

高压脉冲电场激活啤酒废酵母细胞中海藻糖酶活性研究

王 睦, 金 艳, 刘明源, 张美硕, 杨 艺, 林松毅*
(吉林大学营养与功能食品研究室, 吉林 长春 130062)

摘 要: 以啤酒酵母细胞中海藻糖酶活性为研究对象, 以海藻糖得率为衡量指标, 考察不同的电场强度、脉冲数及放置时间对啤酒酵母细胞中海藻糖酶活性的影响情况。研究发现: 在 pH 值为 3 时, 在电场强度为 0~50kV/cm、脉冲数为 0~10 的条件下, 未经电场处理的啤酒酵母细胞中海藻糖得率要略高于经电场处理过的, 同时在经电场处理并放置 2h 以后, 海藻糖的得率逐渐降低, 这说明高压脉冲电场能够在不同程度上激活海藻糖酶的活性, 但海藻糖酶在一定时间内持续作用于已溶出的海藻糖, 导致海藻糖降解。

关键词: 啤酒废酵母; 高压脉冲电场; 海藻糖酶; 激活

Activating Effect of Pulsed Electric Field Treatment on Trehalose Activity in Waste Brewing Yeast Cells

WANG Mu, JIN Yan, LIU Ming-yuan, ZHANG Mei-shuo, YANG Yi, LIN Song-yi*
(Laboratory of Nutrition and Functional Food, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In order to reveal the effect of pulsed electric field (PEF) treatment on trehalose activity in waste brewing yeast cells, trehalose yield was determined under varying conditions of electric field intensity, pulse number and post-treatment standing time. The data obtained showed that PEF treatment at 0—50 kV/cm and 0—10 pulses decreased trehalose yield from brewing yeast cells at pH 3.0 and that trehalose yield from waste brewing yeast cells exhibited a gradual decrease when the post-treatment standing time was over 2 h, indicating that pulsed electric field activates trehalose, leading to the degradation of trehalose in brewing yeast cells.

Key words: brewing yeast cells; pulsed electric field (PEF); trehalose; activation

中图分类号: TS205.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0087-04

海藻糖酶是唯一可以专一性地将海藻糖水解成为两分子葡萄糖单体的水解酶, 在昆虫和真菌代谢系统中有十分重要的作用, 是重要的代谢酶。由于哺乳动物没有海藻糖代谢系统, 以海藻糖酶为靶标开发的新农药对人畜等非靶标生物无毒害作用。因此, 海藻糖酶是目前研究比较热门的一种农药靶标酶, 国内外学者对海藻糖酶的来源、分离纯化、酶学特性及其抑制剂等方面进行了大量研究, 如 Lee 等^[1]通过 30% 硫酸铵沉淀加热, 40%~70% 硫酸铵分级沉淀和丙酮沉淀等方法从蜡螟的幼虫中分离得到海藻糖酶; Valaitis 等^[2]分别采用两种不同的方法分离出舞毒蛾肠中的海藻糖酶; García 等^[3]从大豆根瘤得到的海藻糖酶同时具有水解蔗糖、麦芽糖、蜜二糖、纤维二糖和棉子糖的能力; Dmitryjuk 等^[4]研究的

蛭虫胚胎和幼虫海藻糖酶的最适 pH 值为 8.0, 属于比较罕见的碱性海藻糖酶。

高压脉冲电场(high-intensity pulsed electric field, PEF)技术具有脉冲处理时间短, 由热引起的食品成分的变化较小, 能最大限度的保存食品原有的风味、口感和营养价值等特点, 而成为近期食品工业研究热点技术之一^[5]。据资料表明, PEF 可以抑制番茄汁中过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性, 且当 200Hz 时 POD 抑制率最大; 但也有相关研究表明, 经过 PEF 处理后, 具有活性的蛋白质会被抑制或激活, 如 Zhao 等^[6]使用 PEF 在 35kV/cm 处理溶菌酶 1200 μ s 后发现, 溶菌酶的三级结构展开, 更多的酪氨酸残基包藏于蛋白结构之内, 而更多的色氨酸残基暴露。基于上述现象, 本研究重

收稿日期: 2011-01-24

基金项目: 国家级大学生创新性实验计划项目(2010A83119)

作者简介: 王睦(1988—), 女, 本科, 主要从事营养与功能食品研究。E-mail: liusha1119@126.com

* 通信作者: 林松毅(1970—), 女, 副教授, 博士, 主要从事功能食品研究。E-mail: linsongyi730@163.com

点旨在关注 PEF 技术对啤酒酵母细胞海藻糖酶活性是否存在被激活或者被抑制的作用, 以为后期设计一种抑制或激活啤酒酵母细胞海藻糖酶活性的生产工艺路线提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

啤酒酵母细胞: 实验室保存, 由金汉斯啤酒集团提供酵母泥, 根据前期研究^[7-11]优化获得的预处理工艺流程制备而成, 其生产工艺流程为: 啤酒废弃酵母泥→8g/100mL 酵母悬液→过 80 目筛两次→加 5g/100mL 酒石酸, 沉降 30min→4℃、3600r/min 离心 10min→弃上清液→啤酒酵母细胞。

海藻糖标准品 美国 Sigma 公司; 酒石酸、活性炭、浓硫酸、蒽酮等试剂(均为分析纯) 北京化工厂。

1.2 仪器与设备

高压脉冲电场装置(专利申请号 200410011305.9)为吉林大学殷涌光教授专利产品; LC-2010 高效液相色谱仪、RID-10A 示差折光检测器 日本岛津公司; Sugar-Pak 1 Column 糖分析色谱柱 美国 Waters 公司; AT-330Y 一体化柱温箱 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; T6 新悦型可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; CR20B2 型高速冷冻离心机 日本日立公司; ZD-2 型自动电位滴定仪 上海虹益仪器仪表有限公司。

1.3 方法

1.3.1 海藻糖含量的检测

采用硫酸-蒽酮比色法测定海藻糖含量^[7-11]: 在 550~750nm 波长区域内进行慢速扫描获得图谱, 确定出海藻糖的最大吸收波长为 630nm, 并以海藻糖质量浓度 ρ (mg/mL) 为横坐标, 吸光度 A_{630nm} 为纵坐标, 绘制出海藻糖标准曲线的回归方程为: $A = 6.2745 \times \rho$ ($R^2=0.9984$)。啤酒废弃酵母细胞中海藻糖得率按下式计算。

$$\text{海藻糖得率} / \% = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中: m_1 为上清液海藻糖含量 /mg; m 为干酵母泥质量 /mg。

1.3.2 PEF 电场强度对海藻糖酶活性的影响

将水和酵母细胞按照液料比为 40:1(V/m), 配制 pH 值为 3 的啤酒酵母细胞悬液, 在高压脉冲电场脉冲数为 6 时, 通过对比分析电场强度 0、10、20、30、40、50kV/cm 时, 在其放置 0、1、2、3、4、5、6h 的不同放置时间点样品中海藻糖的得率, 进而考察 PEF 电场强度对海藻糖酶活性的影响。

1.3.3 PEF 脉冲数对海藻糖酶活性的影响

将水和酵母细胞按照液料比为 40:1, 配制 pH 3 的啤酒酵母细胞悬液, 在高压脉冲电场强度 40kV/cm 时, 通过

对比分析不同脉冲数 0、2、4、6、8、10 时, 在其放置 0、1、2、3、4、5、6h 的不同时间点样品中海藻糖的得率, 进而考察 PEF 脉冲数对海藻糖酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 PEF 电场强度对海藻糖酶活性的影响情况分析

对表 1 进行方差分析, 结果如表 2 所示: $F_{(5,30)} = 0.832$, $P=0.537 > 0.05$, 电场强度对海藻糖得率影响不显著; $F_{(6,30)} = 108.657$, $P = 0.000 < 0.001$ 。放置时间对海藻糖得率影响达到极显著水平。

表 1 电场强度与放置时间试验设计方案与结果

Table 1 Trehalose yields under varying conditions of PEF intensity and post-treatment standing time

x_1 电场强度 / (kV/cm)	x_2 放置时间 / h						%
	0	1	2	3	4	5	6
0	4.6142	4.619	6.8673	6.6728	6.5046	6.6367	6.6367
10	4.4173	4.4821	6.7712	6.3845	6.3341	6.6295	6.6295
20	4.3933	4.4965	6.5286	6.716	6.3677	6.2116	6.3269
30	3.6294	4.1146	6.6007	6.7664	6.6223	6.5479	6.5599
40	4.4149	4.7704	7.1267	6.2476	6.2380	6.4782	6.3989
50	4.2347	4.4245	6.2860	7.1339	6.6415	6.3773	6.2764

表 2 电场强度与放置时间的方差分析

Table 2 Variance analysis for trehalose yield as function of PEF intensity and post-treatment standing time

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	显著性
校正模型	40.927	11	3.721	59.646	0.000
截距	1477.760	1	1477.760	23690.261	0.000
电场强度	0.259	5	0.052	0.832	0.537
跟踪时间	40.667	6	6.778	108.657	0.000
总量	1520.558	42			
校正总量	42.798	41			

表 3 电场强度的多重比较分析

Table 3 Multiple comparison of PEF intensity

电场强度 / (kV/cm)	\bar{x}_1	$\bar{x}_1 - 5.858$	$\bar{x}_1 - 5.860$	$\bar{x}_1 - 5.859$	$\bar{x}_1 - 6.0876$	$\bar{x}_1 - 6.088$
0	6.088	0.230	0.229	0.228	0.0004	0
10	6.088	0.230	0.229	0.228	0.0004	
20	6.0876	0.230	0.229	0.228		
30	5.859	0.001	-0.001			
40	5.860	-0.002				
50	5.858					

表 4 放置时间的多重比较分析

Table 4 Multiple comparison of post-treatment standing time

放置时间 / h	\bar{x}_2	$\bar{x}_2 - 6.471$	$\bar{x}_2 - 6.480$	$\bar{x}_2 - 6.451$	$\bar{x}_2 - 6.654$	$\bar{x}_2 - 6.480$	$\bar{x}_2 - 6.697$
0	4.284	-2.190**	-2.200**	-2.170**	-2.370**	-2.410**	-0.201
1	4.485	-1.970**	-1.990**	-1.970**	-2.170**	-2.210**	
2	6.697	0.226	0.217	0.246	0.043		
3	6.654	0.183	0.174	0.203			
4	6.451	-0.020	-0.029				
5	6.480	0.009					
6	6.471						

注: * 在 $\alpha = 0.05$ 水平下, 差异显著; ** 在 $\alpha = 0.001$ 水平下, 差异极显著。下同。

对电场强度及放置时间进行多重分析, 检验结果如表3、4所示: 电场强度对海藻糖得率影响不显著($P > 0.05$), 放置时间对海藻糖得率影响极显著($P < 0.001$)。

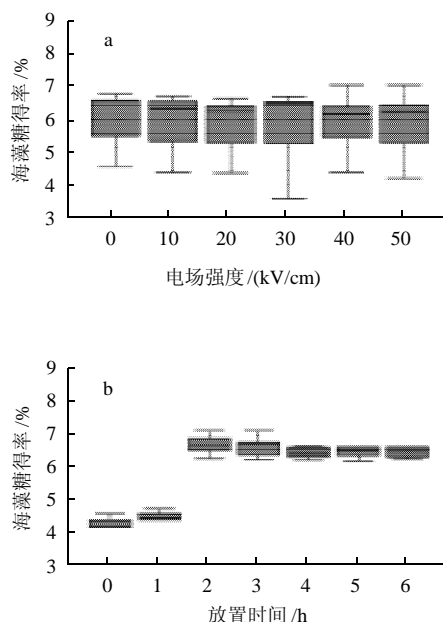


图1 电场强度(a)和放置时间(b)对海藻糖得率的影响
Fig.1 Effects of PEF intensity and post-treatment standing time on trehalose yield

由图1a可知, 电场强度的变化对海藻糖得率分布范围波动不大, 未经电场处理的样品中海藻糖得率总体上要略高于经电场处理的, 这说明高压脉冲电场能够在不同程度上激活海藻糖酶的活性, 导致海藻糖的降解, 故在下一步研究中, 要重点考察其他条件对海藻糖得率的影响, 从而能够抑制海藻糖酶的活性, 提高海藻糖得率; 放置时间对海藻糖得率影响显著($P < 0.05$); 由图1b可知, 海藻糖得率并不是随着放置时间的延长而增加, 而是在4h时有所下降, 可能原因是海藻糖酶的活性中心在经过电场作用后, 随着放置时间的延长开始逐步打开, 活性增强, 因而导致了海藻糖的降解, 具体原因还需要进一步研究与验证。

因此, 电场强度的变化, 对海藻糖得率影响波动不大, 这同时也说明电场强度对海藻糖得率影响不显著; 跟踪时间分别为0、1、2h时海藻糖得率的波动比较明显, 当经电场作用后放置2h, 再进行测定时海藻糖的溶出率最高, 继续延长放置时间, 海藻糖得率的波动不大, 这说明酵母经过电场作用后, 放置一定的时间, 有利于海藻糖更完全的溶出。

2.2 PEF脉冲数对海藻糖酶活性的影响情况分析

表5 脉冲数与放置时间试验设计方案与结果
Table 5 Trehalose yields under varying conditions of pulse number and post-treatment standing time %

x_1 脉冲数	x_2 放置时间/h						
	0	1	2	3	4	5	6
0	6.3197	6.3845	6.7808	6.5022	5.2099	5.7696	5.9233
2	5.9161	6.1467	6.3845	5.7432	4.6839	6.0963	5.7360
4	6.5214	6.6151	7.3501	6.6535	5.4405	4.2419	5.7432
6	6.1251	6.1683	6.3628	6.483	4.9433	5.5030	5.7359
8	6.0194	6.1755	6.7881	6.5959	6.3269	5.4958	5.9449
10	6.3629	6.2260	5.8441	5.3709	4.5830	5.4453	6.1563

表6 海藻糖得率的方差分析
Table 6 Variance analysis for trehalose yield as function of pulse number and post-treatment standing time

变异来源	平方和	自由度	均方值	F值	显著性
校正模型	10.287	11	0.935	4.633	0.000
截距	1497.859	1	1497.859	7420.794	0.000
脉冲数	1.267	5	0.253	1.256	0.309
放置时间	9.019	6	1.503	7.447	0.000
总量	1514.201	42			
校正总量	16.342	41			

脉冲数选取6个水平, 放置时间选取7个水平, 结果如表5所示。对表5进行方差分析结果如表6所示。 $F_{(5,30)} = 1.256$, $P = 0.309 > 0.05$, 脉冲数对海藻糖得率影响不显著; $F_{(6,30)} = 7.447$, $P < 0.001$, 放置时间对海藻糖得率影响达到极显著水平。

表7 脉冲数的多重比较分析
Table 7 Multiple comparison of pulse number

脉冲数	\bar{x}_1	$\bar{x}_1 - 5.713$	$\bar{x}_1 - 6.192$	$\bar{x}_1 - 5.903$	$\bar{x}_1 - 6.081$	$\bar{x}_1 - 5.815$
0	6.127	0.415	-0.065	0.224	0.046	0.312
2	5.815	0.103	-0.377	-0.088	-0.266	
4	6.081	0.368	-0.111	0.178		
6	5.903	0.190	-0.289			
8	6.192	0.480				
10	5.713					

表8 放置时间的多重比较分析
Table 8 Multiple comparison of post-treatment standing time

放置时间/h	\bar{x}_2	$\bar{x}_2 - 5.873$	$\bar{x}_2 - 5.425$	$\bar{x}_2 - 5.198$	$\bar{x}_2 - 6.225$	$\bar{x}_2 - 6.585$	$\bar{x}_2 - 6.286$
0	6.211	0.338	0.786*	1.013**	-0.014	-0.374	-0.075
1	6.286	0.413	0.861*	1.088**	0.061	-0.299	
2	6.585	0.712*	1.160**	1.387**	0.360		
3	6.225	0.352	0.800*	1.027**			
4	5.198	-0.675*	-0.227				
5	5.425	-0.448					
6	5.873						

对脉冲数及放置时间进行多重比较分析, 检验如表 7、8 所示。脉冲数对海藻糖得率影响不显著($P > 0.05$), 说明脉冲数的变化对海藻糖得率影响不大, 脉冲数为 2、4、6、10 时, 未经电场处理的样品中海藻糖得率要略高于经电场处理条件下的, 这说明高压脉冲电场能够在不同程度上激活海藻糖酶的活性, 导致海藻糖的降解; 放置时间对海藻糖得率影响显著($P < 0.05$)。

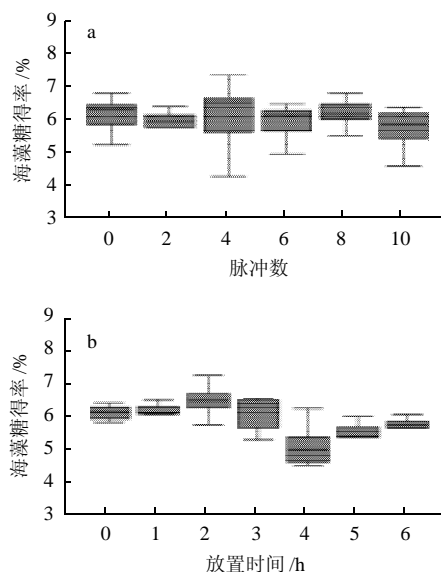


图 2 脉冲数(a)和放置时间(b)对海藻糖得率的影响

Fig. 2 Effects of pulse number and post-treatment standing time on trehalose yield

由图 2 可知, 脉冲数的变化对海藻糖得率影响不大, 这同时也说明脉冲数对海藻糖得率影响不显著; 放置时间分别为 0、1、2 h 时, 海藻糖得率的波动不明显, 当经电场作用后放置 2 h, 再进行测定时海藻糖的溶出率最高, 继续延长放置时间, 海藻糖得率的变化较大。这说明在此条件下, 酵母经过电场作用后, 放置一定的时间, 有利于海藻糖更完全的溶出, 继续延长放置时间, 会导致海藻糖得率下降, 可能原因是海藻糖酶导致海藻糖的降解, 因此通过实验确定放置 2 h 为宜, 这与电场强度单因素试验结果相一致。

3 结 论

当 pH 值为 3 时, 经高压脉冲电场处理的啤酒酵母细胞中海藻糖得率略低于未经电场处理的, 其可能的原因是电场处理激活了海藻糖酶的活性, 导致海藻糖降解; 当啤酒酵母细胞经电场作用后放置 2 h, 海藻糖的溶出率达到最高, 此后才逐渐降低, 可以推测出电场对海藻糖的溶出有促进作用, 但随着酶的作用时间延长, 海藻糖逐渐被分解。故利用高压脉冲电场技术处理后, 可在 2 h 内进行海藻糖的提取; 在一定的 pH 值及液料比条件下, 电场强度及脉冲数因素均对海藻糖得率的影响不显著, 说明当电场强度与脉冲数设定在一定范围内时, 高压脉冲电场均可对啤酒酵母细胞中的海藻糖分解酶产生激活作用。

参考文献:

- [1] LEE J H, TSUJI M, NAKAMURA M, et al. Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2001, 65(12): 2657-2665.
- [2] VALAITIS A P, BOWERS D F. Purification and properties of the soluble midgut trehalase from gypsy moth, *Lymantria dispar*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1993, 23(5): 599-606.
- [3] GARCÍA N A, IRIBARNE C, LÓPEZ M, et al. Physiological implications of trehalase from *Phaseolus vulgaris* root nodules: partial purification and characterization[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(4): 355-361.
- [4] DMITRYJUK M, ŻÓŁTOWSKA K. Purification and characterization of acid trehalase from muscle of *Ascaris suum* (Nematoda)[J]. *Comp Biochem Phys B*, 2003, 136(1): 61-69.
- [5] 殷涌光, 刘静波, 林松毅. 食品无菌加工技术与设备[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [6] ZHAO Wei, YANG Ruijin. The effect of pulsed electric fields on the inactivation and structure of lysozyme[J]. *Food Chemistry*, 2008, 110(2): 334-343.
- [7] 杨渝军, 刘静波, 林松毅, 等. 超声波辅助水浸提啤酒废酵母细胞中海藻糖工艺研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 296-299.
- [8] 刘博群, 刘静波, 李海霞, 等. 废弃啤酒酵母泥除杂、脱苦工艺条件的筛选与其 RNA 提取技术的优化[J]. *食品科学*, 2008, 29(10): 404-407.
- [9] 刘静波, 于一丁, 王睦, 等. 高压脉冲电场促进啤酒酵母细胞 RNA 快速溶出的技术[J]. *吉林大学学报: 工学版*, 2010, 40(4): 1171-1176.
- [10] 林松毅, 王晓丽, 刘静波, 等. 啤酒废弃酵母泥中提取海藻糖的工程化回归模型[J]. *吉林大学学报: 工学版*, 2010, 39(增刊 2): 353-357.
- [11] 林松毅, 王晓丽, 刘静波, 等. 多元线性回归正交设计优化啤酒酵母蛋白酶解工艺[J]. *吉林大学学报: 工学版*, 2009, 39(5): 1229-1233.