

甘露糖蛋白的提纯及分子量测定

张玉香,尹卓容

(山东轻工业学院食品与生物工程学院,山东 济南 250100)

摘要: 用酶法从啤酒酵母中提取的甘露糖蛋白,经乙醇沉淀和 Sephadex G-75 层析柱提纯,样品中含多糖 88%,含蛋白质 12%,薄层层析表明单糖组分中只有甘露糖。葡聚糖凝胶柱层析分析表明此糖蛋白为均一物质,相对分子质量为 32 kda。

关键词: 甘露糖蛋白; 提纯; 分子量

中图分类号: TS262.5 ;TS261.1 ;TS261.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2005)04-0072-03

Purification of Mannose Glycoprotein and Measurement of Its Molecular Weight

ZHANG Yu-xiang and YIN Zhuo-rong

(Food & Bioengineering College of Shandong Light Industry Institute, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: Mannose glycoprotein, distilled from beer yeast by enzyme method, was purified by alcohol deposition and Sephadex G-75 chromatography. The samples contained 88 % polysaccharose and 12 % protein. Samples by thin-layer chromatography suggested that the monosaccharide compositions only contained mannose and samples by sephades column chromatography suggested such glycoprotein was even substance with relative molecular weight as 32 kda. (Tran. by YUE Yang)

Key words: mannose glycoprotein ; purification ; molecular weight

甘露糖蛋白是由甘露糖聚合物共价连接在蛋白质骨架上构成的,位于细胞壁最外层,是组成酵母细胞壁的主要成分之一。标准的甘露糖蛋白是由 5%~20% 肽, 80%~95% 甘露糖组成^[1]。美国 Elizabeth J. Waters 曾报道,甘露糖蛋白呈小球状,分子量范围为 10~450 kda,其中分子量为 32 kda 的甘露糖蛋白可以包围酒石晶核,阻止了酒石晶核的长大,使酒石晶核达到稳定;还可以极大降低蛋白质的非稳定性,使葡萄酒的浑浊度减小,大大降低皂土的使用量;其次它还具有与多酚物质结合的能力,使单宁缩合形成缩合单宁,失去收敛性,从而使葡萄酒变得更加柔和,同时可以使鲜红色的葡萄酒具有成熟葡萄酒典型的宝石红色。李华曾报道在葡萄酒陈酿过程中由酵母菌自溶进入葡萄酒的甘露糖蛋白可以使酒体圆润、柔和,降低涩味。本文研究了啤酒酵母中甘露糖蛋白的提纯方法、成分分析和分子量测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

啤酒酵母, RAPIDASE FILTRATION, Sephadex G-75, 标准蛋白质样品(分别为牛血清蛋白 Mr67000, 鸡卵清蛋白 Mr43000, 胰凝乳蛋白酶原 Mr25000, 溶菌酶 Mr14400), D-葡萄糖, D-甘露糖。

1.1.2 主要仪器设备

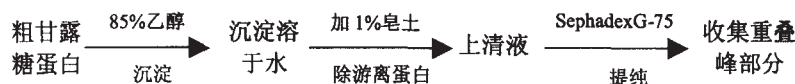
电热恒温水浴锅 (HH-H21-4 型), GYB40-10D 高压均质机, FA2004 电子天平, 721 分光光度计, TDL-5 离心机, QZ-5 型高速离心喷雾机, 紫外检测仪, 恒流泵。

1.2 方法

1.2.1 粗甘露糖蛋白的提取^[2]

啤酒酵母→预处理→均质破壁→酵母悬浮液→自溶→离心分离→沉淀(细胞壁)→酶解→离心分离→上清液→真空浓缩→粗甘露糖蛋白

1.2.2 糖蛋白分离纯化工艺流程



收稿日期 2004-12-24

1.2.3 糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定,以葡萄糖为标准物质^[3]。

1.2.4 蛋白质含量测定

采用凯氏定氮法测定。

1.2.5 Sephadex G-75 凝胶层析提纯甘露糖蛋白

除去游离蛋白后的甘露糖蛋白用 Sephadex G-75 柱(1.0 cm×80 cm)纯化分离,洗脱液为 0.25 % NaCl,流速 1 mL/5 min,每 5 min 收集一管,紫外检测仪 OD₂₈₀ 检测,记录仪画出蛋白质的分布峰,苯酚-硫酸法测各管多糖 OD₄₉₀ 含量,画出多糖分布峰,合并其中蛋白质和多糖的重叠峰部分。

1.2.6 相对分子量测定^[4]

1.2.6.1 标准曲线的测定

采用 Sephadex G-75 柱(1.0 cm×80 cm),洗脱液为 0.25 % NaCl 溶液,洗脱速度为 1 mL/5 min,用标准蛋白质混合液上柱,分别测定它们的洗脱体积,以洗脱体积为横坐标,lg Mr 为纵坐标做图,得到相对分子量标准曲线。

1.2.6.2 样品分子量的测定

取重叠峰部分的多糖蛋白样品,取浓缩液 1 mL(含多糖 54.5 mg),按上述条件上柱,测量其洗脱体积,据标准曲线求出其相对分子量。

1.2.7 样品单糖组分的分析——薄层层析法^[4]

样品处理:柱提纯后的重叠峰部分真空浓缩后,溶于 1 mol/L 的硫酸,封管,在沸水浴中降解 5 h,冷却后用 Ba(OH)₂ 中和,过滤,收集滤液,浓缩,进行薄层层析。薄层层析采用苯胺-二苯胺-磷酸试剂为显色剂,乙酸乙酯-甲醇-乙酸-水(12:3:3:2)为展层剂。

2 结果

2.1 Sephadex G-75 凝胶层析提纯甘露糖蛋白

去游离蛋白后的甘露糖蛋白用凝胶层析进行不同分子量组分的分离,据相关资料用 Sephadex G-75 柱层析,分子较大的组分先洗脱下来,再经一段时间的间隔洗脱得到分子量较小的组分。用 Sephadex G-75 柱层析甘露糖蛋白结果见图 1。

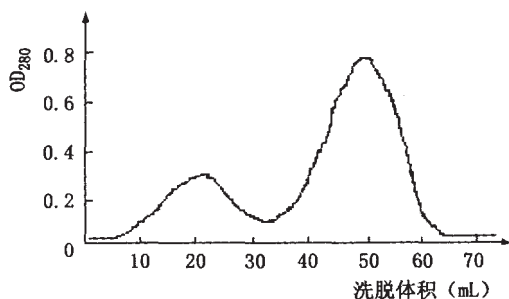
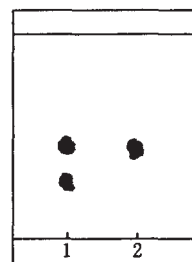


图1 粗甘露糖蛋白洗脱曲线

从图 1 可知,Sephadex G-75 柱层析可以较好地甘露糖蛋白粗分为两部分,收集第一个峰的洗脱液,合并,测得该部分含多糖 19.79 mg,占样品总多糖(103.64 mg)的 19.10 %,该部分多糖含较多色素,呈橙黄色;收集第二个峰的洗脱液,合并,测得该部分含多糖 71.58 mg,占样品总多糖(103.64 mg)的 69.06 %,该部分多糖色素含量少,基本是无色。以下的实验以这部分组分为研究对象。

2.2 成分分析

分析 Sephadex G-75 柱层析洗脱得到的第二个峰部分,苯酚-硫酸法测多糖含量为 71.58 mg,凯式定氮测蛋白质含量为 9.76 mg,多糖:蛋白质为 88:12。薄层层析分析多糖中的单糖组分,结果表明只含甘露糖,见图 2。



1.甘露糖、葡萄糖标准 2.纯化后的样品

图2 薄层层析图

2.3 纯度鉴定

由图 1 可知,Sephadex G-75 柱层析可以较好地甘露糖蛋白进行粗分级,收集重叠峰部分重新上柱,紫外分光光度计测定蛋白质含量,以洗脱体积(mL)为横坐标,OD₂₈₀ 为纵坐标作图。硫酸-苯酚法测定每管的多糖含量,以洗脱体积(mL)为横坐标,OD₄₉₀ 为纵坐标作图。结果显示多糖和蛋白质的出峰位置重叠,表明糖和蛋白质是结合在一起的,此物质是单一均匀的糖蛋白而不是甘露糖和蛋白质的混合物。

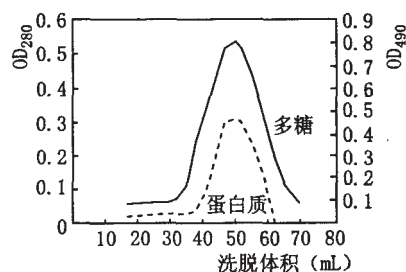


图3 多糖和蛋白的洗脱峰

2.4 分子量的初步测定

先用标准蛋白质混合液上柱,0.25 % NaCl 溶液洗脱,得到洗脱曲线,见图 4。

蛋白的洗脱体积依分子量的增大而减少,4 种标准蛋白质的洗脱体积依次为 19.5 mL,35.8 mL,56.0 mL,78.2 mL。以洗脱体积为横坐标,lg Mr 为纵坐标作图,得

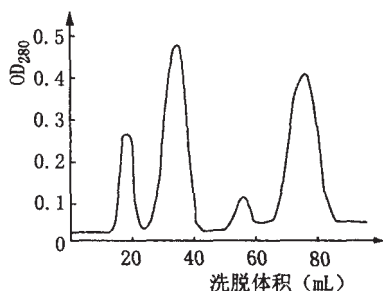


图 4 标准蛋白洗脱曲线

到相对分子量的标准曲线,见图 5。

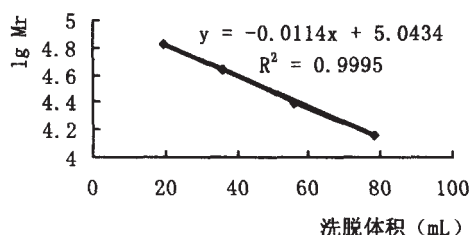


图 5 蛋白质分子量标准曲线

再用纯化后的甘露糖蛋白样品上柱,测得其平均洗脱体积为 47.0 mL。由标准曲线可知甘露糖蛋白的分子量为 32 kda 左右。

3 讨论

3.1 由图 1 粗甘露糖蛋白的洗脱曲线可知,样品中至少有 2 种成分,分子量小的那部分比例较大,Sephadex G-75 凝胶层析法测得其分子量约为 32 kda。分析其成分,结果表明,多糖:蛋白质为 88:12,多糖组分只有甘露糖,且多糖与蛋白质的吸收峰位置重叠,说明此物质为甘露糖蛋白。

3.2 本实验说明,用酶法可以从啤酒酵母中提取得到分子量为 32 kda 的甘露糖蛋白,关于其在葡萄酒中的应用实验正在研究中。

参考文献：

- [1] David R.Cameron,David G.Cooper.The Mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an Effective Biomulsifier[J].Applied and Environmental Microbiology,June,1998,1420-1425.
- [2] 张玉香,尹卓容.甘露糖蛋白的提取[A].山东微生物学会 2004 年学术年会论文集[C].济南:山东微生物学会,2004,295-300.
- [3] 江萍,王义华.三种酵母胞壁多糖的化学组成及血清学试验[J].食品科学,1999,(9) 48-51.
- [4] 张龙翔,张芳.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997.

中国轻工业出版社图书邮购目录

书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)	书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)
酒精工业手册	30.00	5.00	葡萄酒工业手册	48.00	8.00
酒精与蒸馏工艺学	55.00	10.00	*白兰地工艺学	20.00	4.00
酒精工艺学(中专教材)	18.00	3.00	*新版配制酒配方	20.00	4.00
酒精蒸馏技术(第二版)	56.00	10.00	果酒工艺学(中专教材)	20.00	4.00
*生料酿酒技术	36.00	6.00	特种啤酒酿造技术	24.00	4.00
*玉米酒精生产新技术	50.00	10.00	啤酒工业手册	98.00	12.00
白酒生产技术全书	120.00	18.00	啤酒生产问答(修订版)	32.00	6.00
固态法白酒生产技术	12.00	2.00	啤酒生产工艺(技工教材)	48.00	10.00
白酒生产指南	32.00	5.00	啤酒工艺学(中专教材)	36.00	7.00
白酒工人培训教程	55.00	10.00	黄酒工艺学(中专教材)	18.00	3.00
低度白酒生产技术	30.00	6.00	黄酒生产工艺(第二版)	36.00	7.00
白酒勾兑技术问答	16.00	3.00	*药酒生产实用技术	28.00	5.00
小曲白酒生产指南	22.00	4.00	药酒配方 800 例	15.00	3.00
白酒工艺学(中专教材)	15.00	3.00	酶制剂应用手册	28.00	5.00
白酒生产问答	40.00	6.00	酶制剂应用技术	20.00	4.00
酿造酒工艺学(第二版)	50.00	10.00	新编调酒师手册	36.00	7.00
*英汉意法葡萄酒词典	45.00	7.00	调酒师教程	40.00	6.00
*葡萄酒酿造学—原理及应用(引进版)	88.00	14.00	工业微生物实验技术手册	30.00	6.00
*国际葡萄酒药典——葡萄酒辅料标准	28.00	5.00	英汉发酵工业词汇	30.00	6.00
*葡萄酒品尝法	20.00	4.00	*发酵食品微生物学(引进版)	85.00	12.00
葡萄酒酿造与欣赏	16.00	3.00	生物工程设备	50.00	8.00

- (1) 邮购办法:收款地址:北京东长安街 6 号 中国轻工业出版社·发行部 收款人:读者服务部
邮政编码:100740 联系电话:010-65241695 传真:010-65129020
- (2) 字迹务必清楚,以免误投。在汇款单的“附言”栏内注明所购书名和册数 (3) 有*号为近期出版的新书。