

啤酒酵母泥胞壁多糖的提取

李志江¹ 戴凌燕² 盛 艳¹

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163000 ;

2. 黑龙江八一农垦大学生命学院, 黑龙江 大庆 163000)

摘 要: 采用酶解法提取啤酒废酵母泥的酵母细胞壁多糖。采用正交试验加酶量、pH 值、温度和酶解时间 4 个单因素对胞壁多糖提取率的影响。得出最佳提取条件为最适加酶量 240 IU/g, 最适 pH 值 4.0, 最佳酶解时间 2 h, 最佳酶解温度 50 °C, 多糖得率可达 60%。采用薄层层析法对胞壁多糖进行纯化, 定性测得多糖的组分为甘露糖和葡萄糖。

关键词: 啤酒; 废酵母泥; 细胞壁; 多糖提取

中图分类号: TS262.5; TS261.4; TS261.9 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2005)12-0077-03

Extraction and Composition Analysis of Cell Wall in Waste Beer Yeast Slurry

LI Zhi-jia¹ DAI Ling-ya² and SHENG Yan¹

(1. Food and Life Science Technology Institute of Heilongjiang August-fir and Reclaim University Daqing, Heilongjiang 163319 ;

2. Life Science College of Heilongjiang August-fir and Reclaim University Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: The polysaccharides of cell wall in waste beer yeast slurry were extracted by enzyme decomposition method. The effects of four single factors including enzyme addition level, pH value, temperature and enzymolysis time on the extraction rate of polysaccharides are studied by orthogonal test to obtain the following optimal extraction conditions: enzyme addition level as 240 IU/g, pH value as 4.0, 2 h enzymolysis time, enzymolysis at 50 °C, and polysaccharides yield reached 60%. Besides, the polysaccharides are purified by thin-layer chromatography and its ingredients were mannose and glucose by composition analysis (Tran. by YUE Yang)

Key words: beer; waste beer yeast slurry; cell wall; extraction of polysaccharide

啤酒酵母泥是啤酒生产的副产物,随着啤酒产量的逐年提高,产生的啤酒废酵母泥也不断增加。如今,我国每年大约产生 100 万吨啤酒废酵母泥,一些废酵母泥随废水排放,严重污染环境。而且这些啤酒废酵母泥中含有 48%~55% 的蛋白质,23%~28% 的碳水化合物,6%~8% 的核糖,2% 的 B 族维生素,1% 的谷胱甘肽以及丰富的氨基酸和多种矿物质,这些营养成分并没有得到充分的利用,因此对啤酒废酵母泥进行回收利用具有明显的社会效益和经济效益^[1]。

回收的酵母除直接制成酵母片,用于帮助消化外,还可通过提取得到多种生物制剂或名贵药品^[2]。啤酒酵母细胞的细胞壁中含有大量的多糖,外层部分是含甘露糖的多糖体,内侧部分是葡聚糖。它们在人的消化道中难以被消化,故可作为膳食纤维发挥作用,且具有增强细胞免疫力,提高巨噬细胞活性及抗癌等功效^[3]。

酵母菌细胞壁组分有葡聚糖、甘露聚糖、蛋白质及

脂类等,它们以络合的形式共存,利用酵母自溶和酶解的方法使细胞壁结构破裂,游离出葡聚糖、甘露糖等^[4,5],可大大提高原料利用率,提高产品价值,本研究采用蛋白酶水解的方法提取废酵母泥的胞壁多糖。

1 材料与方法

1.1 实验材料

啤酒废酵母泥:取自哈尔滨啤酒厂、大庆(晓雪)啤酒有限公司。

1.2 实验仪器

快速天平 PM460:瑞士 Mettler 梅特勒仪器公司;
电热恒温培养箱 DRP-9082 型:济南赛恩斯科技有限公司;
酸度计 pH-3C:上海雷磁仪器厂;
722S 可见分光光度计:上海精密仪器仪表有限公司;

收稿日期:2005-08-15

作者简介:李志江(1977-),男,湖北玉田人,硕士,助教,发表论文数篇。

远红外线干燥箱 YHW1104 天津市实验仪器;

层析缸、喷雾器、研钵、玻璃板等。

1.3 实验试剂

氢氧化钠、盐酸、氢氧化钡、95%乙醇、苯胺-二苯胺-磷酸显色剂、氯仿、冰乙酸、葡聚糖、甘露聚糖、阿拉伯糖、半乳糖、硅胶G粉、羧甲基纤维素钠、硼酸、酒石酸均为分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 预处理工艺

啤酒废酵母泥→2~6℃水洗→沉淀酵母泥→加2倍体积的5%的酒石酸→离心(3000 r/min,10 min)→干净啤酒酵母

1.4.2 单因素条件下蛋白酶对酵母泥多糖提取率的影响

取酵母泥5g,加水10g,调整pH值、加酶量,控制酶解温度和时间,离心(3000 r/min,10 min)洗涤,干燥,测定多糖得率。

1.4.3 正交实验确定蛋白酶最适作用条件

根据上述单因素实验结果,采用正交试验法,以提取率为评价指标,确定最佳提取条件。

1.4.4 胞壁多糖组分分析

采用薄层层析法测定。

2 结果与分析

2.1 单因素对胞壁多糖提取率的影响

2.1.1 加酶量对酵母泥胞壁多糖提取率的影响(图1)

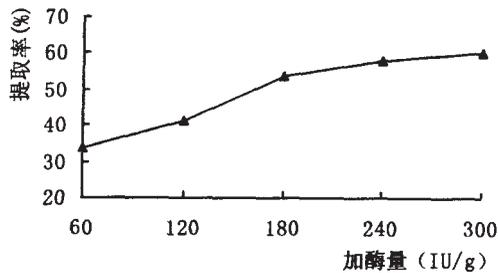


图1 加酶量对胞壁多糖提取率的影响

酵母细胞壁除多糖外,还含有一定量的蛋白质、胶质、粗纤维及脂肪等成分。这些物质的分解有利于糖类物质的溶出、分离和纯化。由图1看出,多糖的提取率随加酶量的增加而增加,当加酶量为240 IU/g时,多糖的得率增加趋势较平缓,故加酶量以240 IU/g左右为宜。

2.1.2 pH值对酵母泥胞壁多糖提取率的影响(图2)

在其他条件不变的情况下,240 IU/g加酶量,控制一定的pH,研究pH值对酵母泥胞壁多糖提取率的影响。从图2中可以看出,当pH值小于4时,多糖的得率随着pH值的增大而增加,当pH值大于4时,多糖的得率随pH值的增大而减小,所以pH值以4.0左右为宜。

2.1.3 酶解时间对酵母泥胞壁多糖提取率的影响(图3)

酶解时间是直接影响提取效果的因素,从1~5h设

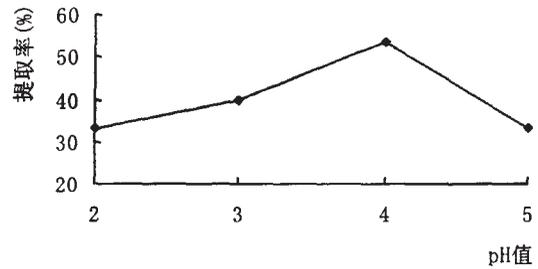


图2 pH值对胞壁多糖提取率的影响

定了5个不同作用时间进行实验,从中确定一个最适的酶解作用时间。由图3可以看出,当酶解时间小于2h时,多糖的得率随着时间的增加而增加,当酶解时间大于2h时,多糖得率随着时间的增加而减少,所以酶解时间以2h左右为宜。

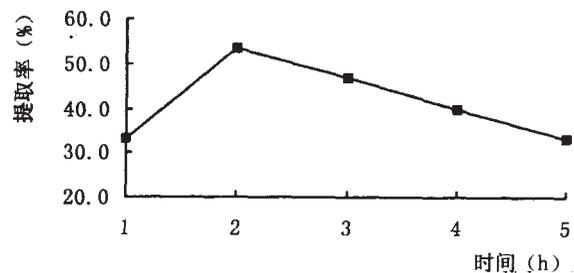


图3 时间对胞壁多糖提取率的影响

2.1.4 酶解温度对酵母泥胞壁多糖提取率的影响(图4)

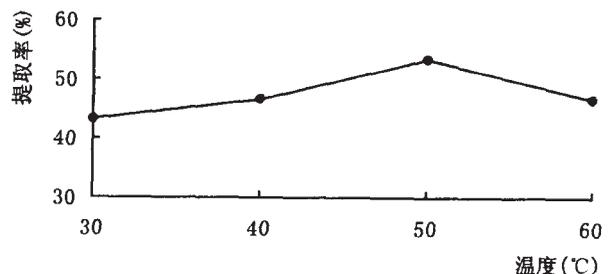


图4 温度对胞壁多糖提取率的影响

酶作用只有在适宜的温度下,才能有最大作用的酶活性,实验采用不同温度下温度对酶解效果的影响。由图4看出,当酶解温度低于50℃时,多糖得率随着温度的增加而增加,当酶解温度高于50℃时,多糖得率随温度的升高而降低,所以酶解温度以50℃左右为宜。

2.2 蛋白酶酶解提取最适作用条件的确定

根据以上单因素得出的结果,选用影响蛋白酶作用条件的4个因素为加酶量、酶解时间、酶解温度和pH值,每个因素做3个水平的实验设计,见表1。

表1 4因素3水平实验设计

水平	因素			
	加酶量 (IU/g)	pH值	酶解时间 (h)	酶解温度 (°C)
1	180	3.0	1	40
2	240	4.0	2	50
3	300	5.0	3	60

在此因素水平下,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表2。因素与指标的关系见图5。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验

实验号	实验条件				多糖得率(g/1.5g)
	A 加酶量	B 时间	C 温度	D pH 值	
1	1	1	1	1	0.60
2	1	2	2	2	0.90
3	1	3	3	3	0.80
4	2	1	2	3	0.80
5	2	2	3	1	0.85
6	2	3	1	2	0.80
7	3	1	3	2	0.50
8	3	2	1	3	0.60
9	3	3	2	1	0.70
K_1	2.30	1.90	2.00	2.15	
K_2	2.45	2.35	2.40	2.20	
K_3	1.80	2.30	2.15	2.20	
k_1	0.77	0.63	0.67	0.72	
k_2	0.82	0.78	0.80	0.73	
k_3	0.60	0.77	0.72	0.73	
R	0.22	0.15	0.13	0.01	

采用极差分析法,根据各因素的 K 、 k 、 R 的大小,对试验结果进行分析。从表2可以判断出各因素对指标影响的顺序为:加酶量>时间>温度>pH。由图5可看出,加酶量为240 IU/g,酶解时间2 h, pH 值为4.0,酶解温度50℃时,各曲线均达到峰值。由此得出最佳条件为:加酶量240 IU/g, pH 值为4.0,酶解时间2 h,酶解温度50℃,多糖提取率可达60%。

2.3 胞壁多糖的组分分析

2.3.1 粗多糖的精制

在最佳提取条件下,酶解胞壁多糖,取粗多糖5 g,加水10 g,混匀,将氯仿:正丁醇=4:1的比例混合后,加至样品中振摇,样品中的蛋白质与混合液形成凝胶,离心除掉,这样反复脱蛋白两次。收集多糖,用3倍体积的95%乙醇醇析,得脱蛋白多糖;用水溶解再醇析,重复两次,最后得去蛋白多糖,供层析用。

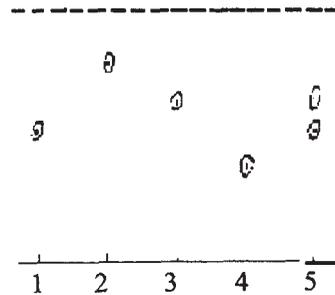
2.3.2 粗多糖组分的分析

称取50 mg 精制多糖于10 mL 试管中,加入2 mL 浓度为1.8 mol/L的 H_2SO_4 封管。置100℃烘箱中水解

2 h。将水解物转入烧杯中,加入 $Ba(OH)_2$ 的饱和溶液,调整pH至7后过滤,滤液置70℃水浴中浓缩,供层析用。

称取硅胶G粉15 g,羧甲基纤维素钠0.05 g,加入0.1 mol/L硼酸溶液80 mL,于研钵中充分研磨,待硅胶G粉开始变稠时,进行薄板铺层。铺层后的薄板放在100℃烘箱中烘干取出后,放在干燥器里备用,使用前于110℃烘箱中活化1 h使用。

取活化过的硅胶G板一块,在距底边1.5 cm水平线上确定4个点,相互间隔2 cm,其中3个点分别点上葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖标准溶液各3 μ L,另一个点点上样品3 μ L。以氯仿:冰乙酸:水=6:7:1为展层剂,当展层剂前沿达距薄板顶端1 cm处,停止层析。取出玻璃板以吹风机吹干。然后以苯胺-二苯胺-磷酸喷雾,于85℃烘箱中烘10 min,各种糖即显出不同颜色,以标准糖比较,即可鉴定出糖的种类。薄层层析结果见图6。



注:1—葡萄糖 2—阿拉伯糖 3—甘露糖
4—半乳糖 5—测定样
图6 薄层层析结果

可溶性糖硅胶G薄层层析实验表明,不同的多糖在层析后即显示出不同的颜色,与标准糖比较后可确定,啤酒酵母胞壁多糖为葡萄糖和甘露糖。

3 结论

3.1 采用酶解法提取酵母细胞壁多糖,最佳提取条件为最适加酶量为240 IU/g,最适pH值为4.0,最佳酶解时间为2 h,最佳酶解温度为50℃,多糖得率可达60%。

3.2 采用薄层层析法对胞壁多糖进行简单纯化,定性测得多糖的组分为甘露糖和葡萄糖。

参考文献:

- [1] 高玉荣.啤酒废酵母自溶条件的研究[J].酿酒科技, 2002, (2):74-76.
- [2] 周建新.啤酒酵母泥的回收与综合利用[J].食品科技, 1994, (3):42-43.
- [3] 施亚琴,等.红毛五加多糖的提取及含量测定[J].华西药学杂志, 1994, (2):73-74.
- [4] 沈国惠.啤酒酵母自溶条件的优化及其抽提物的挥发性风味成分[J].食品与发酵工业, 1991, (3):8-10.
- [5] 刘新,等.啤酒酵母胞壁多糖提取工艺的研究[J].重庆大学学报, 1994, (6):43-48.

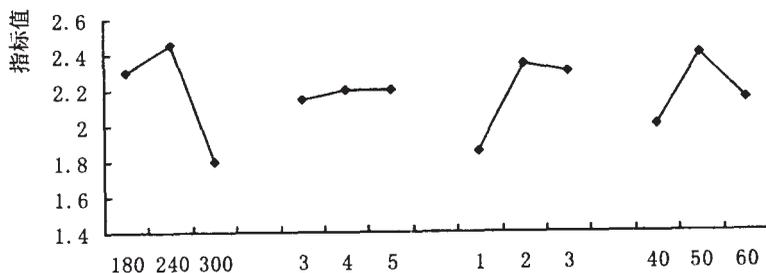


图5 因素与指标的关系