

高产胞外蛋白酶毛霉的筛选及酶学性质研究

罗晓妙,高玉强

(西昌学院 轻化工程学院,四川 西昌 615013)

【摘要】通过平板初筛和发酵复筛从保藏的16种毛霉菌株中筛选出了四株高产胞外蛋白酶毛霉菌株,分别为3.4906、3.4909、3.4943和3.5009。筛选过程中发现平板筛选法用于毛霉筛选不易观察,需改进方法,发酵法仍是最直接有效筛选的方法。对四株毛霉所产蛋白酶酶学特性研究发现,在温度耐受性方面,3.4943和3.4906的蛋白酶耐温性强;在反应温度方面,3.4906和3.5009的最适反应温度较低,3.4943和3.4909的最适反应温度较高;在反应pH方面,4种毛霉所产蛋白酶的最适pH在6.0~8.0范围;在受NaCl浓度影响方面,3.4943的酶活力受NaCl浓度影响较大,3.4909的酶活力受NaCl浓度影响最小。各菌株的酶学特性存在差异,根据发酵食品的工艺特性选择适宜的菌株。

【关键词】胞外蛋白酶;毛霉;筛选;酶学性质

【中图分类号】TQ925*.2 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2014)04-0017-05

前言

毛霉(*Mucor spp.*)是接合菌亚门接合菌纲毛霉目毛霉科真菌中的一个属,是广泛分布于自然界中的一类陆生真菌,在空气、土壤、动物粪便等基物上都分离到毛霉^[1,2]。毛霉的用途较广,在食品加工或化工生产中常利用毛霉的相关酶系分解转化底物生产发酵食品或工业产品,如其中的脂肪酶、果胶酶、凝乳酶、淀粉酶、蛋白酶等被利用生产草酸、乳酸、琥珀酸、甘油等以及发酵酒类和豆类发酵制品等^[3-5]。特别是我国利用毛霉制作食品已有上千年的历史,如中国的腐乳和一些地方的豆豉等都是主要通过毛霉发酵而成^[6,7],这些都说明毛霉在我国传统发酵食品中占据着重要的位置。毛霉发酵豆制品是具有中国特色的传统食品,其制作周期的长短以及成品风味的优劣在很大程度上取决于参与发酵的菌株。菌株的蛋白酶活力高,条件适宜,可以缩短发酵周期、改善产品风味^[8]。因此,在传统食品加工逐渐现代化的今天,筛选高产蛋白酶及酶学性质优良的毛霉作为发酵菌株是现代化工业生产传统毛霉发酵食品的基础,具有重要的现实意义。本文拟通过试验筛选出胞外蛋白酶活力较高的菌株并研究其酶学特性,同时对筛选方法进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌株:16株供试菌株购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号和菌种名称见表1。

PDA培养基(菌种培养用):200g马铃薯,20g葡萄糖,20g琼脂,1000mL蒸馏水。称取200g去皮后的马铃薯,切碎,加水1000mL左右煮沸20min,四层

纱布过滤,在马铃薯汁中加入20g葡萄糖和20g琼脂,充分溶解后用水补足1000mL,趁热纱布过滤,分装三角瓶,121℃高压灭菌20min后取出,冷却备用。液体培养基制备时不加琼脂。

表1 供试菌株编号和菌种名称

菌株编号	菌种名称	菌株编号	菌种名称
3.5006	<i>Mucor mecudo</i>	3.5009	<i>M. recurvus var.indicus</i>
3.4906	<i>M. guilliermondi</i>	3.5008	<i>M. odoratus</i>
3.4916	<i>M.f.circinelloides</i>	3.4922	<i>M. circinelloides.lusitaricus</i>
3.4956	<i>M. variabilis</i>	3.3439	<i>M. oblongisporus</i>
3.4949	<i>M.racemosus f.sphaerosporus</i>	3.4944	<i>M. recurvus var.recurvus</i>
3.4943	<i>M. ramosissimus</i>	3.4959	<i>M. zychae var.zychae</i>
3.4898	<i>M. flavus</i>	3.4909	<i>M.hiemalis f.hiemalis</i>
3.12187	<i>M. indicus</i>	3.4918	<i>M.circinelloides f.janssenii</i>

酪蛋白培养基(筛选蛋白酶用):酪蛋白10.0g/L、氯化钠5.0g/L、磷酸氢二钾2.0g/L、琼脂15.0g/L、水1000mL。按比例称取各组分,混合,加热溶解,校正pH为7.4±0.1(25℃),分装三角瓶,121℃高压灭菌20min后取出,冷却备用。

牛奶培养基(筛选蛋白酶用):将100mL纯牛奶稀释到500mL,取2.5g氯化钠、1.0g磷酸氢二钾、7.5g琼脂,混合,加热溶解,测得pH为7.3,分装三角瓶,121℃高压灭菌20min后取出,冷却备用。

蛋白酶反应底物:10.0g/L酪蛋白溶液。

其它试剂:三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、L-酪氨酸、氯化钠,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

YX280B型手提式不锈钢蒸汽消毒器:上海三申医疗器械有限公司;LPH-250A型生化培养箱:广东省医疗器械厂;DHG-9076A型电热恒温鼓风干燥

收稿日期:2014-03-29

作者简介:罗晓妙(1979-),女,副教授,硕士,主要从事特色资源和发酵食品研究。

箱:上海精宏实验设备有限公司;ZD-85型恒温振荡器:常州澳华仪器有限公司;SW-CJ-1F型单人双面净化工作台:苏州净化设备有限公司;BT125D型电子天平:赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;G8023YSL-V1型微波炉:佛山市格兰仕电器有限公司;UV-7504C紫外分光光度计:上海菁华科技有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 技术路线

保藏菌株的培养→平板筛选→发酵筛选→酶学性质研究

1.3.2 保藏菌株的培养

从斜面菌种中挑取少许孢子接种于PDA培养基平板中央,在25℃条件下倒置培养3d备用。在无菌条件下,用接种环取菌丝到无菌水中并稀释到孢子数大约为 1×10^5 个/mL制备成孢子悬液备用。

1.3.3 平板筛选

将筛选培养基铺好平板,接种,在25℃条件下倒置培养48h,观察记录透明圈直径/菌落直径情况,筛选出酶活力高的菌株。

对16株供试菌株分别使用牛奶培养基平板和酪蛋白培养基平板进行平板筛选。接种方法采取两种方式:一是用0.5cm打孔器在培养菌种的PDA平板上取长势均匀的菌种块接种到酪蛋白平板和牛奶平板中央,二是取0.1mL孢子悬液接种于平板中心,待菌液吸收后培养。根据菌株在平板上的生长情况和产生透明圈的情况分析平板筛选对筛选高产蛋白酶毛霉菌株的实用性和具体操作方法。

1.3.4 发酵筛选

将16株供试菌株分别接种于马铃薯葡萄糖液体培养基,接种方式为取1mL孢子悬液接入盛装有30mL灭菌液体培养基的大试管中,在温度为25℃、转速为100r/min条件下,培养3d,过滤后检测发酵液的蛋白酶活力,筛选出酶活力高的菌株。

1.3.5 酶学性质研究

选取几株酶活力较高的毛霉菌株进行液态发酵,提取胞外蛋白酶粗酶液,研究酶对温度的耐受性、酶的反应温度、反应pH值和NaCl浓度对酶活性的影响等酶学性质。

(1) 酶对温度的耐受性

将提取的粗酶液3mL分装于试管中,分别置于40、50、60、70、80℃的水浴中,在20、40、60min取出检测酶活力。分析酶对温度的耐受性。

(2) 反应温度的影响

将提取的粗酶液3mL分装于试管中,分别放置

在20、25、30、35、40℃的水浴中,按酶活性检测方法加入底物反应、终止反应、检测吸光度,计算酶活力。分析蛋白酶的最适反应温度。

(3) 反应pH的影响

将提取的粗酶液3mL分装于试管中,加入3mL不同pH值的磷酸盐缓冲液(pH4、5、6、7、8、9),2mL底物,然后在30℃水浴反应10min,终止反应,检测吸光度,计算酶活力。分析不同pH值的缓冲液对酶活力的影响。

(4) NaCl浓度的影响

将提取的粗酶液3mL分装于试管中,加入3mL不同浓度的NaCl溶液(2%、4%、6%、8%、10%),2mL底物,然后在30℃水浴反应10min,终止反应,检测吸光度,计算酶活力。分析不同浓度的NaCl溶液对酶活力的影响。

1.3.6 检测方法

蛋白酶活性检测:紫外分光光度法^[9]。用酪氨酸标准溶液在275nm波长下测定吸光度作标准曲线,得到吸光度和酪氨酸浓度的线性方程为: $y=0.0059x+0.004$,酪氨酸浓度在0~50 μ g/mL范围内和吸光度呈良好线性关系, R^2 为0.9976。各菌株液体发酵产物经过滤后取滤液待测。取3mL发酵液滤液于试管中,加入3mL的蒸馏水或缓冲液,2mL10g/L的酪蛋白溶液,在30℃(或试验设定温度)水浴10min,再加2mL浓度为10%的三氯乙酸溶液,用脱脂棉过滤,取滤液测定275nm波长下的吸光度。以反应体系中先加入三氯乙酸溶液后加入反应底物的试管为空白对照。根据检测管吸光度与空白管吸光度之差在酪氨酸标准曲线上查知酪氨酸浓度,再计算酶活力。样品酶活力定义为:30℃中性条件下(或试验设定的温度、pH值条件下),每1min分解酪蛋白生成1 μ g酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位(IU)。

根据文中试验过程,计算公式如下:

$$\text{蛋白酶的活力(IU/mL)} = C/10 \times n$$

式中:C——根据样品液检测得到的吸光度从标准曲线中查得的酪氨酸浓度, μ g/mL;

10——反应时间,min;

n——样品液的稀释倍数,若按上述操作直接取发酵液进行反应、测定,则稀释倍数为1,若所测吸光度值较大,则需将样品液先稀释再进行检测,此处需乘以实际的稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 平板筛选结果

2.1.1 牛奶培养基筛选结果

牛奶中主要蛋白质也是酪蛋白,其本身是乳状液状态,制备更为方便,但是在高温高压灭菌过程中则蛋白质发生了较为严重的变色变性反应,使制备的牛奶培养基为棕黄色,培养后透明圈更不明显,如图1。

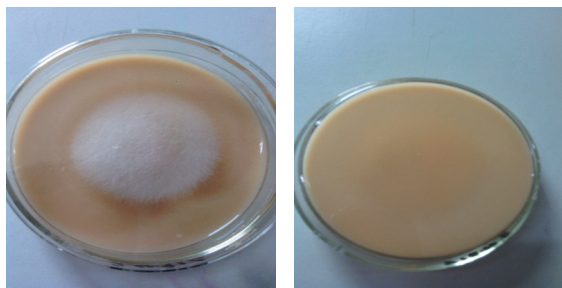


图1 牛奶培养基培养结果

2.1.2 酪蛋白培养基筛选结果

酪蛋白培养基筛选16株毛霉菌株的结果见表

2。

表2 酪蛋白培养基初筛结果

菌株 编号	透明圈直径/菌落直径		
	第一组	第二组	平均值
3.4943	2.32	2.30	2.31
3.5009	2.17	2.19	2.18
3.4906	2.06	2.10	2.08
3.4949	1.94	1.96	1.95
3.4909	1.90	1.92	1.91
3.5006	1.81	1.85	1.83
3.4916	1.77	1.73	1.75
3.4956	1.73	1.75	1.74
3.4944	-	-	-
3.4922	-	-	-
3.5008	-	-	-
3.4959	-	-	-
3.12187	-	-	-
3.3439	-	-	-
3.4918	-	-	-
3.4898	-	-	-

注:表中“-”表示透明圈观察不清,无法计算透明圈直径与菌落直径比值。

在平板筛选过程中发现,很多菌株的菌丝生长快,透明圈不好观察,这说明平板筛选法在筛选产蛋白酶毛霉菌株时需要改进。由表2可以看出,在可以观察到透明圈的菌株中,编号为3.4943、3.5009、3.4906、3.4949和3.4909的直径比值都较高,因此他们的酶活力可能较其他菌株高,是否如此,需通过发酵筛选进一步验证。

2.2 发酵筛选结果

利用测定液态发酵液中酶活力大小来反应菌株的胞外蛋白酶活力情况是最直接和最准确的筛选方法。16株毛霉模式菌株的酶活力检测结果见表3。

表3 16株毛霉菌株的酶活力

菌株 编号	酶活力测定值(IU/mL)			酶活力平均值 (IU/mL)
	1	2	3	
3.4943	32.03	33.12	31.57	32.24
3.5009	31.52	32.22	30.89	31.54
3.4906	31.02	31.75	30.39	31.05
3.4956	30.68	31.04	30.21	30.64
3.4909	29.66	30.14	30.06	29.95
3.4949	28.47	28.65	28.3	28.47
3.5006	25.25	25.43	24.98	25.22
3.5008	25.08	24.95	24.73	24.92
3.4916	24.58	25.01	24.25	24.61
3.12187	23.39	23.74	23.02	23.38
3.4898	21.53	22.36	21.15	21.68
3.4918	17.62	18.12	17.31	17.68
3.4959	16.44	16.39	15.98	16.27
3.4922	14.58	14.73	14.64	14.65
3.4944	6.1	5.89	5.92	5.97
3.3439	5.26	5.42	5.17	5.28

表3中前5株菌种发酵液的蛋白酶活力较高,分别为:3.4943、3.5009、3.4906、3.4956和3.4909。而且通过最小显著差数法(LSD)对其平均值进行多重比较, $LSD_{0.01}$ 计算为3.17,前5株菌在1%水平不具有差异显著性,而表中第六株菌(3.4949)与第一株菌(3.4943)的蛋白酶活力平均值之间则相差3.77IU/mL,大于 $LSD_{0.01}$,说明二者间在1%水平具有差异显著性。由上面的分析可以得出3.4943、3.5009、3.4906、3.4956和3.4909的酶活力较高,与其他供试菌株的蛋白酶活力有显著差异。所以酶学性质研究拟选用这5株菌种进行试验,进一步比较其蛋白酶性质差异。在进一步培养过程中发现3.4956菌株被污染,所以下列试验是对3.4943、3.5009、3.4906和3.4909四株毛霉的蛋白酶性质的比较。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 酶对温度的耐受性

各菌株蛋白酶经不同温度处理后酶活性都会有所降低,但降低的程度存在差异。试验中经70℃和80℃处理最短时间的酶液基本完全失活,几种蛋白酶的耐温性差异主要体现在40~60℃处理之间,如图2所示。

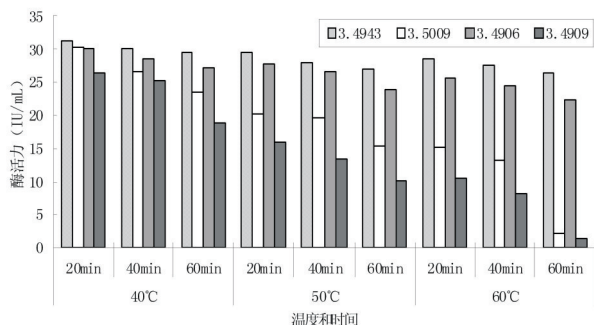


图2 各菌株蛋白酶经不同温度处理后的酶活力

图2表明,3.4943和3.4906的蛋白酶耐温性强,经60℃保持60min仍有较高酶活力,而3.4909和3.5009的蛋白酶耐温性较差,经60℃20min处理后,酶活力下降程度较大,60℃处理60min时基本上失去了酶活力。这可能是不同菌株产生蛋白酶的结构有所不同,从而使其变性失活的温度有所差异所致。

2.3.2 反应温度对酶活力的影响

不同菌株在不同反应温度下表现出的酶活力不同,测得四种毛霉在不同反应温度下的酶活力,如图3。

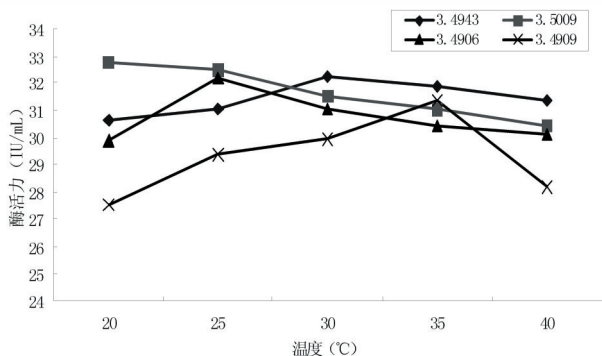


图3 4种毛霉蛋白酶在不同反应温度下的酶活力

由图3可以看出,各菌株蛋白酶活力随反应温度的变化而变化。3.4906在20~25℃的酶活力呈上升趋势,在25~40℃的酶活力呈下降趋势,在25℃有最大值,所以该酶的最适反应温度为25℃;3.4909在20~35℃呈上升趋势,在35~40℃呈下降趋势,在35℃酶活力有最大值,所以该酶的最适反应温度为35℃;3.4943在20~30℃呈上升趋势,在30~40℃呈下降趋势,在30℃时酶活力达到最大值;3.5009在20~40℃呈下降趋势,在20℃酶活力有最大值,所以在所试温度范围内该酶的最适反应温度为20℃,有可能更低。

2.3.3 反应pH对酶活力的影响

测得四种毛霉蛋白酶在不同pH值反应体系中的酶活力,如图4。

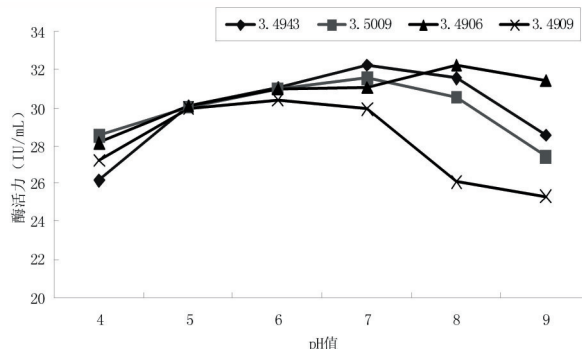


图4 4种毛霉蛋白酶在不同反应pH值下的酶活力

由图4可以看出,各菌株蛋白酶活力随反应体系pH的变化而变化,说明各菌株蛋白酶有自己特定的最适pH值。3.4906在pH8.0时酶活力达到最大值,所以它的最适pH为8.0;3.4909在pH6.0时酶活力达到最大值,所以它的最适pH为6.0;3.4943和3.5009在4.0~7.0范围内呈上升趋势,在7.0~9.0范围内呈下降趋势,在pH7.0时酶活力有最大值,所以它们的最适pH为7.0。

2.3.4 NaCl浓度对酶活力的影响

四种毛霉蛋白酶在加入不同浓度的NaCl溶液的反应体系中测得的蛋白酶活力如图5。

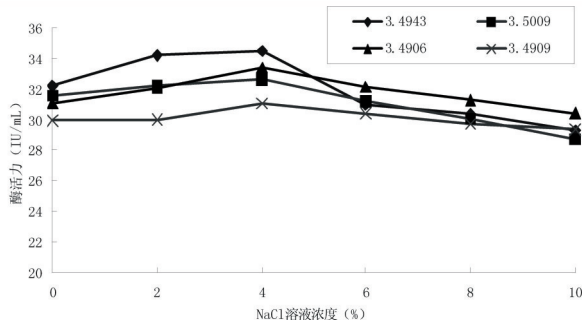


图5 4种毛霉蛋白酶在不同浓度NaCl溶液下的酶活力

NaCl是传统发酵食品中常常使用的调味品,其有利于增进产品风味和抑制微生物生长。同时,在发酵食品的后熟过程中,NaCl往往也会影响酶的活性,对产品品质起到决定性作用。

由图5可以看出,较低浓度的NaCl可保持酶活力甚至使其小幅度上升,而较高浓度的NaCl则会抑制酶活力。图中加入0%~4%的NaCl溶液则几种酶的酶活力均呈上升趋势,而在6%~10%的NaCl溶液加入后则几种酶活力均不同程度下降。3.4943的蛋白酶活力受NaCl浓度影响较大,在高浓度NaCl溶液浓度时降低较多,3.4909的蛋白酶活力受NaCl浓度影响最小。此处加入10%的NaCl溶液相当于反应体系中NaCl浓度约为3.75%,而传统发酵食品往往含盐量在10%以上。3.4909所产生蛋白酶虽然

在没有加入 NaCl 时比其它几种酶活力低,但其受 NaCl 浓度影响小。

3 结论

3.1 平板筛选

平板筛选法是文献中报道的产蛋白酶菌株的简便初筛方法。试验研究发现,利用平板筛选法对毛霉菌株进行产蛋白酶筛选效果不明显。因为毛霉生长迅速,水解圈容易被菌落覆盖,不容易观测结果。两种接种方法中菌种块接种较孢子液接种生长更快,更不易观察到透明圈,但菌落生长更为规则,如果要进行菌落直径的测定或者透明圈的测定则更为准确。由于牛奶中的蛋白质在高温高压灭菌过程中则发生了较为严重的变色变性反应,使制备的牛奶培养基为棕黄色,培养后透明圈更不明显,相对而言,酪蛋白培养基更适合用于平板筛选。

综上所述,对毛霉进行平板初筛宜用酪蛋白培养基制作的平板,将孢子液接种于平板中央,培养后仔细观察。或者可以用玻璃纸培养除去菌落影响或用染色方法更好地显现出被蛋白酶分解掉的酪蛋白的水解圈,将灭菌的玻璃纸平铺于平板上,接种培养,使毛霉菌落生长于玻璃纸上,待培养终止时去除玻璃纸和菌落,再观察平板上的透明圈;也可以采用能使蛋白质着色而氨基酸不着色的染色剂进行染色,根据出现的无色圈的大小来判断菌株蛋白酶活性的高低。

注释及参考文献:

- [1]唐欢,范文奇,周理坤,等.重庆中国三峡博物馆临时展厅内空气微生物调查检测[J].中国微生态学杂志,2014(4):420-424.
- [2]杨金部,张宗舟,苟萍.猪苓生长土壤中微生物区系初探[J].中国食用菌,2014(1):44-47.
- [3]李堃宝,陈熹兮,吴茂瑛.毛霉对油脂废水的降解及 γ -亚麻酸的合成研究[J].上海环境科学,2002(8):473-474,484-511.
- [4]廖永红,任文雅,伍松陵,等.两株酒曲毛霉的分离及Biolog微生物系统分析鉴定[J].食品工业科技,2010(1):191-193.
- [5]韩莹,王和玉,林琳,等.一株毛霉固态发酵代谢产物研究[J].酿酒科技,2012(3):34-36,39.
- [6]姚翔,邓放明,陆宁.自然发霉条件下腐乳醅中优势微生物的分离与初步鉴定[J].食品工业科技,2012(11):209-211.
- [7]胡会萍,李秀娟,黄贤刚.传统豆豉微生物学研究综述[J].中国调味品,2012(6):4-7,13.
- [8]高玉荣,刘晓燕.多菌种低盐分段发酵生产豆豉工艺[J].农业工程学报,2010,S1:369-373.
- [9]张寒俊,刘大川,杨国燕.紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活力的研究[J].粮食与饲料工业,2004(9):2-3.

3.2 发酵筛选

发酵筛选法是更准确直观的筛选方法,本试验用此方法对16株模式菌株进行产蛋白酶筛选,筛选出了几种产蛋白酶活性较高的菌株,分别是3.4943(*M. ramosissimus*)、3.5009(*M. recurvus* var. *indicus*)、3.4906(*M. guilliermondii*)和3.4909(*M. hiemalis* f. *hiemalis*)。

3.3 酶学性质研究

四种菌株的生长特性各不相同,其产生的蛋白酶的特性也存在差异。在温度耐受性方面,3.4943和3.4906的蛋白酶耐温性强,经60℃保持60min仍有较高活力;在反应温度方面,3.5009的蛋白酶最适反应温度最低,在20℃甚至更低,3.4906的蛋白酶最适反应温度居中,为25℃,3.4943和3.4909的蛋白酶最适反应温度较高,分别为35℃和30℃;在反应pH方面,3.4943和3.5009所产蛋白酶的最适pH值为7.0,3.4906所产蛋白酶的最适pH值最高,为8.0左右,3.4909所产蛋白酶的最适pH值最低,为6.0左右;在受NaCl浓度影响方面,3.4943的蛋白酶活力受NaCl浓度影响较大,而3.4909的蛋白酶活力受NaCl浓度影响最小,分析认为3.4909的蛋白酶可能会更适宜于高含盐量的传统发酵食品。

综上所述,各菌株所产生的胞外蛋白酶在温度耐受性、反应温度、反应pH值、NaCl浓度影响等特性上存在差异,可根据发酵食品的工艺特性选择适宜的菌株。

Isolation of Proteases-producing *Mucor* and Characterization of the Proteases in Fermented Liquid

LUO Xiao-miao, GAO Yu-qiang

(School of Applied and Chemical Engineering, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: Four protease-producing *Mucor* strains were isolated from sixteen type strains preserved in our lab, which were 3.4906, 3.4909, 3.4943 and 3.5009 respectively. We found that plate screening was not easy to observe

(下转第26页)

$$f'_+(1) = \lim_{x \rightarrow 1^+} \frac{ax + b - 1}{x - 1} = a = f'_-(1) = 2, \text{ 即 } a = 2, b = 1。$$

解法2 x^2 、 $ax + b$ 在 $x = 1$ 处的函数值相等且导数相等, 由定理1的推论, 得到 $1 = a + b$ 且 $a = 2$, 则 $b = 1$ 。显然, 虽然两种解法得到了相同的结果, 但解法2更加方便、简洁。

例2^[2] 讨论下列分段函数在分段点的可导性:

$$(1) f(x) = \begin{cases} \sin x, & x \leq 0, \\ \ln(1+x), & x > 0; \end{cases} \quad (2) g(x) = \begin{cases} x^2, & x \leq 0, \\ xe^x, & x > 0. \end{cases}$$

解 (1) $\sin 0 = \ln(1+0) = 0$, $\cos 0 = \frac{1}{1+0} = 1$, 由定理1的推论, $f(x)$ 在 $x = 0$ 处可导, 且 $f'(0) = 1$ 。

(2) $(x^2)'|_{x=0} = 0$, $(xe^x)'|_{x=0} = 1$, 由定理2的推论, $g(x)$ 在 $x = 0$ 处不可导。

例3^[3] 讨论 $f(x) = \begin{cases} x^3 \sin \frac{1}{x}, & x \neq 0, \\ 0, & x = 0 \end{cases}$ 在 $x = 1$ 处的可导性。

解 易见 $\lim_{x \rightarrow 0} (x^3 \sin \frac{1}{x})' = 0$, 由定理2, $f(x)$ 在 $x = 0$ 处可导, 且 $f'(0) = 0$ 。

注释及参考文献:

[1] 同济大学数学系. 高等数学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 87.
 [2] 复旦大学数学系. 数学分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983: 158-162.
 [3] 赵润华. 讨论分段函数可导性的一个方法[J]. 河北煤炭建筑工程学院学报, 1993, 10(3): 62-64.

On Derivative Study of Piecewise Function at Dividing Point

PANG Bang-yan, YU Xiao-yao

(Department of Basic Teaching, Shangqiu Institute of Technology, Shangqiu, Henan 476000)

Abstract: As for the derivative of piecewise function at dividing point, this paper gets the conditions of three typical piecewise functions at dividing point by using relative theory and counter-example; and it illustrates the application promotion value of the conclusions with some examples.

Key words: piecewise function; derivability; condition

(上接第21页)

in Mucor screening and should be improved. Fermentation and detecting the protease activity is the most direct and effective screening method. The protease in the fermented liquid of these four isolated strains was researched. The results showed that proteases which produce by the strains of 3.4943 and 3.4906 had good temperature stability; optimum reaction temperature of proteases which produce by the strains of 3.4906 and 3.5009 is lower than that of 3.4943 and 3.4909; In terms of reaction pH, the optimum pH of 4 kinds of proteases produced from 4 strains was in the range of 6.0 ~ 8.0; In affected by the concentration of NaCl, protease activity of 3.4943 was greatly influenced by NaCl concentration and that of 3.4909 was least affected by the concentration of NaCl. Because each strain of enzymatic characteristics varies, we could select suitable strains in production of fermentation food.

Key words: Extra-cellular proteases; Mucor; screening; enzymatic characteristics