

酵母不溶性葡聚糖测定方法的研究

祁业明 杜丽平 肖冬光 栗娜

(天津科技大学天津市工业微生物重点实验室,天津 300457)

摘要: 对酵母不溶性葡聚糖含量的测定方法进行了研究。葡聚糖的纯度一般由酸水解后的单糖含量表示,水解时酸的浓度、温度和时间是影响单糖含量测定结果的重要因素。分别比较 H_2SO_4 和 TFA 在不同条件下水解酵母不溶性葡聚糖对测定结果的影响。实验表明,采用 H_2SO_4 进行水解优于 TFA,最佳水解条件为 H_2SO_4 浓度 2.7 mol/L、水解温度 100℃、时间 3 h。

关键词: 酵母; 酵母葡聚糖; 酸水解; 蒽酮-硫酸法; 测定方法

中图分类号: TS261.1; TQ 92.065 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)09-0092-03

Investigation on the Measurement of Insoluble Yeast Glucan Content

QI Yeming, DU Liping, XIAO Dong-guang and LI Na

(Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Industrial Microbiology Key Lab, Tianjin 300457, China)

Abstract: The measurement methods of insoluble yeast glucan content were investigated. The purity of glucan was usually expressed by monosaccharide content after acid hydrolysis. Acid concentration in hydrolysis, the temperature and the time were important factors influencing the measurement results of monosaccharide content. The hydrolysis by H_2SO_4 and TFA under different hydrolysis conditions was compared to analyze their influence on the measurement of insoluble yeast glucan content. The results showed that H_2SO_4 was preferable than TFA as hydrolysis acid and the best hydrolysis conditions were as follows: 2.7 mol/L H_2SO_4 concentration, hydrolysis temperature at 100℃, and 3 h hydrolysis time.

Key words: yeast; yeast glucan; acid hydrolysis; anthrone- H_2SO_4 ; determination method

酵母是一种重要的食品和工业微生物,在其细胞壁中存在大量的以 α -1,3-D 为主链、 α -1,6-D 为侧链的不溶性葡聚糖。这种物质具有抗细菌、抗病毒、增强哺乳动物的免疫力等作用,是一种良好的生物效应调节剂,广泛应用于食品、医药、化妆品等行业,是国内外研究的热门课题^[1,2]。由于酵母葡聚糖的水不溶性使其测定有一定困难,目前研究大多是将葡聚糖经酸水解成单糖以后测定其含量来表示葡聚糖的纯度。由于单糖对高温比较敏感,在保证多糖水解完全的前提下要使葡聚糖水解释成的葡萄糖减少损失,酸处理的时间、温度和酸浓度是影响测定结果的重要因素^[3]。硫酸和三氟乙酸是最常用的水解葡聚糖的酸,但是对于水解条件的选择,各种文献报道也是不尽相同。

本试验分别采用三氟乙酸(TFA)和硫酸对酵母葡聚糖进行水解,并分别对两种酸水解条件进行了比较,得出了最佳的酸水解方法。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母细胞壁粗提物由安琪酵母股份有限公司提供、葡聚糖由本实验室制备。

浓硫酸(H_2SO_4)、蒽酮、三氟乙酸(TFA)、标准葡萄糖等均为分析纯。

1.2 主要仪器

752 紫外光栅分光光度计。

1.3 试验方法

1.3.1 酵母不溶性葡聚糖的提取

称取干燥的酵母细胞壁粗提物 260 g,将其溶于一定量的水中制成悬浮液,搅拌均匀,置于立式压力蒸汽灭菌器中加热至 125℃ 处理 2 h,冷却至 45℃,离心(4000 r/min, 15 min)。离心后沉淀物用水稀释,搅拌均匀,水洗 2 次,离心。水洗过的沉淀物用水稀释混匀,加热至 45℃,分别在 0 h、1.0 h、2.0 h 时边搅拌边加入

基金项目: 天津科技大学自然科学基金项目资助(20030220)。

收稿日期: 2007-05-21

作者简介: 祁业明(1982-)男,河北人,在读硕士生。

通讯作者: 肖冬光(1956-)男,天津科技大学教授、博士生导师, xdg@ust.edu.cn。

蛋白酶处理 2 h 后离心, 重复水洗两次。沉淀物用丙酮处理后离心, 置于 -70°C 预冷冻 24 h, -67°C 冷冻干燥 10 h, 得到淡黄色、松软的葡聚糖粉末。

1.3.2 标准曲线的绘制

1.3.2.1 标准溶液的配制

精密称取经干燥至恒重的标准葡萄糖 0.1 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 以蒸馏水定容至刻度, 配成 1 mg/mL 的贮备液。分别精密吸取贮备液 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 以蒸馏水稀释定容, 摇匀, 得系列对照品溶液。

1.3.2.2 0.2% 蒽酮试剂的配制

溶解 0.2 g 蒽酮于 100 mL 浓硫酸中, 现配现用。

1.3.2.3 标准曲线的绘制

分别精密吸取上述系列标准溶液 1.0 mL, 各加入 4.0 mL 蒽酮试剂, 摇匀, 迅速浸入冰水浴中冷却, 各管加完后一起浸入沸水浴, 管口加盖玻璃球, 以防蒸发。自沸水浴重新煮沸起计算, 准确煮沸 10 min 后取出, 用自来水冷却, 室温放置 10 min 左右, 于 620 nm 比色。以蒸馏水做对照进行比色, 测吸光度。以吸光度为横坐标, 葡萄糖浓度 (mg/mL) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 见图 1。线性系数 $R^2 = 0.9997$, 结果表明, 葡萄糖的测定量在 0.01 ~ 0.1 mg/mL 的浓度范围内有良好的线性关系。

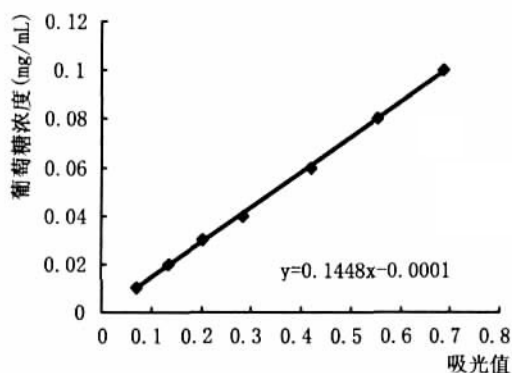


图 1 葡萄糖标准曲线

1.3.3 酸水解条件的优化

1.3.3.1 水解温度的选择

H_2SO_4 水解: 分别称取固体样品 100 mg 放入水解管中, 加入 27 mL、2.7 mol/L 的 H_2SO_4 后封管, 分别置于 80、85、90、95、100、105 和 100 的水浴中水解 3 h。将水解液转入 100 mL 容量瓶定容备用。

TFA 水解: 分别称取固体样品 20 mg 放入水解管中, 加入 3 mL、75% 的 TFA 后封管, 分别置于 80、85、90、95、100、105 和 100 水浴中水解 1.5 h。待水解液蒸干, 加入少量的蒸馏水混匀后再蒸干, 重复蒸发过程 1 次。加入 10 mL 蒸馏水洗涤, 离心, 收集上清液, 重复洗涤 1 次, 将 2 次的上清液转入 50 mL 容量瓶定容, 备用。

1.3.3.2 酸浓度的选择

H_2SO_4 水解: 分别称取固体样品 100 mg 放入水解管中, 并且分别加入 0.5 mol/L、0.9 mol/L、1.8 mol/L、2.7 mol/L、3.6 mol/L、4.5 mol/L 和 5.4 mol/L 的 H_2SO_4 27 mL 后封管, 置于沸水浴中水解 3 h。将水解液转入 100 mL 容量瓶定容, 备用。

TFA 水解: 分别称取固体样品 20 mg 放入水解管中, 再分别加入 50%、60%、65%、70%、75%、80% 和 90% 的 TFA 3 mL 后封管, 置于 95 水浴中水解 1.5 h。以下处理按 1.3.3.1 步骤进行。

1.3.3.3 水解时间的选择

H_2SO_4 水解: 分别称取固体样品 100 mg 放入水解管中, 加入 27 mL、2.7 mol/L 的 H_2SO_4 后封管, 分别置于沸水浴中水解 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h、4.0 h、5.0 h 和 6.0 h。将水解液转入 100 mL 容量瓶定容, 备用。

TFA 水解: 分别称取固体样品 20 mg 放入水解管中, 加入 3 mL、75% 的 TFA 后封管, 分别置于 95 水浴中水解 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h、4.0 h、5.0 h 和 6.0 h。以下处理按 1.3.3.1 步骤进行。

1.3.4 样品含量的测定

将经酸水解处理后的样品溶液稀释到 0.04 mg/mL 后, 取 1.0 mL, 加入蒽酮试剂, 按照硫酸-蒽酮法^[4]测定含量。

2 结果与分析

2.1 水解温度的选择

不同水解温度对葡聚糖测定结果的影响见图 2。

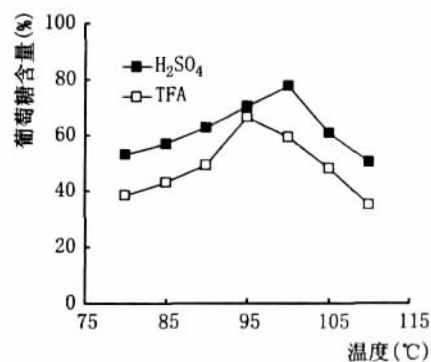


图 2 不同水解温度对葡聚糖测定结果的影响

如图 2 表明, 用 H_2SO_4 和 TFA 水解时, 在开始阶段, 温度的升高对葡聚糖的水解起到促进作用, 测定结果呈上升趋势, 而温度持续升高会对葡聚糖水解释成的单糖造成损失, 导致测定结果出现下降趋势。 H_2SO_4 进行水解, 当温度为 100 时葡萄糖含量最高, 为 77.78%; TFA 进行水解处理时, 葡萄糖含量在 95 达到最高值, 为 66.56%。从两条线的下降趋势可以发现, H_2SO_4 水解

时温度提高 10 ℃ 单糖损失了 25 % ;而用 TFA 水解时,单糖损失达到了 32 % 。对两种酸进行比较可以看出, H_2SO_4 水解酵母不溶性葡聚糖时水解程度比 TFA 要彻底,因此 H_2SO_4 水解后进行糖含量测定的结果高于 TFA。

2.2 酸浓度的选择

不同酸浓度对葡聚糖测定结果的影响见图 3。

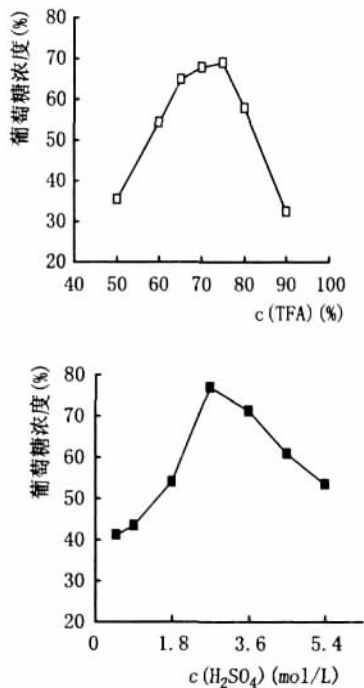


图 3 不同酸浓度对葡聚糖测定结果的影响

图 3 表明,随着 H_2SO_4 和 TFA 浓度的增大,葡萄糖的含量先升后降。这说明水解开始时,随着酸浓度的增加加快了葡聚糖的水解率;同时高浓度的酸也造成了大量由葡聚糖水解释成的葡萄糖的损失。在 H_2SO_4 浓度为 2.7 mol/L 时,糖含量达到最大值 76.80 % ,对于 TFA 而言,浓度为 75 % 时,糖含量达到最大值 68.95 % 。从图 3 中两条曲线的下降趋势可以发现, H_2SO_4 水解时酸浓度提高 1 倍,单糖损失了 20 % ;而用 TFA 水解时,酸浓度提高 15 % ,单糖损失达到了 37 % ,由此可以看出,高浓度的 TFA 对单糖造成的损失明显大于 H_2SO_4 。从 TFA 浓度与糖含量的关系图中可以发现, TFA 浓度在 70 % ~ 75 % 范围时,糖含量的变化非常微小,这和文献报道的情况吻合,说明在这两个浓度之间根据水解时间和温度的不同出现最优点的可能性很大。

2.3 水解时间的选择

不同水解时间对葡聚糖测定结果的影响见图 4。

图 4 表明,采用 TFA 进行水解时,1.5 h 糖含量就达到最大值 68.73 % ,而 2 h 时糖含量为 68.19 % ,水解时间 1.5 h 和 2 h 对糖含量的影响不大,进一步说明了在 TFA

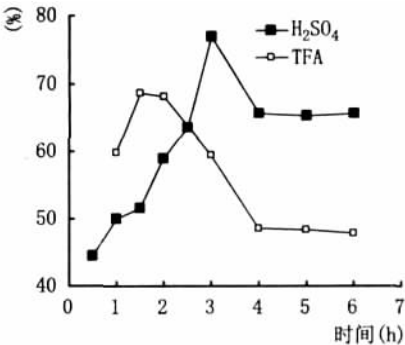


图 4 不同水解时间对葡聚糖测定结果的影响

浓度为 70 % ~ 75 % 之间糖含量的变化非常微小。对 H_2SO_4 而言,从图 4 可以看出,用 2.7 mol/L 的 H_2SO_4 水解 3 h 达到最大值,即糖含量最高为 76.98 % 。在 4 h 以后两条线都趋向平稳,说明水解时间对单糖的损失影响不明显,但是从两条线的最高点来看, H_2SO_4 对酵母不溶性葡聚糖的水解程度还是要高于 TFA。

2.4 不同酸处理方法的比较

本试验分别用 TFA 和 H_2SO_4 水解酵母不溶性葡聚糖,通过对水解温度、浓度、时间 3 个因素对葡聚糖测定结果影响的分析,得出了适宜的水解条件为: TFA : 75 % , 5 ℃ , 1.5 h ; H_2SO_4 : 2.7 mol/L , 100 ℃ , 3.0 h 。将 2 种酸水解的方法和文献中记载的方法进行比较,结果见表 1。

表 1 不同酸处理方法对葡聚糖测定结果的影响

方法 编号	糖含量 (%)					平均值 (%)	RSD (%) (n=5)
1 ^a	68.55	67.05	67.24	69.22	68.34	68.08	1.07
2 ^b	77.66	78.83	77.26	77.87	77.28	77.78	0.84
3 ^c	66.02	67.50	67.05	65.29	66.66	66.82	1.02

注: a: TFA 水解条件: 75 % , 95 ℃ , 1.5 h ; b: H_2SO_4 水解条件: 2.7 mol/L , 100 ℃ , 3.0 h ; c: 水解条件^[1]: 72 % H_2SO_4 , 30 ℃ , 3.0 h ; 2 N H_2SO_4 , 100 ℃ , 4.0 h。

对 3 种酸处理方法的重现性进行了考察,方法 1、方法 2、方法 3 的 RSD 分别为 1.77 % 、1.02 % 和 2.04 % ,可见其有较好的重现性。通过 2.7 mol/L H_2SO_4 一步水解法和 Nathalie Dallies^[5]等采用的两步水解法的比较可以看出,本试验选出的方法具有操作简单、耗时少、重现性好的优点,文献记载的方法操作比较复杂,尤其是第一步用浓硫酸进行处理的时候,必须保证浓硫酸和样品全面充分的接触,操作比较困难。如果操作过程中出现了结块的现象,将最终导致测定结果偏低。将 H_2SO_4 和 TFA 进行比较可以发现,硫酸水解具有重现性好、单糖损失少、成本低、操作容易等优点。TFA 水解时在操作上有一点很难控制,即 TFA 水解后如果不挥发彻底,残留的 TFA 对蒽酮-硫酸测定葡萄糖会有干扰。因此,经过比较可以得出,用 2.7 mol/L 的 H_2SO_4 在 100 ℃ 条件下 (下转第 97 页)

对含量在各个规格成品中居首位。我们知道,乙醛和乙缩醛在白酒中对白酒的香气起平衡和协调的作用^[3],并且,从一等品酒浓郁而又独特的香气可知,提高乙醛和乙缩醛在酒体中的绝对含量对白酒的提香会有明显的作用。

另外,乙醛与乙缩醛是白酒中重要的醛类化合物,其与羧酸一起成为白酒的协调成分,其对白酒的香气起着平衡和协调的作用。表4的数据表明,一等品酒中乙缩醛的绝对含量相对最高,它与乙醛之间的比例为3.93:1,相反,三等品酒中乙缩醛的绝对含量最低,而它与乙醛的相应比例为4.52:1。从一等品酒与三等品酒中乙醛与乙缩醛之间比例的差别看来,其结果是一等品酒闻香、喷香相对较浓,而三等品酒闻香相对较淡有一定的关系。

3 结论

3.1 使用惠普 HP-101 (Methylsiloxane)19091Y-015 型毛细管柱, FID 检测器,以乙酸正戊酯为内标,对鼓香型白酒中的乙缩醛和乙醛进行检测,实验结果表明方法

简单、准确、重现性好。

3.2 提高乙醛和乙缩醛在酒体中的绝对含量对白酒的提香会有明显的作用,它们对白酒的香气起着平衡和协调的作用。

参考文献:

- [1] 李大和,李学如,等.白酒工人培训教程[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
- [2] 李大和.白酒勾兑技术问答[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 陈益钊.中国白酒的嗅觉味觉科学及实践[M].成都:四川大学出版社,1996.
- [4] 李大和.提高新型白酒质量的技术关键[J].酿酒科技,2005,132(6):21-27.
- [5] 蔡定域.实用白酒分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [6] 曾祖训.全国第四届白酒勾调技术培训班教材[M].中国食品工业协会白酒专业协会,1999.
- [7] 林万福、李福玉、李振林.谈乙醛、乙缩醛在白酒中的含量及其量比关系[J].酿酒,2002,(3):42-43.
- [8] 赖登辉、罗德志、赵文玲.乙醛、乙缩醛与白酒质量关系的研究[J].酿酒,2001,(4):53-55.

(上接第94页)

水解3h是最理想的酸处理方法。

3 结论

3.1 分别对 TFA 和 H_2SO_4 水解条件进行优化后,确定了适用于酵母不溶性葡聚糖酸水解时的水解条件:2.7 mol/L 的 H_2SO_4 ,100 水解 3.0 h。TFA 酸水解后测得酵母不溶性葡聚糖的含量为 68.08%, H_2SO_4 酸水解后测得酵母不溶性葡聚糖的含量为 77.78%。

3.2 用 TFA 进行样品酸水解,步骤多,可控性较差,尤其是 TFA 的残留对蒽酮-硫酸比色法有很大的干扰。用 H_2SO_4 水解酵母不溶性葡聚糖操作简单,重现性好,弥补了上述缺点。

参考文献:

- [1] T H Nguyen, G H Fleet, P L Rogers. Composition of the cell

walls of several yeast species [J]. Appl Microbiol Biotechnol 1998, 50:206-212.

- [2] P.Thanadkit et al. Glucan from spent brewer's yeast preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18:527-539.
- [3] Stefan Freimund, Sandro Janett, Eva Arigoni et al. Optimised quantification method for yeast-derived 1,3- β -D-glucan and -D-mannan [J]. Eur Food Res Technol 2005, 220:101-105.
- [4] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [5] Nathalie Dallie, Jean Francois, Veronique Paquet. A New method for quantitative determination of polysaccharides in the Yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast 1998, 14:1297-1306.

张弓酒鉴评会在郑州举行

本刊讯 张弓酒鉴评会于2007年8月19日在郑州举行,由部分白酒专家组成的专家组对38% vol和52% vol张弓酒4个样进行了感官鉴评,一致意见认为:38% vol的1-1号样无色透明,窖香浓郁,醇和甜净,低而不淡,香味谐调,尾味爽口,浓香风格突出;38% vol的1-2号样无色透明,窖香幽雅,醇和绵柔,低而不淡,香味谐调,尾味爽口,浓香风格突出;52% vol的2-1号样无色透明,窖香浓郁,绵甜甘爽,香味谐调,余香悠长,浓香风格突出;52% vol的2-2号样无色透明,窖香幽雅,醇厚绵柔,圆润丰满,香味谐调,回味悠长,浓香风格突出”。(小雨)



鉴评会会场