

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.04.005

红曲霉固态发酵产糖化酶及酸性蛋白酶条件的优化

王秋辰, 王昌禄, 陈勉华, 王玉荣, 李贞景

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 从8株红曲霉中筛选出红曲霉MQ7作为高产糖化酶和酸性蛋白酶的供试菌株,采用固态发酵方法测定在不同发酵温度、底物料液比、大米和麸皮比例条件下的产酶情况.利用正交实验优化固态发酵产酶过程,确定该菌株产酶最佳发酵条件为:发酵温度30℃,底物料液比(g:mL)20:25,大米麸皮比例(g:g)17:3.在此条件下,糖化酶活力达1641.69 U/g,酸性蛋白酶活力达151.09 U/g.同时研究了NaCl含量对红曲霉酶活力的抑制作用,当NaCl质量分数达到18.92%时,红曲霉MQ7产糖化酶活力下降64.8%,酸性蛋白酶活力下降85.6%.

关键词: 红曲霉; 面酱; 糖化酶; 酸性蛋白酶; 发酵条件

中图分类号: TS264 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)04-0021-05

Optimization of Fermentation Conditions of Glucoamylase and Acid Protease Production with *Monascus* in Solid-state Fermentation

WANG Qiuchen, WANG Changlu, CHEN Mianhua, WANG Yurong, LI Zhenjing

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Monascus* MQ7 strain was obtained from eight *Monascus* strains as the highly glucoamylase and acid protease producing strain. The solid-state fermentation conditions for the glucoamylase and acid protease production with *Monascus* MQ7 were studied. Based on single factor tests, in different fermentation temperature, substrate solid-liquid ratio, proportion of rice and bran, the glucoamylase and acid protease production conditions were optimized with $L_9(3^4)$ orthogonal test. The results are as follows: the fermentation temperature is 30℃, substrate solid-liquid ratio (g:mL) 20:25, and the proportion of rice to bran (g:g) 17:3. Under the above conditions, the glucoamylase activity reached 1641.69 U/g, and the highest acid protease activity reached 151.09 U/g. The inhibition of NaCl on enzyme activity was also verified. When the NaCl mass fraction reached 18.92%, *Monascus* MQ7 glucoamylase activity decreased 64.8%, and acid protease activity decreased 85.6%.

Key words: *Monascus*; flour paste; glucoamylase; acid protease; fermentation condition

红曲是以大米为原料,经红曲霉(*Monascus*)发酵制成的一种紫红色米曲,一直以来被认为具有食用和药用双重功效.红曲中的红曲色素^[1]作为天然、优良的复合型食用色素,可以提供性能稳定、安全性高和品种多样的天然色素.部分红曲霉可代谢产生较高的糖化酶、酸性蛋白酶、酯化酶等酶类,在我国酿造微生物行业中占有重要地位,也可用于豆腐、鱼虾等高蛋白食品^[2].红曲中还含有多种药理活性物质,

如 Monacolin K 能够治疗高胆固醇血症^[3]; 麦角固醇可防止婴儿佝偻病,对促进孕妇和老年人钙、磷的吸收也有明显的生理作用^[4]; γ -氨基丁酸是稳定的降血压活性物质,对低肾素高血压患者有很好的降血压效果^[5].

面酱是以小麦面粉为主要原料酿制的酱类^[6].面酱发酵过程的实质是原料中的淀粉、蛋白质等物质在一定条件下,利用曲霉类微生物分泌的淀粉酶分解为

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171729)

作者简介: 王秋辰(1988—),女,天津人,硕士研究生; 通信作者: 王昌禄,教授, clw123@tust.edu.cn.

糊精、麦芽糖及葡萄糖。该糖化作用在制曲阶段已经开始进行,在酱醅发酵期间更进一步加强。同时,面粉中的少量蛋白质也经曲霉所分泌的蛋白酶的作用将其分解成为各种氨基酸,而使面酱又稍有鲜味,成为具有特殊滋味的产品。

目前,面酱酿造制曲多用米曲霉 AS3.042,所产酶系单一,面酱的色、香、味不足。采用多菌种制曲与发酵,可以弥补米曲霉菌种^[7]所产生的酶系不全的缺陷,使面酱中各种酶类的比例更趋合理。将红曲应用于面酱发酵中,利用其糖化酶和酸性蛋白酶活力较高的特点,可优化面酱生产过程中的酶系组成;同时,红曲霉代谢产生的红色素能够弥补面酱色泽偏褐色的缺点;此外,红曲具有的诸多保健功能对提高面酱出品率、产品质量及附加值具有重要意义。本文对实验室保藏的部分红曲霉进行研究,筛选高产糖化酶和酸性蛋白酶红曲霉,研究红曲霉固态发酵条件对红曲产酶的影响,以期为红曲应用于面酱生产奠定基础,为改善面酱产品质量提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基

红曲霉 MQ1、MQ2、MQ3、MQ4、MQ7、MQ8、MQ9、MQ11,天津科技大学食品生物技术实验室保藏菌种。

斜面培养基(g/L):葡萄糖 60,蛋白胨 20,硝酸钠 10,硫酸镁 5,磷酸二氢钾 10,琼脂粉 30,121 °C 灭菌 20 min。

种子液培养基(g/L):葡萄糖 60,蛋白胨 20,硝酸钠 10,硫酸镁 5,磷酸二氢钾 10,121 °C 灭菌 20 min。

初始发酵培养基:将大米与蒸馏水以 1(g):1(mL)的比例浸泡过夜,分装入 250 mL 三角瓶中,每瓶 20 g 原料,20 mL 蒸馏水,121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 试剂与仪器

福林酚试剂,北京索莱宝科技有限公司;麸皮、大米,市售;硫酸镁、硝酸钠、冰乙酸、乙酸钠、乳酸、乳酸钠、磷酸二氢钾,分析纯,天津市化学试剂一厂。

电子天平,美国双杰(兄弟)集团有限公司;微机控制光照培养箱,珠江广东省医疗器械厂;迴转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司;电热鼓风干燥箱,天津市天宇实验仪器有限公司;电热

恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,KAGOSHIMA SEISAKUSHO 公司;紫外可见分光光度计,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 酶活检测

糖化酶活力测定采用斐林试剂滴定法,参照 GB 8276—2006^[8],糖化酶活力单位定义:1 g 酶粉在 40 °C、pH 4.6 的条件下,1 h 水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖,即为1个糖化酶活力单位,以U/g 表示。

酸性蛋白酶活力测定采用福林酚方法,参照 GB/T 23527—2009^[9],酸性蛋白酶活力单位定义:1 g 酶粉在 40 °C、pH 3.0 条件下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸,即为 1 个酸性蛋白酶活力单位,以 U/g 表示。

1.3 高产糖化酶和酸性蛋白酶菌种的筛选

将红曲霉 MQ1、MQ2、MQ3、MQ4、MQ7、MQ8、MQ9、MQ11 菌种分别接种到新鲜的斜面培养基,30 °C 培养 6~8 d 后,在红曲霉菌种斜面中加入 5 mL 已灭菌的种子液培养基,制成孢子悬浮液,接种到装有 100 mL 种子液培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C,180 r/min 培养 24 h,得到种子液,调整孢子数为 2×10^6 mL⁻¹。将各菌株种子液分别加入已灭菌的初始发酵培养基中,接种量 5 mL,均匀加入,在 30 °C 恒温培养箱中培养,从第 6 天开始每隔 24 h 检测糖化酶及酸性蛋白酶活力。

1.4 固态发酵条件优化

利用单因素实验,研究红曲霉不同发酵温度、底物料液比(大米和麸皮总质量与蒸馏水体积间的比例)、大米麸皮质量比对糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响,并在单因素实验基础上,通过 L₉(3⁴) 正交实验优化固态发酵条件。

1.5 NaCl 质量分数对糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

将测定糖化酶和酸性蛋白酶活力所用的乙酸-乙酸钠缓冲液和乳酸-乳酸钠缓冲液换成质量分数分别为 8.02%、10.15%、12.28%、14.47%、16.67%、18.92% 的 NaCl 溶液,制备样品稀释液,比较 NaCl 质量分数对红曲霉酶活力的影响。

2 结果与讨论

2.1 高产糖化酶及酸性蛋白酶菌种的筛选

按照 1.3 所述方法筛选高产糖化酶及酸性蛋白酶的红曲霉菌株,结果见图 1。将各菌株的最大酶活力进行比较,按糖化酶活力排序为 MQ7>MQ9>

MQ2>MQ1>MQ11>MQ3>MQ8>MQ4,按酸性蛋白酶活力排序为 MQ7>MQ9>MQ8>MQ1>MQ11>MQ4>MQ3>MQ2,其中MQ7产糖化酶和酸性蛋白酶活力均最高,因此选择MQ7作进一步研究.

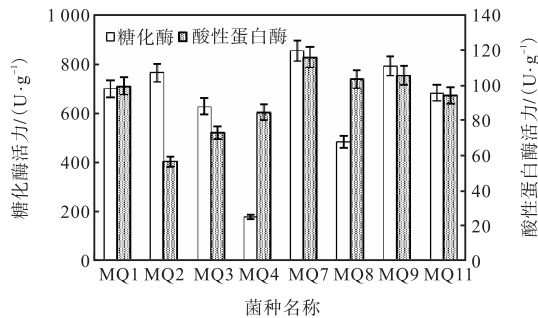


图1 不同菌株的糖化酶和酸性蛋白酶最大活力对比

Fig.1 Contrast of maximum activities of glucoamylase and acid protease of different strains

2.2 固态发酵条件的优化

2.2.1 发酵温度对MQ7菌株产酶的影响

在底物料液比 20:20,大米麸皮比例 19:1 的条件下发酵 7 d,研究不同发酵温度对 MQ7 菌株产酶活力的影响,结果见图 2.

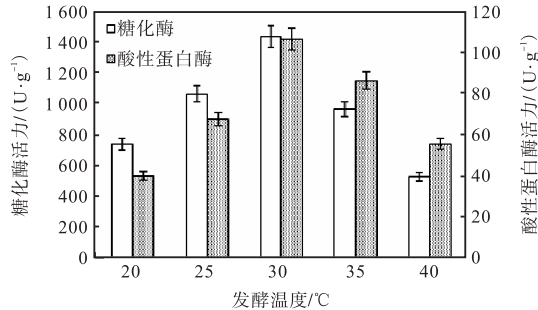


图2 发酵温度对MQ7产糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effect of fermentation temperature on glucoamylase and acid protease activities of *Monascus* MQ7

由图 2 可见:发酵温度对红曲霉 MQ7 产酶活力有较大影响,在 20~30 °C 范围内,随着温度的升高酶活力逐渐增大,在 30 °C 时 MQ7 菌株代谢产生的糖化酶和酸性蛋白酶活力最高,分别达到 1432.6 U/g 和 106.6 U/g;高于 30 °C 时,酶活逐渐降低,达到 40 °C 时,酶活下降显著.这是因为温度过高会抑制酶系充分发挥作用^[10],降低产酶活性,并且过高的温度使得水分蒸发过快,造成红曲霉在生长过程中逐渐缺水.综上所述,选择 25、30、35 °C 作为正交实验的因素水平.

2.2.2 底物料液比对 MQ7 菌株产酶的影响

在发酵温度 30 °C,大米麸皮比例 19:1 条件下

发酵 7 d,研究不同底物料液比对 MQ7 菌株产酶活力的影响,结果见图 3.

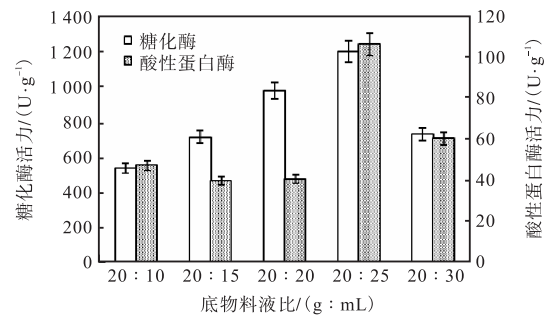


图3 底物料液比对MQ7产糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

Fig.3 Effect of substrate solid-liquid ratio on glucoamylase and acid protease activities of *Monascus* MQ7

由图 3 可见:糖化酶产酶量随着底物料液比的变化呈现先增后减的趋势.当底物料液比为 20:25 时,红曲霉 MQ7 产糖化酶和酸性蛋白酶活力最高,分别达到 1198.3 U/g 和 106.1 U/g,相比底物料液比 20:20 和 20:30 有明显增长.合理料液比可以使培养基有较好的疏松性^[11],增加空气传递,使菌体代谢产生的酶更好地传输,提高产物产量.水分含量过低,培养基中后期表面会逐渐干燥,丧失疏松性;水分含量过高,物料黏结,都不利于通风和菌体生长.综上所述,确定底物料液比 20:20、20:25、20:30 作为正交实验的因素水平.

2.2.3 大米麸皮比例对 MQ7 菌株产酶的影响

在发酵温度 30 °C,底物料液比 20:25 条件下发酵 7 d,研究不同大米麸皮比例对 MQ7 菌株产酶活力的影响,结果见图 4.

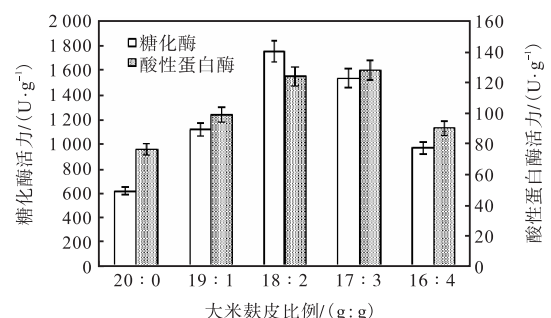


图4 大米麸皮比例对MQ7产糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

Fig.4 Effect of proportion to rice to bran on glucoamylase and acid protease activities of *Monascus* MQ7

由图 4 可见:当大米麸皮比例为 18:2 时,红曲霉 MQ7 产糖化酶活力最高,达到 1754.4 U/g,在大

米麸皮比例为 17 : 3 时,红曲霉 MQ7 产酸性蛋白酶活力最高,达到 127.8 U/g. 麸皮中含有较多的淀粉、蛋白质、维生素、矿物质等,同时麸皮还能够保证培养基的疏松程度^[12]. 糖化酶和酸性蛋白酶活力随大米与麸皮比例的减小而先增高后降低,这可能与大米和麸皮中组分含量不同,导致营养成分利用难易程度不同有关. 综上所述,选择 19 : 1、18 : 2、17 : 3 作为正交实验的因素水平.

2.2.4 正交实验

在单因素实验的基础上,选择影响产酶活力的发酵温度(A)、底物料液比(B)、大米麸皮比例(C)3个

因素进行 L₉(3⁴) 正交实验,以糖化酶和酸性蛋白酶活力为指标进行结果分析,考察各因素的影响程度. 正交实验的因素与水平见表 1,实验结果见表 2.

表 1 发酵条件优化正交实验因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiments for optimization of fermentation

水平	因素		
	发酵温度/°C	底物料液比/(g : mL)	大米麸皮比/(g : g)
1	25	20 : 20	19 : 1
2	30	20 : 25	18 : 2
3	35	20 : 30	17 : 3

表 2 发酵条件优化正交实验结果

Tab. 2 Result of orthogonal experiments for optimization of fermentation

实验编号	A	B	C	空列	糖化酶活力/(U·g ⁻¹)	酸性蛋白酶活力/(U·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	705.83	118.72
2	1	2	2	2	747.25	144.50
3	1	3	3	3	1 258.66	155.03
4	2	1	2	3	855.61	138.22
5	2	2	3	1	1 641.69	151.09
6	2	3	1	2	481.02	118.47
7	3	1	3	2	1 105.97	123.61
8	3	2	1	3	678.23	122.34
9	3	3	2	1	418.54	106.12
糖化酶活力	k ₁	903.91	889.14	621.69	922.02	
	k ₂	992.77	1 022.39	673.80	778.08	
	k ₃	734.25	719.41	1 335.44	930.83	
	R	258.53	302.98	713.75	152.75	
酸性蛋白酶活力	k ₁	139.42	126.85	119.84	125.31	
	k ₂	135.93	139.31	129.61	128.86	
	k ₃	117.36	126.54	143.24	138.53	
	R	22.06	12.77	23.40	13.22	

由表 2 可知,各因素对糖化酶活力影响程度为 C > B > A, 根据糖化酶活力确定的最优组合为 A₂B₂C₃. 各因素对酸性蛋白酶活力的影响程度为 C > A > B, 根据酸性蛋白酶活力确定最优组合为 A₁B₂C₃.

通过综合平衡法^[13]确定红曲霉 MQ7 固态发酵最佳条件为 A₂B₂C₃, 即发酵温度 30 °C, 底物料液比 20 : 25, 大米麸皮比例 17 : 3.

对表 2 结果进行方差分析,其结果见表 3、表 4.

表 3 MQ7 菌株糖化酶发酵条件优化方差分析

Tab. 3 Variance analysis of orthogonal experiments for optimization of glucoamylase

来源	平方和	自由度	F 值	F _{0.05}	显著性
A	103 518.92	2	2.35	19.00	
B	138 363.62	2	3.14	19.00	
C	949 916.90	2	21.53	19.00	*
空白	44 129.98	2	1.00	19.00	
误差	44 129.98	2			

注: *表示显著性水平 (P < 0.05).

表 4 MQ7 菌株酸性蛋白酶发酵条件优化方差分析

Tab. 4 Variance analysis of orthogonal experiments for optimization of protease

来源	平方和	自由度	F 值	F _{0.05}	显著性
A	843.67	2	3.00	19.00	
B	318.42	2	1.13	19.00	
C	828.79	2	2.95	19.00	
空白	280.88	2	1.00	19.00	
误差	280.88	2			

由表 3 可知,在 95%的置信区间内,大米麸皮比例对糖化酶活力有显著影响.

由表 4 可知,在 95%置信区间内,3 个因素对酸性蛋白酶活力的影响不显著,但均对酸性蛋白酶活力有一定影响.

2.2.5 结果验证

MQ7 菌株产酸性蛋白酶的最佳组合 A₁B₂C₃ 并未出现在正交表中,所以在此最佳组合条件下进行 3

次重复性实验. 结果表明, MQ7 菌株产酸性蛋白酶活力分别为 155.11、155.32、156.42 U/g, 平均值为 155.62 U/g, 与实验组合 A₂B₂C₃ 得到的 MQ7 菌株代谢产生酸性蛋白酶酶活 151.09 U/g 相差仅 3.0%, 而实验组合 A₂B₂C₃ 为 MQ7 菌株产糖化酶的最优组合, 酶活力为 1 641.69 U/g, 因此, 选取 A₂B₂C₃ 为正交实验的最优组合.

2.3 NaCl 质量分数对糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

不同质量分数 NaCl 溶液代替缓冲液对红曲霉 MQ7 酶活力的影响见图 5.

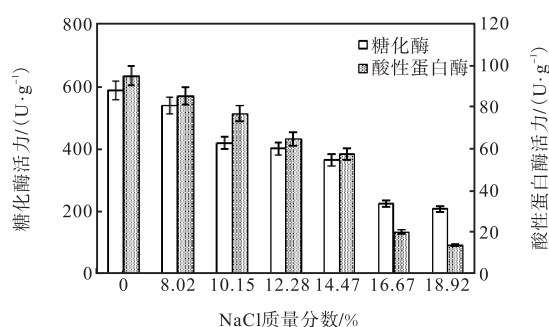


图 5 NaCl 质量分数对 MQ7 产糖化酶和酸性蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of brine on glucoamylase and protease activities of *Monascus* MQ7

由图 5 可见: 随着 NaCl 质量分数增加, 糖化酶及酸性蛋白酶的酶活均有一定程度的降低. 不同 NaCl 质量分数对酶活降低程度不同, 总体来说, NaCl 质量分数越高, 对酶的抑制作用越大. 当 NaCl 质量分数达到 18.92% 时, 糖化酶活力下降 64.8%, 酸性蛋白酶活力下降 85.6%. 糖化酶和蛋白酶活力是鉴定面酱发酵中菌种好坏的重要指标^[14], 由于面酱发酵中的 NaCl 主要起着调节口感和防腐作用, 因此实际生产中一般控制 NaCl 质量分数在 10% 左右, 在保证较大酶活力的同时, 保证面酱风味, 防止腐败.

3 结论

本实验从 8 株红曲霉中筛选出高产糖化酶及酸性蛋白酶的 MQ7 为供试菌株. 通过单因素及正交实验研究红曲霉 MQ7 固态发酵过程, 确定最佳产糖化酶和酸性蛋白酶培养条件为: 发酵温度 30 ℃, 底物料液比 (g : mL) 20 : 25, 大米麸皮比例 (g : g) 17 : 3. 利用 NaCl 溶液代替缓冲液提取粗酶液, 随 NaCl

质量分数升高, 对酶活力的抑制作用越来越大, 在面酱实际生产中考虑口感等因素应控制 NaCl 质量分数为 10% 左右.

参考文献:

- [1] Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhon A, et al. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126 (1): 20-23.
- [2] 王金字, 董文宾, 杨春红, 等. 红曲色素的研究及应用新进展[J]. 食品科技, 2010, 35 (1): 245-248.
- [3] Panda B P, Javed S, Ali M. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*[J]. Food and Bioprocess Technology, 2008, 3 (3): 373-378.
- [4] Wang Tianqi, Li Hanxiang, Wang Manyi, et al. Integrative Extraction of Ergosterol, (1→3)- α -D-Glucan and Chitosan from *Penicillium chrysogenum* Mycelia[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2007, 15 (5): 725-729.
- [5] 王启军, 张东亮, 林萍, 等. 红曲在调味品中的应用[J]. 中国调味品, 2008 (1): 75-78.
- [6] 杨煜灿. 酱及酱产品种类探析[J]. 商品与质量: 学术观察, 2012 (2): 291.
- [7] 付雯, 李冬生, 黄红霞, 等. 甜面酱双菌种制曲工艺条件的研究[J]. 中国调味品, 2010, 35 (10): 85-90.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 8276—2006 食品添加剂·糖化酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 李金红, 栾建文. 改进后熟工艺提高酱油风味[J]. 中国酿造, 2002 (2): 28-29.
- [11] 戴超, 冷云伟. 影响固态发酵的因素及控制策略[J]. 江苏调味副食品, 2008, 25 (5): 34-35.
- [12] 安艳霞, 李水莲, 王亚平. 小麦麸皮的功能成分及加工利用现状[J]. 粮食流通技术, 2011 (2): 41-43.
- [13] 陈魁. 应用概率统计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2011: 267-270.
- [14] 郭继平, 马莺. 紫外诱变选育米曲霉高产蛋白酶菌株[J]. 微生物学通报, 2007, 34 (2): 246-250.

责任编辑: 常涛