

用废啤酒酵母制备碱不溶性葡聚糖的研究

赵光远 殷蔚申 吴小荣

(郑州粮食学院 郑州 450052)

摘要 研究了用碱法及酶-碱法从啤酒厂废弃的酵母泥中制备碱不溶性葡聚糖的工艺。对 NaOH 及蛋白酶用量的影响, NaOH 作用时间、浓度、作用次数等因素的影响进行了较系统的探讨。先用蛋白酶处理酵母可减少 NaOH 用量从而减轻环境污染。对多糖产品进行了定性定量分析,得到的产品主要为 $\beta(1\rightarrow3)$ -D-葡聚糖。

关键词 $\beta(1\rightarrow3)$ -D-葡聚糖, 甘露聚糖 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

酵母细胞壁从外向内分三层, 分别为甘露聚糖、蛋白质、葡聚糖。制备酵母葡聚糖必须

1996-03-18收稿

从酵母细胞壁中消除甘露聚糖和蛋白质。葡聚糖是由葡萄糖组成的均一多糖。酵母细胞壁含有碱不溶性^[1]、酸溶性^[2]、碱溶性^[3]三种葡聚糖。它们的分子量、分枝程度因不同的制备方法而不同。碱不溶性葡聚糖是高度分枝的 $\beta(1\rightarrow3)$ -D葡聚糖,重合度(DP)1450~1500,有3%的 $\beta(1\rightarrow6)$ 链间连接^[1]。酵母 $\beta(1\rightarrow3)$ -D葡聚糖能增强哺乳动物免疫活力^[4],有抗癌^[5]、抗细菌^[6]、抗病毒^[7]、降低血脂^[8]等功能。已有专门名词BRM^[9](生物反应修饰物)。同时还有保湿、成膜、无刺激性等特点,故广泛用于医药食品、化妆品等行业。

1 材料和方法

1.1 材料

由郑州奥克啤酒厂提供的酿造啤酒后废弃的酵母泥。

标准葡聚糖:美国Sigma化学公司。

其它所用药品均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

傅立叶红外检测仪(美国FTS-401型)。

751-GW型分光光度计(上海分析仪器厂)。

离心机(LD₅₋₁₀北京医用离心机厂)

乌式粘度计(1.0mm上海市青浦县前时玻璃仪器厂)。

茂福炉(RJM-28-10沈阳市电炉厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 废酵母前处理方法:废酵母泥加水稀释,过筛去酒花等杂物,用小苏打溶液洗涤一次,蒸馏水洗涤三次。

1.3.2 碱法:用NaOH液处理经前处理的酵母,离心,沉淀物处理两次,HCl处理沉淀物一次,离心,沉淀物用95%乙醇处理,乙醚脱水,75℃干燥制得产品。

1.3.3 酶-碱法:用蛋白酶处理经前处理酵母,离心,沉淀物经碱处理一次后,进一步处理同碱法。

1.3.4 蛋白质含量测定:凯氏定氮法^[10]。

1.3.5 多糖含量测定:苯酚-硫酸比色法^[11]。

1.3.6 多糖组分定性分析见文献[11]。

1.4 产品分析方法

1.4.1 溶解性:室温下取1g产品几份分别添加不同量水及95%乙醇、无水乙醚、丙酮、二甲基亚砷,搅拌后观察其溶解性。

1.4.2 定性分析:多糖含量测定^[11];蛋白质含量测定^[10];总灰分测定^[14];分子量测定^[11];粘度测定^[11];水分含量测定^[14]。

2 结果与讨论

2.1 碱法制备碱不溶性葡聚糖

2.1.1 NaOH处理对酵母多糖及蛋白质的影响

①对甘露聚糖的影响:酵母100g(干重)三份经不同浓度的NaOH溶液700ml,在60℃处理3h后完全水解,产物纸层析结果表明没有甘露糖,说明以2%NaOH处理酵母后不含甘露聚糖。

②NaOH浓度的影响:酵母100g(干重)三份经不同浓度的NaOH溶液1000ml在75℃处理3.5hr,结果见表1。酵母菌体蛋白质及多糖含量随着NaOH处理浓度的增大而降低。对酵母多糖以2%、3%及6%NaOH处理后,其含量差别不显著,而8%NaOH处理多糖减少较显著,可能是8%NaOH较大程度地破坏了碱不溶性葡聚糖。2%和3%NaOH处理比较,多糖含量虽然相差不多,但蛋白质含量2%要比3%高得多,为了提高多糖纯度选择用3%NaOH处理。

表1 NaOH浓度对菌体蛋白质及多糖的影响

NaOH浓度(%)	蛋白质(%)	多糖(%)
2	29.0	18.9
3	20.0	18.0
6	19.3	17.2
8	18.0	14.0

注: %代表处理后酵母的含蛋白质或多糖与最初酵母干重的重量百分比

③ 3%NaOH处理次数的影响:酵母100g(干重)三份用3%NaOH溶液1000ml在75℃分别处理3次,每次3.5h,结果如表2。

NaOH处理两次可除去酵母总蛋白质的99%(废酵母蛋白质最初含量约为干重的55%)。综合考虑多糖得率及蛋白质去除程度3%NaOH处理两次较好。

表2 3% NaOH处理次数对菌体蛋白质及多糖的影响

处理次数	蛋白质(%)	多糖(%)
1	20.00	18.0
2	0.21	13.8
3	0.11	11.0

注: %代表处理后酵母所含蛋白质及多糖与最初酵母干重的重量百分比

④作用温度的影响: 酵母100g(干重)三份用3%NaOH 1000ml在不同温度下(60、75、90℃)处理3.5h后, 结果表明蛋白质及多糖含量都随着NaOH处理温度升高而降低。蛋白质分别为21.5%、20.0%、17.6%, 多糖分别为18.3%、18.0%、17.4%。

表3 正交试验表 $L_4(2^3)$

水平	温度(℃)	NaOH用量(V/W)	NaOH浓度(%)
1	60, 90	10:1, 10:1	6, 3
2	60, 90	15:1, 15:1	3, 3
3	90, 90	10:1, 10:1	3, 3
4	90, 90	15:1, 15:1	6, 3

注: 1. V/W表示NaOH溶液体积V: 酵母干重W

2. 表格中前面的数据为第一次NaOH处理, 后面的数据为第二次NaOH处理。

⑤温度、浓度、NaOH用量的综合影响: 通过三因素两水平 $L_4(2^3)$ 正交试验。所得结果综合分析: 最佳处理条件为(表3): 酵母100g(干重), 用6%NaOH 1000ml, 60℃下搅拌3.5h, 加333ml水, 3000r/min离心15min, 沉淀物用3%NaOH 1000ml在90℃搅拌2h。结果多糖含量为13.6%, 蛋白质含量为0.18%。

2.1.2 碱法制备碱不溶性葡聚糖产品的后处理

①HCl处理对多糖的影响: 用4%HCl室温下处理产品2h, 对其蛋白质含量影响不大, 处理前产品多糖含量为13.6%, 处理后为11.5%, 因糖元及 $\beta(1\rightarrow6)$ -D葡聚糖可溶于酸, 推测减少的2.1%为这两种糖。

②水洗对产品的影响: 水洗可提高产品纯度, 改善产品色泽, 但会造成多糖损失。实践证明宜水洗2~3次。

③乙醇处理对产品的影响: 用95%乙醇在75℃处理3h可除去剩下的大部分脂类及色素, 并随着乙醇纯度的提高及作用温度升高, 产品就越白。

④干燥条件对产品的影响: 产品经无水乙醇、无水乙醚脱水后在37℃下干燥12h即可得白色粉末状产品。产品含水量是色泽洁白与否的关键, 只有在含水量很低(3%左右)时, 才能得到白色粉末状产品。

2.2 酶-碱法制备碱不溶性葡聚糖

2.2.1 蛋白酶对酵母的作用

①酶作用时间的影响: 酵母100g(干重)加500ml水及10mg蛋白酶57℃处理不同时间(12h、24h和36h), 结果以24h为宜, 再延长时间效果不显著。

②酶用量的影响: 酵母100g(干重)三份各加500ml水, 各以110mg、220mg、330mg蛋白酶57℃处理24h, 结果随着酶用量增多, 酵母蛋白质含量越少(分别为29.34%、20.32%、

表4 酶处理后2%与3%NaOH作用对酵母蛋白质及多糖的影响

组别	NaOH处理前 蛋白质 (%)	NaOH处理后			
		2%NaOH		3%NaOH	
		蛋白质 (%)	多糖 (%)	蛋白质 (%)	多糖 (%)
a	20.32	3.00	15.80	1.40	15.00
b	16.67	1.30	15.60	0.19	14.80
c	7.10	0.19	15.40	0.19	14.60

注: 1. 表中含量单位同表2。

2. a组表示加220mg蛋白酶处理后的酵母

b组表示加330mg蛋白酶处理后的酵母

c组表示用220mg及110mg蛋白酶两次处理后的酵母

16.67%)。

③蛋白酶处理后再加NaOH处理对酵母蛋白质及多糖的影响: 酵母100g(干重)经酶处理后再分别用2%及3%NaOH 700ml在60℃处理3h, 从表4可知: C组处理效果较好, 即酵母100g(干重)用220mg和110mg蛋白酶两次

处理再以 2%NaOH 处理, 蛋白质只有 0.19%, 多糖有 15.40%。

2.3 产品分析

2.3.1 产品不溶于水, 也不溶于 95% 乙醇等有机溶剂。当产品在水中添加量在 20% 以上时可形成粘稠状物。产品可溶于二甲基亚砷。

2.3.2 两种产品与苯酚-硫酸试剂反应呈黄色(阴性), 表明为多糖类碳水化合物。两种产品用费林试剂检测呈阴性, 表明不含还原糖。两种产品与碘液没有颜色反应表明不含淀粉及糊精。

2.3.3 产品红外光谱图(图 1)与标准 $\beta(1\rightarrow3)$ -D 葡聚糖红外光谱图对比, 在 890cm^{-1} 处有特征吸收峰, 表明多糖为 β 构型。在 2920cm^{-1} 、 1370cm^{-1} 、 1250cm^{-1} 、 1260cm^{-1} 几处有特征吸收峰, 表明产品为 β -(1 \rightarrow 3)-D 连接的多糖。

2.3.4 两种产品部分水解后未检出麦芽糖, 故不含糖元。

2.3.5 两种产品完全水解后未检出甘露糖, 故不含甘露聚糖。

2.3.6 通过测已知分子量的标准葡聚糖在二甲基亚砷中的相对粘度, 算出特性粘度, 代人

$[\eta] = KM^2$ 中, 求得 $K = 1.38 \times 10^{-7} \text{ ml / mg}$ 。两种产品在二甲基亚砷中的特性粘度为 $5.88 \times 10^{-2} \text{ ml / mg}$ (碱法) 及 $6.9 \times 10^{-2} \text{ ml / mg}$ (酶-碱法), 代入公式, 可得出两产品粘均

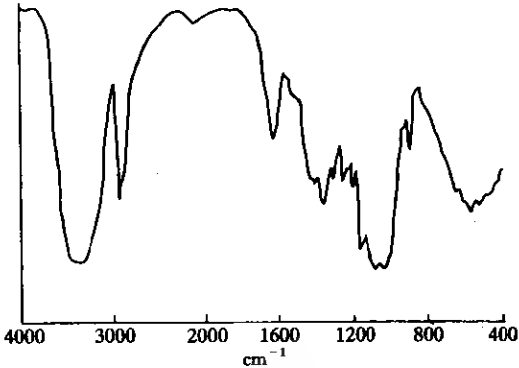


图 1 酶-碱法制备 $\beta(1\rightarrow3)$ -D 葡聚糖红外光谱图

分子量 \overline{M}_n (表 5)。

2.3.7 两种方法所得产品特性比较见表 5。

2.3.8 两种方法所得产品均为白色粉末状的 $\beta(1\rightarrow3)$ -D 葡聚糖, 而酶-碱法用碱量少, 减轻对环境的污染。

表 5 两种方法所得产品特性

方法	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)	灰分 (%)	分子量 ($\times 10^4$)	水溶液的特性粘度 (ml/mg)	水分 (%)	得率 (%)
碱法	93	0.91	0.57	42.6	0.97×10^{-2}	3.2	13.1
酶-碱法	92	1.21	0.46	50.1	1.12×10^{-2}	3.4	13.7

注: 含量均按占产品重量百分比计

参 考 文 献

[1] David J Manners, Alan J Masson, James C Patterson. Biochem J, 1973, 135:19-30.
[2] Bacon J S D, Farmer U C. Biochem J, 1965, 110:34.
[3] Roelofser P A. Biochem Biophys Acta, 1953, 10:477.
[4] Hassid W L, Joslyn M A. J AM Chem Soc, 1941, 63: 295-298.
[5] Williams D L, Sherwood E R, Betal R. Hepatology, 1985, 5:198-206.
[6] Diluzio N R, Williams D L. Infec Immun, 1985, 20: 804-810.
[7] Williams D L, Dilluzio N R. Science, 1980, 208: 67-69.

[8] 日本公开特许公报, (A)昭 62-234027
[9] David L Williams. Carbohydr Res, 1991, 219:203-213.
[10] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1983, 1-4, 89-92.
[11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 6-7, 12-13, 16, 97-101.
[12] 无锡轻工业学院、天津轻工业学院合编. 食品生物化学. 北京: 轻工业出版社, 1981, 53.
[13] James S, Chem Y-G. Carbohydrate Polymers, 1990, 13:207-219.
[14] 郑州粮食学院食品分析教研室编. 食品分析. 郑州粮食学院, 1990, 89, 125.

STUDIES ON THE PREPARATION OF ALKALI-INSOLUBLE GLUCAN FROM DISCARDED BREWER'S YEAST

Zhao Guangyuan Yin Weisheng Wu Xiaorong

(Zhengzhou Grain College, Zhengzhou 450052)

Abstract This paper was on the preparation of alkali-insoluble glucan by the enzyme-alkali extraction method were carried out. The effects of the amount of NaOH and enzyme added, the extraction period, the concentration of NaOH and the extraction times on the extraction of glucan were studied in detail. Hydrolyzing the yeast with protease before extracting with alkali could cut down the amount of NaOH used and reduce the pollution of NaOH on the environment. Quantitative and qualitative analysis were carried out on the final products and the results shew that $\beta(1-3)$ -D-glucan was the major component of the products.

Key words $\beta(1-3)$ -D-glucan, mannan, *Saccharomyces cerevesiae*