

# 豆乳凝固酶产生菌 UV-10 发酵条件及其酶学性质的研究

蒋咏梅 章文贤 施巧琴 吴松刚

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

**摘要:** 豆乳凝固酶产生菌 *Bacillus* sp. UV-10 的最适产酶条件: 初始 pH6.4, 温度 26℃, 培养时间 19h, 需要较大的通气量。酶的最适作用 pH 和温度分别为 5.8 和 70℃。在最适条件下酶活力可达 1.84u/mL。pH6.0~7.0 稳定性较好。60℃下 1h 残余酶活 60%。Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 对其有较强的激活作用, 而 Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> 则有抑制作用。

**关键词:** 芽孢杆菌, 豆乳凝固酶, 最适产酶条件, 酶学性质

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2564 (2001) 04-0016-04

## FERMENTATION CONDITIONS OF SOYMILK-CLOTTING ENZYME PRODUCTION BY *BACILLUS* SP. AND STUDIES ON THE PROPERTIES OF THE ENZYME

JIANG Yong-Mei ZHANG Wen-Xian SHI Qiao-Qin WU Song-Gang

(Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

**Abstract:** The optimum condition of shaking-flask producing enzyme were the temperature 26℃, initial pH 6.4, fermentation period 19 hours, medium volume 15mL medium/300mL Flask. soymilk-clotting enzyme was obtained from ammonium sulfate precipitation. The optimum temperature and pH for the soymilk-clotting activity was 70℃ and 5.8. The enzyme was easy to lose activity in acid or alkaline circumstance. About 60% of the original activity remained after 1 hour at 60℃. Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> increased the clotting activity, whereas Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> cause inhibition.

**Key words:** *Bacillus* sp., Soymilk-clotting enzyme, Fermentation conditions, Properties of enzyme

作为一种优质的蛋白质资源, 大豆已被用于制造多种传统食品。目前, 新型大豆蛋白食品(如大豆干酪、豆凝乳)的研究工作也在积极开展。据报道<sup>[1,2]</sup>, 利用酶凝固豆乳具有其它传统方法无可比拟的优越性, 但豆乳凝固酶的研究工作开展较晚<sup>[3]</sup>, 且所得菌种产酶活力偏低<sup>[4]</sup>。作者从土壤中筛选并经诱变育种得到一株产酶活力较高的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[5]</sup>, 本文对其产酶条件进行了优化, 并对酶学性质进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 诱变株 UV-10 系作者从土壤中分离, 并经激光和化学诱变筛选得到。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 蛋白胨 5g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 琼脂 20g, 以自来水定容到 1L。

发酵培养基: 麦麸 25g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  5g,  $\text{CaCl}_2$  0.5g, pH6.4, 自来水定容到 1L。

### 1.3 方法

1.3.1 豆乳凝固酶活力的测定: 见文献 [6]。65℃, pH6.0, 1mL 酶液 1min 凝固 10 mL 豆浆的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.3.2 粗酶的制备: 发酵液于 4000r/min 离心 20min, 上清液加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 40% 饱和度, 离心去除杂蛋白, 再加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 70% 饱和度, 离心收集酶。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵条件的优化

2.1.1 起始 pH 对产酶的影响: 将发酵培养基调至不同 pH, 产酶结果如表 1 所示, pH 中性偏酸对产酶较有利, 培养基偏碱则对产酶有抑制作用。

2.1.2 培养温度对产酶的影响: 将摇瓶分别置于不同温度下振荡培养 24h, 测其酶活 (见图 1)。结果表明, 该菌在 26℃ 时产酶量最高。高于 26℃ 时, 产酶受抑制。

2.1.3 通气量对产酶的影响: 250mL 摇瓶分别加 15, 30, 50, 75, 100mL 产酶培养基, 26℃ 培养 24h。由图 2 可见 15~30mL 装量酶活最高, 最高达到 1.84u/mL, 而 100mL 装量则测不到酶活, 说明该突变株对通气量的需求较大。

表 1 起始 pH 对产酶的影响

试验号	起始 pH	终止 pH	酶活 (u/mL)
1	4.0	5.1	1.12
2	5.0	5.8	1.20
3	6.0	6.2	1.54
4	6.4	6.4	1.63
5	7.0	7.0	0.97
6	8.0	7.2	0.53
7	9.0	7.5	0.39

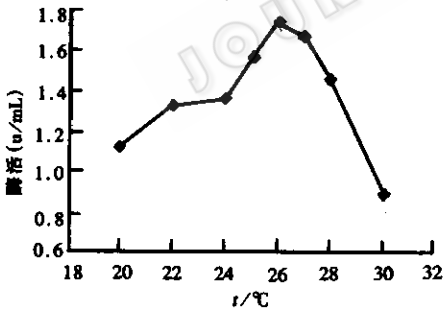


图 1 培养温度对产酶的影响

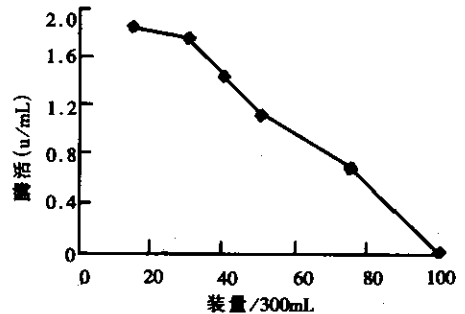


图 2 培养基装量对产酶的影响

2.1.4 培养时间对产酶的影响: 使用最优发酵条件, 26℃ 培养 10~72h, 依次取样测定酶活力和 pH 值, 结果表明 (见图 3): 该突变株培养 19h 产酶量达到最高, 之后较为稳定, 48h 后开始下降。pH 值则在菌体生长初期, 由起始的 6.4 逐渐下降, 酶活达高峰时, pH 降至最低。随着 pH 的上升发酵液酶活力开始逐渐下降。

### 2.2 酶学性质

2.2.1 最适作用温度: 将准备好的豆浆在不同温度下保温 10min, 然后加入酶液测酶活。由图 4 看出, 豆乳凝固酶的反应速度随温度升高而加快。70℃ 酶活最大, 继续升温, 蛋白质变性, 酶活力急剧下降。

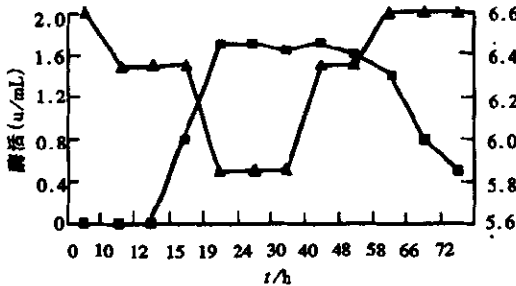


图3 菌株 UV-10 的发酵曲线

—■— 酶活 (u/mL), —▲— pH

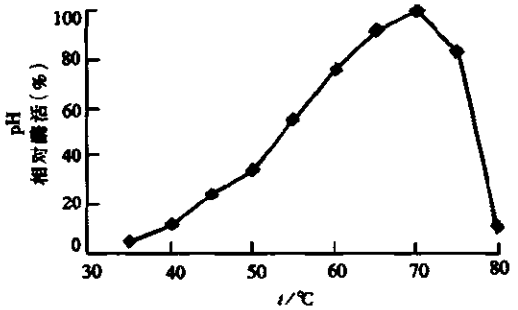


图4 温度对豆乳凝固酶活力的影响

表2 豆乳凝固酶的热稳定性

时间 (min)	温度 (°C)						
	20	40	45	50	55	60	70
10	100	100	100	100	90	80	65
30	100	100	100	100	83	68	57
60	100	100	100	88	75	60	20
90	100	100	100	80	60	43	0

2.2.2 酶的热稳定性: 将该豆乳凝固酶分别在各种温度下保温不同时间, 测定其剩余酶活力。结果表明 (见表2): 该粗酶在45°C时稳定, 55°C处理90min酶活仍有60%, 70°C处理60min完全丧失活力。而70°C却是酶的最适作用温度, 这看起来很矛盾。其原因在于酶的变性不仅取决于温度的高低, 而且与时间长短有关。当凝乳酶被加热到55°C~70°C时, 短时间内表现出高的凝乳活力, 但随着时间的延长, 酶就逐渐失活, 以至最终完全丧失凝乳活力。

2.2.3 反应的最适 pH 值: 将豆浆的 pH 值分别调至 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.7, 由于豆浆在低于 pH5.8 的条件下自凝, 因此本实验中底物 (即黄豆豆浆) 的 pH 不能低于 5.8。结果由图 5 表明, 该豆乳凝固酶随着 pH 值的升高而凝乳速度减慢, pH5.8 时酶活力最高。该结果与其他凝乳酶是一致的, 有关报道<sup>[7]</sup>解释凝乳酶出现该现象的原因是由于在低 pH 值下, 酪蛋白微球的稳定性减小。而关于豆乳凝固酶的原因尚未见报道。

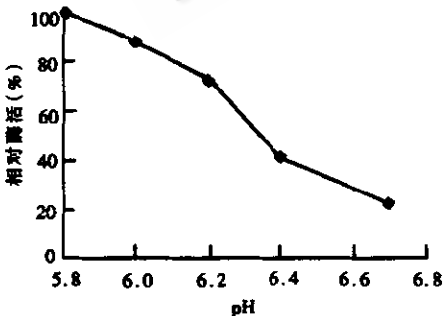


图5 pH对豆乳凝固酶活力的影响

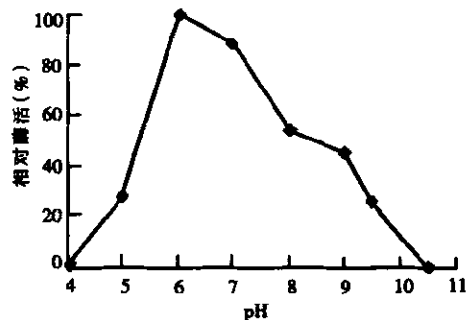


图6 pH对豆乳凝固酶稳定性的影响

2.2.4 pH 稳定性: 将酶液 pH 调至 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 9.4, 10.6, 11.0, 室温 (25°C) 下放置 24h, 然后再将 pH 调至 6.0 左右, 70°C 测定酶的活力, 结果表明 (见图 6): 该酶在 pH6~7 的范围内较为稳定, 偏酸、偏碱的环境都易使之失活。

2.2.5 金属离子对豆乳凝固酶活力的影响: 在作用底物的豆浆中加入不同金属离子, 使

其浓度为 5mmol/L, 测定其酶活力。结果如表 3 所示,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  对该豆乳凝固酶有较强的促凝乳作用, 使凝乳活力增加 2~6 倍,  $\text{K}^+$  作用不明显,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  则有抑制作用。

从金属离子对凝乳活力的影响来看, 不同的离子表现不同, 没有什么规律性。关于  $\text{Ca}^{2+}$  对促凝乳的作用和机理有过许多报道<sup>[8]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  不仅对凝固过程起作用, 即可缩短凝固时间, 使凝乳变硬, 而且对豆乳凝固酶本身也有一定影响。Feder<sup>[9]</sup> 等人提出, 钙离子对许多酶都有保护作用, 主要原因是  $\text{Ca}^{2+}$  能稳定酶的三级结构。除  $\text{Ca}^{2+}$  之外的其他二价金属离子对豆乳凝固酶也有一定的促凝乳作用, 关于其机理, 杨方琪<sup>[10]</sup> 等人认为, 盐的二价金属离子是通过与豆浆中的植酸(盐)和柠檬酸(盐)发生络合反应使豆乳凝固酶 pH 值降低从而加快其凝固。

表 3 金属离子对豆乳凝固酶活力的影响

金属离子	相对酶活 (%)	金属离子	相对酶活 (%)
KCl	95	$\text{CaCl}_2$	450
$\text{FeSO}_4$	560	$\text{ZnSO}_4$	50
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	80	$\text{MgSO}_4$	400
NaCl	250	对照	100

注: 相对酶活力是加入离子后的酶活力与没加入离子活力之比

### 参 考 文 献

- [1] Hashimoto, Toshiro. Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi, 1985, 32 (4): 255~259.
- [2] Katsumi M, Iaso K. Agric. Biol. Chem. 1987, 51 (11): 2928~2933.
- [3] Fuke Y, Matsuoka H. J. Food sci. 1984, 49: 312.
- [4] Yang won P, Iaso K, Biol. chem. 1985, 49: (11) 3215~3219.
- [5] 蒋咏梅, 章文贤, 施巧琴, 等. 福建师范大学学报, 2000, 16 (1): 89~93.
- [6] 刘 勇, 姜成林. 微生物学通报, 1991, 18 (3): 141~144.
- [7] 顾瑞霞, 申 戈. 中国乳品工业, 1991, 19 (1): 20~23.
- [8] 施正学. 生命的化学, 1992, 12 (5): 26~27.
- [9] Feder J. Biochemistry, 1971, 10: 4552~4555.
- [10] 杨方琪. 无锡轻工业学院学报, 1993, 12 (12): 101.