废弃酵母渣提取 β-葡聚糖及其羧甲基化的研究

王庆华[1],刘 山[2],崔炳权[1],邓志刚[2]

(1.广东药学院基础学院,广东 广州 510006;2.广州雅纯化妆品制造有限公司,广东 广州 510425)

摘 要: 采用二次碱处理结合酶处理的方法,从干燥啤酒酵母渣中提取高纯度的酵母 β-葡聚糖,再以异丙醇为分散剂、一氯乙酸钠为醚化剂,采用二次加碱醚化反应,制备羧甲基葡聚糖。对产品进行了初步分析,结果显示修饰后的葡聚糖羧甲基的取代度为 0.55,分子量 Mn 为 2.66×10^5,Mw 为 3.67×10^5,可用作皮肤免疫激活剂。

关键词: 综合利用; 啤酒酵母; 羧甲基葡聚糖; 羧甲基化

中图分类号: X797;Q53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2009)08-0120-03

Extraction of β-glucan from Waste Barm & Study of Its Carboxymethylation

WANG Qing-hua[1], LIU Shan[2] ,CUI Bing-quan[1]and DENG Zhi-gang[2]

(1.School of Basic Courses of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006;

2. Grandway International B.C. Cosmetics Manufaturer, Guangzhou, Guangdong 510425,China)

Abstract: High purity β-1,3-glucan was isolated from waste dry beer barm by two-step alkali extraction and enzyme extraction methods. Then carboxymethyl glucan was prepared by two-step alkali-adding etherification with isopropanol as the solven and sodium monochloroacetic as the etherifying agent. The product carboxymethyl glucan was analyzed and the results revealed that the degree of substitution of carboxymethyl glucan was 0.55, molecular weight Mn was 2.66×10^5 , and molecular weight Mw was 3.67×10^5. The product could be used as skin immune activator.

Key words: comprehensive utilization; beer barm; carboxymethyl glucan; carboxymethylation

酵母 β-葡聚糖是一种以 β-(1,3) 糖苷键连接为主,含有少量 β-(1,6)糖苷键连接的分枝,具有三链螺旋紧密结构的高分子多糖。从废弃啤酒酵母细胞壁分离的酵母 β-葡聚糖已实现产业化,产品应用于人体保健食品和动物饲料的免疫激活剂[1~2]。研究还发现,酵母 β-葡聚糖可加速皮肤伤口愈合, 同时有很好的皮肤保湿性能和抗皱、抗衰老功能,在护肤品方面有很好的应用前景[3]。碱不溶性酵母葡聚糖虽能吸水溶胀,却难溶于水,也不溶于乙醇等常用溶剂,因而限制了在护肤品方面的应用。通过化学修饰的方法引入特殊的化学基团, 一直是增加水难溶性高分子聚合物的常用手段, 如硫酸酯化、磷酸酯化、羧甲基化等等[4~5]。其中多糖的羧甲基化技术较为成熟且产品的人体安全性高。通过对酵母葡聚糖的羧甲基化修饰,增加其溶解度,可以拓展酵母葡聚糖在护肤品方面的应用。国外学者对护肤品用的可溶性酵母葡聚糖研究已比较深入[6~8],瑞士 Mibelle 化妆品公司是国际上最早开展羧甲基葡聚糖(carboxymethyl glucan,CMG)研发的企业,很多国外高档品牌的护肤品多有添加 CMG。近些年,随着国外 CMG 原料进入我国,国内已有少数品牌的护肤品在使用,但 CMG 原料被瑞士 Mibelle 等外国公司垄断。如果能利用我国啤酒企业的废弃酵母渣,提取酵母葡聚糖并合成 CMG,作为护肤品中增强免疫调节活性的因子销售,必能带来可观的经济效益。

工业上通常采用工艺相对简单可行的非均相溶剂法进行羧甲基化反应,本文以异丙醇为分散剂,以一氯乙酸钠为醚化剂,合成 CMG,并对合成样品进行了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 材料仪器

干燥啤酒酵母渣:由广州珠江啤酒集团有限公司提供。

爱尔兰 Megazyme 公司酵母葡聚糖检测试剂盒,丹麦诺维信耐高温 α-淀粉酶 (Termamyl 120L, 化学纯,分析检测用试剂均为分析纯。

奥立龙电导率测量仪 162AP, 美国 Nexus670 型红外光谱仪,751 分光光度计,美国 Waters 515-410 凝胶渗透仪。

1.2 实验方法

1.2.1 高纯度酵母葡聚糖的制备

基金项目:广东省科技计划工业攻关项目(2008B011000002)。

收稿日期:2009-05-20

作者简介:王庆华(1969-),男,广西人,副教授,研究方向:生物活性物质研究开发。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

①将干燥酵母渣分散于水中，使固形物：水质量比为1:10，充分搅拌混合。

②碱处理。将酶处理后的悬液升温至100 ℃，加入碱，使碱在悬液中的浓度达到4 %，搅拌反应2 h，离心收集沉淀物。沉淀物加水重复进行碱处理，碱浓度仍然为4 %，温度100 ℃，反应1 h，盐酸中和，离心收集沉淀物。

③沉淀物加水悬浮，加入高温α-淀粉酶，100 ℃保温0.5 h，水解α-葡聚糖。

④将沉淀物水洗脱盐，乙醇脱水脱脂，干燥，得白色酵母葡聚糖。

1.2.2　CMG的制备

1.2.2.1　羧甲基化原理

与纤维素羧甲基化原理相似，反应分两步：

第一步碱化反应：

葡聚糖-OH + NaOH ⟶ 葡聚糖-O-Na + H_2O

第二步醚化反应：

葡聚糖-O-Na + $ClCH_2COOH$ + NaOH ⟶ 葡聚糖-O-CH_2COONa + NaCl + H_2O

葡聚糖中葡萄糖单元上的C(2)、C(4)及C(6)位的羟基都可以被羧甲基取代，而C(6)的羟基被取代的几率最高(图1)。羧甲基取代后破坏了分子内和分子间氢键，使酵母葡聚糖紧密的三链螺旋结构破坏，水溶解性大大提高。

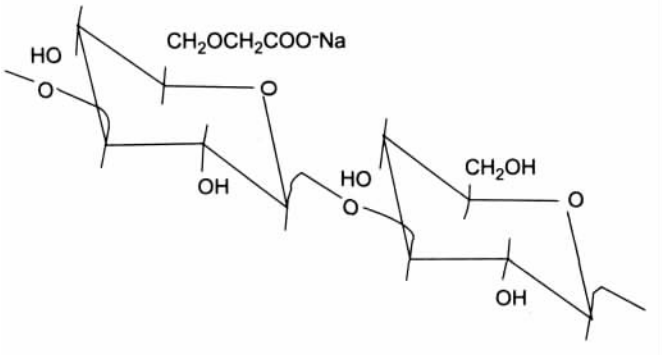


图1　羧甲基酵母葡聚糖的结构示意图

1.2.2.2　羧甲基化方法

上述方法制得的酵母葡聚糖研磨过100目筛网，取100 g该粉末，加入到装有1 L异丙醇的三口烧瓶，搅匀分散，加入30 %的氢氧化钠溶液，室温搅拌碱化过夜；碱化完成后，升温至50 ℃，缓慢滴加300 mL一氯乙酸钠溶液，反应1 h后，再次加入30 %氢氧化钠溶液，升温至60 ℃，反应2 h，用盐酸中和停止反应，滤去上清液，用70 %乙醇洗涤沉淀物多次，直至脱盐完全，烘干得CMG。

1.2.3　理化性质分析

1.2.3.1　酵母葡聚糖含量测定

采用丹麦Megazyme公司检测试剂盒方法，酵母β-葡聚糖量为样品彻底水解测得的总葡聚糖量减去α-葡聚糖量。

1.2.3.2　蛋白质含量测定

采用凯氏定氮法测定酵母葡聚糖样品中蛋白质含量。

1.2.3.3　红外光谱测定

测定提取的酵母葡聚糖和CMG产品的红外光谱。取1 mg干燥样品，与溴化钾粉末压片，500～4000 cm^{-1}范围内扫描。

1.2.3.4　取代度的测定

采用反滴电导法[9]，准确称取已干燥恒重的CMG，用蒸馏水配成0.1 %的溶液，取30 mL该液于烧杯中，加入1.0 mL 0.1 N氢氧化钠，用0.1 N盐酸滴定，同时用电导仪监测每滴入约0.2 mL盐酸后电导率变化。开始加入盐酸时体系中过量的氢氧化钠先与盐酸中和，此反应等当点时消耗盐酸体积记为V1；随后加入的盐酸与体系中-COONa作用，此反应等当点时消耗盐酸体积为V2(见图2)，由V2-V1计算盐酸的消耗量。D.S.=0.162×B/(1-0.08B)。B为1 g样品消耗盐酸的毫克当量数。

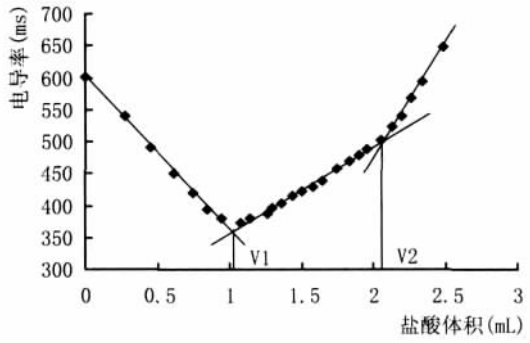


图2　电导滴定曲线图

1.2.3.5　CMG溶解度测定

准确称取1 g CMG，用蒸馏水溶解配制1 % CMG水溶液，25 ℃、15000 r/min分离心15 min，将上清液倒入已称重的蒸发皿中，置烘箱90 ℃将水分蒸干，再将温度调至105 ℃干燥至恒重。

$$溶解度\% = \frac{上清液干燥后的固形物(g)}{样品质量(g)} \times 100\ \%$$

1.2.3.6　CMG相对分子量的测定

使用Waters515-410GPC仪，用凝胶排阻层析色谱法(GPC)测定样品相对分子量。上样体积20 μL，洗脱液流速0.5 mL/min。

2　结果与分析

2.1　酵母β-葡聚糖的制备

酵母β-葡聚糖为酵母细胞壁中的碱不溶性多糖，目前市场上所销售的产品纯度一般小于80 %。为获得高纯的羧甲基酵母葡聚糖，首先要制备高纯度的酵母葡聚糖。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本文以啤酒生产企业的干燥酵母渣为原料来制备。与实验室培养的酵母菌液原料不同，干燥啤酒酵母渣含有大量以淀粉、糊精为主的 α-葡聚糖，用已有的提取方法并不能除去。因此，工艺中除了以高温碱处理外，再用淀粉酶除去 α-葡聚糖，以保证获得纯度大于 95 %的酵母 β-葡聚糖。

2.2 CMG 的制备

羧甲基化修饰是水不溶性多糖常用的增溶方法，在纤维素、淀粉增溶改性上已多有应用，产品的人体安全性较高。本方法中醚化反应体系属碱性，在水存在的条件下伴随着一些副反应的产生，有羟乙羧钠生成，需要消耗碱和醚化剂。为抑制副反应，需合理用碱，并控制体系水量。CMG 产品的溶剂度与取代度有关，一般取代度越高，溶解度越大。但取代度过高则对酵母葡聚糖原有的三链螺旋结构破坏较大，而三链螺旋结构对葡聚糖免疫活性是必需的[10]，CMG 取代度小于 0.75，生物活性保持较好。羧甲基取代度的大小主要与反应体系含水量、碱量、醚化剂量以及碱和醚化剂加入方式等因素密切相关。本方法采用二次加碱醚化法，获得了合适取代度的 CMG。

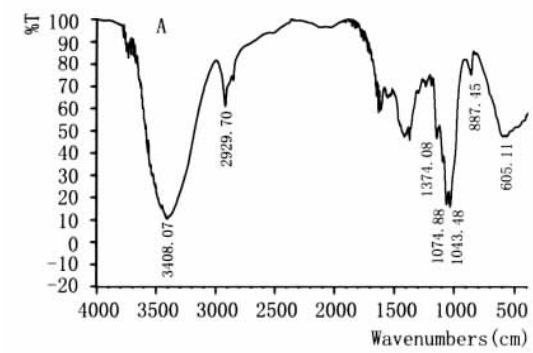
2.3 理化性质结果分析

比较酵母葡聚糖羧甲基化修饰前后红外光谱，图 3A 在波数 890 cm^{-1}、1370 cm^{-1}、2929 cm^{-1} 附近有明显吸收峰，表明样品为 β-(1,3)葡聚糖，图 3B 在波数 1602 cm^{-1} 是- COO^- 特征吸收峰、1422 cm^{-1} 处是与-COO^- 相连的次甲基吸收峰，表明样品为羧甲基葡聚糖。

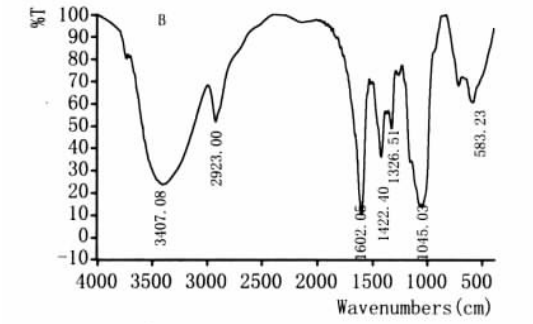
酵母葡聚糖样品经 Megazyme 公司试剂盒提供的方法测定，β-葡聚糖含量为 95.6 %，经凯氏定氮法测定蛋白质含量为 1.1 %。样品的含量高，主要的杂质蛋白质少，适合作为羧甲基化修饰的原料。本 CMG 产品外观为白色粉末，取代度为 0.55，分子量测定 Mn 为 2.66×10^5，Mw 为 3.67×10^5，分布宽 D 为 1.38，1 %水溶液溶解度为 96.5 %，透明度较好，适于作为护肤品的活性添加物使用。

3 结论

两步高温碱处理结合淀粉酶除去 α-葡聚糖的方法，可以从废弃干酵母渣中提取得到高纯度的酵母 β-葡聚糖。以此为原料，异丙醇为分散剂、一氯乙酸钠为醚化剂，二次加碱醚化反应，合成 CMG，工艺简单可行，产品外观、取代度、溶解度、分子量范围适于护肤品使用。



A:酵母葡聚糖



B:CMG

图 3 红外光谱图

参考文献：

[1] Sandula J, Kogam G, Kacurakora M, Machora E, Microbial (1-3) - β-glucan, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodatory activity[J], Carbohydrate Polymers, 1999,38：247-253.

[2] 陈昌福，陈萱，陈超然，梁运祥.β-葡聚糖的特性及其对动物免疫功能的调节[J].华中农业大学学报, 2003,(1)：95-100.

[3] Pillai R, Redmend M, Rding J, Anti-wrinkle therapy: Significant new findings in the non -invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with Beta-Glucan[J]. International Journal of Cosmetic Science,2005,27(5)：292.

[4] Williams David L, et al., A method for the solubilization of a (1-3)- β-D-glucan isolated from Saccharomyces cerevisiae[J]. Carbohydr. Res., 1991,219：203-213.

[5] Williams David L, et al.,Development of a water-soluble,sulated (1-3)-D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J].Carbohydr. Res.,1992,235：247-257.

[6] Zü lli F, Suter F, Applegate L A, Frenk E, Photoprotective effects of CM-glucan on cultured human skin cells[J].Euro Cosmetics,1995,11：46-50 .

[7] Zü lli F, Suter F, Biltz H., Nissen H P, Improving skin function with CM-glucan, a biological response modifier from yeast[J]. International Journal of Cosmetic Science, 1998,20：79-86 .

[8] Sandula J, Machova E, Hribalova V, Mitogenic activity of pariticulate yeast β-(1,3)-D-Glucan and its water-soluble derivatives[J].Int.J. Biol.Macromol., 1995,17：323-326.

[9] 曾晖扬,李卓美.羧甲基纤维素钠取代度测定的新方法[J].纤维素科学与技术, 1996,(4)：38-43.

[10] Bohn J A, BeMiller J N, (1-3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships[J].Carbohydrate Polymers,1995, 28：3-14.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net