

# 从啤酒废酵母中提取海藻糖工艺的研究

谭海刚,李书巧,关凤梅,王瑞明

(山东轻工业学院食品与生物工程学院,山东 济南 250100)

**摘要:** 对从啤酒废酵母中提取海藻糖的工艺进行了研究,在乙醇浓度为 60%(v/v),提取温度为 80±1℃,提取时间为 30 min,酵母质量浓度为 100 g/L 条件下,海藻糖的提取率可达 91.71%。采用活性炭脱色,阴阳离子交换除杂,经浓缩、结晶、干燥,制成的海藻糖成品纯度为 96.85%。

**关键词:** 综合利用; 啤酒废酵母; 提取; 海藻糖; 工艺

中图分类号: X797; TS261.1; TS261.9 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2005)04-0078-03

## Study on Extraction Technology of Trehalose from Waste Beer Yeast

TAN Hai-gang, LI Shu-qiao, GUAN Feng-mei and WANG Rui-ming

(Food and Bioengineering Dept. of Shandong Institute of Light Industry, Ji'nan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** Extraction technology of trehalose from waste beer yeast was studied in this paper. The extraction rate of trehalose could reach 91.71% under the following conditions: alcohol concentration 60%(v/v), temperature at 80±1℃, 90 min extraction time and the concentration of yeast as 100 g/L. The solution was decolorized by active carbon, and then desalted and decolorized by ion-exchange technique, then condensed and crystallized and dried. The purity of produced trehalose was as high as 96.85%.

**Key words:** comprehensive utilization; waste beer yeast; extraction; trehalose; technology

海藻糖(Trehalos,  $\alpha$ -D-glycopyranosyl- $\alpha$ -D-glycopyranoside)是由两个葡萄糖分子通过半缩醛羟基缩合而成的非还原性双糖。自然界中存在的海藻糖一般为( $\alpha$ , $\alpha$ )构型,它的分子式为  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ ,相对分子量为 378.33。

天然海藻糖是白色结晶体,易溶于水、热乙醇,不溶于乙醚、丙酮,无毒无害,无过敏性,具有甜味。海藻糖作为一种应急代谢物,能赋予动物、植物和微生物等抵抗营养缺乏、高温、低温、干燥、高渗透压、有毒物质等恶劣环境的能力<sup>[2,3]</sup>,它具有在严酷环境下保护生物体的生物膜、脂质体、蛋白质、核酸等结构和功能的特殊功效。更为重要的是外源性的海藻糖同样对生物体和生物大分子有良好的非特异性保护作用<sup>[4,5]</sup>。科学家对保存条件苛刻的一些酶类、病毒、疫苗、抗体和重组蛋白等在海藻糖存在条件下干燥和复水后的功能性进行了研究,结果表明,在干燥过程中海藻糖对这些酶类、病毒、疫苗、抗体和重组蛋白等具有明显保护作用<sup>[6,7]</sup>。作为一种生物添加剂,海藻糖在生物制品活性保存以及食品、化妆品、农业、医药等方面有着广泛的应用前景。

近年来,随着国民经济的迅猛发展,我国啤酒工业发展迅速,1992年我国啤酒产量已达 1000 万千升,而 2003 年啤酒产量达到 2540.48 万千升(国家统计局数据),为世界第一大啤酒生产国,但随之也带来一个难题,即如何处置啤酒生产副产物——废酵母问题。在啤酒的生产过程中,每生产 1000 kL 啤酒,就会产生 1~1.5 t 的剩余酵母,其中 60%左右是主发酵酵母,这部分酵母质量比较好,杂质少,是酵母利用的主要部分<sup>[8]</sup>。目前我国有的啤酒厂只是简单地将这些酵母烘干或直接添加到麦糟中去,用作动物饲料或饲料添加剂,但酵母具有坚韧的细胞壁,直接饲用或食用极不易消化,还有部分工厂直接排放至下水道中,造成环境的严重污染。啤酒酵母有较高的利用价值,合理地利用酵母进行开发或深加工,不仅为啤酒工业治理“三废”找到了一条有效的途径,而且将会产生巨大的经济社会效益。

### 1 实验材料和方法

#### 1.1 实验材料

啤酒厂废酵母、工业酒精(95%)、浓硫酸、萘酮、三氯乙酸、葡萄糖、海藻糖、活性炭、732 强酸性阳离子树

收稿日期: 2004-10-08

作者简介: 谭海刚(1979-),男,山东人,在读硕士研究生,主要从事微生物酶技术的研究。

脂、717 强碱性阴离子树脂。

## 1.2 仪器

RE-52A 旋转蒸发器、HH·S11-4 电热恒温水浴锅、721 分光光度计、DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱、分析天平、凯氏定氮仪、HZQ-Q 振荡器、TDL-5-A 离心机。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 提取方法和工艺

恒温水浴,一定质量酵母和一定体积的水-乙醇溶液在冷凝回流和充分搅拌下加热提取。

从啤酒废酵母中提取海藻糖的工艺流程:

啤酒废酵母→洗涤离心→加热预处理→乙醇浸提→冷却离心→上清液浓缩去醇→加足量醋酸铅溶液→过滤→滤液加足量固体草酸钠除铅→过滤→活性炭脱色→阴阳离子交换(阴阳体积比 2:1)→浓缩→乙醇结晶→过滤、洗涤及干燥→成品

### 1.3.2 酵母菌中海藻糖含量测定方法

酵母菌用 0.5 mol/L 三氯乙酸提取,所得溶液中仅有海藻糖存在<sup>[9]</sup>。用三氯乙酸提取液和 0.2% 硫酸蒽酮溶液以 1:4 的比例混合反应,并于 590 nm 处测反应液的吸收值。计算提取液中海藻糖的含量即酵母菌中的海藻糖量。

### 1.3.3 提取液中海藻糖定量分析方法

采用纸层析-硫酸蒽酮比色法<sup>[10]</sup>测定。

### 1.3.4 海藻糖成品纯度的测定方法

海藻糖含量的测定:硫酸蒽酮比色法。

蛋白质含量的测定:凯氏定氮法。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 预处理条件的确定

加热预处理可使海藻糖酶失活并使酵母细胞壁和细胞膜受到一定程度的破坏,有利于海藻糖的渗出,提高海藻糖的提取率。

#### 2.1.1 加热预处理温度的确定

将废酵母在不同温度下处理 5 h,然后用酵母质量浓度 50 g/L(干基)、50%(v/v)乙醇、80℃下提取 90 min,用纸层析-硫酸蒽酮比色法测定提取液中海藻糖量,计算其中的海藻糖提取率,结果见图 1。由

图 1 可知,加热预处理温度为 105℃时,海藻糖提取率达到 90.23%。再提高温度,海藻糖提取率趋于稳定,所以,确定加热预处理的最佳温度为 105℃。

#### 2.1.2 加热预处理时间的确定

将废酵母在 105℃下处理不同时间,然后按 2.1.1 测定海藻糖提取率,结果见图 2。由图 2 可知,加热预处理时间达到 4 h 时,海藻糖提取率达到 90.25%。再延

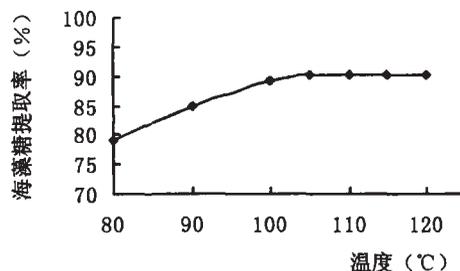


图 1 加热预处理温度对海藻糖提取率的影响

长时间,海藻糖提取率趋于稳定,所以,确定加热预处理的最佳时间为 4 h。

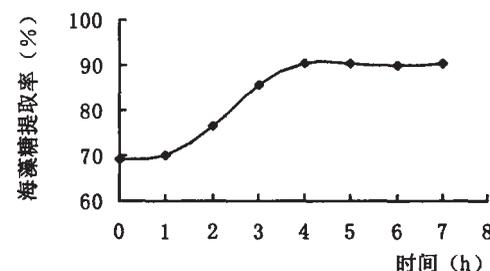


图 2 加热预处理时间对海藻糖提取率的影响

### 2.2 海藻糖提取参数的确定

根据单因素实验结果,选定 4 因素 3 水平作正交实验。因素 A 为乙醇浓度(v/v),水平为 50%、60%、70%;因素 B 为提取温度,水平为 40±1℃、60±1℃、80±1℃;因素 C 为提取时间,水平为 30 min、60 min、90 min;因素 D 为干酵母的质量浓度(干基),水平为 50 g/L、100 g/L、150 g/L。结果见表 1。

从表 1 可知,各因素影响海藻糖提取率的程度顺序为:提取温度>乙醇浓度>酵母质量浓度>提取时间。提取温度对海藻糖提取率的影响最大,随温度的升高,酵母细胞壁和细胞膜的通透性增强,有利于海藻糖的提取,海藻糖得率不断提高;其次乙醇浓度,一定乙醇浓度对海藻糖的溶出有促进作用,但过高的乙醇浓度会造成酵母细胞壁皱缩,阻碍海藻糖的溶出,得率会下降。再次为酵母质量浓度,随着酵母质量浓度的增大,海藻糖提取率呈下降趋势,当酵母质量浓度(干基)小于 100 g/L

表 1 海藻糖提取参数正交实验表及实验结果分析

序号	因素				提取率 (%)		A	B	C	D
	A (%)	B (°C)	C (min)	D (g/L)						
1	50	40±1	30	50	80.45	K <sub>1</sub>	254.61	243.86	256.18	258.79
2	50	60±1	60	150	84.74	K <sub>2</sub>	263.84	259.74	257.15	258.49
3	50	80±1	90	100	89.42	K <sub>3</sub>	253.64	268.49	258.76	254.81
4	60	40±1	60	100	83.75	k <sub>1</sub>	84.87	81.29	85.39	86.26
5	60	60±1	90	50	89.68	k <sub>2</sub>	87.95	86.58	85.72	86.16
6	60	80±1	30	150	90.41	k <sub>3</sub>	84.55	89.50	86.25	84.94
7	70	40±1	90	150	79.66	R	3.40	8.21	0.86	1.32
8	70	60±1	30	100	85.32					
9	70	80±1	60	50	88.66					

时,海藻糖提取率减少很慢,50 g/L和100 g/L的提取率相差仅0.10%;当酵母质量浓度(干基)大于100 g/L时,海藻糖提取率减少很快。提取时间对海藻糖的提取影响不大,这可能与加热使海藻糖酶失活,并对细胞壁和细胞膜造成一定损坏,使得海藻糖释放变得容易。根据实验结果并考虑工艺的效益,确定海藻糖提取的最适工艺条件为 $A_2B_3C_1D_2$ ,即乙醇浓度为60%,提取温度为 $80\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ,提取时间为30 min,酵母质量浓度为100 g/L。

在最适工艺条件下对海藻糖进行提取,提取率可达91.71%。

### 2.3 冷却及离心分离

提取液先冷却至室温,然后300 r/min离心15 min,使固液分离,倾出上清液。

### 2.4 浓缩去醇

本实验采用旋转蒸发器真空浓缩,既可回收乙醇,又能使其中的各种反应减到较低程度。由于海藻糖的性质稳定,并且为非还原性,本实验采用温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ ,真空压力为0.05 MPa,转速为30 r/min进行浓缩。

### 2.5 除蛋白

采用重金属盐来达到除蛋白和澄清的目的。每100 g湿菌体的提取液加质量分数为10%的醋酸铅溶液8 mL,搅拌下反应10 min,再在搅拌下缓慢加入1 g草酸钠固体,静置,离心分离,取上层清液。

### 2.6 活性炭脱色

利用活性炭的吸附作用,除去非离子型色素物质,获得了较好的脱色效果。活性炭用量为样液的1.5%,pH为4.0, $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应40 min,反应过程中不断搅拌。

### 2.7 离子交换

利用732强酸性阳离子树脂和717强碱性阴离子树脂以体积比2:1组成的阴阳离子混合床除去各种离子杂质(包括离子型色素),采取的工艺条件:流速为1.5 mL/min,pH为6.0,温度为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 2.8 浓缩

本试验采用旋转蒸发器使糖液浓缩,达到结晶所需的质量分数40%~50%。条件为:温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ ,真空压力为0.1 MPa,转速为30 r/min。

### 2.9 结晶

采用比例添加乙醇法进行结晶,并可除去部分残余的盐和色素。将样液 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至海藻糖质量浓度为40%~50%,加入为样液5倍体积的无水乙醇,在30

$^\circ\text{C}$ 下不断搅拌,便可得晶体。将晶体过滤并用95%(v/v)乙醇洗涤,结晶率在85%以上。干燥后得到较纯的略带黄色的菱柱晶体即成品。

### 2.10 海藻糖成品的纯度

实验获得的成品中海藻糖含量为96.85%,蛋白质含量为0.14%,其他物质含量为3.01%。

## 3 结论

3.1 确定了加热预处理最佳温度为 $105\text{ }^\circ\text{C}$ ,最佳时间为4 h,经加热预处理后,可使海藻糖酶失活并使酵母细胞壁和细胞膜受到一定程度的破坏,有利于海藻糖的渗出,提高提取率。

3.2 确定了提取海藻糖的适宜条件:乙醇浓度为60%(v/v),提取温度为 $80\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ,提取时间为30 min,酵母质量浓度为100 g/L。在此条件下,提取率可达91.71%。

3.3 海藻糖质量浓度为40%~50%,加入5倍体积的无水乙醇,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下不断搅拌,可得到晶体,再经过滤、洗涤和干燥后得成品,结晶率在85%以上。

3.4 经纸层析对照,成品为海藻糖,纯度为96.85%。

### 参考文献:

- [1] Lee C.K..Developments in Food Carbohydrate[M].London: Applied Science Publishers LTD,1980.1-10.
- [2] Reiko HIRASAWA,Kumio YOKOIGAWA,Yuka ISOBE et al. Improving the Freeze Tolerance of Bakers' Yeast by Loading with Trehalose[J].Biosci.Biotechnol.Biochem.,2001, 65(3): 522-526.
- [3] 李群,袁勤生.海藻糖的性质及应用[J].中国生化药物,1995,16(5):231-233.
- [4] 陈黎忠,李曦光,边广珠,等.海藻糖对含酶冻干品的保护作用[J].上海医学检验,2001,16(3):166-167.
- [5] Colaco C.,Sen S.,Yhangavelu et al.Extraordinary Stability of Enzymes Dried in Trehalose: Simplified Molecular Biology[J].Bio.Tech.,1992,10:1007-1010.
- [6] 黄成根.海藻糖对医用诊断工具酶活性保护研究[J].微生物学通报,1997,24(6):341-343.
- [7] 黄成根,安国瑞,王庆敏等.海藻糖对医用诊断工具酶活性保护[J].微生物学通报,1997,4(1):341-343.
- [8] 孔明,姚汝华.啤酒废酵母综合利用的探讨[J].广州食品工业科技,2003,19(2):59-62.
- [9] Trevelyan W. E.,Harrison J. S..Studies on Yeast Metabolism [J].Biochem. J., 1956,62:177-182.
- [10] 王兰,肖冬光.纸层析分离洗脱法定量测定海藻糖[J].生物技术,2002,12(3):27-29.

# 《酿酒科技》 酒圃曲苑