

3-脱氧葡萄糖松代谢酶产生菌的筛选及产酶条件

李湘萍 莫柏立 庞宗文 黄时海 梁智群

(广西大学工业测试实验中心 南宁 530004)

摘要: 从霉菌和酵母中筛选到一株酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 231), 该菌株具有能够代谢 3-脱氧葡萄糖松 (3-deoxyglucosone) 的酶, 且活性较高。研究了该菌株的最适产酶条件: 培养温度 28℃, 培养基起始 pH7.0, 培养时间 12h, 碳源、氮源分别为蔗糖、牛肉膏, 添加 KH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 能促进产酶。

关键词: 美拉德反应, 3-脱氧葡萄糖松, 霉菌, 酵母

分类号: Q 939.5

美拉德反应, 也称羰氨反应, 是含羰基化合物与含氨基化合物间发生的, 最终产生类黑素的一类复杂的反应。蛋白质与糖类间的美拉德反应, 会使蛋白质发生复杂的化学变化, 如: 某些氨基酸残基的损失, 可消化性降低, 溶解性下降, 褐变, 荧光增加和发生交联等现象^[1~4]。蛋白质的这些变化会引起食品营养下降, 使食品的加工和贮藏困难; 在活体内, 会导致生物活力的丧失, 使细胞和机体组织老化, 从而引起老化病、糖尿病等等^[5~6]。3-脱氧葡萄糖松是美拉德反应的主要中间产物^[7~8]。在生理条件下, 由葡萄糖引起的蛋白质聚合作用中, 3-脱氧葡萄糖松起着交联剂的作用^[9~10]。3-脱氧葡萄糖松是高活性的生物毒性化合物, 因此, 希望能找到可以代谢 3-脱氧葡萄糖松的酶, 使 3-脱氧葡萄糖松发生氧化或还原作用, 阻断美拉德反应, 这对食品加工以及阻止活体内的美拉德反应, 治疗老化病、糖尿病等方面均具有积极意义。

目前, 国外已有报道, 动植物体内存在代谢 3-脱氧葡萄糖松的酶。Kato H 等人在猪肝、鸡肝和欧芹中找到了对 3-脱氧葡萄糖松具有还原作用的酶^[11~13]。但微生物方面, 国内外均未见报道。因此, 本研究小组以微生物为材料, 以 3-脱氧葡萄糖松为基质, 分别以 NAD、NADH、NADP、NADPH 为辅酶, 从霉菌和酵母中进行筛选。筛选得到一株酿酒酵母 (*Saccharomyces*

cerevisiae 231), 该菌株以 NADP 为辅酶时, 代谢 3-脱氧葡萄糖松酶活性较高, 适宜作为研究 3-脱氧葡萄糖松代谢酶 (以 NADP 为辅酶) 的材料。本文报道了从霉菌和酵母中筛选到具有产 3-脱氧葡萄糖松代谢酶的菌株以及该菌株产酶条件研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

所用霉菌、酵母菌均为广西大学食品发酵工程研究所保藏。

1.2 培养基

霉菌斜面及产酶培养基: 5% 麸皮浸出液, 2% 葡萄糖, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 值自然, 斜面加 2% 的琼脂。

酵母斜面及产酶培养基 (基础培养基): 5% 葡萄糖, 1% 牛肉蛋白胨, 0.5% 酵母浸出汁, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 值自然, 斜面加 2% 的琼脂。

培养基灭菌条件: 压力 0.1MPa, 时间 20min。

1.3 酶底物的制备 (3-脱氧葡萄糖松制备)

3-脱氧葡萄糖松按 Kato H 等人的方法制得^[12]。

国家自然科学基金 (批号: 29466012) 和广西科学基金资助项目

1997-06-23 收稿

1.4 粗酶液的制备

1.4.1 霉菌粗酶液的制备:将霉菌培养48h,抽滤收集菌体并用生理盐水洗涤2次,加入菌湿重5倍体积的含10mM 巯基乙醇磷酸钾钠缓冲液(NaCl :40g KCl :1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$:14.5g KH_2PO_4 :1g 定容至500ml pH7.2),放置 -70°C 冰箱过夜。次日,菌体冰浴,用超声波破碎仪处理40min(功率400W,工作时间8sec,间歇时间4sec,共300次),离心($29200 \times g$, 20min, 4°C),取上清液,得霉菌粗酶液。

1.4.2 酵母粗酶液的制备:将酵母培养24h,离心($4110 \times g$, 10min, 4°C)收集菌体并用生理盐水洗涤2次,其它处理与霉菌相同。

1.5 酶活力的测定^[12]

在光径0.5cm的石英比色皿中加入1.35ml酶作用液(100mM pH7.4 磷酸盐缓冲液, 4mM 3-脱氧葡萄糖松, 0.5mM NAD或0.5mM NADP或0.3mM NADH或0.3mM NADPH)和0.15ml粗酶液,总体积1.5ml。用分光光度计于340nm测吸光值的变化值,每隔2min测一次,共测10min。

酶活力单位定义:在1min内增加或减少1nmol辅酶所需要的酶量为1个酶活单位(unit)。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

共实验17株霉菌和15株酵母,霉菌中有9株黑曲霉,3株米曲霉,2株无花果曲霉,康宁木霉、木霉、烟曲霉各1株;酵母中有7株酿酒酵母,1株热带假丝酵母,7株从酒曲及土壤中分离到的酵母。制备酵母、霉菌粗酶液,分别以NAD、NDAH、NADP、NADPH为辅酶,测定3-脱氧葡萄糖松代谢酶的酶活。由此,筛选到酿酒酵母231,以NADP为辅酶时3-脱氧葡萄糖松代谢酶的活力高,酶活为 727u/g 湿细胞,是以NAD、NADH、NADPH为辅酶时的4~7倍。因此,选择酿酒酵母231进一步研究其产3-脱氧葡萄糖松代谢酶(以NADP为辅酶)的条件。

2.2 酿酒酵母231产酶条件研究

2.2.1 培养温度对产酶的影响:取活化菌接

种,分别在 25°C 、 28°C 、 30°C 、 35°C 培养24h,测其酶活。图1表明,产酶的适宜温度为 $25\sim 30^\circ\text{C}$,最适温度为 28°C 。

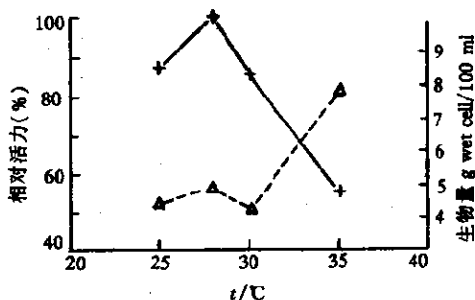


图1 温度对产酶的影响

x: 相对活力; Δ: 生物量

2.2.2 培养时间对产酶的影响:取活化菌接种于基础培养基中, 28°C 分别培养12h, 24h, 36h, 60h, 72h,测其酶活,实验结果表明(图2),适宜培养时间为12~24h。

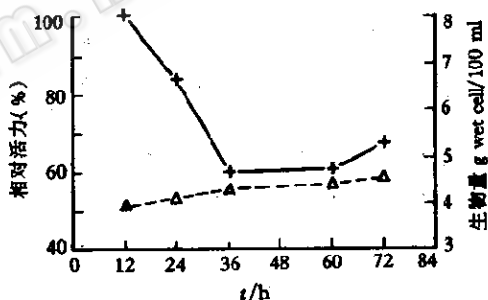


图2 培养时间对产酶的影响

x: 相对活力; Δ: 生物量

2.2.3 培养基起始pH值对产酶的影响:用HCl和NaOH溶液调培养基的pH值,接种于 28°C 培养12h。图3表明,培养基起始pH值的

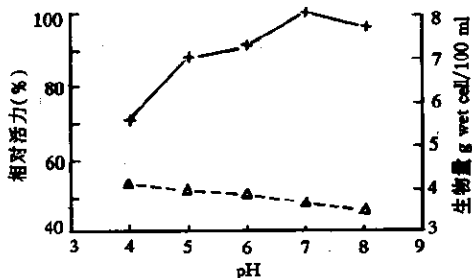


图3 培养基起始pH对产酶的影响

x: 相对活力; Δ: 生物量

适宜范围为 6.0~8.0,其中以 pH7.0 的酶活力最高。

2.2.4 氮源对产酶的影响:基础培养基中含 1% 牛肉蛋白胨,0.5% 酵母浸出汁。酵母浸出汁即是生长因子的来源,也可作为氮源利用。用浓度为 1% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NaNO_3 、尿素、牛肉膏代替牛肉蛋白胨(培养基起始 pH7.0, 28℃ 培养 12h)。结果表明,以牛肉膏为氮源的酶活为 1268u/g 湿细胞,比对照提高了 23.2%,生物量与对照相近。其余的氮源酶活力和生物量均比对照要小。

2.2.5 碳源对产酶的影响:用浓度 5% 的甘油、丙酮、正丁醇、 β -糊精、麦芽糖、蔗糖代替基础培养基中的葡萄糖,培养条件同 2.2.4。实验结果,以蔗糖为碳源时酶活与对照相同,生物量则比对照提高 30.1%。其它碳源均不能提高酶活和生物量。

2.2.6 无机盐对产酶的影响:用不同的无机盐代替基础培养基中的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,培养条件同 2.2.4。结果表明,0.05% KH_2PO_4 、0.05% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 H_2O 对产酶有促进作用,酶活可以提高 10% 左右。 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CuCl_2 对产酶有抑制作用,其中 0.05% CuCl_2 的抑制作用最强,酶活为零。

2.2.7 酶形成的诱导性:在基础培养基中分别加入 0.25mM、0.50mM、0.75mM、1.00mM 的 3-脱氧葡萄糖松和 0.25mM、0.50mM、1.00mM 的甲基乙二醛,培养条件同 2.2.4。结果表明,3-脱氧葡萄糖松对产酶有促进作用,对生物量没有影响。甲基乙二醛对酶活有抑制作用,浓度越大,抑制作用越强。

综上所述,酿酒酵母 231 的最佳产酶条件为:培养温度 28℃,培养时间 12h,培养基起始 pH 值为 7.0,最适氮源、碳源分别为牛肉膏和蔗糖,添加 KH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 H_2O 能促进产酶,3-脱氧葡萄糖松可以诱导产酶。

参 考 文 献

- [1] Smith G A, Friedman M. J Food Sci, 1984, 49: 817~820.
- [2] Eble A S, Thorpe S R, Baynes J M. J Biol Chem, 1983, 258: 9406~9412.
- [3] Monnier V M, Cerami A. Clin Endocrinol Metab, 1982, 11: 431~452.
- [4] Okitani A, Cho R K, Kato H. Agric Biol Chem, 1984, 48: 1801~1808.
- [5] Cerami A. J Am Geriatr Soc, 1985, 33: 626~634.
- [6] Monnier N M, Kohn R K, Cerami A. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 583~587.
- [7] Kato H, Hayase F, Shin D B, Oimomi M, Baba S. "The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition" ed. by Baynes J W, Monnier V M, Progr in Clin Biol Res, 304: 69~84.
- [8] Kato H, Cho R K, Okitani A, Hayase F. Agric Biol Chem, 1987, 51: 683~689.
- [9] Kato H, Shin D B, Hayase F. Agric Biol Chem, 1987, 51: 2009~2011.
- [10] Shin D B, Hayase F, Kato H. Agric Biol Chem, 1988, 52: 1451~1458.
- [11] Liang Z Q, Hayase F, Kato H. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(7): 1074~1078.
- [12] Liang Z Q, Hayase F, Nishimuka T, Kato H. Agric Biol Chem, 1990, 54: 319~328.
- [13] Shin H S, Nishimuka T, Hayase F, Kato H. Agric Biol Chem, 1991, 55: 957~966.

STUDIES ON 3-DEOXYGLUCOSONE-METABOLIZING ENZYME OF FUNGI

Li Xiangping Mo Baili Pang Zongwen Liang Zhiqun

(The Industrial Experimental Centre of GuangXi University, NanNing 530004)

Abstract A yeast strain (*saccharomyces cerevisiae* 231) was selected from fungi. The stain has 3-deoxyglucosone-metabolizing enzyme and it's activity is fairly high. The optimum

conditions of enzyme production were examined. The optimum temperature, initial pH and cultivate time for enzyme production were 28°C, PH7.0 and 12 hours respectively. The suitable carbon source of the medium was sucrose and the suitable nitrogen source was beef extract. Enzyme activity can increase by adding KH_2PO_4 or $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Key words Maillard reaction, 3-Deoxyglucosone, Fungi