

一株产 β -半乳糖苷酶酵母菌株 的选育研究

(甘肃省商业科技研究所, 兰州 730020) 韩 冲 陈 朋 汪永松 冯克宽

摘 要 通过对中国微生物研究所提供的四株酵母菌株的筛选, 从中选出 β -半乳糖苷酶活力较高的马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* Var. *marxianus*, 对此酵母进行诱变后, 得到一株高产 β -半乳糖苷酶的酵母菌株 15D, 并进行了摇瓶和发酵罐培养试验。

关键词 β -半乳糖苷酶 菌株 筛选 诱变

中图分类号: TS201.25 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306 (2002) 08-0033-03

β -半乳糖苷酶 (又称乳糖酶 Lactase) 最早是在年幼动物的小肠内发现的, 后来在某些植物、真菌、酵母菌中发现此种酶, 它可以直接加入牛奶中。由于它在低温时具有水解乳糖的活性, 可以将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖, 所以最早利用 β -半乳糖苷酶是将能产生 β -半乳糖苷酶的微生物用在奶酪的制造和风味的改造上。

利用产酶酵母发酵制备乳糖酶是常用的方法, 国内已有不少的研究。但乳糖酶是一种胞内酶, 产酶活力一般不高, 有待进一步研究。本研究利用经筛选后得到的马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* Var. *marxianus* 进行诱变, 选出一株产酶菌株 15D, 进一步研究它的产酶条件和培养特性。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

邻硝基酚 上海化学试剂公司; 邻硝基苯- β -吡喃半乳糖苷 (ONPG) SIGMA 公司; 硫酸二乙酯 (DES) 由生物所提供; 亚硝基胍 (NTG) 上海化学试剂公司。

乳酒假丝酵母 *Candida Kefyr* (以下简称 A 菌种)、乳酸克鲁维酵母 *Kluyveromyces lactis* Var. *lactis* (以下简称 B 菌种)、乳糖红酵母 *Rhodotorula Lactosa* (以下简称 C 菌种)、马克斯克鲁维酵母马克斯变种 *Kluyveromyces marxianus* Var. *marxianus* (以下简称

D 菌种) 中国微生物研究所菌种保藏管理中心提供。

麦芽汁培养基 麦芽汁配成 10°Be, 自然 pH, 常压灭菌 30min;

发酵培养基 20°Be 糖蜜, 尿素 0.1%, 磷酸二氢铵 0.34%, 硫酸镁 0.15%, 硫酸铜 0.1% pH5.9, 0.055~0.070MPa 压力, 20min 灭菌。

OPTON 万能生物显微镜 德国产, 721 分光光度计 上海第三分析仪器厂; 摇床 中科院武汉科学仪器厂; 离心机 上海医用分析仪器厂; 恒温水箱 北京医疗设备厂; 磁力搅拌器 上海南汇电器器材厂; 5 公升全自动发酵罐 日本产。

1.2 测定方法

1.2.1 酶活力测定

1.2.1.1 样品管 取 1ml 培养液于离心管中 3000r/min 离心 15min, 弃去上清液, 再加磷酸盐缓冲液 1ml, 加甲苯-丙酮混合液 2 滴后充分振荡, 吸取 0.5ml 上清液于试管中, 加蒸馏水 0.5 ml, 再加 ONPG 溶液 2ml, 摇匀, 37℃水浴锅保温 10min, 立即加入 Na_2CO_3 溶液 2ml 终止反应, 取上述反应液于光径 1cm 的比色杯中, 在 721 分光光度计上 (波长 420nm 处) 测定吸光度值 $A_{\text{样}}$ 。

1.2.1.2 标准管 取邻硝基酚标准溶液 1ml, 加甲苯-丙酮混合液 1 滴后充分振荡, 再加磷酸缓冲液 2ml, 37℃水浴锅保温 10min, 立即加入 Na_2CO_3 溶液 2ml 终止反应, 取上述反应液于光径 1cm 的比色杯中, 在 721 分光光度计上 (波长 420nm 处) 测定吸光度值 $A_{\text{标}}$ 。

1.2.1.3 空白管 取磷酸缓冲液 1ml, 加甲苯-丙酮混合液 1 滴后充分振荡, 再加入 ONPG 溶液 2ml, 摇匀, 37℃水浴锅保温 10min, 立即加入 Na_2CO_3 溶液 2ml 终止反应, 取上述反应液于光径 1cm 的比色杯中, 在 721 分光光度计上 (波长 420nm 处) 测定吸光度值 $A_{\text{空}}$ 。

1.2.1.4 测得 $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{标}}$ 、 $A_{\text{空}}$ 之后, 利用如下公式计

收稿日期: 2002-03-30

作者简介: 韩冲 (1945-) 男, 总工, 研究方向: 食品与营养。

算：酶活力单位= (A 样-A 空)× 500mmol/L×2/(A 标-A 空)×10min。

1.2.2 比酶活的测定

1.2.2.1 菌密度的测定 取含有菌种的培养液 1ml , 稀释 10 倍后 ,于光径 1cm 的比色杯中 ,在 721 分光光度计上 (波长 660nm 处)测定吸光度值 A 样。再取空培的麦芽汁培养液 1ml ,稀释 10 倍后 ,于光径 1cm 的比色杯中 ,在 721 分光光度计上 (波长 660nm 处)测定吸光度值 A 空。测得 A 样、A 空之后 ,利用如下公式计算 :菌密度=(A 样-A 空)×10。

1.2.2.2 比酶活的计算方法 测得酶活力单位、菌密度之后 ,利用如下公式计算 :比酶活=酶活力单位/菌密度。

2 菌种选育

2.1 出发菌种筛选

将 A、B、C、D 四个菌株分别接种麦芽汁培养基 , 比较其酶活力及比酶活 ,见表 1。

表 1 四个菌株酶活力及比酶活测定表

菌种	酶活	菌密度	比酶活
A	115.9	1.25	92.7
B	64.1	0.97	66.1
C	23.4	0.34	68.8
D	57.8	0.43	134.4

从表 1 可以看出 ,A、D 酶活比较高 ,但是 D 的比酶活高 ,故选 D 为出发菌。

2.2 诱变

取培养 10h 的菌悬液 (10⁶ 个/ml)1ml ,加入到含有 0.5mg/ml 的亚硝基胍溶液的培养皿中 ,并将处理皿放在接种箱中 ;用紫外灯照射复合处理的方法 ,分别于 30、35、40min 取出 0.5ml 的培养液 ,分别加入生理盐水终止反应 ,然后涂布在麦芽汁固体培养基上 ; 28℃培养 3d 之后 ,挑出大、中、小菌落 48 个 ,分别测定酶活 ,从中选出了酶活最高的 S8 菌株 ;再用硫酸二乙酯复合处理一次 ,测定酶活 ,最后再用亚硝基胍紫外线复合处理一次 ,同上 ,得到酶活最高的 15D ,他们的诱变结果见表 2。

诱变谱 D 原

紫外线 NTG 复合处理 S8 硫酸二乙酯、紫外线 NTG 复合处理 15D

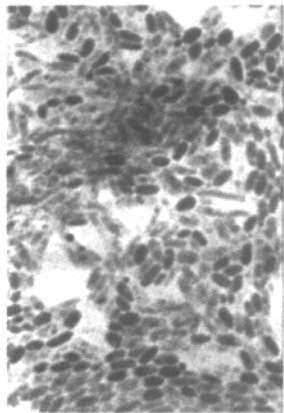
从表 2 可以看出 ,S8 酶活比较高 ,但是 15D 的比酶活最高 ,因此选出变异菌株 15D。

3 产酶条件及小型发酵实验

表 2 出发菌及诱变菌株的酶活测定结果

菌种	酶活	菌密度	比酶活
D 原种	158.6	1.28	124.5
D 传代	123.8	1.12	111.9
S8	182.9	1.20	151.7
15D	156.1	0.92	172.4

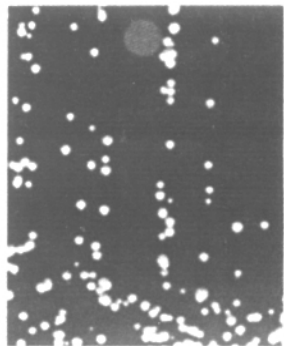
2.3 原种 D 和诱变菌株 15D 的菌形态及菌落形态



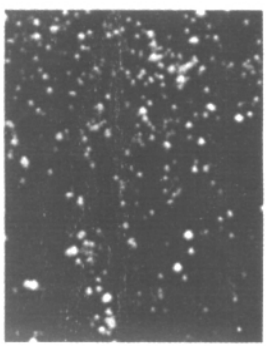
原种 D 的菌形态



诱变菌株 15D 的菌形态



原种 D 的菌落形态



诱变菌株 15D 的菌落形态

3.1 产酶条件

经过我们对产酶条件大量的实验 , 得到如下最优产酶条件 : 在 pH5.9、34℃条件下培养 32h 比酶活较高 ,最佳碳源为糖蜜 ,最佳氮源为尿素+磷酸二氢铵。实验还发现 ,Mg、Cu 对酶的活力有促进作用。

3.2 5L 发酵罐小型发酵实验

在试管和摇瓶培养的基础上 ,采用 5L 发酵罐完成小型发酵实验。

3.2.1 配制培养基 在 20°Be 糖蜜中分别加入 0.1% 尿素、0.3% 磷酸二氢铵、1% CuSO₄、0.15% MgSO₄、pH5.9。

3.2.2 将试管中的 15D 接入到三角瓶中 (接种量为 5%) , 放置在摇床上 , 搅拌速度为 120r/min , 温度 34℃培养 32h ,并测定酶活力。

3.2.3 把培养 24h 后的三角瓶中的 15D , 接入到发酵罐中 ,搅拌速度 500r/min ,34℃培养 32h 后测定酶活力。测定结果见表 3。

表 3 三角瓶及发酵罐培养酶活力的测定

培养方式	酶活	比酶活
三角瓶	156.1	46.3
发酵罐	287.8	22.1

从表 3 中可以看出 , 发酵罐培养方式下酶活力有显著的提高。

4 讨论

对莲心水提取液和 其中沉淀物的保健组分的研究

(南昌大学食品学院, 南昌 330047) 冯启利

摘 要 对莲心这一天然保健产物的水提取液中易产生的沉淀物进行了研究, 采用多种溶剂及溶液检测沉淀物的溶解性, 并采用高效液相色谱分离、紫外分光光度法、薄层层析法和 Dragendorff 试验, 定性检测莲心中的主要保健组分分别在莲心水提取液中及生成的沉淀物中的存在情况, 并初步确定在莲心液中生成的沉淀物基本不含有莲心的主要保健成分, 进而说明在莲心的水提取液中出现沉淀物后, 并不影响其药用及保健价值。

关键词 莲心 保健组分 定性检测

Abstract Aqueous Lotus Seed Stem solution, a natural health product, and its precipitate after standing over a period were investigated in detail. The solubilities of the precipitate in various solvents and solutions were studied. The resulting precipitate solutions and the aqueous Lotus Seed Stem solution were qualitatively analyzed by HPLC, LC-UV, TLC and Dragendorff test. The results showed that the precipitate from aqueous Lotus Seed Stem solution did not contain the major health ingredients. This suggests that the aqueous Lotus Seed Stem solution would keep its active health protection effects even after precipitate was formed in the solution.

Key words lotus seed core; healthy ingredients; qualitative analysis

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306 (2002) 08-0035-03

莲心为莲子中的胚芽, 黄绿色, 是一味具有多种

收稿日期: 2002-04-15

作者简介: 冯启利(1944-) 女, 教授, 研究方向: 农副产品加工及食品分析。

基金项目: 本课题已列入江西省科学委员会科技计划(1999-2001)。

4.1 通过实验我们认为, 亚硝基胍是一种诱变效果较好的诱变剂。在诱变的过程中采用了紫外线与 NTG 复合处理, 同时在挑出诱变菌落后又反复进行了第二次处理, 虽然期间我们也用硫酸二乙酯与紫外线复合处理了一次, 但是效果不明显, 这说明该菌对 DES 不敏感, 因此在选择诱变剂时也要考虑到菌种的敏感性, 这样才能达到预期的效果。

4.2 通过以上实验表明, 产酶条件在 pH5.9、34℃ 条件下培养 32h 比酶活较高, 最佳碳源为糖蜜, 最佳氮源为尿素、磷酸二氢铵的组合。实验中发现, Mg、Cu 离子对酶的活力有促进作用。

药用及保健功能的天然产物^[1], 其药用功能主要是清心消火及治疗热病昏迷、内伤吐血、目赤肿痛等疾病。莲心中所含的非结晶生物碱能扩张血管, 使降压作用强而持久。莲心在我国除了是一味主要的中药外, 民间也常有饮用莲心茶健身的习惯。随着人们保健意识的增强及对莲心保健品的钟爱, 近年来食品科研人员已涉足对莲心的开发研究, 莲心碳酸饮料和莲心茶等这类产品, 都是有着良好市场前景的新生保健品, 莲心水提取液是这类产品必不可少的半成品, 但它的稳定性很差, 这成了开发利用莲心的极大障碍。莲心提取液的不稳定性表现在两方面, 一是褐变速度快; 二是即便经过高效过滤的莲心水提取液, 一般在放置三天后也开始出现沉淀。本文对莲心水提取液在短期(十周)放置过程中生成显著量的沉淀后, 莲心的保健组分在其清液及沉淀物中存在的情况进行定性检测, 目的在于明确莲心水提取液在出现沉淀后, 其保健组分是否发生变化, 保健功能是否受到影响, 为今后在莲心新产品的开发研究过程中制定合理的工艺流程, 选择最佳的提高产品稳定性的方法提供一定的依据。

1 实验仪器

高效液相色谱仪 SHIMADZU LC-10AD; 分离柱 Luna C₁₈; 紫外分光光度计 SHIMADZU SPD-10AV UA-VIS; 沉淀离心机 800 型; 粉碎

参考文献

- 1 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986
- 2 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册. 科学出版社, 1980
- 3 龚广予, 李明. 食品工业, 2000(1): 17~19
- 4 杜连祥等编著. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992
- 5 Halpern, M.G. Industrial Enzymes from Microbial Sources U. S.A. Noyes Data Corporation. 1981