

β -1,3-葡聚糖酶的研究和应用

王云川 殷蔚申

(郑州粮食学院粮油储藏系 郑州 450052)

摘要 β -1,3-葡聚糖酶的生产菌种由冻土毛霉经紫外线诱变获得,据正交试验确定培养条件。经硫酸铵盐析和 Sephadex G-100 柱层析,酶得到纯化,并对酶的性质进行了研究。酶对酵母自溶有明显促进作用,使自溶产物的游离氨基氮含量、还原糖含量、总蛋白质得率、干物质得率均得以提高。

关键词 β -1,3-葡聚糖酶,冻土毛霉,酵母自溶

分类号 Q939.5

酵母细胞壁的骨架成分 β -葡聚糖,是维系细胞壁刚性的主要物质,其中 85% 左右为 β -1,3-葡聚糖^[1]。在 β -1,3-葡聚糖酶的作用下,多聚糖链断裂,葡聚糖水解为寡糖或还原糖^[2],因此酶能够疏松细胞壁,促使细胞内容物外溢。使用酶法水解酵母细胞壁可以提高酵母自溶产率,保持抽提物(如:蛋白质等)的活性和细胞器的完整,无毒安全,避免了使用酸碱、机械等方法破壁带来的污染、抽提物失活等问题,目前日益受到重视。本文报道了在生产 β -1,3-葡聚糖酶的菌种筛选与培养、酶的纯化与性质及应用方面所作的初步工作。

1 材料和方法

1.1 材料

冻土毛霉 (*Mucor hiemalis*) 系本系微生物教研室保藏菌种。

诱变平板分离培养基为(%) : 酵母葡聚糖 2.0, Na_3PO_4 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 琼脂 2.0, pH 自然;液体筛选培养基为(%) : 酵母葡聚糖 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 酵母膏 0.01, pH 自然。

酵母葡聚糖为废弃啤酒酵母经碱处理、酸中和、蒸馏水洗涤后所得产品。

自溶酵母采用市售压榨面包酵母和啤酒厂发酵后废啤酒酵母。

1.2 方法

菌株用紫外线诱变^[3];酶活力定量方法^[4]: 0.5ml 0.5% 葡聚糖溶液与 0.5ml 酶液混合, 50℃ 保温 1h 后,加入 4ml 0.05% 铁氰化钾溶液,沸水浴保温 10min,取上清液于 420nm 比色,用蒸馏水作对照,测定吸光度降低值 (ΔA_{420}),以 0~250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 葡萄糖液作标准曲线;酶活力定义:在上述条件下,每 1h 产生 100 μg 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

酵母自溶方法:添加 β -1,3-葡聚糖酶(每克酵母干重加酶 1.3u)的酵母液在搅拌下,50℃ 保温自溶 24h,以不加酶酵母液作对照。

自溶产物分析方法:游离氨基氮测定按甲醛滴定法^[5];还原糖测定按铁氰化钾法(操作同酶活力定量);含盐量定量按硝酸银滴定法^[6];总氮测定按微量凯氏定氮法^[7]。

1997-02-03 收稿

干物质得率(%) = 自溶上清液干重(g) / 酵母干重(g) × 100%

总蛋白质得率(%) = 自溶上清液总蛋白质含量(g) / 酵母总蛋白质含量(g) × 100%

2 结果与讨论

2.1 产酶菌株和发酵条件的确定

出发菌株经诱变筛选获得菌株 I-331, 液体培养 48h 酶活力达到最高 (2.7u / ml)。使用不同碳源培养 I-331: 产酶最适碳源为干粉状酵母葡聚糖; 直接采用酵母细胞培养效果略差; 葡萄糖作碳源时不产酶, 证明β-1, 3-葡聚糖酶是一种诱导酶。加酶直接作培养基不用添加其他的营养成分, 操作简便, 营养效果较好, 适于生产应用, 因此选用酵母作碳源, 经正交试验确定摇瓶发酵产酶条件为: 1% 酵母, 20% 装液量, 初始 pH5.0, 培养 48h。酶活力可达 1.17u / mL。

2.2 酶的纯化

酶经硫酸铵盐析、Sephadex G-100柱层析纯化, 结果见图 1 和表 1。

Toshio M.^[8]和 N.Ohno^[9]分别报道了冻土毛霉产生的两种β-1, 3-葡聚糖酶(一种为内切型, 一种为外切型), 并且通过层析、电泳等方法进行了纯化。因此, 本文获得的仍然是内、外切酶的混合物。就应用来讲, 内切酶在疏松酵母细胞壁方面效率更高, 应作为研究重点。

2.3 酶的性质

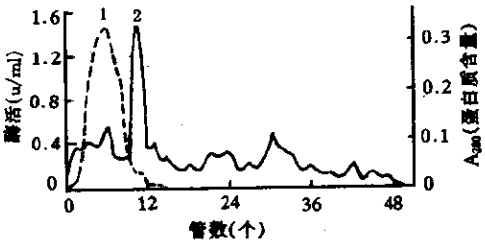


图1 Sephadex G-100柱层析图
1.酶活力(u/ml) 2.A280(蛋白质含量)

酶作用的最适温度为 50℃, 温度超过 50℃ 后, 酶活力迅速降低; 酶在 45~50℃ 范围内比较稳定, 超过此范围酶活力迅速降低至 50% 以下, 温度在 60℃ 以上时, 酶活力完全丧失。酶作用的最适 pH 为 6.0; 酶在 pH4.5~7.0 范围内较为稳定, 超过此范围, 酶活力丧失 50% 以上。

酶作用的最适温度和 pH 与酵母自溶适宜温度 (50℃) 和 pH (6.0) 比较符合, 有利于添加到酵母自溶液中使胞内、胞外酶系协同作用。应该注意的是酶的热稳定性较差, 在应用过程中必需控制好温度。

2.4 酶的应用

随着自溶时间的延长, 面包酵母和啤酒酵母自溶液的 pH 值均呈降低趋势, 自溶液中游离氨基氮含量逐渐升高, 加酶样品的游离氨基氮含量在整个自溶过程中始终比对照样品高。自溶上清液经低温 (40℃) 浓缩后, 呈棕褐色, 鲜香味强烈。产品分析见表 2。

表1 β-1, 3-葡聚糖酶纯化结果

纯 化 步 骤	总 酶 活 (u)	总 蛋 白 (mg)	比 活 力 (u/mg)	得 率 (%)		纯 化 倍 数
				酶活力	蛋白质	
粗 酶 液	1378	6264	0.22	/	/	/
硫酸铵盐析	286.6	133.9	2.14	20.8	2.1	9.73
Sephadex G-100柱层析	62	27.56	2.25	4.5	0.4	10.23

表2 酵母自溶上清液产物分析

样 品	液 渣 比 (w/w)	游离氨基氮含量 (g/100ml)	还原糖含量 (μg/ml)	含 盐 量 (g/100ml)	干物质得率 (%)	蛋白质得率 (%)
啤酒酵母对照	1.99/1	0.410	89.9	0.95	49.33	48.96
啤酒酵母加酶	2.13/1	0.460	106.0	0.94	52.22	53.71
面包酵母对照	3.64/1	0.181	43.2	/	21.30	27.90
面包酵母加酶	3.81/1	0.205	56.6	/	24.00	32.50

添加 β -1,3-葡聚糖酶后,酶作用于酵母细胞壁释放还原糖,一方面使自溶液含糖量提高;另一方面协助酵母自溶,随着胞内物资外渗,自溶液中游离氨基氮含量增加。加酶后促自溶效果明显。自溶液干物质得率和蛋白质得率得以提高,而且自溶液中含盐量基本保持稳定,不会造成产物中盐浓度过高的现象。

参 考 文 献

- [1] David J. M., Alan J. M., James C.P. Biochem. J. 1973, 135: 19~30.
- [2] Pitson S. M., Seviour R. J., McDogall B. M.

Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 178~192.

- [3] 章明春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1984, 99~184.
- [4] Imoto T. Agri Biol Chem, 1971, 35: 1154~1156.
- [5] 中华人民共和国国家标准-食品卫生检验方法(理化部分). GB5009. 39~85 2.2.
- [6] 中华人民共和国国家标准-食品卫生检验方法(理化部分). GB5009. 39~85 2.3.
- [7] 李建武. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994, 160~164.
- [8] Toshio M., Toshiro Y., Haruki Y. et al. Carbohydr Res, 1977, 55: 65~72.
- [9] Ohno, Yoshikazu H., Toshiro Y. Carbohydr Res, 1987, 158: 217~226.

STUDIES AND UTILIZATION OF β -1,3-GLUCANASE PRODUCED BY *MUCOR HIEMALIS*

Wang Yunchuan Yin Weishen

(Department of Grain and Oil Storage, Zhengzhou Grain College, Zhengzhou, Henan 450052)

Abstract A high mutant *Mucor hiemalis* strain I-331 was obtained by using ultraviolet ray. The proper conditions for enzyme production were: 1% yeast, 20% flask's volume of culture, initial pH5.0, culture time 48h. The enzyme was purified by using ammonium sulfate fractionation and Sephadex G-100 gel filtration. The optimum conditions for enzyme's action were 50℃ and pH6.0. The enzyme was stable over 45~50℃ and pH4.5~7.0. The β -1,3-glucanase had strong lytic activity towards the baker's yeast and the brewer's yeast. The effect of autolysis was improved while a little amount of enzyme (1.3u per gram of dry yeast) were added in at the beginning.

Key words β -1, 3-glucanase, *Mucor hiemalis*, Yeast autolysis