

利用啤酒酵母生产 SOD 的提取条件研究

廖湘萍, 徐功瑾, 付三乔

(湖北轻工职业技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 研究了利用异丙醇破壁、丙酮二次纯化提取 SOD 生产工艺, 最佳提取条件为: 异丙醇浓度为 90%、时间 120 min、pH7.0, 粗酶液的收率为 73%, 所得 SOD 的酶比活为 3048.7 u/mg。与胞内 SOD 提取老工艺相比, 具有工艺简单、设备少、操作简便、成本低等特点。(孙悟)

关键词: 综合利用; 啤酒酵母; SOD; 提取

中图分类号: TS261.1; X797 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 05- 0089- 03

Study on the Extraction Conditions of SOD Produced by Waste Beer Yeast

LIAO Xiang-ping, XU Gong-jin and FU San-qiao

(Hubei Light Industry Occupational Technique Institute, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: The extraction techniques of SOD (cell wall broken by isopropyl alcohol and secondary purification by propanone) were investigated. The best extraction conditions were as follows: 90% isopropyl alcohol concentration, extraction time 120 min, pH value as 7.0, the yield of crude enzyme liquid as 73%, and the specific enzymatic activity of SOD was 3048.7 u/mg. Compared with traditional intracellular SOD extraction techniques, the method had the advantages of simple techniques, less apparatus, simple operation and low cost etc.(Tran. by YUE Yang)

Key words: comprehensive utilization; waste beer yeast; superoxide dismutase(SOD); extract

啤酒废酵母是啤酒生产重要的副产物, 其产量为啤酒产量的 0.2%~0.3% (干基, 质量分数)。我国啤酒年产量已达 3200 万千升, 将有 64~96 万 t 的啤酒废酵母产生。目前啤酒厂除将小部分酵母泥留作种子使用外, 大部分连同其中的残留啤酒直接排入下水道, 严重污染环境 (酵母泥的生物耗氧量、化学耗氧量均高达 10 万 mg/L 以上)^[1]; 或者是加工成附加值较低的一些产品。实际上, 啤酒酵母含有许多营养成分, 且无毒, 这是一巨大的宝贵资源, 研究酵母中生物活性物质, 合理开发利用啤酒废酵母, 将产生良好的经济效益和社会效益。

超氧化物歧化酶 (EC1.15.1.1 Superoxide dismutase, 简称 SOD) 是一种重要的氧自由基清除剂, 它是人体重要的防御酶之一, 是人体不可缺少的重要物质, 是人体自由基的头号杀手, 国际公认的氧自由基的专一清除剂, 人体内的氧自由基在 SOD 的作用下, 歧化为水和新生氧, 达到彻底清除体内的过氧自由基, 因此能延缓衰老, 提高人体免疫力, 预防和治疗一些疾病。SOD 是近十几年研究较多、发展较快的新型益寿保健品添加剂, 主要应用于医药、化妆品和保健食品的生产中。目前, 我

国 SOD 的主要来源是从牲畜血液中提取, 该方法所用原料有限, 质量不稳定, 成本高。在啤酒废酵母中 SOD 的含量较高, 我们经过多年的努力, 研究利用啤酒酵母生产 SOD 的生产工艺, 所得 SOD 粗酶液的收率可达到 73%。

1 材料与方法

1.1 材料

啤酒废酵母: 校啤酒厂提供。

试剂: 甲苯、氯仿、无水乙醇、异丙醇、丙酮、邻苯三酚均为分析纯。

设备: 三角瓶、分析天平、高速离心机、旋转摇床。

1.2 工艺流程

酵母泥 洗涤

酵母培养基 灭菌 酵母复壮培养 SOD 提取 SOD 纯化产品

1.3 实验方法

1.3.1 啤酒废酵母的预处理

收稿日期: 2007-01-17

作者简介: 廖湘萍(1961-), 女, 瑶族, 副教授, 研究方向: 食品与工业发酵。

将回收的啤酒废酵母先以等量的无菌冰水混匀,再用80~100目不锈钢孔板筛过滤除去蛋白质、酒花树脂和其他较大的杂质,然后进行离心分离,再注入无菌冰水,搅拌均匀,静置3~4h后,倾去上层悬浊液,再用冰水漂洗2~3次。漂洗次数可按上层冰水的色泽和透明情况来确定,如果色深、水混浊,则可多漂洗几次,直到所得上层清液无色无味,酵母呈纯白色为止^[2]。

1.3.2 酵母的复壮培养

酵母复壮的培养基采用酵母培养基(%):葡萄糖8,蛋白胨1,酵母膏1,蒸馏水1000 mL。将配制好的酵母培养基在121℃温度下灭菌20 min,按30%接种量接入经过洗涤后的酵母,于恒温摇床上进行培养。摇瓶培养条件见表1。

表1 摇瓶培养条件

温度	转速	时间	接种量
28℃	140 r/min	2 h	30%

1.3.3 酵母 SOD 的提取

按每1g酵母湿细胞中加入9 mL异丙醇,经浸泡120 min,抽滤除去溶剂后,加入3倍体积的50 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH7.0),搅拌120 min,离心除去菌体,即得SOD粗提液。

1.3.4 SOD 纯化

用2 mol/L HCl调节SOD粗提液pH至5.0,加入丙酮,搅拌均匀后,离心(5000 r/min)除去沉淀杂蛋白。将上清液调pH到4.0,继续加入丙酮,进行二次沉淀,离心收集沉淀得SOD纯化产品。

1.3.5 SOD 活性测定

SOD活性测定采用改进的微量邻苯酚自氧化法^[3]。

1.3.6 蛋白质含量测定

采用改良的Lowry法^[4]。

2 结果与分析

2.1 啤酒酵母预处理结果

每次实验称取50 g酵母泥,经洗涤、分离,平均收得率为92.6%。

2.2 啤酒酵母细胞壁的破碎方法的确定

因SOD为胞内酶,所以必须将细胞进行破碎,使酶溶解到溶液中,细胞破碎的方法有机械破碎法、物理破碎法、化学破碎法和酶学破碎法。我们采用化学破碎法进行破壁处理。具体采用了甲苯法、乙醇-氯仿法和异丙醇法。实验结果见表2。

比较表2的数据可知,3种破壁方法中,异丙醇法的总酶活力比其他两种方法高。说明异丙醇法对啤酒酵母细胞壁的破碎率较好,对酶的破坏率少,酶的保存率

表2 不同破壁法得SOD粗酶液活力比较

破壁方法	酵母量(g)	总酶活力(u)	每克酵母酶活力(u)
甲苯法	10	7307	730.7
乙醇-氯仿法	10	6585	658.5
异丙醇法	10	8167	816.7

高,因此确定异丙醇法为细胞壁破碎方法。

2.3 异丙醇法 SOD 最佳提取条件的确定

2.3.1 异丙醇最适浓度的确定

分别配制了50%、60%、70%、80%和90%5个浓度梯度,浸泡120 min,搅拌120 min,离心,测总酶活力和酶比活,3次平均结果见表3。

表3 不同异丙醇浓度提取SOD结果(酵母量50 g)

项目	异丙醇浓度(%)				
	50	60	70	80	90
总酶活力(u)	36032	41210	44319	45716	46615
总蛋白(mg)	83.6	102.5	124.4	134.1	148.1
酶比活(u/mg)	431	402	356	340	314

从表3可知,酵母细胞内的SOD的提取量与异丙醇浓度成正比,浓度增加,提取量也增加。而SOD的酶比活是随着异丙醇增加而下降的,表明随着SOD的增加杂蛋白量也在增加。所以,SOD的比酶活随着异丙醇浓度的增加而下降。我们的目的是提取SOD,杂蛋白在纯化过程中被除去,所以确定异丙醇提取SOD的浓度为90%。

2.3.2 最佳提取时间的确定

在确定最佳提取溶剂浓度为90%后,做不同提取时间的提取实验:分别选定了60 min、80 min、100 min、120 min和140 min5个提取时间进行实验。结果发现,SOD的释放量随着提取时间的增加而增加,达到一定的数量后,增加量减慢。在120 min和140 min时的增加变化不大,为增加设备的利用率,所以确定120 min为SOD的最佳提取时间。

2.3.3 最适提取pH的确定

固定异丙醇浓度为90%,提取时间120 min,配制5个不同pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)的溶液进行提取,测粗酶液中SOD的总酶活,在pH7.0时总酶活最高,所以最佳的提取pH为7.0。

2.4 SOD 最佳纯化条件的确定

2.4.1 不同丙酮浓度对杂蛋白沉淀的影响

在粗酶液中除了含有SOD,还含有其他酶蛋白,因此要进行纯化,在纯化工艺中采用丙酮为沉淀剂,根据SOD与杂蛋白等电点不同的特点,进行纯化。SOD的等电点在pH4.0左右,而杂蛋白在pH5.0时沉淀量很多,因此提取时将pH调节到5.0。配制3组添加比例

(0.6 1、0.8 1、1 1) 进行纯化, 测得不同比例所得纯化 SOD 的酶比活, 结果见表 4。

表 4 不同浓度对杂蛋白沉淀的影响

项目	丙酮:粗酶液(v/v)		
	0.6	0.8	1
SOD 酶比活(u/mg)	1428	2990	2587

表 4 结果表明, 在 pH 为 5.0, 丙酮的浓度控制在丙酮粗酶液(v/v)=0.8 1 时, 杂蛋白沉淀最多, SOD 纯化最好, SOD 酶比活最高。

2.4.2 不同丙酮浓度对 SOD 沉淀纯化的影响

将通过离心分离除去杂蛋白的上清液的 pH 调到 SOD 的等电点 pH4, 然后做在不同浓度丙酮条件下 SOD 的沉淀实验, 测得 SOD 酶比活见表 5。

表 5 不同浓度对 SOD 沉淀的影响

项目	丙酮:粗酶液(v/v)		
	0.1	0.3	0.5
SOD 酶比活(u/mg)	2629	2909	2788

表 5 结果表明, 采用丙酮 SOD 清液为 0.3 1 的比例所获得的 SOD 沉淀酶比活最高, 因此纯度最高。

2.5 啤酒酵母 SOD 提取纯化结果

取车间啤酒废酵母 100 g 在异丙醇为 90 % 浓度、pH 为 7.0、提取时间控制为 120 min 的条件下进行抽提, 所得粗酶液采取上述优化后的纯化条件进行二级纯化, 所得 SOD 产品结果见表 6。

表 6 结果表明, 采用异丙醇提取啤酒酵母中的 SOD, 丙酮二次分级沉淀纯化的 SOD 的方法, 所得 SOD

表 6 优化提取条件下啤酒酵母 SOD 提取纯化结果

项目	总蛋白(mg)	总酶活力(u)	酶比活(u/mg)	酶活力回收(%)
异丙醇粗提液	301.1	9.42×10^4	312.8	100
丙酮一次沉淀	25.7	7.95×10^4	3093.4	84
丙酮二次沉淀	22.6	6.89×10^4	3048.7	73

的酶比活可达到 3048.7 u/mg, 对粗酶提取液的酶活力回收率达 73 %。

3 结论

采用异丙醇破壁、丙酮二次纯化提取 SOD 生产工艺, 可得到 SOD 产品, 且酶比活达 3050.2 u/mg。与胞内 SOD 提取老工艺相比, 具有工艺简单、设备少、操作简单、成本低等特点。利用啤酒废酵母进行深加工提取 SOD, 不但可得到高附加值的产品, 且充分利用资源, 变害为利, 变废为宝, 提高企业经济效益, 增强企业的生存竞争能力。提取 SOD 后的酵母残渣及杂蛋白可考虑加工为饲料或饲料蛋白添加剂, 真正达到清洁生产的目的。为降低成本, 异丙醇均可考虑回收浓缩循环使用。

参考文献:

- [1] 王凯军, 秦人伟. 发酵工业废水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.252.
- [2] 王福源. 现代食品发酵技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.13.
- [3] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 邻苯三酚自氧法测定超氧化歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-222.
- [4] Schachtel G R. et al. Extraction with supercritical gases[J]. Ann Biochem, 1973.51: 654.

18 个黄酒品牌获“纯粮精酿标志”

本刊讯: 以第一食品的金枫酿酒、绍兴黄酒集团的古越龙山、会稽山绍兴酒为首的 7 家黄酒企业的 18 个品牌于 2007 年初获得了“纯粮精酿黄酒标志”的首批认定。

据了解, 该标志认定是食品工业协会在国家工商总局申请注册用以证明高品质黄酒的产品标志, 并在国内黄酒行业骨干企业中开展认定工作。

业内普遍认为, 此举是为了促进产业和品牌的进一步集中, 必将加速行业整合, 龙头企业也将进一步扩张。

中国酿酒工业协会黄酒分会统计数据显示, 目前国内年度黄酒人均消费为 1.4 L、年度白酒人均消费为 2.6 L、年度啤酒人均消费为 21 L, 与白酒、啤酒相比, 黄酒的年度人均消费仍存在较大的差距。据预测, 到 2015 年, 黄酒市场需求量将达到 250~300 万千升, 黄酒行业有极大的市场发展空间。

(江砂)

中国酒业被列入行业信用评价体系试点单位

本刊讯: 2007 年 4 月, 全国整规办公布了首批行业信用评价试点单位名单, 中国酿酒工业协会和中国酒类流通协会均被列入行业信用评价体系试点单位。

据悉, 自全国整规办下发《关于开展首批行业信用评价试点工作的通知》起, 至 2006 年 9 月, 已有 52 家商会协会提出试点申请。全国整顿和规范市场经济秩序领导小组办公室(简称“全国整规办”)和国务院国有资产监督管理委员会(简称“国务院国资委”)组织专家对提出申请的商会协会试点方案进行了评审和论证, 最终评定出 44 家行业信用评价体系试点单位。其中, 中国酿酒工业协会和中国酒类流通协会成为首批行业信用评价试点单位。

全国整规办主任、商务部副部长姜增伟指出, 行业信用体系建设是新时期商会协会工作的内在要求, 对促进行业健康发展有着重要作用。这次行业信用评价试点工作很有意义也十分必要, 具有很强的挑战性。希望此次试点的商会协会能正确把握信用评价的方向, 坚持为会员服务和不以盈利为目的的宗旨, 制定科学的评价标准和公正透明的评价程序, 广泛应用评价成果, 以履行协会职责, 提升自身形象, 完善自律、服务、沟通、协调的功能, 使协会工作得到创新发展。(小凡)