

盐法提取啤酒废酵母 RNA 的研究

李 珊,吴振强

(华南理工大学生物科学与工程学院,广东 广州 510640)

摘 要: 采用正交设计试验法对盐法提取啤酒废酵母 RNA 工艺过程中的酵母浓度、NaCl 浓度、抽提温度和抽提时间等因素进行了研究。用方差分析处理,实验结果表明:酵母浓度 8%,NaCl 6%,抽提温度 95℃,抽提时间 6 h 是提取啤酒废酵母 RNA 的适宜条件,并将其用于啤酒厂废酵母泥的 RNA 提取试验,得率为 3.23%。

关键词: 啤酒; 盐法提取; 酵母 RNA; 正交试验

中图分类号:TS262.5;TS261.9;X797 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)07-0076-03

Study on RNA Extraction from Waste Yeast by Salt Method

LI Shan and WU Zhen-qiang

(Bioscience and Bioengineering College of South China Technical Institute, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: The relative factors involved in the process of RNA extraction from waste beer yeast by salt method such as yeast concentration, NaCl concentration, extraction temperature and extraction time were studied by orthogonal experiments. The experimental results were treated by variance analysis. The optimal extraction conditions were obtained as follows: yeast concentration as 8%, NaCl concentration as 6%, extraction temperature at 95℃, and extraction time as 6 h. Such technique was applied in waste slurry RNA extraction in brewery with the yield as 3.23%. (Tran. by YUE Yang)

Key words: beer; salt method; yeast RNA; orthogonal experiment

核糖核酸(即 RNA)和它的降解物核苷酸、核苷及其衍生物不仅是生物化学和医学研究中的宝贵试剂,而且在食品、农业等领域中亦有着很广泛的应用。随着啤酒等发酵行业的快速发展,产生了相应的大量废发酵副产物,如何利用这些低值的副产物,既做到不污染环境,还能产生良好的经济效益,一直是研究的热点^[1]。随着农业生物技术的开发速度加快,利用微生物资源提取氨基酸、核苷酸等生物小分子,具有非化学合成的、无毒、无害的特点,能够促进作物的生长,提高作物的品质,市场前景日益看好,因此发酵废菌体的综合利用有了更好的出路^[2-4]。目前,从微生物中提取核酸的方法主要有盐法、稀碱法、机械法、氨法、自溶法、酶法等,盐法以其提取条件温和成本低的优点,应用比较广泛,但盐法与稀碱法相比,提取率低,有必要对盐法提取工艺优化,提高得率和纯度。本实验利用正交实验,优化盐法提取啤酒废酵母 RNA 的得率和纯度。

1 材料与方 法

1.1 材 料

啤酒废酵母泥和啤酒废酵母干粉:取自啤酒厂。

1.2 主要仪器与设备

pH 计:Ph-10, Sartorius 公司;

高速离心机:CF7D2,日本日立公司;

电子天平:ER-180A,日本 A&D 公司;

HACH/DR2010 型分光光度计:美国 HACH 公司;

HHS 电热恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程(见图 1)

1.3.2 提取方法

每份实验样取啤酒废酵母干粉 12 g,按正交表设计相应的实验条件,制成一定浓度的菌悬液,放入相应温度的水浴中达到所需的温度,加入与实验条件相应的 NaCl 量,在烧杯上盖上薄膜,保持相应时间后,迅速冷却到 10℃以下,离心除去蛋白和菌体,得澄清的上清液,用 6 mol/L 盐酸调 pH 为 2.5,置 4℃冰箱中 4 h 以

收稿日期:2005-01-18

作者简介:李珊(1980-),男,湖南长沙人,在读硕士。主要从事发酵工程、生物化工等方面的研究开发工作。

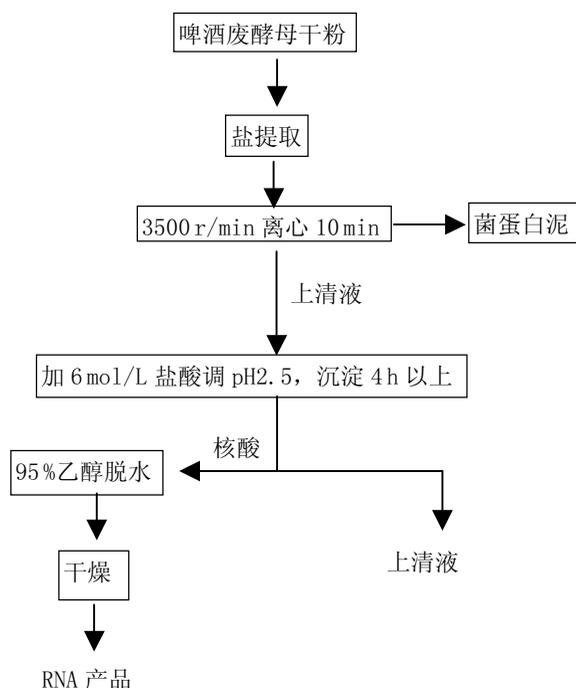


图 1 工艺流程图

上,再离心,收集产品,用 95%乙醇脱水,干燥,得到 RNA 产品^[5]。

1.3.3 RNA 纯度测定:定磷法^[6]。

1.3.4 RNA 得率计算方法

$$\text{RNA 得率}(\%) = \frac{\text{粗 RNA 干重}(\text{g}) \times \text{RNA 纯度}(\%)}{\text{啤酒废酵母干粉}(\text{g})}$$

1.3.5 RNA 提取率计算方法

$$\text{RNA 提取率}(\%) = \frac{\text{粗 RNA 干重}(\text{g}) \times \text{RNA 纯度}(\%)}{\text{啤酒废酵母干粉所含 RNA 重量}(\text{g})}$$

2 结果与讨论

2.1 实验结果

用正交实验 $L_{16}(4^4)$ 考查酵母浓度、NaCl 浓度、抽提温度和抽提时间 4 个因素对提取率的影响。试验设计及结果见表 1;并对表 1 数据进行方差分析^[7,8],结果见表 2。

$$I_j : 10.29 \quad 11.96 \quad 12.25 \quad 11.13, G = \sum Y_i = 42.29$$

$$II_j : 10.83 \quad 13.11 \quad 10.93 \quad 12.21, CT = G^2/16m = 50.61$$

$$III_j : 14.74 \quad 14.76 \quad 12.81 \quad 12.80, S_{\text{总}1} = (\sum Y_i^2)/m - CT = 161.36/3 - 50.61 = 3.18$$

$$IV_j : 13.43 \quad 9.46 \quad 13.30 \quad 13.15, S_{\text{总}} = 54.2603 - 50.61 = 3.65$$

$$R_j^2 : 20.81 \quad 622.26 \quad 610.51 \quad 609.72, Se^2 = S_{\text{总}} - S_{\text{总}1} = 0.47, S_{\text{总}} \text{自由度} = 16m - 1 = 47 (m=3)$$

$$R_j^2/4m : 51.73 \quad 51.86 \quad 50.88 \quad 50.81$$

$$S_j : 1.12 \quad 1.25 \quad 0.27 \quad 0.20$$

表 2 方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 比	显著性
酵母浓度 (A)	1.25	3	0.42	32.31	**
NaCl 浓度 (B)	0.27	3	0.09	6.92	**
抽提温度 (C)	1.12	3	0.37	28.46	**
抽提时间 (D)	0.20	3	0.07	5.38	*
误差 (e)	0.47	35	0.013		

$$F_{0.001}(3,35) = 6.83, F_{0.01}(3,35) = 4.41$$

2.2 结论

由正交实验(表 1)及方差分析(表 2)结果可知,所选择的 4 个因素对提取率都有影响,酵母浓度、抽提温度和 NaCl 浓度影响高度显著;抽提时间也有显著的影响。

表 1 浓盐法提取酵母 RNA 正交实验结果

水平正交号	酵母浓度 (%)	NaCl 浓度 (%)	抽提温度 (°C)	抽提时间 (h)	第一次			第二次			第三次			合计 Y_i	平均 (%)
					产量 (mg)	纯度 (%)	得率 (%)	产量 (mg)	纯度 (%)	得率 (%)	产量 (mg)	纯度 (%)	得率 (%)		
1	1(6)	1(12)	1(80)	1(3)	127.4	69.80	0.74	123.1	75.08	0.77	128.2	79.90	0.85	2.36	0.79
2	2(12)	2(10)	1(80)	2(4)	146.8	76.97	0.94	119.1	84.37	0.84	131.0	69.32	0.76	2.54	0.85
3	3(8)	3(8)	1(80)	3(5)	120.4	97.06	0.97	134.9	89.36	1.00	128.4	94.15	1.01	2.98	0.99
4	4(10)	4(6)	1(80)	4(6)	146.1	77.10	0.94	116.6	68.69	0.67	134.6	71.00	0.80	2.41	0.80
5	1(6)	2(10)	2(85)	3(5)	135.0	72.24	0.81	145.7	77.12	0.94	129.5	68.80	0.74	2.49	0.83
6	2(12)	1(12)	2(85)	4(6)	149.0	81.64	1.01	135.0	82.27	0.92	112.0	77.41	0.72	2.65	0.88
7	3(8)	4(6)	2(85)	1(3)	173.2	84.60	1.22	168.9	92.56	1.30	141.8	74.95	0.89	3.41	1.14
8	4(10)	3(8)	2(85)	2(4)	127.6	64.72	0.69	135.6	68.92	0.78	128.7	75.72	0.81	2.28	0.76
9	1(6)	3(8)	3(95)	4(6)	221.7	72.62	1.34	192.6	76.63	1.23	235.3	76.55	1.50	4.07	1.36
10	2(12)	4(6)	3(95)	3(5)	246.7	78.84	1.62	231.2	79.38	1.53	245.0	63.15	1.29	4.44	1.48
11	3(8)	1(12)	3(95)	2(4)	183.9	92.47	1.42	197.1	86.12	1.41	192.0	95.21	1.52	4.35	1.45
12	4(10)	2(10)	3(95)	1(3)	130.8	67.91	0.74	98.1	72.31	0.59	103.6	63.21	0.55	1.88	0.63
13	1(6)	4(6)	4(90)	2(4)	126.3	90.85	0.96	129.3	90.64	0.98	184.1	71.83	1.10	3.04	1.01
14	2(12)	3(8)	4(90)	1(3)	164.4	78.74	1.08	199.1	82.21	1.36	170.4	73.04	1.04	3.48	1.16
15	3(8)	2(10)	4(90)	4(6)	185.4	82.12	1.27	168.9	91.25	1.28	194.8	90.47	1.47	4.02	1.34
16	4(10)	1(12)	4(90)	3(5)	151.2	65.74	0.83	161.4	77.10	1.04	169.0	72.66	1.02	2.89	0.96

表3 验证试验结果

酵母浓度	NaCl 浓度	抽提温度 (°C)	抽提时间 (h)	第一次			第二次			第三次			平均得率
				产量(mg)	纯度	得率	产量(mg)	纯度	得率	产量(mg)	纯度	得率	
8	6	95	6	206.6	87.47	1.51	232.3	92.11	1.78	225.8	86.50	1.63	1.64

响。实验结果表明, RNA 提取的适宜条件是: 酵母浓度 8%, NaCl 浓度 6%, 抽提温度 95 °C, 抽提时间 6 h。

2.3 正交优化条件应用试验

以最佳组合 A₃B₄C₃D₄ 作为条件, 做验证实验, 结果见表 3。

由于啤酒废酵母干粉核苷酸含量为 4.13%, 换算成 RNA 提取率, 为 39.71% 左右。

2.4 啤酒废酵母泥的提取应用试验

用废酵母泥代替啤酒废酵母干粉(按酵母含水量换算成干粉质量), 在 RNA 适宜的提取条件(浓度 8%, NaCl 浓度 6%, 抽提温度 95 °C, 抽提时间 6 h)下, 得到的提取液用紫外法^[6]测定 RNA 含量, 计算提取率, 实验结果见表 4。

表4 啤酒废酵母泥验证实验结果 (%)

酵母浓度	NaCl 浓度	抽提温度 (°C)	抽提时间 (h)	第一次得率	第二次得率	第三次得率	平均得率	RNA 提取率
8	6	95	6	3.3	3.2	3.2	3.23	78.21

目前, 荷兰 Gist-Brocades 公司已经能在商业上达到 2% 得率 5'-GMP 的核酸抽提物, 但这是在特别的高核酵母上得到的, 而荷兰和德国的公司用啤酒酵母只能达到 Gist-Brocades 的 50% 以下^[9, 10]。酵母的核酸在不同的生长期含量不同, 由于废啤酒酵母处于衰退期, 核酸含量比较低, 细胞内与自溶相关的酶活也较低, 因此从废啤酒酵母提取核酸的得率也比正常的酵母细胞低。

盐法优化工艺提取啤酒废酵母干粉的 RNA, 得率达 1.64% 左右, 与常规盐法提取相当, 但用于啤酒废酵母泥提取 RNA, 得率达 3.23%, 比常规盐法提高了 80% 左右。虽然盐法提取率要低于稀碱法, 但试验表明, 盐法提取和稀碱法提取得到的核酸溶解度不同, 前者有很好的溶解度, 后者有不溶物存在。提取液中, 只有 50% 左右的 RNA 被沉淀得到, 可见 RNA 提取液的后处理尤为重要。RNA 的等电点在 pH2.5 左右, 需准确调节 pH 值方能获得最大沉淀量。酸化时, 温度宜低不宜高, 因为温度高, RNA 溶解度增加, 不利于其沉淀生成。另外, 通过加 CaCl₂ 等沉淀剂能显著增加 RNA 的沉淀, 但这将降

低 RNA 的纯度。因此, 在保持一定 RNA 纯度的前提下, 改善沉淀工艺, 提高 RNA 提取液的沉淀率, 有待于进一步研究。

提取 RNA 后的菌蛋白泥, 其蛋白质含量占干菌体的 50%, 简单处理后, 除可做优质饲料蛋白外, 还可作为食品添加剂使用。因此, 利用废酵母泥(或废液培养酵母)提取 RNA 确实是一项变废为宝、综合利用、防止环境污染的大好事, 具有很好的经济、社会效益。

参考文献:

- [1] Hee Jeong Chae, Hyun Joo Man-Jin In. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics[J]. Biore-source Technology. 2001, 76: 253-258.
- [2] 吴振强, 李珊, 罗宁. 农用核苷酸的开发进展[J]. 土壤肥料, 2004 (4): 3-6.
- [3] Hall R.H., Robins M.J., Stasink L. and Thedford R. Isolation of N⁶-(Y,Y-dimethylallyl)Adenosine from soluble ribonucleic acid[J]. J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88: 2614.
- [4] E. Moustafa, et al: Effect of dibutyryl cyclic AMP and other nucleotides on nitrogen fixation by legume root nodules[J]. Nature. 1973, 244(5416): 461-462.
- [5] 张淑桂, 钱敏, 王光灿, 等. 稀碱法提取酵母 RNA 的正交实验研究[J]. 云南化工, 1994 (2): 10-12.
- [6] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2003.
- [7] 辛益军. 方差分析与实验设计[M]. 北京: 中国财政经济出版社, 2002.
- [8] 颜钰芬, 徐明钧. 数理统计[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1992.
- [9] P. Sombutanuchit, M. Suphantharika, C. Verduyn: Preparation of 5'-GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2001, 17: 163-168.
- [10] Claude P. Champagne, Julie Barrette, Jacques Goulet. Interaction between pH, autolysis promoters and bacterial contamination on the production of yeast extracts[J]. Food Research. 1999, 32: 575-583.

习酒公司
4个品牌
获表彰

本刊讯: 2005年5月16日, 中国酿酒工业协会发布中酒协[2005]22号文, 对在『全国浓香型白酒普查工作』中获得浓香型白酒质量优秀的20个产品和生产企业进行通报表彰, 贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司及其产品三星习酒、五星习酒、茅台液酒、国产天香酒等4个品牌同时上榜受到表彰。

本次检评工作通过产品市场采样、检测品评、评价以及数据的汇总和分析, 感官鉴评样品118个, 经国家级评委认真品评, 历时近一年。(小)