

红曲霉白色突变株固态发酵生产酸性蛋白酶的研究

杨薇, 赵树欣, 张放

(天津科技大学生物工程学院, 天津工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 红曲霉白色突变株因不产色素可扩大红曲霉的使用范围, 对经紫外诱变后的红曲霉白色突变株(WI)进行固体发酵并对其所产生的酸性蛋白酶的性质进行初步研究。研究表明此酸性蛋白酶最适反应温度为 50 °C, 在 30~40 °C 下相对稳定; 最适反应 pH 为 3.0, 在 pH 3.0~5.0 之间相对稳定; Mn^{2+} 、 Ag^+ 、 K^+ 对酸性蛋白酶有激活作用, Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 对酸性蛋白酶有一定抑制作用。通过 Sephadex-G75 凝胶过滤层析及 SDS-PAGE 蛋白质电泳分析此蛋白酶的相对分子量范围大约在 55000~60000 之间。

关键词: 红曲霉; 突变株; 固态发酵; 蛋白酶

中图分类号: TQ925 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0462-04

Production and Characterization of Acid Protease via Solid-State

Fermentation by *M. purpureus* Mutant W1

YANG Wei, ZHAO Shu-xin, ZHANG Fang

(Tianjin Key Lab of Industry Microorganism of College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The characteristics of acid protease produced by *M. purpureus* mutant W1 were preliminarily studied. The optimum reaction temperature and pH value of this acid protease were found to be 50 °C and 3.0, respectively. And the enzyme showed high stability within the temperature ranges of 30~40 °C and with the pH value of 3.0~5.0. It was also found that the activity of the protease could be inhibited by Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , and Cu^{2+} , and activated by Mn^{2+} , Ag^+ , and K^+ . The molecular weight of this protease was about 55000~60000 Da by Sephadex-G75 gel layer analysis and SDS-PAGE protein electrophoresis analysis.

Key words: *M. purpureus*; mutant; solid state fermentation; protease

红曲起源于我国, 主要用于红曲酿酒、发酵食品、色素生产等方面。红曲霉在代谢中可产生蛋白酶、淀粉酶等多种酶类, 并且有不少红曲霉菌株可以产生较高活性的蛋白酶, 可用于腌渍鱼、肉、豆腐等高蛋白食品, 使食品色香味俱佳^[1,2]。而红曲霉代谢中产生的酸性蛋白酶不仅可以用于食品, 还在饲料、纺织、皮革生产等其它领域有着广泛的应用, 因此对红曲霉产酸性蛋白酶特性的研究具有一定的现实意义, 然而大部分红曲霉在培养过程中都会产生色素, 这就大大限制了红曲霉的使用范围。此外, 目前国内外对采用固态发酵的方法生产红曲蛋白酶的报道还很少。因此本文对一株紫色红曲霉经紫外诱变后筛选得到的白色突变株 W1 采用固态发酵的方式产生的酸性蛋白酶的性质进行了初步研究, 为红曲霉的进一步应用提供一些依据。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2008-01-29

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌种

紫色红曲霉白色突变株 (*M. purpureus* mutant W1), 由天津科技大学酿造实验室通过对紫色红曲霉进行紫外诱变所得。

1.1.2 试剂

碳酸钠、三氯乙酸、氢氧化钠、盐酸、乳酸(80%~90%)、乳酸钠(70%)、干酪素、L-酪氨酸、所用试剂均为国产, 分析纯。Sephadex G-75, 进口分装。麦芽汁, 17°Brix, 市购麦芽, 实验室制备。豆粕, 购自天津开发区正大集团。麸皮, 由天津市宁河酒厂提供。

1.1.3 主要仪器

生化培养箱, 广东省医疗器械厂产; 721 型光栅分光光度计, 上海光谱仪器有限公司产; 水浴锅, 天津市中环实验电炉有限公司产。

1.1.4 培养基

斜面培养基: 麦芽汁琼脂培养基, 取 10 °Brix 的麦芽汁添加 2% 琼脂。

固态发酵培养基： $m_{\text{豆粕}}:m_{\text{麸皮}}=1:2.5$ ；加入 pH 5.0 的水（乳酸调解 pH）使培养基水分含量达到 50%，121 °C 蒸料 30 min。

1.1.5 主要溶液

洗脱液：0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5。

1.2 实验方法

1.2.1 福林法测定蛋白酶活力^[3]

1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶)，在 40 °C 和 pH 3.0 值条件下，1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位，以 U/g（或 U/mL）表示。

1.2.2 固态发酵

发酵条件：装料量 30 g/250 mL 三角瓶，培养温度采用变温培养，32 °C 堆积培养 48 h，进行翻料，将温度调至 28 °C 继续培养至 120 h。

1.2.3 酶的提取^[4]

每 10 g 发酵原料，加入 100 mL pH 3.0 乳酸缓冲溶液，40 °C 120 r/min 浸提 1 h，用纱布过滤，收集滤液，测定酶活。在滤液中加入固体硫酸铵边加边搅拌，硫酸铵加完后继续搅拌 1 h，直至硫酸铵全部溶解后，过夜，全部过程在 4 °C 下进行，收集 400 g/L 硫酸铵饱和度沉淀，在 4 °C 10000 r/min 离心 20 min，收集沉淀，将收集的沉淀以最小体积的缓冲溶液悬浮，4 °C 下分别用预冷蒸馏水透析过夜，其间每 6 h 换液 1 次，透析完毕，测定酶活。将透析液进行冷冻干燥，制成酶粉，测定其酸性蛋白酶的酶活力。

1.2.4 酶性质的测定^[5,6]

将一定量冷冻干燥后的酶粉溶于 pH 3.0 乳酸缓冲溶液中，制成酶溶液用于性质测定。

1.2.4.1 酶最适反应温度

取 1 mL 酸性蛋白酶液，在不同温度(30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C) 下反应 10 min，用福林法测定其水解酪素的能力（即酶活）。

1.2.4.2 酶的热稳定性

分别取酸性蛋白酶液 20 mL 于 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 下恒温水浴中保温，每隔 30 min 吸取酶液各 1 mL，立即于冰水中冷却，然后采用福林法测定酶活力。

1.2.4.3 酶最适反应 pH

分别取 0.05 g 酶粉，在 10 mL pH 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的缓冲液中溶解，40 °C 下保温 10 min，测定酶活力。

1.2.4.4 酶的 pH 稳定性

确定该酶的 pH 稳定性范围时，分别取 0.05 g 酶

粉分别置于 10 mL pH 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的缓冲液中溶解，4 °C 下放置 24 h。用 pH 3.0 的乳酸-乳酸钠缓冲液稀释一定的倍数，40 °C 下保温 10 min，测定剩余酶活力。

1.2.4.5 某些金属离子、 NH_4^+ 对酶活性的影响

在各组酸性蛋白酶液中分别添加金属离子盐类母液（添加种类见表 2），使其终浓度为 0.01 mol/L，室温下静置 30 min，测定酶活。设定未添加金属离子酶液的酶活力为 100%，测定各组的相对酶活力。

1.2.5 凝胶过滤层析确定酶的相对分子量范围^[4]

采用凝胶过滤层析柱 Sephadex-75，缓冲液为 0.05 M Tris-HCl pH 7.5，分别取牛血清蛋白（相对分子量 68600）、卵血清蛋白（相对分子量 40000）、溶菌酶（相对分子量 14000）标准品各 10 mg，用去离子水定容到 5 mL，分别进行凝胶过滤层析，上样量为 1 mL，流速为 0.4 mL/min，以 4 mL 为一管分别收集各组分，采用分光光度计，在 280 nm 下测定 OD 值，绘制标准曲线。

取 1 mL 透析液，进行凝胶过滤层析，上样量为 1 mL，流速为 0.4 mL/min，以 4 mL 为一管分别收集各组分，采用分光光度计测定 OD 值，绘制曲线。

收集峰值的组分，进行蛋白酶活力的测定。

1.2.6 透析液的中各种组分的相对分子量范围的确定 SDS-PAGE 电泳。

2 实验结果

2.1 酸性蛋白酶的提取

紫色红曲霉突变株 W1 在豆粕麸皮培养基中按照方法 1.2.2 培养至 120 h，收集发酵原料，按照方法 1.2.3 中的方法对发酵原料中的酸性蛋白酶进行提取，并测定提取过程中酸性蛋白酶的酶活力。

表 1 酸性蛋白酶纯化过程中蛋白酶活力

Table 1 The activity of acid protease in the process of purification

试样	蛋白酶活力 (U/mL, U/g)	总活力 (U)	损失率 (%)
滤液(1000 mL)	91.7	91700	0
透析液(150 mL)	480	72000	21.5
酶粉(6.88 g)	9371	64472	29.7

2.2 酸性蛋白酶性质的测定

2.2.1 酶最适反应温度

从图 1 可看出，该蛋白酶的最适反应温度为 50 °C，此时酶催化反应活性最高。30 °C 以下时酶活

性受低温抑制,不能充分发挥酶的活性;60℃及以上温度时,由于温度过高使酶变性失活造成酶活性下降。

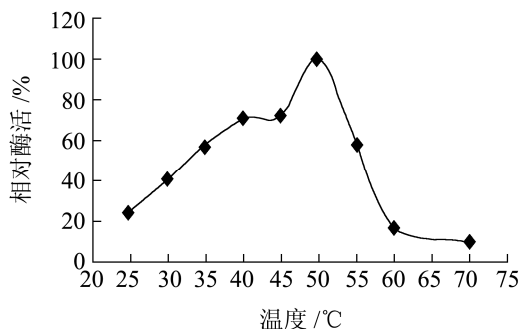


图1 酶最适反应温度

Fig.1 The optimum reaction temperature of protease

2.2.2 酶的热稳定性

酶的热稳定性试验结果如图2所示,该蛋白酶在30~40℃下相对稳定。30℃、40℃处理150min后,相对酶活力保持在50%左右。50℃处理60min后,酶迅速失活,只保持了22%的活力。60℃处理30min后,只保持了20.6%的活力。

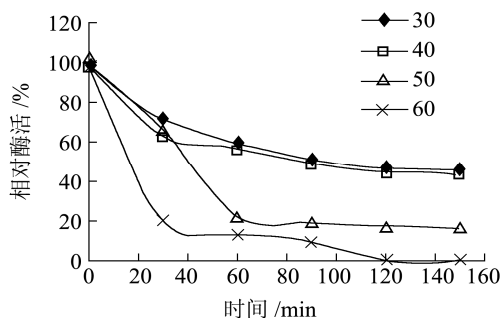


图2 酶的热稳定性

Fig.2 The heat stability of protease

2.2.3 酶最适反应 pH

如图3所示,酸性蛋白酶的酶活力在pH 3.0时达到最高,为100%。因此,酶最适反应pH为3.0。

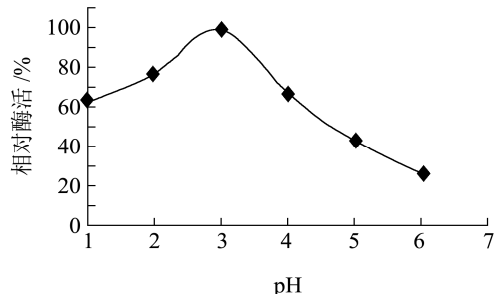


图3 酶的最适反应 pH

Fig.3 The optimum reaction pH of protease

2.2.4 酶的 pH 稳定性

酶的 pH 稳定性试验结果见图4,该酸性蛋白酶在 pH 3~5 之间相对稳定。

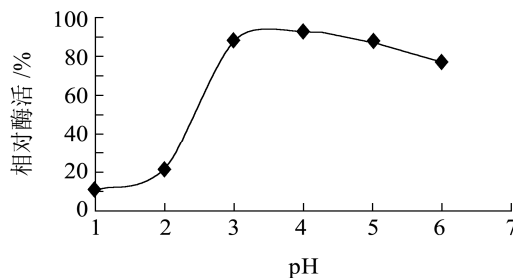


图4 酶的 pH 稳定性

Fig.4 The pH stability of protease

2.2.5 某些金属离子、NH₄⁺对酶活性的影响

某些金属离子、NH₄⁺对酶活性影响见表2, Mn²⁺、Ag⁺、K⁺的添加使酸性蛋白酶的相对酶活力有明显增加,所以 Mn²⁺、Ag⁺、K⁺对酸性蛋白酶有激活作用, Fe³⁺、Al³⁺、Mg²⁺、Cu²⁺添加使酶活有一定程度降低,相对酶活力分别降低至 57.2%、78.8%、57.2%和 71.2%,因此 Fe³⁺、Al³⁺、Mg²⁺、Cu²⁺对酸性蛋白酶有一定抑制作用。Ca²⁺、NH₄⁺对酶活没有十分明显影响。

表2 金属离子对酸性蛋白酶的影响

金属离子	相对酶活 / %	金属离子	相对酶活 / %
FeSO ₄	57.2	MnSO ₄	165.4
CaCl ₂	84.6	MgSO ₄	57.7
NH ₄ Cl	96.2	CuSO ₄	71.2
Al ₂ (SO ₄) ₃	78.8	AgNO ₃	128.8
KCl	137.6		

2.3 酸性蛋白酶的相对分子量

采用凝胶过滤层析确定该酸性蛋白酶的相对分子量。用 pH 7.5, 0.05 M Tris-HCl 缓冲液对标准品及备用样品进行洗脱,流速为 0.4 mL/min,每管收集 4 mL, 280 nm 下,测定 OD 值,绘制工作曲线。

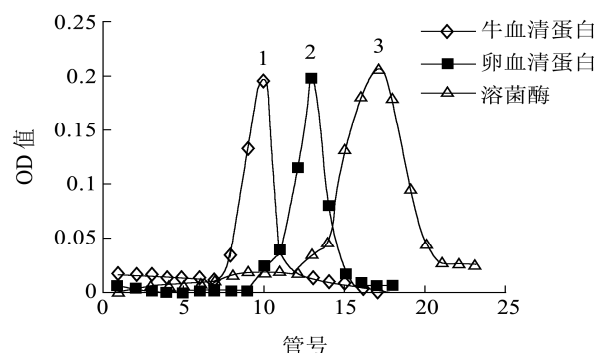


图5 标准品的相对分子量

Fig.5 Verifying molecular weight of standard product by Sephadex-75

从图5可以看出,峰1为牛血清蛋白,相对分子

量 60680; 峰 2 为卵血清蛋白, 相对分子量 40000; 峰 3 为溶菌酶, 相对分子量 14000。

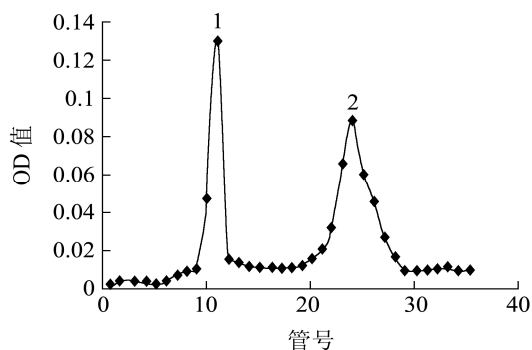


图 6 透析液的相对分子量

Fig.6 Analyzing molecular weight of dialysis liquid by Sephadex-75

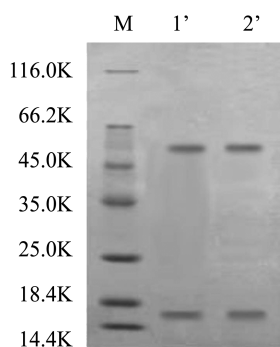


图 7 SDS-PAGE 电泳确定透析液中的各种组分的相对分子量

Fig.7 Analyzing molecular weight of dialysis liquid by SDS-PAGE

注: M 为标品, 1', 2' 为平行样

Note: M is maker, 1', 2' are Appearances of equal rank

由图 6 可以看出, 酸性蛋白酶的提取液中主要包含 2 种组分, 组分 1 的相对分子量在 60000 左右, 组分 2 的相对分子量为 14000 以下, 检测酸性蛋白酶的活力, 结果发现, 组分 1 具有一定的蛋白酶活性, 即为酸性蛋白酶的活性物质; 组分 2 无蛋白酶活性。由

此可知, 酸性蛋白酶的相对分子量约 60000 左右。

2.4 酸性蛋白酶提取液中各组分的相对分子量范围

用 SDS-PAGE 电泳确定酸性蛋白酶提取液中各种组分的相对分子量范围。通过图 7 可以看出, 第一条带比较清晰, 其相对分子量大约为 55000~60000 之间, 与凝胶过滤层析分析得到的组分 1 的相对分子量范围基本一致; 第二条带比较模糊, 相对分子量范围在 18000 以下, 与凝胶层析分析得到的组分 2 的相对分子量范围相符。

3 结论

由紫色红曲霉经过紫外诱变得到的白色突变株 W1 经固态发酵产生酸性蛋白酶, 经硫酸铵沉淀、透析及冷冻干燥得到酶粉, 其蛋白酶活力为 9371 U/g。该酸性蛋白酶的最适反应温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 3.0; 该蛋白酶在 30~40 °C, pH 3~5 之间相对稳定。与出发菌株相比, 该蛋白酶具有更强的耐酸性。通过凝胶过滤层析及 SDS-PAGE 蛋白质电泳确定此酸性蛋白酶的相对分子量分布范围在 55000~60000 左右。

参考文献

[1] 刘永华.红曲研究的现状于进展[J].食品与发酵工业,1997,(5):69-72

[2] 路英华.蛋白酶的研究进展[J].生命科学信息,1991,8(2):8

[3] 白坚.制革工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,2000

[4] M. Kuba, C. Tana, S. Tawata, M. Yasuda. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase[J]. Process Biochemistry 40 (2005) 2191-2196

[5] 邵伟,王栋,唐明,等.红曲霉产蛋白酶特性研究[J].中国酿造,2006,(5):34-37

[6] 邓靖,林亲录,赵谋明,等.米曲霉 M₃ 中性蛋白酶的提取及酶学特性研究[J].中国食品添加剂,2005,(2):21-23

(上接第 461 页)

参考文献

[1] 霍贵成,刘宁,王利华,等.功能性食品与健康[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2002

[2] 朱滨华,马兴胜,关中义.酸奶变质机理及保鲜研究初探[J].黑龙江商学院学报(自然科学版),1997,13(1):11-16

[3] 张国农,李运飞,等.搅拌型酸奶稳定性的研究[J].食品科学,2005,21(1):50-53

[4] 周尽花,吴宇雄,周春山,等.柚皮果胶的提取方法比较及其

粘流性能研究[J].食品科学,27(5): 167-171

[5] F.Kar,N.Arslan. Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, L-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solution. Carbohydrate polymers, 1999,40:285-291

[6] 刘魁英.食品研究与数据分析[M].北京:中国工业出版社,1998,41-43

[7] 郭瑞,丁恩勇.黄原胶的结构、性能与应用[J].日用化学工业,2006,36(1):42-45