

产中性蛋白酶种曲培养基的优化及酶学特性研究

王俊, 苏国万, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以中性蛋白酶活力为检验指标, 采用响应面法对米曲霉产中性蛋白酶的种曲培养基进行优化, 确定其最佳配方组成为: 面粉用量 2.24 g, 花生粕用量 8.46 g, 氯化钙用量 0.028 g, 种曲中性蛋白酶活力高达 15559.40 U/g。经研究纯化后中性蛋白酶酶学特性, 发现中性蛋白酶的最适 pH 为 7.0, 在 pH 5.0~7.0 范围内具有良好的稳定性; 最适作用温度为 50 °C, 在 40~55 °C 条件下能保持较高的酶活力; 试验金属离子对蛋白酶没有显著的激活作用, Ba²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺具有显著的抑制作用。

关键词: 米曲霉; 中性蛋白酶; 响应面分析法; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2012)8-1002-1006

Optimization of the Medium for Production of Neutral Protease and Research of the Enzymatic Properties

WANG Jun, SU Guo-wan, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Response surface analysis was applied to optimize the medium for production of neutral protease. The result showed that the optimum medium formula compositions were flour 2.24 g, peanut meal 8.46 g and calcium chloride 0.028 g, under which the neutral protease activity was up to 15559.40 U/g. The optimum pH and temperature for neutral protease were 7.0 and 50 °C, respectively. The protease was stable at pH 5.0~7.0 and at 40~55 °C. The tested metal ions did not significantly activate the protease, while the ions Ba²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ and Cu²⁺ strongly inhibited its activity.

Key words: *Aspergillus oryzae*; neutral protease; response surface analysis; characterization

中性蛋白酶是一类在中性 pH 条件下作用于蛋白质肽键的蛋白酶, 可将蛋白质水解成多肽或游离氨基酸。中性蛋白酶作用条件温和, 是最早发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂, 在食品中可用于酱油、食醋等调味品, 也可用来水解各种蛋白质以获得多肽或氨基酸^[1]。中性蛋白酶既可从动植物组织中提取, 也可通过微生物进行发酵制备。但受资源缺乏和分离提纯成本高的限制, 动植物源中性蛋白酶难以实现大规模生产。而微生物由于具有生物多样性、易于操作、生长繁殖快、提取工艺相对简单等优点, 使得微生物源中性蛋白酶成为目前工业生产中最主要的蛋白酶, 大约占全世界酶制剂总量的 40%^[2]。在目前应用的微生物源蛋白酶中, 真菌蛋白酶最多, 其中米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 是美国食品药品监督管理局 (FDA) 公

收稿日期: 2012-04-13

基金项目: 广东省科技计划项目 (2009A010700004)

作者简介: 王俊 (1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术方面的研究

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质化学与工程、食品生物技术方面的研究

布的 40 余种安全微生物菌种之一, 其蛋白酶系丰富, 稳定性高, 广泛用于酶制剂工业中^[3~4]。

花生粕是花生榨油后的副产品, 其蛋白质含量高达 50%, 是一种优质蛋白资源。但因高温压榨的榨油工艺造成蛋白严重变性, 难于直接提取或实现高效酶解, 致使花生粕仅限于制作饲料或肥料^[5~6]。因此, 寻找一种可高效水解花生粕蛋白的中性蛋白酶在提高花生粕附加值方面的应用具有重要意义。

米曲霉所分泌的蛋白酶属于典型诱导酶^[7], 根据其产酶特点, 本文利用花生粕作为固态发酵培养基外添加氮源诱导米曲霉分泌出适合水解花生粕的中性蛋白酶。同时, 采用响应面法对米曲霉种曲培养基配方进行优化, 提高米曲霉产中性蛋白酶活力, 并研究其酶学特性, 为米曲霉发酵产酶在花生粕高值化方面的应用提供一定理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

菌种: 沪酿3.042米曲霉, 由华南理工大学食品生

物技术实验室从多个菌种中筛选出, 采用豆汁培养基保存。麸皮、花生粕、面粉, 市购。

种曲基础培养基: 花生粕10 g, 麸皮20 g, 去离子水30 mL, 拌匀装入500 mL三角瓶, 121 °C灭菌20 min后, 趁热打散备用。

1.1.2 试剂

干酪素、三氯乙酸、碳酸钠、氯化钙、氯化钾、氯化镁、氯化锰、氯化钡、氯化亚铁、氯化锌、氯化铜等均为分析纯; 福林试剂, 参照SB/T 10317-1999福林试剂配制方法。

1.1.3 仪器

BSD-150恒温培养箱, 上海博迅实业有限公司; UV-754紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; HSG-IIB-6电热恒温水浴锅, 上海仪表集团; PHS-25数显pH计, 上海精密科学仪器有限公司; 01J2003-05高温灭菌锅, 上海博迅实业有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 种曲培养基水分测定

参照 GB 5009.3-2010。

1.2.2 中性蛋白酶活力测定

采用福林酚法, 参照SB/T 10317-1999。酶活力的定义: 40 °C, 一定pH条件下每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸, 定义为1个蛋白酶活力单位(U, 干基)。

1.2.3 种曲培养基营养源的优化

根据前期实验结果, 选用面粉、花生粕和氯化钙分别作为米曲霉种曲培养基的碳源、氮源和无机盐, 进行单因素分析, 再利用Design-Expert V8.0.6响应面分析法对培养基营养源进行优化, 以确定最佳培养基配方组成。

试验操作: 在基础培养基中添加各营养源配制种曲培养基, 拌匀装入500 mL三角瓶, 121 °C、20 min灭菌冷却后接入米曲霉菌种, 经30 °C恒温培养箱培养54 h, 测定种曲中性蛋白酶活力。

1.2.4 酶学特性研究

种曲→40 °C去离子水浸提1 h→4 °C离心→过滤→蛋白酶粗提液→硫酸铵分级沉淀→4 °C离心→透析脱盐→超滤膜分离(收集大于10 KDa的组分)→Sephadex G-75凝胶过滤层析→收集中性酶活力最高组分进行冷冻干燥→纯化酶粉

设置不同的pH梯度、温度梯度、时间梯度和金属离子对酶液进行反应, 通过测定酶活力, 对酶的最适作用pH及pH稳定性、最适作用温度、酶的热稳定性和金属离子对酶活力的影响进行研究。

2 结果与分析

2.1 响应面分析优化种曲培养基

2.1.1 各营养源单因素对中性蛋白酶活力的影响

微生物酶的合成同时受酶诱导物和酶蛋白质前体的调控, 酶诱导物一般为可利用的碳源, 而酶蛋白质的前体主要来自于氮源, 因此氮源的类型和性质影响酶的合成和分泌^[8]。花生粕蛋白质含量近50%, 可作为优质氮源为米曲霉酶的合成提供酶蛋白前体, 诱导米曲霉分泌蛋白酶。氯化钙作为无机盐可显著促进米曲霉产酶^[9]。此外, 基础培养基中麸皮含有50%左右碳水化合物以及部分蛋白质, 能充当碳源和氮源, 还能起到疏松曲料的作用。本文选取花生粕用量范围为0~15 g; 面粉用量范围为0~5.5 g; 氯化钙用量范围为0~0.055 g进行单因素实验, 结果如图1所示。

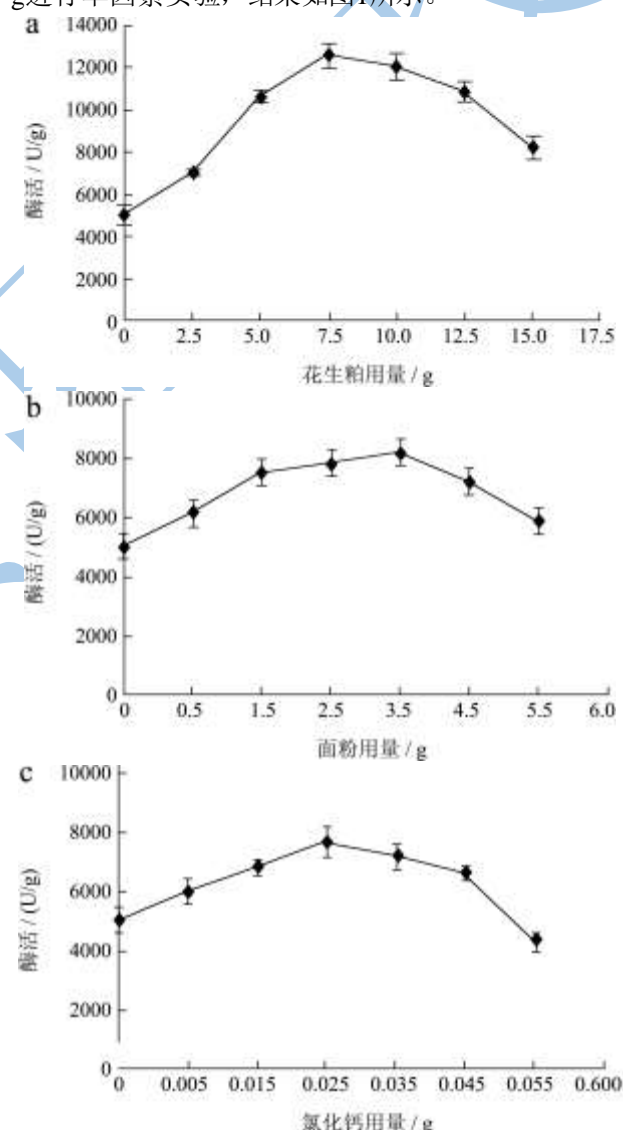


图1 不同营养源用量对中性蛋白酶活力的影响

Fig.1 The effect of dosage of nutrient sources on neutral protease activity

由图1可知, 当花生粕用量为0~7.5 g, 中性蛋白酶活力随着花生粕用量的增加而升高; 在7.5~15 g, 随着花生粕用量增加, 中性蛋白酶活力降低。当面粉

用量为 0~3.5 g, 中性蛋白酶活力随面粉用量的增加而升高; 在 3.5~5.5 g, 随面粉用量增加, 中性蛋白酶活力降低。氯化钙用量在 0~0.025 g 范围, 随氯化钙用量增加, 中性蛋白酶活力升高; 在 0.025~0.055 g, 随氯化钙用量增加, 中性蛋白酶活力降低。在不同营养源用量范围内, 随着营养源用量的增加, 酶活力均呈先上升后下降趋势, 与文献报道适量的营养物质能促进米曲霉生长, 刺激其产酶, 但营养过量也会对产酶造成负面影响的结果一致。由此确定各营养源的合适用量范围: 花生粕 5~10 g, 面粉 0.50~4.50 g, 氯化钙 0.005~0.045 g。

2.1.2 响应面优化培养基配方

根据单因素试验所得结果, 选取面粉用量、花生粕用量和氯化钙用量三个因素作中心组合, 以中性蛋白酶活力为检验指标做响应面分析, 试验结果如表1所示。

表 1 培养基营养源优化的中心组合实验设计及实验结果

Table 1 Experimental design of nutrient source of culture medium and results of central composite design

序号	A (面粉/g)	B (花生粕/g)	C (氯化钙/g)	中性蛋白酶活力/(U/g)
1	3.00	11.70	0.030	11893.44
2	0.48	7.50	0.030	12497.64
3	4.50	5.00	0.045	10282.24
4	3.00	7.50	0.055	11208.68
5	1.50	10.00	0.045	11490.64
6	3.00	7.50	0.005	12497.64
7	3.00	7.50	0.030	15438.08
8	1.50	10.00	0.015	13403.94
9	4.50	10.00	0.045	10544.06
10	4.50	10.00	0.015	11168.40
11	5.52	7.50	0.030	11238.70
12	3.00	3.30	0.030	7502.92
13	1.50	5.00	0.015	9597.48
14	1.50	5.00	0.045	10201.68
15	4.50	5.00	0.015	10251.70

表 2 二次多项模型方差分析表

Table 2 ANOVA for the fitted quadratic polynomial

	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F
模型	1.094E+008	9	1.216E+007	85.68	<0.0001
残差	1.419E+006	10	1.419E+005		
失拟相	1.419E+006	5	2.839E+005		
误差相	0.000	5	0.000		
总和	1.109E+008	19			

$R^2=0.9872$; $R^2_{Adj}=0.9757$

根据实验结果建立中性蛋白酶活力的数学模型为:

$$\text{性蛋白酶活力} = -19680.75 + 4009.45 \times A + 5985.29 \times B + 386158 \times C - 130.56 \times AB + 3973.89 \times AC - 10574.60 \times BC - 562.04 \times A^2 - 325.09 \times B^2 - 5644030 \times C^2 \dots \dots \dots (1)$$

对此模型进行方差分析, 结果见表2、表3。由表2可知, 在 $\alpha=0.01$ 水平时, 模型回归极显著($P<0.0001$), 该模型 $R^2=0.9872$, $R^2_{Adj}=0.9757$, 失拟项不显著($P>0.05$), 因此该方程对实验数据进行了很好的拟合。由表3可知, A、B、C、AB、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 为显著性因素, 在各个影响因素中, 花生粕的用量对中性蛋白酶活力的影响最为显著($P<0.0001$), 其次为面粉用量($P<0.0083$)和氯化钙用量($P<0.0152$)。根据模型方程(1)做响应面(图2), 通过该组动态图可评价诸因素之间对中性蛋白酶活力的交互作用, 同时可确定各因素的最佳水平及组合。

表 3 模型方程系数显著性检验

Table 3 ANOVA for the model equation

项目	系数估计	自由度	标准误差	F值	Prob>F
截距	15438.45	1	153.65		
A	-334.24	1	101.94	10.75	0.0083
B	1000.08	1	101.94	96.24	<0.0001
C	-298.07	1	101.94	8.55	0.0152
A^2	-1264.60	1	99.24	162.38	<0.0001
B^2	-2031.81	1	99.24	419.17	<0.0001
C^2	-1269.91	1	99.24	163.75	<0.0001
AB	-489.61	1	133.20	13.51	0.0043
AC	89.41	1	133.20	0.45	0.5172
BC	-396.55	1	133.20	8.86	0.0139

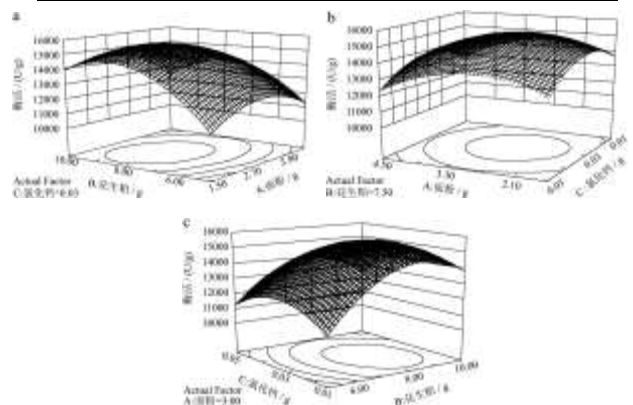


图 2 不同营养源用量对中性蛋白酶活力影响的响应面组图

Fig.2 Response surface group for the effect of different nutrient source dosage on neutral protease activity

图2(a)为氯化钙用量0.03 g时, 花生粕用量和面粉用量交互作用对中性蛋白酶活力影响的响应面。由图可知, 花生粕用量在5~10 g之间及面粉用量在1.5~4.5 g

之间,随着用量的增加,中性蛋白酶活力都呈现先上升后下降的趋势。但当花生粕用量较大时,面粉对中性蛋白酶活力的影响较大,这是因为花生粕除含有大量的蛋白质外,还含有一定量的纤维多糖,在种曲培养基中,花生粕主要作为氮源为米曲霉生长提供营养,但当培养基中的碳源(面粉)不足时,花生粕中的纤维多糖可充当部分的碳源。此外,对菌株产蛋白酶来说,不同碳氮比也会产生不同的结果。Ishida^[10]研究发现氮源在一定范围碳氮培养基中占的比例越大菌株产生的蛋白酶相对越多,但氮源所占比例太大时菌株产生的蛋白酶就有所下降。因此,花生粕与面粉之间具有较强的交互作用。

图2(b)为花生粕用量7.50 g时,氯化钙用量及面粉用量交互作用对中性蛋白酶活力影响的响应面。由图可知,当花生粕用量为7.50 g时,氯化钙用量及面粉用量只单独对中性蛋白酶活力产生影响,两者之间无明显的交互作用,与表3模型方程系数显著性检验结果相一致。

图2(c)为面粉用量3.00 g时,花生粕用量和氯化钙用量交互作用对中性蛋白酶活力影响的响应面。由图可知,当面粉用量为3.00 g时,花生粕与氯化钙有明显的交互作用。主要是因为花生粕中含有多种微量元素,其中钙含量约为837.29 $\mu\text{g/g}$ ^[11],还有其他金属离子,也会对中性蛋白酶活力产生影响。

设定三因素的取值范围:花生粕用量5~10 g,面粉用量1.50~4.50 g,氯化钙用量0.005~0.045 g,将中性蛋白酶活力设定为最大值,软件给出的最优配方为面粉用量2.24 g,花生粕用量8.46 g,氯化钙用量0.028 g,其理论中性蛋白酶活力为15559.40 U/g。考虑实际操作简化工艺,将培养基营养源配方修正为:面粉用量2.50 g,花生粕用量8.00 g,氯化钙用量0.028 g,以该配方进行实际发酵试验,结果得中性蛋白酶活力为15478.00 U/g。理论值与实际值无显著差异,表明培养基优化结果实际可行。

2.2 中性蛋白酶的酶学特性

由于米曲霉分泌的蛋白酶是一种复杂的酶系粗品,本文以制备中性蛋白酶为目的,因此按1.2.4采用硫酸铵分级沉淀、超滤膜分离及凝胶过滤层析对中性蛋白酶进行分离纯化,再对纯化后的中性蛋白酶进行酶学特性研究。

2.2.1 酶的最适作用 pH 及 pH 稳定性

取适量纯化酶粉分别溶于 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的缓冲液,配成一定浓度酶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。分别取 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的酶液 1 mL,加入用相应 pH 缓冲液配制的酪蛋白溶液 1

mL,40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后,测定酶活力。另分别取不同 pH 酶液 1 mL 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 30 min 后,测定酶活力,结果如图 3 所示。

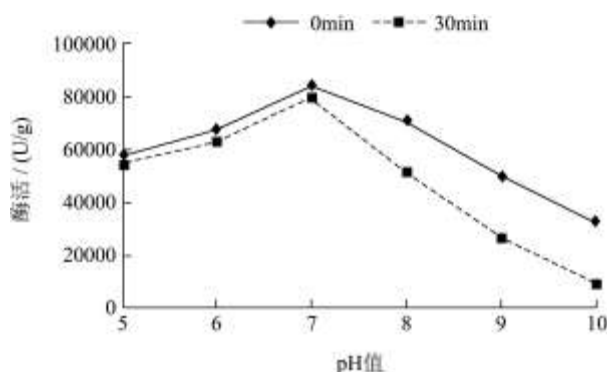


图3 蛋白酶的最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig.3 Optimum pH and pH stabilities of protease secreted by *Aspergillus oryzae*

由图 3 可知,蛋白酶在 pH 5.0~8.0 范围内具有较高的活力,pH 为 7.0 时,蛋白酶活力最高,当 pH 值高于 8.0 时,蛋白酶活力明显降低。因此该蛋白酶的最适作用 pH 为 7.0。而不同 pH 酶液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 30 min 后,在 pH 5.0~7.0 范围内,蛋白酶仍保持较高活力,但在 pH 7.0~10.0 范围内,随着 pH 的升高,酶活力降低的程度越来越大。因此该蛋白酶在 pH 5.0~7.0 范围内具有良好的稳定性,以液态形式保存时,最好使用 pH 5.0~7.0 的缓冲液。

2.2.2 酶的最适反应温度

分别取 1 mL pH 7.0 的酶液于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后测定酶活力,并绘制酶活力随温度变化曲线,结果如图 4 所示。

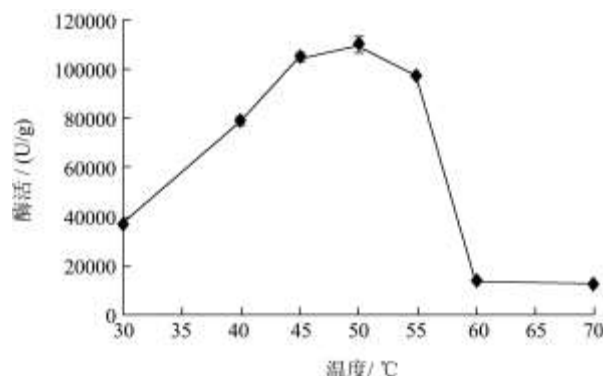


图4 蛋白酶的最适作用温度

Fig.4 Optimum temperature of protease secreted by *Aspergillus oryzae*

温度是影响酶促反应的重要因素,温度升高可以促进蛋白酶的速率,但当升高到一定温度时,酶蛋白发生变性,导致酶活损失。由图 4 可知,温度在 30~50 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,该蛋白酶活力随温度升高而升高,

且在 50 °C 时达到最高。温度在 40~55 °C 范围内蛋白酶具有较高的活力。当温度在 60 °C 时, 该蛋白酶活力急剧下降, 温度升至 70 °C 后, 酶活力基本无变化, 说明蛋白酶在 60 °C 时已经发生变性。因此, 该蛋白酶的最适作用温度为 50 °C。

2.2.3 酶的热稳定性

分别取 pH 7.0 酶液 30 mL 于 30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 恒温水浴中保温, 每隔 30 min 吸取酶液各 1 mL, 立即冰水浴冷却, 然后采用福林酚法测定酶活力, 并绘制不同温度下酶活随保温时间变化曲线, 结果如图 5 所示。

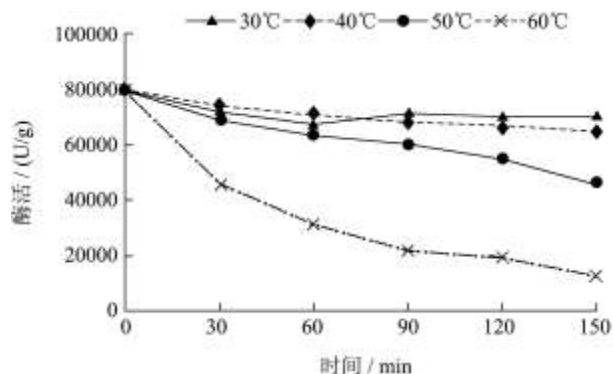


图 5 蛋白酶的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of protease secreted by *Aspergillus oryza*

如图 5, 蛋白酶在 30 °C 和 40 °C 下保温 150 min 后, 酶活基本无变化, 是因为温度相对较低, 对蛋白酶活力影响不大。而在酶最适作用温度 50 °C 下, 前 120 min 酶活力变化不大, 120 min 后, 酶活开始明显降低, 可能发生自溶。在 60 °C 下, 前 30 min 内酶活急剧下降, 90 min 后保持稳定水平, 这是因为 60 °C 下蛋白酶已经开始发生变性, 活力下降, 保温 90 min 已使大部分蛋白酶失活, 所以延长保温时间酶活变化不显著。因此在 30~50 °C 下蛋白酶具有较好的热稳定性。

2.2.4 金属离子对酶活力的影响

本实验使用米曲霉进行发酵产蛋白酶, 而真菌蛋白酶一般都是金属蛋白酶, 其活性受到金属螯合物的影响。因此, 分别在 20 mL pH 7.0 的酶液中加入 K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺, 使其浓度为 10 mmol/L, 40 °C 保温 30 min 后, 分别测定中性蛋白酶活力, 结果如图 6 所示。

如图 6, 金属离子 K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺和 Mn²⁺对蛋白酶稍有激活作用 (P>0.05)。而金属离子 Ba²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺对蛋白酶有显著的抑制作用 (P<0.05), 尤其是 Cu²⁺, 对酶的抑制达到 65% 左右, 这可能是 Cu²⁺对酶活性中心金属离子的置换作用所致。以上结

果表明实验金属离子对蛋白酶活力没有显著的激活作用, 与文献报道存在差异, 可能是由于金属离子对不同的蛋白酶的效应是多样而复杂的, 导致相同的金属离子对不同蛋白酶产生不同的影响。

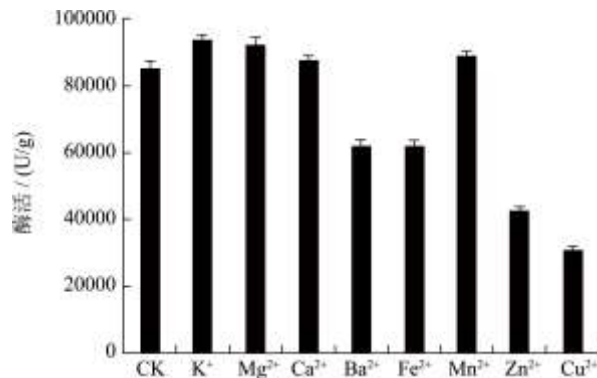


图 6 不同金属离子对蛋白酶活力的影响

Fig.6 Effect of different metal ions on protease secreted by *Aspergillus oryza*

3 结论

3.1 本文采用 Design-Expert V8.0.6 响应面分析法, 通过选取面粉用量、花生粕用量和氯化钙用量三个因素作中心组合, 以中性蛋白酶活力为检验指标优化种曲培养基。确定最佳培养基配方为面粉用量 2.24 g, 花生粕用量 8.46 g, 氯化钙用量 0.028 g, 此方案下, 中性蛋白酶活力可达 15559.40 U/g。考虑实际操作简化工艺, 将培养基营养源配方修正为: 面粉用量 2.50 g, 花生粕用量 8.00 g, 氯化钙用量 0.028 g, 以该配方进行实际发酵试验, 结果得中性蛋白酶活力为 15478.00 U/g。理论值与实际值无显著差异, 表明培养基优化结果实际可行。

3.2 酶学特性实验结果表明, 中性蛋白酶的最适 pH 值为 7.0, 且在 pH 5.0~7.0 范围内具有良好的稳定性。酶最适作用温度为 50 °C, 在 40~55 °C 条件下蛋白酶能保持较高的活力, 且在 30~50 °C 范围内具有较好的热稳定性, 60 °C 下酶变性失活。实验金属离子对该蛋白酶没有显著的激活作用, Ba²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺具有显著的抑制作用。

参考文献

- [1] 汤鸣强,郑挺,曾小芳,等.酿造酱油米曲霉产中性蛋白酶提取与酶学性质研究[J].中国调味品,2008,2:38-40
- [2] 蒋爱凤,胡喜巧,李兰.米曲霉产中性蛋白酶提取与粗酶性质研究[J].河南科技学院学报,2011,39(2):43-48
- [3] 杨世平,邱德全.米曲霉中性蛋白酶特性的研究[J].湛江海洋大学学报,2006,26(4):22-25
- [4] 黄婵媛,崔春,赵谋明.小麦面筋蛋白的米曲霉蛋白酶系酶

- 解特性研究[J].食品与发酵工业,2010,36(9):38-41
- [5] 李瑞,王旭,胡立新.酶解制备花生肽[J].食品研究与开发,2010,31(9):174-177
- [6] 刘政,喻修健,刘健卓,等.双酶同加法制备花生粕多肽的工艺研究[J].化学与生物工程,2009,26(12):57-59
- [7] 冷云伟,袁兴光.诱导酶合成机理与酱油制曲工艺调整[J].中国调味品,1998,5:6-8
- [8] 李秀婷,赵进,鲁绯,等.米曲霉固态发酵产酶条件及活力力研究[J].中国酿造,2009,2:26-28
- [9] 肖怀秋.高活力产中性蛋白酶细菌菌株的选育及酶学性质研究[D].湖南:湖南农业大学硕士学位论文,2006
- [10] H Ishida, Hata Y, Kawato A, et al. Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (glaB) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae* [J]. Current genetics, 2000, 37(6): 373-379
- [11] 梅娜,周文明,胡晓玉,等.花生粕营养成分分析[J].西北农业学报,2007,16(3):96-99

现代食品科技