

绍兴腐乳毛坯中蛋白酶的检测

鲍松林 丁霄霖

(食品科学与工程系)

摘要 1.75%NaCl 溶液可有效抽提林木毛霉菌丝体表面的蛋白酶,依此确立了腐乳毛坯中蛋白酶的检测法。该酶系在 40℃ 以下 2h 酶活稳定不变,60℃ 1h 能保持 58% 活力;其最适作用温度和 pH 分别为 55~60℃ 和 6~7pH;pH 稳定范围为 4~7;NaCl 和 CH₃CH₂OH 对酶系有明显的保护作用。讨论了蛋白酶检测及其性质对腐乳工艺改进的指导意义。

关键词 腐乳毛坯;蛋白酶;检测;林木毛霉

0 前言

毛霉型腐乳生产的第一阶段是以豆腐坯为底物,接种毛霉孢子进行培菌,待长成大量菌丝,即成腐乳毛坯;第二阶段是将毛坯盐腌后进行配料装瓶,随后开始漫长的后熟贮存直至成品。第一阶段毛霉菌在豆腐坯上生长繁殖,是分泌积累以蛋白酶为主的各种酶的重要过程;蛋白酶活力的高低及其酶学特性直接影响到后期熟成的进程和效果,因此很有必要将蛋白酶作为前期培菌的主要参数进行检测。本试验采用未经纯化精制的酶液进行性质测试,着重点不是纯酶学性质,而是与腐乳切实相关的蛋白酶酶系性质,目的在于对腐乳生产进行科学剖析并对其工艺改进提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 豆腐坯 根据腐乳厂的生产工艺,以卤水为凝固剂,制得豆腐坯的规格为:大小 24×24×14mm³,比表面积 0.31mm⁻¹,水分 70%~72%。

1.1.2 菌种 林木毛霉 (*Mucor sitvaticus*) 由绍兴咸亨食品厂提供,是绍兴咸亨腐乳生产菌种。

1.2 方法

收稿日期:1994-04-25

1.2.1 毛霉孢子悬浮液制备 菌种经斜面活化后移接至装有麸皮的三角瓶中,28℃培养60~72h,然后加水洗涤孢子,经二层纱布过滤即制成孢子悬浮液,随配随用。

1.2.2 腐乳毛坯的制备 将符合规格要求的豆腐坯,按一定间隔排列于木框内,用喉头喷雾器喷洒毛霉孢子液进行接种,随后置于24℃、相对湿度88%的条件下进行培菌。分别于24,34,48h取样测定。

1.2.3 蛋白酶的测定 采用福林酚法^[1],其中缓冲液分别取不同pH值进行试验。酶活定义为:在40℃,一定pH条件下,1min水解酪蛋白产生1μg酪氨酸所需的酶量为1个蛋白酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 检测方法的确定

为了客观反映毛坯中的蛋白酶,有必要寻求有效的样本预处理及酶液抽提的方法,然后选用适宜的缓冲液进行测定。腐乳毛坯的主成分是蛋白质,直接取毛坯以高速组织捣碎机捣碎并以缓冲液抽提蛋白酶,测定时发现空白液的吸光度很大,使得测定反应中产生的吸光度增值相对很小,严重影响测定的精度。这是由于福林酚法以酪氨酸为检测对象的局限性所致。试验将毛坯称量后,仅切取其表层连同菌丝体进行捣碎抽提,结果能明显降低测定时空白液的吸光度,提高了测定精度。

其次,选用五种不同介质、缓冲液分别对毛坯中蛋白酶进行抽提,结果见表1。可以看出,1.75%NaCl溶液可有效抽提毛坯中的蛋白酶。与其相比,H₂O,0.85%NaCl,0.1mol/L磷酸缓冲液的相对抽提率分别为15%~21%,77%~83%,74%~82%,而2.35%NaCl溶液的相对提取率为101%~103%,虽增加了盐浓度但提取效果无明显差异。这一结果与Wang^[2]使用0.3mol/LNaCl能有效抽提冻土毛霉蛋白酶的报道相类似,可以推断林木毛霉的蛋白酶也属菌丝表面结合酶,需采用一定离子浓度的介质才能有效提取。试验中水的抽提效率较低,但远比Wang的数据大,这可能与用卤水作凝固剂有关,Wang在试验中采用的是一般液体培养物。

表1 五种不同介质对毛坯中蛋白酶的抽提结果(酶活 u/g 干毛坯)

时间(h)	H ₂ O	0.85%NaCl	1.75%NaCl	2.35%NaCl	0.1mol/L pH7.2 磷酸缓冲液
24	10.2	52.6	68.7	69.4	51.0
34	12.0	45.3	57.4	58.6	47.3
48	9.4	38.2	45.9	47.1	35.4

另外,采用不同pH值的缓冲液对抽提液进行酶活检测(数据见下文),结果表明该蛋白酶酶系主要是中碱性蛋白酶。综合以上试验确定腐乳毛坯中蛋白酶的检测方法为:取一定量毛坯,切下表层及菌丝体加适量1.75%NaCl溶液高速捣碎,30℃抽提1h,取滤液适当稀释,用福林酚比色法测定酶活。

2.2 蛋白酶性质的研究

2.2.1 酶促反应的进程曲线 使酶与底物作用不同时间,测定生成物量(以OD₆₈₀表示)与时间的关系,结果见图1。作用时间在25min以内,OD值达0.4仍保持直线,因此在具体应用时,确定作用时间10或15min,保证OD值和时间呈线性关系。

2.2.2 酶的最适作用温度 将酶促反应的温度控制在 30,40,50,60,70,80℃,分别作用 10 和 15min,测得酶活如图 2. 可见林木毛霉蛋白酶的最适作用温度在 60℃左右,超过 60℃酶失活较快。但当作用时间延长至 15min,酶的最适作用温度则向偏低方向移动,约为 55℃。

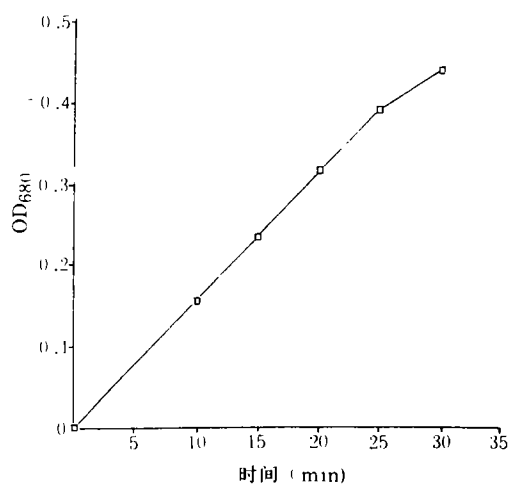


图1 酶促反应的进程曲线

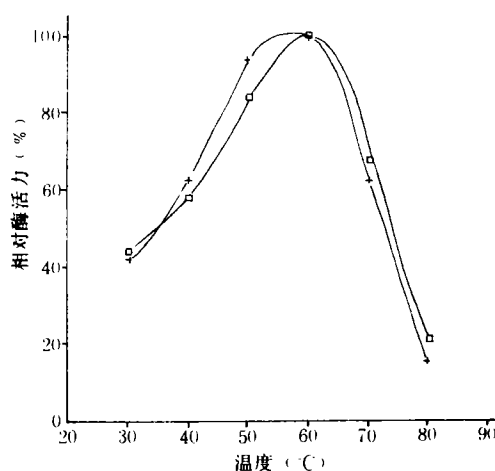


图2 温度对酶活的影响

—+— 15min —□— 10min

2.2.3 酶的热稳定性 将酶液置于 40,50,60,70,80℃水浴中分别处理 25,50,75,100min,定时取样测定其酶活,结果如图 3. 可以看出该酶的热稳定性较好,在 40℃以下 2h 酶活稳定,60℃处理 1h 酶活能保持 58%,但当温度高于 70℃时则迅速失活。这表明保温催熟腐乳可以由持久高效的酶促反应得以保障。

2.2.4 酶的最适作用 pH 将酶置于不同 pH 值的缓冲液中进行酶促反应,测得酶活如图 4.

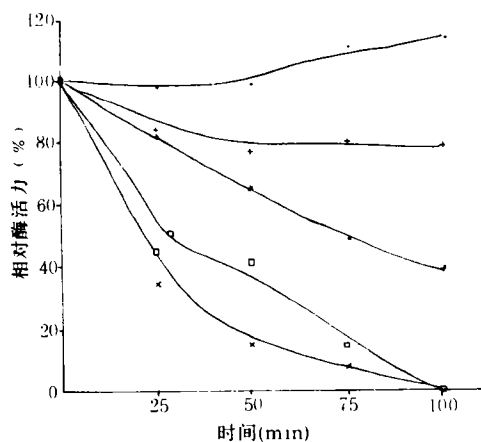


图3 酶的热稳定性

—•— 40℃ —+— 50℃
—*— 60℃ —□— 70℃
—×— 80℃

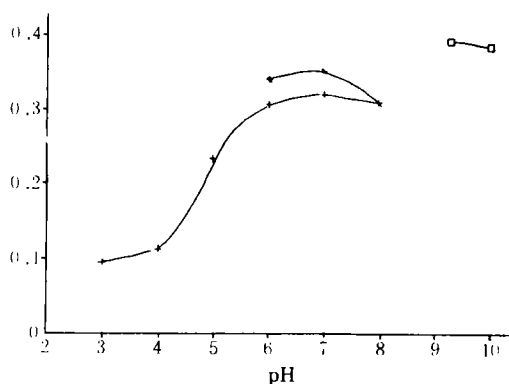


图4 pH对酶活的影响

—+— 0.1mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸
—*— 0.1mol/L 磷酸缓冲液
—□— 硼砂-氢氧化钠

该酶的最适作用 pH 为 9~10,其次是 6~7. 值得指出的是当使用的缓冲液不同时,酶活力表现也不相同,图中所示磷酸缓冲液体系的酶活表现明显高于磷酸氢二钠-柠檬酸体系。这表明在测定该酶酶活时选用适宜的磷酸缓冲液可提高测定灵敏度。

2.2.5 酶的 pH 稳定性 将酶用不同 pH 值的缓冲液调节到 pH 4~10,置于 30℃ 水浴中处理 20min,取出后以缓冲液调回到 pH7 左右,然后常法测定其酶活,结果见图 5. 该酶的 pH 稳定范围是 4~7,pH>7 则迅速失活。这为利用该酶提供了一个工艺条件,在中性偏酸环境中该酶能在较长的时间内保持较高活性,传统腐乳工艺基本符合这一条件,但未能给予充分重视。

2.2.6 酶的耐盐性 在酶液中加入 NaCl,使其终浓度分别达到 5%~20%,置于室温 25℃ 贮存 12d. 将处理酶液经适当稀释后测定酶活,结果见表 2. 表明该酶有较好的耐盐性,同时 10%~15%NaCl 对该酶有较好的保护作用并抑制微生物生长。

2.2.7 酶的乙醇耐性 在酶液中加入乙醇,使其终浓度分别为 5%~20% (V/V),置于室温 25℃ 贮存 3d. 将处理液经适当稀释后测定酶活,结果见表 3. 表明该酶有较高的乙醇耐性,其中 10%~20%乙醇可以有效抑制微生物生长,而对蛋白酶有较好的保护作用。

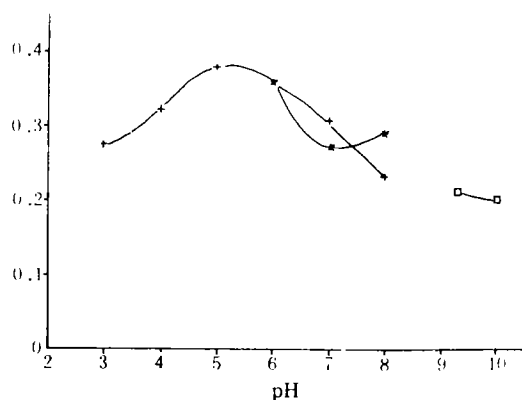


图 5 酶的 pH 稳定性

—+— 0.1mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液
 —*— 0.1mol/L 磷酸缓冲液
 —□— 硼砂-氢氧化钠缓冲液

表 2 酶的耐盐性试验结果(残存酶活 %)

NaCl (%)	1.75	5	10	15	20
1 d	71.9	91.4	97.3	97.3	93.1
12 d	长菌	长菌	81.7	80.0	60.4

表 3 酶的乙醇耐性试验结果(残存酶活 %)

乙醇浓度 (%) (V/V)	0	5	10	15	20
9 h	95.2	91.4	95.2	92.3	110.0
1 d	71.9	72.4	82.4	93.3	93.3
2 d	58.4	67.6	84.8	83.8	104.8
3 d	长菌	长菌	70.5	85.7	76.8

总结以上结果,林木毛霉在豆腐坯上积累的蛋白酶属胞外酶,1.75%NaCl 溶液或具有相当离子浓度的介质可使该胞外酶从菌丝体表面得以较彻底地释放。该菌蛋白酶有较好的热稳定性,在 40℃ 以下 2h 酶活稳定,60℃ 处理 1h 能保持 58%酶活;其最适作用温度为 55~60℃. 该酶在 pH4~7 较稳定,最适作用 pH 为 9~10,其次是 6~7. 考虑到其在碱性条件下易失活以及腐乳生产的基本环境呈中性,将 pH6~7 视为该酶系的最适作用 pH 较有意义。值得注意的是,NaCl 和乙醇对该菌蛋白酶有较好的保护作用。传统的腐乳生产将毛坯盐

腌及在配料中加酒,主要是为抑制微生物生长同时起调味作用,现在看来,食盐对腐乳生产的重要性至少体现在四方面:

- 1) 协同乙醇抑制微生物生长,防止后熟期间杂菌繁殖引起腐败;
- 2) 促进毛霉菌丝体释放蛋白酶并使其随盐分渗透到毛坯内部,同时析出部分豆乳清,使成品体态均匀;
- 3) 起重要的调味作用,不仅赋予腐乳有一定的咸味,还促进谷氨酸等成为单钠盐,构成鲜美滋味;
- 4) 抑制酶促反应使其处于低缓水平,同时又对蛋白酶起保护作用,使其作用持久稳定,有利于形成良好的质构及和谐的风味。

比较腐乳毛坯长菌程度与蛋白酶活力的检测结果,发现两者之间并不呈单纯的正比关系,如表 4 所示。24h 毛坯的蛋白酶活力最高为 68.7u/g 干毛坯,此时菌丝处于旺盛生长期;其后继续生长,表现为菌丛明显增高,但蛋白酶活力呈下降趋势。传统白腐乳生产在采用老熟毛坯时,一般后熟明显快,判断依据是氨基酸态氮是否达到 0.60%。表 4 说明,老熟毛坯中蛋白酶的活力表现并不最高,但其氨基酸态氮则是 24h 毛坯的 2.4 倍。由此可见,老熟毛坯后熟快主要得利于前期培菌时产生较高的氨基酸态氮,而不是单纯因为蛋白酶活力高。

表 4 毛坯长菌程度与蛋白酶活力比较

培菌时间 (h)	毛坯长菌程度	蛋白酶活力 (u/g 干毛坯)	毛坯氨基酸态氮 (%)
24	菌丝白毛状、旺盛、整齐、较紧密,7~9mm	68.7	0.05
34	菌丝白毛状、旺盛、整齐、紧密,9~11mm	57.4	0.08
48	菌丝稍泛黄、略有倒挂下垂,11~14mm	45.9	0.12

以上研究,对传统腐乳工艺改进至少有两方面的指导意义^[3]:一是乙醇在相当程度上可替代食盐的作用,包括抑制微生物生长、减缓酶促反应、保护蛋白酶各方面,因此实现腐乳的低盐化有一定的理论基础,要解决好的问题是风味调整及保质期维持;二是充分利用蛋白酶性质,对腐乳后熟期间进行保温,同时适当调整体系 pH 及降低食盐浓度,均可加速酶促反应。另外,增加单位体系中的蛋白酶总量,如减小豆腐坯规格使其比表面积增大,或添加蛋白酶等,也可缩短成熟期。但需要注意的是腐乳风味与低级酯的形成密切相关,在缩短成熟期工艺中,需适当考虑增进脂化反应的条件,以确保腐乳质量。

参 考 文 献

1 天津轻工业学院等编. 工业发酵分析. 北京:轻工业出版社,1986. 90~92
2 Wang H L. Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. J. Bacteriol. 1967,93:1794~1799
3 李宏梁. 白腐乳生产新工艺的研究:[硕士论文]. 无锡:无锡轻工业学院,1992

Detection of the Protease Produced on Shaoxing Sufu Pehtze by *Mucor Silvaticus*

Bao Songlin Ding Xiaolin

(Dept. of Food Sci. & Eng.)

Abstract The protease which was bound to the mycelial surface of *Mucor silvaticus* , was effective extracted at a sodium chloride concentration of 1.75%; hence the detection of the protease system on sufu pehtze was established. While 58% of activity remained after treatment for 1 hour at 60℃ , no loss of activity was found after 2 hours at 40℃. The optimum temperature and pH for enzymatic reaction of the protease system were 55~60℃ and 6~7 respectively, and it had high activity over wide range of pH from 4 to 7. Both sodium chloride and ethanol protected the protease system from inactivation. The significance of revealed characteristics of the protease system and the relation to the improvement of sufu fermentation were discussed.

Key-words Sufu pehtze; Protease; Detection; *Mucor silvaticus*