

何 灿,宋佳雯,黄 迪,等. 蛋白质谷氨酰胺酶发酵条件的初步优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):218-220.

蛋白质谷氨酰胺酶发酵条件的初步优化

何 灿,宋佳雯,黄 迪,关 静,张 扬,郑 烨,陈曦乐,朱晨旦,

岑院汉凤,孙仁强,赵怡姍,成 楠,张艳芳,高红亮

(华东师范大学生命科学学院,上海 200241)

摘要:蛋白质谷氨酰胺酶在食品行业中具有广泛的应用前景,通过对蛋白质的脱酰胺基作用,可以促进植物蛋白的溶解、乳化和起泡等。对产吡啶金黄杆菌产生蛋白质谷氨酰胺酶的代谢曲线和发酵培养基配方进行研究,结果表明,发酵液氨浓度和 pH 值随发酵时间延长而升高,发酵 12 h 酶活最高,发酵培养基初始 pH 值为 5.2 时酶活最高;通过单因素试验,确定乳糖和蔗糖为最适碳源,大豆蛋白胨和多聚蛋白胨为最适氮源;正交试验结果表明,大豆蛋白胨、乳糖和 Tween 80 最适浓度分别为 1.2%、0.7% 和 0.15%,培养基优化后酶活最高为 0.661 U/mL。

关键词:产吡啶金黄杆菌;蛋白质谷氨酰胺酶;培养基;优化

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0218-03

植物蛋白(如大豆蛋白、小麦蛋白和玉米蛋白等)在食品工业中应用非常广泛,但由于在弱酸性环境中(大多数食品系统的 pH 值范围)存在溶解性差、稳定性低等问题,如在植物蛋白饮料产品中出现蛋白沉淀、脂肪上浮现象,使产品口感和外观变差,产品保质期缩短^[1],造成植物蛋白在生产应用中受到限制。

植物蛋白含有大量的谷氨酰胺残基,通过脱酰胺基作用可以改善植物蛋白的溶解性。Yong 等通过酶法分别脱去部分玉米胶蛋白和小麦蛋白的氨基,使蛋白质溶解性得到提高^[2-3]。通过蛋白质的脱氨基作用,不仅能够提高蛋白质在酸性条件下的溶解性,而且可以提高其乳化性、发泡性和凝胶性等多种功能特性,这些都是食品蛋白质的必需性能。因此,催化蛋白质脱酰胺基酶在工业应用中具有很大潜力。目前,报道能催化蛋白质脱酰胺基作用的酶有谷氨酰胺转氨酶、蛋白酶和肽谷氨酰胺酶^[4-6]。蛋白酶和谷氨酰胺转氨酶的主要酶促反应不是蛋白质残基中谷氨酰胺的脱氨基作用,因此,用于植物蛋白脱氨时有副作用,会给食品带来不利影响。肽谷氨酰胺酶虽然脱氨具有专一性,但是仅以多肽为底物进行反应,对大分子蛋白质没有作用^[6]。2000 年,日本学者 Yamaguchi 等发现了 1 种由微生物产生的新的脱酰胺基酶——微生物蛋白质谷氨酰胺酶^[7],该酶是由从土壤中分离出的 1 株金黄杆菌(*Chryseobacterium proteolyticum*)产生,对酪氨酸和 Cbz-Gln-Gly(苯甲基氧化碳酸-L-谷氨酰胺甘氨酸)均有脱酰胺基活性,而没有蛋白酶和谷氨酰胺转氨酶活性,这是首次报道的微生物产蛋白质谷氨酰胺酶^[3]。

笔者所在实验室从土壤中筛选出了 1 株产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*),能够产生微生物蛋白质谷氨酰胺酶。本研究对该产吡啶金黄杆菌发酵培养基配方进行初步优化,为其进一步工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 产吡啶金黄杆菌由华东师范大学微生物实验室分离并保存。

1.1.2 试剂 Cbz-Gln-Gly,购自 Sigma 公司;大豆蛋白胨、多聚蛋白胨生化纯,购自上海生工生物科技股份有限公司;酵母提取物,购自安琪酵母有限公司;苯酚、硝普钠等常规试剂分析纯,购自上海化学试剂公司。

1.1.3 培养基 种子培养基(1 000 mL):多聚蛋白胨 10 g、酵母提取物 2 g、MgSO₄·7H₂O 1 g,调节 pH 值至 7.0;基础发酵培养基(1 000 mL):乳糖 5 g、多聚蛋白胨 10 g、NaH₂PO₄·H₂O 1.7 g、K₂HPO₄ 0.25 g、MgSO₄·7H₂O 0.25 g、FeSO₄·7H₂O 0.05 g,调节 pH 值至 7.2。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 种子培养:菌种活化后,以 2% 接种量接入种子培养基,200 r/min、25 ℃震荡培养 12 h。发酵培养:以 1% 接种量把种子培养液接种到发酵培养基,200 r/min、25 ℃震荡培养。

1.2.2 酶活性测定方法^[7] 100 μL 含有 10 mmol/L Cbz-Gln-Gly 和 175.6 mmol/L 磷酸钠缓冲液的底物溶液,与 10 μL 酶液混合均匀,37 ℃温浴 30 min,然后加入 100 μL 12% 三氯乙酸终止反应;对照反应是先加入三氯乙酸,后再加入酶液。18 000 r/min 离心 5 min,上清液中释放的氨用卢玉棋的方法^[8]检测。酶活性单位定义为:释放氨 1 μmol/min 的酶量为 1 个酶活性单位。

2 结果与分析

2.1 产吡啶金黄杆菌代谢曲线

从图 1 可以看出,产吡啶金黄杆菌延滞期较短,接种后

收稿日期:2013-07-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:81072422);国家大学生创新创业训练计划(编号:1310269039);上海市大学生创新基金(编号:KY2012-60S)。

作者简介:何 灿(1992—),女,安徽六安人,硕士研究生,主要从事食品微生物研究。E-mail:435144969@qq.com。

通信作者:高红亮(1973—),男,河南林州人,博士,副教授,主要从事食品微生物研究。E-mail:hlgao@bio.ecnu.edu.cn。

4 h 进入对数期,发酵 12 h 后逐渐进入稳定期,最终发酵液 $D_{600\text{ nm}}$ 可达到 1.187;发酵液 pH 值随着发酵时间的延长不断升高,当进入稳定期时 pH 值达到 8.7,这一变化趋势和发酵液中氨浓度趋势一样,这是因为发酵液中蛋白质谷氨酰胺酶分解蛋白质产生氨,氨浓度不断升高,导致 pH 值升高,与 Yamaguchi 等的研究结果^[7]一致。蛋白质谷氨酰胺酶的活性随着发酵时间延长而增加,12 h 达到最大,为 0.37 U/mL,随后又略有下降。

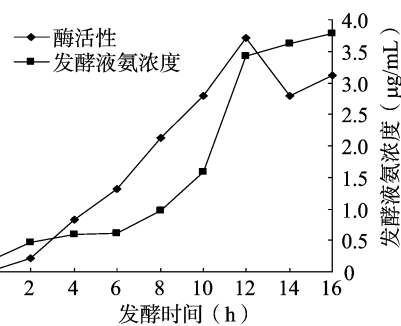
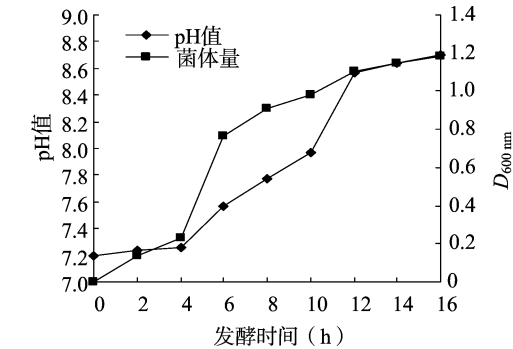


图1 产吡啶素黄杆菌的代谢曲线

2.2 初始发酵 pH 值

发酵液初始 pH 值分别设为 5.2、6.2、7.2、8.2、9.2,发酵 12 h 时测定酶活性。由图 2 可见,pH 值 5.2 时酶活性最高,为 0.514 U/mL,这可能是因为发酵后期大量产氨,导致 pH 值升高(图 1),初始 pH 值低可以延缓 pH 值升高,而较低的 pH 值有利于增加酶活性。

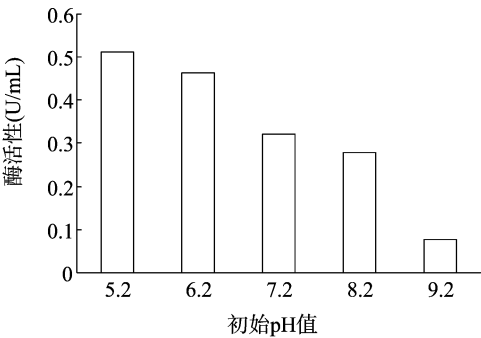


图2 发酵初始pH值对蛋白质谷氨酰胺酶活性的影响

2.3 发酵培养基对蛋白质谷氨酰胺酶的影响

2.3.1 碳源 试验选择速效碳源葡萄糖、蔗糖、乳糖和缓效碳源糊精、淀粉作为常规发酵培养基碳源,分别在基础培养基中添加 5% 浓度,发酵 12 h 后测定酶活性。由图 3 可见,当碳源为 5% 乳糖和 5% 蔗糖时酶活性较高,分别为 0.390 U/mL

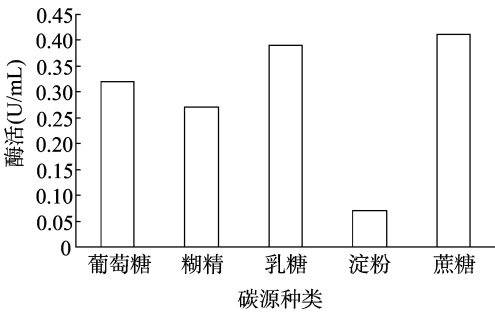


图3 碳源种类对蛋白质谷氨酰胺酶活的影响

和 0.412 U/mL,表明速效碳源有利于产酶。

2.3.2 氮源 试验选取有机氮源植物水解蛋白、多聚蛋白胨、大豆蛋白胨和无机氮源硫酸铵、氯化铵作为氮源,在基础培养基中添加 1% 浓度,发酵 12 h 后测定酶活性。由图 4 可以看出,以 1% 大豆蛋白胨和 1% 多聚蛋白胨为氮源时酶活性较高,分别为 0.460 U/mL 和 0.480 U/mL,表明有机氮源适合产酶。

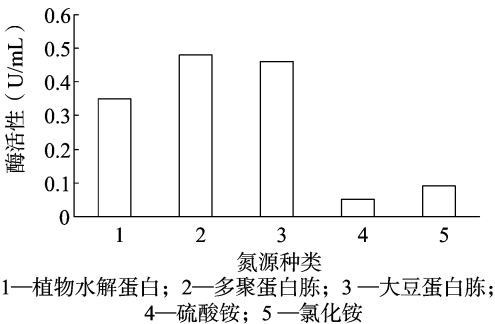


图4 氮源种类对蛋白质谷氨酰胺酶活的影响

2.3.3 表面活性剂 不同表面活性剂对产酶有很大影响。由表 1 可见,0.15% Tween 80 和 0.15% Tween 40 酶活性最高,均为 0.530 U/mL,和对照相比,酶活性增加了 26%;在试验浓度范围内,Tween 20 和曲拉通比对照酶活性低。

表 1 不同表面活性剂对蛋白质谷氨酰胺酶活性的影响

种类	浓度 (%)	酶活性 (U/mL)
Tween 80	0.20	0.312
	0.15	0.530
Tween 40	0.20	0.343
	0.15	0.530
Tween 20	0.20	0.286
	0.15	0.415
曲拉通	0.20	0.215
	0.15	0.311
对照		0.421

2.3.4 培养基正交试验 选取大豆蛋白胨和乳糖作为氮源和碳源,并添加表面活性剂 Tween 80,进行 3 因素 3 水平正交试验,进一步优化培养基配方。结果(表 2)表明,3 种因素对酶活性影响大小为:乳糖>大豆蛋白胨>Tween 80;产生蛋白质谷氨酰胺酶的 3 种培养基成分最佳组合为 $A_3B_3C_3$,即 1.2% 大豆蛋白胨、0.7% 乳糖、0.15% Tween 80。按照优化培

培养基(1 000 mL):大豆蛋白胨 12 g、乳糖 7 g、Tween 80 1.5 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.7 g、 K_2HPO_4 0.25 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,发酵 12 h,酶活为 0.661 U/mL。

表 2 不同培养基正交试验结果

序号	A:大豆蛋白胨 (%)	B:乳糖 (%)	C:Tween 80 (%)	酶活性 (U/mL)
1	1(0.8)	1(0.3)	1(0.05)	0.46
2	1	2(0.5)	2(0.10)	0.45
3	1	3(0.7)	3(0.15)	0.66
4	2(1.0)	2	3	0.52
5	2	3	1	0.52
6	2	1	2	0.47
7	3(1.2)	3	2	0.68
8	3	1	3	0.45
9	3	2	1	0.64
K_1	1.57	1.38	1.62	
K_2	1.51	1.61	1.60	
K_3	1.77	1.86	1.63	
k_1	0.523	0.460	0.540	
k_2	0.503	0.537	0.533	
k_3	0.590	0.620	0.543	
极差	0.087	0.160	0.010	
因素主次	B>A>C			
最优方案	$A_3B_3C_3$			

3 小结与讨论

脱氨基是提高植物蛋白食品功能最有价值的方法之一。蛋白质谷氨酰胺残基侧链酰胺基中的氨基脱掉后生成羧基,导致蛋白质水合程度和负电荷增加,因此,蛋白质的溶解性增加^[9]。Matsudomi 等研究表明,即使少量的脱氨也会大幅度提高蛋白质的功能特性^[10]。化学脱氨基法虽然可以提高植物蛋白(如小麦蛋白)的乳化性和起泡性,但是,该方法会引起蛋白质肽链断裂,导致蛋白质水解而失去蛋白质的功能。与化学脱氨法相比,酶法脱氨更为理想,底物专一,如蛋白质谷氨酰胺酶仅作用于蛋白质中的谷氨酰胺,反应条件温和,而且安全性高。

对蛋白质脱氨的酶目前报道比较多的主要有谷氨酰胺转氨酶、蛋白酶、肽谷氨酰胺酶和蛋白质谷氨酰胺酶。蛋白质谷氨酰胺酶已经应用于 α -玉米蛋白、小麦蛋白和大豆蛋白^[2-3,11],还有乳清蛋白、脱脂牛奶^[12-13]。微生物蛋白质谷氨酰胺酶由 Yamaguchi 等 2000 年首次从 *Chryseobacterium proteolyticum* 发酵产生,并对土壤中分离的菌种进行了鉴定,对其发酵进行了初步研究,其发酵上清液以 Cbz-Gln-Gly 为底物的谷氨酰胺酶活性最高,为 0.258 U/mL,且最高酶活性在发酵 24 h 出现^[7]。本试验通过单因素试验和正交试验,得到最优培养配方(1 000 mL)为大豆蛋白胨 12 g、乳糖 7 g、

Tween 80 1.5 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.7 g、 K_2HPO_4 0.25 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,经过该优化培养基发酵,最高酶活性可达 0.661 U/mL,远远高于 Yamaguchi 等的试验结果,且最高酶活性在发酵 12 h 后即可出现。

参考文献:

[1] 李向红,周小玲,刘永乐,等. 蛋白质谷氨酰胺酶对米谷蛋白功能性质的影响[J]. 食品科学,2010,31(17):192-196.

[2] Yong Y H, Yamaguchi S, Gu Y S, et al. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(23):7094-7100.

[3] Yong Y H, Yamaguchi S, Matsumura Y. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(16):6034-6040.

[4] Motoki M, Seguro K, Nio N, et al. Glutamine-specific deamidation of a SI-casein by transglutaminase[J]. Agricultural and Biological Chemistry,1986,50:3025-3030.

[5] Kato A, Tanaka A, Lee Y, et al. Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1987,35(2):285-288.

[6] Kikuchi M, Hayashida H, Nakano E, et al. Peptidoglutaminase enzymes for selective deamidation of gamma-amide of peptide-bound glutamine[J]. Biochemistry,1971,10(7):1222-1229.

[7] Yamaguchi S, Yokoe M. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8):3337-3343.

[8] 卢玉棋. 水杨酸-次氯酸盐分光光度法测定水中氨氮[J]. 环境与健康杂志,1999,16(5):296-298.

[9] Schwenke K D. Enzyme and chemical modification of proteins[J]. Food Science and Echnology,1997,23(11):393-424.

[10] Matsudomi N, Sasaki T, Kato A, et al. Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein[J]. Agricultural and Biological Chemistry,1985,49(5):1251-1256.

[11] Suppavorasatit I, De Mejia E G, Cadwallader K R. Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(21):11621-11628.

[12] Gu Y S, Matsumura Y, Yamaguchi S, et al. Action of protein-glutaminase on alpha-lactalbumin in the native and molten globule states[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2001,49(12):5999-6005.

[13] Miwa N, Yokoyama K, Wakabayashi H, et al. Effect of deamidation by protein-glutaminase on physicochemical and functional properties of skim milk[J]. International Dairy Journal,2010,20(6):393-399.