

从酵母细胞壁提取 α -1,3-D-葡聚糖的研究

龚炎杰,郭祀远,魏东,蔡妙颜

(华南理工大学轻工与食品学院,广东 广州 510640)

摘要: 采用酸法、碱法提取酵母细胞壁中的 α -1,3-D-葡聚糖。用纸层析法和紫外光谱法进行多糖成分分析。结果表明,经酸法提取的 α -1,3-D-葡聚糖产品中除含有葡聚糖外,还含有甘露聚糖和蛋白质;而用碱法提取时,产品为高纯度的 α -1,3-D-葡聚糖。

关键词: 酵母细胞壁; α -1,3-D-葡聚糖; 酸法; 碱法

中图分类号:TS261.1;Q53;O657.3;O658.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)01-0098-02

Research on the Extraction of α -1,3-D-glucosan from Yeast Cell Wall

GONG Yan-jie, GUO Si-yuan, WEI Dong and CAI Miao-yan

(Light Industry & Food Science College of South China Technical Institute, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: α -1,3-D-glucosan was extracted from yeast cell wall by acid process or by alkaline process. Then the polysaccharide components were analyzed by paper chromatography and ultraviolet spectroscopy. The results suggested that the extraction by acid process produced mannan and protein except α -1,3-D-glucosan. However, the extraction by alkaline process only produced high-purity α -1,3-D-glucosan. (Trans. by YUE Yang)

Key words: yeast cell wall; α -1,3-D-glucosan; acid process; alkaline process

在酵母细胞壁中,含有大量的 α -1,3-D-葡聚糖成分。 α -1,3-D-葡聚糖是一种富生物活性的多糖,它表现出很强的刺激免疫、抗肿瘤和抗辐射等活性^[1-3],是一种良好的生物反应调节剂(biological response modifiers, BRM)。

酵母细胞壁从外向内分为3层,分别为甘露糖、蛋白质和葡聚糖。葡聚糖是由葡萄糖组成的均一多糖。酵母细胞壁中存在着 α -1,6-分支的碱不溶性 α -1,3-D-葡聚糖、碱溶性 α -1,3-D-葡聚糖、中间插有 α -1,3-键的无定型的酸溶性 α -1,6-D-葡聚糖^[4]。从酵母中提取葡聚糖就是要从细胞壁中去除甘露聚糖和蛋白质。国内曾有人分别用酶法、酶-Sevage法和碱法^[5]对废酵母进行 α -1,3-D-葡聚糖的提取,但产品纯度不高,工艺也较复杂。本文分别采用酸法、碱法来提取酵母中的 α -1,3-D-葡聚糖,并分析其产品的纯度,探讨其水解机理,从而找到一种综合效果较佳的从啤酒酵母中提取 α -1,3-D-葡聚糖的方法。

1 试验材料、仪器与方法

1.1 材料

药用酵母粉,市售。

收稿日期:2005-09-21

作者简介:龚炎杰(1980-),男,硕士研究生,研究方向:天然产物有效成分的提取与分离。

1.2 仪器与试剂

紫外分光光度计、离心机、真空干燥箱、集热式恒温加热磁力搅拌器;乙酸、氢氧化钠、无水乙醇、无水乙醚等,均为分析纯。

1.3 α -1,3-D-葡聚糖的提取方法

1.3.1 酸法

配制 1.0 mol/L 醋酸溶液 100 mL,加入酵母粉 5 g,在 90 °C 下反应 3 h。3000 r/min 离心 15 min,沉淀物水洗 2 次,然后用无水乙醇洗涤,无水乙醚脱水,在 -0.1 MPa, 50 °C 条件下真空干燥至恒重即得产品。

1.3.2 碱法

配制 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 100 mL,加入酵母粉 5 g,在 90 °C 条件下反应 3 h。3000 r/min 离心 15 min,沉淀物水洗 2 次,然后用无水乙醇洗涤,无水乙醚脱水,再在 -0.1 MPa, 50 °C 条件下真空干燥至恒重即得产品。

1.4 分析方法

1.4.1 紫外吸收

取适量多糖溶于蒸馏水中,以蒸馏水作空白,于 200~400 nm 处扫描紫外吸收光谱。

1.4.2 单糖组成分析

纸层析:称取多糖样品 10 mg,先用 5 mL 10 mol/L 的硫酸水解 5 min 后,加水将硫酸浓度稀释至 2 mol/L,封管后置于 100 °C 烘箱中水解 6 h,使水解完全,水解产物用碳酸钡中和,过滤,将滤液浓缩至适当浓度,水解产物与标准葡萄糖、甘露糖对照进行纸层析。展开剂为正丁醇-无水乙酸-水=4:1:5(v/v,上层液),以苯胺-邻苯二甲酸为显色剂。

2 结果分析与讨论

2.1 结果分析

2.1.1 紫外光谱分析

分别对经酸法、碱法提取的多糖产品作紫外光谱分析,结果见图 1,图 2。

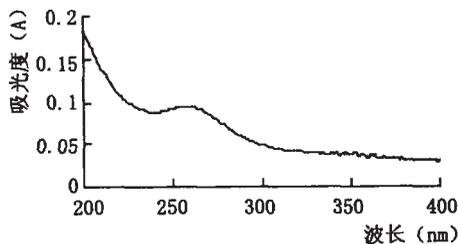


图 1 酸法提取多糖的紫外线吸收图谱

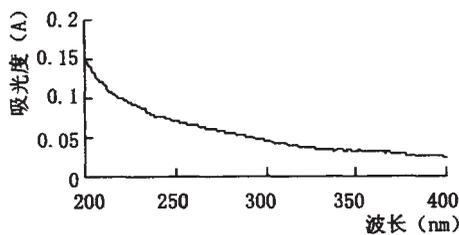


图 2 碱法提取多糖的紫外线吸收图谱

图 1,图 2 表明,酸法所得产品在 260 nm 处有吸收峰,说明其含有蛋白质、核酸成分;而碱法所得产品在 260 nm 和 280 nm 处均无吸收峰出现,说明其不含蛋白质、核酸类成分。

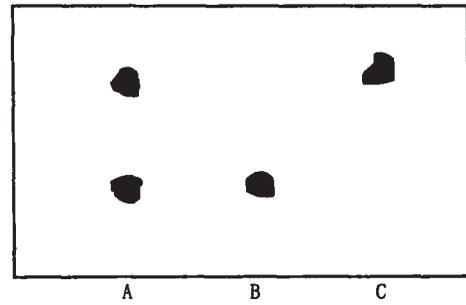
2.1.2 多糖成分分析

分别对两种不同工艺所得的产品进行纸层析色谱,结果见图 3,图 4。

图 3 表明,酸法提取的多糖样品水解物不仅含有葡萄糖,而且含有甘露糖,说明制备的多糖产品除了葡聚糖外还含有甘露糖类成分;而图 4 中水解物层析结果表明,碱法提取的多糖产品中只含有葡聚糖类物质。

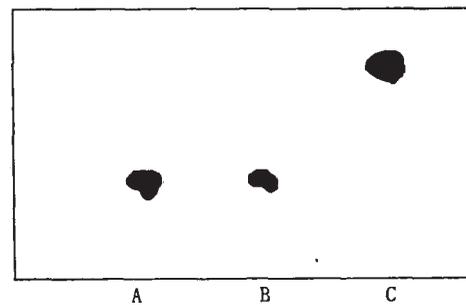
2.2 机理探讨

用这两种方法来提取 -1,3-D-葡聚糖,结果之所以会有这么大的差别。可以作如下解释^[6-9]:酵母细胞壁的甘露聚糖是高度分支的多聚体,以 -1,6-键合的 D-



注: A 为多糖样品;B 为葡萄糖;C 为甘露糖

图 3 酸法提取多糖的纸层析图谱



注: A 为多糖样品;B 为葡萄糖;C 为甘露糖

图 4 碱法提取多糖的纸层析图谱

甘露糖为骨架链,其中大部分甚至全部的残基具有 -1,2-或-1,3-连接的含有 2~5 个甘露糖残基的侧链。位于酵母细胞壁表面的 D-甘露聚糖,同中间层的蛋白质和磷酸酯连在一起形成磷酸-甘露聚糖-蛋白质复合物。其主要通过甘露聚糖的大量碳水化合物短链与多肽残基上的酰胺基或氨基相结合,形成 N-糖苷键。此外甘露聚糖-蛋白质复合物又通过 GPI(葡萄糖磷酸基肌醇)残基与 -1,6-D-葡聚糖相连。

在酸性条件下,O-糖苷键比较容易断裂,而 N-糖苷键、蛋白质中的酰胺键和 GPI 残基都是稳定的,不易断裂,所以酸法提取的多糖产品中保留了相当一部分甘露聚糖-蛋白质的复合物。相反,在碱性条件下,N-糖苷键、蛋白质中的酰胺键和 GPI 残基都是不稳定的,尽管 O-糖苷键不易断裂,但是甘露聚糖、蛋白质却以甘露聚糖、甘露聚糖-肽、肽或氨基酸等的形式溶入碱溶液中,从而得到高纯度的碱不溶性 -1,3-D-葡聚糖。

3 结论

用碱法提取酵母细胞壁 -1,3-D-葡聚糖,所得的产品中去除了蛋白质和甘露聚糖成分,且葡聚糖得率可达 10%。所以,碱提取法是从药用酵母中提取 -1,3-D-葡聚糖的高效方法。

参考文献:

(下转第 104 页)

操作,劳动强度大,为了提高产品质量,必须操作细致。通过试验证明,酿酒工艺、卫生条件与质量稳定关系相当密切。要求生产操作达到“稳、准、细、净”,各个环节必须精工细做,以配料、上甑和蒸酒蒸料等最为重要,必须严格遵守操作规程。

试验酒质量为什么好?初步认为存在水分适宜、入窖温度偏低和用曲量适当等,符合了提高质量的要求。为了使四特酒优质高产,应该对原料有一定的要求,制订半成品和成品酒的质量标准,建立一套完整的生产管理制度。

3 四特酒的标准与展望

通过半年多的生产实践证明,按照试验研究的生产工艺,提高了四特酒的质量。从试验结果看出,试制酒的总酸和总酯均较出厂四特酒含量高,尝评结果一致认为较好。

白酒质量的好坏,以色、香、味和风格为尝评依据。白酒尝评的优劣,以感官尝评为主,理化分析次之。这次试验对高粱与中碎米原料、成品酒加糖与不加糖分别进行了对比,组织全厂20名职工分两次尝评,同时用全国优质酒的德山大曲酒为对对照。尝评结果认为,以高粱原料酿酒好,认为是发展优质酒的方向,同时极大地提

高了四特酒的质量。关于成品酒中加糖可使酒味醇甜,减少苦涩感,因加糖可将酒中杂味抑制,但仔细尝评仍有感觉,其不加糖亦可生产出好酒。通过高粱原料和发酵期长的中碎米原料酿出的酒,经尝评仅次于德山大曲酒。这次尝评因样品多、时间短,所以尝评结果个别尚有出入,有人认为在当地习惯酒中加糖,说明喝酒有地方性和习惯性。

四特酒应加强生产技术管理,成品酒经过半年以上的贮存,精心勾兑,改进包装,其质量一定会上新台阶,最后达到“清彻透明,清香纯正,醇厚甜净,饮后余香”,具有我国传统大曲酒的独特风格,可另树一帜。

四特酒经过科学研究试验后,在全厂职工的共同努力下,产品质量提高很快。产品有加糖与不加糖两种,据反映,不加糖的酒多销售北京等省市,远销香港等地区。1984年获轻工业部酒类质量银杯奖,1988年荣获全国第五届评酒会国家优质酒(银质奖)称号。1991年,轻工业部食品发酵研究所剖析其他香型白酒成分的特征,发现四特酒富含奇数碳脂肪酸乙酯,相应的脂肪酸含量也较高,因此称为特型,为特型的典型代表,已占全国白酒企业各类香型的0.57%,其产量可观。该厂生产规模逐渐扩大,在市场上有了发展,取得了显著的经济效益,2004年进入全国白酒销售收入前11家企业。

(上接第99页)

- [1] 王森,丁霄霖.葡聚糖生物活性与结构的关系[J].无锡轻工大学学报,1997,16(2):90-94.
- [2] Hofer M., Pospisil M. ..Glucan as stimulator of hem atopoiesis in normal and gamma-irradiated mice[J]. Int. J. Immunopharmac., 1997,1(19):607-609.
- [3] 李花霞,杨文鸽.啤酒酵母中葡聚糖的研究[J].食品研究与开发,2004,25(5):54-56.
- [4] 胡晓忠,冯万祥.酵母葡聚糖的制备及理化性质[J].华东理工大学学报,1999,25(5):477-479.
- [5] 王淮.酵母-1,3-葡聚糖的自溶-酶-碱法提取及其酶解产物特性研究[D].武汉:华中农业大学,2002.
- [6] Marcilla A., Valentín E., Santandreu R. ..The cell wall structure and development in diagnosis and treatment of candidiasis[J]. International Microbiol., 1998,1(1):107-116.
- [7] [比]S De贝特斯,[比]E J.旺达姆,等陈代杰,罗敏玉译.生物高分子多糖——真核生物多糖(第六卷)[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [8] Osumi M. ..The ultrastructure of yeast cell wall structure and formation Microbiol. [J]. International Microbiol. 1998,1(29):207-233.
- [9] Shahinian S., Dijkgraaf G. J. P., Sdicu A. M., Thomas D. Y., Jakob C. A., Aebi M., Bussey H. ..Involvement of Protein N-Glycosyl Chain Glucosylation and Processing in the Biosynthesis of Cell Wall β -1,6-Glucan of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, June 1998,1(149):843-856.

(上接第101页)

从表4可知,取下三角瓶冷却皂化液,测得的挥发酯偏高,产生正误差。不卸取三角瓶冷却,减少了空气中CO₂与NaOH反应的机会,测得的结果接近样品中挥发酯的真实含量。

4 结束语

挥发酯是一个不易测准的分析项目,为了减少误差,提高准确度和精密度,必须从以下两方面着手:

4.1 严格遵守容量分析的操作规程。容量瓶、移液管、滴定管、酸度计等要精心校正,减少仪器本身带来的误

差,同时要正确、熟练、细致地操作,减少操作误差;向滴定管注入或放出溶液后30s到1min再读数,以便附在内壁的溶液流下。滴定管内溶液的流速应始终一致,刻度标线的读数务必准确。如果标准溶液的消耗量计偏差0.02mL,就会给测定结果带来较大误差。

4.2 必须控制好外界条件。试样制备、取样、皂化过程中严防酯类挥发;冷却皂化液时尽量减少与空气接触,防止部分NaOH被CO₂中和,产生错误结果。

以上外界条件控制,也适用于葡萄酒和果酒挥发酯的测定。