

微生物产生大豆蛋白凝固酶的研究

1. 菌种的分离筛选及产酶条件的研究

刘 勇 姜 成 林

(云南省微生物研究所,昆明)

摘要 从 141 份土壤样品中筛选到一株产大豆蛋白凝固酶的细菌,在适宜的发酶条件下,酶活力可达 0.6—1u/ml。酶反应的最适温度为 70℃、pH 为 5.5。在 45℃、pH6.3—8.0 条件下,酶活力稳定。

关键词 大豆蛋白凝固酶;产酶条件

食用大豆及其制品在我国已有悠久历史,由于大豆的蛋白质优质并含大量的不饱和脂肪酸,因此具有较高的营养价值和医疗保健价值,对它的进一步开发利用越来越受到重视。大豆制品中的豆腐是我国人民非常喜爱的食品之一。传统上常用盐卤、石膏点制而成。近年来曾报道采用有机酸或葡萄糖酸 δ 内脂等作为凝固剂的新型加工方法^[1-2]。此外,用植物、微生物产生的酶凝固大豆蛋白,以便能大幅度改善品质,提高营养价值,获得口感及质地优良的豆腐已见诸文献^[3]。同时将为新大豆制品(如豆奶酪等)的开发提供优质凝固剂。日本学者曾开发出一株大豆蛋白凝固酶产生菌,其酶活力为 0.16u/ml^[4]。本文报告从 3845 株细菌、放线菌和真菌中筛选到一株产大豆蛋白凝固酶活性较高的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) LY-3655 的菌种分离、筛选及其产酶条件的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 土样来源

昆明地区 85 份,滇东北 18 份,滇西南 18 份,滇西温泉 20 份,共计 141 份。

(二) 培养基

1. 菌种保藏及转代培养基(%): 蛋白胨 0.5,牛肉膏 0.3 NaCl 0.5,琼脂 1.5, pH7.2。

2. 分离培养基(%): 豆饼粉 10,蔗糖 2,琼脂 2, pH7.2。

3. 基础摇瓶发酶培养基(%): 麦麸 6,豆饼粉 4, Na_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.3, CaCl_2 0.05, pH7.2。

(三) 菌种分离

按常规土壤稀释分离法。

(四) 产酶菌株的筛选

1. 初筛: 直接挑取平皿菌落接种于 4ml 5%(W/V)灭菌的豆浆管中, 37℃下培养 24 小时, 观察豆浆的凝聚状况。继而添加石蕊试剂鉴别并除弃非酶作用的酸凝管。

2. 复筛: 将显示具有大豆蛋白凝固酶的菌株接入发酶培养基中, 于适宜温度条件下经 230r/min 振荡培养 48 小时, 滤液测酶活。

(五) 酶活力测定

1. 底物的制备: 取适量大豆加两倍水, 于

云南省应用基础研究基金资助项目。

28℃浸泡14小时,复加4倍量的水磨成糊状,过滤后用2.5倍55℃的热水浸提两次,合并滤液,煮沸两分钟。使豆浆终浓度为7度,保持自然pH值6.2,备用^[4]。

2. 酶活力测定: 参照 Arima 法^[6], 0.5ml 酶液加到 5ml pH6.2 的豆浆中, 65℃ 反应。在上述条件下, 1 分钟凝固 5ml 豆浆的酶量定义为 1 个酶活单位。

结果和讨论

(一) 分离和筛选结果

从 141 份土壤中分离到 3845 株细菌、放线菌和真菌。初筛结果, 产生大豆蛋白凝固酶活性较为明显的 4 株菌均为细菌。经采用 Arima 等酶活力测定方法反复测试, 复筛出产酶稳定, 凝固酶活力最高的一株芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.), 编号为 LY-3655。

(二) 最适产酶发酵条件

1. 麦麸用量对产酶的影响: 基础发酵培养基中, 添加不同量麦麸 35℃ 下培养 48 小时(下同)的试验结果表明, 麦麸用量在 1.5—2.5% 范围内酶活力最高, 为 0.5u/ml。

2. 不同碳源代替麦麸对产酶的影响: 基础发酵培养基中, 分别加入 6% 不同碳源代替麦麸的试验结果见表 1。表明以乳糖作碳源时酶活力最高, 为 1u/ml; 葡萄糖次之, 为 0.4u/ml。

表 1 不同碳源代替麦麸对产酶的影响

碳源(6%)	终止 pH	酶活力 (u/ml)
葡萄糖	7.5	0.40
蔗糖	6	0.16
果糖	6	0.33
麦芽糖	9	0.32
玉米粉	9	0.29
可溶性淀粉	9	0.25
糊精	9	0.33
麦麸	9	0.29
乳糖	6	1.0

3. 豆饼用量对产酶的影响: 基础培养基中, 添加不同量豆饼的试验结果表明, 豆饼用量在 0.5—2.5% 范围酶活力最高, 为 0.44u/ml。

4. 不同氮源代替豆饼对产酶的影响: 在以 6% 乳糖作碳源条件下, 分别加入不同量的各种氮源的试验结果表明, 豆饼及其水解液具有选择性促进产酶的作用。酶活力分别为 1 及 0.57u/ml。无机氮(硫酸铵、氯化铵、硝酸钠、硝酸钾等)及肉膏、豚均对产酶不利。提示此酶为诱导酶。

根据以上结果, 最适发酵培养基的组成(%): 麦麸 2.5, 豆饼 0.5, Na_2HPO_4 0.4, KH_2PO_4 0.3, CaCl_2 0.05, pH6.4。用此培养基摇瓶发酵多次, 酶活稳定, 均在 0.4—0.5 u/ml 之间。

5. 发酵培养基起始 pH 对产酶的影响: 在最适发酵培养基条件下, 不同起始 pH 的试验结果表明, 起始 pH 值在 6.0—6.4 范围酶活力最高, 为 0.5u/ml (表 2)。

表 2 不同起始 pH 对产酶的影响

起始 pH	终止 pH	酶活力 (u/ml)
自然(6.4)	7.5	0.50
4	4.5	0
5	6	0
6	7	0.50
7	8	0.40
8	8.5	0.40
9	9	0.22
10	9.5	0.14

6. 不同通气量对产酶的影响: 在 250ml 三角瓶中分别盛入 15、25、50、75 和 100ml 最适发酵培养基的试验结果表明, 15ml 装量的条件下酶活力最高, 为 0.5u/ml。通气量对产酶的影响不十分明显。

7. 不同接种量对产酶的影响: 在最适发酵培养基条件下, 接入摇瓶培养 24 小时的新鲜菌液, 不同接种量的试验结果表明, 接种量为 5% 时酶活力最高, 为 0.55u/ml。

8. 不同培养温度对产酶的影响: 在最适发酵培养基条件下, 不同培养温度的试验结果表明, 温度在 37—41℃ 范围酶活力最高, 为 0.6 u/ml。

9. 培养时间与产酶的关系: 37℃, 以 5% 的种量接入最适发酵培养基中, 培养 18—72 小

时,依次测定酶活力和 pH 值的试验结果表明,培养 42—48 小时时酶活力最高,为 0.6u/ml。此时, pH 值相应达到高峰(图 1)。

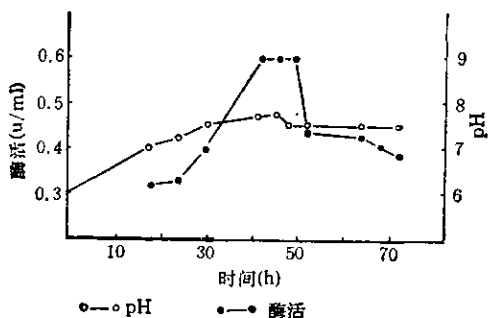


图 1 培养时间与产酶的关系

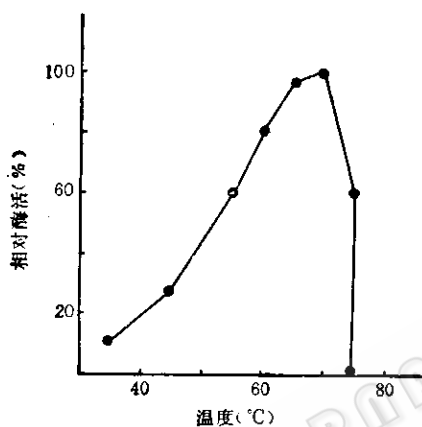


图 2 酶反应的最适温度

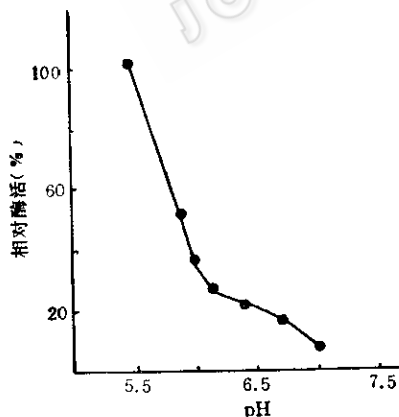


图 3 酶反应的最适 pH

(三) 发酵液的酶学性质

1. 反应的最适温度: 不同温度条件下测酶活力的试验结果表明, 最适反应温度为 70°C。超过此温度酶活力急剧下降(图 2)。

2. 反应的最适 pH: 将底物调为不同的 pH 值, 65°C 下测酶活力的试验结果表明, pH 5.5 时酶活力最高, 并随 pH 升高而降低 (pH 5.4 时豆浆自凝)(图 3)。

3. 温度稳定性: 将酶液在不同温度下保温 30 分钟, 65°C 测酶活力的试验结果表明, 45°C 下酶稳定, 至 55°C 酶活力仅剩 70% (图 4)。

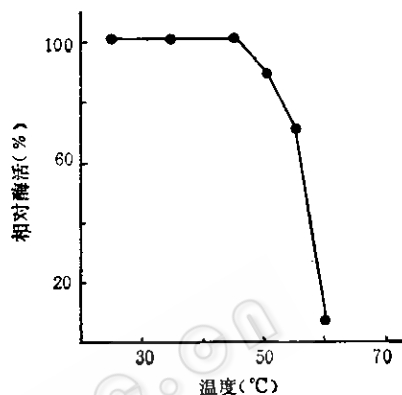


图 4 酶的热稳定性

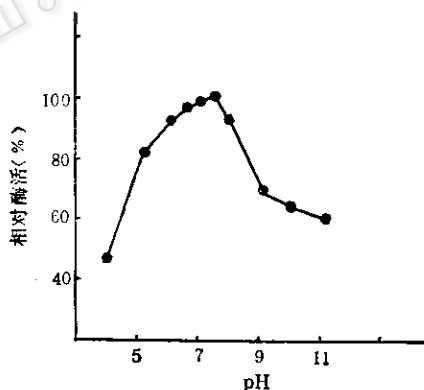


图 5 酶的 pH 稳定性

4. pH 稳定性: 取 0.5ml 酶液与等量不同 pH 值的缓冲液混合后, 35°C 分别保温 1 小时。然后再调节 pH 至 6.4, 65°C 测酶活力。试验结果(图 5)表明酶液在 pH 5.8—8.0 范围时较稳定, 剩余酶活力仍保持 90% 以上; pH 11 时剩余酶活力仅为 60%。

LY-3655 菌株产生一种大豆蛋白凝固酶。在以麦麸、豆饼为主要成分的培养基, pH 6.4, 37°C, 通气良好的条件下, 培养 42—48 小时, 酶活力达到 0.6u/ml, 产酶稳定。凝固后的豆腐

质地细腻, 结构均匀, 成型好。酶学性质的研究、毒性试验以及酶的应用正在进行中。

参 考 文 献

1. 上野隆生: 特公昭, 53-37424.
2. Masaki Terada et al.: US Patent, 4427710, 1984.

3. K Murata et al.: *Agric Biol. Chem.*, **51**(11): 2929—2933, 1987.
4. Y W Park et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**(11): 3215—3219, 1985.
5. 张振山等: 豆制品生产工艺与设备, 第 47—57 页, 中国食品出版社, 北京, 1988.
6. K Arima S Iwasaki and G Tamura.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**(5): 540—545, 1967.