酵母 - 1,3- 葡聚糖研究进展

黄国宏^{1,2}, 李科德¹, 曾庆孝¹

(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2.广西职业技术学院, 广西 南宁 530227)

摘要: 对酵母 - 1,3- 葡聚糖的提取工艺和衍生化方法的研究动态进行了综述, 并对各种方法的优越性进行了比较, 简述了 - 1,3- 葡聚糖在食品、化妆品、医学、动物养殖及饲料工业中的用途, 提出了 - 1,3- 葡聚糖研究发展的方向。

关键词: 啤酒; 酵母泥; - 1,3- 葡聚糖; 提取方法; 分子修饰; 研究进展

中图分类号: TS262.5; TS261.1; TQ925 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2006) 12- 0100- 04

Research Progress in - 1,3- glucan from *Saccharomyces cerevisiae*

HUANG Guo-hong^{1,2}, LI Ke-de¹ and ZENG Qing-xiao¹

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China Univ.of Tech., Guangzhou, Guangdong 510640; 2.Guangxi Polytechnic, Nanning, Guangxi 530227, China)

Abstract: The preparation of - 1,3- glucan from *saccharomyces cerevisiae* and its derivation methods were review in this paper. All the methods were compared. Besides, the usage of - 1,3- glucan in the field of food, cosmetics, medicine, animal breeding, and feedstuff industry were introduced and its research direction and development trend were put forward.

Key words: beer; yeast; - 1,3- glucan; extraction method; molecule modification

- 葡聚糖是一类广泛存在于微生物、植物和动物体内的大分子多糖, 主链结构由 - 1,3- 糖苷键连接, 通常还含有不同比例和大小的 - 3, - 1,4, - 1,6 键连接的支链, 主要以细胞结构成分(如细胞壁)的形式存在, 对异体宿主防御系统具有较强的诱导和活化作用。20世纪40年代, Pillemer 和 Ecker 等发现酵母细胞中存在一种具有免疫刺激作用的活性物质, 直到20世纪60年代, 这一活性物质才被 Riggi 和 Di Luzio 证实为 - 1,3- 葡聚糖。酵母 - 1,3- 葡聚糖能增强哺乳动物的免疫活力、抗癌、抗细菌、抗病毒、抗真菌、抗寄生虫、降低胆固醇和血脂、促进伤口愈合^[1]等, 是一种良好的生物效应调节剂 [BRMs]。

我国的酵母资源十分丰富, 年产啤酒沉淀酵母泥 3~5 万吨(干基), 目前该资源仅作为饲料廉价销售或直接作为废物排入下水道, 既造成环境污染又造成资源浪费。利用现代生物技术对酵母废泥充分开发利用, 使其其中蛋白质、核酸及 - 1,3- 葡聚糖得以综合利用, 提高附加值, 将是啤酒行业提高经济效益的有效途径之一。

1 酵母 - 1,3- D- 葡聚糖的提取方法

酵母细胞壁中含葡聚糖 50%、甘露糖 20%、蛋白质

收稿日期: 2006- 09- 04

作者简介: 黄国宏(1972-) 男, 讲师, 在读硕士, 研究方向: 食品工程及酵母葡聚糖的提取及改性研究。

10%~15%、脂类 8%~9% 及少量几丁质。酵母 - 葡聚糖包括碱不溶性 1,3- - 葡聚糖、碱溶性 1,3- - 葡聚糖、中间插有 - 1,3 键的无定性酸溶性 1,6- 葡聚糖、连接有蛋白质的无定性碱不溶性甘露聚糖, 其中以碱不溶性 1,3- - 葡聚糖占绝大多数。酵母碱不溶性 1,3- - 葡聚糖是一种活性多糖, 制备酵母 - 葡聚糖即提取碱不溶性的 - 1,3- 葡聚糖, 制备的关键是除去蛋白质、甘露聚糖和脂质等杂质。

目前国内外制备酵母 - 1,3- 葡聚糖的方法主要有酸法、碱法、酸碱综合法及酶- 碱法提取等。

1.1 酸法提取

酸法提取是最早采用的酵母 - 1,3- 葡聚糖提取方法。一般用不同浓度的醋酸在 50~90 温度条件下处理 3~6 h, 然后离心, 沉淀用无水乙醇脱水, 干燥即得成品。早期国内外学者对此法进行了较多的研究, 黄丹^[2]、黄刚良^[3]等对此提取方法进行了研究, 并探讨了其提取机理。研究表明, 此法虽然产品得率高, 但纯度低, 产品中蛋白质和甘露聚糖含量高, 需要进一步纯化。由于用此方法提取的成品纯度低, 其应用受到一定程度的限制, 近年来国外对此提取方法的报道很少。但若对成

品 - 1,3- 葡聚糖的纯度要求不高, 如作为饲料添加剂使用, 其不失为一种经济有效的提取方法。

1.2 碱法提取

李卫旗等(1999)报道了碱法提取酵母 - 1,3- 葡聚糖的方法: 取 5 g 啤酒干酵母, 加 1 mol/L NaOH 溶液 100 mL, 在 90 °C 保温 3 h, 离心, 沉淀物水洗 3 次, 离心, 乙醇洗涤脱水, 干燥即得葡聚糖产品。廖鲜艳^[4]等对此法进行了改进, 采用二步碱处理方法进行提取, 降低了碱处理时 NaOH 溶液浓度, 并提高了产品的纯度。方法是: 第一次碱处理作用条件, NaOH 浓度 3%, 料液比 6 v/w, 75 °C 保温 3 h, 离心收集沉淀物; 第二次碱处理作用条件, NaOH 浓度 3%, 料液比 4 v/w, 100 °C 保温 2 h, 离心, 水洗, 脱水, 干燥。万婕^[9]等进一步改进提取工艺, 在碱处理后离心, 沉淀用蒸馏水悬浮, 再用盐酸调节 pH 至 4.5, 离心, 水洗, 脱水, 干燥。由于采用了酸性溶液洗涤, 除去了部分酸溶性的糖元及 - 1, 6- D- 葡聚糖, 因而纯度又有所提高。碱法提取所得的产品得率稍低, 纯度较高, 但产品中还含有少量酸溶性糖元及 - 1, 6- D- 葡聚糖。此法较适于对提取物纯度要求较高的产品, 如食品和医药用途。

1.3 酸碱综合法提取

Masler 等(1986)报道了酸碱综合法提取酵母 - 1, 3- D- 葡聚糖的方法, 后来 Kogan(1995), Machov à (1999)等许多国外学者对此法进行了改进。CHUNG^[6]等研究的改进二步碱处理工艺为: 取 80 g 酵母细胞壁悬浮于 1000 mL 4% NaOH 溶液中, 95 °C 保温 1 h, 离心, 不溶物悬浮于 2000 mL 3% NaOH 溶液中, 于 75 °C 保温 3 h, 离心, 不溶物再悬浮于蒸馏水中, 加蒸馏水至 2000 mL, 用盐酸调节 pH 至 4.5, 75 °C 保温 1 h, 离心, 水洗, 脱水, 干燥。近年来, 许多国内学者亦对此法进行较深入的研究, 胡晓忠(2000)等以新鲜酵母为原料, NaOH 浓度 4%, 添加量 3.3 v/w, 100 °C 下剧烈搅拌 1 h, 离心, 不溶物用 1000 mL 3% NaOH 重新悬浮, 加热到 100 °C 维持 15 min, 离心(此碱处理过程重复一次), 不溶物加 500 mL 0.5 mol/L 乙酸, 100 °C 下剧烈搅拌 3 h, 离心, 水洗, 脱水, 干燥。在酸处理过程中, 酸的选择对 - 1,3- 葡聚糖的得率有很大的影响。酸性过弱, 酸溶性的糖元及 - 1, 6- 葡聚糖除去不完全, 酸性过强会使碱不溶性葡聚糖降解, 得率降低, 故选择 0.5 mol/L 左右的乙酸为适。张开诚^[7]等改进了提取工艺, 采用一步碱处理, 再用 4% 乙酸在室温下处理沉淀物 2 h, 离心, 水洗, 脱水, 干燥。此法提取的酵母 - 1,3- 葡聚糖中不含酸溶性的糖元及 - 1, 6- 葡聚糖, 纯度高, 产品经改性后可应用于医学领域。

以上 3 种提取方法的特点是快速、高效, 但提取条件较剧烈, 酸碱试剂易腐蚀设备、污染环境严重, 尤其是在提取过程中会造成部分 - 1,3- 葡聚糖的降解, 使产品得率与生物活性降低。

1.4 酶- 碱法提取

为了克服上述 3 种提取方法的不足, Freimund^[8]等报道了酶- 碱法提取酵母葡聚糖的方法: 取 1.3 kg 酵母细胞壁, 加蒸馏水 8.8 L, 用 NaOH 调节 pH 至 7.0, 在 125 °C 保温搅拌 5 h, 冷却至室温, 离心, 水洗 2 次, 不溶物加蒸馏水至总体积 10 L, 用 NaOH 调节 pH 至 10.5, 加 Savinases 酶(一种碱性蛋白酶)7.5 mL, 在 45 °C 保温搅拌 5 h, 离心, 不溶物水洗 2 次, 乙醇脱水, 不溶物喷雾干燥。干燥方法的不同对颗粒型 - 1,3- 葡聚糖微观结构的影响从而导致其粒度、形态、溶胀性等物理性质的差异, 而这些物理性质的差异会影响 - 1,3- 葡聚糖的免疫活性。Hromadkova^[9]等研究表明, 喷雾干燥所得的 - 1,3- 葡聚糖颗粒的免疫活性是冷冻干燥和溶剂交换干燥法的两倍, 所以对提取物作为免疫剂使用最好采取喷雾干燥。

国内学者对此提取方法进行了深入研究, 赵光远(1997)等用废酵母前处理后自溶, 离心, 沉淀物用蛋白酶 57 °C 处理 24 h, 离心, 沉淀物再用 2% NaOH 在 60 °C 处理 3.5 h, 离心, 水洗, 去脂, 干燥。李花霞^[10]等对此法进行了改进, 采用酵母泥前处理后自溶, 分离后沉淀溶于水, 再经超声粉碎, 然后进行酶、碱处理。由于超声波处理能促进细胞破碎, 有利于细胞壁分离, 有利于提高成品糖含量及得率, 降低蛋白质含量。本实验室对此提取方法也做了较深入的研究, 用啤酒酵母泥前处理后自溶, 沉淀加碱性蛋白酶处理 2 次, 然后用低浓度的碱溶液进行长时间处理, 得到了纯度较高的成品酵母 - 1,3- 葡聚糖。此法由于酶处理除去了大部分的蛋白质, 因而可以降低后续碱处理过程中碱的浓度与用量, 所以得到的 - 葡聚糖产品分子链完整, 分子量高。而分子量与分子键的分支度会直接影响产品的生物活性, 因而酶- 碱法是提取 - 1,3- 葡聚糖的理想方法。

2 酵母 - 1,3- 葡聚糖的衍生化方法

酵母碱不溶性 - 1,3- 葡聚糖由于其分子量大, 在水中溶解性差, 使其在应用上受到很大限制。- 1,3- 葡聚糖在水中的溶解度同聚合度、分支度和化学修饰等因素密切相关。为了深入地研究和开发利用酵母葡聚糖, 需通过化学修饰将其转化成可溶性的衍生物。增加葡聚糖溶解度的衍生方法很多, 常用的有化学修饰与解聚降低葡聚糖分子量。

2.1 化学修饰法

目前国内外采用的化学修饰方法主要有羧甲基化和硫酸化。

2.1.1 羧甲基化

J.Sandula^[11]等采用氯乙酸作为底物,与葡聚糖在碱性2-丙醇中反应,得到羧甲基葡聚糖,并对不同取代度(DS)的羧甲基-1,3-葡聚糖的溶解度和分子量进行比较,同时以小鼠胸腺细胞的有丝分裂为基础,研究其免疫调节活性。结果发现羧甲基化-1,3-葡聚糖在取代度DS=0.75时,显示出最高的活性,其最适为DS0.6~0.8,当DS>1.0或分子量较低时,则没有活性,DS<0.5时不溶或微溶于水。国内学者杨文鸽^[12]等在这方面也做了较深入的研究,他采用的方法是:先将葡聚糖碱化,再加入氯乙酸,磁力搅拌进行羧甲基化,然后第二次加碱,抽滤,乙醇抽洗,风干,透析,冷冻干燥。得到取代度DS高达0.925的羧甲基-1,3-葡聚糖,产品呈白色,完全溶于水。

2.1.2 硫酸化

Williams(1992)等报道了将-1,3-葡聚糖颗粒分散在二甲基亚砷和脲组成的均相反应体系中,然后加入浓硫酸在100℃温度下进行磺化反应4h,冷却抽滤除去未反应部分颗粒-1,3-葡聚糖,将-1,3-葡聚糖硫酸酯溶液透析,冷冻干燥得到得率为98%的-1,3-葡聚糖硫酸酯。Wang^[13]等采用由硫酸、正丙醇组成的非均相反应体系制备水溶性的-1,3-葡聚糖硫酸酯工艺:硫酸和正丙醇按1.39:1.00(mol/mol)混合,-10℃下制备反应液,为了减少副反应,磺化反应在-6℃下进行,-1,3-D-葡聚糖按1.0:32.8(w/w)的比例加入到反应液中去。反应后,立即在-10℃下,离心去除反应液,再用-20℃预冷过的正丙醇洗涤沉淀数次去除硫酸。沉淀再用去离子水溶解,离心,去除未反应的-1,3-葡聚糖沉淀,将获得的上清溶液冷冻干燥,获得的葡聚糖硫酸酯,完全溶于水,产品的得率约为37.4%。非均相反应体系很好地克服了均相体系的缺陷,提高了产物纯度,产物分离容易,且硫酸正丙醇反应液可重复使用,减轻了环境污染。

2.2 解聚降低分子量

解聚降低分子量的方法有酸解、碱水解、酶消化、超声波和热变性等,得到低分子量的片段。Moon^[14]等用葡聚糖酶对碱不溶性-1,3-葡聚糖进行降解,得到了分子量小于50000的可溶性-1,3-葡聚糖。由于此方法只是降低碱不溶性-1,3-葡聚糖的聚合度而不改变其结构,能保持-1,3-葡聚糖的原有活性,因此应用前景广阔,有待于科研工作者进行更加深入的研究与探讨。

3 酵母-1,3-葡聚糖的应用

3.1 在食品工业中的应用

-1,3-葡聚糖具有很高的粘性、持水性、乳化稳定性等性能,在食品工业中常作为增稠剂、持水剂、粘结剂及乳化稳定剂应用于调味料、甜点等食品^[15]。由于-1,3-葡聚糖在人的消化器官中难以被消化,可以作为非卡路里食品添加剂,提供脂肪样口感,王森^[16]等的研究表明,用-1,3-葡聚糖在肉制品中替代脂肪,它既可提供低脂肉制品滑润、丰厚的口感,又能改善低脂肉制品的脆度、硬度、胶粘性、咀嚼性等质构以及总的可接受性;Thammakiti^[17]将-1,3-葡聚糖作为脂肪取代剂及乳化稳定剂应用于蛋黄酱中,不但有效地保持蛋黄酱的乳化稳定性,而且还延长产品的贮存期。另外,-1,3-葡聚糖是无热能的,且能强化纤维素阻止脂类吸收的效力,促进胆固醇排除,增加肠道蠕动,在食品中既可以作为膳食纤维来发挥作用,又是一种优质保健食品添加剂。

3.2 在化妆品中的应用

现代科学技术的飞速发展和广泛应用给化妆品行业带来了全新的发展机遇,化妆品已从洁肤、润肤为目的的基础护肤品向延缓衰老、美化肤色为目的的功效型化妆品方向发展。由于-1,3-葡聚糖特有的生物学功能和理化特性(抗凝血、抗氧化、促进细胞增生、抑菌和吸水性能),可产生保湿、延缓衰老、促进上皮纤维成细胞增殖和美化肤色等多种功能。郝伟章^[18]的研究结果表明,羧甲基化-1,3-葡聚糖可降低皮肤暴露于UVA区域时对辐射的敏感性,起防止皮脂中角鲨烯氧化的作用,且因其具有成膜性,还可发挥它的第二皮肤作用,有助于提供给皮肤细胞许多生化活性。傅冠民^[19]的研究表明,羧甲基化-1,3-葡聚糖能增加皮肤的保湿性并能减弱表面活性剂对皮肤的损伤,并能提高角质层的更新速度和改善皮肤的紧密度。

3.3 动物养殖与饲料工业中的应用

酵母-1,3-葡聚糖是一种很好的天然免疫增强剂,能提高机体的非特异性和特异性免疫作用,而开发并使用免疫增强剂以提高疫苗免疫效果,是改善动物健康状况的重要途径,在动物养殖与饲料工业中应用相当广泛。Selvaraj^[20]等研究表明,对鲤鱼进行腹膜内注射可溶性酵母-1,3-葡聚糖可显著提高鲤鱼的特异性与非特异性免疫功能。Courie^[21]等用-1,3-葡聚糖作为抗生素替代物添加于猪、鸡等畜禽日食粮中,能显著提高这些畜禽的体液免疫和细胞免疫功能,并促进畜禽生长,提高饲料价值。杨文鸽^[22]等研究表明,羧甲基-1,3-葡聚糖可以提高大黄鱼血液中白细胞数量和吞噬能力,以及血清中溶菌酶和酚氧化酶活力,增强大黄鱼的非特异性免疫功能。

3.4 在医学中的应用

近 20 年来,国内外各类多糖药物不断进入临床用于多种疾病的治疗,主要集中在抗感染、抗肿瘤、抗风湿、抗消化道溃疡和增进免疫功能等方面。衍生化的可溶性-1,3-葡聚糖对禽流感显示出很强的抗病毒性能,可以用来治疗或预防禽流感^[14],-1,3-葡聚糖能诱导巨噬细胞产生白细胞介素-2(IL-2)和一氧化氮(NO),从而提高免疫力,对癌细胞的增殖具有很强的抑制活性,在医学上常用于预防和治疗免疫缺陷、癌症等疾病^[9]。孔维华等^[23]研究表明,-1,3-D-葡聚糖对小鼠水浸应激性胃溃疡、乙醇或阿司匹林损伤性胃溃疡、大鼠幽门结扎性胃溃疡和乙酸腐蚀性胃溃疡等有非常显著的预防或治疗作用。

4 研发趋势

4.1 研究生物活性高的水溶性酵母-1,3-葡聚糖的制备工艺。葡聚糖经分子修饰后不但大大提高了其溶解度和生物活性,特别是一些基团的引入,增加了葡聚糖的生理功能。特别是经硫酸化得到的葡聚糖硫酸酯具有抗 HIV 活性,其制备工艺是近年来国内外研究的热点。

4.2 研究提取率高、杂质含量低的酵母-1,3-D-葡聚糖提取工艺。酶-碱法提取条件温和,得到的产品分子量较大和分子链较完整,且对环境污染低,是一种有待更进一步深入研究其提取的工艺方法。

4.3 进一步研究酵母-1,3-葡聚糖免疫活性,探明免疫活性与-1,3-葡聚糖微观结构之间的关系,以扩大其在医学临床上的应用。

4.4 建立离体快速检测-1,3-葡聚糖生物活性的方法。

参考文献:

- [1] Kogan, G. (1-3,1-6)-D-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity[J]. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2000,(23): 107- 152.
- [2] 黄丹,刘达玉.酿酒酵母中活性多糖的提取工艺研究[J].*食品工业*, 2004, (4): 27- 29.
- [3] 黄刚良,等.啤酒酵母中(1-3)-D-葡聚糖的提取及其机理研究[J].*精细化工*, 2003, 20(8):458- 459.
- [4] 廖鲜艳,等.啤酒废酵母残渣制备碱不溶性葡聚糖[J].*酿酒*, 2001, 28(1):75- 78.
- [5] 万婕,刘成梅,等.从破壁酵母中提取-葡聚糖的工艺研究[J].*农产品加工*, 2006, 58(3):24- 26.
- [6] CHUNG, Bong-Hyun.PARK,Jeong-Hoon.et al. Composition comprising soluble glucan oligomer from *saccharomyces cerevisiae* IS2 for immune activation or prevention and treatment of cancer and the preparation method of. PCT int[J]. *Appl.WO* 2004.
- [7] 王战勇,杨双春,等.啤酒废酵母制备碱不溶性葡聚糖[J].*氨基酸和生物资源*, 2006, 28(1):37- 39.
- [8] Stefan Freimund, Martin Sauter,et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- -D- glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J].*Carbohydrate Polymers*, 2003, (54): 159- 171.
- [9] Z. Hroma dkova ,et al . Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1-3)- -D- glucan from *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, (51):9- 15.
- [10] 李花霞,等.废酵母中碱不溶性葡聚糖的制备及其理化性[J].*广州食品工业科技*, 2004, 20(4):53- 55.
- [11] J.Šandula,E.machová ,et al. Microbial (1-3) - -D- glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity[J]. *Carbohydrate Polymers* . 1999, (38):247- 253.
- [12] 杨文鸽,等.酵母葡聚糖的羧甲基化研究[J].*食品工业与发酵*, 2004, 30(11): 28- 30.
- [13] Ya-Jun Wang,Shan-Jing Yao.et al . A novel process for prepatation of (1-3) - -D- glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation[J]. *Carbohydrate Polymers* . 2005, (59):93-99.
- [14] Moon,Won Kook.et al. Novel use of water soluble glucan oligomer isolated from *saccharomyces cerevisiae* IS2 for prevention and treatment of avian flu.PCT int[J].*Appl. WO* 2005.
- [15] S.Thammakiti,et al. Preparation of spent brewer's yeast - glucans for potential application in the food industry[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, (39):21- 29.
- [16] 王淼,陈玉添.酵母葡聚糖在肉制品中的应用研究[J].*食品机械*, 2001, 82(2): 32- 33.
- [17] S.Thammakiti,et al. - Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise[J].*Food Hydrocolloids*, 2006, (20):68- 78.
- [18] 郇伟章. -葡聚糖的性质及其在化妆品中的应用[J].*香料香精化妆品*, 1999, (3):35- 38.
- [19] 傅冠民.羧甲基化-1,3-葡聚糖在护肤品中的功能[J].*日用化学品科学*, 2000, 23(5): 4- 6.
- [20] V.Selvaraj,et al. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp infected with *Aeromonas hydrophila*[J].*Fish& Shellfish Immunology*,2005, (19): 293- 306.
- [21] Courie,Jr.et al. A methed of producing an economical and ecologically sound natural immunobiotic exteract for use as a health management instrument and a replacement for growth promotion antibiotics in livestock and companion animals[P]. *Patent. Pub.*2005.
- [22] 杨文鸽,等.葡聚糖与其羧甲基衍生物对养殖大黄鱼非特异免疫作用[J].*浙江农业学报*, 2006, 18(1): 16- 20.
- [23] 孔维华,等. -1,3-葡聚糖抗实验性胃溃疡作用研究[J].*山东大学学报*, 2001, 36(1):107- 112.