

青霉 P-1007 酸性蛋白酶酶学性质及其 固体发酵条件的初步研究

戚淑威,黄遵锡

(云南师范大学生命科学学院,云南 昆明 650092)

摘要: 青霉 P-1007 产胞外酸性蛋白酶,其酶活可达 1500 u/g。该酶的最适温度为 50 ℃,最适 pH 值为 5.5 酶的 pH 稳定性和耐温性较好,在 pH5.5,50 ℃条件下保温 8 h,其相对酶活仍在 83 % 以上 在 pH 值为 5.5,60 ℃条件下水浴 2 h 后,相对酶活为 60 %。不同金属盐对该酶酶活及不同氮源、碳源、温度、pH、含水量以及发酵时间对菌株产酶的影响试验结果表明:MnCl₂,CuSO₄ 均对该酶有激活作用,其他金属盐类对该酶有不同程度的抑制作用 添加黄豆粉(1 %)和葡萄糖(1 %)可使菌株产酶酶活分别提高 71 %和 31 %;培养温度为 40 ℃以及培养基起始 pH 为 7.0 时产酶最高,含水量和发酵时间对产酶也有不同程度的影响。

关键词: 青霉; 酸性蛋白酶; 发酵条件; 酶活力

中图分类号: TS261.1 ;TQ920 ;TQ925 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2006)02-0025-04

Preliminary Study on the Zymological Properties of Acid Protease Produced by Penicillium P-1007 and Its Solid Fermentation Conditions

QI Shu-wei and HUANG Zun-xi

(Life Science College of Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650092, China)

Abstract: The extra-cellular acid protease was produced by penicillium P-1007. Its enzyme activity was about 1500 u/g, its optimal temperature was at 50 ℃ with its best pH value as 5.5, and its pH stability and temperature resistance was good (its relative enzyme activities were above 83 % and 60 % respectively under the conditions of pH5.5, 50 ℃ and 8 h heat preservation and pH5.5, 60 ℃ and 2 h water bathing). Furthermore, the effects of different metallic salts, nitrogen sources, carbon sources, temperature, pH, water content and fermentation time on the enzyme activity and the yield of the acid protease were studied and the results were as follows: both MnCl₂ and CuSO₄ could activate the protease while other metallic salts inhibited the protease on different levels; addition of 1 % bean flour and 1 % glucose could increase enzyme yield and enzyme activity by 71 % and 31 % respectively; the maximal yield of enzyme was achieved under the conditions of temperature at 40 ℃ and pH as 7.0; water content and fermentation time would also influence enzyme yield on different levels. (Tran. by YUE Yang)

Key words: penicillium; acid protease; fermentation conditions; enzyme activity

蛋白酶是最重要的工业酶制剂,能催化蛋白质和多肽键的水解。其中酸性蛋白酶是一种适合于在酸性环境下水解蛋白质的酶类,它主要用于毛皮软化和脱毛处理,也可用于羊毛低温染色和啤酒澄清工艺,以及消炎止咳,化痰和助消化^[1]。在啤酒澄清过程中需要添加蛋白酶来降解啤酒中的悬浮物,以提高啤酒的澄清度,另外还可以提高底物的利用率,降低成本,但其所需的温度

及 pH 值分别为 50~60 ℃和 4.0~5.5,虽然目前生产酸性蛋白酶的菌株较多,如黑曲霉、宇佐美曲霉、米曲霉等^[2],但这些菌株产生的酸性蛋白酶只能耐热至 50 ℃,且当 pH 升至 5.0 以上时酶活会明显降低,故现有的酸性蛋白酶大都不能较好地应用到啤酒生产当中。因此本研究旨在筛选到一株产酸性蛋白酶,其酶的最适作用温度在 50~60 ℃之间、pH 值在 4.0~5.5 之间,以应用于啤酒澄清

基金项目:云南省科技攻关项目(2001GG23)资助。

收稿日期:2005-10-19

作者简介:戚淑威(1978-),女,辽宁省辽阳市人,硕士研究生,专业方向:微生物与发酵工程。

工艺当中。

笔者通过对大量的霉菌进行筛选,得到一株产酸性蛋白酶的青霉,并对其粗酶的酶学性质进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株

本实验室筛选得到的青霉 P-1007。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 分离及斜面培养基

分离培养基为在查氏培养基中加 1% 的酪蛋白,斜面培养基为 PDA 培养基和查氏培养基。

1.1.2.2 种子发酵培养基 (%)^[3]

麸皮 5.36 g, KH_2PO_4 15 g, CaCl_2 0.005 g, 水 100 mL, pH4.0。

1.1.2.3 基础固体发酵培养基^[4]

麸皮 15 g, 水 35 mL。

1.1.3 酶活力的测定

1.1.3.1 粗酶液的制备

取上述培养好的固体发酵曲于 40℃ 烘干,称取 1 g 加入 50 mL 的蒸馏水后充分捣碎,室温下抽提 2 h,用 4 层纱布过滤,滤液即为粗酶液。

1.1.3.2 酶活力测定

采用常规的 Folin-酚试剂显色法^[5]进行,即在 pH 5.5, 60℃ 条件下 1 min 水解干酪素产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个蛋白酶活力单位,以 u/g 表示。

1.1.4 所用仪器

恒温箱、水浴锅、灭菌锅、722 型分光光度计、E-BA12/12R 离心机、精密 pH 计、摇床。

2 结果与分析

2.1 酶学性质

2.1.1 粗酶液的制备

取 1 g 发酵好的且 40℃ 烘干的麸曲,加入 50 mL 的蒸馏水后充分捣碎,室温下抽提 2 h,用 4 层纱布过滤,滤液即为粗酶液,按文献[4]的方法测定,其酶活力大约为 1500 u/g 干基,取上述粗酶液经高速冷冻离心 (4000 r/min, 10 min) 后供以下实验用。

2.1.2 酶的最适 pH 值^[6]

配制不同 pH 值的磷酸缓冲液 (0.025 M), 即 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 然后用这些缓冲液将酶液进行适当的稀释,再用这些缓冲液配成不同 pH 的 1% 酪蛋白底物,按文献[4]在 60℃ 条件下测定酶活,结果见图 1。图 1 表明,该酶的最适作用 pH 为 5.5。

2.1.3 酶的最适温度的测定^[6]

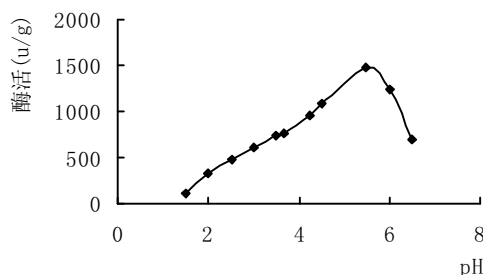


图 1 酸性蛋白酶的最适 pH 值

在 pH5.5 条件下,分别测定温度为 10℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃ 和 90℃ 下的酶活,结果见图 2。图 2 表明,该酶的最适作用温度为 50℃。

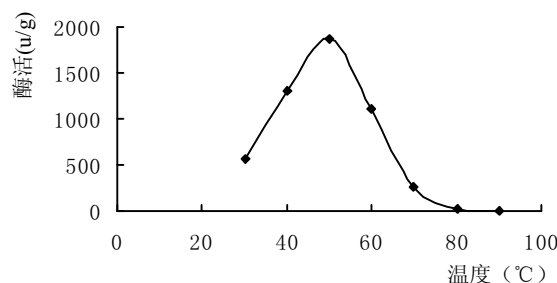


图 2 酸性蛋白酶的最适温度

2.1.4 酶的 pH 稳定性的测定

将该菌株所产的粗酶液放在 pH 5.5, 50℃ 条件下保温不同时间,以未保温的酶液为空白对照,于 50℃ 水浴中测定酶活,所得酶活分别除以对照的酶活,得到的商即为不同时间下对应的相对酶活,结果见图 3。图 3 表明,该酶在 pH 5.5, 50℃ 条件下保温 8 h 后,相对酶活可达 83% 以上。

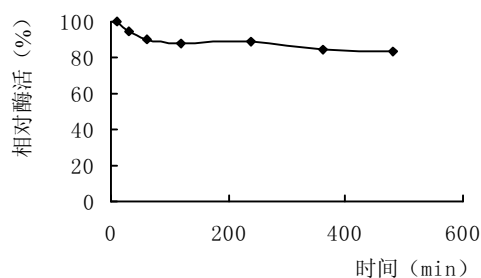


图 3 pH 稳定性

2.1.5 酶的耐温性的测定^[5]

在 pH 5.5, 60℃ 条件下,不同时间取出酶液进行酶活力的测定,并以未保温的酶液为空白对照,50℃ 下测定酶活,结果见图 4。图 4 表明,该酶在 60℃ 条件下保温 2 h 后,酶活仍可达 60% 以上。

2.1.6 某些金属盐类对酶活力的影响^[1]

先将选好的 10 种金属盐类配成 0.1 mol/L 的溶液,各取 0.263 mL 加入到 5 mL 酶液中,室温下处理 30 min 后测定相对酶活,结果见表 1。表 1 表明, MnCl_2 对该酶

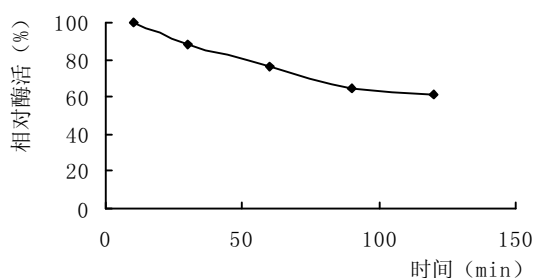


图4 酸性蛋白酶的耐温性

有明显的激活作用,可以使原始酶活提高 2 倍以上, CuSO_4 对该酶有轻度的激活作用,而其他金属盐类如 KCl , NaCl , FeSO_4 等对该酶有不同程度的抑制作用。

表1 10 种金属盐类对酶活力的影响

金属盐类 (5×10^{-3} mol/L)	酶活 (u/g)	相对酶活 (%)
MnCl_2	3187	207
CuSO_4	1618	105
KCl	1212	79
NaCl	1372	89
Li_2SO_4	894	58
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1370	89
CaCl_2	863	56
MgSO_4	1047	68
ZnSO_4	1202	78
FeSO_4	1231	80
对照	1540	100

注: 空白对照为不加任何金属盐类的酶液。

2.2 固体发酵条件的研究

2.2.1 不同氮源对菌株产酶的影响^[2]

在基础固体发酵培养基中添加不同的氮源,考察其对酶活产生的影响。酶活测定结果见表 2。从表 2 可知,黄豆粉 (1 %) 可使出发菌株的酶活提高 71 %。

表2 不同氮源对菌株产酶的影响

氮源 (1%)	相对酶活 (%)	氮源 (1%)	相对酶活 (%)
豆饼粉	81	牛肉膏	77
蛋白胨	87	酵母膏	113
鱼粉	69	对照	100
黄豆粉	171		

注: 对照为基础固体发酵培养基发酵得到的酶液

2.2.2 不同碳源对菌株产酶的影响

在基础固体发酵培养基中添加不同的碳源,考察其对酶活产生的影响。酶活测定结果见表 3。从表 3 可知,葡萄糖 (1 %) 可使出发菌株的酶活提高 31 % 左右。

表3 不同碳源对菌株产酶的影响

碳源 (1%)	相对酶活 (%)	碳源 (1%)	相对酶活 (%)
葡萄糖	131	玉米粉	84
淀粉	124	对照	100
蔗糖	92		

注: 对照为基础固体发酵培养基发酵得到的酶液。

2.2.3 培养温度对产酶的影响

在固体发酵培养基中接入 1 mL 的种子发酵液,分

别培养于 30 ℃, 40 ℃, 50 ℃, 60 ℃ 和 70 ℃ 恒温箱中,考察温度对产酶的影响,结果见表 4。从表 4 中可以看出,培养温度为 40 ℃ 时产酶最高。

表4 发酵温度对产酶的影响

温度 (°C)	酶活 (u/g)	温度 (°C)	酶活 (u/g)
30	810	60	686
40	1670	70	256
50	1014		

2.2.4 培养基起始 pH 对产酶的影响^[7]

添加至基础固体发酵培养基中的水分先用盐酸调不同 pH 值,再添加至发酵培养基中,混匀,接入 1 mL 的种子发酵培养基,40 ℃ 培养 2 d,考察不同的起始 pH 对产酶的影响,结果见表 5。从表 5 中可以看出,培养基起始 pH 为 7.0 时,即接近于中性时产酶最高。

表5 培养基起始 pH 对产酶的影响

pH	相对酶活 (%)	pH	相对酶活 (%)
2.0	59	6.0	49
3.0	73	7.0	128
4.0	95	8.0	126
5.0	76	对照	100

注: 对照为添加蒸馏水后经发酵得到的酶液。

2.2.5 含水量对产酶的影响

在 15 g 麸皮中分别加 5 mL, 15 mL, 25 mL, 35 mL 和 45 mL 的蒸馏水,混匀,接入 1 mL 的种子发酵液进行发酵,发酵结果见表 6。从表 6 中可以看出,最佳含水量为 70 %。

表6 含水量对产酶的影响

水分 (mL)	酶活 (u/g)	水分 (mL)	酶活 (u/g)
5	396	35	1594
15	637	45	1355
25	1023		

2.2.6 发酵时间对产酶的影响

在固体发酵培养中接入 1 mL 的种子发酵液,在温度为 40 ℃,不同发酵时间段取出一定量的麸曲进行酶活力的测定,结果见表 7。从表 7 中可以看出,当发酵时间为 2 d 时产酶量最大。

表7 发酵时间对产酶的影响

发酵时间 (d)	酶活 (u/g)	发酵时间 (d)	酶活 (u/g)
1	789	5	980
2	1498	6	871
3	1320	7	665
4	1010		

3 讨论

由实验结果可知,该菌株所产酶的最适 pH 值和最适温度分别为 5.5 和 50 ℃,初步证明该酶可应用于啤酒

的澄清工艺。又因为该酶在 pH 为 5.5 的条件下稳定性较好,即在 pH 5.5,50℃条件下保温 8 h 后其相对酶活仍在 83 %以上。且该酶的耐热性也较好,即在 pH 5.5,60℃条件下保温 2 h 后酶活仍在 60 %以上,由此进一步证明该酶可应用于啤酒澄清工艺。另外,在低浓度金属盐(5×10⁻³ mol/L)条件下,MnCl₂ 对该酶有明显的激活作用,可使酶活提高 2 倍以上,CuSO₄ 对该酶有轻度的激活作用,其他金属盐类则对酶有不同程度的抑制作用。

在研究不同氮源、碳源、温度、pH、含水量以及发酵时间对菌株产酶的影响中,添加黄豆粉(1%)和葡萄糖(1 %)可使菌株产酶酶活分别提高 71 %和 31 %。培养温度为 40℃以及培养基起始 pH 为 7.0 时产酶最高,含水量和发酵时间对产酶也有不同程度的影响。可以看出,氮源、温度、含水量以及发酵时间 4 种因子对产酶的影响较大,因此本研究的下一步工作就是要通过正交实验得到该菌产酶的最佳发酵条件,以期待该酶酶活的大

幅度提高。

参考文献：

[1] 唐宝英,曹建民.酸性蛋白酶高产菌株选育[J].食品与发酵工业,1998,(3) :18-21.

[2] 胡稳奇,等.米曲霉(Aspergillus oryzae) A-9005 酸性蛋白酶的初步研究[J].湖南师范大学自然科学版,1995,(3) :80-84.

[3] 孙俊良.酶制剂生产技术[M].北京:科学出版社,2004.

[4] Hikotaka.Hashimoto,Takashi.Iwaasa,andTamotsu.Yokotsuka. Thermostable Acid Protease Produced by Penicillium duponti K1010,a True Thermophilic Fungus Newly Isolated from Compost[J]. APPLIED MICROBIOLOGY,Dec.1972,986-992.

[5] 中山大学微生物教研室.生化技术导论[M].北京:人民教育出版社,1987.

[6] 章剑林,等.耐高温酸性蛋白酶的菌株筛选及特性研究[J].浙江农业科学,1995,(4) :171-173.

[7] 黄遵锡,慕跃林,等.酸性蛋白酶高产菌株的选育[J].云南师范大学学报,1999,(6) :43-48.



1970~2002 年日本酒税课税量

年度	清酒		合成清酒		烧酒		啤酒		威士忌类		煮酒	
	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)
1970	1601	210631	38	2395	213	10841	2981	315957	134	58715	31	2075
1974	1598	231536	22	1377	188	9816	3653	386037	201	135217	47	3189
1978	1558	269690	21	1297	233	12758	4451	690041	285	258490	64	4314
1982	1543	290546	21	1442	308	17863	4792	958071	361	411596	69	5044
1986	1410	278064	22	1751	594	42524	5049	1205622	267	335399	81	5966
1990	1422	203249	22	1444	596	61896	6490	1350254	189	193369	88	1919
1994	1243	161361	48	3522	605	75366	7086	1560363	152	144567	92	1979
1998	1093	141193	55	3858	688	136677	6096	1350877	124	50015	110	2384
2002	898	113876	67	4572	798	187414	4271	946548	93	35098	106	2246

年份	果实酒类		烈性酒		利口酒		发泡酒		杂酒		总计	
	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)	课税量 (千 kL)	课税额 (百万日元)
1970	31	1549	8	1321	23	2285	—	—	0	2	5060	605772
1974	39	2543	6	954	22	1929	—	—	0	4	5776	772573
1982	67	5386	9	2755	27	3982	0	0	3	311	7201	1696995
1986	63	5574	22	6390	78	9594	0	92	5	659	7590	1891544
1990	79	4036	42	13511	131	12102	0	△1	6	464	9066	1842243
1994	72	4181	27	9150	216	18379	26	4009	31	4451	9572	1983318
1998	158	9144	16	5032	280	27403	1053	110919	1057	111182	9676	1837766
2002	111	6127	20	3942	571	49852	2600	272756	2603	272960	9538	1622635

注：按会计年度统计。

晓摘自日本酿造协会志, 2005,(9): 601