

产羧肽酶菌株的筛选及其产酶特性的研究*

冯红霞 陆兆新** 尤 华

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要:从土壤中分离到 28 株产蛋白酶菌株, 用其粗酶液水解多肽并经氨基酸自动分析仪测定产物中游离氨基酸的含量和种类, 从中筛选到一株产羧肽酶的菌株。对该菌株的菌落和菌体形态进行观察, 确定其属于曲霉菌属。该菌株在发酵至第 84h 时, 发酵液中羧肽酶活性达到最大。此时发酵液 pH 值为 7.46, 菌体已处于衰败期, 说明该酶的合成方式为延迟合成型。

关键词:产羧肽酶菌株, 筛选, 曲霉菌属, 产酶特性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0038-04

THE SCREENING OF THE CARBOXYPEPTIDASE PRODUCING STRAIN AND ITS PROPERTIES OF ENZYME PRODUCING

FENG Hong-Xia LU Zhao-Xin YOU Hua

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: One carboxypeptidase producing strain was obtained from 28 proteinase producing strains, by analyzing the products of peptides hydrolyzed by the enzyme of the strains. According to the characteristics of the morpha and the colonies, the screened strain belongs to aspergillus genera. The activity of its carboxypeptidase reached maximum at the 84th hour after fermentation.

Key words: Carboxypeptidase producing strain, Screening, *Aspergillus genera*, Properties of enzyme producing

蛋白质在水解的过程中往往产生一些带有苦味的多肽, 即苦味肽。其苦味是由肽链中的疏水性氨基酸 (主要是羧基端疏水性氨基酸) 引起的, 影响了多肽在食品和饮料中的应用。因此寻找一种有效、廉价的脱苦方法成为目前一个重要的研究课题。羧肽酶是一种外肽酶, 可以从肽链羧基端水解多肽, 产生游离氨基酸。因此可以利用羧肽酶这一特性水解苦味肽肽链羧基端疏水性氨基酸, 使其脱苦。羧肽酶具有广泛用途, 除了食品上用于多肽的脱苦外, 还可用于多肽的氨基酸测序及游离氨基酸的制备。羧肽酶在动物、高等植物以及丝状真菌中含量都很丰富。本文对从土壤中筛选到的一株产羧肽酶菌株进行了初步鉴定并对其产酶特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

各地采集的土样; 大豆分离蛋白 (河南安阳升华植物蛋白有限责任公司); 胃蛋白酶 (华美生物工程公司); 茚三酮 (AR); 其他试剂均为分析纯; 斜面/平板培养基: 查氏培养基; 液体发酵培养基: 10g/L 豆粕粉, 5g/L 麸皮, 自然 pH 值。

* 江苏省“10.5”农业科技攻关重点项目

** 联系人

收稿日期: 2001-01-21, 修回日期: 2002-03-25

1.2 主要实验仪器

电热恒温水浴锅, 氨基酸自动分析仪, 722 分光光度计, 818 型奥立龙 pH 计。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种筛选: 取一定量的土样, 用无菌水制成一定浓度的悬浊液, 于查氏平板培养基上进行涂布。培养 4~5d, 挑取单菌落, 进一步分离、纯化, 并进行菌种鉴定。用茚三酮显色法筛选产蛋白酶菌株, 再用氨基酸自动分析仪法从中选出产羧肽酶菌株。

1.3.2 底物的制备: 在 37℃, pH = 1.5 的条件下, 大豆分离蛋白经胃蛋白酶处理 12h 后 (S/W = 1: 100, E/S = 1: 1), 5,000r/min 离心 15min, 取上清作为菌种初筛底物。

1.3.3 粗酶液的制备: 接种霉菌孢子悬液于液体培养基, 30℃ 条件下, 摇床培养一定时间, 过滤得上清, 即为粗酶液。

1.3.4 酶活测定: ④ 羧肽酶活性: 用氨基酸自动分析仪测定粗酶液作用前后游离氨基酸的变化, 能产生较多疏水性氨基酸的菌株, 即为所要的羧肽酶菌株。⑤ 蛋白酶活性: 茚三酮显色后, 用分光光度计测定其 OD 值。

2 结果与分析

表 1 胃蛋白酶水解 SPI 生成的苦味肽

二肽	三肽	四肽	五肽
Phe-Leu	Arg-Leu-Leu	Glu-Tyr-Phe-Leu	Phe-Ile-Glu-Gly-Val
Leu-Phe	Thr-Phe-Leu	Ser-Lys-Gly-Leu	
Leu-Lys			
Arg-Leu			
Gly-Leu			

2.1 多肽底物的制备

胃蛋白酶水解大豆分离蛋白 (SPI), 生成的苦味肽主要有以下类型 (表 1)。

从该表可以看出, 胃蛋白酶作用于大豆蛋白生成的苦味肽羧基端氨基酸

主要是: 亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸, 如用羧肽酶处理大豆蛋白多肽, 生成的疏水性氨基酸主要应为: 亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸等。

2.2 菌种筛选

用茚三酮显色的方法, 从各地采集到的土样中分离到 28 株产蛋白酶菌株, 分别发酵制得粗酶液, 以胃蛋白酶处理大豆分离蛋白得到的多肽为底物, 在 30℃, pH 为 3.6 的条件下反应 1h 后, 对其产物进行氨基酸分析。

某霉菌发酵液作用于多肽底物后对其进行氨基酸分析结果如图 1。

从图 1 中可以看出大豆多肽在该霉菌粗酶液的作用下, 生成大量游离的疏水性氨基酸, 其中疏水性氨基酸主要有: 蛋氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、亮氨酸 (Leu)、缬氨酸 (Val) 等, 这一结果恰好和胃蛋白酶作用生成的大豆多肽的末端氨基酸组成相符合。其中以蛋氨酸 (Met) 最多, 其次为苯丙氨酸

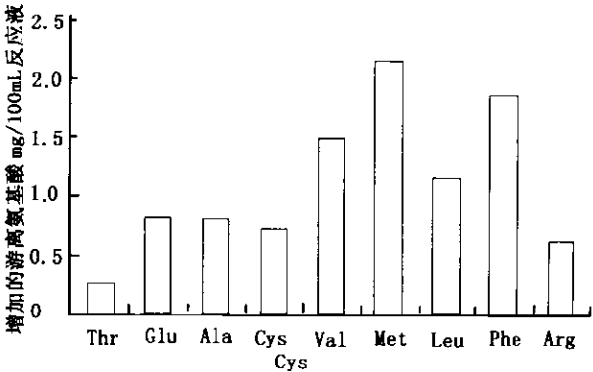


图 1 某霉菌粗酶液作用大豆多肽生成的游离氨基酸

(Phe) 和缬氨酸 (Val), 最少的为苏氨酸 (Thr)。故而证明了该霉菌能够产生羧肽酶, 水解苦味多肽羧基端的疏水性氨基酸。

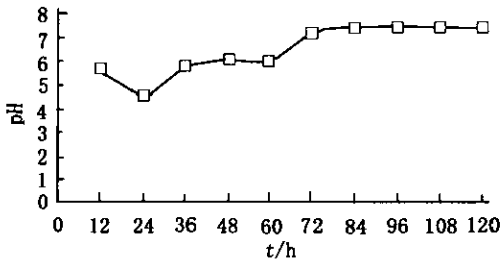


图2 培养时间与 pH 值

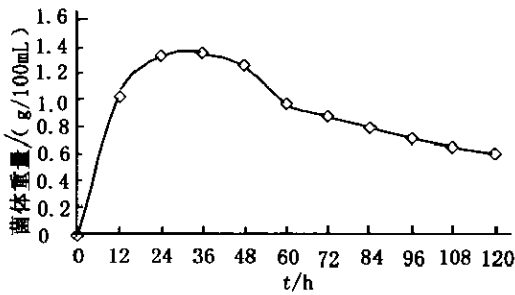


图3 培养时间与菌体生长关系

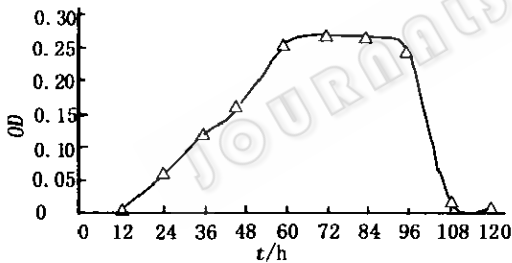


图4 培养时间与 OD 值的变化

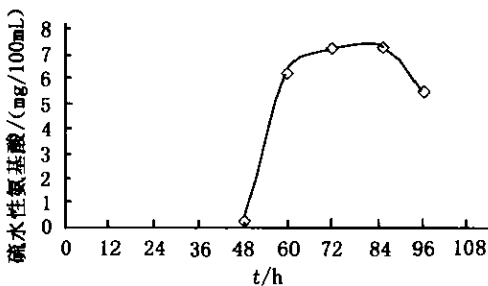


图5 培养时间与疏水性氨基酸生成量的变化

2.3 菌种的鉴定

对该菌株的菌落形态和显微镜下的菌体形态进行观察, 确认该菌株具有典型的曲霉菌属的特征: 分生孢子头。如具有气生菌丝和营养菌丝; 气生菌丝的顶囊上生有小梗, 分生孢子小梗呈放射状排列, 其上生有成串的孢子, 成熟孢子颜色为灰黑色。由此可以推断该产羧肽酶菌株属于曲霉属 (*Aspergillus* sp.)。

2.4 产羧肽酶菌株菌体生长和产酶关系

2.4.1 培养时间与 pH 值的变化: 从图 2 中可以看出, 发酵液体培养基的起始 pH 值 (自然 pH) 为 5.7, 从开始到培养 24h 时, 培养基的 pH 值是不断下降的, 24h 时的 pH 值为 4.58。说明在这段时间内, 菌体在分解培养基和自身的代谢过程中, 分泌一些酸性物质导致 pH 值降低。之后, 随着菌体生长减缓及分解, pH 值又上升, 从 36h 到 60h 之间 pH 值基本稳定在 6.0 左右, 60h 时开始 pH 值升高至 7.0 以上。

2.4.2 培养时间与菌体生长的关系: 从图 3 中可见, 菌体在 36h 时达到最大, 之后开始下降, 到 120h 时候, 菌体有少量增加。说明在 36h 之前菌体迅速生长, 以后菌体开始老化、环境也开始变得不适宜, 菌体开始分解、减少。

2.4.3 培养时间与 OD 值的变化: 从图 4 中的 OD 值的曲线看, 蛋白酶活性在 60h 时, 达到最大, 72h 到 96h 时酶活稳定基本不变, 108h 后几乎测不到酶活。说明该酶在发酵液中不能长时间稳定存在, 因此在发酵制备该酶时, 应该及时从发酵液中分离出来, 以免酶的活性丧失。

2.4.4 培养时间与疏水性氨基酸的生成量的变化: 根据 OD 值曲线变化趋势, 选择发

酵时间分别为 48h、60h、72h、84h、96h 时的粗酶液用于氨基酸分析。从氨基酸分析的结果来看 (见图 5), 48h 以前, 羧肽酶生成量很少, 从 48h 开始, 羧肽酶大量生成, 羧肽酶的酶活在 84h 时达到最大。以此为根据, 确定从发酵液中分离该酶的最佳时间应

在第 84h 时。因为从 60h 到 84h 之间酶活增加不多, 如果从节省时间, 缩短发酵周期的角度出发, 可选择在 60h 到 72h 之间结束发酵。

3 讨论

蛋白质水解后形成的多肽常常具有苦味的原因, 从肽链组成的化学本质上来讲, 是由于肽链的末端带有疏水性氨基酸, 只要把疏水性氨基酸从肽链末端水解掉, 就可以减轻或祛除苦味肽的苦味, 改善其适口性。本实验中所获得的羧肽酶具有该特性, 因此把它加入蛋白质水解液中, 能够减轻蛋白质水解后的苦味, 起到改善食品风味的作用。

从本实验可看出, 该羧肽酶具有广泛的作用位点, 可以水解大多数的疏水性氨基酸, 因此除了在食品上用于脱苦外, 还可广泛用于氨基酸测序和氨基酸的制备等方面。

在本实验条件下该菌株产生羧肽酶的方式属于延迟合成型, 即在第 84h 酶活达到最大时, 菌体生长已处于衰败期。

参考文献

- [1] 张德安等编. 生物大分子实验手册. 长春: 吉林大学出版社, 1991.
- [2] Norio I, Yasuhiro A, Hidenori K, *et al.* Agri Biol Chem, 1987, **51** (9): 2389 ~ 2394.
- [3] Soichi A, Michiko Y, Hiromichi, *et al.* Agri Biol Chem, 1970, **34** (5): 729 ~ 738.
- [4] Teruyoshi M, Rikimaru H, Tadao H. Agri Biol Chem, 1970, **34** (8): 1235 ~ 1243.
- [5] 郭本恒. 食品工业, 1994, (1): 8 ~ 10.