

# *Rhizopus oryzae* 产酸性蛋白酶条件及其酶学性质研究

李理, 钟晓敏

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以少孢根霉 (*Rhizopus oligosporus*) 为对照研究了豆豉中的一个分离菌株米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 产生酸性蛋白酶的条件及所产蛋白酶的性质, 结果表明这个菌株的产酶条件和蛋白酶的性质与少孢根霉相比有相似性但也存在一些差异: 米根霉在水分含量 57%~59%、pH 2.5~3.0 的酸性介质中、28~31 °C 下培养 36 h 时产酸性蛋白酶能力最强, 所分泌的蛋白酶系在 pH 4.0 和 pH 6.0 附近有最强的催化活性, 在 pH 3.0~6.0 的范围内有较好的稳定性, 催化反应的最适作用温度为 50 °C, 它的温度稳定性很差, 在 50 °C 保温 30 min 已完全失活; 少孢根霉在水分含量 52%~55%、pH 2.5~3.0 的酸性介质中、31 °C 下培养 48 h 时产酸性蛋白酶能力最强, 在 35 °C 条件下培养 36 h 也能产生较高的酶活力, 少孢根霉分泌的蛋白酶系在 pH 3.0 和 pH 6.0 附近有最强的催化活性, 在 pH 4.0~6.0 范围内很稳定, 催化反应的最适作用温度可达 55~60 °C, 但它的温度稳定性较差, 在 50 °C 保温 30 min, 酶活力损失达到 90%, 保温 120 min 酶几乎完全失活。

**关键词:** 米根霉; 少孢根霉; 酸性蛋白酶; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2010)1-28-6

## Production and Characterization of an Acid Proteases from *Rhizopus oryzae*

LI Li, ZHONG Xiao-min

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

**Abstract:** The culture condition for maximum yield of an acid protease from *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus* and the properties of the protease were studied in this research. The results showed that the optimum conditions for maximum production of acid protease from *Rhizopus oryzae* grown on wheat bran were water content of 57%~59%, pH of 2.5~3.0, fermentation temperature of 28~31 °C and time of 36 h. The best pH value and temperature of the achieved protease were 4.0~6.0 and 50 °C, respectively. The protease showed high pH stability within 3.0~6.0 and poor thermo-stability, which might lose its activity when incubated at 50 °C for 30 min. The optimum conditions for maximum production of acid protease from *Rhizopus oligosporus* grown on wheat bran were water content of 52%~55%, pH value of 2.5~3.0, fermentation temperature of 31 °C for 48 h or fermentation temperature of 35 °C for 36 h. The highest activity of the protease from *Rhizopus oligosporus* was obtained pH3.0 or pH6.0, and temperature of 55~60 °C. It showed high pH stability at 4.0~6.0, but lower thermal stability at 50 °C. It was found that nearly 90% of the protease activity was lost when incubated at 50 °C for 30 min.

**Key words:** *Rhizopus oryzae*; *Rhizopus oligosporus*; acid protease; enzymological propertie

天培和豆豉均为发酵大豆制品。天培 (Tempeh) 起源于印度尼西亚, 是以大豆为原料, 经脱壳、浸泡、蒸煮、接种根霉菌后再经短时间发酵而制成的一种高蛋白大豆发酵食品, 类似于我国的霉菌型豆豉<sup>[1]</sup>。生产天培所使用的根霉有少孢根霉、米根霉、少根根霉、匍枝根霉, 一般生产中多采用少孢根霉, 因为它具有很强的分解蛋白质和脂肪的能力, 能产生某些抗氧化物质, 并能产生诱人的天培风味和天培特有的质构<sup>[2]</sup>, 国外多采用 NRRL-2710 少孢根霉为天培的生产菌种。豆豉在我国有着十分悠久的历史, 可分为霉菌型豆豉和细菌型豆豉两大类, 而霉菌型豆豉又分为根霉型、

曲霉型和毛霉型<sup>[3]</sup>。浏阳豆豉是曲霉型豆豉的典型代表, 采用黑豆为原料采取自然制曲发酵而成, 是一种典型的多菌种混合发酵, 其颗粒完整、滋味鲜美并具有独特的豆豉香味。蒋立文等利用平板稀释分离实验, 对自然制曲成熟的浏阳豆豉曲料中的微生物菌相及组成做了初步的研究分析, 结果表明浏阳豆豉自然制曲成熟的曲料以曲霉属和细菌为主, 而中温菌根霉属的检出也说明了根霉属在浏阳豆豉产品的风味形成过程中有不可缺少的作用<sup>[4]</sup>。我们从浏阳豆豉中分离、纯化出一株米根霉, 拟应用于天培发酵。已有的报道以及我们的前期研究表明<sup>[5-8]</sup>, 少孢根霉在发酵过程中主要产酸性蛋白酶, 因此我们对米根霉产酸性蛋白酶条件及其蛋白酶系的特性做了一些研究, 并与少孢根霉

收稿日期: 2009-08-26

作者简介: 李理 (1965-), 副教授, 研究方向为粮油微生物与食品安全

做了比较, 以期为米根霉的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

菌种: 米根霉 R<sub>1</sub>, 本实验室自行分离保存; 少孢根霉 (*Rhizopus oligosporus*, CICC 3152), 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

斜面培养基: 均采用 PDA 培养基

固体发酵培养基: 10 g 麸皮, 一定比例的蒸馏水, 装于 250 mL 三角瓶中, 摇匀, 于 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 趁热摇散后备用。

试剂: 酪蛋白为生化试剂; 除 Folin-酚试剂自制外, 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

JM-5001型电子天平; YX-280D 不锈钢手提式高压灭菌锅; LRH-150-MS 霉菌培养箱; Laborluxll 光学显微镜; CR-22G 型高速冷冻离心机; UV-2300 紫外-可见分光光度计; HH-2 数显恒温水浴锅; SW-CJ-1C 超净工作台; METTLER TOLEDO pH 计。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 孢子悬浮液的制备

每次实验前, 将 4 °C 下保存的试管菌种转移接至 PDA 斜面培养基上, 于 28 °C 培养 3~5 d。在无菌条件下, 逐步加入 10 mL 无菌蒸馏水于孢子已成熟的斜面管中, 剧烈摇晃振荡 1 min, 所得到的即为孢子悬浮液, 备用。

#### 1.3.2 粗酶液的制备

在固体发酵培养基中接种 1 mL 孢子悬浮液 (孢子数约为 10<sup>6</sup> 个), 摇匀, 放入霉菌培养箱中培养。每个三角瓶中加入 100 mL 无菌水, 分散摇匀, 4 °C 下浸提过夜。八层无菌纱布过滤, 滤液置于无菌三角瓶中。将滤液于 4 °C、8000 r/min 冷冻离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

#### 1.3.3 蛋白酶活力的测定

采用 Folin-酚法, 酪氨酸作标准曲线, 求出 K 值。酶活力定义为<sup>[9]</sup>: 在 40 °C, pH 3.0 条件下, 1 min 内催化酪蛋白水解产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个蛋白酶活力单位 (U)。

蛋白酶活力测定<sup>[10]</sup>: 1 mL 经适当稀释的酶液, 加 1 mL 2%酪蛋白 (0.05M pH 3.0 乳酸-乳酸钠缓冲液溶解), 于 40 °C 反应 10 min, 加入 2 mL 0.4 mol/L 的三氯乙酸中止反应, 过滤取 1 mL 滤液进行福林酚显色反应, 于 660 nm 测其吸光值, 代入酶活力公式计算酶活力。由 Folin-酚法得到酪氨酸标准曲线如图 1 所示。

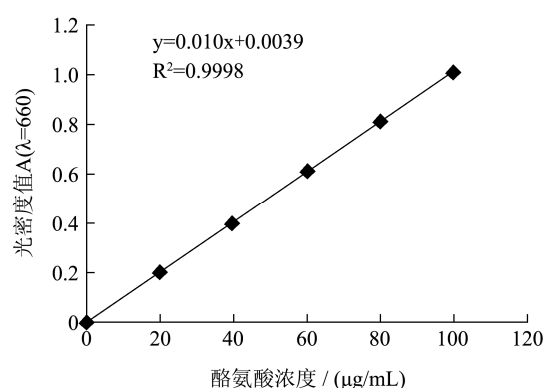


图 1 酪氨酸标准曲线

Fig. 1 Calibration curve of tyrosine

#### 1.3.4 发酵温度及时间对产酶的影响

由于在发酵过程中, 随着温度及时间的改变, 霉菌的产酶量会发生变化, 因此根据两种根霉的生长温度范围以及相关的研究, 在相对湿度 75%、加水比 1:1、自然 pH 值条件下, 将米根霉与少孢根霉分别于 28 °C、31 °C、35 °C、38 °C 培养 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h, 通过测定两种根霉产生的酸性蛋白酶的活力, 确定米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶的最佳温度与最佳时间。

#### 1.3.5 培养基水分含量对产酶的影响

由于培养基的水分含量对霉菌的产酶量也会产生一定的影响, 因此为了确定米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶所需的最佳培养基水分含量, 在米根霉与少孢根霉各自最佳发酵温度和时间、相对湿度 75%、自然 pH 值条件下, 按水:麸皮以 0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1 添加后接种培养, 通过快速烘干法测定接种后培养基的水分含量, 得到按上述比例添加后培养基的初始水分含量分别为 49%、52%、55%、57%、59%、60%、61%、63%。通过测定两种根霉产生的酸性蛋白酶的活力, 确定米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶所需的最佳培养基水分含量。

#### 1.3.6 培养基初始 pH 值对产酶的影响

由于产酶的 pH 值通常同酶反应最适 pH 值接近, 因此, 根据以往关于根霉生长及产蛋白酶的 pH 范围的一些研究, 本实验对米根霉和少孢根霉的最佳培养基初始 pH 值进行确定, 选择范围为 pH 1.5~8.0。用乳酸和 NaOH 将固体培养基的 pH 值分别调为 1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 在米根霉与少孢根霉各自最佳温度、时间以及培养基水分含量, 相对湿度 75% 条件下培养, 通过测定两种根霉产生的酸性蛋白酶的活力, 确定米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶的最佳培养基初始 pH 值。

### 1.3.7 酶的最适作用 pH 与 pH 稳定性

在最佳温度、时间、培养基水分含量及初始 pH 条件下培养米根霉和少孢根霉，在达到产酶高峰时取样，提取粗酶液。配制一系列 pH 范围为 2.0~8.0 的缓冲液，将两种根霉菌粗酶液用缓冲液适当稀释后，于 40 °C 测定其在 pH 2.0~8.0 条件下的催化活性，比较并确定两种根霉蛋白酶的最适作用 pH。

将提取的粗酶液的 pH 值分别调为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，25 °C 下放置 12h 后，将酶液用缓冲液适当稀释，于 40 °C 测定它在酸性条件 (pH 3.0) 下的残留酶活力，比较并得出两种根霉蛋白酶在不同 pH 条件下的稳定性。

### 1.3.8 酶的最适作用温度与温度稳定性

分别在 30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 下测定米根霉和少孢根霉蛋白酶在酸性条件下 (pH 3.0) 的活力，比较并得出两种根霉蛋白酶的最适作用温度。

将米根霉与少孢根霉粗酶液在 30 °C、40 °C、50 °C 下分别保温 30 min、60 min、90 min、120 min，然后迅速冷却至室温，于 40 °C 测定其在酸性条件 (pH 3.0) 下的活力，比较并得出两种根霉蛋白酶的温度稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶条件的研究

#### 2.1.1 发酵温度与时间对两种根霉产酸性蛋白酶的影响

测定在不同发酵温度与时间下米根霉与少孢根霉产酸性蛋白酶的活力，结果见图 2。

从图 2 可看出，米根霉在 28~31 °C 内有较强的产酸性蛋白酶的能力，其中以 28 °C 时产酶能力最强 (A)，其酸性蛋白酶活力最高可达到 45 U/mL。随着温度的升高，米根霉的产酶能力逐渐下降，当发酵温度达 38 °C 时产酸性蛋白酶的能力仅能达到 28 °C 时的四分之一，约为 12 U/mL。米根霉产酸性蛋白酶达到高峰的时间与发酵温度成反比，随着发酵温度的升高，产酶达到峰值的时间前移，当发酵温度为 28~31 °C 时，米根霉在培养 36 h 后有最强的产酸性蛋白酶活力，而当温度升高至 35~38 °C 时，培养 24 h 后即达到产酶的高峰，且随着发酵时间的延长产酶量迅速下降。

不同于米根霉，少孢根霉在 31~35 °C 范围内有较强的产酸性蛋白酶能力，但达到产酶高峰的时间要慢于米根霉。少孢根霉在 31 °C 培养 48 h 有最高的产酸性蛋白酶活力，可达到 35 U/mL (B)，而随着发酵温

度的升高，少孢根霉产酶达到高峰的时间也发生前移，28 °C 时少孢根霉在培养 60 h 后其产酸性蛋白酶能力达到最大，而随着发酵温度的升高产酶达到峰值的时间依次前移 12 h，且随着发酵时间的延长产酶量同样迅速下降。Wang 等<sup>[7]</sup> (1974 年) 研究了少孢根霉产酸性蛋白酶的条件，得出少孢根霉在 32 °C 培养 2~3 d 后酶活力达到最高，而在 25 °C 培养 3~4 d 后酶活力才达到峰值，这与我们得出的结论一致。

图 2 的结果表明，米根霉产酸性蛋白酶的最适温度稍低于少孢根霉，产酶达到高峰的时间较快，且产酶量稍高。两种根霉产酸性蛋白酶均随着温度与时间的变化而显著变化，且变化趋势相似。

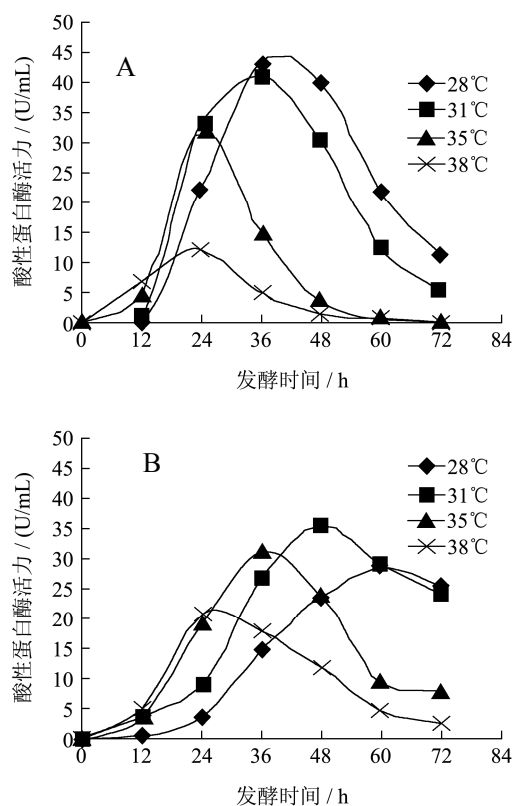


图 2 米根霉 (A) 与少孢根霉 (B) 产酸性蛋白酶的温度 - 时间曲线

Fig.2 Effects of temperature on the activity of acid proteases produced by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*

#### 2.1.2 培养基水分含量对两种根霉产酸性蛋白酶的影响

测定不同培养基水分含量条件下培养的两种根霉菌产酸性蛋白酶的活力，结果如图 3 所示。

从图 3 可看出，水分含量对米根霉和少孢根霉产酸性蛋白酶活力均有影响。随着水分含量的增加，米根霉与少孢根霉的产酶能力均呈现先上升后下降的趋势，当培养基水分含量在 52%~55% 范围内时，少孢

根霉产酸性蛋白酶能力较强,当培养基水分含量达55%时产酶量最高,即加水比为0.9:1时最有利于少孢根霉产酶,随着水分含量的增加酶活力逐渐下降。而对于米根霉,在水分含量57%~59%范围内具有较强的产酶能力,当水分含量达57%时产酶量最高,而当水分含量超过60%时,酶活力迅速下降。这是因为培养基水分含量过高,灭菌后培养基易结块成团,通气状况差,不利于产酶;而培养基水分含量过低,则水分不足,对菌体生长和产酶也造成不利影响。

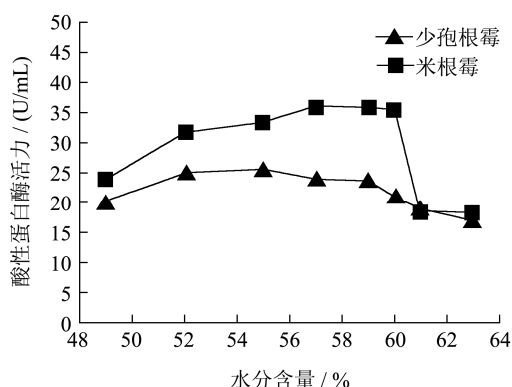


图3 培养基水分含量对根霉菌产酸性蛋白酶的影响  
Fig.3 Effects of medium water content on acid protease produced by *Rhizopus*

### 2.1.3 培养基初始 pH 值对两种根霉产酸性蛋白酶的影响

在发酵过程中,培养基的 pH 值可以影响霉菌产蛋白酶的 type。通常来说,在酸性条件下培养有利于酸性蛋白酶的生成,而 pH 值升高后则有利于中性和碱性蛋白酶的生成,但也有些例外,例如黑曲霉在 pH 6.0 左右培养产酸性蛋白酶最好<sup>[9]</sup>。

测定不同培养基初始 pH 值条件下培养的两种根霉菌产酸性蛋白酶的活力,结果如图 4 所示。

从图 4 所示可看出,当培养基初始 pH 值为 1.5~2.0 时,米根霉与少孢根霉的酸性蛋白酶活力很弱,这可能是因为在此 pH 范围内根霉的生长受到一定程度的抑制,且产生的酸性蛋白酶极易自溶失活。米根霉与少孢根霉均在初始 pH 值为 2.5~3.0 的范围内有很强的产酸性蛋白酶能力,随着初始 pH 值的升高产酶能力逐渐下降,而当初始 pH 值达 5.0~6.0 时,米根霉产酸性蛋白酶活力有所提高,当初始 pH 值为 6.0 时,少孢根霉产酸性蛋白酶能力也较强。Wang 和 Hesseltine 研究<sup>[6]</sup>发现少孢根霉产生的酸性蛋白酶不止一种,他们分离纯化出 5 种不同结构的酸性蛋白酶,并通过研究发现这 5 种酸性蛋白酶依据其最适 pH、最适温度和分解酪蛋白的能力可分为两大类。由此我们可推测米根

霉产生的酸性蛋白酶也不止一种,且其酸性蛋白酶反应的最适 pH 值与少孢根霉产生的酸性蛋白酶接近。

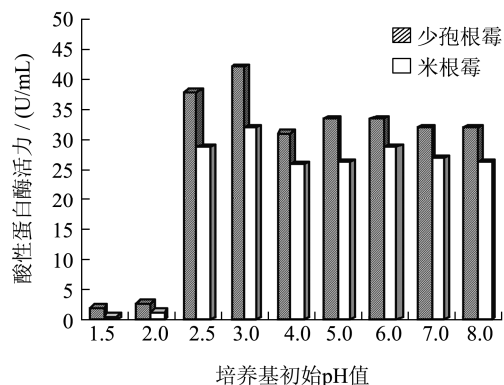


图4 培养基初始 pH 值对根霉菌产酸性蛋白酶的影响

Fig.4 Effects of initial pH on acid protease produced by *Rhizopus*

### 2.2 米根霉与少孢根霉蛋白酶系催化特性的研究

酶反应是很复杂的,它的催化速率受底物浓度、酶本身的浓度、介质的 pH 值、温度、反应产物、活化剂和抑制剂等因素的影响。本实验主要研究介质 pH 值和温度对两种根霉蛋白酶催化特性的影响。

#### 2.2.1 米根霉与少孢根霉蛋白酶的最适作用 pH

配制一系列 pH 范围为 2.0~8.0 的缓冲液,将两种根霉菌粗酶液用缓冲液适当稀释后,于 40 °C 测定其在 pH 2.0~8.0 条件下的催化活性,结果见图 5。

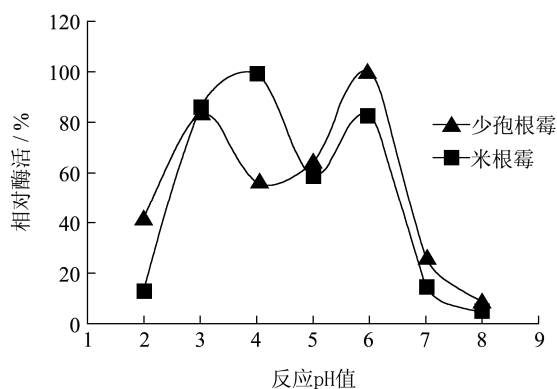


图5 pH 值对米根霉和少孢根霉蛋白酶的影响

Fig.5 Effect of pH on proteases from *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*

从图 5 可看到,在 pH 2.0~8.0 的范围内,米根霉与少孢根霉产生的蛋白酶系,其催化活力均有两个峰值。米根霉分泌的蛋白酶系在 pH 4.0 和 pH 6.0 附近有最强的催化活性,这说明米根霉至少产生了两种酸性蛋白酶。Sushil Kumar 等<sup>[11]</sup>从米根霉的培养物中纯化得到的一种胞外酸性天冬氨酸蛋白酶,并研究得到这种酸性蛋白酶的最适作用 pH 为 5.5。少孢根霉分泌的蛋白酶系在 pH 3.0 和 pH 6.0 附近有最强的催化活性,



说明少孢根霉也至少产生了两种酸性蛋白酶,且少孢根霉蛋白酶反应的最作用 pH 为 3.0 和 6.0。Wang 等<sup>[5]</sup>(1965 年)采用液体发酵培养提取少孢根霉蛋白酶,详细研究了其酶学特性,他们的研究得出的结论是少孢根霉产生的蛋白酶系在 pH 3.0 附近催化活力达到高峰,此外在 pH 5.5 附近还有一个次高峰。而 Lilik Ikasari 和 David A. Mitchell<sup>[12]</sup>用 5% NaCl 浸提以米糠为基质发酵的少孢根霉产生的蛋白酶,对其性质作了一些研究,他们得到的结论是少孢根霉产生的蛋白酶系在 pH 1.5~5.0 的范围内有催化活性,且在 pH 2.0 时有最大催化活力。这与我们的研究结果有些差别,用于蛋白酶测定的底物和缓冲液类型及浓度的不同,可解释得到不同的最作用 pH,但不能解释活力峰数量的不同。

### 2.2.2 米根霉与少孢根霉蛋白酶的 pH 稳定性

将提取的粗酶液的 pH 值分别调为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 25 °C 下放置 12 h 后,将酶液用缓冲液适当稀释,于 40 °C 测定它在酸性条件 (pH 3.0) 下的残留酶活力,结果见图 6。

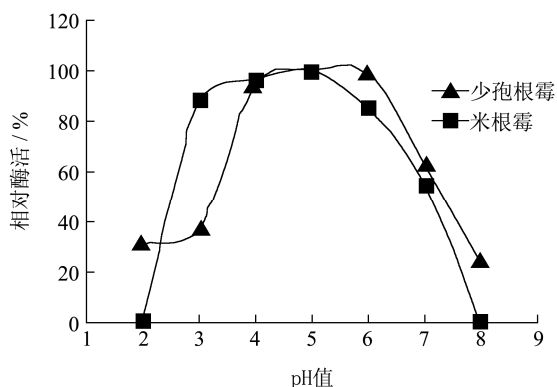


图 6 米根霉与少孢根霉蛋白酶的 pH 稳定性

Fig.6 The pH stabilities of proteases from *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*

从图 6 可看出,米根霉产生的蛋白酶系在 pH 3.0~6.0 的范围内有较好的稳定性, Sushil Kumar 等<sup>[11]</sup>纯化得到的酸性蛋白酶在 pH 5.5~7.5 的范围内较稳定;少孢根霉产生的蛋白酶系在 pH 4.0~6.0 范围内很稳定,这与文献报道的研究结论相一致<sup>[5,6]</sup>;两种根霉蛋白酶系均在 pH 5.0 左右最稳定。在 pH 2.0 和 pH 8.0 时,米根霉蛋白酶完全失活,原因可能是在 pH 2.0 时米根霉蛋白酶由于自溶而失活,而在 pH 8.0 时米根霉蛋白酶发生变性而失活。比较而言,少孢根霉蛋白酶的 pH 稳定性范围宽于米根霉蛋白酶。

### 2.2.3 米根霉与少孢根霉蛋白酶的最作用温度

分别在 30 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 下测定米根霉和少孢根霉蛋白

酶在酸性条件 (pH 3.0) 下的活力,结果见图 7。

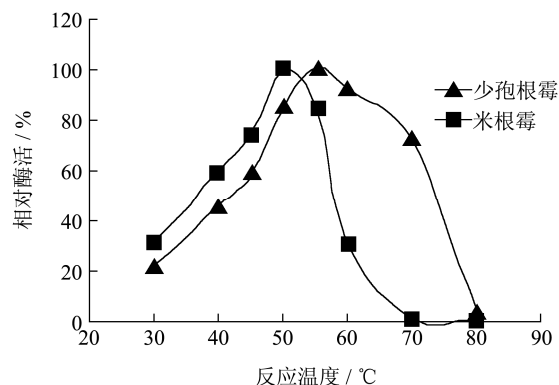


图 7 反应温度对米根霉和少孢根霉蛋白酶的影响

Fig.7 Effect of reaction temperature on proteases from *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*

由图 7 可看出,少孢根霉分泌的蛋白酶系在 50~60 °C 范围内具有较强的催化活性,且在 55 °C 反应时催化活力最强,说明少孢根霉蛋白酶是一种中高温蛋白酶,这与其他一些学者的报道相一致<sup>[5-7,11]</sup>。而当反应温度超过 60 °C 后,少孢根霉蛋白酶的催化活力迅速下降。米根霉蛋白酶反应的最作用温度稍低于少孢根霉蛋白酶,其在 50 °C 具有最强的催化活性,而当反应温度超过 55 °C 后,米根霉蛋白酶的催化活力急剧下降,当反应温度达到 70 °C 时酶已失活, Sushil Kumar 等<sup>[11]</sup>纯化得到的天冬氨酸蛋白酶最适反应温度可达到 60 °C,之后酶活力迅速下降,70 °C 时酶完全失活,这与我们的研究结果相似。另外,温度对米根霉和少孢根霉蛋白酶的催化活力均有较大的影响,当温度从 30 °C 升高到 50 °C 时,米根霉蛋白酶的催化活力提高了 3 倍,而温度从 30 °C 升高到 55 °C 时少孢根霉蛋白酶的活力提高近 4 倍。

### 2.2.4 米根霉与少孢根霉蛋白酶的温度稳定性

将米根霉与少孢根霉粗酶液在 30 °C、40 °C、50 °C 下分别保温 30 min、60 min、90 min、120 min,然后迅速冷却至室温,于 40 °C 测定其在酸性条件 (pH 3.0) 下的活力,结果见图 8。

由图 8 可看出,米根霉蛋白酶的稳定性很差,其在 30 °C 和 40 °C 保温 30 min,酶活力损失达到 80% 左右,而保温 120 min 酶几乎完全失活,在 50 °C 保温 30 min 米根霉蛋白酶已完全失活,说明米根霉蛋白酶不耐高温,只适合在较低温度下反应。虽然少孢根霉蛋白酶的最适反应温度可达 55~60 °C,但是它的温度稳定性较差,该蛋白酶系在 30 °C 有较好的稳定性,但其在 40 °C 保温 30 min,酶活力损失就达到 60%,而在 50 °C 保温 30 min,酶活力损失达到 90%,保温

120 min 酶几乎完全失活。因此,少孢根霉蛋白酶仅能在其最适作用温度反应较短的时间,否则会导致失活。

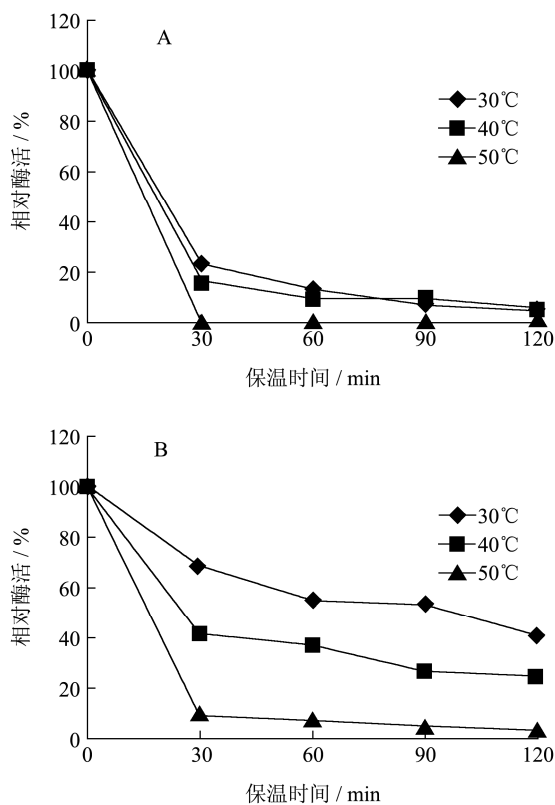


图8 米根霉(A)与少孢根霉(B)蛋白酶的温度稳定性

Fig.8 Thermo-stability of proteases from *Rhizopus oryzae* (A) and *Rhizopus oligosporus*(B)

### 3 结论

在实验条件下我们可得出如下结论:

(1) 米根霉与少孢根霉均以产生酸性蛋白酶为主,且至少存在两种形式的酸性蛋白酶,此外米根霉的产酶量稍高于少孢根霉。米根霉在28~31℃条件下培养36 h时产酸性蛋白酶能力很强,而少孢根霉在31℃条件下培养48 h达到产酶高峰,在35℃条件下培养36 h也可以产生很高的酶活力。当培养基水分含量在52%~55%范围内时,少孢根霉产酸性蛋白酶能力较强,而对于米根霉,培养基水分含量达57%时产酶量最高。米根霉与少孢根霉在pH 2.5~3.0的酸性介质中培养时均有很强的产酸性蛋白酶能力。

(2) 米根霉分泌的蛋白酶系在pH 4.0和pH 6.0附近有最强的催化活性,在pH 3.0~6.0的范围内有较好的稳定性;少孢根霉分泌的蛋白酶系在pH 3.0和pH

6.0附近有最强的催化活性,在pH 4.0~6.0范围内很稳定,两种根霉蛋白酶均在pH 5.0左右最稳定。

(3) 米根霉分泌的蛋白酶系最适作用温度为50℃,当反应温度超过55℃后,其催化活力急剧下降,它的温度稳定性很差,在50℃保温30 min已完全失活。少孢根霉分泌的蛋白酶系是一种中高温蛋白酶,其最适作用温度可达55~60℃,但它的温度稳定性较差,在50℃保温30 min,酶活力损失达到90%,保温120 min酶几乎完全失活。

### 参考文献

- [1] Kathleen A. Hachmeister and Daniel Y. C. Fung. Tempeh : a mold - modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains [J]. Critical Reviews in Microbiology, 1993, 19 (3): 137-188
- [2] 乔支红.天培的研究进展[J].山西食品工业,2004,(1):2-4
- [3] 孙森,宋俊梅,张长山. 豆豉、纳豆及天培的研究进展[J].中国调味品,2008,(3):29-33
- [4] 蒋立文,夏波.浏阳豆豉发酵微生物的初步研究[J].中国酿造,2004,(12):11-12
- [5] 陈丽燕,钟晓敏,李理. 乳酸对蜡样芽胞杆菌的抑制研究[J].现代食品科技,2009,26(7):756-759
- [6] Wang H. L., Hesseltine C. W.. Multiple Forms of *Rhizopus oligosporus* Protease[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1970, (140): 459-463
- [7] Wang, H. L., Vespa J. B., Hesseltine C. W.. Acid Protease Production by Fungi Used in Soybean Food Fermentation [J]. Applied Microbiology, 1974, 27(5): 906-911
- [8] 钟晓敏,付静,蓝嘉,等. *Actinomucor elegans*、*Aspegillus oryzae* 和 *Rhizopus oligosporus* 产蛋白酶条件及蛋白酶性质的比较[J]. 食品与发酵工业,2009,35(5):40-44
- [9] 张树政.酶制剂工业(下)[M].北京:科学出版社,1984:446-447
- [10] SB/T 10317-1999,蛋白酶活力测定法[S]
- [11] Sushil Kumar, Neeru S. Sharma, Mukh R. Saharan, et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization[J]. Process Biochemistry, 2005, (40):1701-1705
- [12] Lilik Ikasari, David A. Mitchell. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, (19): 171-175