

米曲霉 40188 产中性蛋白酶、 α -淀粉酶特性的研究

张艳芳, 陶文沂

(江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

摘要 通过对米曲霉 40188 产酶特征及中性蛋白酶及 α -淀粉酶酶学特征的研究, 得出米曲霉 40188 制曲最佳时间为 50~72 h, 中性蛋白酶和 α -淀粉酶酶活在 40℃ 稳定, 随着温度升高酶活降低, 但 α -淀粉酶的热稳定性较中性蛋白酶强, 中性蛋白酶的最适 pH 为 7~8, α -淀粉酶的最适 pH 为 6~8, α -淀粉酶的耐盐性较中性蛋白酶强, 中性蛋白酶酶活随着盐浓度的增加呈下降趋势。

关键词 米曲霉 40188, 中性蛋白酶, α -淀粉酶

制曲是酱油生产的一道关键工序, 种曲质量的好坏直接影响原料的利用率和酱油的成品质量^[1]。目前, 我国制曲所采用的菌种主要是米曲霉, 米曲霉的酶系包括有蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、谷氨酰胺酶、木聚糖酶、肽酶等, 酶系复杂, 在酱油的酿造过程中起着不同的作用, 其中中性蛋白酶与 α -淀粉酶对酱油的产量和质量有着重要影响^[2]。本试验通过对 1 株米曲霉 40188 所产中性蛋白酶和 α -淀粉酶特性的研究, 讨论了温度、pH 值、盐浓度对酶活性的影响以及制曲过程酶活的变化, 以期能够为生产企业提高酱油的产量和质量提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

米曲霉 40188, 中国工业微生物菌种保藏中心。

斜面培养基: PDA 培养基。

发酵培养基: $m(\text{麸皮}):m(\text{豆粕})=4:1$; 水 60%, 自然 pH。麸皮、豆粕均为市售。

干酪素, 可溶性淀粉, NaOH, NaCO_3 等均为分析纯试剂。

1.2 试验仪器

生化培养箱、高速匀浆机、显微镜、净化工作台、752 紫外可见分光光度计。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面种子培养方法

挑 1 环菌体于斜面培养基中 30℃ 培养 72 h。

1.3.2 摇瓶培养方法

将 1 mL 菌悬液接种到经 121℃, 20 min 灭菌的 250 mL 三角瓶麸皮豆粕固体培养基中 [$m(\text{麸皮}):m(\text{豆粕})$

$=4:1$, 水 60%, 自然 pH], 充分摇匀。于 30℃ 生化培养箱中培养。24h 和 48h 各摇瓶 1 次, 共培养 72 h。

1.4 分析方法

1.4.1 酶液的提取

称取成曲 5g 加入蒸馏水 100 mL, 高速匀浆机搅拌破碎, 过滤, 得酶液。

1.4.2 蛋白酶活力的测定

采用福林酚法。参照中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法(SB/T 10317-1999)。

1.4.3 α -淀粉酶酶活力的测定

淀粉酶催化可溶性淀粉产生的还原糖能使 3,5-二硝基水杨酸还原, 生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸, 淀粉酶活力的大小与产生的还原糖的量成正比。用标准浓度的麦芽糖溶液制作标准曲线, 用比色法测定淀粉酶作用于淀粉后生成的还原糖的量。酶活力定义: 1 g 固体曲于 50℃, pH5.6 条件下催化产生 1 mg 麦芽糖为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 培养时间对酶活的影响

分别在 24、36、42、50、70 h 取曲样, 提取酶液, 测定中性蛋白酶和 α -淀粉酶酶活。结果见图 1 和图 2。

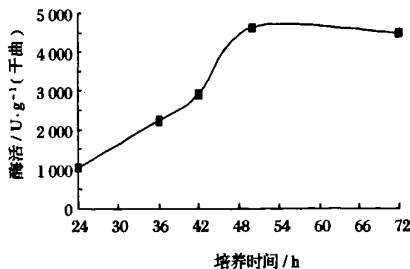
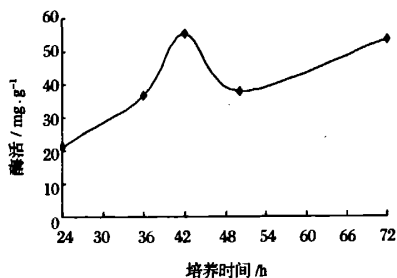


图1 培养过程中中性蛋白酶酶活变化
从测定结果可以看到, 中性蛋白酶的产酶高峰期

图2 培养过程中 α -淀粉酶酶活变化

从48 h开始,之后持续在一个较高的水平,缓慢下降;而 α -淀粉酶在42 h出现一个高峰后又有所下降,在50 h后才又开始回升。

2.2 温度对酶活的影响

酶液在不同温度保温一定时间后,在40℃测定中性蛋白酶酶活,在50℃测定 α -淀粉酶酶活。结果见图3,图4。

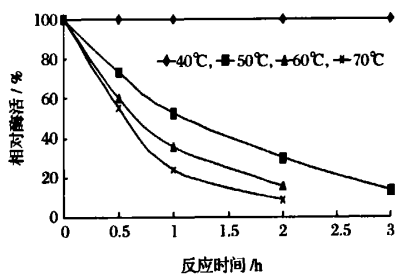
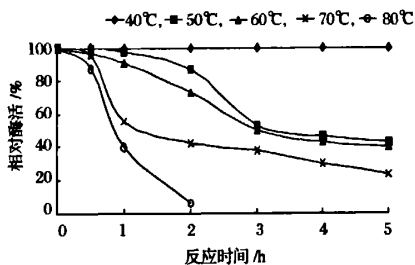


图3 温度对中性蛋白酶酶活的影响

图4 温度对 α -淀粉酶酶活的影响

由图3和图4可以看到,在40℃保温3 h和5 h,中性蛋白酶和 α -淀粉酶酶活都很稳定。但随着温度的升高,酶活都有不同程度的降低。中性蛋白酶在50℃作用3 h,其相对酶活仅为13.55%,在70℃作用2 h后,其相对酶活仅剩8.76%。 α -淀粉酶在50、60℃作用1 h再在70℃作用30 min后,其酶活仍相对稳定,在70℃作用5 h后,其相对酶活仍有23.46%,但在80℃作用2 h后,其相对酶活仅剩6.08%。

2.3 pH值对酶活的影响

以不同pH缓冲溶液将酶液稀释,并在不同pH值下测定酶活,所得结果见图5。

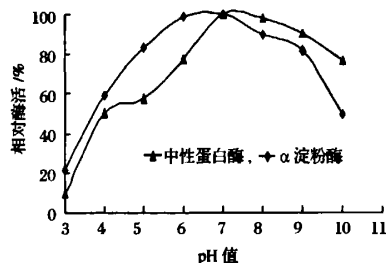


图5 pH变化对酶活的影响

由图5可以看到,中性蛋白酶在pH7~8时酶活最高,而 α -淀粉酶的最适pH为6~8。

2.4 盐分对酶活的影响^[4]

向酶液中添加不同量的NaCl,使酶液的盐浓度为2%,4%,6%,8%,10%,12%,14%,16%,于40℃保温1 h后,分别测定其中性蛋白酶及 α -淀粉酶酶活。结果见图6。

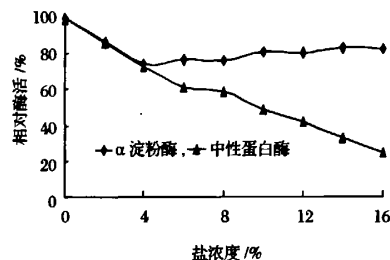


图6 盐浓度变化对酶活的影响

由图6可见,中性蛋白酶随着盐浓度的增加,酶活持续降低; α -淀粉酶在0%~4%的盐浓度范围内酶活降低与盐浓度的增加相一致,盐浓度超过4%, α -淀粉酶活性相对稳定。

3 结论

(1) 综合考虑中性蛋白酶和 α -淀粉酶的产酶时间曲线以及经济因素,米曲霉40188的制曲时间选择在50~72 h。

(2) 米曲霉40188中性蛋白酶和 α -淀粉酶在40℃,酶活都很稳定,但 α -淀粉酶的热稳定性比中性蛋白酶强。在50℃作用3 h,其中性蛋白酶相对酶活仅为13.55%,在70℃作用5 h后,其 α -淀粉酶相对酶活仍有23.46%,在80℃作用2 h后,其相对酶活为6.08%。

(3) 米曲霉40188中性蛋白酶的最适pH为7~

8, α -淀粉酶在 pH6~8 都有较高的酶活。

(4) 米曲霉 40188 中性蛋白酶的耐盐性不如 α -淀粉酶。其中性蛋白酶活性随着盐浓度的增加而不断下降, α -淀粉酶活性在盐浓度增加到 4% 时, 其活性不再持续下降, 保持在一个稳定的水平。

参考文献

- 1 上海市酿造科学研究所. 发酵调味品生产技术(第二版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999

- 2 刘金霞. 酱油酿造过程中米曲霉酶系的影响因素[J]. 江苏调味副食品, 2002, 73(2): 10~11
- 3 林祖申. 米曲霉制曲过程中酶活性变化及其工艺优化[J]. 中国酿造, 2007, 170(5): 56~59
- 4 Ruohang Wang, Rocky Chau Sing Lawb, Colin Webb. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 217~227

Study on Neutral Protease and α -Amylase Activity of *Aspergillus oryzae* 40188

Zhang Yanfang, Tao Wenyi

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Study carried out on the properties of neutral protease and α -amylase. It is found that the enzyme activity of neutral protease and α -amylase decrease with the temperature rise after the temperature is higher than 40°C. The optimum pH of neutral protease is between 7.0 and 8.0 and α -amylase is from 6.0 to 8.0. The enzyme activity of neutral protease decreased with the increase of sodium chloride concentration. The enzyme activity of α -amylase is stable after the sodium chloride concentration increase to 4%.

Key words *Aspergillus* 40188, neutral protease, α -amylase

信息窗

大蒜加工废水处理难题被攻克

经过曲阜师范大学课题小组近一年的攻关, 大蒜加工蒜片产生的废水难处理这一难题被攻克。不但实现了废水的循环利用, 还从中提取了大蒜多糖和大蒜素等高端产品, 解决了大蒜深加工的“瓶颈”问题。

大蒜加工废水里含有的大蒜素, 是废水难以降解的“元凶”, 但这又是宝贵的医药原料。课题攻关小组采用分子印迹分离技术和膜分离技术, 对废水进行多级分离处理, 终于取得重大突破, 并成功申请了从废水中提取大蒜素和大蒜多糖两项国家发明专利。经过两个多月的工业化试生产, 实现了废水的回收利用和零排放, 达到了工业化生产的技术要求。专家经实地考察论证, 认为技术成熟, 可以推广。

会讯

壳聚糖功能化应用专家研讨会在上海隆重召开

2008年5月23~24日, 由中国化学会甲壳素专业委员会主办, 武汉大学甲壳素研发中心协办, 上海争锋生物科技有限公司承办“壳聚糖及其衍生物功能化应用”专家研讨会在上海科学会堂召开。

本次会议以国内外最新的壳聚糖的研究成果为主题进行了交流。中国化学会甲壳素专业委员会杜予民主任、日本国立专业科学与技术研究所 S. AIBA 教授、台湾海洋大学陈荣辉教授、中国海洋大学生命科学院刘万顺教授、北京大学生命科学中心卢永军教授、深圳大学化学与化工学院吴奕光教授、广州暨南大学材料与工程系主任周长忍教授、华东理工大学化学与分子工程学院副院长张文清教授等十多所国内外知名学府的 10 多位专家出席了研讨会并作了演讲。

会上各位专家分别就壳聚糖及其衍生物的功能化应用发表了自己的见解。日本国立专业科学与技术研究所 S. AIBA 教授讲述了壳聚糖在日本的广泛应用, 特别是在特定保健用食品方面的应用作了详细的交流。来自台湾的陈荣辉教授介绍了近 2 年来台湾在这个领域中的新的发现, 特别提到了壳聚糖及其衍生物对抑制肿瘤的效果。杜予民主任对于壳聚糖及其衍生物研究与功能化应用作了系统和非常详细的介绍, 国内的很多的成果已经达到和超过世界的先进水平, 发展前景非常喜人。