

张 勇,周丽明. 碱不溶性酵母胞壁多糖的提取条件[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):307-309.

碱不溶性酵母胞壁多糖的提取条件

张 勇,周丽明

(上饶师范学院生命科学院,江西上饶 334001)

摘要:以废啤酒酵母为原料,采用 NaOH 溶液提取碱不溶性酵母胞壁多糖。经过单因素试验后确定提取条件为:100 g 废啤酒酵母悬浮于 1 000 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,100 ℃ 下剧烈搅拌 60 min,3 000 r/min 离心 20 min 后弃上清液,沉淀再碱液处理 2 次,冷却后用 HCl 调 pH 值至 4.5,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀经 95% 乙醇、丙酮、乙醚洗涤后干燥即得碱不溶性酵母胞壁多糖。在此提取条件下,碱不溶性酵母胞壁多糖的得率为 2.23%,其多糖含量为 90.20%,蛋白质含量为 0.87%。

关键词:碱不溶性;酵母胞壁多糖;废啤酒酵母;提取条件

中图分类号:TS201.2⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0307-03

酵母细胞壁中存在碱不溶性葡聚糖、碱溶性葡聚糖、酸溶性葡聚糖、连接有蛋白质的无定性的碱溶性甘露聚糖等。其中不溶性葡聚糖除因不溶使其在抗肿瘤等的临床应用上受到限制外,高度的黏性、持水性和热稳定性以及制备工艺简单等方面的优点,使其在食品、医药、化妆品、造纸和建筑材料等行业广泛应用^[1]。啤酒工厂主要副产物——啤酒酵母泥中就含有具有这种特性的胞壁多糖。我国酵母资源丰富,年产啤酒沉淀酵母泥 3 万~5 万 t(干基)^[2]。啤酒酵母细胞壁中含有大量的多糖,约为酵母细胞干重的 40%^[3],目前对其综合利用主要是从中提取蛋白质、核酸、谷胱甘肽等^[4],对其胞壁多糖的研究还不多见。本研究对从废啤酒酵母中提取碱不溶性酵母胞壁多糖的工艺条件进行了研究,为酵母多糖的进一步研究和废啤酒酵母的综合利用提供参考。

1 材料与方法

收稿日期:2013-04-01

作者简介:张 勇(1978—),男,湖北襄阳人,硕士,讲师,研究方向为生物活性物质。E-mail:1328662368@qq.com。

1.1 材料、试剂与仪器

废啤酒酵母(湖北金龙泉啤酒有限公司);试剂均为国产分析纯;pH 计[320-S 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];真空干燥箱(DZT-6020 型,上海精宏实验设备有限公司);可见分光光度计(722S 型,上海精密科学仪器有限公司);红外消化炉(HN-12A,上海勇规分析仪器有限公司)。

标准葡萄糖溶液制备:取 105 ℃ 干燥至恒重的 D-葡萄糖,精密称重,配成 3.62 mg/mL 的标准储备液。使用前用蒸馏水稀释配制成标准葡萄糖使用液(0.036 2 mg/mL)。

80% 苯酚:80 g 苯酚(分析纯重蒸馏试剂)加 20 g 水使之溶解,可置冰箱中避光长期贮存。

6% 苯酚:临用前以 80% 苯酚配制。

1.2 方法

1.2.1 酵母胞壁多糖提取与纯化方法 碱不溶性葡聚糖提取与纯化工艺流程如下:废啤酒酵母→碱液处理→中和→溶剂洗涤→干燥→酵母胞壁多糖。

用一定浓度的 1 000 mL 碱液(NaOH)对 100 g 废啤酒酵母处理多次,每次均是在沸水浴中加热处理一定时间,冷却后

[2]Zhang M,Liu G,Tang S,et al. Effect of five triterpenoid compounds from the buds of *Aralia elata* on stimulus-induced superoxide generation,tyrosyl phosphorylation and translocation of cytosolic compounds to the cell membrane in human neutrophils[J]. *Planta Medica*,2006,72(13):1216-1222.

[3]杨志福,汤海峰,贾艳艳,等. 太白橐木总皂苷对糖尿病小鼠血糖血脂及抗氧化作用的影响[J]. *解放军药学报*,2008,24(2):110-113.

[4]任美萍,刘明华,陈 怡,等. 橐木皂苷抗肿瘤活性研究[J]. *时珍国医国药*,2009,20(10):2417-2418.

[5]李 明,鲁卫星. 龙牙橐木药理研究进展[J]. *医学综述*,2009,15(20):3157-3160.

[6]Song S J,Nakamura N,Ma C M,et al. Five saponins from the root bark of *Aralia elata*[J]. *Phytochemistry*,2001,56(5):491-497.

[7]Kim J S,Shim S H,Chae S,et al. Saponins and other constituents from the leaves of *Aralia elata*[J]. *Chemical and Pharmaceutical*

Bulletin,2005,53(6):696-700.

[8]Ma Z Q,Song S J,Li W,et al. Two new saponins from the bud of *Aralia elata* (Miq.) Seem[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*,2005,7(6):817-821.

[9]裴月湖. 天然药物化学实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.

[10]黎琼红,张国刚. 三七药材的指纹图谱[J]. *沈阳药科大学学报*,2006,23(4):229-232.

[11]李 琳,朱 杰,傅晓琴,等. 中试超滤系统浓缩分离南瓜多糖[J]. *食品科学*,2009,30(22):33-36.

[12]周大寨,朱玉昌,周毅锋,等. 芸豆蛋白质的提取及超滤分离研究[J]. *食品科学*,2008,29(8):386-390.

[13]盛占武,孙志高,黄学根,等. 超滤法提取橙皮苷工艺研究[J]. *食品科学*,2008,29(2):188-191.

[14]冯 颖,李天来,范文丽,等. 长白橐木生物活性成分的初步研究[J]. *江苏农业科学*,2009(5):256-258.

再离心,弃去碱液。在用碱液处理最后 1 次后用 HCl 调 pH 值,一定转速下离心 20 min 后弃上清液,沉淀即为酵母胞壁多糖粗品。将沉淀用 200 mL 蒸馏水洗出,100 ℃ 水浴 20 min,3 000 r/min 离心 20 min;沉淀用 100 mL 95% 乙醇洗出,用电动搅拌器搅拌 15 min 后 3 000 r/min 离心 20 min;重复 1 次;沉淀用 100 mL 丙酮洗出,搅拌 15 min 后 3 000 r/min 离心 20 min;重复 1 次;然后沉淀用 100 mL 无水乙醚洗出,搅拌 15 min,3 000 r/min 离心 20 min,沉淀置于沸水浴中挥发残余无水乙醚,最后置于 37 ℃ 下真空烘干,即得酵母胞壁多糖。

酵母胞壁多糖得率按下式计算:

酵母胞壁多糖得率 = $\frac{\text{酵母胞壁多糖质量}}{\text{酵母残渣质量}} \times 100\%$ 。

1.2.2 标准曲线的制作^[5] 分别精密吸取标准葡萄糖使用液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 于 10 mL 比色管中,各以水补至 2.0 mL,然后加入 6% 苯酚 1.0 mL,然后冷水浴中迅速加入浓硫酸 5.0 mL,并于冷水浴中放置 5 min,摇匀,再置沸水浴中加热 15 min,再置冷水浴中 15 min,取出,用可见光分光光度计于 490 nm 处测其吸光度,以 2.0 mL 水按同样显色操作为空白,横坐标为多糖质量(μg),纵坐标为吸光度,得标准曲线。

1.2.3 酵母胞壁多糖中多糖含量测定方法^[6] 称取约 10 mg 酵母胞壁多糖,用 20 mL 3 mol/L H₂SO₄ 于 100 ℃ 水浴中水解 90 min,然后将水解液定容至 250 mL。准确吸取水解液 1.0 mL,按“1.2.2”节的方法操作,测其吸光度。根据标准曲线计算出酵母胞壁多糖中多糖含量。

1.2.4 酵母胞壁多糖中蛋白质含量测定方法 凯氏定氮法^[7]。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

试验结果(图 1)表明,葡萄糖在浓度 0~0.065 16 mg/mL 范围内与其吸光度呈良好的线性关系,在此范围内的线性回归方程为: $y=0.005\ 7x+0.000\ 8$, $r=0.999\ 8$ 。

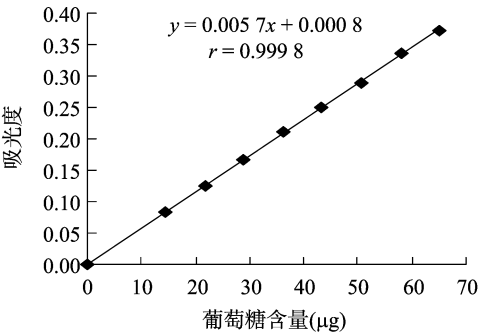


图1 葡萄糖标准曲线

2.2 单因素试验结果

2.2.1 碱溶时间的选择 多份废啤酒酵母均悬浮于 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,并于 100 ℃ 水浴中分别剧烈搅拌不同时间,冷却后调节 pH 值至 9.0,3 000 r/min 离心 20 min,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表 1。

表 1 碱溶时间试验结果

酵母碱溶时间 (min)	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
45	2.79	70.12	3.72
60	2.65	71.62	3.56
90	2.43	68.67	3.23
120	2.12	65.77	3.03
150	1.96	61.17	2.72

从表 1 可以看出,废啤酒酵母在碱溶 60 min 条件下得到的多糖含量最高,而且得率较高,蛋白质含量较低。随着碱溶时间的增长,蛋白质逐渐减少,但多糖得率和含量都有较大幅度的降低,可见碱溶时间过长在除去蛋白和杂质的同时也会使多糖遭到破坏,致使得率和含量下降,所以 60 min 为碱溶最佳时间。

2.2.2 碱溶温度的选择 多份废啤酒酵母均悬浮于 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,并于不同温度水浴中剧烈搅拌 60 min,冷却后调节 pH 值至 9.0,3 000 r/min 离心 20 min,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表 2。

表 2 碱溶温度试验结果

碱溶温度 (℃)	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
80	3.1	64.52	4.39
90	2.76	69.65	3.72
100	2.58	72.33	3.48

从表 2 可以看出废啤酒酵母在碱溶温度为 100 ℃ 条件下得到的多糖含量最高,蛋白质含量最低,多糖得率略有减少。可能是在温度比较低的时候碱溶不彻底,含有一些杂质和蛋白质。综合考虑到多糖含量和蛋白质含量等问题,故选择碱溶温度为 100 ℃。

2.2.3 碱液浓度的选择 多份废啤酒酵母分别悬浮于 0.75、1.0、1.5 mol/L 的 NaOH 溶液中,于 100 ℃ 水浴中剧烈搅拌 60 min,冷却后调节 pH 值至 9.0,3 000 r/min 离心 20 min,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表 3。

表 3 碱液浓度试验结果

碱液浓度 (mol/L)	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
0.75	3.15	68.64	3.89
1.0	2.72	71.56	3.42
1.5	2.18	71.32	2.96

从表 3 可以看出,废啤酒酵母在碱液浓度为 1 mol/L 时得到的多糖含量最高,多糖得率比碱液浓度为 0.75 mol/L 时略少。可能随着碱液浓度的提高,在杂质和蛋白质不断被溶解的过程中多糖也在一定程度上被降解,而且碱液浓度越大对多糖的破坏越厉害,多糖的损失也越大。故选择碱液浓度为 1 mol/L。

2.2.4 碱溶后离心转速的选择 多份废啤酒酵母均悬浮于 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,于 100 ℃ 水浴中剧烈搅拌 60 min,冷却后调节 pH 值至 9.0,分别于不同转速下离心分离

20 min,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表4。

表4 碱溶后离心转速试验结果

离心转速 (r/min)	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
2 500	2.41	72.85	3.22
3 000	2.68	72.16	3.31
3 500	2.81	70.86	3.46
4 000	2.95	69.11	3.58
4 500	3.02	68.62	3.64

从表4可以看出,随着转速的提高,多糖的得率和蛋白质的含量均有上升的趋势,但多糖含量呈下降趋势。在加大转速的条件下,多糖得率增大了,但也会将杂质和蛋白质沉淀下来影响多糖的含量。故选择3 000 r/min离心废啤酒酵母的碱溶液,以获得较高多糖含量的酵母胞壁多糖。

2.2.5 碱液处理次数的选择 多份废啤酒酵母均悬浮于1 mol/L的NaOH溶液中,于100℃水浴中剧烈搅拌60 min,分别重复不同碱液处理次数,冷却后调节pH值至9.0,3 000 r/min离心20 min,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表5。

表5 碱液处理次数试验结果

碱溶处理次数	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
1	2.52	74.19	3.65
2	2.18	85.42	1.78
3	1.93	93.54	0.92

从表5可以看出,废啤酒酵母在碱溶3次后得到的多糖含量最高,多糖得率略有减少,蛋白质含量最低。随着碱溶次数的增加,在不断除去一些杂质和蛋白质的同时仅少量多糖遭到了破坏。综合考虑到多糖含量及蛋白质含量等问题,故确定碱溶次数为3次。

2.2.6 碱溶后中和pH值的选择 多份废啤酒酵母均悬浮于1 mol/L的NaOH溶液中,于100℃水浴中剧烈搅拌60 min,离心分离弃上清液,再重复碱液处理2次,冷却后用HCl调节不同pH值,按“1.2.1”节操作,计算多糖得率,并按“1.2.3”节和“1.2.4”节测定多糖含量和蛋白质含量,结果见表6。从表6可以看出,随着中和pH值增大,多糖得率有增大的趋势;但蛋白质含量增大,多糖含量降低。这可能是由于pH值较低时,在除去蛋白等杂质的同时也导致部分多糖降解致使多糖得率有所降低;而在pH值较高时多糖被破坏较少,但杂质和蛋白质含量较高。在pH值为4.5的时候多糖含量有90.20%,故选定pH值4.5为最佳中和pH值。

表6 碱溶后中和pH值试验结果

pH 值	多糖得率 (%)	多糖含量 (%)	蛋白质含量 (%)
3.0	2.06	82.33	0.78
4.5	2.23	90.2	0.87
6.0	2.52	89.24	1.02
7.5	2.67	87.81	1.17
9.0	2.91	85.57	1.42

3 结论

本试验采用NaOH溶液提取碱不溶性酵母胞壁多糖。提取与纯化方法为:称取废啤酒酵母100 g悬浮于1 000 mL 1 mol/L的NaOH溶液中,100℃下剧烈搅拌60 min,碱溶的酵母液冷却后于3 000 r/min离心20 min,去上清液;沉淀用1 000 mL 1 mol/L的NaOH溶液重新悬浮,100℃水浴60 min,3 000 r/min离心20 min;沉淀再用1 000 mL 1 mol/L的NaOH溶液重新悬浮,100℃水浴60 min;冷却后用HCl调pH值至4.5,3 000 r/min离心20 min,去上清液;将沉淀用200 mL蒸馏水洗出,100℃水浴20 min,3 000 r/min离心20 min;沉淀用100 mL 95%乙醇洗出,用电动搅拌器搅拌15 min后3 000 r/min离心20 min;重复1次;沉淀用100 mL丙酮洗出,搅拌15 min后3 000 r/min离心20 min;重复1次;然后沉淀用100 mL无水乙醚洗出,搅拌15 min,3 000 r/min离心20 min,沉淀置于沸水浴中挥发残余无水乙醚,最后置于37℃下真空干燥,即得碱不溶性酵母胞壁多糖。碱不溶性酵母胞壁多糖的得率为2.23%,其多糖含量为90.20%,蛋白质含量为0.87%。

参考文献:

[1]胡晓忠,冯万祥. 酵母葡聚糖的制备及理化性质[J]. 华东理工大学学报,1999,25(5):477-479.
[2]黄国宏,李科德,曾庆孝. 酵母β-1,3-葡聚糖研究进展[J]. 酿酒科技,2006(12):100-103.
[3]段胜利,王雪,苑鹏,等. 采用催化自溶和生物破壁技术提取啤酒酵母细胞壁多糖[J]. 食品与发酵工业,2012,38(5):138-143.
[4]杨建梅. 啤酒废酵母中β-1,3-D-葡聚糖的制备及性质研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012.
[5]张勇. 酵母多糖的研究——产多糖酵母菌株筛选、发酵工艺及酵母多糖提取、分离纯化和免疫活性的研究[D]. 武汉:湖北工业大学,2005.
[6]张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1999:132-136.
[7]陈均辉,陶力,李俊,等. 生物化学实验[M]. 3版. 北京:科学出版社,2003:51-54.