

产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的分离鉴定及酶学特性

徐亚男¹, 史学伟¹, 安洋洋², 谈思维¹, 肖婧¹, 童军茂^{*1}

(1. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000; 2. 包头职业技术学院 经管系, 内蒙古 包头 010043)

摘要: 在葡萄酒自然发酵的初期, 非酿酒酵母菌占主导地位, 其产生的 β -葡萄糖苷酶独特的水解活性, 能够赋予葡萄酒特殊的香气。在新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中, 通过对非酿酒酵母菌的采集与筛选, 得到 1 株产 β -葡萄糖苷酶能力较强的菌株; 紫外-微波复合诱变后, 酶活力增加 1.81 倍; 经 26S rRNA 基因序列分析, 鉴定为克鲁维毕赤酵母, 并命名为 XYN086 (*P. kluyveri* XYN086); 酶学性质研究表明: 该菌株所产 β -葡萄糖苷酶最适 pH 为 6.0, 在 pH 6.0~8.0 时酶活力保持 60% 以上; 酶的最适作用温度为 60 °C, 在 60 °C 酶活力保持较好; 金属离子依赖性实验表明, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 对该菌株所产 β -葡萄糖苷酶的酶活力均有激活作用, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Na^{+} 均有抑制作用, 说明此菌株所产的 β -葡萄糖苷酶对金属离子具有依赖性。据以上数据确认, 该菌株为产 β -葡萄糖苷酶克鲁维毕赤酵母。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 非酿酒酵母菌; 酶学特性

中图分类号: Q 939.9 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)010—1100—06

Isolation, Identification and Enzymatic Characteristics of Yeasts Producing β -Glucosidase

XU Yanan¹, SHI Xuewei¹, AN Yangyang², TAN Siwei¹, XIAO Jing¹, TONG Junmao^{*1}

(1. College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Administered by the Department, Baotou Vocational and Technical College, Baotou 010043, China)

Abstract: During the fermentation of wine under natural conditions, non-*Saccharomyces* yeasts predominate in the initial stage of fermentation, and they can produce the unique hydrolytic activity β -glucosidases which give the wine a special aroma. In this study, a strain with good capacity of producing β -glucosidase was isolated from must by the collection and screening of non-*Saccharomyces* yeasts during the fermentation of Xinjiang Cabernet. The strain was identified as *Pichia kluyveri* and named *P. kluyveri* XYN086 by morphology and ITS sequence analysis. The studies on enzymatic properties showed that the optimum pH for the β -glucosidase was 6.0 and its activity remained at more than 60% in pH 6.0-8.0. Furthermore, the optimum temperature for this enzyme was 60 °C and its activity was kept better at this temperature. Metal ions has a great influence on the activity of β -glucosidase, the enzyme was activated by Fe^{2+} and Cu^{2+} , whereas it was inhibited by Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , and Na^{+} . These results showed that XYN086 had the potential

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 新疆生产建设兵团科技攻关项目(P20136500002-1146; 2015AB016, 2016AB009); 新疆生产建设兵团青年科技创新资金项目(DEC_PGUEIK_893341); 新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化项目(2016AD024)。

* 通信作者: 童军茂(1963—), 男, 山东招远人, 工学博士, 教授, 主要从事果蔬贮藏与加工研究。E-mail: 1730233122@qq.com

development values of producing β -glucosidase.

Keywords: β -glucosidase, non-*Saccharomyces*, enzymatic characteristics

β -葡萄糖苷酶在生物能源、食品工业、保健品、农业、医药等领域有着广泛的应用。 β -葡萄糖苷酶属纤维素酶类,在生物能源领域,纤维素发酵生产燃料乙醇等过程中,添加一定的 β -葡萄糖苷酶或产 β -葡萄糖苷酶菌株,可提高纤维素降解的酶反应速率,为生物能源的利用与开发奠定了基础;在食品工业领域, β -葡萄糖苷酶作用于水果中的芳香前体物质,利于果汁脱苦和果汁增香,并可用作食品添加剂;在保健品行业中, β -葡萄糖苷酶应用于大豆异黄酮等,可有效增加产量和降低生产成本,其工业化应用前景较高;在农业领域,生氧 β -葡萄糖苷酶在植物病虫害的绿色防治上具有重大意义;在医药领域, β -葡萄糖苷酶可应用于某些疾病的诊断和治疗。

非酿酒酵母菌是一类自然存在于葡萄表皮、酿酒环境中,能分泌多种胞外酶,通过代谢和自溶提高发酵食品的感官特性,参与复杂新鲜的风味物质形成的酵母菌^[1]。葡萄酒的主要香气成分取决于葡萄中挥发性次级代谢产物的数量和化学性质^[2]。其中,以自由分子或非芳香糖基化前体物质存在的烷烃贡献最大^[3]。 β -葡萄糖苷酶能够显著增加葡萄酒中非芳香糖基化前体物质的水解和芳香物质的释放^[4],在葡萄酒的香气形成过程中起重要作用。在葡萄酒自然发酵过程的初期,非酿酒酵母菌占主导地位,其产生的 β -葡萄糖苷酶独特的水解活性,能够赋予葡萄酒特殊的香气^[5-6]。但是,目前已知菌株产 β -葡萄糖苷酶的酶活力普遍比较低,在一定程度上限制了 β -葡萄糖苷酶的工业化生产。因此,直接从自然界中筛选出产 β -葡萄糖苷酶且酶活较高的菌株是最直接并且最有效的方法。

在新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中,经鉴别培养基采集非酿酒酵母菌,得到一株能分泌 β -葡萄糖苷酶的野生菌株,通过分子生物学鉴定为克鲁维毕赤酵母;并对其酶学特性进行初步研究,证实其在食品工业领域有着良好的应用前景,进一步应用于新疆特色酿造发酵行业中,以期改善产品质量,提高设备利用率,同时为后期的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验葡萄 赤霞珠葡萄,采自新疆葡萄园。

1.1.2 培养基 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(g/dL):葡萄糖 2.0,酵母提取物 2.0,蛋白胨 2.0;pH 7.0,121 °C灭菌 20 min。赖氨酸培养基^[7](g/dL):赖氨酸 0.56,葡萄糖 1.0,KH₂PO₄ 0.1,MgSO₄ 0.05,琼脂 2.0;121 °C灭菌 20 min。筛选培养基(g/dL):葡萄糖 2.0,蛋白胨 2.0,酵母浸粉 1.0,p-NPG 1.0;自然 pH 值,121 °C灭菌 20 min。发酵培养基(g/dL):葡萄糖 2.0,蛋白胨 2.0,酵母浸粉 1.0,NH₄NO₃ 0.3,KH₂PO₄ 0.4;自然 pH 值,121 °C灭菌 20 min,在温度降到 60~70 °C左右加入 0.1 g/dL p-NPG。

1.1.3 仪器 Seven Excellence S400 型 pH 计,梅特勒托利仪器(上海)有限公司制造;SYQ-DSX-280B 手提式不锈钢电热蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂制造;Mini-14K 高速离心机,上海昨非实验室设备有限公司制造;数显气浴恒温振荡器,金坛市精达仪器制造厂制造;7200 型可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司制造;Power Cycler Gradient SL PCR 仪,德国耶拿分析仪器股份公司制造;IEF-SYS 琼脂糖凝胶电泳仪,英国 Biochrom 有限公司制造。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化 葡萄样品经破碎后带皮进行自然发酵,发酵启动后在整个发酵过程中定期取样,以不同浓度梯度涂布于赖氨酸培养基,28 °C培养 48 h,划线分离;重复多次直至得到单菌落后,接种于酵母浸出粉胨葡萄糖培养基,28 °C培养 48 h后,保存于-80 °C冰箱。

1.2.2 产酶菌株的筛选 取试验菌株的菌悬液 0.1 mL,以 10 倍系列稀释至 10⁻¹~10⁻⁶,分别取各个梯度稀释液 1 mL 接种于筛选培养基上,培养 72 h 后,喷 1 mol/L 碳酸钠,选择其中显示黄色光圈的菌株作为初筛菌株;初筛菌株接种于发酵培养基,置于温度 30 °C 的摇床,150 r/min 培养 72 h 后,发酵液于 8 000 r/min 离心 10 min,除菌,收集上清液,于紫外分光光度计 400 nm 下测定吸光值;筛选酶活力

大的菌株,备用。

1.2.3 产酶菌株诱变选育 将筛选出的菌株发酵液在离心机中 5 000 r/min 离心 8 min,弃去上清液,用无菌水重新悬浮;吸取 2 mL 放置于 4 ℃冰箱中作为对照;剩余的菌液,吸取 5 mL 加入无菌平板中,平板置于紫外灯已照射 30 min 的磁力搅拌器上,等距离放置距灯 30 cm 处,照射 20 min,得诱变菌株 1;诱变菌株 1 放入微波源为 2 450 MHz、850 W 的微波炉中,每照射 10 s,冷却 10 s 后再照射 10 s,冷却后在 37 ℃培养 60 h,得到最终诱变菌株。

1.2.4 粗酶液的提取和 β -葡萄糖苷酶活性测定 取诱变菌株和对照菌株发酵液于 4 ℃ 8 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。取 0.05 mL 酶液,将 50 mL 0.2 g/dL p-NPG 溶液,0.15 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲液混合后,30 ℃下水浴预热 10 min 后立即加入碳酸钠中止反应。室温放置 5 min,400 nm 处测吸光值,同时做空白样品;酶活力单位(IU)定义:每分钟生成 1 μ mol 对硝基苯酚用酶量为 1 个酶活单位。酶活力计算公式:

$$X=A \cdot K \cdot V \cdot n / t$$

式中: X 为酶活力 (IU/mL); A 为吸光值; K 为吸光常数; V 为反应总体积; n 为稀释倍数; t 为反应时间。

1.2.5 菌株的分子生物学鉴定 采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取试验菌株 DNA,以所得基因组 DNA 为模板,利用 ITS1 和 ITS4 为引物扩增 ITS 区的基因,PCR 反应体系参照文献[8],将扩增产物送到北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序;将 ITS 序列输入 NCBI(美国国家生物信息中心)的 GenBank 数据库中进行比对,分析序列同源性,确定该菌株的分类地位。

1.2.6 粗酶性质研究

1) pH 对酶活的影响:分别配制 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的柠檬酸缓冲溶液,测定酶活力,以最高点酶活为 100%,其他与之相比得相对酶活,绘制酶最适 pH 值曲线;

2) pH 稳定性研究:粗酶液分别与等量不同 pH 缓冲液混匀,置于 30 ℃下水浴保温 1 h 后,测定剩余酶活,以最高点酶活为 100%,其他 pH 条件下与之相比为相对酶活,绘制酶的 pH 值稳定性曲线;

3) 温度对酶活的影响:在温度分别为 30、40、50、60、70 ℃下测酶活,以最高点酶活为 100%,其他

与之相比得相对酶活,以确定最适反应温度,绘制酶催化温度曲线;

4) 热稳定性研究:粗酶液置于 50、60、70 ℃不同温度下保温一定时间,取出后迅速冷却,以 pH 为 7.0 2 g/dL 葡萄糖溶液为底物溶液,在 30 ℃下测定剩余酶活,以未经处理的酶溶液酶活为 100%,其他温度条件下与之相比为相对酶活,绘制酶热稳定性曲线;

5) 金属离子对酶活的影响:反应体系中加 1 mL 终浓度为 1 mmol/L 的各种金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} ,充分混匀后在 30 ℃下放置 24 h,测酶活,以 1 mL 双蒸水代替金属离子的酶溶液酶活力为 100%,其他金属离子与之相比为相对酶活。

1.2.7 数据分析 独立重复进行 3 次试验,结果是 3 次测定的平均值 $\pm$ 标准偏差,所有曲线以 Origin 8 作图。

2 结果与讨论

2.1 产酶菌株的筛选

以采集于发酵过程中的新鲜葡萄汁为分离源,分离得到具有水解 β -葡萄糖苷酶活性的菌株 3 株,通过 β -葡萄糖苷酶黄色光圈亮度试验,得到黄色光圈较明显的 1 号和 2 号菌株,结果如表 1 所示。

表 1 产酶菌株筛选结果

Table 1 Results of the screening strain

编号	黄色光圈亮度	β -葡萄糖苷酶活力/(IU/mL)
1	++	16.21 $\pm$ 1.20
2	++	13.09 $\pm$ 2.01
3	+	11.38 $\pm$ 1.50

注:“++”表示亮度高;“+”表示亮度较低

由表 1 可知,分离得到的 3 株菌株均产 β -葡萄糖苷酶,通过黄色光圈亮度可知,1 号和 2 号菌株水解能力最强,3 号菌株次之;酶活测定结果表明,1 号菌株产 β -葡萄糖苷酶能力高于其他 2 株,2 号菌株酶活力高于 3 号菌株,表明 1 号和 2 号菌株均具有可能的开发前景,故选择 1 号和 2 号菌株为本次试验初次筛选的菌株。

2.2 产酶菌株诱变选育

将产 β -葡萄糖苷酶能力较好的菌株进行诱变选育,结果见表 2。可知,各菌株经紫外-微波复合诱变后,酶活力均不同程度增大,1 号菌株酶活力增加 (13.12 $\pm$ 1.45) IU/mL,2 号菌株酶活力增加 (5.05 $\pm$

0.29) IU/mL,经诱变后,1号菌株所产 β -葡萄糖苷酶活力明显高于2号菌株,故本次试验所得菌株为1号诱变菌株。

表2 菌株诱变选育对酶活的影响

Table 2 Effect of mutation on β -glucosidase activity

编号	诱变前酶活力/ (IU/mL)	诱变后酶活力/ (IU/mL)
1	16.21 $\pm$ 1.20	29.33 $\pm$ 2.65
2	13.09 $\pm$ 2.01	18.14 $\pm$ 2.30

2.3 26s rRNA 基因序列分析

对1号菌株进行DNA的提取和PCR扩增,通过分子生物学手段鉴定该菌株的ITS核苷酸序列如下:

GTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTCCAAGATTGGCGCCGCGGGAGGGGCAACTTTC CATGGCGCTGAAAATTCAGTCAAACCTGGTCATT TAGAGGTCGTAAAAGTCGTAACAAGTTTCCGTA GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAT ATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAAACACCTA

表3 1号菌株的26s rRNA基因测序BLAST结果

Table 3 BLAST results of 26s rRNA gene sequencing of strain 1

类型	最大值	总值	涵盖	拟合度	相似度	登录
<i>Pichia kluyveri</i> strain SD2S5Y1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 205	1 205	99%	0.0	100%	KC905052.1

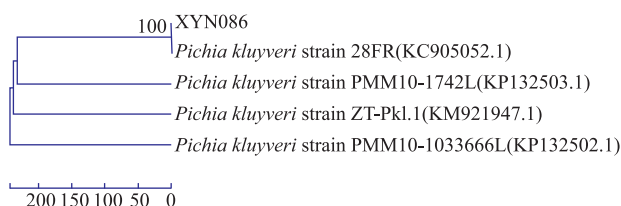


图1 1号菌株(XYN086)基于26s rRNA基因发育树

Fig. 1 Development tree diagram based on 26s rRNA genes of strain 1(XYN086)

2.4 酶的最适pH及其酸碱稳定性

测定不同pH对 β -葡萄糖苷酶活性的影响,如图2所示,随着pH的增加,该菌株所产 β -葡萄糖苷酶酶活力逐渐增大,在pH 6.0时达到最高,pH继续增加,酶活力降低较大幅度,故确定该菌株的产酶最适pH为6.0。

如图3所示,该菌株所产 β -葡萄糖苷酶在pH为6.0时,酶活力保持最佳,在pH 6.0~8.0,可保持

AAATTGTAATACCACAGTCACTAAGTTTAAACAAA
ACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGC
ATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAG
TGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTT
GAACGCACATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGG
CATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGCGCAA
GCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTTCGAAAT
GGAACGTCGTGGACGAAGTGAAGTAACTTTTAG
CACGCTTTGGCCGCCGAACCTTTAACTAAGCTCGA
CCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACA
GGGATTGCCTCACTAGCGCGAGTGAAGCGGCAA
GAGCTCAGATTTGAAATCTCACCTAGTGTGCGAG

见表3,1号菌株的26s rRNA基因序列和BLAST比对结果显示,它与*Pichia kluyveri* strain 28FR菌的26s rRNA (KJ095611)有100%的相似度。构建的系统发育树(图1)表明,1号菌株在*Pichia*属进化树一个分支上。因此,该菌株为克鲁维毕赤酵母,命名为XYN086(*P.kluyveri* XYN086)。

较好酶活力(相对酶活大于60%),在强酸pH为3.0、强碱pH为10.0时,酶活损失较严重,损失率约为80%。说明该菌株所产 β -葡萄糖苷酶在pH 6.0~8.0较稳定,利于 β -葡萄糖苷酶的贮藏和生产。

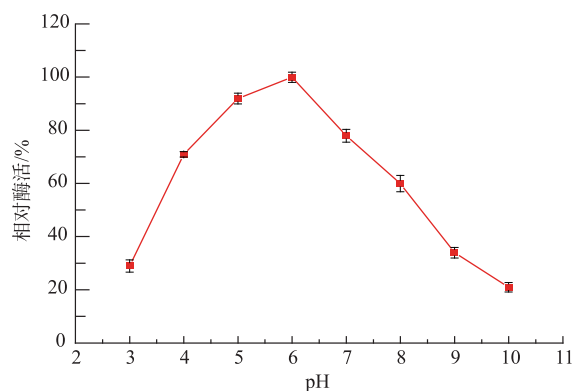


图2 pH对 β -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on β -glucosidase activity

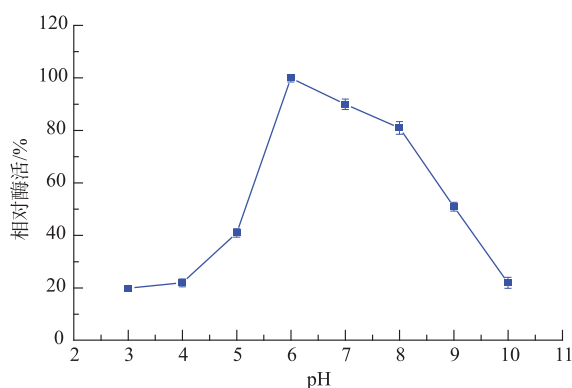
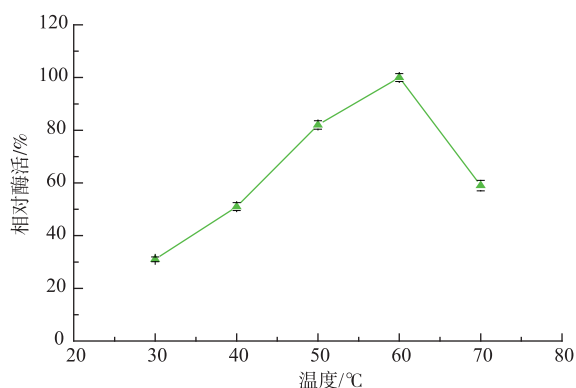


图 3 pH 稳定性

Fig. 3 pH stability

2.5 酶的最适温度及其热稳定性

在不同温度下,测定 β -葡萄糖苷酶的活性,由图4可知,随着温度的增加, β -葡萄糖苷酶活力增大,在60℃时,该菌株表现了最佳酶活力,在50~60℃各菌株均具有较高活性,当温度低于30℃或高于70℃时,酶活力显著降低。

图 4 温度对 β -葡萄糖苷酶活性的影响Fig. 4 Effects of temperature on β -glucosidase activity

如图5所示,随着温度的升高,经一段时间后,酶的活性逐渐降低;在60℃下,在不同时间内,测定的酶的活性相对稳定,保温60 min后,仍保留80%的活性;70℃下保温20 min后,酶活力损失30%,保温60 min后,剩余酶活力仅为21%。由此可知,该 β -葡萄糖苷酶在60℃即最适温度下拥有良好的稳定性。

2.6 金属离子对蛋白酶活性的影响

如表4所示, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 对该菌株所产 β -葡萄糖苷酶的酶活力均有激活作用, Fe^{2+} 的激活作用不明显, Cu^{2+} 的激活作用最强,为 $(136.92 \pm 2.27)\%$; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Na^{+} 对该菌株所产 β -葡萄糖苷酶的

酶活力均有抑制作用, K^{+} 的抑制作用最显著,为 $(43.51 \pm 1.21)\%$,说明该菌株所产的 β -葡萄糖苷酶需要依赖金属离子维持其活性。

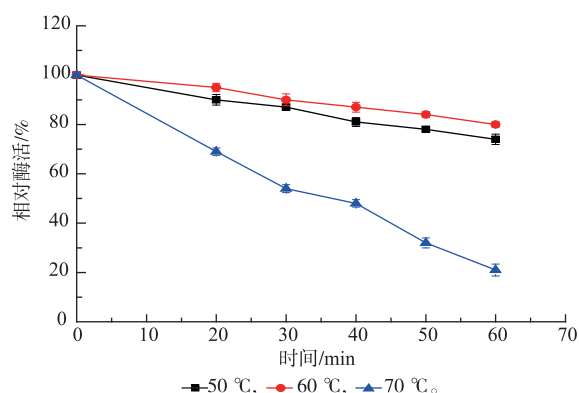


图 5 热稳定性

Fig. 5 Thermal stability

表 4 金属离子对酶活力的影响

Table 4 Effects of metal ions on β -glucosidase activity

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%
双蒸水	1	100±0.0
Ca^{2+}	1	91.23±1.32
Fe^{2+}	1	101.31±0.72
Mg^{2+}	1	78.01±1.53
Cu^{2+}	1	136.92±2.27
K^{+}	1	43.51±1.21
Na^{+}	1	52.07±0.27

3 结 语

在新疆赤霞珠葡萄酒发酵过程中,通过对非酿酒酵母菌的采集与筛选,得到1株产 β -葡萄糖苷酶能力较强的菌株;紫外-微波复合诱变后,酶活力增加1.81倍;经26S rRNA基因序列分析,鉴定为克鲁维毕赤酵母,并命名为XYN086 (*P.kluyveri* XYN086);酶学性质研究表明:该菌株所产 β -葡萄糖苷酶最适pH为6.0,在pH为6.0~8.0时酶活力保持在60%以上;酶的最适作用温度为60℃,在60℃酶活力保持较好;金属离子依赖性发现, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 对该菌株所产 β -葡萄糖苷酶的酶活力均有激活作用, Cu^{2+} 的激活作用最强,为 $(136.92 \pm 2.27)\%$; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Na^{+} 均有抑制作用, K^{+} 的抑制作用最显著,为 $(43.51 \pm 1.21)\%$,说明此菌株所产的 β -葡萄糖苷酶对金属离子具有依赖性。据以上数据确认,该菌株为产 β -葡萄糖苷酶克鲁维毕赤酵母。

参考文献:

- [1] SEGURA-García L E, TAILLANDIER P, BRANDAM C, et al. Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2015, 60(1):284-291.
- [2] van Rensburg S J, BERMAN P A, POTOCHNIK F C V, et al. Glycosylation of transferrin in Alzheimers disease and alcohol-induced dementia[J]. **Metabolic Brain Disease**, 2010, 15(4):243-247.
- [3] MARAI L, KUKSIS A. Simultaneous quantitation of krebs cycle and related acids by mass fragmentography [J]. **Journal of Chromatography (A)**, 2013, 268:447-460.
- [4] RAPP A, MANDERY H. Wine aroma[J]. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2000(8):873-884.
- [5] LAFFORT P, ETCHETO M, PATTE F. Implications of power law exponent in synergy and inhibition of olfactory mixtures[J]. **Chemical Senses**, 2011, 14(1):11-23.
- [6] MULLER C J, FUGELSANG K C. Red wine but not white: the importance of fully characterizing wines used in health studies[J]. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2000, 66(2):447.
- [7] FERNANDEZ R M, LAMY-FREUND M T. Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol[J]. **Biophysical Chemistry**, 2000, 87(2):87-102.
- [8] MANZANARES P, ROJAS V. A preliminary search for anthocyanin-beta-D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts[J]. **International Journal of Food Science and Technology**, 2000, 35(1):95.

科技信息

韩国修订糖、碳水化合物、脂肪、维生素 D、铬等的每日营养成分标准值

2016 年 6 月 16 日,据韩媒报道,韩国食品和药品安全部于 15 日发布了《食品等的标示标准》部分修改告示(案)行政预告。

糖类的每日营养成分标准值规定为 100 g,并对碳水化合物、脂肪、维生素 D、铬等的标准值进行了调整。碳水化合物由 330 g 下调至 324 g,脂肪由 51 g 上调至 54 g,维生素 D 由 5 μ g 上调至 10 μ g,铬由 50 μ g 减至 30 μ g。

另外,为使以婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女等特定人群为对象的食物可以该类人群的推荐摄入量或充分摄入量作为标准进行标示,对“韩国人营养素摄取标准表”进行修改。

根据糖类标准值的制定,对于糖类,要标示营养成分标准值相关比例,营养标示表格图案中追加糖类的“1 日营养成分标准值相关比例(%)”。

[信息来源]WTO 检验检疫信息网. 韩国修订糖、碳水化合物、脂肪、维生素 D、铬等的每日营养成分标准值 [EB/OL]. (2016-6-17). <http://www.wtociq.gov.cn>