

# 毛霉的产蛋白酶发酵条件优化

郑晓婷 赵新淮\*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 从发酵豆制品中分离出 1 株产蛋白酶性质优良的毛霉 M2, 并研究 M2 菌株的产蛋白酶条件。研究优化得出该毛霉菌株的产酶培养基条件为: 氮源为大豆分离蛋白, 碳源为葡萄糖, 无机盐为磷酸二氢钾、氯化钙和氯化镁; 它的适宜的产酶发酵条件为: 培养温度为 28°C, 接种量为 2%, 300 mL 三角瓶的装液量为 100 mL, 初始 pH 为 5, 摇床转速为 150 r/min, 培养时间为 48 h; 发酵液蛋白酶活力可达 4.35 U/mL。凝胶电泳法测定出毛霉所分泌蛋白酶的分子量为 36.4 kD。

**关键词:** 毛霉, 蛋白酶, 发酵条件

## Optimization of Fermentation Conditions for Proteases Produced by *Mucor*

ZHENG Xiao-Ting ZHAO Xin-Huai\*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** A strain of *Mucor* named M2, which could produce protease, was isolated from a traditional fermented soybean product. Culture conditions of proteases produced by M2 were studied therefore. The results showed that nitrogen source and carbon source preferred for protease production were soybean protein isolate and glucose, while inorganic salts preferred were  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$ . The suitable culture conditions for protease production were as follows: culture temperature was 28°C, inoculation volume was 2%, liquid level was 100 mL in 300 mL triangle bottle at pH 5, rotating speed was 150 r/min and culture time was 48 h. The obtained protease activity in culture was about 4.35 U/mL. The protease produced by *Mucor* was analyzed with SDS-PAGE. The protease had a molecular weight of 36.4 kD.

**Keywords:** *Mucor*, Protease, Fermentation condition

发酵豆制品在我国已有几千年的历史。一些研究发现, 发酵豆制品不仅味美、营养丰富, 而且具有降低胆固醇、降血压、抗氧化等多种保健功能<sup>[1]</sup>。毛豆腐是我国特有的一种大豆发酵食品, 它是豆腐经自然发酵制成, 利用微生物的发酵来改变大豆蛋白的质地与风味, 以独特的工艺、细腻的品质、丰富的营养及鲜香可口的风味深受消费者喜爱<sup>[2]</sup>。

在工业用酶当中, 蛋白酶是用量最大、应用最广的一种, 约占整个酶制剂产量的 60% 以上, 广泛应用于食品、饲料、纺织和洗涤等领域<sup>[3]</sup>。食品生产用蛋白酶分为动物蛋白酶、植物蛋白酶、微生物蛋白酶, 其中微生物具有资源广泛、生长繁殖快和培养方法简单等优点, 所以, 采用发酵工程技术生产蛋白酶, 原料便宜, 不受土地和季节的限制, 是

\* 通讯作者: ✉ zhaoxh@mail.neau.edu.cn

收稿日期: 2008-07-08; 接受日期: 2008-09-09

生产蛋白酶的优良方法<sup>[4]</sup>。用于食品加工的蛋白酶可以由多种菌种生产,其中,我国传统发酵豆制品毛豆腐制作所用毛霉具有分泌蛋白酶、肽酶及其它酶系的功能,能进行蛋白质的降解<sup>[5]</sup>,所产蛋白酶的酶系丰富,酶活力高,在各种调味品以及大豆多肽的制作过程中起着重要的作用。林亲录等曾研究分离于自然发酵腐乳的毛霉,结果表明该毛霉在麸曲固态培养 72 h 时蛋白酶活力最高,并且培养 24 h 后翻曲 1 次能显著提高酶活力,中性蛋白酶酶活达到 459.7 U/g 干曲<sup>[6]</sup>。侯美珍等则研究了曲种培养时间、培养温度及培养基成分对腐乳毛霉产蛋白酶的影响,发现酸性蛋白酶产量最大,而碱性蛋白酶的量最小,在 25°C 左右恒温培养 36 h~48 h,酶活 600 U/g 以上<sup>[7]</sup>。不过,国内对毛霉产蛋白酶发酵条件的优化研究报道较少。

本研究从自然发酵生产的毛豆腐中分离得到 1 株毛霉 M2,并且对它的产蛋白酶培养基组成和培养条件进行优化,确定该菌株的适宜产酶条件。同时,对所产生的蛋白酶分子质量进行 SDS-PAGE 分析。研究结果将对该菌株以及所产蛋白酶在生产中的实际应用,具有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌种

毛霉(*Mucor*),从自然发酵生产的毛豆腐中分离获得。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: PDA 培养基。

1.2.2 基础发酵培养基(g/L): 蛋白胨 20, 葡萄糖 10, 硫酸镁 2, 磷酸二氢钾 2。

### 1.3 培养基组成的确定

保持基础培养基其它组成不变,依次改变培养基的氮源、碳源和无机盐种类,等量接种 M2 菌液,28°C、150 r/min 摇床培养 48 h,测定发酵液中蛋白酶活力。

确定最佳氮源、碳源和无机盐后,选取均匀设计表  $U_{10}(10^{10})$ ,对它们进行均匀设计实验<sup>[8]</sup>。

### 1.4 产酶培养条件的确定

分别从培养温度、培养基初始 pH、接种量、摇瓶培养基装液量和摇床转速等进行单因素试验。

### 1.5 粗酶液的制备

培养 48 h 的发酵液用 60 目筛网滤去菌体,

5000 r/min 离心 20 min,收集上清液即得粗酶液<sup>[9]</sup>。

### 1.6 粗酶液的硫酸铵分级沉淀

除去菌丝和不溶杂质后的发酵液,加入不同量的硫酸铵,4°C 放置 12 h,离心后分析上清液中残留的蛋白酶活力,确定沉淀蛋白酶所需的硫酸铵饱和度。

### 1.7 蛋白酶活力测定

Folin-酚法(中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法 ZBX 66030-1987)。

### 1.8 蛋白酶分子量的测定

利用已经确定的硫酸铵饱和度对发酵液进行盐析以沉淀蛋白酶,然后对盐析物进行脱盐、浓缩。提纯的蛋白酶样品和低分子量标准蛋白进行 SDS-PAGE 分析<sup>[10]</sup>。标准蛋白分子质量范围 14.4 kD ~97.4 kD。

## 2 结果与讨论

### 2.1 M2 菌株酶活力曲线的测定

在 100 mL 的发酵培养基中接种 M2 菌株,在 28°C、150 r/min 的振荡培养箱中培养,每隔 12 h 测定发酵液的蛋白酶活力,结果见图 1。

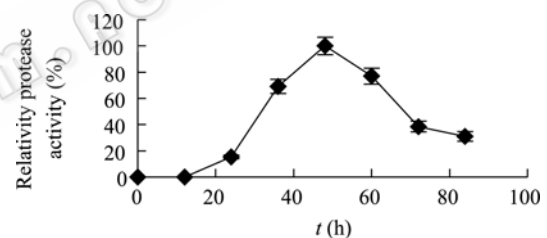


图 1 菌株的酶活力曲线

Fig. 1 Protease activity produced by strain M2 in liquid culture

M2 菌株所产蛋白酶的酶活力在 48 h 达到最大,之后呈下降。所以选择培养 48 h 来测定蛋白酶活力。

### 2.2 M2 菌株产酶培养条件的确定

2.2.1 氮源种类: 基础培养基中分别添加浓度为 2% 的不同氮源,它们对蛋白酶活力的影响见图 2。

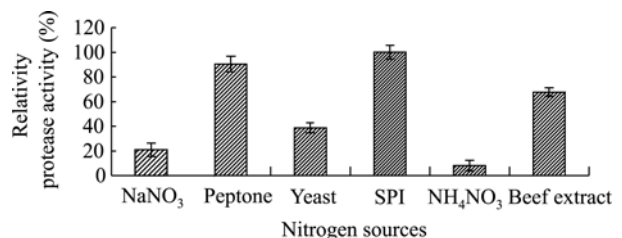


图 2 不同的氮源对酶活力的影响

Fig. 2 The effects of nitrogen sources on protease activity produced by strain M2

添加大豆分离蛋白(SPI)的培养基中蛋白酶活力最高, 余下其次是蛋白胨和牛肉膏。添加硝酸钠和硝酸铵的培养基中蛋白酶活力较低。表明大豆分离蛋白等有机氮源更有利于 M2 菌株产蛋白酶。

**2.2.2 碳源种类:** 在基础培养基中分别添加浓度为 1% 的不同碳源, 它们对蛋白酶活力的影响见图 3。

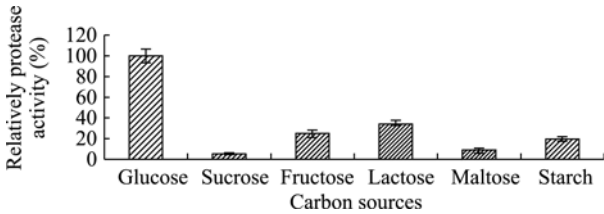


图 3 不同的碳源对酶活力的影响  
Fig. 3 The effects of carbon sources on protease activity produced by strain M2

结果显示, M2 菌株对碳源的利用广泛, 其中葡萄糖较其他碳源更有利于 M2 菌株产蛋白酶, 可能是葡萄糖对于蛋白酶的合成有诱导作用; 其他氮源不利于蛋白酶产生, 可能是它们的分解代谢物对蛋白酶有阻遏作用<sup>[11]</sup>。

**2.2.3 无机盐:** 在基础培养基中分别添加浓度为 0.2% 的不同无机盐, 以不添加无机盐为对照, 无机盐对蛋白酶活力的影响见图 4。

无机盐的种类对蛋白酶活力的影响很大。磷酸二氢钾和氯化钙可显著提高酶活力。钙离子可能是该酶合成的诱导剂, 镁离子是生物代谢途径中多种酶的激活剂。因此, 优化培养基中的无机盐应有磷酸二氢钾、氯化钙和氯化镁。这与一些研究报道相似<sup>[12,13]</sup>。

**2.2.4 培养基的优化:** 在确定氮源、碳源和无机盐

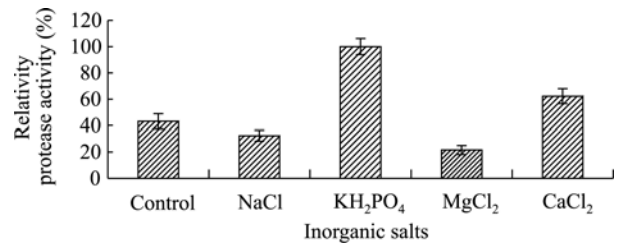


图 4 不同无机盐对酶活力的影响  
Fig. 4 The effects of inorganic salts on protease activity produced by strain M2

种类的培养基的基础上, 采用 U<sub>10</sub>(10<sup>10</sup>) 均匀设计实验对它们的配比进行了优化研究(表 1)。对实验结果(表 2)采用回归分析进行分析、优化处理, 得到如下的回归方程:

$$\text{生物量(g/L)} = 3.109 + 2.945X_1 - 2.765X_2 + 4.842X_3 + 2.423X_4 - 1.544X_5 - 1.724X_1^2 + 2.638X_1X_2 - 0.583X_2^2 - 2.94X_3X_1$$

(式中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub> 分别为大豆分离蛋白、葡萄糖、氯化镁、磷酸二氢钾、氯化钙的添加量)

根据回归方程得到优化的产酶培养基条件: 大豆分离蛋白 17 g/L、葡萄糖 14 g/L、氯化镁 2 g/L、磷酸二氢钾 2 g/L、氯化钙 6 g/L。采用优化的培养基得到的蛋白酶活力可达到 3.88 U/mL。

**2.2.5 培养温度对蛋白酶活力的影响:** 分别在 24°C、28°C、32°C 和 36°C 下进行培养, 测定发酵液蛋白酶活力, 结果如图 5。在 28°C 培养产生的蛋白酶活力较高, 可能是由于温度升高有利于生长代谢和蛋白酶的产生; 温度继续升高而酶活力降低, 可能是因为温度上升导致酶失活速度加快, 以及菌体易衰老而影响正常的生长和代谢。

表 1 因素水平表  
Table 1 Factors and levels of uniformity design

因素 Factors	水平 Levels									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
大豆分离蛋白 (g/L) Soybean protein isolate (SPI)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
葡萄糖 (g/L) Glucose	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
氯化镁 (g/L) MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
磷酸二氢钾 (g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
氯化钙 (g/L) CaCl <sub>2</sub>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

表 2  $U_{10}(U_{10}^{10})$ 优化 M2 菌株产蛋白酶培养基组成的试验结果  
Table 2 Results of uniformity design tested for medium compositions for proteases produced by strain M2

试验号 Number	大豆分离蛋白 SPI (g/L)	葡萄糖 Glucose (g/ )	氯化镁 MgCl <sub>2</sub> (g/l)	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ )	氯化钙 CaCl <sub>2</sub> (g/L)	酶活力 Enzyme activity (U/mL)
1	2	5	1.2	2	8	2.124
2	6	11	2.4	4	4	3.339
3	8	17	4.8	1.6	11	1.148
4	12	23	0.4	4.8	7	1.839
5	16	29	1.6	1.2	3	2.572
6	20	2	2.8	3.2	9	1.677
7	24	8	4	0.8	6	1.108
8	28	14	0.8	2.8	2	3.263
9	32	20	2	0.4	8	1.846
10	36	26	3.2	2.4	5	2.897

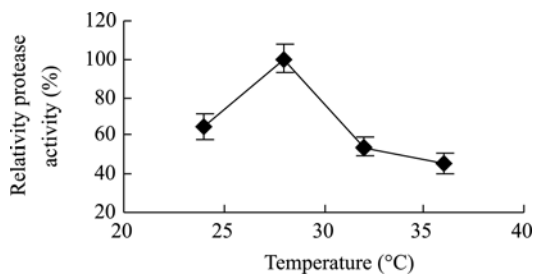


图 5 培养温度对酶活力的影响

Fig. 5 The effects of temperature on protease activity produced by strain M2

2.2.6 培养基初始 pH 对蛋白酶活力的影响: 调节培养基初始 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 9.0, 培养后测定发酵液的蛋白酶活力, 结果如图 6。当培养基的 pH 在 5 附近时蛋白酶活力最高, pH 增大酶活力逐渐减低, 说明在弱酸性培养基条件下 M2 菌株产蛋白酶活力较高。

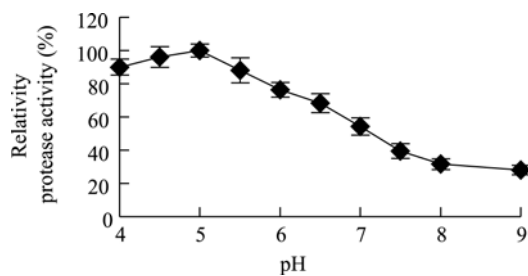


图 6 初始 pH 对酶活力的影响

Fig. 6 The effects of original pH of culture on protease activity produced by strain M2

2.2.7 接种量对蛋白酶活力的影响: 分别按照 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 的添加水平, 接种菌悬液(浓度约为  $3 \times 10^5$  个/mL)于培养基中进行培养, 测定发酵液蛋白酶活力, 结果如图 7。接种量对蛋白酶活力

影响较大, 接种量在 2% 时酶活力最大, 之后呈现下降。这可能是因为培养基中的菌体过多, 导致营养成分不能满足菌体正常生长代谢, 从而影响菌体产蛋白酶能力。

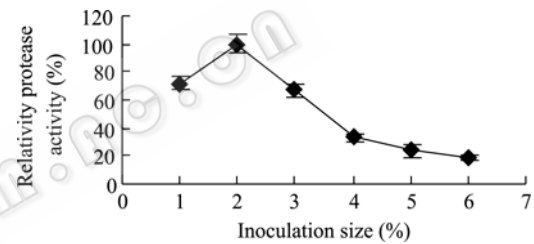


图 7 接种量对酶活力的影响

Fig. 7 The effects of inoculation size on protease activity produced by strain M2

2.2.8 装液量对蛋白酶活力的影响: 在 300 mL 三角瓶中分别装入 25 mL、50 mL、100 mL 和 150 mL 体积的培养基, 培养后测定发酵液蛋白酶活力, 结果如图 8。随着装液量的增加, 蛋白酶活力也随之增加, 当装液量为 100 mL 时, 蛋白酶活力相对较高; 装液量继续增大, 蛋白酶活力反而降低, 可能是三角瓶中溶解的氧浓度小, 导致菌体不能正常生长代谢, 从而影响 M2 菌株产酶。

2.2.9 摇床转速对蛋白酶活力的影响: 分别在 4 个摇床转速下进行培养并测定发酵液蛋白酶活力, 结果如图 9。摇床转速为 150 r/min 时, M2 菌株产蛋白酶的酶活力相对较高, 可能是在液体培养下需要大量氧气来满足菌体生长和产酶需要, 摇床转速提高导致溶氧浓度增大, 酶活力提高。当转速过高产生过度振荡等不利影响, 菌体生长和代谢受损使酶活力降低。

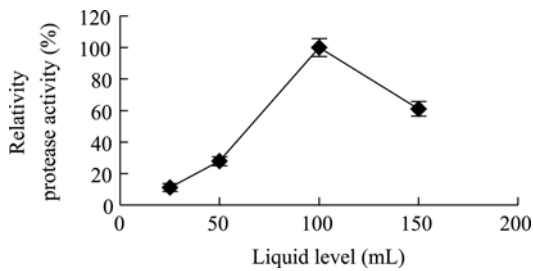


图 8 摇瓶装液量对酶活力的影响

Fig. 8 The effects of liquid level on protease activity produced by strain M2

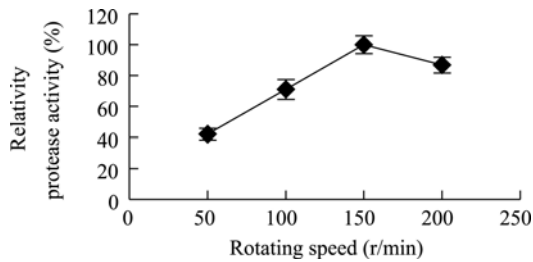


图 9 摇床转速对酶活力的影响

Fig. 9 The effects of rotating speed on protease activity produced by strain M2

利用上述所确定的诸优化条件可得到 M2 的适宜产酶发酵条件参数。试验结果表明, 在此优化条件下, 发酵液中 M2 菌株产蛋白酶的酶活力达到  $(4.35 \pm 0.12) \text{U/mL}$ 。

利用硫酸铵对发酵液中的蛋白酶进行盐析时, 硫酸铵饱和度为 10% 时有少量的沉淀出现, 上清液的蛋白酶活力仍有 90.6%; 当硫酸铵饱和度达到 70% 时上清液酶活力几乎为零, 说明蛋白酶基本被沉淀出来。所以, 选取 10% 和 70% 为硫酸铵分级沉淀的起始和终止饱和度。发酵液经硫酸铵分级沉淀、脱盐和浓缩后, 蛋白酶样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示有一个蛋白区带存在。通过凝胶成像系统软件 Labwork 4.5 分析, 得出此区带蛋白的分子质量约为 36.4 kD。

### 3 结论

本研究从自然发酵豆制品筛选得到 1 株产蛋白酶活力较高的毛霉 M2, 通过对 M2 产酶培养条件的研究, 确定产酶培养基的适宜氮源为大豆分离蛋白、适宜碳源为葡萄糖, 适宜的无机盐为磷酸二氢

钾、氯化钙和硫酸镁。采用均匀优化试验设计, 确定培养基组成为大豆分离蛋白 17 g/L、葡萄糖 14 g/L、氯化镁 2 g/L、磷酸二氢钾 2 g/L、氯化钙 6 g/L。在培养温度为 28°C, 初始 pH 为 5, 接种量为 2%, 300 mL 三角瓶的装液量为 100 mL 及转速为 150 r/min 的条件下培养 48 h, 有利于 M2 菌株产蛋白酶, 所产蛋白酶的酶活力可达到 4.35 U/mL 左右。M2 菌株发酵液中的蛋白酶经过分离、纯化后, 凝胶电泳分析可知其分子质量约为 36.4 kD。

### 参考文献

- [1] 陈九武, 杨 军. 发酵豆制品的保健功能. 大豆通报, 1998, 4: 25.
- [2] 傅金泉. 纯种发酵毛豆腐技术. 食品科学, 1994, 172 (4): 72-73.
- [3] 荆 谷, 冯 静, 孔 健, 等. 微生物金属蛋白酶研究进展. 生物工程进展, 2002, 22 (1): 61-63.
- [4] 王吉庄, 钟 芳, 王 璋. 高水解度大豆肽的制备. 食品工业科技, 2003, 24 (9): 40-42.
- [5] 李幼筠. 中国腐乳的现代研究. 中国酿造, 2006, 154 (1): 4-7.
- [6] 林亲录, 赵谋明, 邓 靖, 等. 毛霉产蛋白酶的特性研究. 食品科学, 2005, 26(5):44-47.
- [7] 侯美珍, 宋德贵, 韦平英. 时间及温度对腐乳毛霉生长及产蛋白酶的影响. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(4):97-100.
- [8] 王钦德, 杨 坚. 食品试验设计与统计分析. 北京: 中国农业大学出版社, 2003, pp.369-375.
- [9] 黄红英, 方海红, 刘爱民, 等. 一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究. 微生物通报, 2001, 28 (5): 20-24.
- [10] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2008, pp.43-75.
- [11] 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1998, pp.387-449.
- [12] 张 锐, 曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件研究. 微生物学通报, 2001, 28 (4):5-9.
- [13] Channe PG, Shewale JG. Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14 (1): 11-15.