

工业酿酒酵母重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶部分酶学性质的研究

张 强^{1,2}, 陈启和¹, 何国庆¹

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029; 2. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014)

摘 要: 用刚果红法测定 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的酶活力, 研究重组酿酒酵母(*S.cerevisiae*)菌株 SC- β G 分泌表达的重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的部分酶学性质, 并与出发菌株枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)表达的原始酶的性质进行比较。结果表明, 重组酶保持了与原始酶相同的底物专一性。重组酶的最适反应温度为 35℃, 而原始酶为 55℃。重组酶的热稳定性也发生了改变, 40℃热处理 20min 只保留 63.4% 的最初酶活力, 但温度再升高时对热处理敏感度降低, 70℃的热处理 20min 仍保留 45.9% 的最初酶活力; 而原始酶 50℃时稳定, 60℃以上的热处理酶活力损失很大。与原始酶相比, 重组酶的最适 pH 值下降为 pH5.0, 而原始酶为 pH6.5; 相比原始酶在 pH7.0 有最大稳定性, 重组酶在 pH5.5 时有最大稳定性。重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适反应条件与原始酶相比更接近啤酒的实际生产条件。

关键词: 工业酿酒酵母; β -1,3-1,4-葡聚糖酶; 酶学性质

Enzymatic Properties of β -1,3-1,4-Glucanase from Recombinant Industrial *S. cerevisiae*

ZHANG Qiang^{1,2}, CHEN Qi-he¹, HE Guo-qing¹

(1. College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China ;

2. Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract : Enzymatic properties of β -1,3-1,4-glucanase secreted by recombinant *S. cerevisiae* strain SC- β G was examined using Congo-Red method and compared with the native β -1,3-1,4-glucanase from original strain *B. subtilis*. Results showed that obvious differences in enzymatic properties of β -1,3-1,4-glucanase from *S. cerevisiae* strain SC- β G and original strain *B. subtilis* except substrate specificity were observed. The optimal reaction temperature was 35 °C for recombinant β -1,3-1,4-glucanase and 55 °C for native β -1,3-1,4-glucanase. As for thermal stability, recombinant β -1,3-1,4-glucanase remained 63.4% activity after 40 °C heat treatment for 20 min and 45.9% activity after 70 °C heat treatment; in contrast, the native β -1,3-1,4-glucanase was stable below 50 °C and its activity exhibited a significant loss after heat treatment at 60 °C. Moreover, the optimal reaction pH for both enzymes also exhibited an obvious difference, such as pH 5.0 for recombinant β -1,3-1,4-glucanase and pH 6.5 for native β -1,3-1,4-glucanase. Similarly, the optimal pH for stability of both enzymes was 5.5 for recombinant β -1,3-1,4-glucanase and 7.0 for native β -1,3-1,4-glucanase. Therefore, the optimal reaction conditions of recombinant β -1,3-1,4-glucanase are closer to beer brewing conditions so that this enzyme should reveal better effect on beer brewing.

Key words: industrial *S. cerevisiae*; β -1,3-1,4-glucanase; enzymatic property

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)03-0170-03

微生物来源的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(E.C 3.2.1.73, 简称 β -葡聚糖)在啤酒^[1]及饲料^[2]工业上有广泛应用。啤酒工业中, 一些微生物来源的 β -葡聚糖编码基因在酿酒酵母中成功表达^[3]使酿酒酵母菌株有分解 β -葡聚糖的能力, 以消除 β -葡聚糖带来的负面影响。

外源基因在酿酒酵母中表达时, 由于受酶蛋白编码后加工修饰的影响, 使得重组蛋白的性质可能发生变化^[4-5]。本实验对酿酒酵母菌株中表达的来源于枯草芽孢杆菌的 β -葡聚糖酶进行部分酶学性质进行研究, 考察其热稳定性、pH 值稳定性, 希望对表达 β -葡聚糖酶的酿酒

收稿日期: 2009-03-23

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z315); 浙江省自然科学基金重点项目(Z304076)

作者简介: 张强(1980—), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhbuaiji@sina.com

酵母菌株在工业上的利用提供一定的理论信息。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

分泌、表达 β -葡聚糖酶的重组酿酒酵母菌株 SC- β G 由本课题组构建^[6], 能分泌有活性的 β -葡聚糖酶至发酵液; 出发菌株枯草芽孢杆菌 ZJF-1 A5 由本实验室筛选、诱变并保存^[7]。

刚果红(Congo-Red) Amresco 公司; β -葡聚糖标准溶液(300mg/L) Carlsberg 公司; 其他试剂为分析纯。

1.2 β -葡聚糖酶的活性测定方法

根据 He 等^[8]的研究, 取枯草芽孢杆菌 ZJF-1A5 培养 36h 的上清液作为粗酶液; 重组酿酒酵母菌株 SC- β G 转接培养 60h 时的上清液为粗酶液^[6], 测酶学性质。

酶活力测定: 0.9mL 大麦 β -葡聚糖溶液(30 μ g/mL) 50℃预热 10min, 加入 0.1mL 粗酶液, 50℃反应 30min, 煮沸灭活 10min, 冷却至室温。加 1mL 刚果红溶液(100 μ g/mL), 漩涡振荡后室温放置 10min, 测 OD_{540nm} 值^[9-10]。定义每小时分解底物中 1 μ g 大麦 β -葡聚糖的酶量为一个酶活力单位。

1.3 β -葡聚糖酶的底物专一性

用地衣多糖、昆布多糖、羧甲基纤维素以及可溶性淀粉为底物代替大麦 β -葡聚糖, 配制成相同浓度, 按 1.2 节所述方法进行酶活力测定。

1.4 β -葡聚糖酶的最适反应温度

将底物溶液分别在 20、30、40、50、60、70℃ 水浴中保温 10min, 然后加入 100 μ L 待测酶, 振荡摇匀, 在相应的不同温度下反应 10min, 终止反应后冷却至室温, 参照 1.2 节所述方法进行酶活力测定。以最大酶活力为 100%, 其他条件下酶活力与之相比较, 计算相对酶活力(下同)。以不同温度对相对酶活力作图。

1.5 β -葡聚糖酶的热稳定性

待测酶液在 20、30、40、50、60、70℃ 水浴中保温 20min, 立即冰浴, 然后按 1.2 节所述方法进行酶活力测定。以不同温度对相对酶活力作图。

1.6 β -葡聚糖酶最适反应 pH 值

用 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液配制反应底物, 然后按 1.2 节所述方法测定重组酶的酶活力; 用 pH 值为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液配制反应底物, 按 1.2 节所述方法测定原始酶的酶活力。以不同 pH 值对相对酶活力作图。

1.7 β -葡聚糖酶 pH 值稳定性

用 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液稀释重组酶的粗酶液, 然后在

4℃条件下放置 48h; 用 pH 值为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液稀释原始酶的粗酶液, 在 4℃条件下放置 48h, 然后按 1.2 节所述方法对原始酶和重组酶分别进行酶活力测定。以不同 pH 值对相对酶活力作图。

2 结果与分析

2.1 酶的底物专一性

对枯草芽孢杆菌中产生的原始酶与酿酒酵母中产生的重组酶的底物专一性进行检测, 结果表明, 原始酶与重组酶有相同的底物专一性, 都专一作用于大麦 β -葡聚糖和地衣多糖, 而对羧甲基纤维素、昆布多糖以及可溶性淀粉均没有分解能力(表 1)。

表 1 重组酵母分泌的 β -1,3-1,4 葡聚糖酶与原始酶的底物专一性比较
Table 1 Substrate specificities of β -1,3-1,4-glucanases from recombinant *S. cerevisiae* and original strain *B. subtilis*

底物	键型	β -葡聚糖酶	
		原始酶	重组酶
大麦 β -葡聚糖	β -1,3-1,4-	+	+
地衣多糖	β -1,3-1,4-	+	+
昆布多糖	β -1,3-	—	—
羧甲基纤维素	β -1,4-	—	—
可溶性淀粉	α -1,4-1,6-	—	—

注: +, 对底物有分解作用; —, 对底物无分解作用。

2.2 原始酶与重组酶的最适反应温度

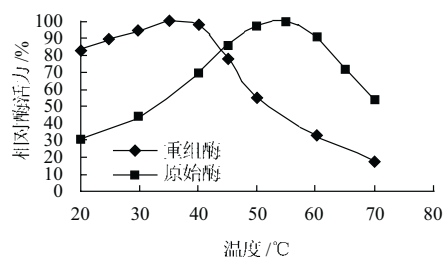


图 1 原始酶与重组酶的最适反应温度

Fig.1 Optimal reaction temperatures of recombinant and native β -1,3-1,4-glucanases

如图 1 所示, 低温下原始酶的相对活性较低, 20℃到 55℃之间原始酶的活性随温度的升高而快速上升, 55℃有最大活性, 温度继续升高相对酶活力迅速下降。而重组菌株在温度较低时仍可以保持较高的相对酶活力, 20℃到 40℃之间的相对酶活力保持在 85% 以上, 最适反应温度为 35℃。

2.3 原始酶与重组酶的热稳定性

由图 2 可见, 20℃到 50℃的热处理对原始酶的活性

基本没有产生影响。50℃处理 20min 以后原始酶依然保持 95% 以上的活性。60℃的热处理使酶活力丧失很快, 酶蛋白只保留了 65.5% 的活性, 而 70℃热处理则丧失了大部分酶活性, 相对酶活力只剩 25.4%。

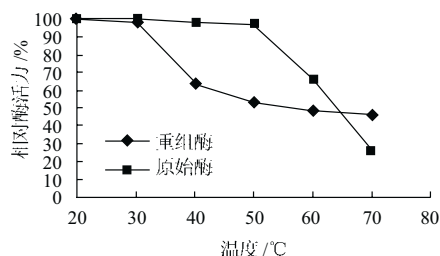


图2 原始酶和重组酶的热稳定性

Fig.2 Thermostability of recombinant and native β -1,3,4-glucanases

相比原始酶 20~50℃热处理的高稳定性, 酿酒酵母中表达的重组酶的热稳定性发生了很大的变化。30℃以下的热处理对重组酶影响很小, 但 40℃热处理 20min 重组酶蛋白只保持了 63.4% 的原始酶活性。40℃到 70℃的热处理对重组酶的影响差别并不大, 70℃热处理后重组酶仍然保持 45.9% 的活性。

2.4 原始酶与重组酶的最适反应 pH 值

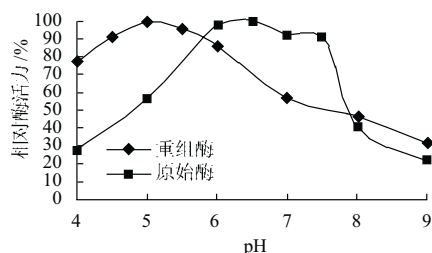


图3 原始酶与重组酶的最适反应 pH 值

Fig.3 Optimal reaction pH of recombinant and native β -1,3,4-glucanases

用磷酸缓冲液(0.1mol/L)分别配制 pH4.0~9.0 的底物溶液, 测 β -葡聚糖酶在不同 pH 值时的相对酶活力, 结果如图 3 所示。原始酶在 pH6.0~7.5 之间有较高的活性, 其最高相对酶活力出现在 pH6.5 时。在 pH 值小于 6.0 及大于 7.5 范围内相对酶活力下降很快; 重组酶的最适 pH 值比原始酶要低, 最高相对酶活力出现在 pH5.0 时, 在 pH4.0 仍有 78% 的相对酶活力。

2.5 原始酶与重组酶的 pH 值稳定性

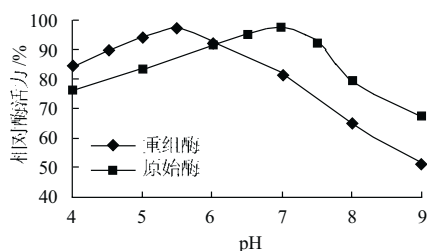


图4 原始酶与重组酶的 pH 值稳定性

Fig.4 pH stability of recombinant and native β -1,3,4-glucanases

由图 4 可见, 与原始菌株产生的 β -葡聚糖酶相比, 重组酿酒酵母表达的重组酶的 pH 值稳定性发生了改变。重组酶在酸性条件下相对稳定, pH5.5 时有最高的稳定性, 而原始酶的最高稳定性在 pH7.0, pH6.0~7.5 之间相对稳定。

3 讨论

外源基因在酿酒酵母中表达时, 由于受酶蛋白编码后加工修饰的影响, 使重组蛋白的性质发生改变, 但文献对外源 β -葡聚糖酶在酿酒酵母中表达后性质改变报道并不多, Olsen 等^[4]与 Meldgaard 等^[5]研究发现, 当芽孢杆菌的 β -葡聚糖酶基因在酿酒酵母中表达后与原始菌株中产生的酶相比在 70℃时的热稳定性有很大提高, 认为主要是受糖基化影响造成的。国内也有 β -葡聚糖酶基因在酿酒酵母中表达的报道, 但未见对其性质进行研究^[11-12]。本研究中发现酿酒酵母表达的重组 β -葡聚糖酶的热稳定性、pH 值稳定性等都发生了很大改变。值得注意的是, 啤酒发酵是在低温(10℃左右)、酸性 pH 值(pH4.0~4.5)条件下进行的, 重组 β -葡聚糖酶的稳定性及最适反应条件与枯草芽孢杆菌产生的 β -葡聚糖酶相比更接近于啤酒的实际发酵条件, 因此酿酒酵母中表达外源的 β -葡聚糖酶比啤酒发酵过程中添加 β -葡聚糖酶制剂有望可以更好的保持活性并降解发酵液中的 β -葡聚糖。

参考文献:

- [1] 李永仙, 顾国贤, 俞中. 耐高温 β -葡聚糖酶在啤酒糖化中的应用研究[J]. 酿酒, 2002, 29(2): 81-83.
- [2] 周根来, 王磊. β -葡聚糖酶在麦类饲料中的应用研究[J]. 中国饲料, 2002(6): 14-16.
- [3] CHEN Y Q, HUANG X Q, SONG D X, et al. Molecular cloning and expression of *Bacillus subtilis* *bglS* gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Current Microbiology, 1992, 25(5): 279-82.
- [4] OLSEN O, THOMSEN K K. Improvement of bacterial β -glucanase thermostability by glycosylation[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 579-585.
- [5] MELDGAARD M, SVENDSEN I. Different effects of N-glycosylation on the thermostability of highly homologous bacterial (1,3-1,4)-beta-glucanases secreted from yeast[J]. Microbiology, 1994, 140: 159-166.
- [6] ZHANG Q, CHEN Q H, FU M L, et al. Construction of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with *bglS* gene insertion into *PEP4* locus by homologous recombination[J]. Journal of Zhejiang University, 2008, 9(7): 527-535.
- [7] 汤兴俊, 何国庆. 热稳定性 β -葡聚糖酶菌株选育及产酶特性[J]. 农业生物技术学报. 2002, 10(4): 385-389.
- [8] HE G Q, TANG X J, CHEN Q H. Optimization of cultural conditions for thermostable β -1,3,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5[J]. Journal of Zhejiang University, 2003, 4(6): 719-726.
- [9] WOOD P J, ERFLE J D, TEATHER R M. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides hydrolases in detection and assay of polysaccharide hydrolases[J]. Methods in Enzymology, 1988, 160: 59-74.
- [10] van RENSBURG P, van ZYL W H, PRETORIUS I S. Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo-beta-1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in yeast[J]. Biotechnology, 1997, 55(1): 43-53.
- [11] 汤晓颖, 秦俊川, 唐国敏, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶基因在工业酿酒酵母中的整合和表达[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 586-591.
- [12] 肖志壮, 王婷, 汪天虹, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶 III 基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 391-396.