

麴霉蛋白酶及其应用在蛋白胨 制造的研究*

湯汉芬

方心芳

(北京医学院医学系)

(中国科学院菌种保藏委员会)

微生物蛋白酶在食品制造方面的利用,我国劳动人民已有丰富的經驗和悠久的历史,如豆醬、豆豉、醬油等都是利用它的作用制成的产品。近年来微生物蛋白酶的应用在皮革鞣化上已有显著成效。解放后中国科学院菌种保藏委员会已在几个制革厂試驗成功,現正逐步推广。前年作者曾建議北京化学試剂研究所試用麴霉蛋白酶代替胰酶制剂制备蛋白胨,業已获得初步效果。但在制备过程中,仍存在着一些問題亟待解决。本研究的目的即在研究麴霉蛋白酶的性質,进一步利用以試制不同蛋白質来源的蛋白胨。为了确定应用这一方法制出的蛋白胨的实用价值,还作了蛋白胨的化学分析与微生物培养的比较試驗。

实验方法

試驗所用的菌种 12 株是菌种保藏委员会肖永瀾同志从 117 株黃綠及黃褐色麴霉中选出来的^[1]。培养的方法是在 250 毫升的錐形瓶中用麸皮 5 克,加水 5 毫升,混和后,通过 20 磅压力灭菌 30 分鐘,然后在室温下接种麴霉,于 30°C 保温箱中培养。待菌絲生出后,倒瓶一次。約 5 天后即成熟为麸麴。

实验进行以前,比較了几种測定蛋白酶活性的方法,結果决定采用松島欽一法^[2]及 Folin 与 Ciocalteu 的比色法^[3]。前者的特点是簡捷,一般常应用于工業上酶制剂的檢定。其簡要操作如下:用試管 10 个各盛以蛋白質溶液 5 毫升,順序加入不等量的酶液(0.10 毫升,0.15 毫升,0.20 毫升……),置于 48°C 保温箱中 5 分鐘。然后取出試管,立即順序加入饱和的硫酸鎂与濃硝酸的混合液(4:1) 5 毫升。記錄其开始不生沉淀时所用的酶量。Folin 与 Ciocalteu 法的原理是基于在蛋白質水解过程中游离出来的酪氨酸与色氨酸所生成的顏色反应。应用此法測定蛋白酶的活性已有蔭山公雄等^[4-7]詳

* 1956 年 4 月 3 日收到。

細研究过。由于過濾时濾紙可能吸附一部分在水解时游离出来的酪氨酸，我們改用了离心法代替過濾，減少了操作过程中的麻煩，节省時間并避免酪氨酸的損失。形成的顏色，在光电比色計中进行測定。

選擇基質时，由于酪蛋白来源容易，質量优良，为制造蛋白胨的較好原料，故在本試驗中選作基質。1%的酪蛋白溶液配制如下：用酪蛋白 2.5 克，加 0.2 *N* 氢氧化鈉溶液 50 毫升，在水浴上加热溶解，過濾，然后稀釋至 250 毫升。此时酪蛋白溶液的 pH 近于 7。各种不同 pH 的酪蛋白液是用 Clark 与 Lubbs 緩冲液制备的，并用 pH 計測得其准确值。

(一) 从麩麩提取蛋白酶的条件的試驗

从麩麩中提取蛋白酶，一般是用水^[7-8]，1% NaCl 液^[9]或 20% NaCl 液^[10]。我們首先用 1% NaCl 液在 42—43°C 提取麩麩中的蛋白酶，提取時間从 1/2 小时到 4 小时。然后用 1% 酪蛋白液 1 毫升，加入酶液 0.50 毫升，經 5 分鐘后，按照 Folin 与 Ciocalteu 法比較以上提取液中蛋白酶的活性，証明浸出 1 小时至 4 小时的酶量相等，1/2 小时不够，故浸出時間以 1 小时为宜。其次我們用 1% 氯化鈉液在不同温度提取 1 小时，証明提取温度以 33—46°C 为最适宜，温度高至 58°C 时，酶的破坏十分显著。当試驗用不同溶剂提取酶时，我們比較了水，1% NaCl 液，不同 pH 的緩冲液 (pH 6, 7, 8) 的提取液中蛋白酶的活性，証明 pH 7 的溶剂最为适宜，水或 1% 氯化鈉液無差別。因此我們选择了水或 1% 氯化鈉液作为提取麩麩中蛋白酶的溶剂，温度在 42—43°C，時間为 1 小时。

(二) 十二种麩霉蛋白酶活性的比較及其最适 pH 的測定

首先应用松島欽一法找出十二种麩霉蛋白酶的最适宜 pH 范围。比較 pH 1 至 9 的酪蛋白液在同一時間內达到加蛋白質沉淀剂后开始不生成沉淀时所用之酶量，証明 pH 6—7 的酪蛋白液所用的酶量最少，此即最适宜 pH 范围。然后配制 pH 6—7 間的各种酪蛋白液，用 0.5% 酪蛋白液 2 毫升，加酶液 0.02 毫升，經 5 分鐘后，按照 Folin 与 Cicalteu 法測定此类蛋白酶的最适宜 pH，并比較其活性，如圖 1。

从圖 1 可以看出这 12 种麩霉蛋白酶在同等条件下，其最适宜 pH 不完全相同，变化于 pH 6.52—6.85 之間。比較其活性时，發現以 3.374 号土褐麩霉 (*Asperigillus terrecola*) 的蛋白酶活性最大，其次是 3.280 号，而以 3.400 号及 3.431 号为最弱。因此我們选择了 3.374 号进行如下試驗。

(三) 温度、基質濃度及酶濃度对土褐麩霉蛋白酶反应的影响

試驗温度对酶反应的影响用 0.5% 酪蛋白液 (pH 7) 2 毫升，加酶液 0.20 毫升，經 5 分鐘后*，其結果如圖 2。

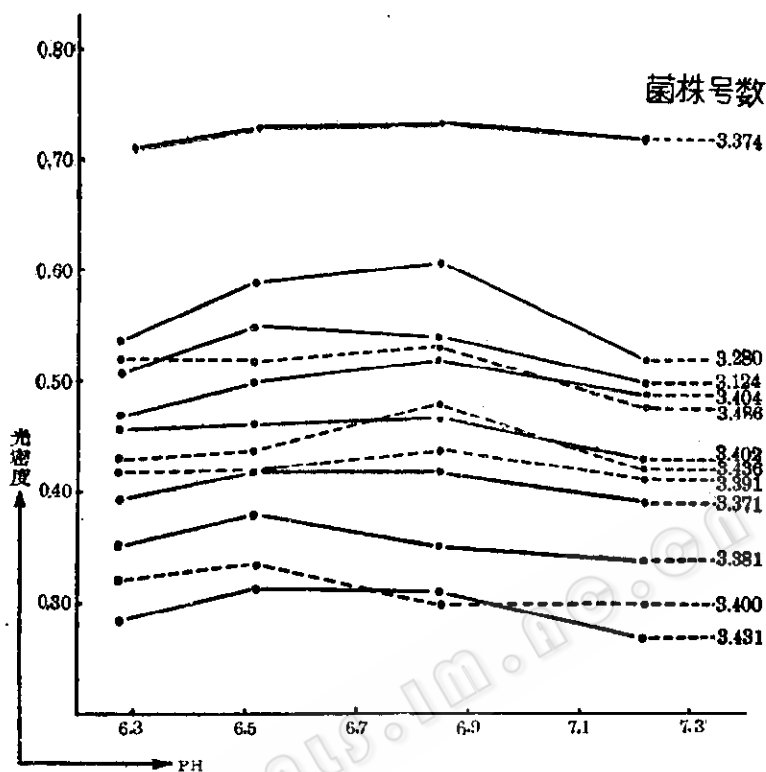


圖 1 不同 pH 对 12 种鏈霉蛋白酶活性的影响。

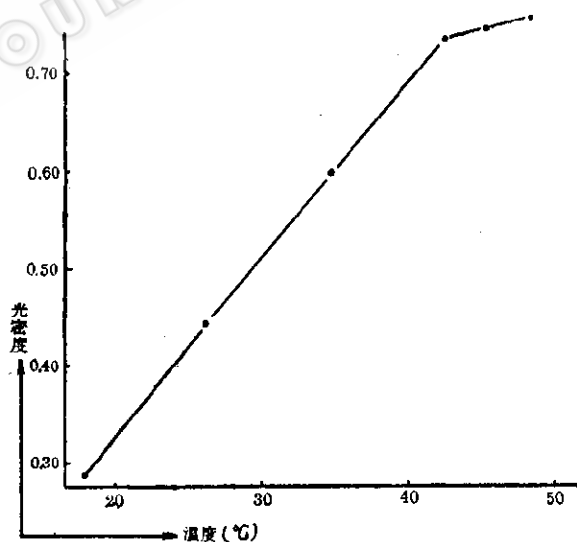


圖 2 温度对 3.374 号土棉鏈霉蛋白酶反应的影响。

• 本实验测定酶活性时除特别注明者外都用此条件。

酶反应的最适温度常因作用时间的长短而有差异。作用的时间长则最适温度较低；时间短则最适温度较高，这是由于时间短酶被破坏较少之故。本实验所用的时间都是 5 分钟，故温度虽达到 48°C ，酶反应速度仍略见上升。

基質濃度及酶濃度对酶反应的影响见图 3、图 4。如果酶量维持一定，将基質的濃度逐渐增加，则反应的速度即迅速增高，达到一定程度后，基質的濃度虽再增加，反应的速度也不再增高（图 3）。然后固定这时的基質濃度，改变酶液的用量。结果如图 4。

(四) 3.374 号土褐黴蛋白酶在不同温度下的稳定性

在試驗温度对土褐黴蛋白酶反应的影响时，因为作用时间很短，酶被破坏不显著。一般工业上在应用此酶时，作用时间比较长，因此本实验延长了作用的时间来观察其在不同温度下的稳定程度。结果见图 5。

从图 5 可看出此酶在低温时比较稳定（一般情况下，此酶的提取液置冰箱中可以保存 3 天之久）。在 43°C 时破坏较少，但温度增高至 54°C 以上时，它的破坏程度甚为显著。这点在应用蛋白酶时必须注意。

(五) 3.374 号土褐黴蛋白酶对各种酸鹼度的稳定性

取等量的酶液分置于 8 个試管中，以麝香草酚藍为指示剂，加 $0.2N$ 鹽酸或氫氧化鈉液調节各酶液的 pH 为 2、4、5、6、7、8、9、10。在 43°C 保温 1 小时后，取出使迅速冷却，立刻用以上酸或鹼液將所有酶液調节至 pH7，稀釋至等量，然后进行酶活性的比較。

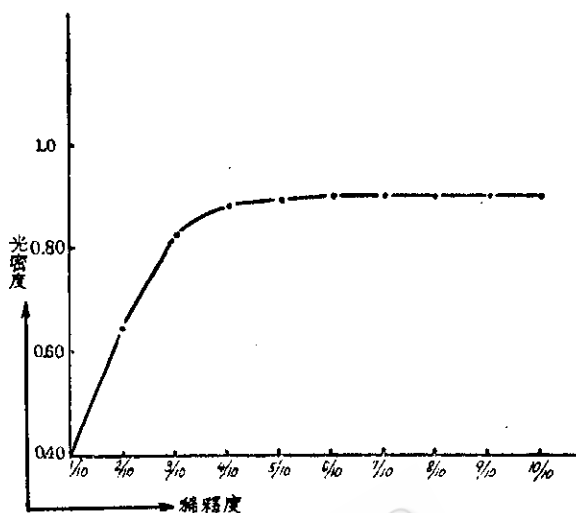


图 3 基質的濃度对 3.374 号土褐黴蛋白酶反应的影响。

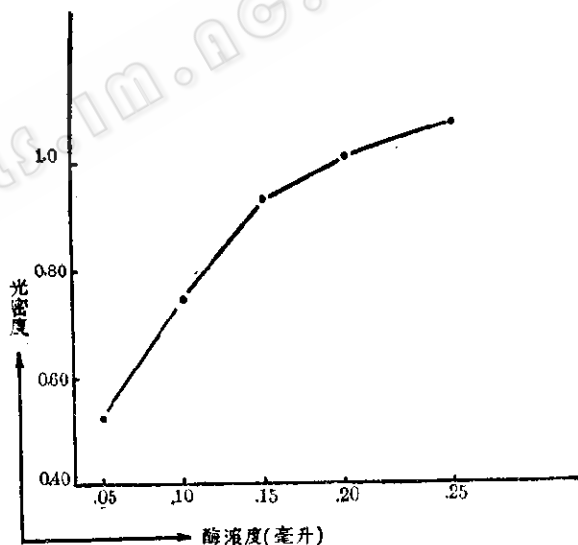


图 4 酶的濃度对 3.374 号土褐黴蛋白酶反应的影响。

結果見圖 6。

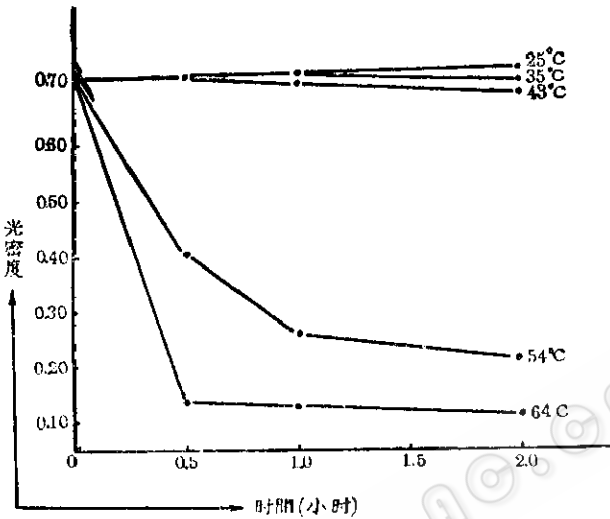


圖 5 3.374 号土褐鏈霉蛋白酶在不同温度下的稳定性。

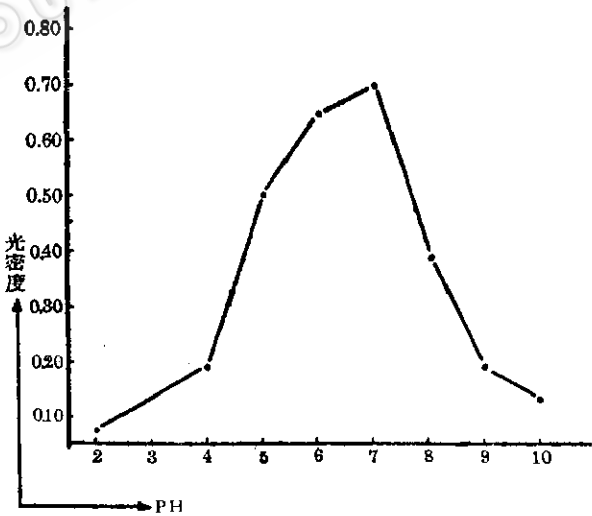


圖 6 3.374 号土褐鏈霉蛋白酶对各种酸碱度的稳定性。

从以上结果可以看出此酶在 pH7 时最为稳定, 在 pH6 时破坏较少, 过酸过碱破坏均甚显著。

(六) 3.374 号土褐黴蛋白酶对几种蛋白质作用的比较

本试验共用 6 种蛋白质, 其中大豆蛋白是按照郑集法^[10]由大豆制备的。其水解程度比较结果见图 7。

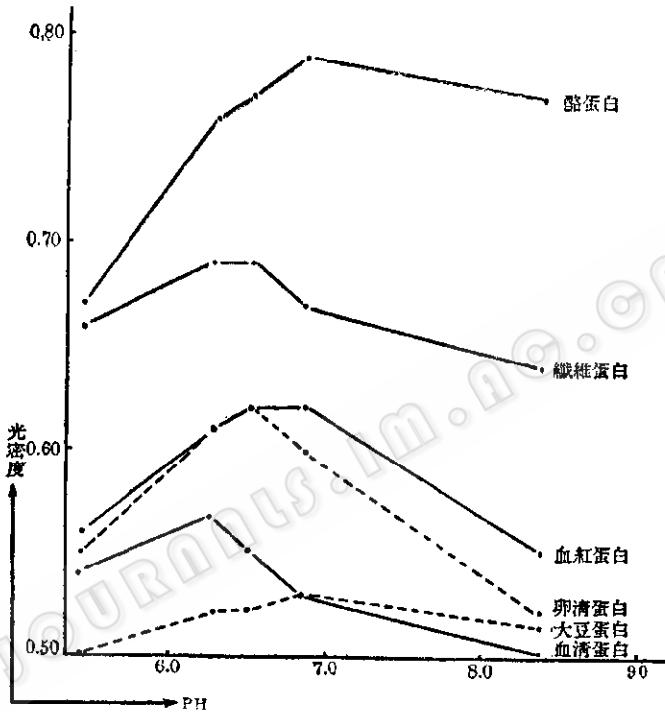


圖 7 3.374 号土褐黴蛋白酶对几种蛋白质水解作用的比较。

各种蛋白质中所含酪氨酸的成分有差别 (例如酪蛋白中的酪氨酸比卵清蛋白中的多), 以上结果是依据酪氨酸的颜色反应表明蛋白质的水解程度。从图 7 也可看出同一种蛋白酶作用于不同的蛋白质时, 其最适宜 pH 也不完全相同。

蛋白胨的试制

根据以上实验结果, 我们进一步利用 3.374 号土褐黴蛋白酶试制蛋白胨。采用的原料是酪蛋白与大豆蛋白。酪蛋白是从中国医药公司购得, 大豆蛋白是我们用大豆制备的。在进行培养黴霉时, 改用容量 700—800 毫升的平底瓶, 一次制备黴霉 60 克, 提取时加水 600 毫升。此时不宜加盐水提取以避免增加蛋白胨中灰分的含量。

制备方法是根据 Leifson 法^[11]加以改良, 用磨碎过的酪蛋白 100 克, 加水 490 毫升

与 0.2N 氢氧化钠液 410 毫升 (可以将水与氢氧化钠液分成两部分, 先加一部分溶解大量的酪蛋白, 过滤后的残渣再加所余的碱液溶解, 将最后剩下的少量残渣弃去)。在水浴上加热至溶解, 然后用纱布过滤, 弃去残渣。此时酪蛋白液的 pH 近于 7。加入酶液 100 毫升, 混匀后, 在 45—46°C 保温并时常摇动。在作用最初进行时, 溶液的 pH 稍有降低, 可加氨液重复调节 pH 至 7, 并不时取出 1 毫升水解液进行比色测定, 至酪氨酸的含量不再增加为止。此段时间约为 7 小时。然后将水解液煮沸 1 分钟, 并加骨炭脱色。冷后过滤, 弃去残渣。将滤液减压蒸馏直至稠浆状为止。蒸馏时不应有沉淀析出, 取出稠浆并涂于玻板上, 在 70°C 以下烘干。干后用刀片刮下, 研碎后成棕黄色粉末。产量为 60%。

从大豆蛋白制备蛋白腩时亦如上法, 但消化时需要延长至少至 15 小时。产品为棕黄色粉末。产量为 40%。

以上两种制成的蛋白腩的化学成分如下:

	水分 (%)	灰分 (%)	总氮 (%)	氨基酸 (%)	可溶性蛋白	类别
酪蛋白腩	3.87	0.56	12.8	2.46	無	微量
大豆蛋白腩	3.89	0.59	12.7	2.98	無	微量

蛋白腩制品培养微生物的试验

为了确定此蛋白腩制品的营养价值, 曾用它与美国 Hema Drug 公司的出品进行肠内细菌的培养比较试验, 证明酪蛋白腩与美国所产者近似, 而大豆蛋白腩则优于美货 (见表 1*)。此外应用本制品在培养放线菌时, 也证实了它的优良效用, 试验是用地震菌 (*Streptomyces rimosus*) 进行的。此菌如氮源不适宜, 就不产生厚层的孢子枝和气菌

表 1 細菌培养試驗(培养时间为24小时)

蛋白腩的种类	pH	接 种 細 菌										氨基酸产生							
		液 体 培 养					固 体 培 养												
		大腸菌	伤寒菌	志賀氏菌	痢疾氏菌	宋內氏菌	副傷寒	副傷寒	副傷寒	大腸菌	伤寒菌	志賀氏菌	痢疾氏菌	宋內氏菌	副傷寒	副傷寒	副傷寒	大腸菌	伤寒菌
酪 蛋 白 腩	7.6	++	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
大 豆 蛋 白 腩	7.6	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
美国制蛋白腩 (Hema Drug Co.)	7.6	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	

+ 示生長或产生氨基酸; ++ 示生長旺盛; - 示不产生氨基酸; ± 示不确定。

* 由北京医学院細菌科陶善敏教授协助进行。

絲。結果証明用酪蛋白胰培养地霉菌既形成厚層的孢子枝和气菌絲，又产生比較多的抗生素，比日本照内氏胰为优**。

討 論

1. 吉田文彦^[12]在研究麴霉蛋白酶时，指出两种蛋白酶系統：一种是米麴霉群蛋白酶，这种蛋白酶在鹼性液中比較稳定，在酸性液中破坏甚大。另一种是黑色麴霉蛋白酶，其性質与前一种恰好相反，即在酸性液中較稳定，在鹼性液中破坏甚大。前者的最适宜 pH 为 6.5，因此他認為是木瓜蛋白酶或胰蛋白酶体系；后者的最适宜 pH 为 2.5，故認為是胃蛋白酶体系。蔭山公雄等指出两种蛋白酶系統同时存在于米麴霉中。一种是酸性蛋白酶，最适宜 pH 为 3；另一种是鹼性蛋白酶，最适宜 pH 为 7.5。本实验所观察的 12 种麴霉，显然以鹼性蛋白酶为主。酸性蛋白酶是否存在，尚待进一步的深入研究。至于 3,374 号土褐麴菌蛋白酶是否与木瓜蛋白酶相同，只进行过初步比較試驗。用硫化氢或苛性鈉液处理后，木瓜蛋白酶被激活，但土褐麴霉蛋白酶并無激活現象。因此我們認為此类蛋白酶虽其最适宜 pH 与木瓜蛋白酶相近，其性質可能不完全相同。

2. 在測定麴霉蛋白酶的活性过程中，水解液的 pH 常略显降低，酶的活性受到抑制，5 分鐘后即停止水解。如果在緩冲液中，水解作用即能繼續进行。这可能是由于水解时产生的酸性物質所致。在制备蛋白胰时，为了避免灰分含量的增加，不加緩冲液，可用少量的氨液来調整水解液的 pH。

3. 在选择酪蛋白原料时，特別考虑到用品来源丰富与成本經濟，故采用中国医藥公司的“保健干酪素”。其价格極廉，可大量供应，但杂质甚多，溶解比較困难，用以制造的蛋白胰質量不如純酪蛋白的制品。但为我国今后工業大量生产提供参考，仍决定选用此种粗制品作为原料。

4. 蛋白胰是蛋白質的水解次級衍生物，除胰外，其中常含有少量的脉、肽及氨基酸。由于所用原料及水解酶的不同，胰中常含有不等量灰分及生長因素等化合物。例如用較多量的胃蛋白酶所制备的蛋白胰常得到較滿意的微生物生長。这可能是因为胃蛋白酶中含有生長因素的緣故^[10]。我們制出的蛋白胰的效能优良，可能在于所用土褐麴霉蛋白酶含有生長因素或水解产物中的氨基酸未遭破坏的緣故。

选择水解时的温度在 45—46°C，因为腐敗菌类在此温度不易生長，可不加防腐劑。而且温度較高，消化時間减少，这对生产來說是非常經濟有利的。最应注意控制消化時間、pH 与温度。否則蛋白質沒有完全水解为胰，或者胰可以繼續水解生成大量的氨基

** 这是中央衛生研究院藥物系刘若磐先生的实验結果。

酸,在减压蒸馏时会大量析出。本实验在制造蛋白胨时,只试用了 3.374 号土褐麴霉一种,如用米麴霉试制蛋白胨也可得到类似的结果。

4. 本试验测定了麴霉蛋白酶作用的条件,这对使用麴霉作为鞣化剂的皮革厂及高温发酵的酱油厂也会有所帮助。

結 論

在比較十二株麴霉产生的蛋白酶的活性时,选出了蛋白酶活性最强的 3.374 号土褐麴霉,并进行了土褐麴霉蛋白酶的性質,如作用温度、基質濃度、酶濃度对其活性的影响,在不同温度或酸鹼度下的稳定性及其对于几种蛋白質的水解作用比較研究。

利用 3.374 号土褐麴霉产生的蛋白酶试制酪蛋白胨与大豆蛋白胨已获得初步的成績。根据微生物的培养試驗,酪蛋白胨对于要求氮源严格的地霉菌培养是合适的,至于腸內細菌的培养試驗結果,大豆蛋白胨最为滿意。

本研究的結果,除对于蛋白胨的制备提供了一个新的、較优良的方法外,也可供皮革鞣化,酱油的釀造等方面参考。

本实验在进行过程中曾蒙北京大学教授及中国科学院菌种保藏委员会兼任研究员湯佩松給我們不少帮助,特此志謝。

参 考 文 献

- [1] 肖永瀾、方心芳: 产生蛋白酶的麴霉的选种試驗 (未发表)。
- [2] 松島欽一: 日本发酵工学杂志, **32** (1): 14, 1954。
- [3] Folin, O. and Ciocalteu, V.: *J. Biol. Chem.*, **73**: 627, 1927。
- [4] 蔭山公雄、国定期行: 日本发酵工学杂志, **33** (1): 28, 1955。
- [5] 蔭山公雄: 日本发酵工学杂志, **33** (2): 53, 1955。
- [6] 蔭山公雄、杉田脩: 日本发酵工学杂志, **33** (3): 109, 1955。
- [7] Takamine: *J. Ind. Chem.*, **6**: 824, 1914。
- [8] Harada, T.: *J. Ind. Chem.*, **23**: 1424, 1931。
- [9] Matsushina, K.: *J. Ferment. Tech.*, **31**: 367, 1953。
- [10] 郑集: 中国化学会志, **1**: 149, 1936。
- [11] Leifson, E.: *Bull. Johns Hopkins Hoop.*, **72**: 179-99, 1943。
- [12] 吉田文易: 日本农化杂志, **28**: 66, 1954。

STUDY ON THE PREPARATION OF PEPTONE BY THE ACTIVITY OF PROTEASE PRODUCED BY ASPERIGILLA.

TANG HAN-FEN AND FANG SIN-FANG

School of Pharmacy, Peking Medical College, and Academia Sinica, Peking

1. A survey was made on the proteolytic activities of protease produced by 12 strains of *Asperigilla*, and among them, *A. terricola* strain No. 3. 374 was found to be the most active and was selected for the preparation of peptone.

2. Peptone produced from casein and soy bean protein by the proteolytic action of this particular organism was successfully carried out. Tests showed that casein peptone thus prepared was more nutritious for *Streptomyces rimosus* than Teruuchi's peptone, a Japanese brand commonly employed in this laboratory. For the coliform bacteria, casein peptone was found to be equivalent to that of Hema Drug Co., but peptone prepared from soy bean protein was even superior.

3. The results of this study showed that a new and economical process for the preparation of peptone is possible, and paved the way for further application of the organisms herein studied in soy sauce fermentation and in the bating treatment used in leather industry.