

耐酸性木聚糖酶在清酒酿造中的作用

陆 健 曹 钰 陈 坚 顾国贤

(江南大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘 要 从华根霉(*Rhizopus chinensis* Y92)发酵液中通过离子交换色谱和凝胶过滤色谱分离纯化获得一种耐酸性木聚糖酶 R, 将它和另外 2 种耐酸性木聚糖酶: 米曲霉(*Aspergillus oryzae* RIB128)木聚糖酶 B 和白曲菌(*Aspergillus kawachii* IFO4308)木聚糖酶 C 分别应用于清酒酿造中, 结果表明, 木聚糖酶 B 可以促进米细胞的溶解, 对于原料米的利用率有明显的提高, 而木聚糖酶 C 和木聚糖酶 R 的作用则不太明显。

关键词 木聚糖酶, 华根霉, 米曲霉, 白曲菌, 清酒

木聚糖酶(endo-1, 4- β -D-xylan xy-lanohydrolase EC 3.2.1.8)通过内切方式水解木聚糖分子中 β -1, 4-木糖苷键, 其水解产物主要为木二糖与木二糖以上的寡聚木糖, 也有少量木糖和阿拉伯糖。由于其在造纸、食品和饲料等工业中潜在的应用前景, 越来越引起研究者广泛而深入的关注^[1]。具有新性质的木聚糖酶产生菌仍然一直处于被研究之中。丝状真菌由于分泌出胞外木聚糖酶而且产酶水平高于酵母和细菌而尤为受到重视^[1]。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和白曲菌(*Aspergillus kawachii*)在日本传统发酵食品中应用历史悠久, 而且现在也已经用于工业酶制剂的生产中。这 2 种微生物都产生耐酸性的木聚糖酶, 即: 米曲霉(*A. oryzae* RIB128)木聚糖酶 B^[2]和白曲菌(*A. kawachii* IFO4308)木聚糖酶 C^[3]。

10 年前, 日本的研究者对于白曲菌木聚糖酶在日本大麦烧酒(shochu)中的应用进行了研究, 取得了良好的效果^[4]。清酒(sake)是日本的传统酒, 大米是主要生产原料, 米粒中淀粉层外围有纤维素和木聚糖等半纤维素的包围, 从而影响到对原料中淀粉的利用率, 在日本, 米的价格比较高, 影响到清酒生产的成本。但是由于木聚糖酶有比较复杂的水解

底物特异性, 所以迄今为止还未能找到有效应用于清酒酿造的耐酸性木聚糖酶。

华根霉是中国酿造行业中应用比较广泛的微生物, 通过初步研究, 发现华根霉所产木聚糖酶具有较好的耐酸性, 因此本文首先对从中国曲中分离出的华根霉(*Rhizopus chinensis* Y92)产生的木聚糖酶进行纯化, 这在国内尚属首次; 并着重研究比较了不同曲霉耐酸性木聚糖酶 B、C 和华根霉木聚糖酶在清酒酿造中的作用, 希望能够寻找出适合于酿酒行业应用的耐酸性木聚糖酶, 再通过蛋白质工程来提高产酶水平。

1 材料与方法

1.1 清酒酵母

日本酿造协会清酒酵母 701 号。

1.2 耐酸性木聚糖酶的制备

1.2.1 米曲霉木聚糖酶 B(*Aspergillus oryzae* RIB128)

制备、纯化方法见参考文献[3]。

1.2.2 白曲菌木聚糖酶 C(*Aspergillus kawachii* IFO4308)

制备、纯化方法见参考文献^[4]。

1.2.3 华根霉木聚糖酶 R(*Rhizopus chinensis* Y92)制备和纯化

第一作者: 硕士, 讲师。

收稿时间 2001-09-02

1.2.3.1 粗木聚糖酶的获得

发酵培养基:0.1% 蛋白胨,0.5% 酵母浸出物,0.1% NaNO_3 ,0.1% K_2HPO_4 ,0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.03% 蔗糖,0.001% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2%,小麦麸皮,发酵起始 pH5.5,装液量为 20%,在 25℃ 下培养 60 h。

1.2.3.2 华根霉木聚糖酶 R 的纯化

所有环节下在 4℃ 均进行。发酵液(1 L)经过离心(8000 × g,30 min),过滤,膜(Amicon YM 10 超滤膜,日本)浓缩,10 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 5.0)透析后纯化。粗木聚糖酶进阴离子柱(Poros PI/M,4.6 mm × 100 mm,日本),离子交换柱预先用 40 mmol/L pH5.0 醋酸盐缓冲液平衡,用含 0~1.5 mol/L 的 NaCl 的同种缓冲液连续梯度洗脱,收集有活性的部分,浓缩后进凝胶过滤色谱柱(TSK G2000SW,21.5 mm × 600 mm,Tosoh 公司,日本),用含有 0.2 mol/L NaCl 的 pH5.0 40 mmol/L 醋酸盐缓冲液洗脱,收集有活性部分。

1.3 α -米溶解试验

10 g α -米(已经浸泡、蒸煮过的精白度为 70% 的米)中加入 10 单位(U)木聚糖酶、10 mg GluC-100(含 α -淀粉酶和糖化酶,日本),30 mL 水,在各木聚糖酶最适作用温度和 pH 进行溶解试验,反应停止后,样品经过灭酶、4000 r/min 离心 15 min(4℃),取上清液测定还原糖含量。

1.4 小型清酒酿造方法

清酒酿造按表 1 的方案进行,在初投时加入适量的乳酸并且接入酵母泥,3 投保持 7℃,1 d 后逐日升温(1℃/d)到 15℃ 为止,保持至结束。在 3 投时加入木聚糖酶 1 U/g 米。

1.5 测定方法

1.5.1 木聚糖酶活性的测定方法

粗木聚糖酶采用 RBB-Xylan 方法测定^[4],以排除木糖苷酶的影响,其余各个环节的酶活力测定方法如下:0.2 mL 适当稀释的酶液加入到 40℃ 预保温的 0.5 mL 的 2%

木聚糖(Sigma 公司)和 0.3 mL 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液中,在 pH4.5,40℃ 反应 30 min,释放出的糖按照 Somogyi-Nelson 法测定^[5,6]。酶活单位定义:40℃ 每分钟产生 1 μmol 产物(木糖)为 1 活性单位(U)。

表 1 小型清酒酿造试验方案

	初投	2 投	3 投	合计
总米/g	35	65	100	200
米饭/g	25	55	80	160
米曲/g	10	10	20	40
水/mL	55	75	130	260
时间/d	2	1	1	
温度/℃	15	9	7	

1.5.2 还原糖的测定方法

按照 Somogyi-Nelson 法测定^[5,6],以木糖为标准。

1.5.3 清酒中的乙醇体积分数、相对体积质量、酸度、pH 值的测定方法

见参考文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 3 种耐酸性木聚糖酶的基本性质

2.1.1 华根霉木聚糖酶的纯化

将粗木聚糖酶进入 PI/M 离子交换柱后仅获得 1 个含有木聚糖酶活性的部分,将此部分再经过浓缩后进入凝胶过滤色谱柱(TSK G2000SW),经过 TSK G2000SW 后获得 1 个含有木聚糖酶活性的部分,在聚丙烯酰胺凝胶上显示单一条带,表明该酶已经达到了电泳纯(华根霉木聚糖酶 R 的纯化和性质研究将另文发表)。该纯化的华根霉木聚糖酶被命名为木聚糖酶 R,该酶可以应用于清酒酿造中。

由细菌和真菌产生的木聚糖酶绝大部分是诱导型的^[1],*A. oryzae* RIB128 和 *A. kawachii* IFO4308 在以木聚糖为诱导底物时都产生多组分木聚糖酶^[2,3],*Rhizopus chinensis* Y92 在以小麦麸皮为诱导底物时,比以木聚糖为诱导底物时产生的酶活要高,但是只产生单组分木聚糖酶,据文献报道,合适诱导底物是有效产生木聚糖酶的关键因素

之一^[1],但底物是否会影响到微生物所产生木聚糖酶组分的多少,目前尚不清楚。作者以 *A. oryzae* RIB128 和 *Rhizopus chinensis* Y92 为对象,正在进行研究不同底物对产生木聚糖酶组分多少的影响。

2.1.2 3 种耐酸性木聚糖酶的基本性质

对华根霉木聚糖酶 R 的基本性质进行了研究,结果列于表 2 中。

表 2 3 种耐酸性木聚糖酶的基本性质

酶的基本性质	木聚糖酶 B ^[3]	木聚糖酶 C ^[4]	木聚糖酶 R
分子质量/ku	65	29	75
最适作用温度/℃	55	50	55
最适作用 pH	6.5	2.0	5.0
热稳定性/℃	~50	~50	~55
pH 稳定性	2.0~8.0	1.0~9.0	3.5~8.0

从表 2 可以看出,这 3 种酿造微生物来源的木聚糖酶虽然分子质量不同,但是都有比较好的耐酸稳定性,其中木聚糖酶 C 是典型的酸性木聚糖酶。在清酒酿造的酸性条件下,这 3 种木聚糖酶都可以发挥作用。

2.2 α -米溶解试验

从图 1 可以看出,木聚糖酶 B 能够较好地促进米细胞的溶解,表现在还原糖含量有较大的增加;木聚糖酶 C 和 R 的作用不明显,很可能和这些木聚糖酶的水解底物的特异性有关。

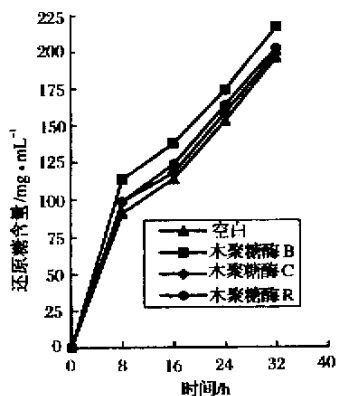


图 1 3 种木聚糖酶对 α -米溶解的影响

2.3 小型清酒酿造

2.3.1 发酵过程

图 2 显示了小型清酒发酵过程,虽然发酵温度比较低(7~15℃),但是加入木聚糖酶 B 的发酵比较快, CO_2 失重在发酵 10 d(即加入木聚糖酶 B 7 d)后明显增加。虽然木聚糖酶 C 能够促进大麦烧酒发酵的效率^[4],但在这里,木聚糖酶 C 和 R 对于清酒发酵过程的促进作用则不明显。

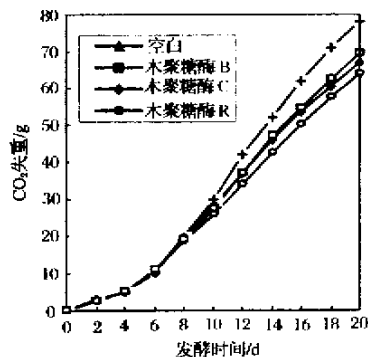


图 2 清酒的发酵过程

2.3.2 发酵结束后清酒的各项指标

表 3 3 种耐酸性木聚糖酶对清酒酿造的影响

指标	空白对照	木聚糖酶 B	木聚糖酶 C	木聚糖酶 R
pH 值	3.99	3.98	3.96	3.96
酸度	3.42	3.52	3.64	3.56
相对体积质量	1.0065	1.0073	1.0066	1.0068
乙醇体积分数/%	15.5	16.6	15.8	15.9

表 3 是发酵结束后清酒的几项主要指标,可以看出,3 种木聚糖酶的添加对于清酒酿造没有负面影响,几项主要清酒指标也都正常,虽然木聚糖酶 C 和木聚糖酶 R 也在一定程度上提高了酒精的产率,但不是很明显,而木聚糖酶 B 有明显的作用,将原料的利用率提高比较多,这表明木聚糖酶 B 是适合清酒酿造用的。

A. oryzae RIB128 和 *A. kawachii* IFO4308 在以木聚糖为诱导底物时都产生多组分木聚糖酶^[2,3],*A. kawachii* IFO4308 所产耐酸性木聚糖酶 C 水解木聚糖主要产生木二糖、木三糖和少量的低聚木糖^[2];研究发现 *A. oryzae* RIB128 所产耐酸性木聚糖

酶 B 水解木聚糖后仅产生木二糖,不同于其他 *A. oryzae* RIB128 木聚糖酶组分水解木聚糖的特性。因此深入研究耐酸性木聚糖酶 B、C 和 R 对不同底物水解的特性,寻找出木聚糖酶水解底物特异性与其应用效果之间的联系,将是一项有意义的研究工作。

致谢 本项目的研究得到了日本国税厅酿造研究所提供的试验用微生物菌种,该研究所酶工程研究室若林三郎室长给予了热情的指导和帮助,江南大学生物工程学院徐岩博士提供了试验用菌种,作者在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Kulkarni N et al. FEMS Microbiol. Rev., 1999, 23:411~456
- 2 Ito K et al. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56: 547~550
- 3 陆 健等. 21 世纪食品. 北京:中国轻工业出版社, 2000. 143~151
- 4 Ogasawara H et al. J. Brew. Soc. Japan, 1991, 86(4):304~307
- 5 Somogyi M. J. Biol. Chem., 1952, 195:19~23
- 6 Nelson N. J. Biol. Chem., 1944, 153:375~380
- 7 日本酿造协会. 国税厅所定分析法注解(第 4 版). 东京:日本酿造协会, 1993

Application of Acid Stable Xylanases in Sake Brewing

Lu Jian Cao Yu Chen Jian Gu Guoxian

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

ABSTRACT Xylanase R was purified by ion exchange chromatography and gel filtration chromatography from *Rhizopus chinensis* Y92. Three acid stable xylanases (xylanase B from *Aspergillus oryzae* RIB128, xylanase C from *Aspergillus kawachii* IFO4308 and xylanase R) were used in sake brewing separately. The fermentation rate and alcohol yield of sake brewing could be improved by adding xylanase B.

Key words xylanase, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, sake

我国食品卫生告别 600 个旧标准

2001 年 11 月 12 日,我国食品卫生方面的有关专家再次会聚北京,讨论形成了新的食品卫生标准文本,这标志着我国食品卫生标准已经全部清理完毕,所有新的标准文本都将会形成,并上报卫生部。

此次清理的卫生标准,包括食品产品标准、污染物标准及食品添加剂、农残、营养强化剂、食品产品的检验方法等标准近 600 个,涵盖了我国所有的现行食品卫生标准。在清理过程中,专家们本着健康保护、促进公平贸易的原则,将我国的标准与国际标准进行比较,进行危险性评估,同时也对过去标准操作过程中发现的问题进行了修正,进一步提高了我国食品标准的科学性和完整性。

新的标准文本一改过去一个产品一个标准的局面,把基本问题相同的标准归在一起,减少了标准的数量,提高了标准的实用性和可操作性,从而更有效地保护了消费者。