

# 啤酒酵母多糖的提纯、化学组成及抗氧化性质鉴定\*

王义华<sup>1,2</sup> 徐梅珍<sup>2</sup> 江萍<sup>3</sup> 何照范<sup>3</sup> 熊绿芸<sup>3</sup>

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)<sup>1</sup> (江西农业大学食品科学系 南昌 330045)<sup>2</sup>

(贵州大学生物技术学院 贵阳 550025)<sup>3</sup>

**摘要:**以啤酒酵母为材料,通过化学抽提法得到水溶性提取物 Mal;经薄层层析分析表明:Mal 主要含有甘露糖;经检测分析, Mal 含有蛋白成分,为蛋白多糖;氨基酸自动分析仪分析表明 Mal 含有多种氨基酸,包括 7 种必需氨基酸和 9 种非必需氨基酸;邻苯三酚自氧化法检测发现多糖能够抑制邻苯三酚自氧化,具有抗氧化能力。

**关键词:**酵母,多糖,薄层层析

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0051-04

## PURIFICATION, CHEMICAL COMPONENT AND ANTIOXIDATIVE ANALYSIS OF POLYSACCHARIDE FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

WANG Yi-Hua<sup>1,2</sup> XU Mei-Zhen<sup>2</sup> JIANG Pin<sup>3</sup> HE Zhao-Fan<sup>3</sup> XIONG Lu-Yun<sup>3</sup>

(Department of biological sciences and biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(Department of food science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)<sup>2</sup>

(College of biotechnology, Guizhong University, Guiyang 550025)<sup>3</sup>

**Abstract:** a soluble extraction of polysaccharide named Mal was extracted from *Saccharomyces cerevisiae* by chemical precipitation method; Mal was known to be mainly composed of mannase by thin layer chromatography, Protein analysis showed that Mal was complexes of polysaccharide and protein, and amino acid analysis proved that Mal contained 7 kinds of essential and 9 kinds of non-essential amino acids, and pyrogallol autoxidation analysis revealed showed that the yeast polysaccharide showed anti-oxidant property.

**Key words:** Yeast, Polysaccharide, Thin layer chromatography

酵母多糖是酵母细胞壁的重要组成部分<sup>[1]</sup>,其主要成分为大分子的甘露聚糖及糖蛋白复合物<sup>[2,3]</sup>,这些大分子含有 100~300 甘露糖分子。酵母多糖占酵母细胞壁干重的 40%<sup>[4,5]</sup>。周义发等研究表明酵母甘露聚糖主要由  $\alpha$ -D-甘露糖组成,分子量为 220 KD<sup>[6]</sup>。目前人们对酵母多糖认识和功能研究已取得了较大的进展,研究发现酵母多糖具有免疫活性和抑制肿瘤生长等作用<sup>[7,8]</sup>。最近,国内一些报道也证明,酵母多糖对断奶仔猪具有抗病效果<sup>[9]</sup>,对大肠杆菌攻毒条件下的仔鸡的小肠粘膜也具有保护作用<sup>[10]</sup>,另外,对小鼠和仔鸡的免疫功能也有一定促进作用<sup>[11,12]</sup>。在啤酒生产过程中会产生的大量废弃物啤酒酵母泥,我们从啤酒酵母泥开发利用的长远观点出发,以啤酒酵母为材料,提取了啤酒酵母多糖,并对多糖的化学组成及抗氧化性质进行了初步研究,从而为啤酒酵母多糖的深入研究及其综合开发积累资料,提供依据。

\* 江西省科技厅重点新产品开发基金 (No. 200110723600)

江西农业大学博士启动基金资助项目

作者还有:陈卫平<sup>2</sup>

收稿日期:2002-08-27, 修回日期:2002-10-25

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株：啤酒酵母（购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心）

1.1.2 试剂：单糖标准样品为生化试剂；其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 酵母胞壁多糖的化学提取：主要参照文献[13]的方法进行。啤酒酵母细胞用灭菌的0.9% NaCl溶液收集以后，3,000 r/min离心20 min，沉淀用pH 7.2的0.02 mol/L柠檬酸缓冲液洗涤形成悬浮液。放入高压锅内高压抽提90 min。取出冷却后，以3,000 r/min离心20 min。冷却至4℃，加入3倍体积的冷甲醇，出现乳白色沉淀，4℃放置过夜后，3,000 r/min离心20 min，得白色沉淀，放入干燥器中干燥。重复采用Sevag法去除提取物中的游离蛋白，采用文献[14]方法检测样品中的蛋白含量，直至蛋白含量恒定为止。再用pH值8.8的1%硼酸溶液提取多糖，沉淀溶于2%乙酸溶液中，加入适量乙酸晶体，待充分溶解后，加入3倍体积乙醇，3,000 r/min离心20 min，收集白色多糖沉淀，干燥，4℃保存备用。

1.2.2 多糖含量的测定：采用酚硫酸法<sup>[7]</sup>。准确称取标准葡萄糖20 mg于500 mL容量瓶中加水至刻度（40 μg/mL）。分别吸取0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、及1.8 mL于具塞刻度试管中，各以水补至2.0 mL。再加入6%苯酚1.0 mL，浓硫酸5.0 mL，静置10 min，摇匀，室温放置20 min，于490 nm测定吸光值，同时以2.0 mL水作空白对照。取适量样品液（按实验中实际情况而定），按上述步骤测定，由标准曲线计算出多糖含量。

1.2.3 多糖的单糖组成分析：样品处理：20 mg多糖加5 mmol/L的硫酸在100℃下封管水解5 h，用Ba(OH)<sub>2</sub> 5 mg中和硫酸，过滤收集滤液，即可进行薄层分析。标准单糖溶液的配制：木糖、鼠李糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖各2.000 g溶解于100 mL水中即为20 μg/μL样品。

3 g硅胶G于9 mL 0.1 mol/L磷酸二氢钠溶液中调成匀浆后，用涂浆器将硅胶涂铺于10 cm×20 cm玻璃板上，自然凉干，110℃活化1 h。将标样与样品液点于硅胶板上，每点上样20 μg，于装有层开剂（正丁醇：吡啶：水=8:4:3）100 mL的密闭层析缸内进行展层，当前沿达到离原点10 cm以上取出，凉干。用喷雾器将适量显色剂（用丙酮配制2%二苯胺，2%苯胺，0.85%磷酸，1% HCl）喷于硅胶板上，85℃的恒温箱中显色10 min。单糖的薄层扫描定量方法参照CS-930薄层扫描仪操作手册进行，扫描波长选用390 nm。

1.2.4 蛋白质含量的检测：采用文献[14]方法检测除样品中的蛋白含量。

1.2.5 多糖的氨基酸组分的分析<sup>[15]</sup>：准确称取样品20 mg，加入6 mol/L HCl（含有1%草酸和0.05%巯基乙醇），封管，于100℃水解24 h，过滤，收集滤液。用Backman 6300型氨基酸自动分析仪分析滤液中各氨基酸浓度。

1.2.6 多糖的抗氧化能力检测：多糖清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>作用的检测采用邻苯三酚自氧化法<sup>[16]</sup>

2 结果与分析

2.1 多糖的提取

按 1.2.1 法得到啤酒酵母多糖提取物，命名为 Ma1。

2.2 多糖的物理性质

Ma1 能溶于水，溶液无色透明，pH 值为 6.5。不溶于乙醇、乙醚、丙酮。多糖经 300 ~ 700 nm 扫描，在 370 nm 处有最大吸收。

2.3 多糖含量与单糖组成的鉴定

采用苯硫酸法测定多糖提取物的浓度为 75.6%，薄层析法鉴定发现 Ma1 含有甘露糖（图 1）。薄层扫描仪检测甘露糖占多糖含量的 96.8%，表明 Ma1 的糖链主要由甘露糖组成。

2.4 蛋白质含量的分析

经考马斯亮兰法鉴定，Ma1 的蛋白质含量为 22.3%，由此可见，提取物为蛋白多糖。

2.5 多糖中氨基酸组成与含量的分析

测定 Ma1 中各氨基酸组成与含量，结果表明 Ma1 的 16 种氨基酸，总含量为 24.9%。其中包括 7 种必需氨基酸，含量高达 10.6%；另外还含有 9 种非必需氨基酸，含量达 12.0%（表 1）。因此啤酒酵母的多糖复合物中含有丰富的氨基酸营养成分。

表 1 Ma1 的氨基酸含量 (%)

必需	种类	Thr	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Lys	合计		
氨基酸	含量	2.13	1.25	0.57	0.87	1.12	0.43	4.26	10.6		
非必需	种类	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Tyr	His	Arg	合计
氨基酸	含量	1.74	1.21	2.41	0.76	1.09	1.28	0.53	2.14	0.88	12.0

2.6 多糖的抗氧化作用检测

邻苯三酚自氧化系统常用作的产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和测定 SOD 酶活性，实验以蒸馏水为空白对照，室温下分别测定不同浓度的酵母多糖对邻苯三酚自氧化体系的影响，并绘出时间进程曲线（图 2）。由图 2 可见，在测定体系中加入酵母多糖时，OD<sub>425</sub> 吸收值明显下降，表明多糖具有明显的抑制邻苯三酚的自氧化的作用。

3 讨论

在酵母多糖的提取过程中，用溴代十六烷三甲铵除去蛋白质后，应用硼酸在碱性条件下能与多羟基复合物形成稳定的复合物性质，将多糖再次沉淀分离出来，这是多糖化学提取法的关键一步。首先，多糖浓度和多糖/硼酸盐的比率会影响多糖的再次沉淀析出率。两者比例不适合会造成多糖提取失败。根据本实验研究的结果，多糖浓度应不超过 2%，多糖/硼酸的比率控制于 2 左右，才能够有效地提取多糖。其次，多糖

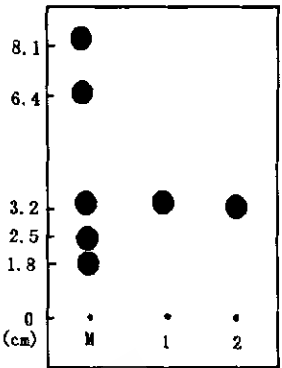


图 1 Ma1 单糖组成的薄层层析鉴定

M 单糖的混合标准样品，按 Rf 的从小到大分别为半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖和鼠李糖；1, 2 Ma1 的酸水解产物

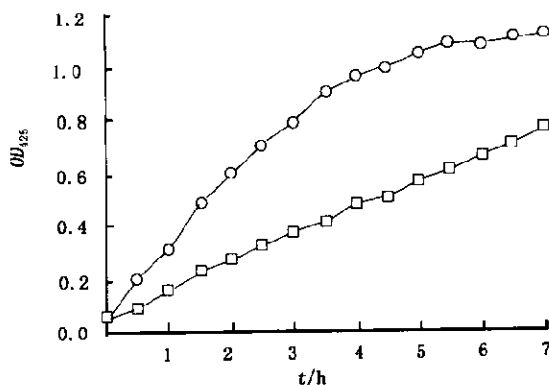


图2 酵母多糖对邻苯三酚自氧化的抑制效应

—○—空白, —□—多糖溶液

并具有抗氧化功能;据报道啤酒酵母多糖还具有促进机体生长与提高免疫功能等作用<sup>[3-6]</sup>;因此啤酒酵母多糖具有十分重要的开发意义。

本文研究结果表明酵母多糖具有抗氧化能力,多糖复合物之所以表现出抗氧化等生物活性,可能是因为糖链与蛋白质形成不同功能结构域。对这种作用机理的研究,还需对多糖的结构、多糖与蛋白质的作用方式及其生理活性部位作更加深入的研究<sup>[11]</sup>。对酵母多糖进一步纯化及结构分析、抗肿瘤及其免疫学特性的研究正在进行之中。本研究为以后的深入的研究积累了资料,奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Peter N L, Rafael O. J bacterial, 1998, 3735 ~ 3740.
- [2] Dean N. Biochim Biophys Acta, 1999, 1426: 309 ~ 322.
- [3] Munro S. FEBS Lett, 2001, 498: 223 ~ 227.
- [4] Nakanishishundo Y, Nakayama K, Tanaka A, et al. J Biol Chem, 1993, 268: 26338 ~ 26345.
- [5] Ballou L, Cohen R E, Ballou C E. J Biol Chem, 1980, 255: 5986 ~ 5991.
- [6] 周义发, 张翼伸, 梁忠岩. 生物化学杂志, 1991, 7: 74 ~ 78.
- [7] Furuyama M, Nishikawa Y, Shinoda T, et al. Carbohydr Res, 1983, 117: 229 ~ 239.
- [8] 徐军发, 侯 敢, 黄迪南, 等. 中国生化药物杂志, 2002, 23 (2): 67 ~ 68.
- [9] 金淑英, 李斯华, 黄挺进. 浙江畜牧兽医, 2001, 3: 3 ~ 4.
- [10] 张运涛, 谷文英, 王永玲. 粮食与饲料工业, 2000, 3: 30 ~ 31.
- [11] 李 凡, 石艳春, 李 毅, 等. 白求恩医科大学学报, 1998, 24 (2): 124 ~ 126.
- [12] 高仕英, 吴纪经, 吴英华. 中国实验动物学报, 2000, 8 (3): 189 ~ 199.
- [13] 张惟杰编著. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [14] Bradford M H. Anal Biochem, 1976, 72: 248 ~ 254.
- [15] 何照范, 张迪清编著. 保健食品化学及其检测技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [16] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71 ~ 73.

提取液中加入硼酸溶液后,溶液的pH值也是多糖能否沉淀析出的重要因素。逐滴加入NaOH溶液时务必充分搅拌,尽可能地避免局部过碱,同时仔细观察提取液中反应,当pH值达到一定时,就会出现多糖复合物沉淀。多糖开始发生沉淀的pH值为8.5,如果pH值超过8.8仍未产生多糖沉淀,就表明多糖提取失败。

研究表明, Mal 为蛋白多糖,糖链主要由甘露糖组成;其中氨基酸含量丰富,含有7种必需氨