

李 聪, 朱晓吉. 超声破碎酵母细胞提取蔗糖酶条件优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 237–239.

# 超声破碎酵母细胞提取蔗糖酶条件优化

李 聪<sup>1</sup>, 朱晓吉<sup>2</sup>

(1. 辽宁石油化工大学化学化工与环境学部, 辽宁抚顺 113001; 2. 辽宁省抚顺市环境科学研究院, 辽宁抚顺 113006)

**摘要:**采用单因素试验和  $L_9(3^3)$  正交试验确定酿酒酵母的最佳超声破碎条件。结果表明, 酿酒酵母的最佳超声破碎条件为: 破碎功率 350 W、总工作时间 25 min、工作时间/间歇时间 15 s/25 s。

**关键词:**酵母细胞; 蔗糖酶; 酶活性; 超声破碎法; 正交试验

**中图分类号:** TS201.2<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)04–0237–03

蔗糖酶(sucrase, EC 3.2.1.26) 别称转化酶, 能催化蔗糖水解产生葡萄糖、果糖, 是一种广泛存在于自然界中的糖苷酶<sup>[1]</sup>。目前蔗糖酶已在农产品加工业<sup>[2]</sup>、食品工业<sup>[3–4]</sup>、医药行业<sup>[5–6]</sup>中发挥重要作用。工业上一般从酵母中提取蔗糖酶<sup>[7]</sup>。蔗糖酶属于胞内水解酶, 提取时须对酵母细胞进行破壁处理, 酵母细胞的破壁方法主要有机械研磨法、酶解法、反复冻融法等<sup>[8]</sup>, 这些方法都有一些不足之处, 例如酶解法耗时、费用高, 机械研磨法操作复杂、损耗大等<sup>[9]</sup>。超声波具有空化效应, 会产生机械剪切压力而使细胞破碎<sup>[10–11]</sup>。本研究采用超声波法破碎酵母细胞, 以期找出有效保存酵母蔗糖酶活性的超声破碎条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) GY 7, 由辽宁石油化工大学化学化工与环境学部实验室保存。

### 1.2 培养基

种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 15 g/L, 氯化钠 4 g/L, pH 值 7.0。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L, pH 值 5.5。

### 1.3 仪器设备

立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); 全温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技生物有限公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 酿酒酵母的培养及收集** 向装有 30 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中接种两环斜面种子, 30 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h, 得到二级种子液。将二级种子液以 10% 的接种量接入 100 mL 发酵培养基中, 29 ℃、摇床转速 160 r/min 条件下培养 27 h 左右。取菌液于 4 000 r/min 离心 10 min, 得到酵母菌体细胞。

**1.4.2 超声破碎酿酒酵母** 将离心得到的菌体用 pH 值 4.6 的醋酸–醋酸钠缓冲液冲洗 2 次, 取菌体 1 g, 加入到 50 mL 缓冲液中充分振荡混匀制成菌悬液, 在超声细胞破碎仪中破碎, 破碎条件按单因素试验和正交试验表进行。

收稿日期: 2013–08–26

作者简介: 李 聪(1984—), 女, 辽宁抚顺人, 硕士研究生, 助理实验师, 研究方向为食品微生物发酵。E-mail: lcfayewong@126.com。

比 1 g : 20 mL 的最佳工艺条件下, 对样品中狼把草总黄酮的提取量在 25.080 4 ~ 25.670 5 mg 之间, 平均提取率为 0.507 2%, 提取效果比较理想。

## 3 小结

本试验采用微波工艺提取狼把草黄酮, 该方法加热耗能少, 成本低, 简单方便。优化所得最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数 75%、微波功率 500 W、提取时间 35 min、料液比 1 g : 20 mL、微波温度 70 ℃, 该优化条件下的平均提取率为 0.507 2%。该研究结果对狼把草总黄酮在药物、食品等领域的深入开发提供了一定参考。

## 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1901.
- [2] 王天勇, 南凤仙, 杨文远. RP–HPLC 法同时测定狼把草中的木

犀草素、槲皮素和芹黄素[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 1996, 17(4): 18–21.

- [3] 万洪善, 李 凡. 盐生植物碱蓬黄酮类物质的提取及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 296–298.
- [4] 鄢春旻. 黄酮类化合物抗病毒及抗炎活性研究[D]. 南京: 南京大学, 2012: 32.
- [5] 才金玲, 单 群, 陆 军, 等. 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织的保护作用[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 289–291.
- [6] Aquila S, Giner R M, Recio M C, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 121(2): 333–337.
- [7] 张 宇, 曲佐寅, 刘立新, 等. 万寿菊茎叶中 2 种黄酮类化合物的体外抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 233–237.
- [8] 张海生, 陈锦屏. 蜂蛹黄酮的提取及体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 158–162.
- [9] 尹爱群, 穆惠军, 江雪欣, 等. 黄酮类化合物研究进展[J]. 中国药事, 2005, 19(11): 50–53.

1.4.3 酵母蔗糖酶的提取 将超声破碎后细胞悬浊液于 12 000 r/min 离心 20 min, 得到上清即为粗酶液。向粗酶液中加入乙醇使其质量分数达 30%, 4 ℃ 放置过夜, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 再追加投入乙醇使其最终质量分数达 50%。4 ℃ 放置 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用双蒸水溶解, 4 ℃ 保存<sup>[12]</sup>。

1.4.4 酵母蔗糖酶活性的测定 取 4 支试管, 各加入 0.5 mL 酶液。将其中 1 支试管置于 100 ℃ 沸水浴 2 min (作参比), 另 3 支试管作平行测定管。向 4 只试管中各加入 2% 蔗糖液 0.5 mL, 置于 35 ℃ 水浴反应 10 min, 然后取出各加入 1 mL DNS 溶液终止反应。用 DNS 法<sup>[13]</sup>在 540 nm 波长下测定还原糖含量。将 1 个酶活力单位定义为在本试验条件下, 1 min 催化 2% 蔗糖生成 1 μg 葡萄糖的蔗糖酶量<sup>[14]</sup>。在葡萄糖标准曲线 (图 1) 上找到所测定光密度值对应的葡萄糖含量, 按下式计算酶活力。

$$\text{蔗糖酶活力} = \frac{x \times n}{V \times t} \quad (1)$$

式中:  $x$  为葡萄糖含量;  $n$  为稀释倍数;  $V$  为酶液体积, 0.5 mL;  $t$  为反应时间, 10 min。

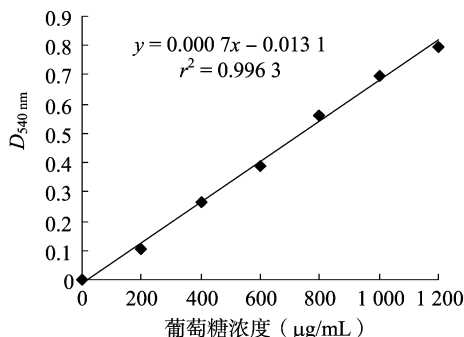


图1 葡萄糖浓度标准曲线

## 2 结果与分析

### 2.1 超声破碎酵母细胞的单因素试验

2.1.1 超声破碎功率的确定 超声破碎功率是影响细胞破碎率的重要因素, 超声破碎功率过小会造成细胞破碎率低, 破碎不完全; 若超声破碎功率过大, 则会引起样品飞溅或产生泡沫。本试验中细胞悬液体积为 50 mL, 因此在 200 ~ 400 W 范围内选择功率。在工作时间/间歇时间为 20 s/25 s、总工作时间 (指超声破碎的总时间, 不包括间隔时间) 25 min、冰浴等条件不变的情况下, 分别以 5 个功率进行超声细胞破碎。

由图 2 可以看出, 当破碎功率为 350 W 时, 提取到的酵母蔗糖酶活力最高, 为 8 515.7 U/mL。当破碎功率小于 350 W 时, 酵母蔗糖酶活力随功率增加而增加, 说明功率越高, 细胞破碎率越高, 蔗糖酶活力也越高; 而当破碎功率大于 350 W 时, 蔗糖酶的活力开始降低, 说明功率过大虽然会增加细胞破碎率, 但由于功率增大的同时对活性物质的破坏力也有所增大, 因此破碎功率选择 350 W 较为适宜。

2.1.2 总工作时间对酵母蔗糖酶的影响 选定破碎功率 350 W、工作时间/间歇时间为 20 s/25 s, 分别以 5、10、15、20、25、30 min 为总工作时间进行超声细胞破碎。破碎后离心取上清, 提取蔗糖酶, 最后测定蔗糖酶活力。

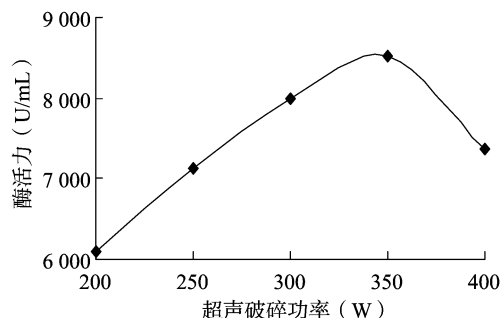


图2 超声破碎功率对酵母蔗糖酶活力的影响

由图 3 可见, 在一定范围内, 随着总工作时间的增加, 蔗糖酶活力逐渐升高, 20 min 之前增加幅度较为显著, 之后趋于缓慢; 当总工作时间达到 25 min 时, 破碎效果最为明显, 蔗糖酶活力最高, 达到 8715.7 U/mL; 30 min 后蔗糖酶活力开始有降低趋势。因此, 超声破碎总工作时间选择 25 min 左右较为适宜。

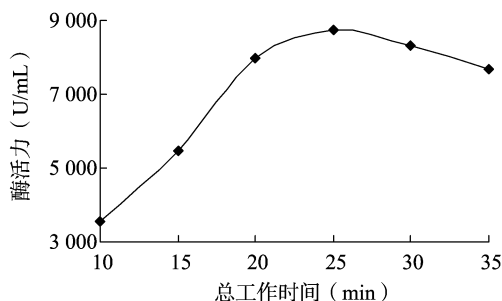


图3 总工作时间对酵母蔗糖酶活力的影响

2.1.3 工作时间/间歇时间对酵母蔗糖酶活力的影响 工作时间/间歇时间是超声破碎过程中的重要因素之一, 其直接影响细胞破碎率, 而且不同时间间隔还会引起超声破碎过程中热效应和空化效应的改变, 影响目的蛋白活性<sup>[15]</sup>。在破碎功率为 350 W、总工作时间为 25 min 条件下, 分别以工作时间/间歇时间为 5 s/25 s、10 s/25 s、15 s/25 s、20 s/25 s、25 s/25 s、30 s/25 s 进行超声细胞破碎。

由图 4 可以看出, 在一定范围内, 随着工作时间/间歇时间的增大, 蔗糖酶活性逐步增高; 当工作时间/间歇时间为 15 s/25 s 时, 蔗糖酶活性达到峰值; 之后蔗糖酶活性有小幅降低; 当工作时间超过间歇时间时, 蔗糖酶活性骤然下降。因此, 选择工作时间/间歇时间为 15 s/25 s 左右进行超声破碎。

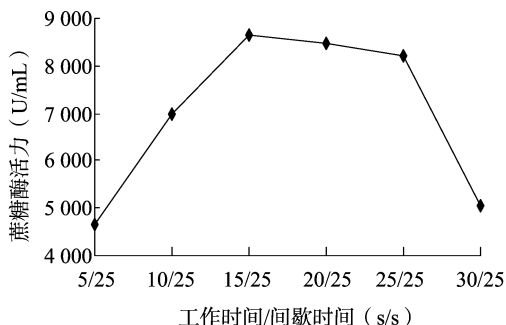


图4 工作时间/间歇时间对酵母蔗糖酶活性的影响

2.2 超声破碎酵母细胞的正交试验

在单因素试验的基础上,选用  $L_9(3^3)$  正交试验表,综合考察超声破碎功率、总工作时间、工作时间/间歇时间对酵母蔗糖酶活性的影响,各因素水平见表 1。

表 1 超声破碎酵母细胞正交试验因素与水平

水平	A:超声破碎功率(W)	B:总工作时间(min)	C:工作时间/间歇时间(s/s)
1	300	20	10/25
2	350	25	15/25
3	400	30	20/25

由表 2 可以看出,超声破碎酵母细胞正交试验结果中,极差的高低顺序为:工作时间/间歇时间 > 超声破碎功率 > 总工作时间,即工作时间/间歇时间对酵母蔗糖酶活性的影响最大,其次是超声破碎功率,影响最小的因素是总工作时间。由表 2 还可见,从酿酒酵母中提取蔗糖酶的最佳超声破碎工艺条件为  $A_2B_2C_2$ ,即超声功率 350 W,总工作时间 25 min,工作时间/间歇时间 15 s/25 s。

表 2 超声破碎酵母细胞正交试验结果

处理	A:超声破碎功率	B:总工作时间	C:工作时间/间歇时间	酵母蔗糖酶活力(U/mL)
1	1	1	1	5 787.1
2	1	2	2	8 601.4
3	1	3	3	5 558.6
4	2	1	2	8 730.0
5	2	2	3	8 787.1
6	2	3	1	6 101.4
7	3	1	3	7 658.6
8	3	2	1	5 687.1
9	3	3	2	8 372.9
$k_1$	6 649.0	7 391.9	5 858.5	
$k_2$	7 872.8	7 691.9	8 568.1	
$k_3$	7 239.5	6 677.6	7 334.8	
R	1 223.8	1 014.3	2 709.6	

方差分析表明,工作时间/间歇时间是影响酵母蔗糖酶活性的显著性因素(表 3)。

表 3 超声破碎酵母细胞正交试验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值 ( $\alpha=0.10$ )	P 值
超声破碎功率	2 247 445.6	2	1.361	9.000	0.142
总工作时间	1 628 826.1	2	0.986	9.000	0.158
工作时间/间歇时间	11 042 127.5	2	6.686	9.000	0.043
误差	1 651 536.3	2			

3 结论与讨论

酿酒酵母细胞壁较厚,在超声破碎过程中超声功率的选择非常重要,功率较小影响酵母细胞破碎率,导致酵母蔗糖酶活力较低;而功率过大则会引起细胞悬液飞溅或产生泡沫。

超声破碎的工作时间/间歇时间对蔗糖酶活力有显著影响,当超声破碎时间大于间歇时间时,超声破碎过程中产生了较多热量,而较短的间歇时间使热量无法散发,从一定程度上破坏了蔗糖酶活性。因此设定工作时间/间歇时间时,应使超声时间短于间歇时间。

本研究以酵母蔗糖酶活力为指标,将超声破碎功率、总工作时间、工作时间/间歇时间列为考察因素,通过单因素试验及正交试验探寻超声破碎酵母细胞的最佳条件。试验优化后的超声破碎条件为超声功率 350 W,总工作时间 25 min,工作时间/间歇时间 15 s/25 s。优化后的超声破碎酵母细胞法与酸碱裂解法、反复冻融法、酶解法相比,更为简便、快捷、经济、实用,适于实验室及小规模破碎酵母提取蔗糖酶等胞内活性物质试验。

参考文献:

[1]郭小路,张万秋,阙瑞琦,等. 薄荷幼叶蔗糖酶的分离纯化与部分性质[J]. 西南大学学报:自然科学版,2008,30(2):90-94.

[2]梁东丽,谷洁,高华,等. 不同禽畜粪便静态高温堆肥过程中蔗糖酶活性的变化[J]. 农业环境科学学报,2009,28(7):1535-1540.

[3]崔俊山,黄晓静,王山,等. 低温生产高活性右旋糖苷蔗糖酶的明串珠菌的筛选[J]. 食品科技,2011,36(12):6-9.

[4]陈冰,林轩,梁诗莹,等. 蔗糖酶水解蔗糖的研究[J]. 湛江师范学院学报:自然科学版,1997,18(2):57-60.

[5]陈维顺,于皆平,沈志祥,罗和生. 蔗糖酶作为大肠腺癌恶变倾向标志的研究[J]. 中国肿瘤临床,1996,23(8):542-544.

[6]吴衍昌,范业鹏,孙秀玲,等. 口腔肿瘤恶变与唾液蔗糖酶活性的相关性研究[J]. 黑龙江医学,2000,7(7):3-5.

[7]余瑞元,倪逸声,王林,等. 大鼠、小鼠胰蛋白酶的分离纯化及动力学性质[J]. 生物化学杂志,1993,9(6):659-663.

[8]杨翠竹,李艳,阮南,等. 酵母细胞破壁技术研究与应用进展[J]. 食品科技,2006,31(7):138-142.

[9]李宏君,尹彤彤,杨启东. 细胞破碎方法简述[J]. 黑龙江医药,2002,15(2):124.

[10]严娟,蔡志翔,张斌斌,等. 桃果肉总酚提取和测定方法的研究[J]. 江苏农业学报,2013,29(3):642-647.

[11]蒋彦婕,吴纪中,张巧凤,等. 紫小麦麸皮花色苷提取工艺及其结构[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):1146-1151.

[12]郑学玲,李利民,姚惠源. 小麦麸皮水溶性戊聚糖的分离及分级纯化[J]. 无锡轻工大学学报:食品与生物技术,2004,23(2):1-4.

[13]Miller G L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent invertase for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry,1959(31):426-428.

[14]徐桦,陆珊华,孙爱民. 酵母蔗糖酶  $K_m$  值的测定[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,1999,19(4):329-331.

[15]戴佳锟,李燕,马齐,等. 从毕赤酵母中提取外源重组蛋白的超声破碎条件及优化[J]. 食品科学,2012,33(10):57-60.