

酱油米曲霉961酶制剂蛋白酶 动力学的研究

赵玉莲

摘 要

采用酶制剂代替固体曲酿制酱油是一项新技术。本文对米曲霉961菌株产生的酶制剂蛋白酶动力学进行了研究。详细探讨了酱油用米曲霉酶制剂蛋白酶的酶反应速度的规律以及各种影响因子,并采用 Lineweaver-Burk 作图法,求得了961酶制剂蛋白酶的米氏常数为 3.77×10^{-3} 。

一、前 言

在生物科学迅猛发展的条件下,作为一门新学科的生化工程学形成了。今后工业微生物学成就以及微生物工业与之相近的工业领域的成就,将在更大程度上取决于生化工程或生物工程的成果。例如应用计算机辅助进行数据处理的现代化发酵罐来研究微生物群体发育、生物体的数量与组成、生长和产物生成的动力学、细胞能量供给者(ATP)的作用、关键酶的活力,以及培养基中物理化学限制因子的变化等基本条件,将能进一步促进工业微生物学的顺利发展。

微生物工业,包括菌体产量、代谢产物的形成、特殊机能的应用等,均是由于微生物体内外酶的作用所引起的。酱油酿造是多种微生物分泌的酶在一定的条件下协同作用,最后形成酱油的色香味成分的。酱油酿造工艺的主要工序制曲,目的是使米曲霉在原料上生长繁殖,以便在发酵时,利用它所分泌的多种酶,其中最重要的有蛋白酶和淀粉酶。单独使用酶制剂酿造酱油,国外虽有报导,但尚未达到工业生产规模。近年来,我国在此领域做了不少工作,酱油酶制剂与酶法酱油的试验正在中试过程中。引用生化工程学的观点和方法,将有助于开展新局面。

酶是生物催化剂,问题的实质是减少反应所需的活化能,加快生物化学反应的速度。因此,为了更好地将酶制剂应用于酱油酿造,必须对酱油酶制剂蛋白酶动力学进行研究。本文研究了酱油用米曲霉961酶制剂蛋白酶的酶反应速度的规律以及各种因素对它的影响。

二、材料与方 法

(一) 供 试 材 料

1. 米曲霉 961 菌株产生的酱油用酶制剂

2. 麸皮水解液

100 克麸皮加 2% 盐酸溶液 400 毫升, 搅拌后加热至沸腾 15 分钟, 过滤后即得。该水解液还原糖含量为 3.62% (碘量法)。

(二) 试 验 方 法

1. 蛋白酶分析方法: 福林——酚法

2. 氯化钠分析法: 直接法(摩尔法), 测得本试验的食盐中氯化钠含量为 86%

3. 961 酶制剂的溶解

(1) 酶制剂的制得

将发酵成熟醪经过过滤将菌丝体和发酵滤液分开, 使湿菌体中含水量不超过 75%, 将此湿菌体经挤酶机挤压成型后, 用沸腾干燥器干燥, 使干菌体(半成品)含水量不高于 10%, 然后再将此干菌体与已浓缩的发酵滤液混合(菌丝体: 浓缩酶液 = 1:1~1:1.1), 将混好的湿酶经过成型再在沸腾干燥器内干燥即得粗酶制剂。

(2) 酶制剂的溶解

酶制剂加自来水搅拌后即能完全溶解。作为酶活测定的试样时, 称取一定量酶制剂以 1:100 的稀释度混合后, 经组织捣碎机捣碎后定容稀释即得。

4. 各种影响因子的试验

将待试因子加入上述稀释酶液中, 然后再根据试验所给的条件进行测定。例如食盐浓度对酶活力的影响, 即将所需浓度的不同食盐量加入稀释酶液中, 再将该含有不同食盐浓度的酶液置于水浴中保温, 定时取样测定酶活力, 计算存活率。

三、结 果 与 讨 论

(一) 961 酶制剂蛋白酶分解酪蛋白的进程曲线

将 961 酶制剂稀释后, 按福林——酚法进行不同时间的酶反应, 然后比色, 结果见表一 图 1。

表一 不同酶反应时间与酪氨酸生成量的关系

| 酶反应时间(分) | 酪氨酸生成量(微克) | 酶活力(微克酪氨酸/毫升分) |
|----------|------------|----------------|
| 5 | 12800 | 2560 |
| 10 | 32000 | 3200 |
| 15 | 52800 | 3520 |
| 20 | 68800 | 3440 |
| 25 | 69000 | 3450 |

表一与图1说明, 961酶制剂与一般酶的特性一样, 其分解酪蛋白的能力, 在反应开始不久的一段时间内, 产物的生成量与反应时间几乎成正比; 但随着时间的增加就不成正比关系了。曲线上任何一点的斜率就是该相应时间的反应速度。由图1表明, 测定该蛋白酶的酶活力, 所取的酶反应时间最好在10~20分钟之间。

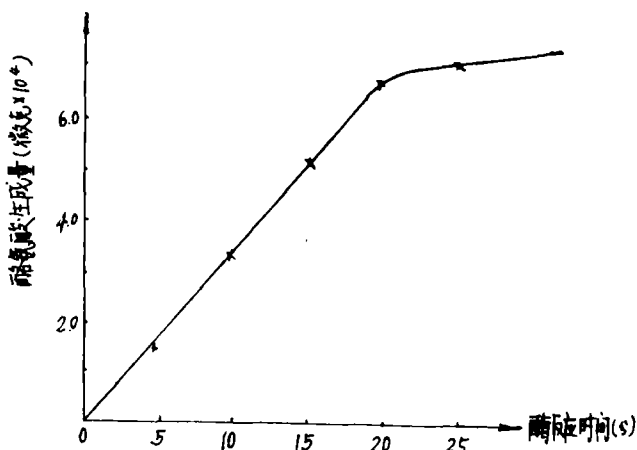


图1 961蛋白酶分解酪蛋白进程曲线

(二) 不同酶液浓度对酶反应速度的影响

将961酶制剂稀释成不同浓度, 其它条件不变, 测定其酶反应速度, 结果见表二、图2。

表二 不同酶液浓度对酶反应速度的影响

| 酶液浓度(%) | 光密度(O·D值) |
|---------|-----------|
| 0.50 | 0.245 |
| 0.75 | 0.330 |
| 1.00 | 0.500 |
| 2.00 | 1.000 |

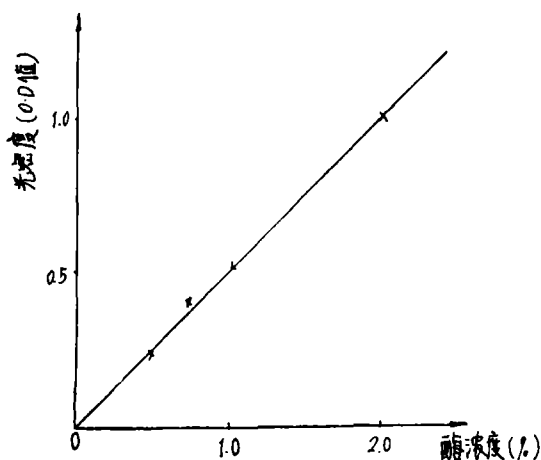


图2 酶浓度与反应速度的关系

表二、图2说明, 当酶蛋白(底物)浓度为2.0%时, 酶反应速度与酶浓度之间成直线关系。

(三) 酪蛋白(底物)浓度对酶反应速度的影响

当其它条件不变的情况下, 不同酪蛋白浓度对酶反应速度的影响可见表三、图3。

图3说明, 当酶液浓度不变时, 酪蛋白浓度与酶反应速度之间关系曲线是二相现象。

表三 不同酪蛋白浓度对酶反应速度的影响

| 酪蛋白浓度(%) | 光密度(O·D值) | 酶活力(单位/毫升) |
|----------|-----------|------------|
| 0.20 | 0.235 | 940 |
| 0.40 | 0.360 | 1440 |
| 0.60 | 0.440 | 1760 |
| 0.80 | 0.470 | 1880 |
| 1.00 | 0.470 | 1880 |
| 2.00 | 0.445 | 1780 |

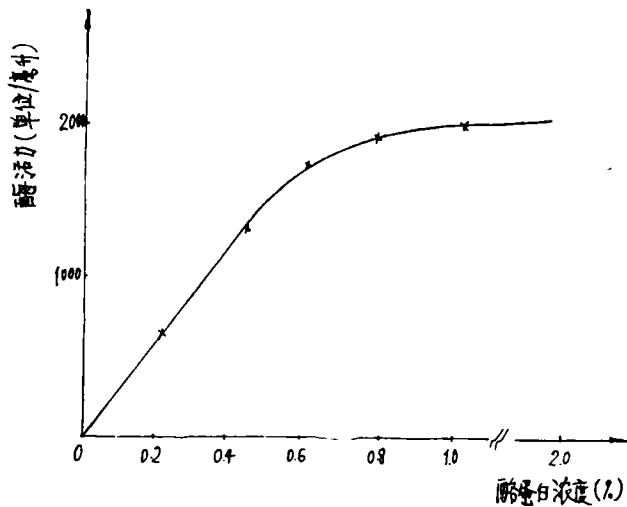


图3 酪蛋白浓度与酶反应速度的关系

当酪蛋白浓度低于0.6%时，反应速度随酪蛋白浓度的增加而增加，反应速度与酪蛋白浓度几乎成正比，符合一级反应： $dpdt = KE[S]$ 。当酪蛋白浓度大于0.6%时，则对酶反应速度的影响变小，最后反应速度与酪蛋白浓度几乎无关，反应达到最大速度，符合零级反应。

(四) 酶制剂蛋白酶的米氏常数

关于底物浓度和酶反应速度曲线的二相现象，目前比较普遍采用中间络合物学说来说明，而Michaelis和Menten从酶和底物先结合形成中间物，然后再分解为产物这个假定出发，

根据酶与底物及中间产物之间接近动态平衡的情况，得到一个表示底物浓度与反应速度之间相互关系的方程式：

$$u = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad \text{或} \quad K_m = [S] \left(\frac{V}{u} - 1 \right)$$

式中， K_m 称米氏常数。每个酶促反应，在一定条件下，都有它特定的 K_m 值。 K_m 是酶的一个重要特性。

由于米氏方程是一个双曲线函数，直接用它来求出 K_m 和最大酶反应速度 V 是不方便的。因为当底物浓度逐渐增加时，反应速度仍有少量增加，反应很难达到最大速度，不易准确测定。

为了正确得到最大反应速度 V 值和米氏常数 K_m ，采用Lineweaver-Burk作图法，又称双倒数作图法。取米氏方程的倒数形式：

$$\frac{1}{u} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

这是相当于 $y = ax + b$ 的直线方程式。这里 $\frac{1}{u}$ 相当于 y ， $\frac{1}{[S]}$ 相当于 x ，用 $\frac{1}{[S]}$ 对 $\frac{1}{u}$ 作图，即可得到 $y = ax + b$ 的直线图，从而求得 K_m ，见表四、图4。

表四 酪蛋白浓度对酶反应速度的影响

| 酪蛋白浓度 (%) | 酪氨酸生成量 (微克/分) $\times 10^3$ | $\frac{1}{[S]}$ | $\frac{1}{u} (\times 10^{-3})$ |
|-----------|-----------------------------|-----------------|--------------------------------|
| 0.20 | 0.94 | 500 | 1.060 |
| 0.40 | 1.44 | 250 | 0.690 |
| 0.60 | 1.76 | 166.6 | 0.568 |
| 0.80 | 1.88 | 125 | 0.530 |
| 1.00 | 1.88 | 100 | 0.530 |
| 2.00 | 1.78 | 50 | 0.561 |

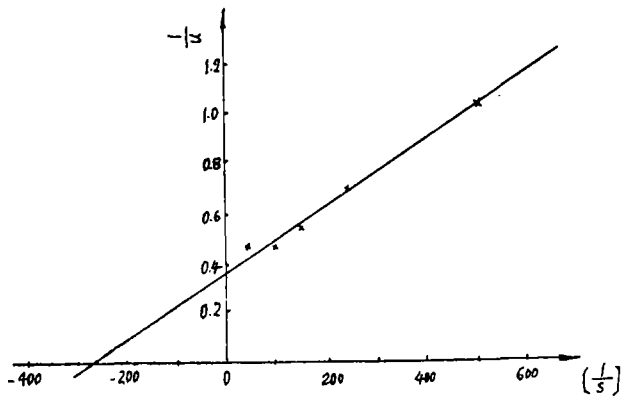


图 4 图解法求解 K_m

由图 4 求得, $K_m = \frac{1}{261} = 0.00377 = 3.77 \times 10^{-3}$

(五) 温度对 961 酶制剂蛋白酶的影响

为了观察 961 酶制剂蛋白酶在不同温度下的酶作用情况, 将酶制剂用自来水稀释至酿制酱油所需的酶活力单位, 并将此酶液置于试管中, 分别放在 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃ 水浴锅中, 定时取样测定酶活力, 观察它们的酶活力变化情况, 结果见图 5。

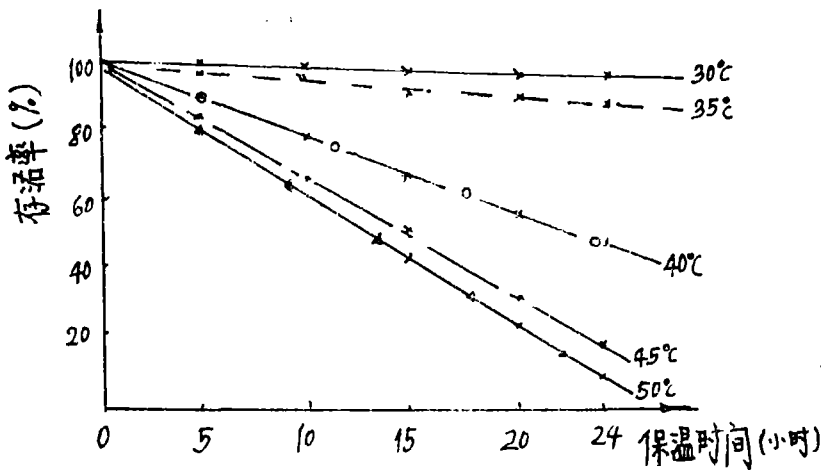


图 5 961 酶制剂蛋白酶的耐热性能

由图 5 可知, 不加任何保护剂时的酶液, 对温度还是很敏感的。在 45℃ 水浴中, 10 小时后存活率约为 60%, 因此, 采用该酶制剂酿制酱油, 发酵温度不宜过高。

(六) pH 对 961 酶制剂蛋白酶的影响

酶活力与氢离子浓度关系很大。同一种酶在不同 pH 条件下, 测得的酶活力不同。已知 961 酶制剂是一复合酶, 仅蛋白酶系统就含有碱性蛋白酶、酸性蛋白酶与中性蛋白酶三种。为了观察中性蛋白酶的最适作用 pH, 将 961 酶制剂采用不同 pH 的磷酸缓冲液稀释, 然后

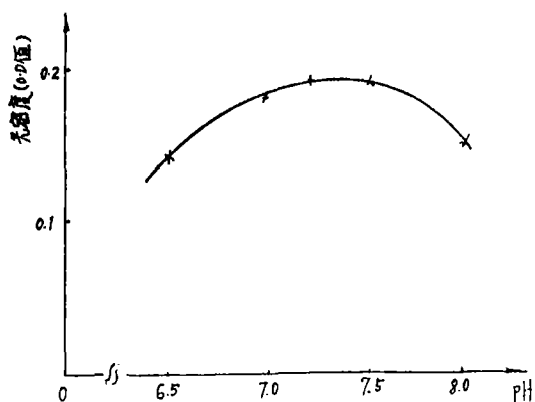


图6 pH对酶活力的影响

将此稀释酶液同时置于40℃水浴锅中保温30分钟，测定酶活力，结果见图6。

图6表明，961酶制剂中性蛋白酶在pH7.2~7.5表现出酶的最大活力。

国内普遍采用的低盐固态酿制酱油工艺，酱醅的原始pH一般均低于6.0，这不是961酶制剂中性蛋白酶的最适作用pH；另有实验^[1]表明，也不是酸性蛋白酶的最适pH。为此采用酶制剂酿制酱油时，最好先调节酱醅(撒盐水的pH)的原始pH至中性，以便更好地发挥中性蛋白酶的作用。随着发酵的进行，一些耐盐细菌如乳酸菌等产酸菌的生长活动，使酱醅的pH自然下降，进而发挥酶制剂中酸性蛋白酶的作用。这样，就有可能更好地完成对原料中蛋白质的分解作用，从而提高原料利用率。

(七) 不同食盐浓度对酶活的影响

绝大多数市售酱油的酿制工艺，多采用低盐固态发酵。尽管发酵温度各有不同，但大多数控制在40~50℃之间。为了探讨在此温度下食盐对酶活性的影响，我们进行了在40℃时不同食盐浓度对酶活性的影响试验，结果见表五。

表五说明，酶活力随着食盐浓度的升高而愈受抑制；而以氯化钠作试验时，其浓度在2.0%内对该酶有激活作用。这说明，所选用食盐中的杂质对酶有抑制作用。

表五 不同食盐浓度酶液在40℃水浴中酶活情况

| 保温时间(小时) | 食盐浓度 (%) | | | | | | |
|----------|----------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 82.2 | 76.0 | 74.0 | 73.7 | 74.0 | 74.5 | 75.0 |
| 8 | 80.8 | 67.0 | 63.0 | 61.3 | 63.0 | 60.5 | 64.7 |
| 12 | 69.7 | 40.0 | 37.2 | 52.0 | 51.0 | 49.0 | 50.0 |
| 24 | 46.7 | 41.0 | 32.0 | 24.0 | 18.0 | 15.4 | 24.4 |

(八) 不同葡萄糖浓度对8.0%食盐酶液的保护作用

为了得到优质酱油，生产原料中必须含有适量的淀粉质原料，因而酱醅中必有糖类存在。为了观察葡萄糖存在情况下的酶活力，在8.0%食盐酶液(低盐固态发酵工艺酿制酱油时，酱醅中食盐含量一般为8.0~14.0%)中添加不同量的葡萄糖，将含糖的食盐酶液置于45℃水浴中，定时取出分析，结果见图7。

由图7可见，葡萄糖对酶活力有一定的保护作用。并且其保护效果随糖液的浓度而增加，如在45℃水浴中放置4小时，不加糖液的酶液存活率为44.0%，而含6.0%葡萄糖的食盐酶液的存活率为64.0%，含12.0%葡萄糖的食盐酶液的存活率则为80.0%。

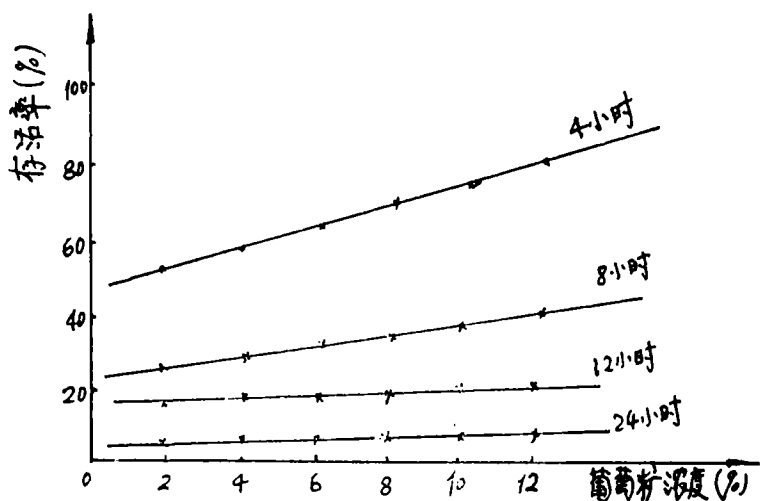


图7 不同葡萄糖浓度对酶活的影响

(九) 麸皮水解液对食盐酶液活力的影响

酿制酱油，常常使用麸皮作辅料，一方面用以作为制曲的疏松剂与营养料，更主要在于有助于酱油褐变成色。为了观察麸皮及其降解物对酶活力的影响，将麸皮进行稀酸水解，并测定水解液的还原糖含量。再将此水解液按不同还原糖浓度兑入 8.0% 食盐酶液，然后将此含有麸皮水解液的 8.0% 食盐酶液置于 45℃ 水浴，定时取出测定酶活力，结果见表六、图 8。

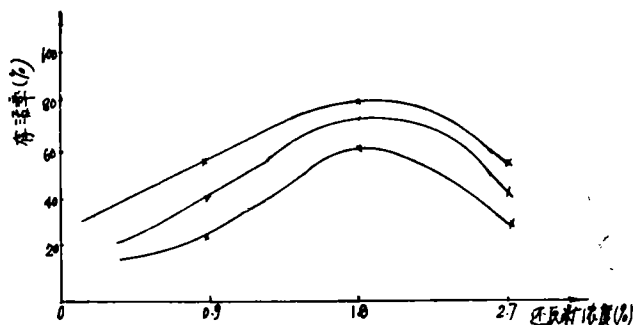


图8 麸皮水解液对酶活的影响

表六 麸皮水解液对食盐酶液的影响

| 保温时间 (小时) | 存活率 (%) | | | |
|-----------|--------------|------|------|------|
| | 麸皮水解液含糖量 (%) | | | |
| | 0 | 0.9 | 1.8 | 2.7 |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 32.1 | 56.8 | 79.9 | 53.9 |
| 8 | 17.6 | 37.2 | 78.3 | 60.0 |
| 12 | 12.5 | 26.4 | 61.6 | 27.4 |
| 24 | 5.1 | 9.6 | 测不出 | 测不出 |

表六、图 8 说明，麸皮水解液对酶活力有一定的保护作用。效果随浓度的增加而增加，但可能是随着水解液糖度的增加，糠醛含量的增加反而抑制了酶活力。

(十) 氨基酸对酶活力的影响

酱油生产以蛋白质原料为主。在酿制过程中，蛋白质逐步由蛋白酶水解而生成胨脞乃至各种氨基酸。在谷氨酸存在的情况下，我们测定了 8.0% 食盐酶液在 45℃ 水浴中保温不同时间的酶活力，结果见表七、图 9。

表七 不同谷氨酸含量对酶活力的影响

| 保温时间 (小时) | 存活率 (%) | 谷氨酸含量 (%) | | | | | | |
|--------------|------------|-----------|------|------|------|------|-----|-----|
| | | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 32.1 | 39.2 | 58.0 | 55.3 | 68.3 | 52.9 | 8.2 | |
| 8 | 17.6 | 15.3 | 31.0 | 35.5 | 39.8 | 34.1 | 2.0 | |
| 12 | 12.5 | 13.3 | 17.6 | 20.2 | 28.8 | 27.5 | 0 | |
| 24 | 5.1 | 10.2 | 10.0 | 9.9 | 16.3 | 13.9 | 0 | |

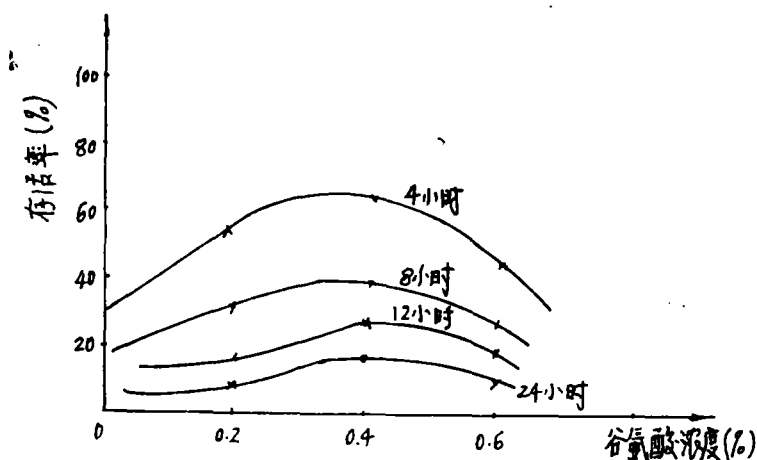


图 9 不同谷氨酸含量对酶活的影响

表七、图 9 说明，微量谷氨酸的存在，对酶作用有利；但当其含量超过 0.4% 时，则会抑制酶活力。

四、结 论

(一) 本研究表明，为得到优质酶法酱油，如何合理使用酶制剂，寻找合适的酶制剂酿制工艺，尚需做大量的工作。

(二) 本实验研究表明，961 酶制剂蛋白酶的 K_m 值为 3.77×10^{-3} ，说明目前国内用以测定酱油曲蛋白酶分析方法：福林—酚法，所选用的酪蛋白浓度为 2.0%，大大高于所需的底物浓度。

(三) 酶的动力学研究, 一、应该是纯酶, 二、应该是在该酶合适的 pH 缓冲系统中进行。鉴于本试验目的在于寻求用酶制剂酿制酱油时合理的工艺参数。为此, 影响酶速度因子的试验均与生产实践相仿, 采用自来水系统。

参 考 文 献

- [1] 赵玉莲, 中国酿造 1982.1(5)p19~24。
- [2] 中浜敏雄等, 酱油酿造的新的技术研究 昭和 47 年。
- [3] Biochemical Eegineering (1st edition); Shuichi Aiba, Arthur E, Hump-hrey, Nancy F, Millis, Vniv of ToKyo press (1968).

Kinetic Studies on the Soybean Sauce Protease of *Aspergillus oryzae* 961 Enzyme Preparation

Zhao Yulian

Abstract

For the soybean sauce brewing instead of the use of koji the enzyae preparation is used as a new developed technique. The paper studied the Kinetics of the protease of the enzyae produced by *Aspergillus oryzae* 961. The law of the velocity of the enzyae calalyzed reaction and the various factors were discussed in detail. By using line Lineweaver-Burk's graphic method the Michaelis constant, K_m , of the proleaze was estimated to be 3.77×10^{-3}