

米曲霉双菌株组合制曲对产蛋白酶的影响

李 鹏^{1,2}, 张艳芳¹, 王选年^{*1}

(1. 新乡学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003; 2. 郑州大学 生命科学院, 河南 郑州 450000)

摘要: 通过对 2 株米曲霉菌株进行组合制曲培养, 以中性蛋白酶、氨肽酶为指标, 得到制曲时间短、制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性高的组合比例。将 2 株米曲霉菌株按合适比例进行组合制曲培养, 检测中性蛋白酶和氨肽酶活力。在 pH 7.2、30 ℃ 条件下对单菌株进行制曲培养, CICC2339 和 CICC2066 菌株中性蛋白酶活力在 42 h 分别达到 1187.7 U/g 和 830.8 U/g, 其氨肽酶活力分别在 42 h 和 60 h 达到最高值 93.2 U/mL 和 201.4 U/mL, 最优组合菌株 A6B4 制曲 42 h 中性蛋白酶和氨肽酶活力最高分别达到 1 366.8 U/g 和 148.7 U/mL, 其中性蛋白酶和氨肽酶活力都较单菌株制曲具有优势。2 株米曲霉菌株组合制曲能够缩短制曲时间, 提高中性蛋白酶和氨肽酶活力, 这些研究结果为米曲霉在食品发酵上的进一步了解提供帮助。

关键词: 米曲霉; 组合制曲; 中性蛋白酶; 氨肽酶

中图分类号: TS 251.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)02-0206-05

Effects of Combination Koji Making of Two Strains of *Aspergillus oryzae* on Proteases System

LI Peng^{1,2}, ZHANG Yanfang¹, WANG Xuannian^{*1}

(1. School of Life Science and Technology, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China; 2. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Two stains of *Aspergillus oryzae* were selected in combined of koji making, in order to shorten koji making time and increase activity of neutral protease and aminopeptidase. The two strains of *Aspergillus oryzae* were combined by appropriate proportion during koji making. The activity of neutral protease and aminopeptidase were determined. Single strain koji was cultivated for pH 7.2, 30 ℃. The neutral protease activity of CICC2339 and CICC2066 were reached 1 187.7 U/g and 830.8 U/g on 42 h respectively, the aminopeptidase were reached 93.2 U/mL and 201.4 U/mL on 42 h and 60 h respectively. The highest activity of neutral protease and aminopeptidase of optimal combination A6B4 were reached 1 366.8 U/g and 148.7 U/mL on 42 h respectively, which had advantages than single strain. The combination could shorten koji making time, increase the activity of neutral protease and aminopeptidase. These results provided some assistance to the further

收稿日期: 2015-08-19

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究项目(2011C550002)。

* 通信作者: 王选年(1969—), 男, 河南灵宝人, 教授, 农学博士, 硕士研究生导师, 主要从事微生物学与免疫学方面研究。

E-mail: wangxuannian@163.com

引用本文: 李鹏, 张艳芳, 王选年. 米曲霉双菌株组合制曲对产蛋白酶的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(2): 206-210.

understanding of *Aspergillus oryzae* in the food fermentation.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, koji making combination, neutral protease, aminopeptidase

米曲霉是食品用蛋白酶主要来源菌株,具有很强的蛋白酶合成能力,其所产蛋白酶能够在较广的pH值范围内保持活力。蛋白酶是酱油酿造最重要的酶,对于酱油产品的品质以及生产成本具有决定性的作用^[1]。目前国内传统的酱油酿造采用的是单菌种沪酿3.042,但是其所产酶系过于单一,成品酱油香气及色泽存在不足^[2]。制曲是酱油酿造过程中最关键的步骤之一,成曲的优劣不仅对于氨基酸产生率和蛋白质利用率至关重要,而且还能影响到酱油挥发性风味成分的形成^[3]。混合菌种制曲能够完善酶系,弥补单菌种制曲酶系不完整、酱醅中酶类比例不协调的缺陷,促进成品酱油品质和出品率^[4]。张齐军^[5]、程世杰^[6]、靳文生^[7]等采用米曲霉、黑曲霉等混合制曲完善了酶系、提高了蛋白酶产量,但有报道指出混合菌种制曲中添加黑曲霉不但不能有效改善酱油风味,且对色泽和香气产生副作用^[8]。

氨肽酶(aminopeptidase)是自然界中普遍存在的一种重要的蛋白酶类,能够催化肽链氨基末端肽键进行水解。其中有些氨肽酶不仅能够水解多肽,还能水解完整的蛋白酶^[9]。由于肽段呈苦味的部分原因是由于肽链N末端的碱性氨基酸的存在,所以氨肽酶具有很强的脱苦能力^[10]。米曲霉是氨肽酶重要的来源菌之一,早在20世纪70年代就有日本学者从米曲霉中分离出亮氨酸氨肽酶进行实验研究^[11]。唐文竹等通过对一株米曲霉菌株进行发酵条件优化,使其胞外氨肽酶活性较优化前提高了3倍以上^[12]。

本研究中参考混合菌种协同作用的制曲方式,以2种米曲霉菌株为出发菌株进行组合制曲,来提高制曲中性蛋白酶和氨肽酶的酶活力,以期对提高酱油发酵蛋白质利用率有所帮助。

1 材料与方法

1.1 菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)菌株:CICC2339, CICC2066 购于中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基和菌种培养方式

1.2.1 培养基

1)斜面培养基:PDA培养基。

2)制曲培养基:按照麸皮:豆粕=4:1的质量比在250 mL的锥形瓶中加入20 g过10目筛的干料,然后加入干料质量分数80%的蒸馏水,混匀,于121℃、0.1 MPa灭菌40 min。

1.2.2 菌种培养方式 用无菌水洗脱于4℃保存的米曲霉PDA斜面,制备成孢子悬液,采用血球板计数法计算孢子个数,调整孢子悬液浓度为 1.28×10^7 个孢子/mL。接种制备好的1 mL孢子悬液于制曲培养基中,混匀后30℃培养。

1.3 实验方法

1.3.1 粗酶液的提取方法 中性蛋白酶粗酶液:取1 g于30℃培养后的固体干曲,按照1:20(g:mL)加入0.1 mol/L pH 7.2的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液,于40℃水浴中浸提1 h,间歇搅拌,用4层纱布过滤即得粗酶液。

氨肽酶粗酶液:取1 g于30℃培养后的固体干曲,按照1:20(g:mL)加入0.1 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液,放置4℃过夜,4层纱布过滤得粗酶液。

1.3.2 酶活性的测定方法

1)中性蛋白酶测定 采用福林-酚法。参考中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法(GB/T23527-2009)。中性蛋白酶的测定pH值为7.2。

酶活定义:1 g干曲在40℃、pH 7.2条件下,1 min水解酪素产生1 μg酪氨酸为一个酶活力单位。

计算公式: $U=A \times K \times 4 / 10 \times n$ (1)

式(1)中,A:平均吸光度值;K:吸光常数;4:反应试剂的总体积;10:反应时间;n:酶液稀释倍数。

2)氨肽酶测定 采用亮氨酸对硝基苯胺法。酶活定义:在40℃、pH 7.2的条件下,每分钟水解亮氨酸对硝基苯胺生成1 μg对硝基苯胺(pNA)所需的酶量定义为一个酶活力单位。

酶活力计算公式: $U=A \times V_1 \times D / (k \times t \times V_2)$ (2)

式(2)中, V_1 :反应总体积; V_2 :酶液体积; D :酶液的稀释倍数; k :消光系数; t :恒温反应时间。

1.3.3 单菌株制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性检测实验 分别取1 mL 1.28×10^7 个孢子/mL的孢子悬液加入制曲培养基中,于30℃培养24 h后检测中性蛋白酶和氨肽酶活性。

1.3.4 双菌株组合制曲实验 将与单菌株培养时孢子浓度相同的 2 株米曲霉菌株 CICC2339 和 CICC2066 的孢子悬液共 1 mL 按孢子数比例接种于制曲发酵培养基进行双菌株组合制曲(见表 1, 孢子

子液体积比值), 每个组合设 3 个重复, 于 30 ℃ 培养 38、42 h 和 44 h, 然后称取 1 g 干曲进行中性蛋白酶和氨肽酶活性检测。

表 1 双菌株组合曲孢子接种体积比例

Table 1 Inoculation ratio of two strains- combination koji making

菌株编号	B(100%)	B ₈ (80%)	B ₇ (70%)	B ₆ (60%)	B ₅ (50%)	B ₄ (40%)	B ₃ (30%)	B ₂ (20%)	B(0%)
A(0%)	B								
A ₂ (20%)		A ₂ B ₈							
A ₃ (30%)			A ₃ B ₇						
A ₄ (40%)				A ₄ B ₆					
A ₅ (50%)					A ₅ B ₅				
A ₆ (60%)						A ₆ B ₄			
A ₇ (70%)							A ₇ B ₃		
A ₈ (80%)								A ₈ B ₂	
A(100%)									A

注: A 为 CICC2339, B 为 CICC2066

2 结果与讨论

2.1 单菌株制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性检测结果

A(CICC2339)、B(CICC2066)单菌株制曲过程中中性蛋白酶活性变化如图 1 所示, A、B 菌株制曲中性蛋白酶活性在 42 h 分别达到最高的 830.8 U/g (干曲) 和 1187.7 U/g(干曲)。中性蛋白酶能够水解蛋白质产生肽段, B 的中性蛋白酶活力较 A 菌株低, 说明 B 菌株对蛋白质进行水解产生肽段的能力较弱。

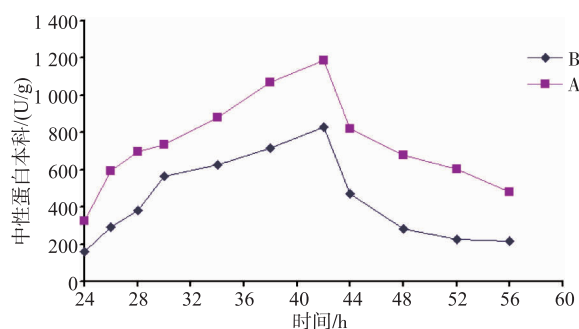


图 1 单菌株制曲中性蛋白酶活性

Fig. 1 Neutral protease activity of single strain koji

A、B 单菌株制曲过程中氨肽酶活性变化如图 2 所示, B 菌株制曲氨肽酶活性在 60 h 达到 2014 U/mL,

A 菌株在 42 h 达到 93.2 U/mL, 虽然 B 菌株氨肽酶活性较高, 但氨肽酶产量到达峰值的时间较长, 且由于其中性蛋白酶活力较低, 不能有效地利用氨肽酶高活性的优势来水解多肽以及提高酱油酿造过程中游离氨基酸的生成率。

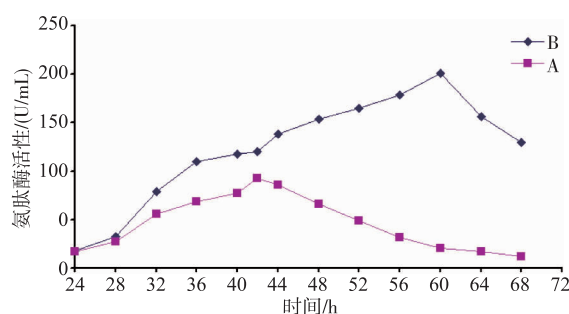


图 2 单菌株制曲氨肽酶活性

Fig. 2 Aminopeptidase activity of single strain koji

结合图 1 和图 2, 运用不同菌株组合制曲的方式整合 A、B 菌株各自产蛋白酶的优势, 达到制曲中性蛋白酶和氨肽酶活力均得到改善的目的。

2.2 组合制曲实验结果

按表 1 所示的比例, 将 A 和 B 菌株进行组合制曲培养, 在 38、42 h 和 44 h 检测制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性, 检测结果见图 3 和图 4。

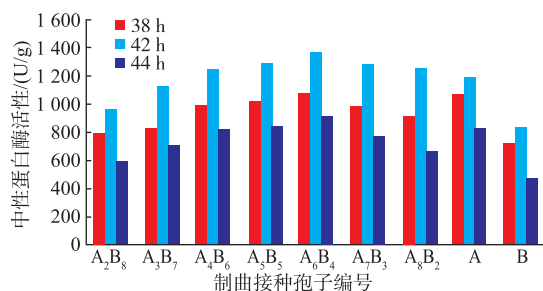


图3 组合曲中性蛋白酶活性

Fig. 3 Neutral protease activity of combination koji

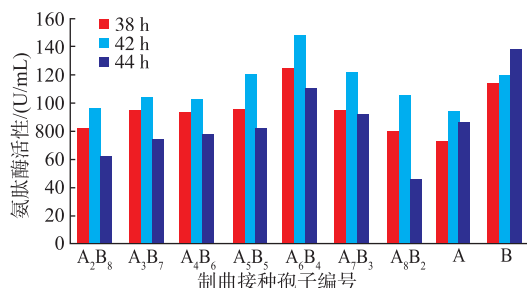


图4 组合曲氨肽酶活性

Fig. 4 Aminopeptidase activity of combination koji

由图3所示,各编号组合制曲中性蛋白酶活性均在42 h达到最高,A₆B₄在所有组合中达到最高的1 366.8 U/g(干曲),图4中A₆B₄在42 h氨肽酶活性达到最高的148.7 U/mL。A₆B₄在保持中性蛋白酶活性高的基础上具有较高的氨肽酶活性,在酱油酿造过程中提高了对蛋白质的水解能力以及肽段水解产物中游离氨基酸的产量。

2.3 单菌株制曲与组合制曲实验结果的比较

酱油酿造过程中不同蛋白酶扮演着不同的角色,所以制曲要综合考虑中性蛋白酶和氨肽酶的活性情况。将制曲时间为42 h的A菌株和B菌

株粗酶液按体积比6:4直接混合后检测中性蛋白酶和氨肽酶活性,检测结果与A₆B₄进行比较,结果见表2。

表2 单菌株曲与组合曲蛋白酶活性比较

Table 2 Comparison of protease activity between single strain koji and combination koji

菌株编号	42 h	
	中性蛋白酶活性	氨肽酶活性
A	1 187.7	93.2
B	830.8	120.5
A ₆ B ₄	1 366.8	148.7
A、B酶液混合(V _A :V _B =6:4)	911.3	101.1

由表2所示,A₆B₄制曲42 h其中性蛋白酶和氨肽酶活性均高于A、B单菌株培养和酶液混合,这说明A₆B₄组合在酱油酿造过程中其制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性具有较大优势。

3 结 语

通过调节制曲培养基接种孢子的体积比,对2株米曲霉菌株A、B进行组合制曲,以中性蛋白酶和氨肽酶活性为指标得到最优组合A₆B₄。A₆B₄在pH 7.2、30℃条件下制曲中性蛋白酶和氨肽酶活性在42 h分别达到最高的1 366.8 U/g(干曲)和148.7 U/mL,且均高于传统酱油酿造米曲霉菌株As.3.042。A₆B₄既拥有A菌株高中性蛋白酶活性的特点,又具有B菌株高氨肽酶活性的优势,不但在酱油酿造过程中能够更有效地水解蛋白质产生多肽,而且氨肽酶活性的提高有助于水解酱油产物中的肽段产生游离氨基酸,从而达到去除产品苦味,提升风味的目的,这对于酱油品质的改善具有重要意义。

参考文献:

- [1] ZHANG Jinlan, ZHOU Wenping, WANG Fujie, et al. Research advance on proteases system in soy sauce production[J]. *China Brewing*, 2014, 33(11): 1-5. (in Chinese)
- [2] ZENG Pingjia. Thinking about the development of Chinese soy sauce[J]. *Food Research and Development*, 2004, 25(3): 11-14. (in Chinese)
- [3] 李保英. 多菌种酱油制曲工艺及其对酱油风味影响的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013: 8-10.
- [4] FANG Chunyu, ZHOU Jian, WU Huachang, et al. Preparation conditions for high efficient soy sauce koji with multi-strain[J]. *China Brewing*, 2011, 4(229): 81-83. (in Chinese)
- [5] ZHANG Qijun. Application of two strains in koji-making of soy sauce fermentation[J]. *China Condiment*, 2015, 40(2): 77-80. (in Chinese)
- [6] CHENG Shijie, LIU Changhai, CHEN Sui, et al. Impact on decomposition of proteins in raw material by multiple strain culture with process of high-salt-diluted state fermentation[J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(11): 266-270. (in Chinese)

- [7] JIN Wensheng. Improvement of composition of enzyme system and sauce fermentation by using multi-strain koji starters[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2011, 21(8): 977-979. (in Chinese)
- [8] MA Xuezheng, KONG Wei. Experimental report on koji making and fermentation with multi-strain for soy sauce[J]. **China Brewing**, 2004, 12: 20-21. (in Chinese)
- [9] 吴庆勋. 氨肽酶高产菌株的选育及发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学, 2006: 1-5.
- [10] 付静. *A. elegans*, *A. oryzae* 和 *R. oligosporus* 肽酶系统及其脱苦机理的比较研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 94-95.
- [11] NAKADAI T. Nasuno S. Purification and properties of leucine aminopeptidase I from *Aspergillus oryzae* [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1973, 37(4): 757-765.
- [12] TANG Wenzhu, DONG Changhui, HOU Yingmin, et al. Optimization of fermentation condition for aminopeptidase production with *Aspergillus oryzae* [J]. **Food and Fermentation Industry**, 2014, 40(5): 82-86. (in Chinese)

科 技 信 息

澳新拟批准 2 种新食品原料用于婴幼儿配方食品

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,近日澳新食品标准局发布 [36-18]通报,拟批准关于 2 种新食品原料的 A1155 号申请。

据了解,这两种新食品原料分别为 2'-O-岩藻糖基乳糖(2'-FL)和乳糖-N-新四糖(LNnT),Glycom A/S 公司拟将其用于婴儿配方奶粉、较大婴儿配方奶粉以及儿童配方补充食品。该项应用申请有望于 2018 年 12 月获得通过。

[信息来源] 食品伙伴网. 澳新拟批准 2 种新食品原料用于婴幼儿配方食品 [EB/OL]. (2018-1-19). <http://news.foodmate.net/2018/01/455592.html>

澳新批准两种酶作为加工助剂

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,近日澳新食品标准局批准 A1130 和 A1131 两项食品应用申请。

A1130 申请将柱状假丝酵母来源的三酰基甘油脂肪酶(Triacylglycerol Lipase)作为加工助剂用于焙烤食品、乳制品及油脂加工。

A1131 申请将一种枯草芽孢杆菌蛋白酶 Aqualysin 1 作为烘焙食品加工助剂,用于面包、饼干、馒头、蛋糕、玉米圆饼等食品。

澳新食品标准局批准以上两项申请,修订澳新食品标准法典附录 18。

[信息来源] 食品伙伴网. 澳新批准两种酶作为加工助剂 [EB/OL]. (2018-1-12). <http://news.foodmate.net/2018/01/454999.html>