text{tot}} \times 100\% =$$

$$\frac{\left[\frac{C_{\text{NH}_2} (\mu\text{mol/L})}{6.25N(\text{mg/mL})} - 0.013195(\text{mmol/g}) \right]}{9.2} \times 100\%$$

式中: C_{NH_2} , 水解蛋白液中的 $-\text{NH}_2$ 的含量, 6.25N, 水解蛋白液中蛋白质含量; 0.013195 (mmol/g), 原料玉米醇溶蛋白水解前 $-\text{NH}_2$ 的含量; 9.2 (即 h_{tot}), 对于玉米醇溶蛋白其 $h_{\text{tot}} = 9.2(\text{mmol/g})$ 。

1.5 水解试验

从玉米蛋白粉中提取出的玉米醇溶蛋白粉用 0.1 mol/L 的 NaOH 调至 pH9.0, 在 90℃ 条件下保持 60 min。以底物浓度、加酶量、pH、反应时间 4 个可能影响水解率的因素做单因素试验, 以确定相关影响因素及各因素的合适范围。在单因素试验的基础上, 以水解度为考察目标, 通过正交试验优化出酶水解玉米醇溶蛋白的最适条件。

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2007-08-02, 改回日期: 2007-11-14

2 结果与讨论

2.1 *Bacillus natto* 918 菌株固体培养条件的优化

以 *Bacillus natto* 918 产酶活力为评价指标,对培养基配比、培养温度、pH、水分含量、培养时间等条件优化,得出 *Bacillus natto* 918 菌产酶活高的最佳培养条件: $m(\text{麸皮}) = \text{豆粕}$ 为 2 : 5, 温度 37℃, pH 8.0, 水分含量 85%, 培养时间 1 d。

2.2 酶活热稳定性测定:

将酶液分别在 35、40、50℃ 的条件下保持 5h, 在此期间每隔 15 min 取样测定, 酶活见图 1。

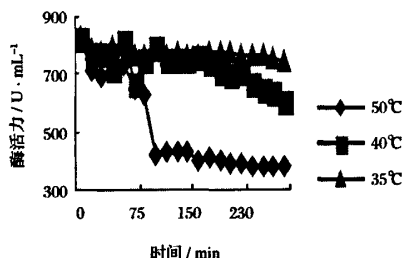


图 1 *Bacillus natto* 酶液的热稳定性

水解蛋白过程中温度不同酶活可能降低, 通过测定酶活, 可以确定水解反应的最适温度。由图 1 试验结果可知 *Bacillus natto* 918 产蛋白酶活在 35℃ 和 40℃ 时较高且最稳定, 而在 50℃ 时的稳定性较差。因此我们选择在 35℃ 下, 对影响水解度的其他因素进行试验, 进一步确定水解的最佳条件。

2.3 *Bacillus natto* 918 酶水解条件单因素试验

底物浓度、加酶量、pH、反应时间最佳条件见图 2~图 5。

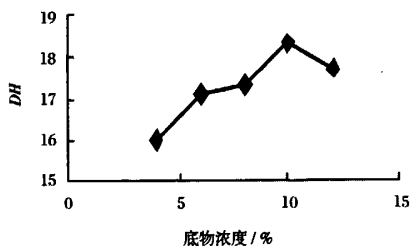


图 2 底物浓度对水解率的影响

由图 2 可以看出, 随着底物浓度的增加, 水解度上升较快, 底物浓度达到 10% 时, 水解度最大, 当底物浓度大于 10% 时, 随着底物浓度的增加, 水解度反而降低, 其原因可能是底物浓度过大后, 蛋白不能充分浸润, 影响了酶对蛋白的作用, 因此我们确定最适

酶解反应的底物浓度为 10%。

图 3 中, 当加酶量较小时, 随着加酶量的增加水解度迅速上升。当加酶量达到一定的量时, 水解度不再随酶量的增加而上升, 因此, 仅增加酶量来提高水解度效果不显著。综合酶的成本以及酶水解玉米蛋白的利用率, 本实验选择加酶量为 8 000 U/g。

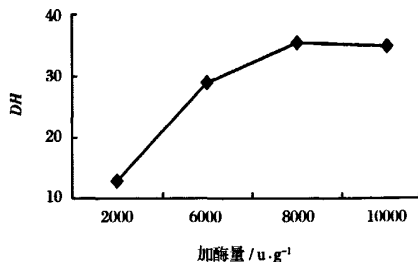


图 3 加酶量对水解率的影响

底物玉米醇溶蛋白随着 pH 的变化表现出不同的解离状态, pH 值直接影响了酶与底物的结合和酶对底物的催化。由图 4 可以看出在 pH 9.0 的条件下酶解玉米醇溶蛋白的水解度最高, 因此确定 pH 9.0 为反应的最佳条件。

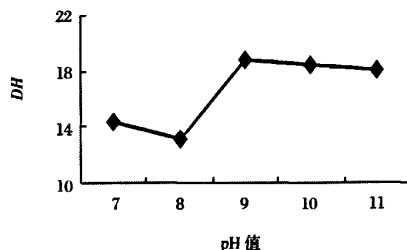


图 4 pH 对水解率的影响

由图 5 看出, 反应开始时, 最初底物的浓度较大, 水解度随着时间的延长而明显升高, 随反应进行, 底物浓度逐渐降低, 反应速度也随之降低, 当反应 4h 时水解效果最好, 水解度由 9.73% 增加到 32.90%, 但 4 h 以后, 水解度开始有所下降。因此, *Bacillus natto* 918 酶水解玉米醇溶蛋白的最佳水解时间为 4 h。

2.4 *Bacillus natto* 918 酶水解条件正交试验

以底物玉米醇溶蛋白浓度为 10%, 对其他因素进行三水平的正交试验, 结果见表 1。

由表 1 可知, 加酶量对水解率的影响最大, 其次是 pH 和温度。 *Bacillus natto* 918 蛋白酶的最佳水解条件为 $A_2B_2C_3D_1$, 即加酶量为 8 000 U/g, 温度为 40℃, pH 为 8.5, 水解时间为 3 h。在此条件下得到的水解度达到 33.8%。

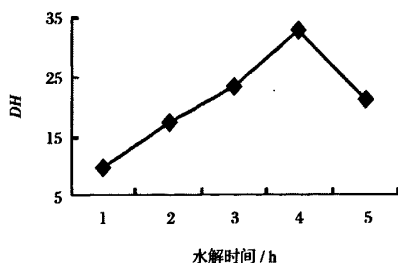


图5 水解时间对水解率的影响

表1 正交试验结果表

实验号	加酶量 /U · g ⁻¹	温度 /℃	pH	水解时间 /h	水解率 /%
1	7 500	35	8.5	3.0	13.8
2	7 500	40	9.0	3.5	13.4
3	7 500	45	9.5	4.0	24.6
4	8 000	35	9.5	4.0	30.5
5	8 000	40	8.5	3.0	33.8
6	8 000	45	9.0	3.5	24.1
7	8 500	35	9.0	3.5	29.3
8	8 500	40	9.5	4.0	17.2
9	8 500	45	8.5	3.0	16.0
K ₁	17.267	24.533	18.367	21.200	
K ₂	29.467	21.467	19.967	22.267	
K ₃	20.833	21.567	29.233	24.100	
R	12.200	3.066	10.866	2.900	

3 结 论

(1) *Bacillus natto* 918 菌产酶活高的最佳培养条件:麸皮:豆粕为 2:5,温度 37℃,pH 8.0,水分含量 85%,培养时间 1d。酶的热稳定性试验表明:

Bacillus natto 918 产蛋白酶酶活在 35℃ 和 40℃ 时高而且最稳定,在 50℃ 时的稳定性较差。

(2) 单因素水解条件试验分析表明,底物浓度、加酶量、pH、反应时间等对 *Bacillus natto* 918 发酵产酶水解玉米醇溶蛋白的水解率有较大影响。

(3) 通过正交试验确定了最佳水解工艺条件为:底物浓度为 10%,加酶量 8 000 U/g、pH 9.5、反应温度 40℃、反应时间 3.0 h,且在此条件下水解率可以达到 33.8%。

参 考 文 献

- 1 尤 新. 玉米的综合利用及深加工[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995. 82~84
- 2 M agoichi Y, M asayasu T, Osamu N, et al. Preparation of corn peptide from gluten meal and its administration effect on alcohol metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. Nutr Sci Vitaminol, 1996, 42: 219~231
- 3 Beak Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing By-products[J]. J of Food Sci, 1995, 60(5): 929~935
- 4 张晓峰, 陈庆森, 庞广昌. 酶解 100 kg 玉米蛋白粉制备玉米功能肽的中试研究[J]. 食品工业科技, 2006, 7(27): 58~59
- 5 谢秋玲, 郭 勇. 纳豆——一种多功能食品[J]. 食品工业科技, 1999, 20(L): 71
- 6 江 晓, 董明盛. 纳豆与保健食品[J]. 中国畜产与食品, 1998, 5(6): 279
- 7 QB/T 1803—1993, 129~132
- 8 刘 萍, 陈黎斌, 杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 5(27): 117~122

The Study on Hydrolysis Zein by the Protease Enzyme of *Bacillus natto* 918

Li Zhirui, Lu Mingchun, Wang Li, Liu Yingxin, Gao Yue, Jin Fengxie

(College of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

ABSTRACT The study to gain physiological function short peptide by enzymolysis zein has always adopted alkaline proteinase and admix enzyme, enzymes that are usually prepared as commodities. Through cultivating the *Bacillus natto* TK-1, we used solid state fermentation to produce protease, to determined degree of hydrolysis, and the best enzymolysis conditions for hydrolyzing the zein after alkali treatment as: the concentration of substrate 10%, enzyme addition 8000U/g, pH=9.5, reaction temperature 40℃, and reaction time 3.0h. The hydrolysis rate may achieve 33.8% under this condition.

Key words *Bacillus natto*, solid state fermentation, Zein