

响应曲面法优化中空纤维膜分离啤酒废酵母活性成分的研究

杨才誉¹, 马 森^{2,3}, 高俊永^{2,3}, 卢家炯^{2,3}, 莫海涛²

(1.广西工业职业技术学院, 广西 南宁 530001; 2.广西大学糖业工程技术中心, 广西 南宁 530004;

3.广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530004)

摘 要: 以啤酒废酵母为原料, 研究中空纤维膜分离酵母活性成分的工艺。在膜通量试验基础上, 选择料液浓度、pH 和操作压力为自变量, 海藻糖透过率和蛋白质截留率为响应值, 采用 Box-Behnken 设计的方法, 拟合得到二次多项式回归方程的预测模型, 并确定膜分离工艺的最佳条件为压力 18 psi、温度 24 ℃、pH 6.0 和料液浓度 3.0 %。在此条件下, 膜通量为 20.62 L/m²·h, 海藻糖透过率为 96.82 %, 蛋白质截留率为 95.04 %。

关键词: 啤酒废酵母; 综合利用; 中空纤维膜; 响应曲面法; 海藻糖; 蛋白质

中图分类号: TS261.1 J93-3 J658 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)08-0029-04

Optimization of the Separation of Waste Beer Barm through Hollow Fiber Membrane by Use of Response Surface Methods

YANG Cai-yu¹, MA Sen^{2,3}, GAO Jun-yong^{2,3}, LU Jia-jiong^{2,3} and MO Hai-tao²

(1.Guangxi Vocational Techniques Institute, Nan'ning 530001; 2.Research Center of Sugar Engineering, Guangxi University, Nan'ning

530004; 3.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nan'ning, Guangxi 530004, China)

Abstract: The separation techniques of active compositions from waste beer barm through hollow fiber membrane were studied. Based on membrane flux experiments, the solution concentration and pH values and operating pressure were selected as independent variables and the penetration rate of trehalose and the retention rate of proteins selected as response values, then the predictive polynomial quadratic equations model was obtained by use of Box-Behnken design and the optimum separation technical conditions were summed up as follows: operating pressure as 18 psi, temperature at 24 ℃, pH value was 6.0 and solution concentration was 3.0 %. Under the above conditions, the membrane flux was 20.62 L/m²·h, the penetration rate of trehalose was 96.82 %, and the retention rate of protein was 95.04 %.

Key words: waste beer barm; comprehensive utilization; hollow fiber membrane; response surface method; trehalose; protein

啤酒酵母属于真菌类, 含有丰富的蛋白质、海藻糖、葡聚糖和甘露聚糖等生物活性成分^[1], 具有提高免疫力、清除自由基、保护生物膜等生理功能, 在食品、药品、化妆品等领域有良好的应用前景^[2~3]。据统计, 2007 年我国啤酒产量为 3931.4 万 t, 约产生废酵母 58.97 万 t (干重), 这些酵母大都丧失了发酵能力, 营养价值损失较少, 是廉价提取多种生物药物和功能成分的宝贵资源。目前, 啤酒废酵母研究方向主要集中在蛋白质、酵母味素和葡聚糖等方面, 综合利用较少涉及^[4~5], 其提取方法一般使用化学试剂, 成本高, 耗时长, 制取过程中易造成细菌、病毒污染, 无法满足食品级要求, 从而在实际应用上受到限制。

膜分离技术是生物、医药等行业普遍应用的方法, 相

比于传统的试剂提取, 它是纯物理分离, 能去除致病菌, 具有分子级分离、无试剂污染、分离效率高、不破坏生物活性及操作简单等特点^[6], 可用于蛋白质和糖类物质的分离纯化。故本实验将膜分离技术应用于海藻糖和蛋白质的分离工艺研究, 基于超滤机理研究了影响膜通量的主要因素, 并采用响应曲面试验设计初步探求中空纤维膜分离酵母活性成分的最佳工艺条件, 为提高我国啤酒废酵母资源的综合利用和工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验材料: 新鲜啤酒废酵母 (广西南宁青岛啤酒有限

基金项目: 广西重大科技成果引进与产业化示范项目资助(0630004)。

收稿日期: 2009-04-29

作者简介: 杨才誉(1978-), 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 多糖提纯分离理论与技术。

通讯作者: 马森, E-mail: branch@mail.gxu.cn。

公司提供);酒精(工业级);海藻糖、葡萄糖、蔗糖(SIG-MA);蒽酮、浓硫酸等(分析纯)。

主要仪器:美国 Amersham Biosciences 超滤系统(包括 0.2 μm 微滤膜,MWCO5000 超滤膜,WATSON MARLOW323 蠕动泵);美国 Waters 高效液相色谱仪(包括 ELSD2000 蒸发光检测器,EMPOWER 色谱工作站);瑞士 RUCHI 旋转蒸发仪 R-205;丹麦 FOSS 自动定氮仪;美国贝克曼超速离心机;日本岛津 UV-2051PC 紫外可见分光光度计,真空冷冻干燥机。

1.2 方法

1.2.1 膜分离工艺流程

β -1,3-葡聚糖 $\leftarrow$ 酶解、碱溶 $\leftarrow$ 沉淀

↑

啤酒废酵母 $\rightarrow$ 超声波破壁 $\rightarrow$ 离心 $\rightarrow$ 上清液 $\rightarrow$ 微滤 $\rightarrow$ 超滤 $\rightarrow$ 浓缩 $\rightarrow$ 真空冷冻干燥 $\rightarrow$ 蛋白质、海藻糖

1.2.2 啤酒废酵母提取液的制备

新鲜啤酒废酵母在 0 $^{\circ}\text{C}$ 冷水中絮凝,制得水分含量 20%~25%的酵母泥,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱鼓风干燥后磨粉,用功率为 140 W 的超声波处理 60 min,4000 r/min 离心 20 min,所得上清液即为啤酒废酵母提取液,沉淀用来制备 β -1,3-葡聚糖^[4]。

1.2.3 微滤膜预处理

将料液浓度为 20%的酵母提取液,用 0.2 μm 微滤膜,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、压力 15 psi、泵转速 210 r/min 的条件下进行实验,收集透过液,得到浅黄色的酵母微滤液。

1.2.4 超滤膜分离酵母活性成分试验

膜通量试验:膜管的分离效率通常用膜通量来衡量,膜通量是指每单位时间和单位膜面积透过膜的液体量,影响因素主要有操作压力、温度、pH 和料液浓度。将酵母微滤液稀释到适当浓度,讨论操作压力 5~20 psi、温度为 9 $^{\circ}\text{C}$ 及 23.5 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 2~10 和料液浓度 1.5%~7.5%对膜通量影响,确定最适超滤操作范围。

分离性能的响应曲面法设计:在膜通量试验基础上,采用 Box-Behnken 设计方案,以浓度、pH 和压力 3 个因素为自变量,分别用 X_1 、 X_2 、 X_3 来表示,并以 +1、0、-1 分别代表变量的水平,按照方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码。式中, x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X_0 为试验中心点处自变量的真实值, ΔX 为变量的变化步长,海藻糖透过率(Y_1)和蛋白截留率(Y_2)为响应值(见表 1)。采用 SAS 对实验数据进行回归分析,由此求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程,对中空纤维膜分离酵母多糖的影响因素进行更为深入的研究和条件优化,并做出各因素响应曲面图,进行建模及分析。

1.2.5 膜分离性能的测定

表 1 试验因素水平及编码

因素	代码		水平		
	编码	非编码	-1	0	1
浓度(%)	x_1	X_1	1.5	3	4.5
Ph	x_2	X_2	4	6	8
压力(psi)	x_3	X_3	10	15	20

用 FOSS 自动定氮仪测定蛋白质含量,蒽酮-硫酸法测定海藻糖含量^[7]。

HPLC 色谱条件:色谱柱:氨基柱,流动相:乙腈-水(体积比 80:20),流速:1.0 mL/min,进样 20 μL ;ELSD 参数:漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$,气体流速:2.5 L/min,外标法定量分析。

$$\text{膜通量 } J(\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{h}) = \frac{\text{滤出溶液体积 } V}{\text{膜面积 } S \times \text{时间 } t}$$

$$\text{蛋白质截留率}(\%) = \frac{\text{截留液蛋白质含量}}{\text{原溶液蛋白质含量}} \times 100\%$$

$$\text{海藻糖透过率}(\%) = \frac{\text{透过液海藻糖含量}}{\text{原溶液海藻糖含量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 超滤膜通量

2.1.1 操作压力对膜通量的影响

超滤是以压力为推动力的膜分离过程,压力是分离性能的重要参数。由图 1 可知,在 5~10 psi 操作压力区间内,膜通量有较大增幅,而在 15~20 psi 区间内,膜通量的增幅较小。这是因为在操作压力较小时,经过膜表面的溶质量较少,对膜污染较小,膜通量与压力呈线形关系,但当压力达到某一临界值时,膜面凝胶层逐渐形成并增厚,使膜通量增长幅度明显减小,最后趋于稳定。

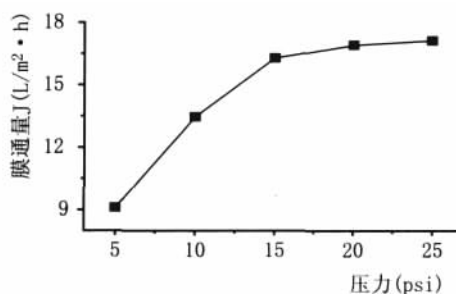


图 1 压力对膜通量的影响

2.1.2 温度对膜通量的影响

通常膜通量会随着温度的升高而增大。由图 2 所示,在 0~500 s 内,24 $^{\circ}\text{C}$ 的膜通量明显高于 9 $^{\circ}\text{C}$ 的膜通量。这是因为料液粘度下降,料液中糖和蛋白分子的活化能提高,扩散系数和传质系数增大,降低了浓差极化现象。然而,过高的温度在增大膜通量的同时会破坏溶液中的活性成分、增加仪器负担和能源消耗。

2.1.3 pH 对膜通量的影响

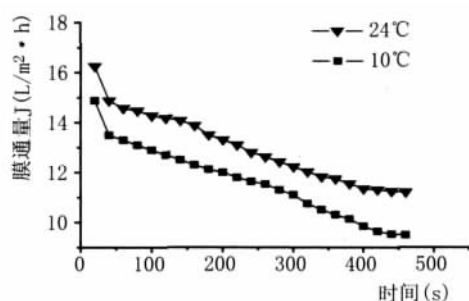


图2 温度对膜通量的影响

pH 对料液中蛋白类物质有较大影响, 结果见图 3。

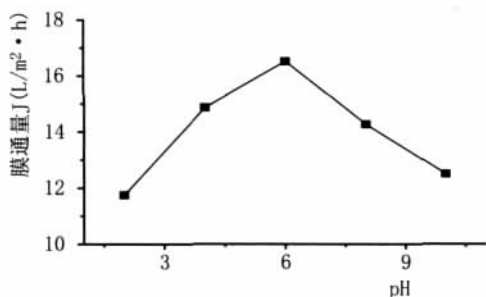


图3 pH 对膜通量的影响

由图 3 可知, 膜通量在 pH 6.0 时最大, 而在 pH 2.0 和 10.0 时膜通量均很小。这是因为 pH 在一定范围会使成分复杂的酵母蛋白溶解度变小(等电点)而析出或絮凝于膜表面, 堵塞膜孔, 增大传质阻力, 造成膜通量下降。而当 pH 远离等电点时, 蛋白质稳定, 黏度小, 不易形成絮凝状态, 利于膜分离过程。

2.1.4 料液浓度对膜通量的影响

料液浓度是影响超滤速度的一个重要因素, 结果见图 4。由图 4 可知, 在相同的操作条件下, 可溶性固形物含量越低, 膜通量越大, 其中浓度为 1.5 % 的膜通量约是 7.5 % 的两倍。这是因为溶液粘度随着溶液浓度的增高, 溶质间排斥作用高于吸引作用, 造成传质阻力增大, 浓差极化现象增强, 膜通量下降。

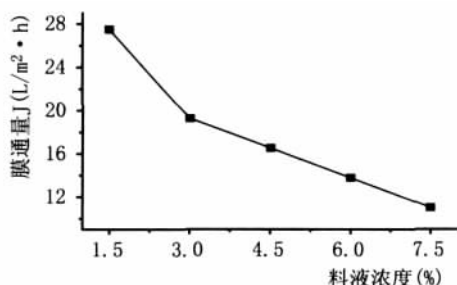


图4 料液浓度对膜通量的影响

2.2 超滤膜分离性能的响应曲面试验结果与分析

2.2.1 试验结果

试验采用 Box-Behnken 设计方案及膜分离性能分析, 结果见表 2。试验号 1~12 是析因试验, 试验号 13~

15 是中心试验(估计试验误差)。利用 SAS 软件, 通过表 2 中试验数据进行多元回归拟合, 分别获得海藻糖透过率和蛋白质截留率对编码自变量浓度、pH、压力的二次多项回归方程(1)和(2):

$$Y_1 = 95.84 - 0.35x_1 - 0.68x_2 + 4.48x_3 - 7.21x_1^2 + 0.53x_1x_2 - 3.36x_2^2 - 1.19x_1x_3 + 1.51x_2x_3 - 3.60x_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 96.27 - 0.40x_1 - 0.57x_2 - 0.33x_3 - 1.31x_1^2 + 0.07x_1x_2 - 0.99x_2^2 - 0.56x_1x_3 + 1.26x_2x_3 - 1.87x_3^2 \quad (2)$$

表2 Box-Behnken 设计方案及膜分离性能分析

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁		Y ₂	
				实验值	预测值	实验值	预测值
1	-1	-1	0	88.34	88.03	95.41	95.01
2	-1	1	0	84.22	85.59	94.11	93.74
3	1	-1	0	85.26	87.34	93.70	94.08
4	1	1	0	83.27	88.26	92.67	93.07
5	-1	0	-1	80.06	82.62	93.21	93.26
6	-1	0	1	89.37	90.52	93.00	93.73
7	1	0	-1	83.07	80.73	94.31	93.58
8	1	0	1	87.61	85.80	91.85	91.81
9	0	-1	-1	84.73	86.59	95.21	95.57
10	0	-1	1	92.72	92.54	92.73	92.40
11	0	1	-1	82.03	82.21	91.58	91.91
12	0	1	1	96.04	97.54	94.13	93.78
13	0	0	0	95.59	95.84	96.20	96.27
14	0	0	0	96.02	95.84	95.82	96.27
15	0	0	0	95.92	95.84	96.79	96.27

对海藻糖透过率方差分析(表 3)结果表明, 所建立的回归模型是极显著的($P < 0.01$)。该模型的 $R^2 = 0.9610$ 说明, 此模型与实际试验拟合较好, 试验失拟项小, 因此可用该回归模型代替试验真实点对实验结果进行分析。回归方程各项的方差分析结果还表明方程中的一次项和二次项的影响都是极显著的, 因此各个具体试验因子与响应值都不是简单的线形关系。同理, 对蛋白质截留率方差分析(表 4)结果表明, 所建立的回归模型是显著的($0.01 < P < 0.05$), 二次项的影响是极显著的, $R^2 = 0.9253$, 各个具体试验因子与响应值也不是简单的线形关系。

表3 海藻糖透过率的回归各项方差分析结果

变异源	自由度	平方和	F 值	P 值
一次项	3	165.386	15.71	0.0056
二次项	3	251.547	23.89	0.0022
交互项	3	15.8825	1.51	0.3203
模型	9	432.816	13.70	0.0051
失拟项	3	17.4492	114.87	0.0086

2.2.2 响应面分析

由响应面图 5~图 6 可以看出, 在选定区域内, 各因素对海藻糖透过率(Y_1)的影响从大到小依次为: 压力(X_3)、pH(X_2)、浓度(X_1); 对蛋白质截留率(Y_2)的影响顺序为: pH、浓度、压力。通过软件分析, 得到的最佳膜分

表4 蛋白质截留率的回归各项方差分析

变异源	自由度	平方和	F 值	P 值
一次项	3	4.72420	3.04	0.1334
二次项	3	20.1020	12.8	0.0088
交叉项	3	7.60907	4.84	0.0611
模型	9	32.4652	6.88	0.0235
失拟项	3	2.14095	2.99	0.2608

离条件为料液浓度 2.89 %、pH 6.07、压力 18.21 psi,在此条件下,海藻糖透过率理论值为 97.28 %,蛋白质截留率为 95.35 %。

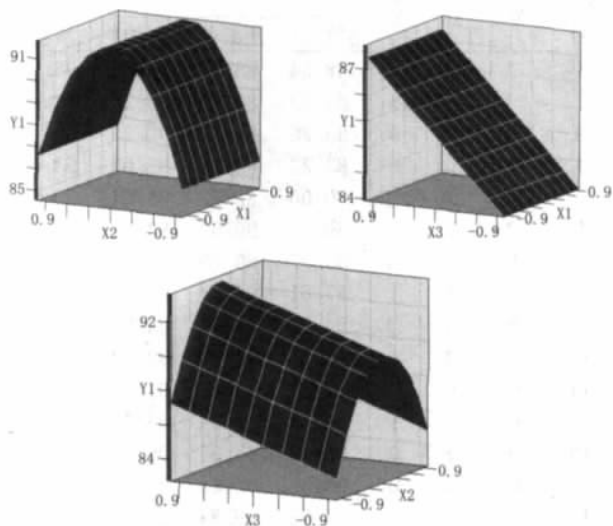


图5 海藻糖透过率的响应曲面

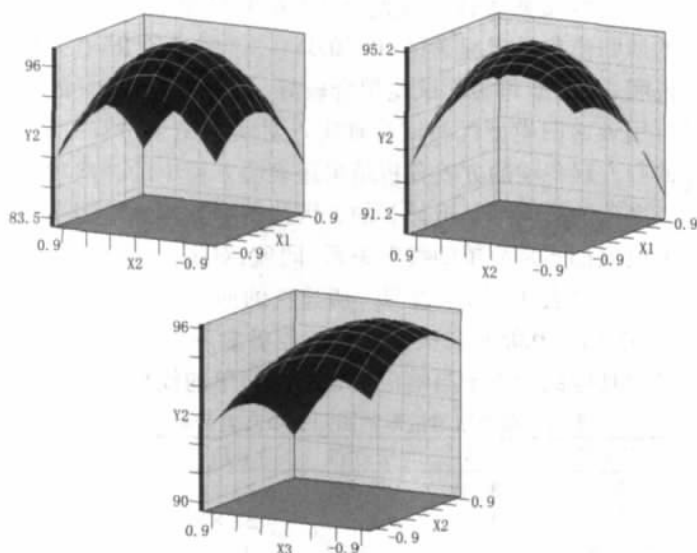


图6 蛋白质截留率响应曲面

2.2.3 验证试验

为检验方法的可靠性,采用上述最优条件进行膜分离实验,同时考虑到实际操作的情况,将膜分离最佳条件修正为浓度 3 %、pH 6.0、压力 18 psi 时,实际测得的海藻糖透过率为 96.82 %,蛋白质截留率为 95.01 %,说明拟合的结果是可信的。

进一步对酵母透过液进行 HPLC 分析得到图 7 的 HPLC 色谱图。与标准样对比,3 号峰为海藻糖,1 号峰和 2 号峰分别是葡萄糖和蔗糖,峰面积总和达到 64.60 %,说明酵母透过液主要成分是以海藻糖、葡萄糖和蔗糖为代表的低碳糖。另用考马斯亮蓝检验不变色,说明不含蛋白类物质,得到了良好的分离效果。

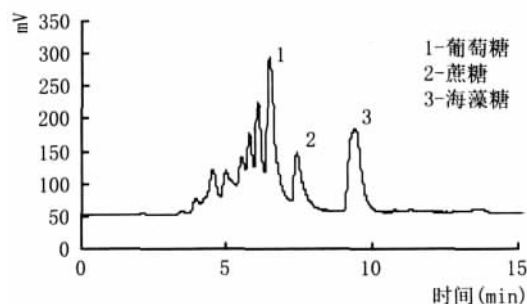


图7 海藻糖透过液 HPLC 谱图

3 结论

探讨了中空纤维膜分离海藻糖和蛋白质的方法,基于超滤机理研究了操作压力、温度、pH 和料液浓度对膜通量的影响,并在此基础上采用响应曲面法试验设计建立了主要因素对海藻糖透过率和蛋白质截留率的预测模型,确定了最佳膜分离工艺条件为:操作压力为 18 psi、温度为 24 °C、pH 6.0 和浓度 3 %,此时超滤膜通量为 20.62 L/m²·h,海藻糖透过率为 96.82 %,蛋白质截留率为 95.04 %,达到了分离浓缩的目的。中空纤维膜分离工艺具有高效率、无污染的优点,可为啤酒废酵母综合利用提供有益参考。

参考文献:

- [1] 陈华癸,蔡泽民.生物资源再利用原理与技术[M].武汉:湖北科学技术出版社,1999.197-214.
- [2] Kaushik J K, Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer[J]. The Journal of Biological Chemistry,2003,278(29): 26458-26465.
- [3] Aehrig S C, Rohn S, Kroh L W, et al. Antioxidative activity of (1→3),(1→6) -β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media[J]. Food Science and Technology, 2008, 41(5): 868-877.
- [4] 马森,卢家炯,高俊永,等.超声-酶-碱法提取啤酒废酵母 β-1,3-葡聚糖的研究[J].酿酒科技,2009,(2):96-99.
- [5] 汪立平,王锡昌,陈有容,等.啤酒废酵母甘露聚糖的制备[J].食品科学,2009,30(2):134-137.
- [6] 黄维菊,魏星.膜分离技术概论[M].北京:国防工业出版社,2008.
- [7] 张维杰.糖复合物生化研究技术(第二版)[M].杭州:浙江大学出版社,2003.12-13.