

啤酒废酵母酶法制备生物活性肽的工艺研究

吴鑫颖^{1,2}, 邱树毅^{1,2}, 凌秀梅^{1,2}

(1. 贵州大学化学工程学院, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 以啤酒废酵母为原料, 经菠萝蛋白酶酶解、分离、纯化、干燥等工序制得啤酒废酵母活性肽。试验通过单因素及响应面分析确定了菠萝蛋白酶对废酵母的最佳酶解条件: 酶解温度 40.61 , pH6.58, 酶用量 2.62 % (w/w)。酶解后多肽得率可达到 50.97 % (w/w)。

关键词: 综合利用; 啤酒废酵母; 生物活性肽; 菠萝蛋白酶; 酶水解

中图分类号: TS261.1; X797

文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2008)02- 0110- 04

Technical Research on the Preparation of Polypeptides from Waste Beer Yeast by Enzymatic Hydrolyzation

WU Xin-ying^{1,2}, QIU Shu-yi^{1,2} and LING Xiu-mei^{1,2}

(1. Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003; 2. Fermentation Engineering & Bio-pharmacy Key Lab of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: Waste beer yeast polypeptides were made from waste beer yeast by bromidic hydrolyzation, separation, purification and dryness etc. The optimum bromidic hydrolyzation conditions of waste beer yeast were determined by single factor and response surface analysis experiments as follows: temperature at 40.61 , pH value as 6.58, and the use level of enzyme was 2.26 % (w/w). The yield of peptide could achieve 50.97 % (w/w).

Key words: comprehensive utilization; waste beer yeast; polypeptides; bromelin; enzymatic hydrolyzation

我国 2006 年年产啤酒 3515 万 t, 每年需处理的废酵母泥 60~90 万 t。啤酒废酵母是一种营养丰富、价格低廉的蛋白源, 其中蛋白质占酵母干重的 45%~60%。目前处理方法主要是将其直接干燥成饲料蛋白原料, 但因细胞壁在畜体内不易被消化, 核酸含量偏高, 而限制了其发展和运用。本试验采用蛋白酶水解啤酒废酵母中的蛋白质来制取生物活性肽, 可在充分利用啤酒废酵母、有效处理啤酒生产废渣的同时, 获得一定的经济效益, 为啤酒行业循环经济的发展开创新思路。

生物活性肽是分子量在 180~1000 之间的, 一定氨基酸顺序的小肽、寡肽、低聚肽^[1], 具有免疫调节、抗菌、抗肿瘤等多种生理活性作用, 它比氨基酸更易被人体吸收, 可获得更高的生物效价和营养价值, 是目前研究的热点之一^[2~4]。酶水解蛋白质的方法具有反应条件温和、反应时间短、效率高、不产生消旋作用、也不破坏氨基酸、产品纯度高、产物易分离、成本低廉等优点^[5], 优于传统的化学水解法, 是制备活性肽较好的方法。目前制取生物活性肽的原料多采用大豆、花生等, 啤酒废酵母作为原料研究的相关报道较少, 本研究对生产生物活性肽

的原料多样性及啤酒废酵母的综合利用研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 啤酒废酵母, 贵州蓝剑瀑布啤酒集团有限公司提供。

NaHCO₃、NaOH、HCl、三氯乙酸(TCA): 分析纯; 活性炭: 工业级。SephadexG- 25: Superfine Amersham Biosciences 公司生产; 菠萝蛋白酶 (Bromelain from pineapple stem): Sigma 公司生产。

1.2 仪器

pHS- 25 型精密数显酸度计, 电热恒温水浴锅, TDL- 40B 型离心机, UV- 2500 型紫外分光光度计, KTA purifine 制备色谱仪; $\phi 1.6 \times 100$ cm 层析柱; 旋转蒸发仪 RE- 52B; 真空干燥器; ALPHA1- 4 冷冻干燥机。

1.3 检测方法

多肽分离方法为三氯乙酸 TCA 沉淀法。即取出 10 mL 酶解后的上清液加 10 mL 20 % (w/w) 的 TCA, 搅匀静置 30 min 后, 4800 r/min 下离心 10 min, 所得上清

收稿日期: 2007- 10- 26

作者简介: 吴鑫颖(1975-), 女, 安徽人, 硕士, 讲师。

液^[TCA]分别用凯氏定氮法^[6]和甲醛滴定法^[7]测定上清液中的总氮含量和氨态氮含量, 多肽氮量和多肽得率按下式进行计算^[7]:

多肽氮量 = 上清液^[TCA]总氮量 - 上清液^[TCA]氨态氮量

多肽得率 = $\frac{\text{上清液}^{[TCA]} \text{多肽氮量}}{\text{原料总蛋白氮量}} \times 100\%$

1.4 制备工艺流程及其要点

啤酒废酵母 → 预处理 → 酶解 → 灭酶 → 除杂 → 离心分离 → 收集上清液 → 脱色、除臭 → 凝胶层析分离 → 真空冷冻干燥 → 活性多肽成品

1.4.1 啤酒废酵母的预处理

为了除去啤酒废酵母泥中一定量的大颗粒酒花、树脂等杂质, 需对酶解前的废酵母进行预处理。将啤酒废酵母加入 2 倍体积的 0~4 无菌水, 搅拌均匀后, 用 80 目筛网滤去杂质, 然后加入 1 倍体积的 0~4 无菌水, 并添加 1%(w/w) 的 NaHCO₃, 反应 15 min 后, 倾去上清液, 用蒸馏水洗涤 2~3 次, 离心所得废酵母用 NaOH 溶解其中的蛋白质后 (pH9.0), 再用 HCl 沉淀蛋白质 (pH4.5) 后, 离心分离后备用。

1.4.2 酶解

取一定量经预处理的废酵母蛋白, 加入 200%(w/w) 的水, 在一定的 pH 值、温度、时间条件下用一定量的菠萝蛋白酶进行酶解。

1.4.3 灭酶

将酶解液迅速升温到 95℃, 维持 15 min, 让酶失活。

1.4.4 除杂

酶解所得的多肽液中含有一些核酸杂质, 本试验用等电点沉淀法去除核酸。

1.4.5 离心分离

多肽液在 3000 r/min 条件下, 离心 15 min。

1.4.6 脱色

用活性炭吸附柱对离心所得的上清液进行吸附脱色、除臭。

1.4.7 凝胶层析分离

试验选用分离分子量范围为 1000~5000 的葡聚糖凝胶 (Sephadex G-25) 精制、纯化多肽液。将凝胶 Sephadex G-25 经过 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液溶胀后, 装入内径为 1.6 cm、高度为 100 cm 的层析柱中, 加入多肽液 5 mL, 用 pH 为 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 流速控制为 0.5 mL/min, 最后在波长为 280 nm 条件下检测洗脱成分。

1.4.8 真空冷冻干燥

分离所得组分, 经真空浓缩、真空冷冻干燥后能形成乳白色、略带苦味、有酵母香、易溶于水的均匀粉末。这种干燥方式能较大程度地保护多肽的活性, 提高成品

的品质。

2 结果与分析

2.1 菠萝蛋白酶酶解条件的优化

2.1.1 对影响菠萝蛋白酶酶解的各因素进行单因素分析

对影响菠萝蛋白酶的酶解程度的酶用量、反应 pH、时间、温度几个重要因素进行单因素试验, 各因素条件对多肽得率的影响见图 1~图 4。

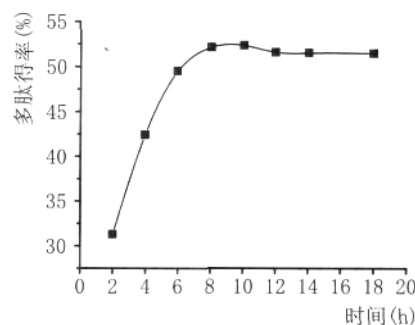


图 1 反应时间对多肽得率的影响

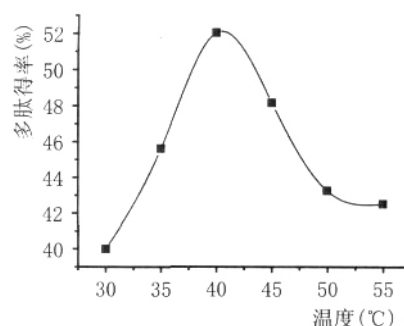


图 2 反应温度对多肽得率的影响

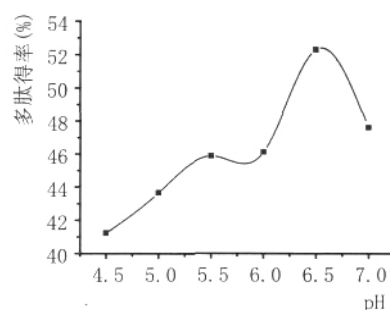


图 3 pH 对多肽得率的影响

由各图中各曲线的变化趋势可知, 较佳的酶解条件为: pH6.5, 酶解温度 40℃, 酶按干酵母泥中所含蛋白质量的 2.5%(w/w) 加入酵母悬液, 酶解时间为 10 h。

2.1.2 对影响菠萝蛋白酶酶解的各因素进行响应面分析

为了更好地了解各因素之间的交互作用, 确定最佳酶解条件, 在单因素实验结果的基础上, 采用响应面分析法对用菠萝蛋白酶酶解啤酒废酵母中蛋白质的条件

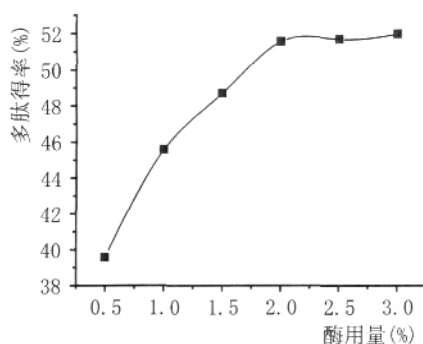


图 4 酶用量对多肽得率的影响

进行优化。

2.1.2.1 因素水平的选取

根据 central composite 的中心旋转实验设计原理, 用响应面分析法对影响较大的酶解温度、pH、酶用量 3 个因素进行分析, 根据单因素分析选取因素水平。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 因素水平设计

水平	X ₁ 温度(℃)	X ₂ pH	X ₃ 酶用量(%)
-1	35	6.0	2.0
0	40	6.5	2.5
1	45	7.0	3.0

2.1.2.2 实验设计与结果

设定 X₁= 酶解温度, X₂= 酶解 pH, X₃= 酶用量, 以 3 次实验所得多肽得率的平均值为响应值(Y), 实验设计与实验结果见表 2。采用 Design- Expert 软件对所得数据进行分析, 回归分析结果见表 3, 响应面分析结果见图 5、图 6、图 7。

表 2 响应面分析方案与试验结果

序号	因素			Y 多肽得率 (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	1	1	46.47
2	-1	0	0	47.31
3	0	0	0	51.19
4	0	0	1	49.89
5	0	0	0	51.21
6	1	0	0	48.91
7	-1	-1	1	44.54
8	1	1	1	47.05
9	1	1	-1	46.03
10	0	-1	0	48.56
11	0	0	-1	49.45
12	-1	-1	-1	43.67
13	-1	1	-1	45.44
14	1	-1	1	46.95
15	0	0	0	51.01
16	0	1	0	49.71
17	1	-1	-1	45.18

采用 Design- Expert7.0 程序对响应值与各因素进

行回归拟合后, 得到回归方程:

$$Y = -465.0522 + 9.3087X_1 + 90.4730X_2 + 22.4156X_3 - 0.1375X_1X_2 + 0.0445X_1X_3 - 0.2950X_2X_3 - 0.1049X_1^2 - 6.3904X_2^2 - 4.2504X_3^2$$

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性, 由表 3 可以看出, 最显著的因素为一次项 X₁, X₂, X₃, 二次项 X₁X₁, X₂X₂, X₃X₃, 其次为交互项 X₁X₂。回归方程也是高度显著的, 相关系数 R₂=91.78/92.52=99.2%, 说明响应值的变化有 99.2% 来源于所选变量, 即酶解温度、pH 及酶用量。因此, 回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系, 可以利用该回归方程确定菠萝蛋白酶最佳酶解条件为: 酶解温度为 40.61, pH 为 6.58, 酶用量为 2.62%(w/w), 在此条件下进行提取, 由回归方程预测多肽得率可达到 51.07%(w/w)。

表 3 回归分析结果

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	9	91.78	10.20	96.43	<0.0001	☆☆
X ₁	1	4.48	4.48	42.32	0.0003	☆☆
X ₂	1	3.36	3.36	31.81	0.0008	☆☆
X ₃	1	2.63	2.63	24.89	0.0016	☆☆
X ₁ X ₂	1	0.95	0.95	8.94	0.0202	☆
X ₁ X ₃	1	0.099	0.099	0.94	0.3655	
X ₂ X ₃	1	0.044	0.044	0.41	0.5416	
X ₁ ²	1	18.43	18.43	174.27	<0.0001	☆☆
X ₂ ²	1	6.84	6.84	64.67	<0.0001	☆☆
X ₃ ²	1	3.03	3.03	28.61	0.0011	☆☆
误差	7	0.74	0.106			
总和	16	92.52				

注: ☆为显著(P<0.015), ☆☆为高度显著(P<0.01)。

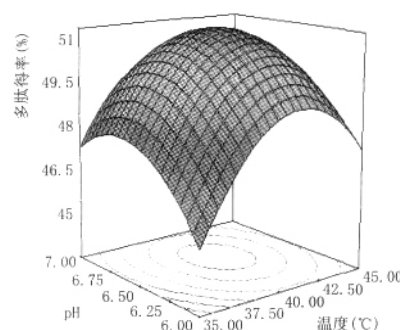


图 5 多肽得率对酶解 pH 与温度的响应面

在上述响应面分析法求得的最佳条件下进行酶解, 发现响应值与回归方程预测值吻合良好, 结果见表 4。

2.2 不同的预处理方案对酶解多肽液成分的影响

将用菠萝蛋白酶酶解后的多肽液, 经灭酶、除杂、离心、脱色后, 用葡聚糖凝胶(SephadexG- 25)层析柱分离纯化, 用 Tris- HCl 缓冲液洗脱, 在波长为 280 nm 条件下, 所得的洗脱曲线见图 8。由图 8 可知, 葡聚糖凝胶(SephadexG- 25)层析对多肽液中的多组分进行分离,

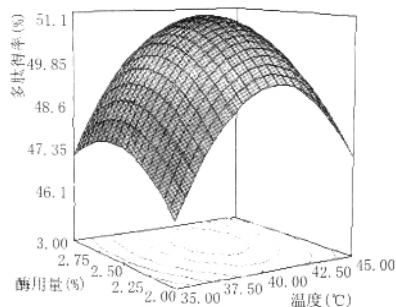


图6 多肽得率对酶用量与酶解温度的响应面

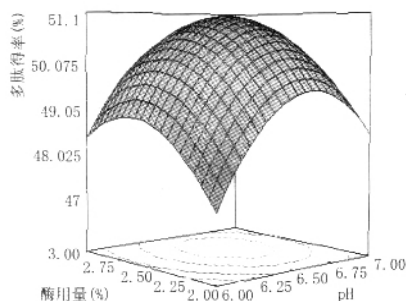


图7 多肽得率对酶解 pH 与酶用量的响应面

表4 验证试验结果

项目	对应的最佳条件	响应值(多肽得率: % (w/w))
实验值	酶解温度 40.61 °C, pH6.58,	50.97
方程预测值	酶用量 2.62 %	51.07

可获得较好的分离效果。

3 结论

3.1 对菠萝蛋白酶酶解啤酒废酵母条件的单因分析及对重要因素的响应面分析得出最佳酶解条件为: 酶解温度为 40.61 °C, pH 为 6.58, 酶用量为 2.62 % (w/w)。

3.2 利用 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液溶胀凝胶 SephadexG-

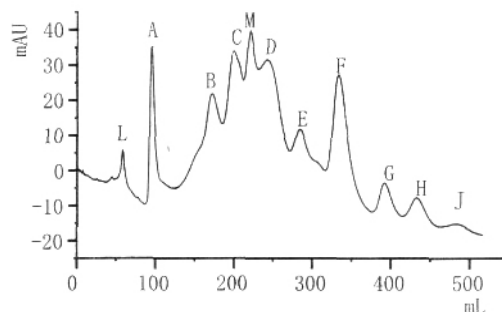


图8 酶解后的洗脱曲线

25, Tris-HCl 缓冲液洗脱柱层析, 可获得较好的分离效果。

参考文献:

- [1] 杨培慧, 齐剑英, 冯德雄, 等. 谷胱甘肽的应用及其检测方法[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(1): 52-54.
- [2] 王尔慧. 大豆新加工技术原理与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [3] 陈历俊, 程涛, 骆承序. 肽基蛋白水解物及其生物活性[J]. 食品工业科技(增刊-北京食品学会成立二十周年论文集), 1999, 178-182.
- [4] 李书国, 陈辉, 庄玉亭, 等. 复合酶法制备活性大豆寡肽研究[J]. 粮食与油脂, 2001, (3): 5-7.
- [5] 李艳丽. 玉米肽的制备、特性及其活性研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2003.
- [6] 黄伟坤, 等. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.
- [7] 周利巨, 王君虹, 陈新峰, 等. 大豆蛋白酶解液脱色工艺的优化[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(3): 130-133.
- [8] 任娇艳, 赵谋明, 崔春, 等. 基于响应面分析法的草鱼蛋白酶解工艺[J]. 华南理工大学学报, 2006, 34(3): 95-100.
- [9] Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. Structural analysis of anti-oxidative peptides from soybean beta-conglycinin[J]. Journal of agricultural and food chemistry. 1998, 43(3): 574-578.

泸州老窖通过国家级农业产业化龙头企业初审

本刊讯: 2007年12月初, 国家级农业产业化龙头企业评审培训会在四川成都市举行, 会上, 泸州老窖集团有限责任公司通过了国家级农业产业化龙头企业初审, 有望被命名为国家级农业产业化重点龙头企业。目前, 泸州市已有省级农业产业化重点龙头企业9家, 泸州老窖集团有限责任公司名列其中。如果泸州老窖集团有限责任公司被命名为国家级重点龙头企业, 将对该公司争取国家、省级农业项目资金, 加快打造国家优质原粮基地, 进一步提高名酒质量, 促进泸州市酒业发展和助农增收等产生十分重要的意义。(君)

洋河蓝色经典包装获得两项大奖

本刊讯: 2007年12月中旬, 在北京人民大会堂召开的2007年中国“包装之星”设计作品评比活动颁奖大会上, 江苏洋河酒厂股份有限公司产品洋河蓝色经典以其精美高雅、新颖别致的包装设计, 一举荣获“世界之星”、“包装之星”两项大奖。“世界之星”颁奖大会将于2008年在非洲加纳举行。此项评比活动是由中国包装总公司、中国包装联合会、世界包装组织(WPO)和“世界之星”包装奖作品推荐组委会共同主办的。世界包装组织主席基斯·皮尔森等各界权威人士出席了大会。洋河蓝色经典包装在此次严格而竞争激烈的评比中同时获得两项大奖, 充分说明该品牌的成功开发是外在包装、内在品质、文化品味等全方位精心打造的结果。(江源)