

微波辅助碱—酶法提取酵母 β -1,3-葡聚糖工艺优化

Optimization on beta-1,3-glucan from yeast by microwave-alkali-enzymatic extraction

杨锡洪^{1,2} 高学丽² 解万翠^{2,3} 李子琪³

YANG Xi-hong^{1,2} GAO Xue-li² XIE Wan-cui^{2,3} LI Zi-qi³

(1. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 3. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042)

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, China; 2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 3. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, China)

摘要:为建立酵母 β -1,3-葡聚糖高效、快速的提取方法,以细胞壁为原料,在传统碱—酶法基础上,辅助微波加热,采用响应面法优化提取工艺,通过二次回归模型分析得出最佳工艺为:微波功率 420 W,加热时间 5 min,酶添加量 2 550 U/g。该条件下 β -1,3-葡聚糖总糖含量预测值为 87.44%,验证值为 87.94%。

关键词:酵母; β -1,3-葡聚糖;微波辅助;碱—酶法

Abstract: For finding a rapid and environmental friendly way to extract zymosan (beta-1,3-glucan), a method was established by microwave-assisted heating at low alkaline concentration, which was using the cell wall as a raw material and based on traditional enzyme alkaline. Extraction process was optimized by using response surface method, the optimum process conditions for quadratic regression model analysis were as followed: microwave power 420 W, heating time 5 min; the quantity of enzyme 2 550 U/g. Under this condition, the total sugar value could reach 87.44%, and the verification results was 87.94%.

Keywords: yeast; beta-1,3-glucan; microwave assisted; alkaline enzyme method

酵母细胞壁是酵母抽提物生产中的重要副产物,约占酵母细胞干重的 25%~30%,主要由 3 层构成,由内向外依次为葡聚糖(glucan)、蛋白质、甘露聚糖^[1]。葡聚糖是主链为

β -1,3-键(故称为 β -1,3-葡聚糖,简称葡聚糖),及少量 β -1,6-键侧链的高聚物,特有的三股螺旋结构使其可促进体内抗体产生,具有活化巨噬细胞、嗜中性白血球功能^[2],还可增强宿主抵抗细菌、病毒、真菌及寄生虫的感染,加强机体抗辐射能力,并促进伤口愈合,是一种重要的生物效应应答剂(biological response modifiers, BRM)^[3-4]。葡聚糖对重金属与毒素也具有一定的吸附作用^[5-6],被广泛应用于水产养殖和饲料工业,开发酵母葡聚糖具有重要的应用前景。

酵母 β -1,3-D-葡聚糖的提取方法主要有酸法、碱法、酸碱结合法,这些方法提取条件较剧烈,且强酸强碱易腐蚀设备、污染环境。后期发展的酶碱法先采用碱液提取葡聚糖,再用酶法降解蛋白质,提高了总糖含量,但提取时间长、操作工艺复杂。目前,微波辅助提取法已应用于车前草多糖、紫苏叶多糖的提取^[7-8],但在葡聚糖提取方面未见文献报道,如果能在碱—酶法的基础上,改变碱处理时的加热方式,用微波加热代替水浴保温,可在短时间内迅速升温,既缩短时间,又可在降低碱液浓度条件下保证较高的葡聚糖提取率。

本研究拟探讨在碱—酶法的基础上复合微波加热,以快速加热、强电磁波作用提高碱液游离蛋白质的能力,提高提取率,缩短提取时间,由此建立酵母 β -1,3-D-葡聚糖的提取新方法,为开发利用酵母细胞壁提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母细胞壁:食品级,广东雅琪生物科技有限公司;
D-葡萄糖:标准品,纯度 $\geq 98\%$,上海源叶科技有限公司;
木瓜蛋白酶:食品级,酶活 10 万 U/g,广西庞博有限

基金项目:湛江市科技计划项目资助(编号:2013A05006);2015 年国家大学生创新创业训练计划项目(编号:201510426027)
作者简介:杨锡洪,男,青岛科技大学教授,博士。
通讯作者:解万翠(1969—),女,青岛科技大学教授,博士。
E-mail: xiewancui@163.com
收稿日期:2015-12-02

公司；

氢氧化钠、冰醋酸等：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

微波炉：G70F20CN1L-DG(W0) 型，广东格兰仕微波炉电器制造有限公司；

紫外分光光度计：UV-1801 型，北京北分瑞丽分析仪器有限公司；

真空冷冻干燥机：LGJ-10 型，北京四环科学仪器厂；

离心机：TGL-16C 型，上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 β -1,3-葡聚糖的提取 称取酵母细胞壁，以 1.5% NaOH 为提取液，微波加热提取一定时间。将提取液以 3 500 r/min 离心 15 min，取沉淀，用木瓜蛋白酶酶解。酶解液再以 3 500 r/min 离心 15 min，取沉淀，用无水乙醇和水各洗涤一次，经冷冻干燥得酵母 β -1,3-D-葡聚糖粗品^[9]。

表 1 因素水平制表

Table 1 Table for investigated factors and their levels

水平	A 加热时间/min	B 微波功率/W	C NaOH 浓度/%	D 酶添加量/(U·g ⁻¹)	E 酶解时间/h	F 酶解 pH	G 酶解温度/℃
1	4	280	1.5	1 000	2	5.5	45
2	6	420	3.0	2 000	4	6.5	55

1.3.4 响应面优化提取工艺 在确定显著影响因素基础上，借助 Design-Expert 8.0 软件，运用 Box-Behnken 试验设计原理，以总糖含量为响应值，通过响应面优化提取条件。

1.3.5 数据处理 所有试验重复 3 次，采用 Excel 2003 进行数据统计和处理，采用正交设计助手 II 3.1 及 Design Expert 8.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果与分析

L₈(2⁷) 试验方案及结果分析见表 2。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of Plackett-Burman

试验号	A	B	C	D	E	F	G	总糖含量/%
1	1	1	1	1	1	1	1	77.16
2	1	1	1	2	2	2	2	86.24
3	1	2	2	1	1	2	2	79.85
4	1	2	2	2	2	1	1	89.97
5	2	1	2	1	2	1	2	72.11
6	2	1	2	2	1	2	1	65.92
7	2	2	1	1	2	2	1	76.54
8	2	2	1	2	1	1	2	85.21
k ₁	83.305	75.358	81.287	76.415	77.035	81.112	77.398	
k ₂	74.945	82.892	76.963	81.835	81.215	77.138	80.852	
R	8.360	7.534	4.324	5.420	4.180	3.974	3.454	

1.3.2 标准曲线绘制及样品测定

(1) 标准曲线绘制：配制 40 μ g/mL 葡萄糖标准溶液，准确移取 0.0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mL 于 10 mL 比色管中，各管补水至 2 mL，加入 6% 苯酚 1 mL，冷水浴中迅速加入浓硫酸 5 mL，放置 5 min，摇匀，沸水浴中加热 15 min，再置于冷水浴中 15 min，室温 490 nm 测吸光度，绘制标准曲线。

(2) 样品测定：准确称取 25 mg 样品，加 12 mol/L 硫酸溶液 25 mL，混匀，室温静置 25 min，加水使硫酸最终浓度为 2 mol/L，真空封管。于 100 $^{\circ}$ C 水解 6 h，冷却至室温，调节 pH 至 7.0，10 000 $\times$ g 离心 15 min，上清液即单糖水解液^[10]。

取稀释的水解液 1 mL(相当于 45 μ g 左右葡萄糖)，按照苯酚硫酸法测定吸光度值，以标准曲线计算多糖含量^[11]。

1.3.3 正交试验设计 综合分析影响葡聚糖提取率的可能因素，在前期预试验基础上，采用 7 因素 2 水平正交试验进行显著因素筛选。因素水平设计见表 1。

由表 2 可知，对总糖含量影响显著性为：加热时间>微波功率>酶添添加量>NaOH 浓度>酶解时间>酶解 pH>酶解温度。本结论与张红丽等^[8]在固定样品处理量前提下，微波功率与加热时间是最主要影响因素相一致。选择前 3 个为研究对象，碱浓度为非主要影响因素，为了降低对环境的污染，采用低浓度(1.5%)，酶解温度 55 $^{\circ}$ C，酶解时间 4 h，pH 5.5，以总糖含量为响应值，做响应面优化。

2.2 响应面优化提取工艺

2.2.1 回归方程的建立与方差分析 基于前期单因素预试验及正交试验结果设定试验因素与水平见表 3，试验设计及结果见表 4。

通过 Design-Expert 8.0 软件进行多元回归拟合分析，方差分析结果见表 5，得到的回归方程为式(1)：

$$Y = 87.28 - 1.76A - 1.65B - 0.41C - 5.13AB - 2.30AC - 1.14BC - 6.34A^2 - 4.93B^2 - 1.30C^2 \quad (1)$$

由表 5 可知，回归模型差异极显著(P<0.000 1)，方程中的 A、B、AB、AC、A²、B²影响极显著，BC、C²影响显著，并且该

表 3 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 3 Factors and levels in Box-Behnken experimental design

水平	A 微波功率/W	B 微波时间/min	C 酶添加量/(U·g ⁻¹)
1	280	4	2 000
0	420	5	2 500
-1	560	6	3 000

表 4 Box-Benhknen 试验设计及结果

Table 4 Box-Benhknen experimental design and corpeonding experimental results

序号	A	B	C	总糖含量/%
1	0	−1	−1	81.53
2	−1	0	1	82.91
3	0	0	0	87.60
4	0	0	0	87.19
5	−1	−1	0	75.08
6	1	0	−1	80.98
7	0	0	0	87.06
8	−1	1	0	81.20
9	1	−1	0	81.10
10	0	1	−1	81.36
11	0	−1	1	83.03
12	−1	0	−1	79.16
13	0	1	1	78.30
14	1	1	0	66.69
15	1	0	1	75.51

模型的 $R^2=0.993\ 4$,失拟项不显著,说明此模型与实际拟合程度好,可用于回归模型分析和预测酵母多糖的提取结果^[12]。

2.2.2 响应面及等高线分析 采用 Design Expert 8.0 软件

表 5 总糖含量回归模型方差分析[†]

Table 5 Variance analysis of regression equation for the total sugar content

来源	平方和	自由度	均方	F 比率	P 值>F	显著性
模型	402.16	9	44.68	84.09	<0.000 1	* *
A	24.75	1	24.75	46.57	0.001 0	* *
B	21.75	1	21.75	40.92	0.001 4	* *
C	1.34	1	1.34	2.53	0.172 5	
AB	105.37	1	105.37	198.28	<0.000 1	* *
AC	21.25	1	21.25	39.99	0.001 5	* *
BC	5.20	1	5.20	9.78	0.026 0	*
A ²	148.43	1	148.43	279.32	<0.000 1	* *
B ²	89.57	1	89.57	168.56	<0.000 1	* *
C ²	6.27	1	6.27	11.79	0.018 5	*
残差	2.66	5	0.53			
失拟合	2.50	3	0.83	10.48	0.088 3	
纯误差	0.16	2	0.079			
总误差	404.82	14				

[†] “*”表示差异显著(0.01<P<0.05);“* *”表示差异极显著(P<0.01); $R^2=0.993\ 4,R^2_{adj}=0.981\ 6$ 。

建立的响应面及等高线见图 1~3,等高线形状可反应出两因素交互作用强弱,圆状表示交互作用不显著,椭圆状表示交互作用显著。

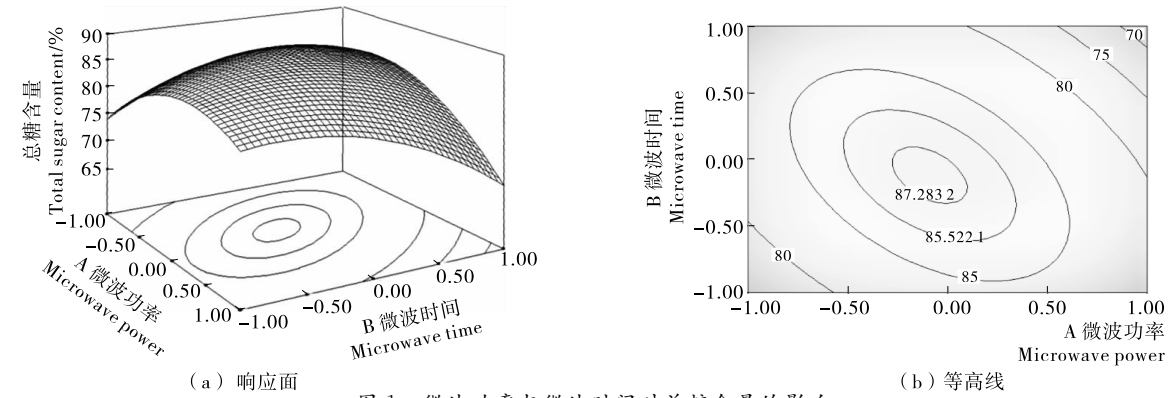


图 1 微波功率与微波时间对总糖含量的影响

Figure 1 Microwave power and microwave time effect on the total sugar content

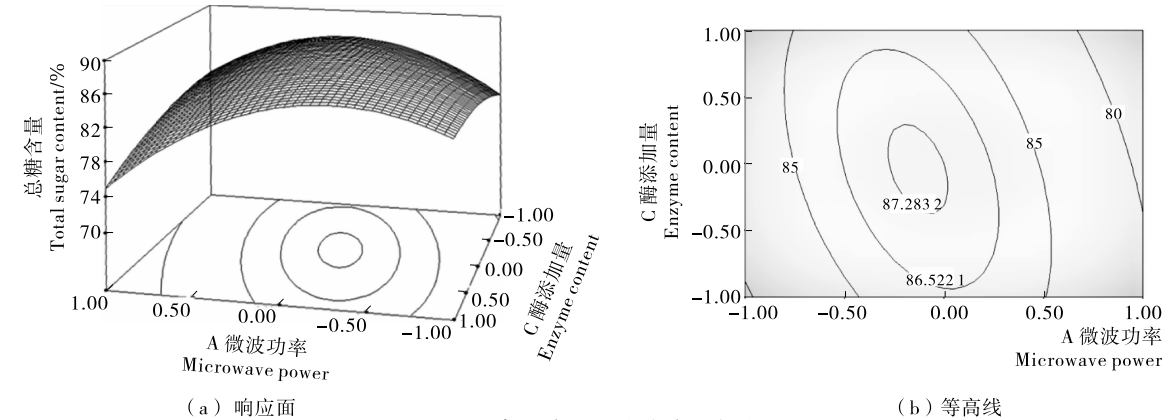


图 2 微波功率与酶添加量对总糖含量的影响

Figure 2 Microwave power and the influence of the adding amount of total sugar content

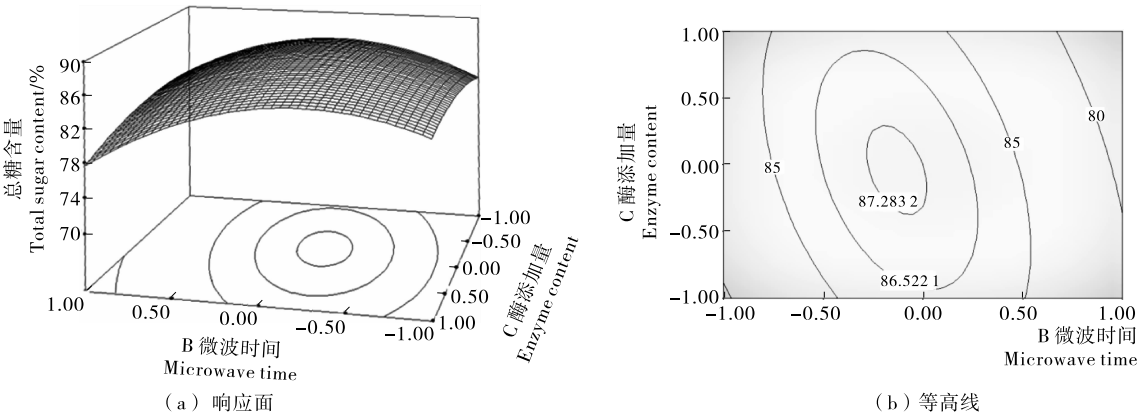


图 3 微波时间与酶添加量对总糖含量影响

Figure 3 Microwave time and adding amount of influence on the total sugar content

经响应面模型软件分析,确定最佳提取工艺:微波功率 408.80 W,加热时间 4.84 min,酶添加量 2 545.00 U/g。基于工业实际,选取微波功率 420 W,加热时间 5 min,酶添加量 2 550 U/g。3 次验证实验得总糖含量平均值为 87.94%,与预测值 87.44%接近。蔺红苹等^[13]比较了碱法、酸碱法以及酶—碱法 3 种提取酵母葡聚糖的方法,结果表明酶—碱法提取效果最好,多糖含量可达 73.67%。采用响应面法优化的提取率和总糖含量皆优于目前的方法,优化确立的最佳参数可靠,具有实用价值。

3 结论

本试验在碱—酶法的基础上改用微波加热,增强了碱处理中蛋白质从细胞壁中游离的效果,使蛋白质释放更彻底。后续酶法降解蛋白质,可以有效去除蛋白质,提高总糖纯度。经过对影响总糖含量的多因素进行显著性筛选,确定主要因素,再采用响应面法优化确定最佳工艺为微波功率 420 W,加热时间 5 min,酶添加量 2 550 U/g,在此条件下,β-1,3-葡聚糖的提取率为 28.01%,总糖含量为 87.94%,蛋白质含量为 3.78%,产品为乳白色粉末。该方法的提取率好、总糖纯度高,若能进一步探讨不同来源的 β-葡聚糖的功能及性质^[14],将进一步促进其产业的快速发展。

参考文献

[1] 杨晓红,王元秀. 酵母多糖的制备研究[D]. 山东: 济南大学, 2013: 2-44.

[2] 钟超,吴晖,余元善,等. 气相色谱法测定啤酒酵母 β-葡聚糖含量[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 330-333.

[3] Da Silva Araujo, Vilma Barbosa, Ferreira de Melo, et al. Followed extraction of beta-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (Saccharomyces uvarum) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2014, 23: 164-170.

[4] Valasques Junior, Gildomar L, De Lima, et al. Extraction opti-

mization and antinociceptive activity of (1→3)-beta-D-glucan from Rhodotorula mucilaginosa[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 293-299.

[5] 张丽霞. 啤酒酵母 β-D-葡聚糖及其衍生物吸附玉米赤霉烯酮(ZEA)的研究[D]. 江苏: 江南大学, 2006: 4-9.

[6] 朱红梅. 酵母细胞壁在水产养殖中的应用研究进展[J]. 水产养殖, 2013, 34(10): 26-29.

[7] 郭婕,胡春红,袁淑培,等. 车前草多糖微波提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 223-230.

[8] 张红丽,谢三都,沈萃. 微波技术辅助紫苏叶多糖提取工艺优化[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 305-309.

[9] 冯文娟,徐泽平,周传兵,等. 酵母 β-1,3-D-葡聚糖提取及结构鉴定[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 151-153.

[10] 祁业明,杜丽平,肖冬光,等. 酵母不溶性葡聚糖测定方法的研究[J]. 酿酒科技, 2007(9): 92-97.

[11] 杨建梅,李红,杜金华. 啤酒废酵母超声破壁提取食源性 β-1,3-D-葡聚糖[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(3): 149-153.

[12] Yin Xiu-lian, You Qing-hong, Jiang Zhong-hai. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from Tricholoma matsutake by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86: 1 358-1 364.

[13] 蔺红苹,陈春红,杨淞. 3 种啤酒酵母细胞壁中 β-(1,3)-D 葡聚糖提取方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 9 199-9 200.

[14] 曹静,刘高强,王晓玲,等. 可食真菌 β-葡聚糖的生物功能及检测技术[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 247-250.