

总状毛霉凝乳酶的研制及初步应用

孙 健

(北京市营养源研究所真菌室 北京 100034)

宋晓红 卢孟柱 刘英华

(北京乳品研究所 北京 100027)

摘要 从 17 株产凝乳酶的霉菌中初筛得到产酶量较高的菌株,再进行⁶⁰Co- γ 射线诱变,得到产酶量较初筛菌株提高 80% 的诱变菌株——总状毛霉 R132。确定了诱变株 R132 的液体发酵产酶工艺及提取纯化路线,获得适于应用的部分纯化酶液样品。用该酶制作的 Adam 干酪与车间生产样品对照进行成熟期理化性质分析的结果基本相同。

关键词 总状毛霉,凝乳酶,干酪

为缓解干酪生产量的不断增加与所需小牛凝乳酶来源日益短缺的矛盾,自本世纪初开始在其他动物、植物及微生物中寻找小牛凝乳酶的代用品。至 60 年代,在微生物中寻找合适的凝乳酶源成为一个新课题。据报道^[1,2],有近 40 余种微生物可产生一定活力的凝乳酶。由 *Bacillus cereus* 产生的凝乳酶可制出脱离苦味的 Cheddar 干酪;由 *Macor pusillus* 产生的凝

乳酶适用于一些干酪的生产,不具有异味,如 Buttre、Edam 和 Tilsit 干酪等^[3,4]。目前,全世界微生物凝乳酶用量已超过总用量的三分之一^[4]。

干酪是一种营养价值很高的食品。制作中通过添加凝乳酶,将牛奶中蛋白质凝结并排出

1992-10-07 收稿

乳清,使其营养成分浓缩10倍。我国虽然引进了部分干酪生产线,而所有生产用酶均需进口,因此,凝乳酶的研制成为当务之急。

我们从17株霉菌出发,通过筛选、诱变及培养条件的摸索,得到了通过毒理安全性试验的凝乳酶样品,经过小型发酵罐放大及粗酶的部分提纯,在Adam干酪试制中获得了理想效果。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

易脆毛霉 (*Mucor fragilis*), 微小毛霉 (*Mucor parainii* Chadat at Nechitch), 总状毛霉 (*Mucor racemosus*), 五通桥毛霉 (*Mucor wutungkiao* Fang) 和米根霉 (*Rhizopus oryzae*), 分别取自本所菌种保藏组和轻工业部食品与发酵工业研究所菌种室。

1.2 发酵培养基

1.2.1 液体发酵培养基:

培养基 A (%) : 麸皮 3, 葡萄糖 2, 豆粉 0.2, 奶粉 0.1, NaNO_3 0.3, KH_2PO_4 0.05, MgSO_4 0.025, pH6.8。

培养基 B (%) : 麸皮 4, 葡萄糖 6, NaNO_3 0.3, KH_2PO_4 0.05, MgSO_4 0.025, pH6.8。

1.2.2 半固体发酵培养基 A: 麸皮:水 = 1 : 0.8, 水中溶解有 2% 葡萄糖。

1.2.3 半固体发酵培养基 B: 乳清 100ml, pH6.8, 加麸皮 4% 或 6%。

1.3 筛选方法

1.3.1 平板初筛: 取适量霉菌的孢子菌悬液涂布于酪蛋白水解平板上。平板中菌落周围出现有白色沉淀圈, 说明该菌株产生的凝乳酶将酪蛋白凝结出来; 在白色沉淀圈内又出现透明圈, 则说明该菌株所产生的蛋白酶将酪蛋白分解。挑选菌株则以白色沉淀圈大而透明圈小者为佳。

1.3.2 摇瓶试验: 将斜面菌种接种于装有 100ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶中, 于 28℃、240 r/min 振荡培养 3 天。过滤发酵液, 分别定量测定凝乳酶活力与蛋白分解酶活力。

1.4 酶活力测定方法

1.4.1 凝乳酶活力测定: 参照《乳与乳制品生产》^[8]一书中凝乳酶活力单位的规定而设计。取脱脂奶粉液 (9% pH6.2) 10ml 于 35℃ 水浴 10 分钟, 加入适当浓度酶液 (酶液在 35℃ 水浴中) 1ml, 摇匀并开始记时, 直至试管壁开始出现凝集颗粒为止, 记录凝乳时间。将 40 分钟凝集 1ml 9% 脱脂奶粉液的酶定为一个凝乳酶单位 (u)。

$$\text{每毫升酶液的总单位数} = \frac{40 \times 10 \times n}{t \times 1}$$

其中, t: 凝乳时间 (分钟) n: 酶液稀释倍数

1.4.2 蛋白分解酶活力测定: 用 pH5.5 的醋酸缓冲液配制 1.2% 酪蛋白溶液。取该溶液 5ml 与 1ml 酶液于 35℃ 反应 10 分钟, 以三氯乙酸终止酶反应过滤。取上清液 2ml 与 Na_2CO_3 溶液 5ml 混合, 在波长 280nm 测定 OD 值。

1.5 粗酶液制备及 Adam 干酪制作

将斜面种子接种于液体发酵培养基中, 28℃、240 r/min 摇床培养 3 天, 将发酵液依次经过滤、抽滤、超滤浓缩、加乙醇 (先以 1 : 0.72V/V 混合后离心, 再取上清液加乙醇至 1 : 0.87V/V, 放置过夜) 和离心, 最后取沉淀溶解于 pH5.5 的醋酸缓冲溶液中。

在装有干酪奶 100L 的 35℃ 保温槽中, 顺加 CaCl_2 、 KNO_3 溶液和 Adam 干酪发酵剂。当奶的 pH 降至 6.4 时, 加入浓度为 4000u/ml 的凝乳酶液, 搅拌均匀, 使之在 30min 内全部凝乳, 然后切割、排乳清、预压、装模、压榨、盐渍、包装和后熟 (5℃ 成熟室存放 50 天), 最终制成 Adam 干酪样品。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选

通过摇瓶培养观察菌体生长情况和检测培养液的凝乳时间, 结果表明总状毛霉 R1、R2、R3 在 40 分钟以内凝乳, 酶活力达到 180—320u/ml。其中以 R3 的凝乳酶活力最高, 蛋白质分解也不明显, 为以下实验所选用。

2.2 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱变育种

总状毛霉 R3 的单孢子悬液经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线处理,照射剂量为 2、4、6、8、 $10 \times 10^4 \text{rad}$ (死亡率均在 95% 以上)。根据初筛平板上白色沉淀圈与透明圈的大小,选出了凝乳酶活力与分解酶活力比值较大的变异株共 154 株。通过摇瓶复筛,有 9 株产酶活力较出发菌株 R3 提高,最高的一株 R132 可提高 80%,而蛋白分解酶活力相对较弱(表 1)。虽然 R1213 的凝乳酶活力也提高 80%,但它的蛋白分解酶活力较 R132 的高,因此只选用 R132 菌株进行发酵试验。

2.3 变异株 R132 发酵产酶条件的优化

将 R132 株在半固体培养基和麸皮浸液的培养基中培养,其产酶情况均不如培养基 A 的效果好。所以,R132 株的发酵产酶采用液体发酵法。

2.3.1 培养基有机成分的正交试验:采用 $L_9(3^4)$ 分别对麸皮(1,2,4%),葡萄糖(1,3,6%),豆粉(0,0.2,0.5%),奶粉(0,0.1,0.2%)进行正交试验。结果证明葡萄糖为显著因子,麸皮次之,奶粉与豆粉显示较弱的负效应(图 1)。选出优化的培养基 B,其配方(%)为:麸皮 4,葡萄糖 6, NaNO_3 0.3, KH_2PO_4 0.05, MgSO_4 0.025。

表 1 变异株与出发菌株的酶活力比较

菌种	凝乳酶活力 (u/ml)	蛋白分解酶活力 (u/ml)	凝乳酶活力 蛋白分解酶活力	凝乳酶活力 提高率(%)
出发菌株 R3	240	68	3.5	
变异株 R11	708	58	5.3	28
R2161	292	106	2.8	22
R115	270	44	6.1	12
R132	434	75	5.8	80
R13	406	50	6.8	67
R1163	308	106	2.9	28
R1122	300	152	2.0	25
R1213	434	113	3.8	80
R3224	400	185	2.2	67

2.3.2 添加玉米粉及乳清对产酶影响:添加玉米粉及乳清的培养基产酶效果不佳,不如培养基 B(表 2)。

另外, NaNO_3 , MgSO_4 和 KH_2PO_4 为液体培养基的必需成分, NaNO_3 不能用有机氮源代替, TW-80 的添加对液体发酵产酶不起作用。

表 2 添加玉米粉和乳清对产酶的影响

	培养基 B	培养基 A		乳清 100ml pH6.8	
		加玉米粉 2%	不加玉米粉	加麸皮 4%	加麸皮 6%
凝乳酶活力 (u/ml)	360	203	225	167	191

2.3.3 pH对产酶的影响:分别配制不同初始pH的培养基B,经过48小时摇瓶培养,测定培养液的凝乳时间。从图2可见。初始pH越低,凝乳时间越短。但观察到菌体在酸性或碱性较

强的培养液中生长不良。由于培养液过酸亦可造成凝乳。所以将此试验发酵后的酶液pH统一调至6.0进行测定。结果在培养基初始pH6.5-7.5时所产凝乳酶活力最高。

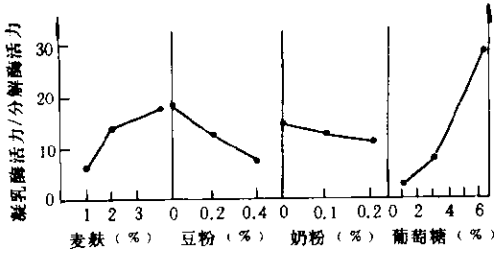


图1 培养基成分对变异株 R132 发酵产酶的影响

在发酵过程中,随时间和产酶量的增加,发酵液的pH由高变低。通过添加CaCO₃及中间流加NaOH溶液的控制试验,可使发酵终点pH控制在6.0,与未控制组对照,产酶量稍有增加。由于在小试中易造成污染,暂不进行pH控制发酵。

2.3.4 发酵时间对产酶的影响:250ml三角瓶装100ml培养基B,pH6.8,灭菌后接种,于28℃240r/min部养(图3)。产酶活跃期在48-

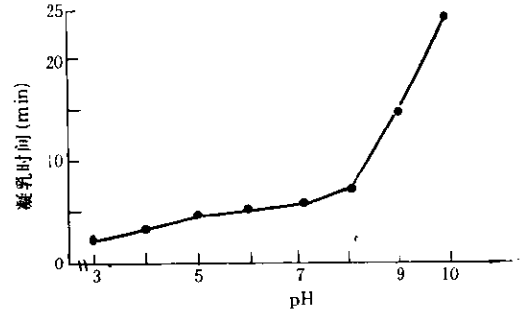


图2 培养基初始 pH 与产凝乳酶活力的关系

72小时,在72小时左右达到产酶高峰400u/ml。

2.3.5 发酵罐产酶过程:15L发酵罐内装12L培养基B,接种4%种子液,通入空气压力4Pa,气流量6-12L/min,搅拌速度300r/min,温度28-30℃。最高产酶与摇瓶相当,发酵时间减少至60小时,残糖量较摇瓶高,终点pH降低(图4)。

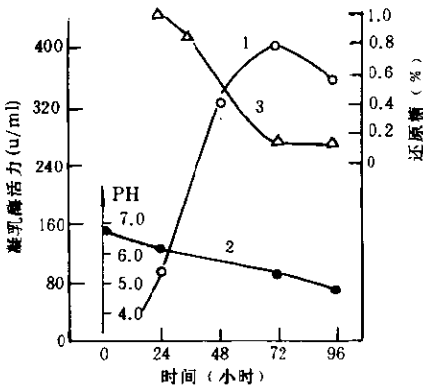


图3 R132 菌株摇瓶发酵产酶过程
1. 酶活力 2. pH值 3. 还原糖

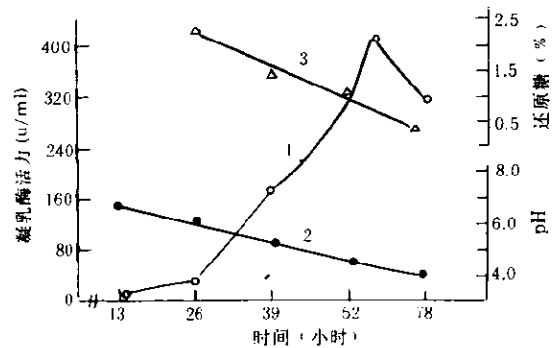


图4 发酵罐发酵产酶过程
1. 酶活力 2. pH值 3. 还原糖

2.4 发酵液后处理及粗酶液的部分纯化

发酵液提取纯化凝乳酶的工艺步骤:发酵液→粗滤→絮凝→抽滤→超滤浓缩→第一级酒

精沉淀→取清液→第二级酒精沉淀→将沉淀溶解、离心→酶液。依据试验条件,处理 5000ml 发酵液,结果见表 3。

表 3 酒精沉淀法提取凝乳酶

步骤	体积 (ml)	凝乳酶活力 (u/ml)	酶活收率 (%)	比活力 (u/mg)	蛋白分解酶活力 (u/ml)
原酶液	5000	370	—	106	98
清液超滤浓缩	500	3000	98	151	860
第一级酒精沉淀	880	2130	85	221	629
第二级酒精沉淀 (湿酶泥)		76000(u/g)	76	372	1021u/g

上述试验中超滤浓缩选用丹麦 DDS 3 万分子筛膜超滤,第一级酒精沉淀所用体积比(酒精与浓缩发酵酶液)为 1 : 0.72,第二次酒精沉淀所用体积比为 1 : 0.87。

2.5 安全试验

将酶液进行毒理学试验。急性毒性试验(LD₅₀):大白鼠:雄>10.0g/kg,雌>21.5g/kg;小白鼠:雄>21.5g/kg,雌>21.5g/kg。根据毒性分级属无毒物质。Ames 试验(鼠伤寒沙门氏菌/大鼠肝微粒体酶系统)检测结果为致突变反应阴性。经北京市卫生防疫站检测该酶液符合食品添加剂卫生标准。

2.6 Adam 干酪的制作和成份分析

将所得湿酶泥溶解于 pH5.5 醋酸缓冲液中,离心,取清液制成 4000u/ml 酶液,用此酶液制得农家干酪(鲜干酪)。此干酪与小牛凝乳酶所制鲜干酪在凝乳效果、组织状态、口感风味上均无差别。制作的 Adam(半硬)干酪与小牛凝乳酶制作的样品(车间产品)于成熟期 50 天

后的成分分析对比见表 4 和表 5。两种干酪在软硬度、口感风味和香味上基本相同。若能进一步选择与微生物凝乳酶相适宜的干酪发酵剂及干酪制作工艺,改善该酶所制干酪在色泽及弹性上的不足,将会得到更为理想的效果。

表 4 干酪样品的成分分析

检测项目	R132 酶所制	小牛凝乳酶所制
水分(%)	44.9	45.1
灰分(%)	4.4	4.5
酸度(T)	23.2	17.1
脂肪(%)	21.4	23.4
盐(%)	1.64	1.63
酪蛋白(%)	17.6	19.6
总蛋白(%)	23.7	24.4
乳酸菌数(×10 ⁴)	1.4	1.7

表 5 干酪样品氨基酸分析结果

种类	总氨基酸(mg/100mg)		游离氨基酸(mg/100mg)	
	R132 酶所制	小牛酶所制	R132 酶所制	小牛酶所制
天门冬氨酸	1.78	1.66	0.022	0.023
苏氨酸	0.92	0.90	0.173	0.139
丝氨酸	1.38	1.34	0.067	0.053
谷氨酸	5.68	5.35	0.152	0.153

续表

种类	总氨基酸(mg/100mg)		游离氨基酸(mg/100mg)	
	R132 酶所制	小牛酶所制	R132 酶所制	小牛酶所制
甘氨酸	0.51	0.49	0.021	0.021
丙氨酸	0.81	0.74	0.050	0.040
缬氨酸	1.71	1.68	0.108	0.092
蛋氨酸	0.74	0.69	0.032	0.032
异亮氨酸	1.28	1.30	0.057	0.040
亮氨酸	2.63	2.57	0.208	0.197
酪氨酸	1.32	1.32	0.055	0.020
苯丙氨酸	1.40	1.37	0.123	0.096
赖氨酸	2.08	2.07	0.146	0.116
氨	0.62	0.51	0.042	0.040
组氨酸	0.79	0.77	0.019	0.018
精氨酸	0.89	0.85	/	0.007
脯氨酸	2.95	2.83	0.067	0.052
色氨酸	0.48	0.47	0.015	0.009
胱氨酸	0.16	0.15	/	/
总和	28.03	27.08	1.357	1.148

3 结 论

总状毛霉变异株 R132 为好氧菌株,适于液体培养产生凝乳酶,培养基成分及提取工艺简单易行,最终所得固体湿酶的酶活力可达 $7.6 \times 10^4 \text{u/g}$,样品酶液活力为 4000u/ml ,可以直接用于干酪制作。所制的 Adam 干酪样品与对照样品相比,在口感风味,软硬度及理化分析结果基本相同。此酶有希望替代进口小牛凝乳酶用于制作农家干酪和 Adam 干酪。

参 考 文 献

[1] Sardinas J L. Applied Microbiology, 1968, 16(2):248-

255.

- [2] Arima K. Agric Biol Chem, 1967, 31(5):540-545.
 [3] Sardinas J L. Process Biochem, 1976, 11(4):10-17.
 [4] Sigmund Schwimmer. Source Book of Food Enzymology, U S A, 1981.
 [5] A 贝斯曼. 酶生物技术手册, 北京: 科学出版社, 1989. 295-304, 372-375.
 [6] 张树政. 酶制剂工业, 北京: 科学出版社, 1984. 189-218.
 [7] 高培基, 曲音波, 钱新民, 等. 微生物生长与发酵工程, 山东济南: 山东大学出版社, 1990. 97-106.
 [8] 金世举. 乳与乳制品生产, 北京: 轻工业出版社, 1977. 428-441.

THE STUDY ON RENNIN PRODUCED BY *MUCOR RACEMOSUS* AND ITS UTILIZATION

Sun Jian Song Xiaohong Lu Mengzhu Liu Yinghua

(Beijing Research Institute For Nutritional Resources 100054)

Abstract The *Mucor racemosus* R3 with higher rennin activity was chosen from 17 rennin producers. After the strain R3 was mutated by ^{60}Co -r treatment, a highest rennin producers-R132 was selected. Its rennin activity reached 180% of the original strain. The rennin manufacture processes from fermentation to enzyme purification were established. The rennin R132 was used in experiment to make Adam cheese. The analytical results indicated that the physical and chemical properties of the laboratory cheese were similar to those of the factory-cheese.

Key words *Mucor racemosus*, Rennin, Cheese