

β -环糊精衍生物修饰 对去折叠胰蛋白酶酶学性能的影响

刘军平¹, 童桂鸿^{1,2}, 刘伟^{1,*}, 邹立强¹, 钟娇¹, 刘翔宇¹, 张怡¹

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

2.江西省农业厅 江西省农产品质量安全检测中心, 江西南昌 330077)

摘要:为了改善天然胰蛋白酶和去折叠胰蛋白酶的酶学性能,采用单-6-脱氧-6-氨基- β -环糊精(CDAN)对它们进行修饰,研究CDAN对它们的相对活性、动力学参数、热稳定性、自溶性及在尿素溶液中稳定性的影响。结果显示:CDAN修饰明显降低了天然和去折叠胰蛋白酶的米氏常数并提高了它们的催化效率,其中去折叠胰蛋白酶的变化最显著($p < 0.05$),修饰前后去折叠胰蛋白酶的 K_m 值分别为 0.35×10^{-3} mol/L和 0.11×10^{-3} mol/L。修饰的天然胰蛋白酶在60℃保温10 min时,相对活性由修饰前的2.1%上升至58.3%,而修饰的去折叠胰蛋白酶则从修饰前的19.5%上升至70.5%;在尿素溶液中处理60 min时,修饰前后天然胰蛋白酶的相对活性分别为11.3%和78.8%,而去折叠胰蛋白酶分别为21.3%和84.9%。表明CDAN修饰改善了胰蛋白酶的热稳定性、抗自溶能力以及在尿素溶液中的稳定性,其中去折叠胰蛋白酶的改善效果比天然胰蛋白酶的更好。

关键词: β -环糊精, 胰蛋白酶, 动态高压微射流, 稳定性

Effect of β -cyclodextrin derivative modification on enzyme properties of unfolded trypsin

LIU Jun-ping¹, TONG Gui-hong^{1,2}, LIU Wei^{1,*}, ZOU Li-qiang¹, ZHONG Jiao¹, LIU Xiang-yu¹, ZHANG Yi¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.Jiangxi Provincial Testing Center of Quality Safety for Agricultural Products, Nanchang 330077, China)

Abstract: Native trypsin and unfolded trypsin are modified by mono-6-deoxy-6-amino- β -cyclodextrin (CDAN) to improve their enzyme properties. The effect of CDAN modification on the relative activity, kinetic parameters, thermal stability, autolysis and stability in the urea of native trypsin and unfolded trypsin was studied. Results showed that there was an obvious decrease in the K_m value and increase in the catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) of native trypsin and unfolded trypsin after modification. And the modified unfolded trypsin showed more obvious ($p < 0.05$) change than modified native trypsin. The K_m value of unfolded trypsin was 0.35×10^{-3} mol/L and 0.11×10^{-3} mol/L before and after modification, respectively. After modification the relative activity of native trypsin increased from 2.1% to 58.3% at incubation 10 min at 60 °C, while that of unfolded trypsin increased from 19.5% to 70.5%. Moreover, before and after modification, the relative activity of native trypsin was 11.3% and 78.8% at incubation 60 min in urea solution, respectively, while that of unfolded trypsin was 21.3% and 84.9%, respectively. The results showed that unfolded trypsin showed more obvious improvement in the thermal stability, autolysis and stability in the urea after modification in comparison to native trypsin.

Key words: β -cyclodextrin; trypsin; dynamic high-pressure microfluidization (DHPM); stability

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)15-0169-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.028

胰蛋白酶被广泛应用于医疗、食品等工业及生物技术领域。在应用中,胰蛋白酶多处于强酸强碱、高温高压或有抑制剂的反应环境中,其活性和稳定性受到极大的影响^[1],尤其是热稳定性及抑制剂的影

响使之在实际应用中受到很大限制。通过酶的改性可以获得较为稳定的胰蛋白酶,改性的方法主要有化学修饰^[2]、物理处理^[3]、固定化^[4]和蛋白质工程^[5]等,其中化学修饰是最有效的改性方法之一。常用

收稿日期: 2014-10-21

作者简介: 刘军平(1985-),男,硕士,实验师,研究方向:食品高新技术与资源综合利用, E-mail: ljpf@163.com。

* 通讯作者: 刘伟(1972-),男,博士,教授,研究方向:食品高新技术与资源综合利用, E-mail: liuwei@ncu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060209)和江西省“赣鄱英才555工程”青年拔尖人才培养计划项目资助。

于修饰酶的化学物有聚乙二醇衍生物^[6]及葡聚糖、聚蔗糖、壳聚糖、羧甲基纤维素、环糊精等多糖类衍生物^[1,7-9]。

环糊精(Cyclodextrin,简称CD)是一类由疏水性的内腔和亲水性的外表构成的环状低聚葡萄糖化合物,它能与多肽类大分子结合,从而改变大分子的功能性质^[10-12]。目前,在天然胰蛋白酶修饰中应用较多的修饰剂是聚乙二醇类衍生物^[6],环糊精衍生物的应用相对较小,而环糊精衍生物对去折叠胰蛋白酶的修饰则尚未见报道。已有研究发现环糊精衍生物修饰对天然胰蛋白酶的活性和稳定性等有不同程度的改善^[8-9,12-13]。本课题组前期研究发现采用动态高压微射流(Dynamic high-pressure microfluidization, DHPM)诱导的去折叠胰蛋白酶其热稳定性得到改善^[14],但处于去折叠态的胰蛋白酶结构并不稳定。为了使其更加稳定,本文利用 β -环糊精经过胺化处理后的衍生物即单-6-脱氧-6-氨基- β -环糊精(mono-6-deoxy-6-amino- β -cyclodextrin, CDAN)对去折叠胰蛋白酶进行化学修饰,分析修饰后酶学性能、热稳定性、自溶性及在尿素溶液中稳定性的变化,以进一步研究去折叠胰蛋白酶的稳定性,为去折叠态酶的稳定化提供一种参考方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胰蛋白酶(产品编号 T1426,活力 $\geq 10,000$ BAEE units/mg protein) 德国 Sigma 公司;单-6-脱氧-6-氨基- β -环糊精 上海拓克化学科技有限公司;酪蛋白 上海青析化工科技有限公司;乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺(1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride, EDAC) 上海索莱宝生物科技有限公司;三氯乙酸 天津市大茂化学试剂厂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等 均为分析纯试剂。

M-110EH30 型超高压微射流均质机 美国 Microfluidics 公司;DELTA320 型 H 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅 上海贺德实验设备有限公司;TGL-16C 型离心机 上海安亭科学仪器厂;UV-1600PC 型紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DHPM 处理天然胰蛋白酶 根据本课题组的报道^[14],采用动态高压微射流(DHPM)处理天然态胰蛋白酶(native trypsin, NT)以获得去折叠态胰蛋白酶(DHPM-induced unfolded trypsin, DT),首先利用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH7.4)配制 1 mg/mL 的天然胰蛋白酶,再采用 M-110EH30 超高压微射流均质机在 80 MPa 的压力下处理酶溶液三次,获得去折叠胰蛋白酶,冷冻干燥备用。

1.2.2 胰蛋白酶的化学修饰 胰蛋白酶与单-6-脱氧-6-氨基- β -环糊精(CDAN)的化学修饰参照 Fernández M 等描述的方法^[9]。取 20 mg 胰蛋白酶溶于 10 mL 磷酸盐缓冲液中,再加入 30 mg 的 EDAC 和 100 mg 的 CDAN,磁力搅拌混匀,在室温下继续搅拌

1 h,再置于 4℃ 下反应 16 h。然后将混合液在 4℃ 下透析 48 h,以获得修饰后的天然胰蛋白酶(CDAN-modified NT, NT_{CD})和去折叠胰蛋白酶(CDAN-modified DT, DT_{CD}),冷冻干燥备用。

1.2.3 胰蛋白酶活性的测定 胰蛋白酶活性测定参照 Purcena L L A 等描述的方法^[15],以酪蛋白为反应底物,取 1 mL 胰蛋白酶溶液(1 mg/mL)与 2 mL 磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH7.4)混合,再加入 5 mL 的酪蛋白溶液(7.5 mg/mL),充分混匀,于 37℃ 下反应 30 min,随后立即加入 5 mL 的 5% (w/v)三氯乙酸以终止反应。将上述溶液在 10000 r/min 条件下常温离心 10 min,取上清液在 275 nm 处测定其吸光度。一个酶活力单位定义为每分钟吸光度增加 1.0 所需的酶量。酶的相对活性为处理样品酶活力与对照样品酶活力之比,本文采用相对活性对各处理样品的活力进行比较,对照样品酶活力为天然胰蛋白酶在 37℃ 下测定的活力。

1.2.4 动力学参数的测定 在不同底物浓度(0.01~0.30 $\times 10^{-3}$ mol/L)下根据 1.2.3 测定胰蛋白酶的相对活性,再利用 Lineweaver-Burk 方程计算样品的米氏常数 K_m 、催化常数 K_{cat} 和催化效率 K_{cat}/K_m 。

1.2.5 胰蛋白酶热稳定性和自溶性的测定 使用磷酸盐缓冲液(pH7.4)配制浓度为 1 mg/mL 的样品(NT, DT, NT_{CD}, DT_{CD}),将各个样品置于 30~90℃ 范围内的不同温度下保温 10 min,随后立即冷却至室温,再根据 1.2.3 的方法测定各个样品经不同温度处理后的相对活性。

自溶性测定是将样品溶液(1 mg/mL)置于 40℃ 的恒温水浴锅中保温 180 min,每隔 20 min 取样,根据 1.2.3 测定相对活性。

1.2.6 胰蛋白酶在尿素溶液中的稳定性测定 将配制好的酶溶液置于 8 mol/L 的尿素溶液中,在 37℃ 下保温 180 min,在不同时间段内取适量样品,根据 1.2.3 的方法测定其相对活性。

1.2.7 数据处理 数据处理采用 Origin8.0 软件,显著性差异采用 ANOVA 单因素方差分析, $p < 0.05$ 时表示有差异,每个实验都重复三次,数值以“均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与讨论

2.1 环糊精修饰的胰蛋白酶活性和动力学参数分析

修饰的天然胰蛋白酶和去折叠胰蛋白酶以酪蛋白为底物在 37℃ 下测定相对活性,从表 1 可以看出修饰前后的相对活性基本没有变化,表明 β -环糊精的氨基衍生物对酶在 37℃ 下的活性影响不大。Michael Fernández 等^[9]也报道了 β -环糊精衍生物修饰的天然胰蛋白酶活性变化不大,其分解蛋白的活性(以酪蛋白为底物)仅下降了 0.001 katal/kg 左右。课题组前期研究聚乙二醇衍生物对去折叠胰蛋白酶的修饰,发现在修饰后去折叠胰蛋白酶的活性也变化不大^[16]。

从表 1 可以看出天然胰蛋白酶的 K_m 值从 0.42 $\times 10^{-3}$ mol/L 降到 0.24 $\times 10^{-3}$ mol/L,而去折叠胰蛋白酶的下降幅度更大,从 0.35 $\times 10^{-3}$ mol/L 下降到 0.11

表1 环糊精修饰对天然和去折叠胰蛋白酶相对活性及动力学参数的影响

Table 1 Effect of cyclodextrin modification on relative activity and kinetic parameters of native and unfolded trypsin

样品	NT	NT _{CD}	DT	DT _{CD}
相对活性(%)	100 ± 0.9 ^a	95.7 ± 0.7 ^a	98.1 ± 2.1 ^a	98.9 ± 1.3 ^a
K _m (×10 ⁻³ mol/L)	0.42 ± 0.032 ^a	0.24 ± 0.015 ^b	0.35 ± 0.027 ^a	0.11 ± 0.019 ^c
K _{cat} (s ⁻¹)	1.67 ± 0.15 ^a	3.11 ± 0.08 ^b	1.81 ± 0.11 ^a	3.45 ± 0.14 ^c
K _{cat} /K _m (s ⁻¹ L/mmol)	3.98 ± 0.24 ^a	12.96 ± 0.98 ^b	5.17 ± 0.15 ^c	31.36 ± 0.28 ^d

注:NT为天然胰蛋白酶;DT为经动态高压微射流诱导的去折叠胰蛋白酶;NT_{CD}和DT_{CD}分别为经过β-环糊精衍生物修饰的天然和去折叠胰蛋白酶;同行上标小字母不同者差异显著(p<0.05);数值以均值±标准差表示。

×10⁻³ mol/L。修饰后的K_{cat}/K_m值也发生明显变化,天然胰蛋白酶从修饰前的3.98 s⁻¹ L/mmol增加到修饰后的12.96 s⁻¹ L/mmol,约上升了3倍,在所有样品中修饰的去折叠胰蛋白酶达到最大值31.36 s⁻¹ L/mmol,约是DT的6倍,NT的10倍。同时可以看到DHPM处理也降低了天然胰蛋白酶的K_m值,这与本课题组前期报道相似^[17]。Fernández M等^[9]报道不同的β-环糊精衍生物对天然胰蛋白酶动力学参数的影响,在修饰后其K_m值的最大降幅是从处理前的38.7 μmol/L下降到22.6 μmol/L,K_{cat}/K_m值则是从3.3 × 10⁻⁵ s⁻¹ L/mmol上升至8.1 × 10⁻⁵ s⁻¹ L/mmol,这种变化幅度与本文天然胰蛋白酶的修饰作用类似,但却明显小于修饰前后去折叠胰蛋白酶的变化幅度,这表明β-环糊精衍生物对去折叠胰蛋白酶的修饰效果更为明显。此外,对比于已报道的另一种常用化学修饰剂—聚乙二醇衍生物对胰蛋白酶的影响^[16-17],可以发现环糊精的氨基衍生物对于改善天然胰蛋白酶的动力学参数更有效,这种改善作用对于去折叠胰蛋白酶则更为显著。

K_m值的降低表明酶与底物的亲和力增强,K_{cat}/K_m值的升高表明酶的催化效率升高。可见修饰的天然和去折叠胰蛋白酶与底物的亲和力及催化效率均得到提高,其中去折叠胰蛋白酶的效果更为明显,这可能与环糊精的疏水性内腔和亲水性外表的结构有关^[18]。一方面这种类似于酶模型的结构能与底物(客体)形成较稳定的合物^[18],增加酶分子与底物的接触几率,同时对于酶与底物形成的中间体也有稳定作用。另一方面环糊精的修饰可能发生在靠近胰蛋白酶活性中心的侧链氨基酸上^[8,19],从而影响了活性中心与底物的接合。Fernández M等^[9]也报道了位于胰蛋白酶活性中心附近的环糊精分子能增加底物在微环境中的浓度,从而增加修饰酶与底物的亲和力。

2.2 环糊精修饰对天然和去折叠胰蛋白酶热稳定性和自溶性的影响

酶热稳定性是通过在不同温度下保温10 min后的相对活性表征的,如图1所示。从图中可以看出,在较高温度下,两种修饰酶的活性下降幅度较缓慢,而未修饰酶则急剧下降直至失活,如60℃时,NT和DT的相对活性分别为2.1%和19.5%,而NT_{CD}仍有58.3%,DT_{CD}更是高达70.5%。前期有报道采用不同的化学物质修饰天然胰蛋白酶,以提高其热稳定性。如Murphy A等^[20]采用琥珀酰亚胺酯进行修饰,NT

的T₅₀值(相对活性为50%时的温度)增加了5℃;Villalonga R等^[1]采用羧甲基纤维素修饰,T₅₀上升了7℃。对比之下,本文利用环糊精衍生物修饰,T₅₀约提高了12℃。Fernández M等^[8]也报道了α-、β-、γ-环糊精衍生物修饰天然胰蛋白酶,其热稳定性得到提高,到70℃时,修饰酶的相对活性仍维持在40%附近,而本文中修饰后天然和去折叠胰蛋白酶的活性分别为42.9%和55.2%。以上数据表明CDAN修饰能明显改善天然和去折叠胰蛋白酶的热稳定性,尤其是对去折叠胰蛋白酶稳定性改善效果更好。

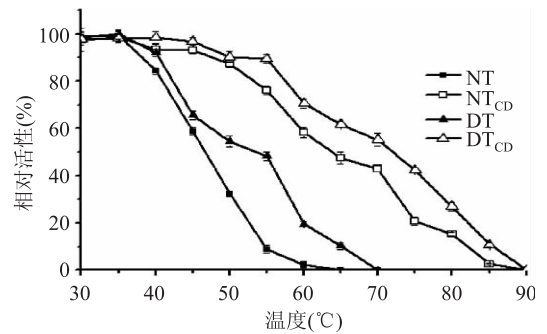


图1 环糊精修饰对天然和去折叠胰蛋白酶热稳定性的影响
Fig.1 Effect of cyclodextrin modification on thermal stability of native and unfolded trypsin

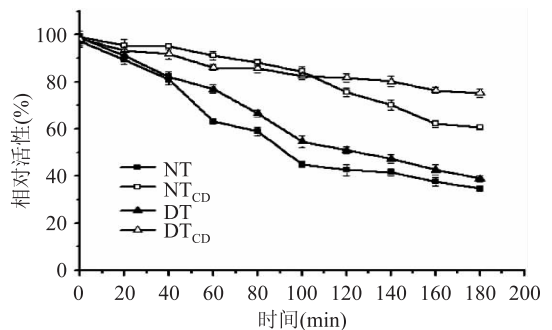


图2 在40℃下保温不同时间后样品(NT、NT_{CD}、DT、DT_{CD})的相对活性

Fig.2 Relative activity of NT, NT_{CD}, DT and DT_{CD} incubated at different time at 40℃

图2表示环糊精修饰对酶自溶性的影响。在40℃下,随着保温时间的延长,酶的相对活性逐渐降低,但是修饰酶的相对活性下降幅度明显比未修饰酶的小,如保温100 min时,NT和DT的相对活性分别为44.9%和54.6%,而修饰酶的相对活性仍维持在

80%以上。对于修饰酶,在保温 100 min 之后,NT_{CD}的相对活性下降明显快于 DT_{CD},到 180 min 时,NT_{CD}的相对活性从 98.9% 下降到 60.8%,DT_{CD}则从 98.2% 下降到 75.2%。酶的相对活性下降幅度越慢说明其抗自溶能力越强^[17]。可见,CDAN 修饰提高了天然和去折叠胰蛋白酶的抗自溶性,尤其是去折叠胰蛋白酶的抗自溶性改善最明显。

胰蛋白酶的热稳定性和自溶性的改变可能与酶蛋白积聚及其构象变化相关。据报道蛋白积聚是影响胰蛋白酶热动力学的重要因素^[8],而与胰蛋白酶侧链修饰的环糊精分子表面具有亲水性,这种亲水性的相互作用可以阻碍分子间或分子内在受热反应中的蛋白积聚^[21],从而使酶的热稳定性得到改善。同时,修饰酶的侧链疏水氨基酸残基部分被环糊精包埋,这也有利于降低这些氨基酸分子与周围水分子的不稳定反应。从结构上看,环糊精分子与胰蛋白酶的芳香族氨基酸共价修饰^[9],酶分子内的交联作用加强,其构象将更加稳定,这可能有利于减缓胰蛋白酶在高温和长时间保温条件下活性的下降。

本文中修饰的去折叠胰蛋白酶具有更高的热稳定性和更低的自溶性,这可能与 DHPM 诱导的去折叠态的特殊结构有关。DHPM 处理使酶内部被掩盖的疏水氨基酸侧链部分暴露出来^[14,16],这有利于环糊精分子与其进行共价修饰,从而使修饰的去折叠胰蛋白酶在构象上比天然胰蛋白酶结构更加稳定。同时,暴露的疏水侧链可以增加与环糊精分子结合的机率,可能有更多的环糊精分子与去折叠胰蛋白酶结合,其表面亲水性作用增强,有利于防止蛋白积聚的发生。

2.3 修饰酶在变性剂中稳定性的分析

酶在工业应用中的反应环境复杂多变,很多反应条件中会含有机溶剂等不稳定性因素。本文选取常用的尿素作为变性剂分析修饰酶在其溶液中的反应稳定性,图 3 表示酶在 8 mol/L 的尿素溶液中混合不同时间后测定的相对活性。

从图 3 可以看出,随着时间的延长,天然和去折叠胰蛋白酶的相对活性急剧下降,尤其是在前 60 min 内,它们的活性分别降至 11.3% 和 21.3%,60 min 以后下降比较平缓,但活力很低;而修饰酶在整个处理过程中相对活性下降都较少,其活力一直高于修饰前的水平,在 60 min 时,修饰的天然和去折叠胰蛋白酶相对活性分别为 78.8% 和 84.9%。Venkatesh R 等^[22]报道采用戊二醛和蔗糖衍生物修饰的胰蛋白酶在尿素溶液中更加稳定,如原酶和蔗糖修饰酶活力为 50% 的时间分别为 25 min 和 42 min,本文中环糊精修饰酶在 180 min 后的相对活性仍高于 50%。以上结果表明,天然和去折叠胰蛋白酶在尿素溶液中的稳定性都较低,但环糊精修饰明显增加了它们在尿素溶液中的稳定性,其中修饰的去折叠胰蛋白酶稳定性最高。

在尿素溶液中,修饰酶稳定性增加的原因可能与其结构稳定性及环糊精的性质相关。环糊精与酶共价结合,增加了酶的结构稳定性^[23],尤其是去折叠

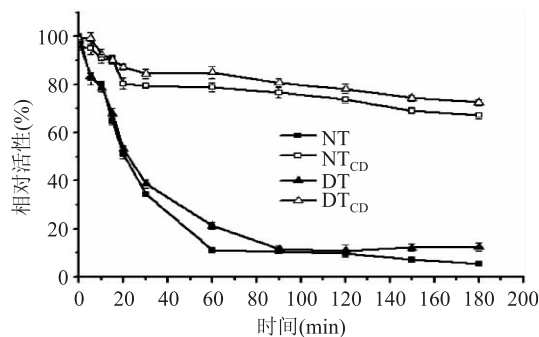


图3 在尿素溶液中作用不同时间后样品 (NT、NT_{CD}、DT、DT_{CD}) 的相对活性

Fig.3 Relative activity of NT, NT_{CD}, DT and DT_{CD} incubated at different time at urea solution

胰蛋白酶的疏水侧链暴露,使环糊精与之的结合更紧密,此外,环糊精表面的亲水性以及其疏水内腔与酶侧链形成的包合作用在一定程度上也能阻碍尿素的作用^[18]。

3 结论

单-6-脱氧-6-氨基-β-环糊精修饰改善了天然胰蛋白酶和去折叠胰蛋白酶的酶学性能,修饰酶的催化效率、热稳定性、抗自溶能力、在尿素溶液中的稳定性及其与底物的亲和力均获得提升,其中修饰后的去折叠胰蛋白酶效果更好。前期发现经动态高压微射流处理获得的去折叠胰蛋白酶热稳定性提高,但结构不够稳定。本研究表明单-6-脱氧-6-氨基-β-环糊精修饰进一步提升了去折叠胰蛋白酶的热稳定性,并改善了它的催化性能,在结构稳定性上也获得了良好效果,但环糊精修饰后去折叠胰蛋白酶的构象变化以及构象变化与酶学性能的关系仍不是很明确,有待进一步的研究。本文的结果可以为去折叠态酶蛋白的稳定性研究提供理论依据,并为胰蛋白酶在极端环境中的应用提供一种处理方法,扩大了胰蛋白酶的应用范围。

参考文献

- [1] Villalonga R, Villalonga M L, Gómez L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10 (5): 483-490.
- [2] Cowan D A, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 4 (49): 326-346.
- [3] Yu Z L, Zeng W C, Zhang W H, et al. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α-amylase, papain and pepsin [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 3 (21): 930-936.
- [4] Gogoi D, Barman T, Choudhury B, et al. Immobilization of trypsin on plasma prepared Ag/PPAni nanocomposite film for efficient digestion of protein [J]. Materials Science and Engineering: C, 2014, 43: 237-242.
- [5] Woodley J M. Protein engineering of enzymes for process applications [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2013, 2

- (17):310-316.
- [6] Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Chemistry for peptide and protein PEGylation [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 116-127.
- [7] Li C Y. Effects of chemical modification by chitoooligosaccharide on enzyme activity and stability of yeast β -D-fructofuranosidase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 64-65: 24-32.
- [8] Fernández M, Fragoso A, Cao R, et al. Chemical conjugation of trypsin with monoamine derivatives of cyclodextrins Catalytic and stability properties [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(4): 543-548.
- [9] Fernández M, Fragoso A, Cao R, et al. Improved functional properties of trypsin modified by monosubstituted amino- β -cyclodextrins [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21(3): 133-141.
- [10] Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 101: 238-250.
- [11] 宋乐新, 郭子建. 氨基酸、多肽的环糊精化学 [J]. *无机化学学报*, 2001, 17(4): 457-470.
- [12] 宋发军, 曾小英, 骆衡, 等. β -环糊精衍生物与核糖核酸酶的相互作用 [J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 44(1): 76-79.
- [13] Treethammathurot B, Ovatlamporn C, Wungsinthaweekul J, et al. Chemical modification and thermal stability study of β -cyclodextrin- and PAMAM-trypsin conjugates [C]. *Proceedings of the 4th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, Shenzhen, China, 2009: 954-959.
- [14] Liu W, Zhang Z Q, Liu C M, et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(3): 616-621.
- [15] Purcena L L A, Caramori S S, Mitidieri S, et al. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2009, 29(4): 1077-1081.
- [16] Liu W, Liu J P, Zou L Q, et al. Stability and conformational change of methoxypolyethylene glycol modification for native and unfolded trypsin [J]. *Food Chemistry*, 2014, 146: 278-283.
- [17] Treethammathurot B, Ovatlamporn C, Wungsinthaweekul J, et al. Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 357(1-2): 252-259.
- [18] Giordano F, Novak C, Moyano J R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds [J]. *Thermochimica Acta*, 2001, 2(380): 123-151.
- [19] Finer-Moore J S, Kossiakoff A A, Hurley J H, et al. Solvent structure in crystals of trypsin determined by X-ray and neutron diffraction [J]. *Proteins*, 1992, 3(12): 203-222.
- [20] Murphy A, Fágúin C. Stability characteristics of chemically-modified soluble trypsin [J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 49(1): 163-171.
- [21] Mozhaev V V, Siksnis V A, Melik-Nubarov N S, et al. Protein stabilisation via hydrophilisation. Covalent modification of trypsin and α -chymotrypsin [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 173(1): 147-154.
- [22] Venkatesh R, Sundaram P V. Modulation of stability properties of bovine trypsin after *in vitro* structural changes with a variety of chemical modifiers [J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 1998, 11(8): 691-698.
- [23] Fernández M, Villalonga M L, Fragoso A, et al. α -Chymotrypsin stabilization by chemical conjugation with *o*-carboxymethyl-poly- β -cyclodextrin [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 535-539.
- (上接第 168 页)
- [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1909-1914.
- [4] Yongsmith B, Tabloka W, Yongmanitchai W, et al. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, 9(1): 85-90.
- [5] Yongsmith B, Thongpradis P, Klinsupa W, et al. Fermentation and quality of yellow pigments from golden brown rice solid culture by a selected *Monascus* mutant [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, 97(20): 8895-8902.
- [6] Yongsmith B, Kitpprechavanich V, Chitradon L, et al. Color mutants of *Monascus* sp. Kb9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture [J]. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2000, 10: 263-272.
- [7] Yongsmith B, Krairak S, Bavavoda R. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp [J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1994, 78(3): 223-228.
- [8] Martinkova L, Patakova Juzlova P, Kren V, et al. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus* [J]. *Food Additive Contaminant*, 1999(16): 15-24.
- [9] 许贛荣, 毛鹏等. 一种偶联原位萃取发酵红曲黄色素的双液相发酵方法 [P]. 专利号 201410116854.6.
- [10] 黄艳, 王璐, 毛鹏, 等. 红曲液态发酵生产橙、黄色素及其色调研究 [J]. *食品工业科技*, 2014(19): 142-145.
- [11] Lian XJ, Wang CL, Guo KL. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber* [J]. *Dyes Pigments*, 2007, (73): 121-125.
- [12] 姜琼, 谢好. 苯酚-硫酸法测定多糖方法的改进 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(12): 316-318.
- [13] Chen M H, Johns M R. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus* [J]. *Enzyme and microbial technology*, 1994, 16(7): 584-590.
- [14] 穆洪霞, 丁雪梅, 黄六斌, 等. 红曲霉发酵不同底物产色素的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2014, 33(1): 1-4.
- [15] 周波, 浦跃武, 朱明军, 等. 氮源对红曲霉突变株产黄色素的影响 [J]. *现代食品科技*, 2008, 24(2): 123-127.
- [16] 张慧娟, 沈良俊, 许贛荣, 等. 红曲橙色素的提取及其稳定性研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 31(12): 129-133.