

蛋白酶固定化条件优化及在酱醪发酵中的应用

吴惠玲^{1,3}, 魏鲁宁^{1,3}, 周紫琦², 袁国新^{1,3}, 颜喆^{1,3}, 潘海朋², 林康艺^{1,3}, 江晓波^{1,3}, 陈永泉², 胡文锋²
(1. 广东珠江桥生物科技股份有限公司, 广东中山 528415) (2. 华南农业大学食品学院应用微生物研究室, 广东广州 510642) (3. 广东省食品生物工程技术研究开发中心, 广东广州 510640)

摘要: 本文以海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、酶液与载体溶液体积比及固定时间为因素, 优化中性蛋白酶固定化工艺, 并将固定化中性蛋白酶凝胶颗粒应用于传统高盐稀态酱醪发酵, 以缓解高渗透压环境对酶的胁迫作用, 提高蛋白质利用率, 缩短酿造周期。结果显示: 当采用 0.007 M 海藻酸钠、0.27 M 氯化钙, 酶液与载体溶液体积比为 12:30, 固定 2 h, 固定化凝胶颗粒最稳定, 相对酶活力最高; 另外, 酱醪发酵数据显示, 酱醪总重 17.5 kg, 添加总酶量 5.80 g (1000 U/g 酶粉) 时, 外源游离蛋白酶和固定化蛋白酶试验组均能显著改善发酵过程各指标含量, 平均缩短发酵时间 20 d 左右; 与外源游离组相比, 固定化试验组效果更加显著, 蛋白质转化率较空白对照组与游离组分别提高达 6.08% 和 1.88%。因此, 在酱醪发酵过程添加固定化外源蛋白酶能有效提高高盐稀态酱油发酵蛋白质转化率, 同时缩短发酵周期。

关键词: 酱油; 高盐稀态; 蛋白酶; 固定化; 蛋白质转化率

文章编号: 1673-9078(2013)5-1080-1084

Optimization of Immobilization Conditions for Protease and Its Application in the Fermentation of Soy Sauce

WU Hui-ling^{1,3}, WEI Lu-ning^{1,3}, ZHOU Zi-qi², YUAN Guo-xin^{1,3}, YAN Zhe^{1,3}, PAN Hai-peng², LIN Kang-yi^{1,3}, JIANG Xiao-bo^{1,3}, CHEN Yong-quan², HU Wen-feng²

(1. Pearl River Bridge Biotechnology Co. Ltd., Zhongshan 528415, China) (2. Laboratory of Applied Microbiology, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (3. Research and Development Center of Food and Biological Engineering Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The aim of this research was to increase the protein conversion ratio and short the fermentation period of traditional Chinese soy sauce by using immobilization technics. The concentration of sodium alginate, calcium chloride, volume ratio of enzyme to carrier solution and immobilization time were selected as the factors to optimize the immobilization process of neutral protease powder, and the immobilized neutral protease powder was applied in the fermentation of high-salt liquid state soy sauce. The results indicated that the optimal immobilization process condition of immobilized gel particles with good stability and the highest relative enzyme activity were 0.007 M sodium alginate, 0.27 M calcium chloride, and the volume ratio of enzyme to carrier solution 12:30 after immobilizing for 2 hours. Contrast to the control group, the index contents of the dissociative and immobilized group added with 5.80 g neutral protease in 17.5 kg sauce mash were improved significantly during the fermentation process, and the fermentation period was shorten by about 20 days; and the protein conversion rate of the immobilized protease powder group was improved by about 6.08% and 1.88% respectively, compared to the control and dissociative enzyme group. It is concluded that the immobilized neutral protease powder could improve the protein conversion rate and shorten the fermentation period of the fermentation of high-salt liquid state soy sauce.

Key words: soy sauce; high-salt liquid state; protease; immobilization; protein conversion rate

传统方法酿制的酱油除作为调味品外, 还具有保健功能, 如抗氧化、抗癌、降血压、杀菌等^[1]。目前我国高档酱油主要采用高盐稀态发酵法进行生产, 首先利用米曲霉制曲, 之后盐水制酱醪, 在高盐环境下经长期发酵而成。期间, 微生物以及各种酶系共同作用, 发生复杂的生化反应, 如蛋白质水解、淀粉糖化、

酒精发酵和有机酸发酵、美拉德反应等。但是, 在高盐稀态环境中, 由于渗透压高, 微生物代谢活性或酶活很低, 从而导致发酵周期长、蛋白质利用率及氨基酸态氮出品率低^[2]。因此提高发酵过程中微生物或酶的活性很有必要。

近年来, 人们就如何提高酱油发酵蛋白质转化率和缩短发酵周期做了大量研究, 其中发酵过程添加外

收稿日期: 2013-01-18

源酶有正面影响。如史龙君^[3]及云秀芳等^[4]研究了添加纤维素酶对酱油发酵氨基酸态氮及蛋白质转化率的影响,获得了比较好的结果。

本文在前期研究基础上,在高盐稀态酱油发酵过程添加外源游离和固定化中性蛋白酶,希望能在提高中性蛋白酶活力的同时,利用固定化材料提供的保护作用,缓解高渗胁迫,维持长时间较高酶活,从而改善蛋白质转化率,缩短发酵周期。

1 材料与方法

1.1 原料

成曲和食用盐:由广东珠江桥生物科技股份有限公司提供;以大豆与面粉为原料,经浸泡、蒸煮、冷却,接种米曲霉(*Aspergillus oryzae*)沪酿3.042发酵36~48 h制曲。

海藻酸钠、无水氯化钙、氯化钠以及三氯乙酸等均为分析纯。

1.2 仪器设备

DK-S26 型电热恒温水浴锅;UV-1800 紫外分光光度计;LS-B75L-I 型立式高压蒸汽灭菌锅;松下冰箱;德尔搅拌机;蠕动泵;AL204 电子天平。

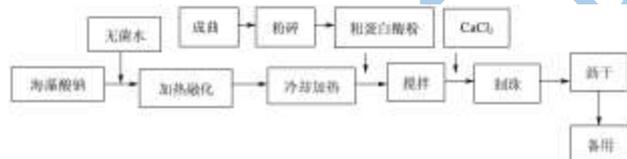
1.3 试验方法

1.3.1 中性蛋白酶

取一定量米曲霉制备的成曲,粉碎过60目筛,得中性蛋白酶粉,其酶活为1000 U/g,4℃冷藏备用。

1.3.2 中性蛋白酶的固定

中性蛋白酶固定流程如下:



称取一定量中性蛋白酶粉,加入15 mL 无菌蒸馏水,搅拌均匀,混入一定浓度的海藻酸钠溶液,再次搅拌均匀且无明显气泡。用蠕动泵将混合液挤出至一定浓度的氯化钙溶液中,-20℃固定一定时间后用无菌生理盐水冲洗2~3次,4℃冰箱保藏备用^[5-7]。

1.3.3 中性蛋白酶活测定

按照行业标准 SB/T 10317-1999 的方法测定酶活力^[8]。

1.3.4 酱醪发酵指标测定

总酸、氨基酸态氮及全氮检测按照 GB 18186-2000《酿造酱油》方法进行^[9]。

1.4 试验方法

1.4.1 中性蛋白酶粉固定化正交试验

在中性蛋白酶的固定过程中,海藻酸钠浓度决定了凝胶颗粒的成型和反应性能。浓度太低不易成珠;浓度过高会影响外界发酵液与酶充分接触;氯化钙浓度与固定化时间决定了凝胶颗粒的硬度和反应速度;酶液与载体溶液体积比间接决定了凝胶颗粒中酶活力大小^[10-11]。以上四因素设置三水平进行正交试验,得出最佳固定化工艺条件,因素水平见表1。

表1 中性蛋白酶固定化条件正交表

Table 1 The orthogonal table of immobilization conditions of neutral protease

水平	因素			
	A(海藻酸钠/M)	B(氯化钙/M)	C(酶液:载体溶液(V:V))	D(固定时间/h)
1	0.005	0.18	12:30	1
2	0.007	0.23	15:30	2
3	0.010	0.27	18:30	3

1.4.2 固定化中性蛋白酶稳定性

以下试验主要参考Cruz 等的方法进行^[12]。

1.4.2.1 热稳定性

取相同酶活单位的游离酶和固定化酶凝胶颗粒,分别置于35℃、40℃、45℃、50℃、55℃恒温水浴,保温10 min,取出后迅速冷却,测定酶活力。

1.4.2.2 pH的影响

取相同酶活力单位的游离酶和固定化酶凝胶颗粒,置于透析袋中,分别于pH值4、5、6盐酸溶液和pH值为8和10的氢氧化钠溶液中浸置1 h,取出透析袋,用双蒸水冲洗并透析至中性,测定酶活力。

1.4.3 固定化中性蛋白酶在高盐稀态酱醪发酵中的应用

试验共分三组,分别为添加游离中性蛋白酶粉、添加固定化中性蛋白酶凝胶颗粒(每组酱醪总重17.5 kg,添加酶活达331.43 U/kg 酱醪),以及空白对照组;每组设3个平行。发酵过程及发酵90 d后分别检测各组氨基酸态氮、总酸、全氮含量及头油中蛋白质转化率和氨基酸态氮生成率。酿造方法参照行业标准:SB/T 10312-1999,高盐稀态发酵酱油酿造工艺规程进行^[13]。

2 结果与讨论

2.1 中性蛋白酶粉固定工艺

以海藻酸钠和氯化钙浓度、酶液与载体溶液体积比、固定时间作四因素三水平作正交试验,结果见表2。

从表2可以看出,海藻酸钠和氯化钙浓度,酶液与载体溶液体积比及固定时间对固定化凝胶颗粒质量

影响不同。极差 R 值显示 C>D>B>A, 即酶液: 载体溶液体积比影响最大, 其次是固定化时间与氯化钙浓度, 海藻酸钠浓度对凝胶颗粒质量影响最小。根据正交试验结果, 制备固定化凝胶颗粒的最佳工艺: 海藻酸钠 0.007 M、氯化钙浓 0.27 M, 酶液: 载体溶液=12:30, 固定 2 h。

表 2 中性蛋白酶固定化正交试验结果

Table 2 The orthogonal test results of immobilization conditions of neutral protease

试验号	因素				相对酶活 / %
	A	B	C	D	
1	1(0.005)	1(0.18)	1(12:30)	1(1)	84.5
2	1	2(0.23)	2(15:30)	2(1)	53.9
3	1	3(0.27)	3(18:30)	3(3)	50.0
4	2(0.007)	1	2	3	39.9
5	2	2	3	1	64.9
6	2	3	1	2	100
7	3(0.010)	1	3	2	43.8
8	3	2	2	3	71.3
9	3	3	1	1	80.6
K ₁	67.97	61.23	85.27	81.83	
K ₂	63.10	63.37	58.13	60.73	
K ₃	65.23	71.70	52.90	53.73	
R	4.87	10.47	32.37	28.10	

注: 相对酶活是以最高酶活为基准, 其余各组与之相比所得。

凝胶颗粒中包埋中性蛋白酶活为 66 U/g。最佳条件下制备的固定化酶凝胶颗粒酶活力达 10.77 U/g, 酶活回收率为 16.83% (固定化酶活回收率为固定化酶表观活力总和与游离酶活力总和之比)。

2.2 固定化中性蛋白酶稳定性

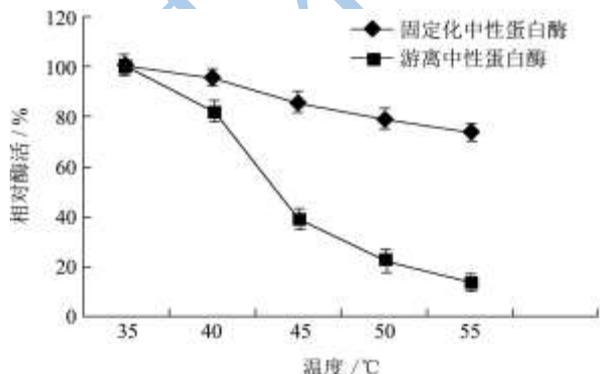


图 1 不同温度下固定化酶的稳定性

Fig.1 The stability of immobilized neutral protease at different temperature

由图 1 可知, 随着温度上升, 游离中性蛋白酶与固定化中性蛋白酶相对酶活均呈下降趋势。在 35 °C

时, 相对酶活最高, 与中性蛋白酶的最佳反应温度吻合; 另外, 温度高于 40 °C, 游离蛋白酶活性迅速下降, 55 °C 时只剩 20% 相对酶活; 而固定化中性蛋白酶相对酶活力一直比较稳定, 在 55 °C 时其相对酶活仍达 80% 左右, 两者差异显著。说明固定化处理有效地保护了蛋白酶, 提高了蛋白酶对温度的耐受性能。

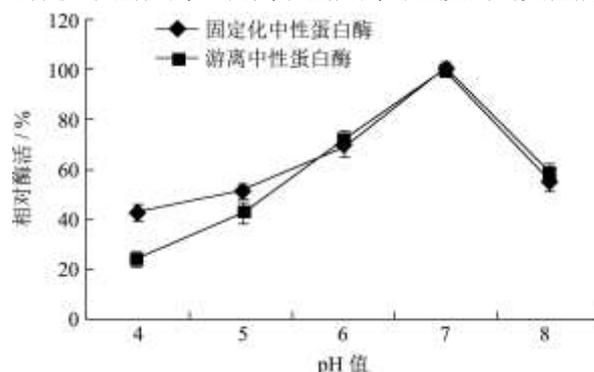


图 2 不同 pH 对固定化酶活性的影响

Fig.2 The stability of immobilized neutral protease at different pH

由图 2 可知, 在不同 pH 环境中, 游离中性蛋白酶与固定化中性蛋白酶凝胶颗粒, 相对酶活均先升后降, pH 值为 7.0 时, 相对酶活力最高, 亦与中性蛋白酶活最佳 pH 值范围吻合。另外, 试验结果显示, 经不同 pH 值溶液处理, 固定化中性蛋白酶活力略高于游离中性蛋白酶活; 越接近于中性环境, 游离中性蛋白酶与固定化中性蛋白酶活相差越不显著。

2.3 酱醪发酵过程各品质指标

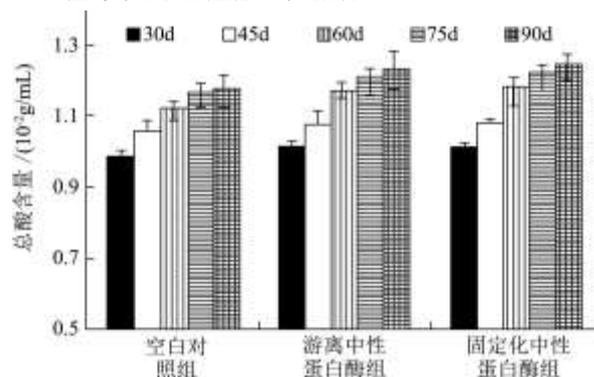


图 3 酱醪发酵过程总酸变化

Fig.3 Time course of total acids content during soy sauce mash fermentation process

图 3 为酱醪发酵过程总酸变化。由图 3 可看出, 添加外源游离中性蛋白酶液与固定化中性蛋白酶凝胶颗粒发酵组总酸含量均高于空白对照组。

与空白对照组发酵 90 d 时总酸生成量 1.181×10^{-2} g/mL 相比, 添加外源游离中性蛋白酶液与固定化中性蛋白酶凝胶颗粒组发酵 60 d 时总酸生成量分别为 1.174×10^{-2} g/mL 和 1.185×10^{-2} g/mL, 平均提前 20 d 左

右达到相同水平。

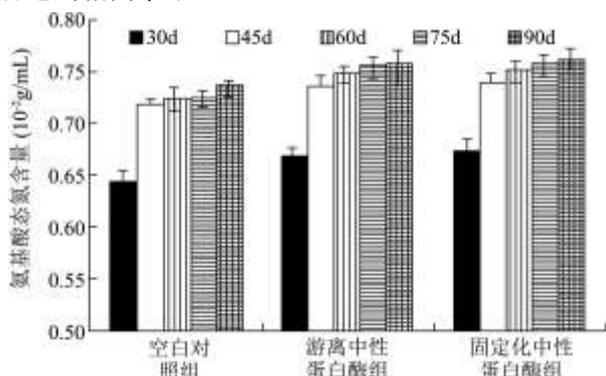


图4 酱醪发酵过程氨基酸态氮含量变化

Fig.4 Time course of the production of amino acid nitrogen during soy sauce mash fermentation process

图4为酱醪发酵过程中氨基酸态氮含量变化。由图4可知，添加外源游离中性蛋白酶液与固定化中性蛋白酶凝胶颗粒发酵组氨基酸态氮含量较空白对照组提高幅度显著，发酵至60d时氨基酸态氮生成量分别为 0.748×10^{-2} g/mL和 0.752×10^{-2} g/mL，较空白对照组发酵90d时 0.740×10^{-2} g/mL相比，平均提前30d左右达到相同水平。

以上试验结果表明，在酱醪发酵中添加外源中性蛋白酶液或固定化中性蛋白酶凝胶颗粒均能有效提高总酸和氨基酸态氮的生成水平和速度，且添加固定化中性蛋白酶发酵组效果更显著。

2.4 固定化中性蛋白酶对酱油头油各品质指标的影响

2.4.1 头油总酸及氨基酸态氮含量

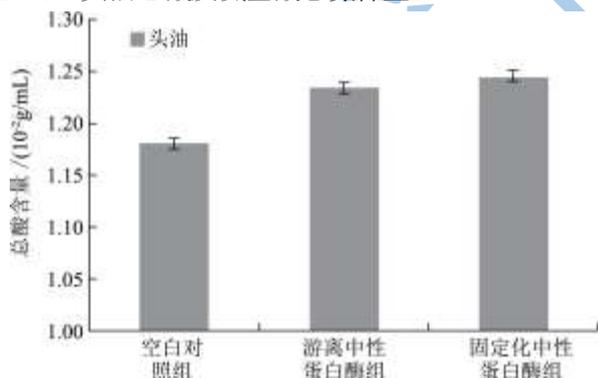


图5 各试验组头油总酸含量

Fig.5 Total acid content of the first soy sauce of each group

由图5可以看出，各试验组头油总酸含量均高于空白对照组，固定化中性蛋白酶组与游离中性蛋白酶组头油总酸含量分别为 1.245×10^{-2} g/mL和 1.234×10^{-2} g/mL，较空白对照组 1.181×10^{-2} g/mL分别提高了5.42% ($p < 0.05$)、4.49% ($p < 0.05$)。

正常情况下，高盐稀态酱油中有机酸的含量不高，除微生物的转化活性不高外，有机酸与酱油中所

含的醇类等发生酯化反应生成香味物质有关，所以酱油的酸味并不明显。而且，有机酸过多会严重影响酱油的风味，研究表明，发酵过程中总酸含量超过2%时会抑制酵母菌生长繁殖，产生拮抗作用；也会引起酱油体态变薄口味变酸等问题^[14]。以上试验数据显示，尽管提高了试验组产酸速度，但总酸含量并没有超过普遍认可的上限2%，所以不会对酱油的品质和风味造成负面影响。

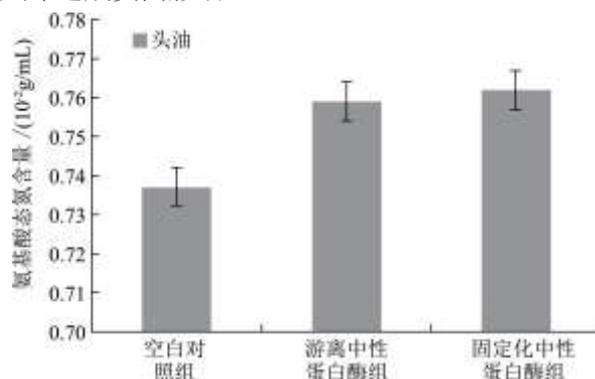


图6 各试验组头油氨基酸态氮含量

Fig.6 The amino acid nitrogen content of the first soy sauce of each group

由图6可知，与空白对照组相比，各试验组头油中氨基酸态氮含量均有所提高；固定化中性蛋白酶组与游离中性蛋白酶组头油氨基酸态氮含量分别为 0.762×10^{-2} g/mL和 0.759×10^{-2} g/mL，较空白对照组的 0.740×10^{-2} g/mL分别提高了2.97% ($p < 0.05$)、2.57% ($p < 0.05$)。

上述结果表明，各试验组均能提高头油中各品质指标，并有效缩短发酵周期。说明在高渗透条件下，添加外源游离中性蛋白酶或固定化蛋白酶均有利于改善传统高盐稀态酱醪发酵工艺。

2.4.2 头油氨基酸态氮生成率

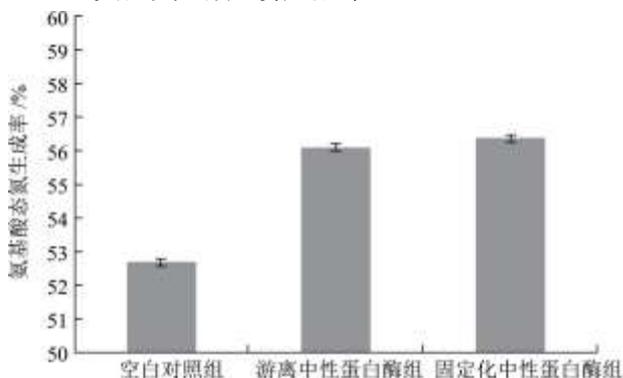


图7 各试验组头油中氨基酸态氮生成率

Fig.7 The amino nitrogen producing rate of the first soy sauce in each group

由图7可知，与空白对照组52.68%的氨基酸态氮生成率相比，游离添加组与固定化组分别提高了

3.42% ($p < 0.05$) 和 3.70% ($p < 0.05$), 差异显著。史龙君^[1]研究结果显示, 与空白对照组相比, 于酱油发酵过程中添加 0.125% 纤维素酶, 氨基酸态氮生成率仅提高 0.78%; 当纤维素酶量增至 1.25%, 酱油氨基酸态氮转化率提高近 5.78%。云秀芳等^[4]在酱油发酵中使用纤维素酶, 提高了蛋白质的利用率, 但是淀粉利用率及氨基酸态氮生成率均不明显。尽管添加的酶不同, 采用的工艺不同, 但本试验研究结果与史龙君的研究结果相似。

2.4.3 头油蛋白质转化率

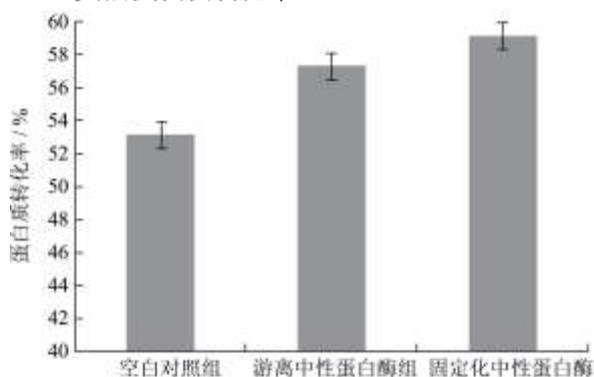


图 8 各试验组头油蛋白质转化率

Fig.8 The protein conversion ration of the first soy sauce in each group

由图 8 可知, 固定化中性蛋白酶及游离酶发酵组头油蛋白质转化率均高于空白对照组, 分别为 59.09% 和 57.21%, 较空白对照组 53.01% 分别提高了 6.08% ($p < 0.05$) 和 4.20% ($p < 0.05$)。云秀芳^[4]等研究了不同阶段添加不同量纤维素酶对酱油发酵的影响, 结果显示, 不同阶段添加不同量纤维素酶均可有效提高酱油头油中蛋白质转化率, 幅度达 1.55~9.53%; 史龙君^[1]研究显示, 添加不同量纤维素酶能有效提高蛋白质转化率, 最高达 8.10%。本试验研究添加外源游离或固定化中性蛋白酶对酱醪发酵的影响, 结果与史龙君、云秀芳等人前期研究结果基本相符。

3 结论

3.1 中性蛋白酶固定化工艺优化条件为: 海藻酸钠 0.007 M, 氯化钙 0.27 M, 酶液与载体溶液体积比 12:30, 固定时间 2 h。此条件下制备的凝胶颗粒耐热性及耐 pH 能力较强, 中性蛋白酶相对活力高, 稳定性好。

3.2 应用于高盐稀态酱醪发酵, 固定化中性蛋白酶凝胶颗粒能显著提高传统高盐稀态酱醪发酵水平, 改善

发酵头油品质; 较空白对照组相比, 酿造周期缩短至少 20 d, 蛋白质转化率提高达 6.08%。

3.3 本试验仅对固定化中性蛋白酶应用于高盐稀态酱油发酵做了初步研究, 固定化技术在传统酿造行业中的进一步应用, 本研究组将相继报道。

参考文献

- [1] LIOE H N, SELAMAT J, YASUDA M. Soy Sauce and Its Umami Taste: a Link from the Past to Current Situation [J]. The Society for Food Science and Technology, 2010, 75(3): 71-75
- [2] 刘会勇, 解欣炜, 王瑞果, 等. 高盐稀态发酵酱油速酿工艺技术探讨 [J]. 中国酿造, 2004, 1: 19-21
- [3] 史龙君. 纤维素酶在酱油酿造上的应用研究 [J]. 中国调味品, 2008, 9: 61-64
- [4] 云秀芳. 纤维素酶在酱油生产中的应用研究 [J]. 中国调味品, 2001, 3: 15-19
- [5] Esquisabel A, Hernandez R M, Gascon A R. Immobilized Enzymes for Biomedical Applications [J]. Methods in Biotechnology, 2006, 22: 283-293
- [6] Li T P, Li S H, Wang N, et al. Immobilization and Stabilization of Pectinase by Multipoint Attachment onto an Activated Agar-gel Support [J]. Food Chemistry, 2008, 109: 703-708
- [7] Galina A, Kovalenko, Larisa V. Immobilization of Glucoamylase by Adsorption on Carbon Supports and Its Application for Heterogeneous Hydrolysis of Dextrin [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343: 1202-1211
- [8] SB/T 10317-1999, 蛋白酶活力测定法[S].
- [9] GB 18186-2000, 中华人民共和国国家标准-酿造酱油[S].
- [10] Sluis C V D, Mulder A N, Grolle K C F, et al. Immobilized Soy-Sauce Yeasts: Development and Characterization of a New Polyethylene-oxide Support [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 179-188
- [11] Rotkova J, Sulakova R, Korecka L, et al. Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications [J]. 2009, 321: 1335-1340.
- [12] Cruz J C, Pfromm P H, Rezac M E. Immobilization of Candida Antarctica Lipase B on Fumed Silica [J]. Process Biochemistry, 2009, 44: 62-69
- [13] SB/T 10312-1999, 高盐稀态发酵酱油酿造工艺规程[S].
- [14] 卢一苍. 浅谈酱油中的总酸 [J]. 上海调味品, 1994, 4: 14-15