

(8) 43-48

# 啤酒酵母胞壁多糖提取工艺的研究

## The Extraction Technique of the Cell Wall Polysaccharides from Beer Yeast

刘焯新

Liu Langxin

(重庆大学生物工程研究中心, 重庆, 630044)

陈宗道

Cheng Zongdao

(西南农业大学食品学院)

王光慈

Wang Guangci

田野

Tian Ye

(重庆啤酒厂技术科)

V. 792.05

A

**摘要** 提出了一个从啤酒厂主要副产物——废酵母泥中制备胞壁多糖的新工艺。该工艺主要包括自溶、机械破碎、碱溶、中和、沉淀等工序, 碱溶工序的最佳工艺条件为: 按5:1 (碱液体积 mL: 酵母胞壁湿重 g) 比例加入2%的KOH溶液, 煮沸浸提1.5 h。在实验室规模下, 在各工艺参数优化时, 胞壁多糖得率为10%, 相对纯度达83%。层析表明, 组成胞壁多糖的基本单位为甘露糖和葡萄糖。

**关键词** 酿造酵母; 细胞壁; 多糖; 提取工艺; 组成 / 废酵母泥

啤酒

中国图书资料分类法分类号 TS261.9

**ABSTRACT** A new preparing procedure has been suggested of the cell wall polysaccharides of yeast (CWPY) from the waste yeast paste, a by-product in the brewery. This procedure includes autolysis, mechanical crush, alkali extraction, neutrality and precipitation, etc. The best result of alkali extraction can be obtained when the wet cell wall paste, to which 2% KOH solution was added at the ratio of 5:1, was treated at 100°C for 1.5 h. Under conditions of optimum parameters in the laboratory, the extraction rate of CWPY reached as high as 10% with a relative purity of 83%. The components of CWPY were found to be mannose and glucose by means of the paper chromatography.

**KEYWORDS** brewer's yeast; cell wall; polysaccharide; abstractions; composition / waste yeast paste

### 0 引 言

啤酒生产中每天都产生大量的副产物——酵母泥, 如何将它们“变废为宝”已引起越来越

\* 收文日期 1994-01-20

越多的啤酒生产厂家的极大兴趣。通常的方法是将酵母直接添加到食品中,或者从中提取蛋白质、核酸、谷胱甘肽等物质,而对利用其细胞壁多糖的研究甚少。酵母细胞壁的主要成分是葡聚糖(glucan)和甘露聚糖(mannan),它们在人的消化道中难以被消化,可作为膳食纤维发挥作用,并具有增强细胞免疫力,提高巨噬细胞活性及治癌等功效<sup>[1]</sup>。1973年加拿大学者 J. F. T. Spencer<sup>[2]</sup>曾报道了其提取条件,1991年我国学者周义发<sup>[3]</sup>对废酵母甘露聚糖的结构进行了探讨,但还未有人从食品开发的角度,对废酵母泥的胞壁多糖粗品(以下简称胞壁多糖)提取工艺进行较为详尽的研究。本文从副产物综合利用出发,以啤酒厂废酵母泥为原料,旨在选择一条适宜的工艺路线,寻求最佳工艺条件,制备胞壁多糖,并对其性质作初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

废酵母泥、氢氧化钾、醋酸、盐酸、硫酸、乙醇、丙酮、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 酵母胞壁多糖的提取工序

1) 酵母沉淀 先将新鲜废酵母泥用双层纱布多次过滤除杂,然后漂洗多次,在8℃下冷藏沉淀过夜。

2) 机械破碎 经高速捣碎机处理,确立最佳破碎时间。

3) 自溶 按文献[4]的方法自溶,然后离心,分别收集上清液和沉淀物。上清液浓缩,成为酵母浸膏,沉淀物供下面实验用。

4) 碱溶 确定碱浓度、温度、时间等条件,选择最佳工艺。

5) 中和 碱溶后置室温放冷,选择一种酸中和至 pH6~7,静置过夜,离心,收集上清液。

6) 沉淀 以95%乙醇作沉淀剂,选择最佳沉淀条件。

多糖得率  $\zeta$  可按式计算

$$\zeta = \frac{m_1}{m_2(1-W_{H_2O})} \times 100\%$$

式中  $m_1$ ——粗多糖质量 g;  
 $m_2$ ——湿酵母泥质量 g;  
 $W_{H_2O}$ ——湿酵母泥中水的质量分数, %

#### 1.2.2 胞壁多糖的组分分析过程

1) 胞壁多糖的精制 采用 sevag 法<sup>[5]</sup>。

2) 精制多糖的水解 称取50 mg 精制多糖于安瓿瓶中,加2 mL 浓度为1 mol/kg 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 封管,置100℃烘箱中水解2 h。将水解物转入烧杯中,加入 Ba(OH)<sub>2</sub> 的饱和溶液调 pH 至7后过滤,滤液置70℃水浴中浓缩,供层析用<sup>[5]</sup>。

3) 纸层析<sup>[5]</sup> 将制备好的样品吸4  $\mu$ L 点在2号新华层析纸上,同时分别取0.5%的标准葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖4  $\mu$ L 点在纸上作对照。用正丁醇、冰醋酸和水按体积比为4:1

15组成的溶液浸润,使点液上行展开,室温15℃,经16h后取出自然风干。喷显色剂(100 mL水中加1.66 g邻苯二甲酸,1 mL苯胺,再以正丁醇饱和即可),显色后,于105℃加热10分钟后观察。

### 1.2.3 测定多糖含量 硫酸—苯酚法<sup>[6]</sup>

其相对纯度按下式计算:

$$p = \frac{\text{测得的多糖总量}}{\text{粗多糖}} \times 100\%$$

\* 由于此法测得的是多糖总含量,除胞壁多糖外,还包括一些胞内多糖,故定义为相对纯度。

## 2 结果与分析

### 2.1 胞壁多糖的提取

#### 2.1.1 提取工艺路线选择

工艺1: 酵母沉淀→碱溶→中和→沉淀→洗涤→烘干;

工艺2: 酵母沉淀→自溶→碱溶→以下同工艺1;

工艺3: 酵母沉淀→机械破碎→自溶→碱溶→以下同工艺1;

工艺4: 酵母沉淀→自溶→机械破碎→碱溶→以下同工艺1。

表1 工艺路线的选择

工艺路线	T/d	ε/(%)	p/(%)
工艺1	2.5~3	17.52	71.88
工艺2	3~3.5	9.43	77.72
工艺3	3~3.5	10.77	79.23
工艺4	3~3.5	10.35	83.24

注: 1 均采用2%的KOH热溶,20%的醋酸中和,2倍95%的乙醇沉淀,机械破碎时间4分钟。

2 计算得率时,沉淀酵母泥含水量按87%计。

3 T—生产周期

由表1可见,采用工艺4,得率和纯度都较高,而且还可得到另一副产物——酵母浸膏(yeast extract),它是一种天然调味料和营养添加剂<sup>[4]</sup>,所以工艺4最为理想。这可能是因为酵母的自溶属于内自溶型(endotype autolysis),产生细胞内部结构的水解,细胞壁成分很少水解,最后剩下细胞外壳<sup>[7]</sup>,经机械破碎后增大了与碱液接触的机会,有利于多糖碱溶。

#### 2.1.2 破碎时间t的选择

表 2 破碎时间  $t$  的选择

$t/\text{min}$	0	2	4	6
$\zeta$	9.23	10.76	10.31	10.46
$p$	77.05	79.45	83.15	80.05

取少许酵母细胞菌悬液,经美兰染色后,在显微镜下观察,发现机械破碎后有的细胞的细胞壁破裂,即表面积增大,因而增大了酵母与碱液的接触面积,胞壁多糖的得率和纯度提高,但若破碎时间过长,既增加了能耗,对纯度也不利,破碎处理时间以4分钟最好。

### 2.1.3 碱溶工序的工艺参数选择

将破碎后的酵母细胞壁,按1:5(胞壁质量 g:不同浓度 KOH 溶液体积 mL)在一定温度下处理一定时间,结果见表3。

表 3 碱溶最适条件选择 %

条 件	$\zeta$	$p$	备 注
$W_{\text{KOH}}/(\%)$	1	4.77	61.30
	1.5	7.85	66.33
	2	10.46	83.00
	2.5	10.61	83.38
$t/^\circ\text{C}$	25	2.74	38.72
	60	6.15	56.52
	80	8.38	67.10
	100	10.43	82.70
$\tau/\text{h}$	1	8.46	65.23
	1.5	10.31	83.09
	2	10.61	82.86
	2.5	9.38	81.50

表中  $W_{\text{KOH}}$ —KOH 的质量分数;  $t$ —温度;  $\tau$ —时间

碱溶是提取工艺中关键的工序,碱液浓度、温度、时间对产品的得率及纯度至关重要,尤其温度影响很大,煮沸比常温,得率提高近3倍,煮沸时间越长,越有利于多糖的溶解,但时间过长,多糖会发生降解,而且杂质增多,所以,选择2%KOH煮沸1.5h最好,这比加拿大学者 J. F. T spencer<sup>[2]</sup>等人采用的工艺缩短了半小时,这可能是因为本研究将自溶与机械破碎结合在一起,更加有利于多糖的碱溶提取。

### 2.1.4 中和用酸的种类选择

碱煮后,分别用盐酸、硫酸、醋酸(浓度均为20%)中和至 pH6~7.这是因为酸或碱都可能引起多糖降解或发生结构的变化,要尽量避免过酸或过碱的环境,所以,碱浸提结束后要即时用酸中和;而且中和还可进一步去除胶状物等杂质,盐酸、硫酸较之醋酸,酸性更强,更易使多糖发生酸水解;而且,醋酸与 KOH 反应生成的醋酸钾比 KCl、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在乙醇中溶解度大,因而用乙醇沉淀得到的多糖中杂质盐含量少,产品纯度更高,选择醋酸为中和用酸。

表4 中和用酸的选择 %

酸种类	离心难度	上清液	$\zeta$	$\rho$
20%盐酸	+	深褐色,较浑浊	10.00	68.35
20%硫酸	+	深褐色,浑浊	9.38	70.30
20%醋酸	++	浅褐色,澄清	10.46	82.84

注：+，较难；++，较易

### 2.1.5 沉淀工序工艺参数的选择

溶液中的胞壁多糖可用乙醇沉淀出来。实验发现，与将乙醇倒入溶液的传统方法相比，采用将溶液倒入乙醇中的方法，可大大提高沉降速率，减少乙醇用量，而且沉淀出的胞壁多糖呈絮状，易分离。沉淀最佳条件选择见表5。

表5 乙醇沉淀胞壁多糖最适条件选择 %

条 件	离 心 度	$\zeta$	$\rho$	备 注
1	+	7.01	78.73	
k	1.5	++	8.21	20℃静置
	2	+++	10.42	12 h
L/℃	2.5	+++	11.28	
	5	++	10.77	2倍乙醇静置
	20	++	10.13	
$\tau$ /h	35	++	9.10	12 h
	8	+	8.92	
	12	++	10.00	2倍乙醇
	18	++	10.46	室温
	24	+++	10.92	80.81

注：+，难；++，较难；+++，易

L,  $\tau$  分别为沉淀温度和时间；

k 为加入的乙醇与被沉淀液的体积比

可见，乙醇用量越大，沉降时间越久，则胞壁多糖沉淀越彻底，得率增加，但杂质也相应增加，纯度下降。故选择加入2倍体积的乙醇，沉淀12h为宜。温度升高，不利于沉降，但低温和室温(20℃)相比，沉淀效果相差不明显，从节约能源的角度出发，建议采用室温。

沉淀经50℃热丙酮、乙醇梯度洗脱后，在60~70℃烘8~10h即得胞壁多糖。

### 2.1.6 成本预算

生产酵母胞壁多糖的主要原辅料有：废酵母泥、氢氧化钾、醋酸、酒精、丙酮等，沉淀用的酒精可回收，经试验，回收率达84%，按最佳工艺路线操作，多糖得率为10%，综合各因素，每提取1 kg 胞壁多糖略需46元。

## 2.2 胞壁多糖的一般性质

### 2.2.1 成分分析

经分析,按本工艺制备得到的胞壁多糖,其多糖总含量为83.5%,蛋白质7.1%,水分7.6%。将其配成100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的溶液,在200~400 nm的紫外光下扫描,未发现核酸的特征吸收峰(260 nm)。

### 2.2.2 胞壁多糖的糖组分确定

纸层析结果见图1,表明:酵母胞壁多糖的单糖组成有葡萄糖和甘露糖。

### 2.2.3 理化性质

酵母胞壁多糖为肉色粉末,加热至70 $^{\circ}\text{C}$ 以上易褐变;易溶于热水,微溶于低浓度的乙醇,不溶于高浓度乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶液中,暴露在空气中易吸潮,其水溶液呈粘稠状,pH中性,在浓硫酸存在下与 $\alpha$ -萘酚作用,于界面处呈紫色环,与苯酚-浓硫酸反应后,呈橙黄色,其特征吸收波长为490 nm,水解前与斐林试剂呈阴性反应,水解后与斐林试剂呈阳性反应,产生棕红色氧化亚铜沉淀。

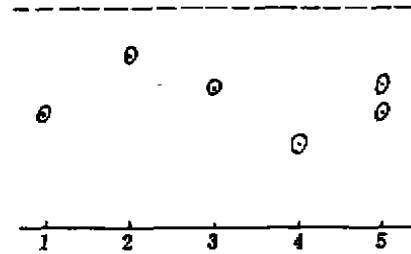


图1 胞壁多糖水解物纸层析结果图

1. 葡萄糖标样 2. 阿拉伯糖标样 3. 甘露糖标样 4. 半乳糖标样 5. 试样样品

## 3 结 论

1) 我国是一个啤酒生产大国,废酵母泥是啤酒生产中的重要副产物,若按本研究提出的工艺可得到胞壁多糖和酵母浸膏两种产物,既创造了经济效益,又改善了环境污染,为啤酒废酵母的综合利用开辟了一条新途径。

2) 啤酒酵母有典型的细胞结构,其细胞壁重量为细胞干重的25%~30%,主要成分是 $\beta$ -葡聚糖和 $\alpha$ -甘露聚糖,约占60%~80%,葡聚糖位于细胞壁内层,甘露聚糖位于细胞壁外层并与某些蛋白质相结合,当用热碱萃取时,甘露聚糖-蛋白质复合物(mannan-protein complex)以及部分葡聚糖溶于热碱,这是提取胞壁多糖的基本依据。然后,根据它们较易溶于水而不溶于酒精、丙酮等,可以将之分离。

3) 提取胞壁多糖的工艺流程为:酵母沉淀 $\rightarrow$ 自溶 $\rightarrow$ 机械破碎 $\rightarrow$ 碱溶 $\rightarrow$ 中和 $\rightarrow$ 沉淀 $\rightarrow$ 分离 $\rightarrow$ 烘干。将酵母自溶与机械破碎相结合,可缩短碱溶时间,提高产品得率和纯度。在最佳提取条件下,胞壁多糖得率为10%,纯度达83%。

## 参 考 文 献

- 1 刘颖. 酵母的营养价值及其应用. 粮油食品科技, 1990, (4), 34~35
- 2 Spencer J F T, Gorin P A J. Mannose-Containing Polysaccharides of Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 1973, 15(1): 1~2
- 3 周义发. 酵母甘露聚糖的结构确定与核磁共振谱的解析. *生物化学杂志*, 1991, 7(1): 74~78
- 4 沈国惠. 啤酒酵母自溶条件的优化及其抽提物的挥发性风味成分. *食品与发酵工业*, 1991, (3): 8~10
- 5 石勇民, 苏凤岩. 猴头多糖的初步提取及分析. *微生物学杂志*, 1989, 9(2): 47~48
- 6 袁晓华. 植物生理生化实验. 北京, 高等教育出版社, 1983. 9~11
- 7 宁正祥. 酵母的自溶作用. *食品科学*, 1991, (12): 16~18