

微生物凝乳酶的研究

I. 菌株的筛选、发酵、制备及毒性

郭光远 姜成林 马俊

(云南省微生物研究所, 昆明)

摘要 从土样和湖泊底泥中分离到 2502 株微生物, 从中筛选到一株细菌和一株真菌, 经诱变处理, 凝乳酶活力分别为 10000 u 和 5000u/g 以上。对高产菌株的发酵条件、酶制备条件及毒性进行了研究。

关键词 微生物凝乳酶; 筛选; 发酵; 制备

凝乳酶是制乳酪的关键性酶, 其作用是切断 K-酪蛋白的苯丙氨酸 105-甲硫氨酸 106 之间的肽键, 释放出带电的糖大肽及副-K-酪蛋白, 使胶囊丧失稳定性; 而后在钙离子存在下使牛奶凝聚, 形成凝块。凝乳酶的传统来源是从仔牛皱胃提取。1964 年, 发现在微小毛霉 (*Mucor pusillus*)^[1] 等微生物中也产生凝乳酶, 国外对此已进行了大量研究。目前全世界凝乳酶的年产值约一亿美元以上, 占各类酶总产量的 15%, 市场供应仍然紧张。迄今我国还

未见研制这种酶的报道。我们在进行云南不同地区放线菌区系及资源考察的过程中, 对所分离到的 2502 株放线菌, 真菌、细菌进行了凝乳酶产生菌的筛选, 其中两个菌株 (Y 85-8501, Y 85-8512) 经诱变处理后酶活力分别高达 10000 u/g 以上、5000 u/g 以上。本文报告这两

云南省应用基础研究基金资助的课题。

中国科学院昆明动物研究所刘爱华等同志做动物试验; 云南省卫生防疫站做食品卫生检验; 方儒祺同志提供部份菌株, 在此一并致谢。

株菌的部分研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株来源

在昆明、元江、中甸等地区和滇池、洱海等七个高原湖泊采集土样、湖底泥和水样,用酵母膏麦芽膏琼脂等^[2]五种培养基分离放线菌,用马丁培养基分离真菌,用营养琼脂分离细菌。

(二) 产酶菌株的筛选

1. 液体培养: 黄豆粉 20 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 20 g, 淀粉 5 g, NaCl 4 g, CaCO₃ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 5 g, 水 1000 ml, pH 7.8。28℃ 摇瓶发酵 3—4 天, 测定凝乳酶活性。

2. 固体培养: 麦麸 100 g, 蔗糖 10 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 水 80 ml 拌匀。28℃ 培养 3 天, 加水提取测定凝乳酶活性。

(三) 高酶活菌株的发酵条件

1. 液体发酵: 麦麸 20 g、NaCl 5 g、Mg · SO₄ · 7H₂O 5 g、KH₂PO₄ 2 g、CaCO₃ 3 g、水 1000 ml, pH 自然。接种斜面种子, 摇瓶培养 (28℃, 400r/min) 3 天。

2. 固体发酵

① 液体种子: 麦麸 30 g、NaCl 5 g、Mg · SO₄ · 7H₂O 5 g、KH₂PO₄ 2 g、CaCO₃ 3 g、水 1000 ml, pH 自然。接种斜面种子, 28℃ 摇瓶培养 1 天。

② 固体发酵培养: 麦麸 100 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.4 g。称取一定量的固体培养基加其重量 70% 的水, 拌匀, 1 kg/cm² 高压蒸汽灭菌。稍冷却后接种上述种子液, 接种量为固体培养基干重的 5%、再加无菌水, 使水与干基的比例为 1。28℃、浅盘或三角瓶内发酵 3 天。

(四) 凝乳酶活力测定

脱脂奶粉液的制备: 称取市售奶粉 12.5 g 溶于 100 ml 水中, 加入 0.02% CaCO₃, 4000 r/min 离心 30 分钟, 弃掉上层奶油和沉淀, 测定前加入 0.01 M CaCl₂。

测定方法: 0.5 ml 酶液加入 5 ml 脱脂奶粉

液(上述试剂需 35℃ 保温 10 分钟) 记录反应开始至凝乳出现的时间。一分钟使奶粉液凝固所需酶量为 400 个酶活力单位^[3]。

(五) 蛋白酶活力测定

用福林法测定蛋白酶活性^[3,4]。

(六) 糖化酶活力测定

用碘量法测定糖化酶活力^[4]。

结 果 和 讨 论

(一) 凝乳酶产生菌的筛选

对云南省滇中高原、元江干热河谷、中甸白芒雪山以及七个高原湖泊等各种不同生态环境分离到的各类放线菌、真菌、细菌进行凝乳酶产生菌的筛选, 结果见表 1。

从 2127 株放线菌筛选的初步结果表明, 62% 的高温链霉菌菌株产生凝乳酶, 产酶活力较高 (100u/ml) 的菌株占 5.2%; 中温链霉菌有 11.3% 的菌株产酶, 活性较高的占 2.2%。小单孢菌、诺卡氏菌、马杜拉放线菌、高温放线菌也都有产生凝乳酶活性较高的菌株。尽管水生放线菌产酶菌株的比例较高, 但高活力菌株则多数来自土壤放线菌。

对 215 株真菌的筛选结果表明, 有 9.8% 的菌株产凝乳酶。细菌有 8.8% 的菌株产凝乳酶, 活性较高的占 3.1%。

对 56 株酶活力超过 100 u/ml 的菌株进行了反复比较, 最后选定一株毛霉 (*Mucor* sp.) 代号 Y 85-8512 和--株芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 代号 Y 85-8501 作出发菌, 经诱变选育得到产酶稳定的高产菌株。

(二) 高酶活菌株不同发酵条件的酶活力

1. 液体发酵: 500 ml 三角瓶装 50 ml 液体发酵培养基, 摇瓶培养 3 天, 菌株 Y 85-8501 发酵液的酶活力为 3200 u/ml; 菌株 Y 85-8512 发酵液无酶活力。

2. 固体发酵: 菌株 Y 85-8501 每克麸曲 (干基) 的酶活力平均为 10240 单位, 菌株 Y 85-8512 平均为 6000 单位。

(三) 菌株 Y 85-8512 发酵条件与产酶的关系

表1 各类微生物产生凝乳酶的菌株

菌 株	昆 明			元 江			中 甸			湖 泊			总 数		
	T	P	H	T	P	H	T	P	H	T	P	H	T	P	H
链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>) 高温中温	332	64	4	490	25	10	57	16	5	269	187	12	326	203	17
放线菌													1166	132	26
孢囊放线菌属 <i>Actinosporangium</i>				2	0								2	0	
小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	66	0		8	0		14	2	2	146	7		234	9	2
小双孢菌属 <i>Microbispora</i>										1	0		1	0	
小多孢菌属 <i>Micropolyspora</i>				1	0								1	0	
马杜拉放线菌属 <i>Actinomadura</i>	8	0		10	1	1	10	1	1	264	0		292	2	2
诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>				9	1		6	1	1	6	0		21	2	1
糖多孢菌属 <i>Saccharo-polyspora</i>	10	0		12	0		15	1		18	4		55	5	
红球菌属 <i>Rhodococcus</i>				6	0								6	0	
链孢囊菌属 <i>Strepto-sporangium</i>				1	0								1	0	
糖单孢菌属 <i>Saccharo-monospora</i>										2	2		2	2	
小四孢菌属 <i>Microtetraspora</i>										6	0		6	0	
高温放线菌属 <i>Thermoactinomyces</i>										14	1	1	14	1	1
总数(%)	416	64	4	539	27	11	272	38	18	908	227	16	2127	356	49
		14	1		5	2		14	6.6		25	1.8		17	2.3
真菌(%)	19	19	2	16	2		180	0	0				215	21	2
			10.5		12.5									9.8	0.9
细菌(%)	41	6	2	97	6	3	22	2	0				160	14	5
														8.8	3.1

T = 试验菌株数; P = 产酶菌株数; H = 高活性菌株数

1. 接种量对产酶的影响: 500 ml 三角瓶装 50 g 培养基, 用液体摇瓶培养 24 小时的菌丝体悬浮液和固体发酵七天的孢子悬浮液作种子, 试验不同种子、不同接种量对产酶的影响 (表 2)。在所试用量的范围内, 液体种子 10% 的接种量发酵 72 小时酶活力最高, 接种量增加到 30%, 酶活力不再增加; 接种 0.5% (以种曲和麸料的重量计) 的固体孢子悬液, 酶活力可达 6300 u/ml, 增加接种量反而使酶活力降低。

表2 接种量对产酶的影响

接种量(%)		孢子悬浮液			菌丝悬浮液		
		0.5	2	3	5	10	30
酶活力 (u/g)	62小时	6300	4800	4688			
	72小时	3665	4032	4200	6982	7680	7680

2. 浅盘发酵厚度对产酶的影响: 用瓷盘装 2 cm、3 cm、5 cm、7 cm 四种不同厚度的固体培养基, 测定培养基厚度对产酶的影响。四种厚度的发酵结果分别为: 7915 u/g、7117 u/g、5578 u/g 和 5032 u/g。以上结果可见, 浅盘发

酵培养基越薄越利于产酶。生产上宜采用 3 cm 左右厚度。

用浅盘发酵了 10 批以上 (每批料 1—2 kg) 得到大致相同的结果。

3. 培养基发酵前后的营养分析: 对六批不同来源, 不同粗细的麦麸进行了发酵前后蛋白质、糖等主要营养成分分析。结果表明, 不同麦麸发酵后还原糖均普遍增加, 总糖消耗 8.33—15.95%, 蛋白质含量变化不大。麦麸平均消耗 15%。发酵后废料可作饲料利用。

(四) 菌株 Y 85-8512 发酵物的提取条件

1. 提取温度的影响: 发酵物均匀混合, 加四倍水拌匀, 在 28℃、室温 (10—20℃)、4℃ 温度下静置提取 12 小时。结果表明, 28℃ 提取、提取液酶活力最高, 折合每克发酵物 5828 单位; 4℃ 提取, 酶活力为 4080 u/g; 室温提取, 酶活力为 5100 u/g。28℃ 提取效果最好。

2. 提取时间的影响: 发酵物加四倍水拌匀, 室温下静置提取 0.5、5、10、12、16、20、24 小时后分别测定酶活力。在所试时间内, 除提取

时间为0.5小时提取液酶活力偏低外,其余的提取时间内提取液酶活力差别不大。发酵物以提取10小时酶活力最高,为5486 u/g。生产上以提取10小时较为合适。

3. 加水量的影响: 发酵物分别加4、5、6倍水提取12小时测定酶活力为: 6144 u/g、6885 u/g、7058 u/g, 可见提取时加6倍水产量最高。但考虑到酒精用量、宜用4倍水提取。

4. 干燥发酵物的保存时间: 发酵物45℃烘干, 分别置于冰箱(4℃)和室温(10—25℃), 保存两个半月内发酵物的酶活力基本无变化, 保存4个月酶活力降低17%。

(五) Y 85-8512 粗酶的制备

1. 制备温度与酶收率的关系: 提取液用二倍酒精在不同温度下进行沉淀, 制备粗酶粉, 再测定冰冻干燥后的粗酶粉的酶活力, 比较制备前后酶的收率。在0℃和-25℃条件下制备, 酶收率均为90.9%; 而在20℃制备, 酶收率仅为57.7%。因此认为, 低温是酶制备的关键条件。

2. 酒精用量与酶的收率: 提取液用1—4倍的酒精在相同的温度(15℃)下制备粗酶(表3)。从酶的收率可见, 酒精用量以二倍为宜。在生产时、建议用二倍酒精于0℃以下制备酶粉, 可得90%的收率。

表3 酒精用量对酶收率的影响

酒精:提取物	1:1	2:1	3:1	4:1
收率(%)	50	77.4	79.1	81.1

(六) Y 85-8512 发酵物的蛋白酶活力与糖化酶活力

用提取液测定, Y 85-8512 的糖化酶活力为23.2 u/ml。蛋白酶活力为7 u/ml。蛋白酶活力与凝乳酶活力的比率为228.6。

用 Arima 方法^[3]测定, 菌株 Y 85-8512 的水解蛋白的 OD 值($\lambda = 600 \text{ nm}$)与凝乳酶活力的比率为5776。

(七) 毒性试验及食品卫生检验

Y 85-8512 酶粉用1, 50, 100 $\mu\text{g/g}$ 体重三个剂量灌胃小鼠做的试验表明, 三种剂量均未引起小鼠骨髓细胞微核率和姐妹染色单体交换率的增加。 $p > 0.05$ 值表明该酶无明显的致突变效应。试验小鼠灌胃后亦无可见的毒性反应。

该酶经云南省卫生防疫站检验三批的结果认为, 该酶的细菌总数, 大肠杆菌群, LD_{50} 均符合有关参议标准, 不含重金属, 可进行试生产。我们在云南路南及内蒙有关单位使用该酶来凝固牛奶, 均收到良好效果。

参 考 文 献

- [1] Arima, K.: United States Patent 3, 151, 039. 1964.
- [2] 姜成林、徐丽华: 微生物学通报, 12: 218—220, 1985.
- [3] Arima, k. et al.: In Methods in enzymology, Academic Press, New York and London, 19: 446—458, 1970.
- [4] 中华人民共和国轻工业部: 工业用糖化酶, 蛋白酶质量标准, 1979.