

微小毛霉凝乳酶的生物合成和性质的研究

矫庆华 钱世钧 孟广震

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

从19株真菌中筛出一株微生物凝乳酶高产菌株,微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 602。在含有50—60% 麸皮的半固体培养基中,起始 pH 5.0—6.7, 28℃, 培养96小时,凝乳酶最高活力为17000u/g 麸皮。补加葡萄糖、蔗糖、硫酸铵、乳清粉均对酶的产生无显著影响。

酶的凝乳活力与蛋白水解活力作用的最适温度均为65℃, 此酶具有较高的凝乳活力对蛋白水解活力的比值,凝乳酶的 pH 稳定范围为4—8, 凝乳酶在60℃保温5分钟,活力完全丧失。以上性质对于干酪的制造是有利的。

关键词 微小毛霉;凝乳酶;干酪

凝乳酶广泛存在于动物、植物和微生物中,而传统用于干酪制造业的来自于小牛的皱胃酶^[1]。随着干酪业发展的需求及小牛全球性的缺少,至使近些年来微生物凝乳酶日趋成为小牛皱胃酶的较好的代用品。许多工作者对从植物、动物和微生物来源的凝乳酶进行了广泛的研究,但在工业生产中应用最多的只有三种,这三种酶分别来自于寄生内座壳菌 (*Endothia parasitica*)、米黑毛霉 (*Mucor miehei*) 和微小毛霉 (*Mucor pusillus*)^[1,2]。

我们从19株毛霉中筛选出一株高产凝乳酶的微小毛霉菌株,本文报道该酶形成的最佳条件、酶的制备及性质的研究。

材料和方法

(一) 菌种来源

共19株毛霉。其中5株微小毛霉、1株米黑毛霉和13株未定名菌株。其中:*M. pusillus* IFO, *M. miehei* CBS 由日本东京大学农业化学系 T. Beppu 教授赠送。12株为本所分类室提供,其它为本所菌种保藏室提供。

(二) 斜面培养

马铃薯葡萄糖斜面, 在无菌条件下接种,于28℃培养6天。

(三) 三角瓶半固体培养基和培养方法

称10g 麸皮加10ml 自来水装于250ml 三角瓶中,搅拌均匀,0.55kg/cm² 灭菌30分钟,冷却后在无菌条件下接种。(每支斜面加5ml 无菌水,每三角瓶接种2ml 孢子悬浮液。) 加盖8层纱布于28℃ 静止培养72小时。

(四) 酶的提取

培养后,每三角瓶中加40ml 自来水,捣碎培养物,室温放置过夜,用纱布压滤,于10000r/min 离心10分钟,取上清液测凝乳活力和蛋白水解活力。

(五) 凝乳酶活力的测定

采用 Arima 方法^[2]。用0.01mol/L CaCl₂ 液配制10% 脱脂奶粉液。此溶液配制后在室温放置40分钟以上使用,当天使用有效,不宜冰箱放置。取5ml 10% 脱脂

本文于1990年8月15日收到。

奶粉液于 35℃ 保温 10 分钟, 加 0.5ml 适当稀释的酶液(酶液也于 35℃ 保温), 立即摇匀, 开始计时。(凝乳时间控制在 40—90 秒。)并把试管倾斜 45° 以上, 沿试管轴方向旋转, 观察管壁上开始出现凝集小颗粒为终点, 记录凝乳时间。在上述条件下, 40 分钟凝集 1ml 10% 脱脂奶粉的酶量定义为一个 Soxhlet 单位 (SU)^[3]。

Soxhlet 单位 (SU) = 2400/T

× 5/0.5 × D × V/g

式中: T: 凝乳时间(秒)

D: 稀释倍数

V: 提取液的体积

g: 所用麸皮的克数

(六) 蛋白水解活力测定

方法 1: 采用修改了的 Arima 方法^[2]。用 pH6.0, 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液配制 1.2% 酪素溶液, 取 5ml 此溶液, 加 1ml 酶液, 35℃ 保温 10 分钟, 用 5ml 0.44mol/L 三氯醋酸终止酶反应, 继续保温 20 分钟, 反应混合物用滤纸过滤。取滤液 2ml, 加 0.55mol/L Na₂CO₃ 液 5ml, 再加 0.7mol/L 的 Folin 试剂 1ml, 35℃ 保温 20 分钟, 于 660nm 读吸光度 A 值。

方法 2: 用 pH4.0 的 0.1mol/L 柠檬酸

缓冲液配制 20mg/ml 的血红蛋白液。取此液 1ml 于不同温度下保温 10 分钟, 加适当稀释的酶液, 反应 10 分钟, 加 2ml 10% 三氯醋酸终止酶反应, 用滤纸过滤, 于 280nm 读吸光度 A 值^[4]。

(七) 蛋白质测定

采用 Folin-酚法^[5]。

(八) 粗酶液的制备

取 3000g 麸皮加 3000ml 自来水拌匀, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟。取预先培养的固体曲种子 90g 加 600ml 无菌水拌匀, 接种到上述培养基中, 将培养物平均分散到 6 个搪瓷盘中 (48 × 34cm), 28—30℃ 培养三天, 合并培养物, 加 12000ml 自来水浸泡过夜, 用纱布压滤, 离心取上清液加乙醇, 其比值为 1:0.6(V/V), 放置 4 小时, 离心取上清液, 加乙醇, 其比为 1:0.8(V/V), 放置过夜, 离心, 将沉淀用 pH5.0 的 0.05 mol/L 醋酸缓冲液溶解, 活力约为 100000 u/ml。

结 果

(一) 菌种选育

采用上述半固体培养方法进行菌种选育。19 株菌均有凝乳活力, 但水平相差甚

表 1 不同菌株凝乳活力对蛋白水解活力的比值

Table 1 The ratio of milk-clotting activities to proteolytic activities of the enzymes from different strains

菌 株 Strains	凝乳活力 Milk-clotting activity (u/g wheat bran)	蛋白水解活力 Proteolytic activity (A ₆₆₀ /g wheat bran)	凝乳活力/蛋白水解活力 Ratio of milkclotting/ proteolytic activity(u/A)
微小毛霉 Mucor pusillus IFO 4578	10779.39	7.446	1447.67
微小毛霉 Mucor pusillus 602	16755.60	8.024	2088.18
微小毛霉 Mucor pusillus B	16238.80	8.118	2000.47
米黑毛霉 Mucor miehei CBS 182-67	11255.17	7.820	1439.28

大,活力范围在 17741.3—63.3u/g 麸皮。微小毛霉 602 活力最高,为 17741.3 u/g 麸皮。又从 4 株较高活力的菌株中比较其自身的凝乳活力与蛋白水解活力的比值,发现微小毛霉 602 的比值高,微小毛霉 B 次之(表 1)。

(二) 微小毛霉 602 培养条件

1. 半固体培养基的固-液之比对酶产生的影响: 分别称 10g 麸皮于 250ml 三角瓶中,与不同量的自来水混合均匀,接种,静止培养三天,结果如图 1 所示。固-液最佳比值为 1:0.8 到 1:1 (麸皮含量相当于 50—56%)。

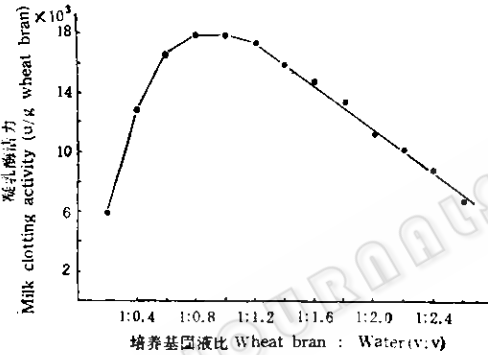


图 1 培养基固-液之比对酶产生的影响
Fig. 1 Effect of the proportion of wheat bran to water on rennet yield

2. 培养温度对酶产生的影响: 10g 麸皮加 10ml 自来水混匀,接种,分别于 24、28、32、37 和 45℃ 培养不同时间,实验结果(图 2)表明,28℃ 培养活力最高,37℃ 培养虽然第一天产酶活力较高,但随着时间的延长,活力趋于平稳不再提高。

3. 培养时间对酶产生的影响: 接种后,于 28℃ 培养不同时间,取样测定凝乳活力,结果(图 3)表明,培养到第四天时产酶活力最高,而第五天活力开始下降,培养到第七天时,活力降至最高活力的 40%。

4. 培养基初始 pH 对酶形成的影响:

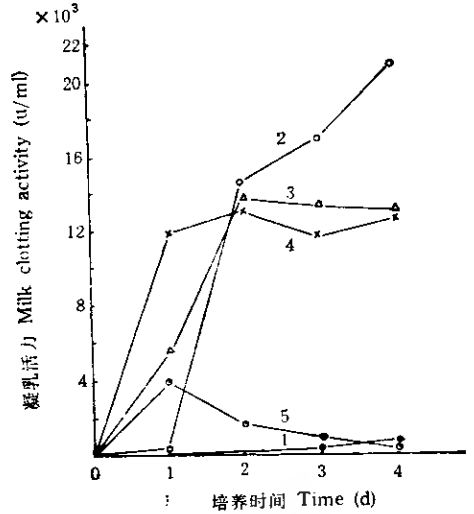


图 2 培养温度对酶产生的影响
Fig. 2 Effect of temperature on rennet yield
1. 24°C; 2. 28°C; 3. 32°C; 4. 37°C; 5. 45°C

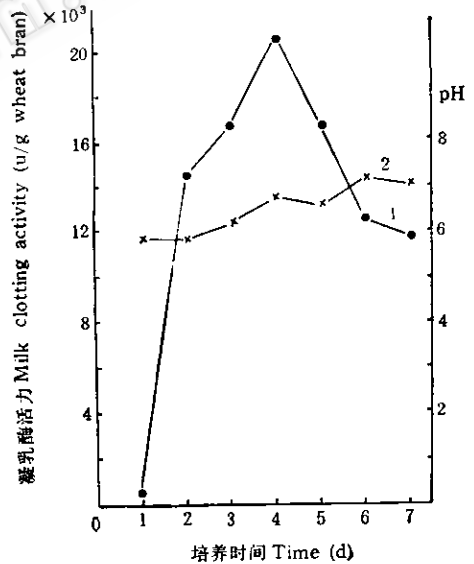


图 3 培养时间对酶形成的影响
Fig. 3 Time course of rennet formation at semisolid culture

- 1. 酶活力 Milk clotting activity;
- 2. 提取液的 pH pH of extract

分别称 10g 麸皮于 250ml 三角瓶中,加不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (0.05mol/L) 或水相混合,接种,28℃ 培养

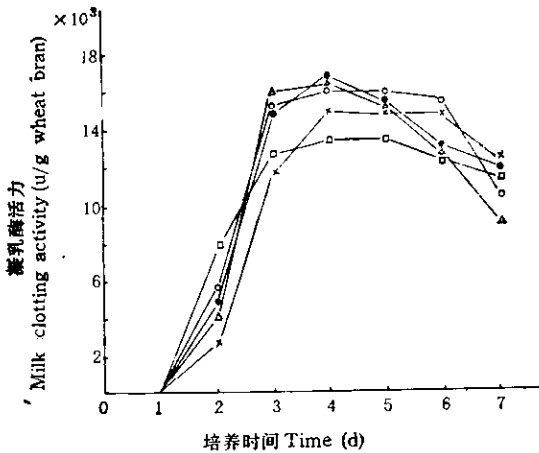


图4 初始 pH 对酶形成的影响

Fig. 4 Effect of initial pH of medium on rennet formation

○——○ pH 5.0; ×——× pH 6.0;
 △——△ pH 6.6; □——□ pH 7.0;
 ●——● H₂O

七天, 实验结果如图 4。用缓冲液代替水与麸皮混合, 使酶的产生在高峰之后都有一个较宽的稳定范围, 最适 pH 范围在 5.0—6.6, 高于 pH 6.6 对酶的形成不利。

5. 碳源对酶产生的影响: 在以麸皮为基础的培养基中, 分别添加葡萄糖、蔗糖进行产酶实验。由表 2 可见, 加葡萄糖达

表2 碳源对酶产生的影响

Table 2 Effect of additional carbohydrates on the enzyme production

碳源	浓度	提取液 pH	酶活力
Carbon source	Conc. (%)	Extract pH	Milk-clotting enzyme activity (u/g wheat bran)
葡萄糖 Glucose	0.0	6.5	17627.1
	0.5	6.4	19759.1
	1.0	6.4	18047.8
	1.5	6.4	18007.5
	2.0	6.4	17142.9
蔗糖 Sucrose	0.0	6.5	17267.1
	0.5	6.4	17821.8
	1.0	6.4	18761.4
	1.5	6.4	17897.9
	2.0	6.4	17681.7

0.5% 浓度时, 产酶则有少量增加, 但葡萄糖浓度的提高而凝乳酶活力不再上升。蔗糖对酶产生无影响。

6. 氮源对酶产生的影响:

(1) 在半固体培养基中添加不同量 (0—1%) 的硫酸铵, 于 28℃ 培养 4 天, 提取后测定凝乳酶活力、蛋白水解活力及提取液 pH, 结果表明添加硫酸铵对酶的产生无影响。

(2) 分别称 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6g 乳清粉与 10g 麸皮相混合, 再分别加入 10ml 自来水混匀, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟, 分别接种 2ml 孢子悬浮液, 28℃ 培养 4 天。对照中不加乳清粉。结果表明, 随着乳清粉浓度的增加, 凝乳活力也相应地增加。当乳清粉浓度增加到 5% 时, 则酶活力比对照增加 13.8%, 而乳清粉浓度继续增加则活力下降。

(三) 粗酶的性质

1. 酶的 pH 稳定性: 取粗酶液 (约 100000u/ml) 1ml, 用蒸馏水稀释到 200ml, 每份取 10ml, 用 0.05mol/L NaOH 或 HCl 调不同 pH 值, 在 8℃ 放置 20 小时, 并用 0.05mol/L HCl 或 NaOH 调到 pH 6.0, 并用 pH 6.0 的蒸馏水定容到 25ml, 取此酶液 0.5ml 测定酶活力和蛋白水解活力。结果如图 5。凝乳酶活力与蛋白水解活力均在 pH 4—8 之间比较稳定, 剩余活力均在 95% 以上。

2. 酶的热稳定性: 取粗酶液 (100000 u/ml) 1ml, 用 pH 6.0 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液稀释到 200ml, 每份取 10ml 于 40、50、55、60℃ 分别保温不同时间取样, 立即于冰水中冷却, 再放室温平衡, 于 35℃ 测定酶活力, 结果如图 6。酶在 50℃ 保温一小时剩余活力为 90% 以上。而在 55℃ 则剩余活力为 60%, 在 60℃ 保温 5 分钟, 酶活力完全丧失。

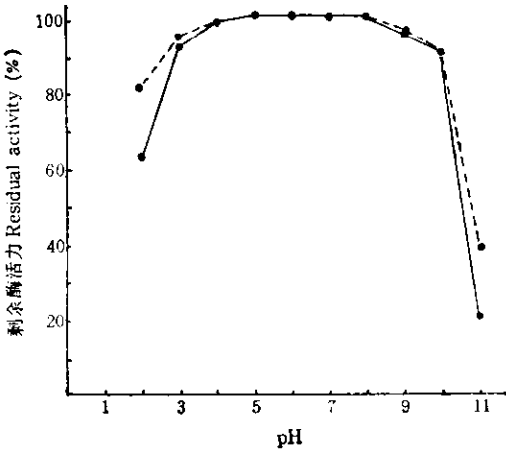


图5 酶的pH稳定性

Fig. 5 Stability of the enzyme at different pH valume

- 凝乳酶的剩余活力 Residual activity of milk clotting;
- - -●- - 蛋白水解剩余活力 Residual activity of proteolytic activity

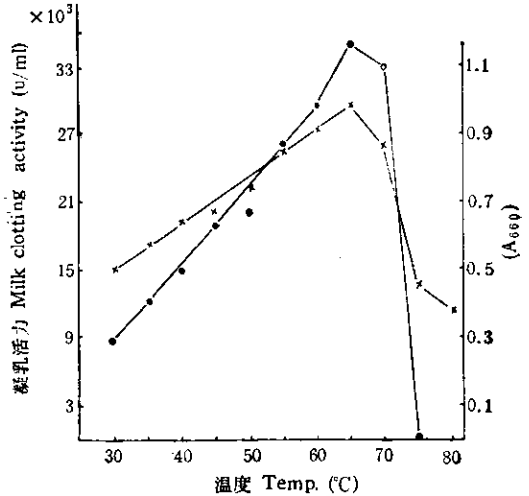


图7 温度对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the enzyme activity

- 1.凝乳活力 Milk clotting activity;
- 2.蛋白水解活力 Proteolytic activity

用的最适温度均为 65°C。

讨 论

众所周知，几乎所有的酸性蛋白酶都有凝乳作用，但对于干酪制造所用的酶，它的凝乳活力与蛋白水解活力的比值就显得非常重要。Arima^[2]描述了链霉菌产生的凝乳酶具有强的蛋白水解活力。Velslov^[6]也描述了由曲霉产生的凝乳酶比小牛凝乳酶的蛋白水解活力高100倍。我们研究的微小毛霉602所产生的凝乳酶虽然也属于天门冬氨酸蛋白酶^[7]，但它的凝乳活力与蛋白水解活力的比值较高，说明它是一种较好的小牛凝乳酶的代用品。

微小毛霉602在半固体培养基上在28—30°C，可产生较高活力的凝乳酶，但培养基的含水量对酶的形成影响极大。在深层液体培养时，只长菌丝不产酶(数据未列出)，补加有机氮与无机氮对酶形成的影

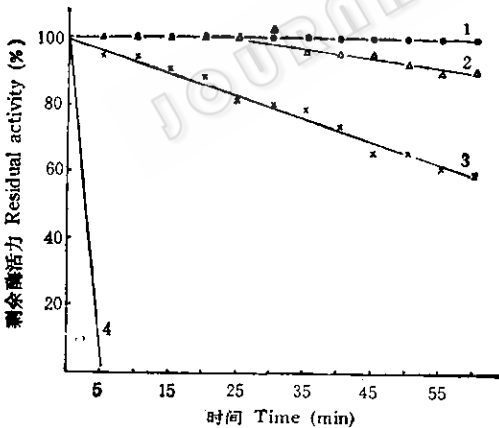


图6 酶的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of the enzyme
1. 40°C; 2. 50°C; 3. 55°C; 4. 60°C

3. 温度对酶活力的影响: 以血红蛋白为底物测定蛋白水解活力。结果如图7。不论对凝乳活力、还是蛋白水解活力,酶作

响不同, 添加硫酸铵对酶的产生无影响。添加一定量的乳清粉对酶的形成有益。

微小毛霉 602 的 pH 稳定范围与 Arima^[2] 报道的基本一致。在无底物保护下, 酶的热稳定性较差, 于 60°C 保温 5 分钟活力完全丧失, 这一点对于干酪制造有利。

参 考 文 献

[1] Sardinias, J. L. et al.: *Process Biochemist-*

ry, 11(4): 10—17, 1976.

[2] Arima, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 31(5): 540—545, 1967.

[3] Hideyuki, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 42(12): 2227—2231, 1978.

[4] Anson and Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physic.*, 16: 59, 1932.

[5] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 第 27 页, 科学出版社, 北京, 1973 年。

[6] Velselov, P. Y. et al.: *Prikl. Biokhimiya Mikrobiologiya*, 1: 52, 1965.

[7] 钱世钧等: 微生物学报, 29(4): 272—277, 1989.

BIOSYNTHESIS AND PROPERTIES OF MILK-CLOTTING ENZYME FROM *MUCOR PUSILLUS*

Jiao Qinghua Qian Shijun Meng Guangzhen

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A high yield strain *Mucor pusillus* 602 was screened from 19 different fungi strains for production of microbial rennet. The best yield of the enzyme is about 17000u/g wheat bran obtained from semisolid culture contained 50—56% of wheat bran with initial pH 5.0—5.7 at 30°C for 96 h. However additional glucose, ammonium sulfate, whey powder have no significant effects on the rennet formation.

Biochemical properties of the enzyme

were examined as follows. optimum temperature for both milk-clotting activity and proteolytic activity is about 65°C. The enzyme showed better stability between pH 4—8. Higher ratio of milk-clotting activity to proteolytic activity and lower thermostability make the enzyme advantageous to cheese-making process.

Key words

Mucor pusillus; Rennet; Cheese