

## 五通桥毛霉麸皮培养基的豆乳凝固酶活性研究

李平<sup>1</sup>, 栾广忠<sup>1,2</sup>, 宋阳<sup>1</sup>, 杨洋<sup>1</sup>, 石磊<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省农产品加工工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**研究了五通桥毛霉固态发酵条件以及温度、pH、金属离子等因素对其麸皮培养基粗酶液豆乳凝固酶活性的影响。结果表明:五通桥毛霉麸皮培养基粗酶液具有豆乳凝固酶活性,4 mL粗酶液可使50 g豆乳在20 min内凝固。当培养基中麸皮与水的比例为10:11,在20℃培养54 h时粗酶液酶活最高,达0.24 U·mL<sup>-1</sup>;粗酶液最适作用温度和pH分别为50℃和5.9;其对温度敏感,70℃保温10 min豆乳凝固酶活性完全消失;在3.0~5.0 mmol·L<sup>-1</sup>浓度范围内,Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>可以提高酶的活性,K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>作用不明显,而Zn<sup>2+</sup>和Al<sup>3+</sup>则有抑制作用。

**关键词:**粗酶液;豆乳凝固酶;发酵条件;酶学性质

**中图分类号:**Q936

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2014)02-0264-05

## Soymilk-clotting Enzyme Activities in Bran Culture of Wutungkiao Mucor

LI Ping<sup>1</sup>, LUAN Guang-zhong<sup>1,2</sup>, SONG Yang<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, SHI Lei<sup>1</sup>

(1. College of Food Science & Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Engineering Center of Agro-product Processing, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The effect of fermentation condition, temperature, pH and metal ions on the soymilk-clotting enzyme activities (SCA) in bran culture of Wutungkiao mucor was researched. The extractive of Wutungkiao mucor bran culture had soymilk-clotting enzyme activities, and 4 mL extractive could coagulate 50 g soymilk in 20 min. The optimized fermentation condition by orthogonal tests was as follows: ratio of bran to water was 10:11, and cultivated 54 h at 20℃, with the highest activities of 0.24 U·mL<sup>-1</sup>. The optimum temperature, and pH for SCA was 50℃ and 5.9, respectively. The SCA of the extractive was sensitive to temperature, and could be completely inactivated under 70℃ for 10 min. Within 3 to 5 mmol·L<sup>-1</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> could enhance the SCA of the coarse enzyme, no obvious effect was observed for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, while Zn<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> showed inhibitive effect.

**Key words:** Coarse enzyme; Soymilk-clotting enzyme; Fermentation conditions; Properties of the enzyme

随着人们生活水平的提高,传统的大豆食品已经不能满足人们的需要,因此开发新型大豆制品如豆凝乳、大豆干酪等成为当务之急。目前凝固豆乳的方法主要有加酸、加盐、加热、酒精凝固、葡萄糖酸-δ-内酯凝固等<sup>[1]</sup>,但用这些方法所制备的豆凝乳通常都带有异味,严重破坏口感。相关研究表明,利用蛋白酶能够获得质量较高的豆凝乳,且具有较好的应用前景<sup>[2]</sup>。而微生物产生的蛋白酶无论是蛋白质水解、凝乳效率还是生产工艺方面,都优于动植物组织中产生的蛋白酶,其中碱性及中性蛋白酶效果更佳,更适合工业化生产豆凝乳<sup>[3]</sup>。五通桥毛霉作为一种常用的腐乳生产用菌,其在腐乳坯上生长的菌丝分泌的蛋白酶及肽酶,会使蛋白质降解,影响其风味和质构。鉴于此,若五通桥毛霉的麸皮培养物提取液(粗酶液)也能够凝固豆乳,且蛋白质在豆酪后酵过程中能被多种酶类降解,则会缩

短后酵时间、产生良好风味,而且工业生产中的粗酶液不必分离纯化,可显著降低成本。为此,研究了五通桥毛霉麸皮培养物提取液的豆乳凝固酶活性以及发酵条件等对粗酶液凝乳活性的影响,为后期豆酪制备研究奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

五通桥毛霉(*Mucor Wutungkiao*) Y1404(实验室保藏)。麸皮购自当地小麦磨坊;大豆(蛋白质含量38.25 g·100 g<sup>-1</sup>),市售。氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸亚铁、硫酸锌、氢氧化钠等均为国产分析纯。

#### 1.2 主要仪器

PB-10/C型pH计(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司),DK-98-I型电热恒温水浴锅(天津市泰

收稿日期:2013-10-11

基金项目:联合国大学-麒麟继续研究基金项目(Follow-up Research of UNU-Kirin Grant)。

第一作者简介:李平(1986-),女,在读硕士,主要从事大豆蛋白深加工。E-mail:happyfamilylee@163.com。

通讯作者:栾广忠(1968-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物蛋白深加工技术研究。E-mail:qlgz@nwsuaf.edu.cn。

斯特仪器有限公司),SHP-150 生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司),TOMYES315 全自动高压灭菌锅(基因有限公司),TG16-WS 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),SH-2 磁力搅拌器(天津市泰斯特仪器有限公司),KDL-2303 多功能榨汁豆浆机(天津市达康电器公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 麸皮培养基的制备及培养 将 10 g 麸皮,14 mL 蒸馏水加入 250 mL 三角瓶中,121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,趁热摇散,冷却后接种毛霉菌丝,适宜温度下培养一定时间<sup>[4]</sup>。

1.3.2 粗酶液的制备 参照潘进权等<sup>[5]</sup>的方法,取接种培养的麸皮培养物,加入其 5 倍质量的 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液,40℃ 水浴中浸提 1.5 h,3 层纱布过滤,滤液在 7 000 g 转速下离心 10 min,上清即为粗酶液。

1.3.3 豆乳的制备 参照栾广忠等<sup>[6]</sup>的方法,将大豆挑选除杂,称取 100 g 样品,漂洗干净后加入 3 倍蒸馏水于室温下浸泡过夜。用相当于豆总量 8 倍的水平均分成 2 次进行打浆(打浆所用的水量应扣除干豆所吸收的水分),得到的生浆经 200 目尼龙布过滤后,加热煮沸 10 min,在冰水混合物中冷却至 4℃ 保存备用。测定得到豆浆蛋白质含量为 3.46%。

1.3.4 豆乳凝固酶活力的测定 采用 Arima 法<sup>[7]</sup>,取 5 mL 豆浆加入到试管中,在一定温度下水浴保温 30 min,加入 0.5 mL 粗酶液后立即混匀,继续保温,计时,直至试管壁开始出现凝固颗粒的时间为凝固时间(精确到秒)。在上述条件下,每分钟可使 10 mL 豆乳凝固的酶量定义为 1 个豆乳凝固酶活力单位(U)。

$$\text{凝乳酶活力}(U) = 1/T$$

T 为豆乳凝固时间(min)。

1.3.5 豆乳凝固时间测定 准确称量 50 g 豆乳,加入粗酶液,混匀后在 40℃ 下凝固,记录凝固时间。对照组的粗酶液在 100℃ 煮沸处理 5 min。

1.3.6 发酵条件优化 以培养时间、培养温度及培养基中麸皮与水的比例为因素进行单因素试验,之后在单因素试验的基础上进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验对培养条件进行优化。

1.3.7 粗酶液酶学性质研究 按照 1.3.4 的方法对影响粗酶液活力的因素(温度、pH、底物浓度、金属离子)进行研究。

### 1.4 数据分析

利用 DPS v7.05 软件对数据进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗酶液豆乳凝固酶活性检测

由图 1 可知,当粗酶液添加量为 4 mL 时,豆乳即可在 16 min 9 s 时凝固,且倒置烧杯后豆乳不流出,说明形成了自持性凝乳。对照组豆乳未凝固,说明粗酶液具有豆乳凝固酶活性。4 mL 粗酶液可使 50 g 豆乳在 20 min 内凝固,说明粗酶液的豆乳凝固酶活性较高,不必进一步浓缩即可直接使用。

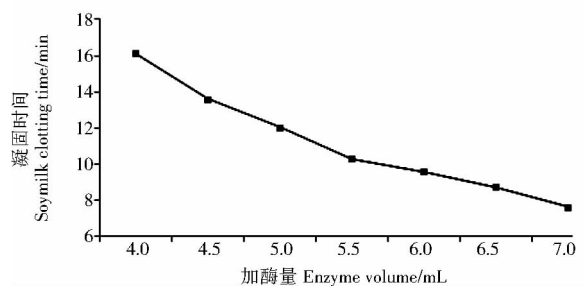


图 1 加酶量对凝乳时间的影响

Fig. 1 Effect of enzyme volume on soymilk clotting time

### 2.2 发酵条件对豆乳凝固酶活性影响的单因素试验

2.2.1 培养时间 将麸皮与水分比例为 10:14 (g:mL) 的培养基置于 24℃ 条件下分别培养 42, 48, 54, 60, 66, 72 h 时测定酶活。由图 2 可知,在培养 54 h 后酶活达到最高。

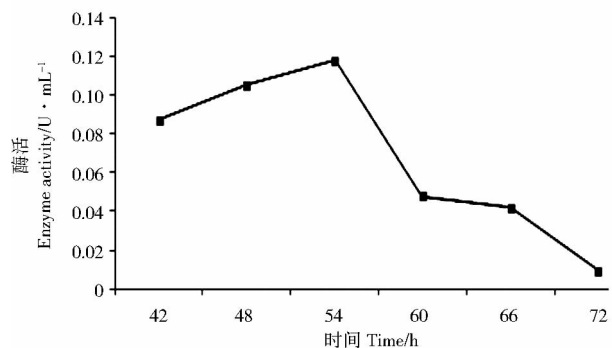


图 2 培养时间对豆乳凝固酶活性的影响

Fig. 2 Effect of culture time on soymilk clotting enzyme activities

2.2.2 培养温度 将麸皮与水分比例为 10:14 (g:mL) 的培养基分别置于 18, 20, 22, 24, 26℃ 条件下培养 54 h, 测定酶活。由图 3 可知,在 20℃ 时酶

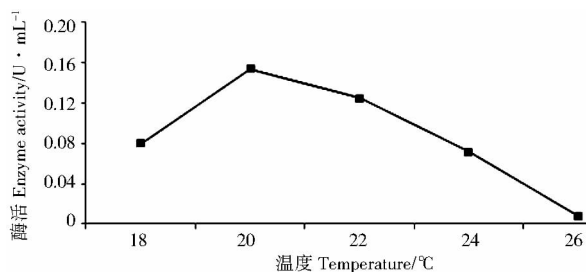


图3 培养温度对豆乳凝固酶活性的影响

Fig.3 Effect of culture temperature on soymilk clotting enzyme activities

活最高,低于或高于 20℃ 条件下培养,酶活均受到抑制。

2.2.3 培养基配比 在 20℃ 培养 54 h 条件下,测定麸皮和水的比例分别为 10:9、10:11、10:13、10:15、10:17、10:19 时的酶活性。由图 4 可知,麸

皮与水的比例为 10:11 时酶活力最高。

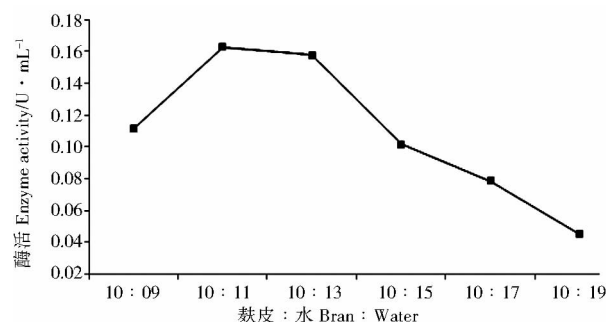


图4 培养基比对豆乳凝固酶活性的影响

Fig.4 Effect of the ratio of culture medium on soymilk clotting enzyme activities

2.2.4 发酵条件优化 以培养基配比、培养温度及培养时间为因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验对培养条件进行优化。由表 1 可知,影响因素主次为: 时间 >

表1 正交试验设计及结果

Table 1 Design and result of the orthogonal experiment

处理号 No.	因素及水平 Factor and level			
	温度 Temperature/°C	时间 Time/h	比例 Ratio	酶活 Enzyme activity/U·mL <sup>-1</sup>
1	19	51	10:10	0.160000
2	19	54	10:11	0.210526
3	19	57	10:12	0.173913
4	20	51	10:11	0.190476
5	20	54	10:12	0.235294
6	20	57	10:10	0.210526
7	21	51	10:12	0.173913
8	21	54	10:10	0.210526
9	21	57	10:11	0.190476
r1	0.1815	0.1748	0.1937	$\Sigma = 1.75565$
r2	0.2121	0.2188	0.1972	
r3	0.1916	0.1916	0.1944	
极值 Extremum	0.0306	0.0440	0.0035	

温度 > 麸皮与水的比例;当五通桥毛霉在麸皮与水的比例为 10:11、20℃ 培养 54 h 时得到的豆乳凝固酶活力最大(0.235 U·mL<sup>-1</sup>)。

### 2.3 粗酶液酶学性质

2.3.1 温度对酶活力的影响 将豆乳在不同温度下保温 5 min,然后加入粗酶液测定其豆乳凝固酶活性。由图 5 可知,豆乳凝固酶的活力随温度的升高先升高后下降,并在 50℃ 时达最大值。因此,50℃ 为该酶的最适作用温度。

2.3.2 酶的热稳定性 将该豆乳凝固酶分别在

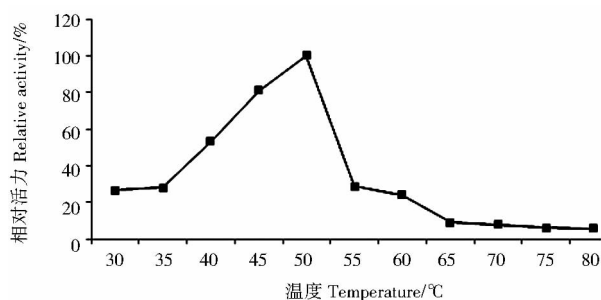


图5 温度对豆乳凝固酶的影响

Fig.5 Effect of temperature on soymilk clotting enzyme

40,50,60,70℃ 保温 10,20,30,40 min,然后立即测定其酶活。由图 6 可知,60℃ 保温 30 min 后基本失活,而在 70℃ 下仅保温 10 min,该酶完全失活,说明酶的温度稳定性较差。

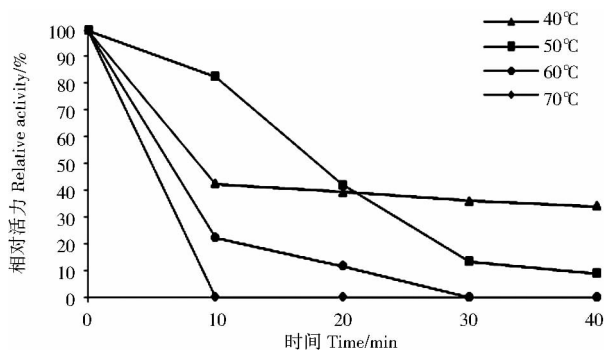


图 6 豆乳凝固酶的热稳定性

Fig.6 The thermo stability of soy milk clotting enzyme

2.3.3 pH 对酶活力的影响 参照段洪武等<sup>[8]</sup>的方法,调节粗酶液的 pH 至 5.9,6.1,6.3,6.5,6.7,测定 pH 对酶活力的影响。由图 7 可知,随着 pH 的升高豆乳凝固酶的活力逐渐降低,pH5.9 时豆乳凝固酶的活力最高。其可能原因一是随着 pH 的升高,大豆球蛋白表面电荷数增加<sup>[9]</sup>,二是由于大豆蛋白的乳化性和乳化稳定性随着 pH 的升高而提高,导致豆乳溶液体系变得稳定,而在低 pH 下,球蛋白微球的稳定性减小容易相互聚集而凝固<sup>[10]</sup>。

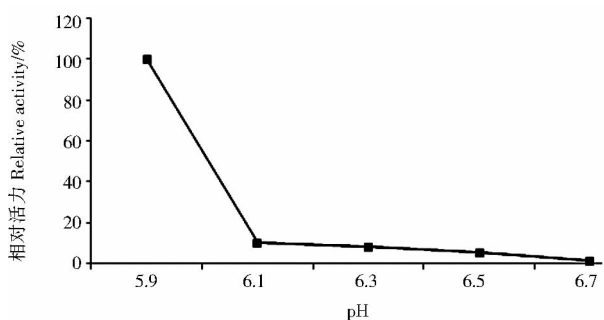


图 7 pH 对豆乳凝固酶的影响

Fig.7 Effect of pH on soy milk clotting enzyme

2.3.4 酶的 pH 稳定性 将粗酶液 pH 调至 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0 室温放置 1 h,再调至 6.0,50℃ 测定酶活。由图 8 可知,该酶在 pH4.0 ~ 7.0 的范围内较稳定,偏酸或偏碱环境均使活性下降。

2.3.5 底物浓度对酶促反应的影响 制备豆乳时调节加水量为干豆重量的 6,7,8,9,10 倍,得到不同浓度的豆浆,分别取 5 mL 加入 0.5 mL 粗酶液使其

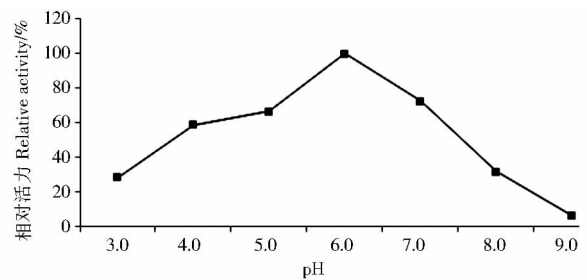


图 8 豆乳凝固酶的 pH 稳定性

Fig.8 The pH stability of soy milk clotting enzyme

凝固。由图 9 可知,在该底物浓度范围内,酶相对是足量的。因为当在相同酶浓度下,底物浓度对反应速率的影响呈矩形双曲线,而当底物浓度很低时,反应速率随底物浓度的增加而急剧加快,两者呈正比关系<sup>[11]</sup>。

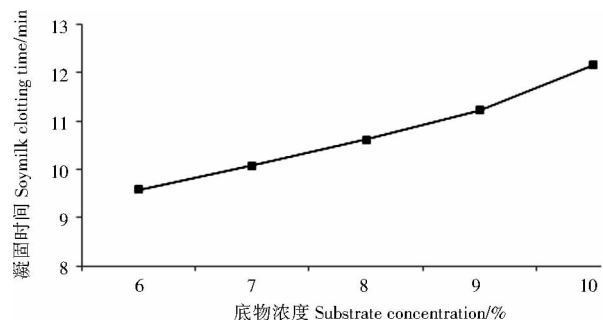


图 9 底物浓度对酶促反应的影响

Fig.9 Effect of substrate concentration on enzymatic reaction

2.3.6 金属离子对酶活力的影响 豆乳中加入不同的金属离子,使其最终浓度为 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mmol·L<sup>-1</sup>,测定豆乳凝固酶活力。由图 10 可知,Fe<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 对豆乳凝固酶有较强的促进作用,可使凝乳活力增加 1.5 ~ 4.0 倍。在相同离子强度下,Ca<sup>2+</sup> 对酶活力影响最大。Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 对凝固时间的影响差异不显著( $P > 0.05$ ),且 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 与另外 5 种金属离子相比对豆乳凝固酶的活性影响显著( $P < 0.05$ ),当无机盐的浓度从 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 增大到 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> 时。在相同离子强度下,Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 对凝固时间的影响与其他二价或三价金属离子相比差异极显著( $P < 0.01$ ),其原因可能是一价盐离子有静电屏蔽作用<sup>[12]</sup>,盐的正离子屏蔽了蛋白质之间的部分负电荷,使蛋白质之间的静电斥力减弱;二价盐离子除此作用外,还会与大豆蛋白质间形成“盐桥”<sup>[13-15]</sup>,蛋白质与二价盐离子形成共价交联。随着盐浓度的增加,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Al<sup>3+</sup> 3 种金属离子对

凝固时间的影响没有明显差异 ( $P > 0.05$ )。在  $3.0 \sim 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  可以提高酶的活性,  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  作用不明显, 而  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  则有抑制作用。

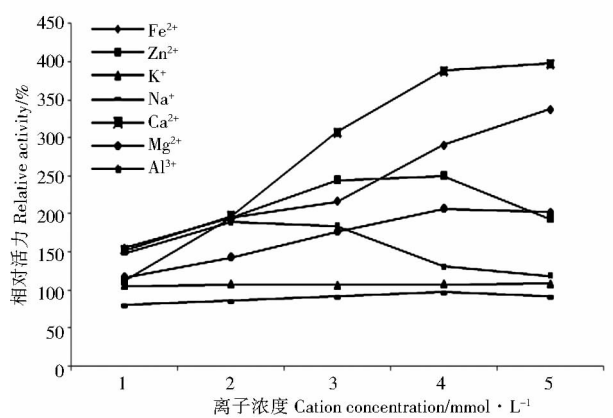


图 10 金属离子对豆乳凝固酶活力的影响

Fig. 10 Effect of metal ions on soy milk clotting enzyme

### 3 结 论

腐乳生产菌五通桥毛霉固态发酵粗酶液具有豆乳凝固酶活性;在  $20^\circ\text{C}$  培养 54 h 后,其酶活力可达到  $0.24 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;该粗酶液的温度稳定性较差,偏酸或偏碱的环境都易使之失活; $3.0 \sim 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  可以提高酶的活性,  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  作用不明显,而  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  则有抑制作用。

### 参考文献

[1] 蒋咏梅,章文贤. 豆乳凝固酶的研究概况[J]. 微生物学通报, 2003,30(2):78-81. (Jiang Y M, Zhang W X. The survey on the research of soy milk-clotting enzyme [J]. Microbiology, 2003, 30 (2):78-81.)

[2] Murata K, Kusakabe I, Kobayashi H, et al. Studies of the coagulation of soy milk-protein by commercial proteinases[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(2):385-389.

[3] Park Y W, Kusakabe I, Kobayashi H, et al. Production and properties of a soy milk-clotting enzyme system from a microorganism[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49(11):3215-3219.

[4] 林亲录,赵谋明,邓靖,等. 毛霉产蛋白酶的特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5):44-46. (Lin Q L, Zhao M M, Deng J, et al. Studies on process features of protease produced by mucor [J]. Food Science, 2005, 26(5):44-46.)

[5] 潘进权,罗晓春,谢明权. 雅致放射毛霉 AS3. 2778 碱性蛋白酶的纯化及水解特性[J]. 华南理工大学学报, 2008, 36(12):106-111. (Pan J Q, Luo X C, Xie M Q. Purification and hydrolysis characteristics of a alkaline protease from actinomucor elegans AS3. 2778 [J]. Journal of South China University of Technology, 2008, 36(12):106-111.)

[6] 栾广忠,程永强,李里特,等. 碱性蛋白酶 Alcalase 凝固豆乳过程的流变学特性变化[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2):90-95. (Luan G Z, Cheng Y Q, Li L T, et al. Coagulum texture change during soy milk coagulation induced by alcalase [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(2):90-95.)

[7] 栾广忠. 碱性蛋白酶 Alcalase 凝固豆浆机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005. (Luan G Z. Studies on the mechanism of soy milk coagulation by an alkaline proteinase-Alcalase [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.)

[8] 段洪武,孙勇,邓林,等. 豆乳凝固酶产生菌株的筛选及其酶学性质的研究[J]. 中国酿造, 2004(6):15-17. (Duan H W, Sun Y, Deng L, et al. Screening of soy milk coagulation enzyme-producing strain and study on its enzyme properties [J]. China Brewing, 2004(6):15-17.)

[9] Wang C R, Zayas J F. Emulsifying capacity and emulsion stability of soy proteins compared with corn germ protein flour [J]. Food Science, 1992, 57(3):726-731.

[10] 顾瑞霞,申戈. 凝乳酶及其代用品[J]. 中国乳品工业, 1991, 19(1):20-23. (Gu R X, Shen G. Rennet and its substitutions [J]. China Dairy Industry, 1991, 19(1):20-23.)

[11] 阚建全. 食品化学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2008:255-257. (Kan J Q. Food chemistry [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008:255-257.)

[12] 刘志胜. 豆腐盐类凝固剂的凝固特性与作用机理研究[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(3):39-43. (Liu Z S. Study on properties of tofu salt-coagulant and mechanism of tofu coagulation [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2000, 15(3):39-43.)

[13] Puppo M C, Añón M C. Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(9):3583-3589.

[14] Puppo M C, Añón M C. Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(8):3039-3046.

[15] Nagano T, Tokita M. Viscoelastic properties and microstructures of 11S globulin and soybean protein isolate gels; Magnesium chloride-induced gels [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(7):1647-1654.