

废啤酒酵母制取酵母抽提物的酶促工艺研究

Study on the preparation of beer yeast extract from its waste residue

吴满刚¹ 雷姝敏¹ 卞君杰¹ 费立天¹

WU Man-gang¹ LEI Shu-min¹ BIAN Jun-jie¹ FEI Li-tian¹

于海¹ 葛庆丰¹ 姜虹¹ 周平凡²

YU Hai¹ GE Qing-feng¹ JIANG Hong¹ ZHOU Ping-fan²

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 常州市菜根香生态农业有限公司, 江苏 常州 213000)

(1. College of Food Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China;

2. Changzhou Caigen Ecological Agriculture Co., Ltd., Changzhou, Jiangsu 213000, China)

摘要:为了获得废啤酒酵母制取酵母抽提物的最佳工艺条件,通过单因素试验获得外加酶法制取酵母抽提物的最佳工艺条件,并比较其与传统工艺条件的效果;使用 GC—MS 对最终产物进行风味分析。通过优化得到最佳工艺条件为添加中性蛋白酶,外加酶 0.20%, pH 6.0, 酶促溶时间 36 h, 得到的该抽提物中含有多种酸类、酯类和醇类等物质。研究表明,外加中性蛋白酶法是开发利用啤酒废酵母制备酵母提取物的较好方法,得到的产物营养丰富。

关键词:啤酒;酵母;抽提物;蛋白酶;酶解;风味

Abstract: In order to acquire optimum conditions of preparation of yeast extract from its waste residue, single factor experiments were conducted to a good condition of adding external enzymes, and also it was compare with the traditional process. And then the GC—MS was used to analyze the flavor of the yeast extract for determining the best stratagem. Through optimization, the best optimum condition is that it adding 0.20% neutral protease and reacting for 36 h at pH 6.0. The final extract contained a variety of acids, esters, alcohols and other substances. The neutral protease method is shown a better way to acquire yeast extract. Moreover, the products obtained were with rich nutriment.

Keywords: beer; yeasts; extract; protease; enzymatic hydrolysis; flavor

废啤酒酵母泥在本质上就是啤酒酵母,是在啤酒生产过程中经主发酵和后发酵酿造工艺后产生的^[1]。酵母泥中富

含蛋白质、维生素和微量元素等营养物质,具有很高的经济价值^[2]。中国是世界啤酒生产大国,每年生产约 50 万 t 啤酒废酵母,除很少部分被用作饲料外,大部分被排放,并未得到合理利用^[3]。目前,中国对制取酵母抽提物工艺的研究主要有自溶法^[3]、扩培法^[4]、复合促溶法^[5]和外加酶解法^[6-7]等。由于外加酶法可以提高营养物质的获得率,缩短提取时间,已经成为研究热点^[8]。

随着生物酶技术的快速发展,啤酒废酵母的加工利用向着精深加工方向发展。提高产品的科技含量,进行产品开发及各类直接或间接生物产品转化,注重产品的高附加值是目前研究的重点。本试验采用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶这 3 种成本较低,应用广泛,大生产发展较优^[8-10]的单种酶进行对比研究,对酵母抽提物酶促工艺条件进行优化,以期通过控制多种指标得到高得率、高呈味核苷酸含量的酵母抽提物产品。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

木瓜蛋白酶(8.0×10^4 U/g)、胰蛋白酶(1.1×10^5 U/g)、中性蛋白酶(3.5×10^4 U/g)、酪素:生化纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醛、氢氧化钠(片状)、碳酸钠、氯化钠、三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、酚酞、乙醇、福林酚试剂等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外分光光度计:J-26XPI 型,尤尼科(上海)仪器有限公司;

高压均质机:Ultra-turrax 型,上海智光仪器仪表有限公司;

基金项目:常州市科技支撑计划(农业)项目(编号:CE20142020);扬州大学中青年学术带头人资助

作者简介:吴满刚(1977—),男,扬州大学副教授,博士。

E-mail: mgwu@yzu.edu.cn

收稿日期:2016—03—26

恒温水浴锅:HH 型,北京长安科学仪器厂;
冷冻离心机:Sorvall ST 16R 型,赛默飞世尔科技公司;
酸度计:S20K 型,梅特勒—托利多仪器有限公司;
鼓风干燥箱:ZXRD-7230 型,上海智城分析仪器制造有
限公司;
旋转蒸发器:SY200 型,上海亚荣生化仪器厂;
气质联用仪:DSQ II 型,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

废啤酒酵母→脱苦→调配(蒸馏水:酵母泥质量比为
9:1)→高压均质(45 MPa 处理 2 次)→酶解(50 ℃,恒温自
溶 36 h)→灭酶(90 ℃,10 min)→冷却(至室温)→离心(常
温,3 000×g,10 min)→上清液→减压浓缩(55 ℃)→酱状酵
母抽提物

1.2.2 废啤酒酵母脱苦 取啤酒废酵母离心(5 000×g,
10 min)去上清液,2 倍体积 0.5% NaHCO₃ 振荡 30 min,100
目筛子筛分,2 倍体积蒸馏水和 0.5% NaHCO₃ 分别洗涤,最
终采用 2 倍体积蒸馏水离心洗涤 2 次^[11]。

1.2.3 酶促工艺条件的优化 文献[12~13]和[14]⁴⁰都指
出,酶促溶的最适温度均在 50 ℃左右,因此本试验确定酶促
温度为 50 ℃。

(1) 酶添加量对酶促溶影响:取 10 g/100 g 的酵母悬浊
液 80 mL,温度控制为 50 ℃,酶促溶时间 30 h,pH 6.0,以氨
基酸态氮得率和固形物得率为指标,考察酶添加量(0.00,
0.10,0.20,0.30,0.40,0.50 g/100 mL,酶活以 10⁴ U/g 数量
级计)对酶促溶影响。

(2) pH 对酶促溶的影响:取 10 g/100 g 的酵母悬浊液
80 mL,温度控制为 50 ℃,基于前述研究所得酶添加量,酶促
溶时间 30 h,以氨基酸态氮得率和固形物得率为指标,考察
pH(5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5)对酶促溶影响。

(3) 酶促溶时间对酶促溶的影响:取 10 g/100 g 的酵母
悬浊液 80 mL,温度控制为 50 ℃,基于前述研究所得酶添加
量、pH,以氨基酸态氮得率和固形物得率为指标,考察酶促
溶时间(12,18,24,30,36,42 h)对酶促溶影响。

1.2.4 优化工艺条件与传统工艺条件的对比 以得到的 3
种酶的优化工艺条件与传统的醇溶和盐溶工艺进行对比研
究。控制相同条件为:选取 80 mL 浓度为 10 g/100 g 的酵母
悬浊液,酵母溶液 45 MPa 均质 2 次,自溶时温度为 50 ℃。

- (1) 空白组^{[14]41}:溶液 pH 6.0,自溶时间 36 h。
(2) 醇溶组^[5]:添加 1.0 mL/100 mL 乙醇,溶液 pH 6.5,
自溶时间 48 h。
(3) 盐溶组^{[14]41-43}:添加 2.0 g/100 g 氯化钠,溶液
pH 6.0,自溶时间 36 h。

1.2.5 测定方法

- (1) 蛋白酶活力:福林法^[15]。
(2) 游离氨基氮得率:甲醇滴定法^[16]。游离氨基氮得率
按式(1)计算:

$$y_A = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%,$$

(1)

式中:
 y_A ——游离氨基氮得率,%;
 m_1 ——自溶后上清液氨基氮质量,g;
 m_2 ——自溶前酵母干重,g。
(3) 固形物得率:根据文献[17],固形物得率按式(2)
计算:

$$y_s = \frac{m_3 \times \omega_1 - m_4}{m_2} \times 100\%,$$

(2)

式中:
 y_s ——固形物得率,%;
 m_3 ——自溶后上清液总质量,g;
 ω_1 ——上清液固形物含量,%;
 m_4 ——外加物质干重,g;
 m_2 ——自溶前酵母干重,g。

(4) 挥发性成分鉴定:称取 8 g 最佳工艺条件获得的酵
母抽提物,装入 250 mL 锥形瓶中铺平,密封;50 ℃水浴平衡
20 min;然后将固相微萃取针头插入平衡后的锥形瓶中,推
动手柄探出纤维头,使纤维头吸附 40 min。

色谱柱:DB-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm,
0.25 μm);载气为 He(色谱纯);恒定流速 1.2 mL/min;进样
口温度设为 250 ℃;初始温度 40 ℃,保持 3 min,以 5 ℃/min
升至 200 ℃,再以 15 ℃/min 升至 260 ℃,保持 3 min。

离子源:电子电离源(EI);电子能量 70 eV;质谱接口温
度 280 ℃;离子源温度 230 ℃;四级杆温度 150 ℃;溶剂延迟
3 min;质谱扫描 40~600 u。

根据得到的图谱,参考文献[18]进行定性分析。

2 结果与分析

2.1 酶促工艺条件的优化

2.1.1 酶添加量对酶促溶影响 酵母的自溶过程主要是糖
类物质和蛋白质等大分子物质在酶的水解作用下不断降解
的过程。蛋白质的降解导致游离氨基氮得率和固形物得率
增加^[6]。由图 1 可知,随着酶添加量的增加,蛋白质降解速
率从迅速逐渐变缓。这是由于起初底物浓度远大于酶浓度,
增加酶量,酶与底物结合效率增加,蛋白质降解速率加快;其
后,酶浓度逐渐饱和,蛋白质降解速率趋于平稳,最终再增加
酶量已无法有效提高酶解效率^[7]。综合考虑,当木瓜蛋白酶
添加量为 0.4%,中性蛋白酶添加量为 0.2%,胰蛋白酶添加
量为 0.025%时,游离氨基氮得率和固形物得率最高,即为 3
种酶最适宜添加量。

2.1.2 pH 对酶促溶的影响 晏志云^{[14]39}在研究中发现,酵
母自溶时其 pH 变化趋势是先缓慢上升然后再逐步下降。
因而,研究中只需要在自溶开始时调节到适宜蛋白酶作用的
pH,从而保证酶的活性和酶促反应速度。酶的催化能力与
pH 紧密相关,体系中 pH 变化,酶分子的构象、与底物分子
的解离状态等也随之发生变化,从而影响酶与底物的结
合^[19]。当 pH 为酶适宜反应 pH 时,则促进酶的活性和酶促
反应速度,酶解效果较好,固形物得率和游离氨基酸得率相
对较高;反之,远离该 pH 则起抑制效果。由图 2 可知,

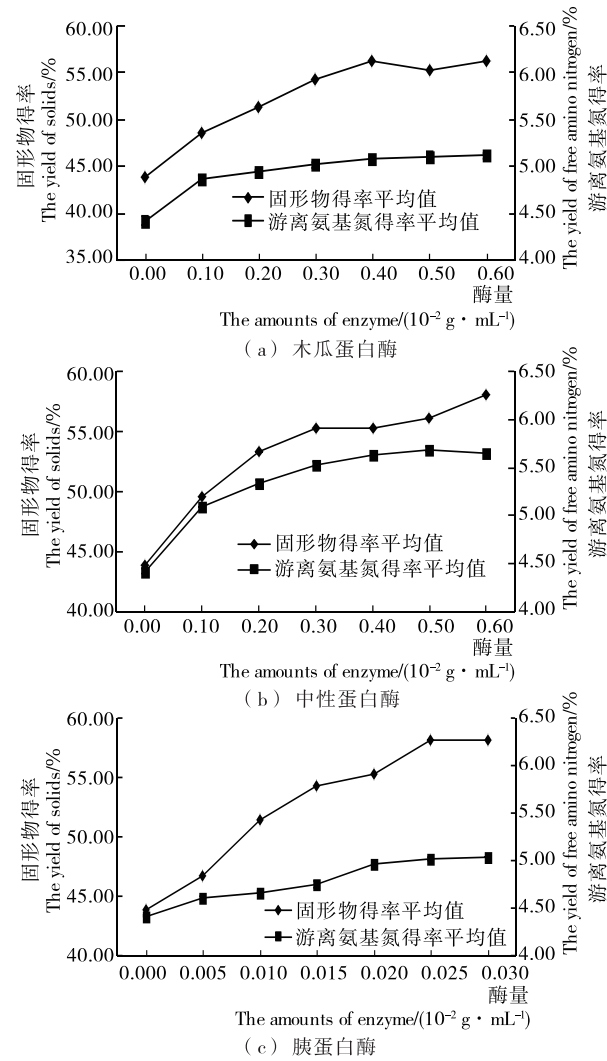


图 1 酶添加量对酶促溶的影响

Figure 1 Effects of the content of enzymes

pH 5.5,6.0,5.0 分别是木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶促溶的理想酸碱度。

2.1.3 酶促溶时间对酶促溶的影响 由图 3 可知:随着酶促溶时间的延长,酵母抽提产品得率不断增加,其风味也不断改善,而后产品得率趋于稳定,风味将变得醇厚,最终产品得率几乎不再增加。其中,木瓜蛋白酶的最佳酶促溶时间为 36 h,与蒋雪薇等^[5]的研究结果一致,而中性蛋白酶的为 36 h,胰蛋白酶的为 30 h。

综上所述,木瓜蛋白酶促溶的最佳工艺条件为:蛋白酶酶量为酵母溶液的 0.4%,pH 5.5,自溶时间 36 h,与陈军^[12]得到的结论相近;中性蛋白酶促溶的最佳工艺条件为:蛋白酶酶量为酵母溶液的 0.2%,pH 6.0,自溶时间 36 h;胰蛋白酶促溶的最佳工艺条件为:蛋白酶酶量为酵母溶液的 0.025%,pH 5.0,自溶时间 30 h。

2.2 优化工艺条件与传统工艺条件的对比

由图 4 可知,添加蛋白酶的三组游离氨基酸得率和固形物得率均高于盐溶组和空白组。其中,中性蛋白酶组的游离氨基酸得率达到 4.34%,固形物得率达到 62.02%,结果明显

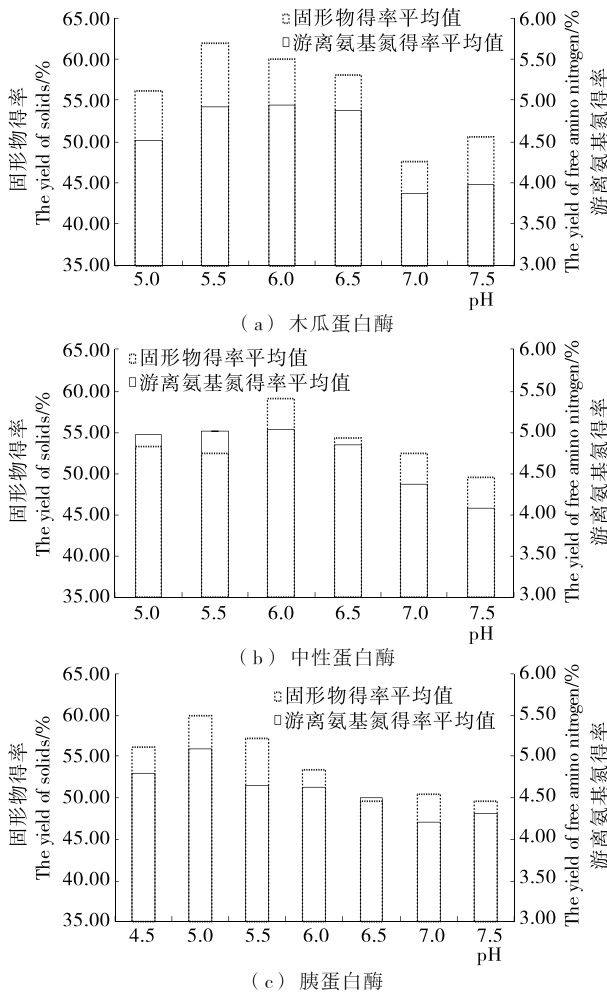


图 2 pH 对酶促溶的影响

Figure 2 Effects of the pH on autolysis on the base of enzymes

优于胰蛋白酶组与木瓜蛋白酶组。因此,最优酶促工艺条件为:采用中性蛋白酶,蛋白酶酶量 0.2%,溶液的 pH 6.0,酶促温度 50 ℃,酶促溶时间 36 h。

2.3 挥发性成分鉴定

经 GC—MS 分析鉴定,所得酵母抽提物中挥发性化合物的 GC 色谱见图 5,各种化合物相对百分比含量比较见表 1。

由表 1 可知,制得的酵母抽提物中测定出的挥发性化合物,主要有酸类(占 15.34%)、酯类(占 9.29%)、醇类(占 1.99%)、醚类(占 1.50%)和其他类(占 9.13%),是酵母抽提物的主要风味来源。

3 结论

综合比较酶解和传统工艺条件,得出当添加 0.20% 中性蛋白酶,pH 6.0,自溶 36 h,50 ℃ 下促溶效果最佳。同时,得到的酵母抽提物富含多种风味物质。试验中木瓜蛋白酶研究部分与前人^[12]相似,同时在前人基础上比较了更适用于大生产的工艺条件的优劣,为酶促提取酵母抽提物的大生产化作了一定理论补充。但并未在提高产品附加值方面进行更深入的研究,后续需着眼于附加值研究进行进一步探讨。

表 1 鉴定结果[†]

Tsble 1 Results of identification

保留时间/min	峰面积/%	中文名
15.16	11.89	乙酸
27.53	1.18	蝶呤-6-羧酸
36.04	2.27	2-己基环丙烷乙酸
4.33	0.61	氨基甲酸,甲酯
21.07	0.58	γ -亚麻酸苯甲酯
23.12	0.58	12,15-十八碳三烯酸,甲酯
25.37	1.32	亚麻酸单甘油酯
29.25	6.20	辛酸乙酯
1.23	1.14	甘氨酸
1.84	3.67	醋酸锰二水合物
29.18	4.32	维生素 D ₃
21.20	0.87	守醇
26.18	1.12	4-苄氧基-6-羟甲基-四氢吡喃-2,3,5-三醇
21.15	0.73	3-环己烯基-1-丙醛
26.22	0.77	3-苄氧基-2-氟-4-甲氧基苯甲醛

[†] 酸类 15.34%，酯类 9.29%，其他 9.13%，醇类 1.99%，醛类 1.50%。

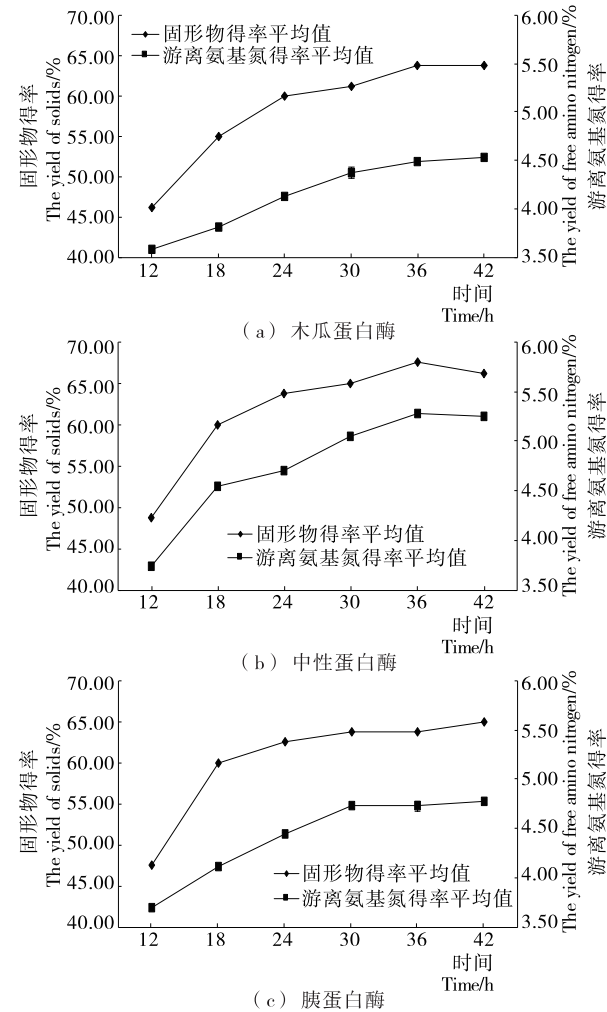


图 3 酶促溶时间对酶促溶的影响

Figure 3 Effects of the time on autolysis on the base of enzymes

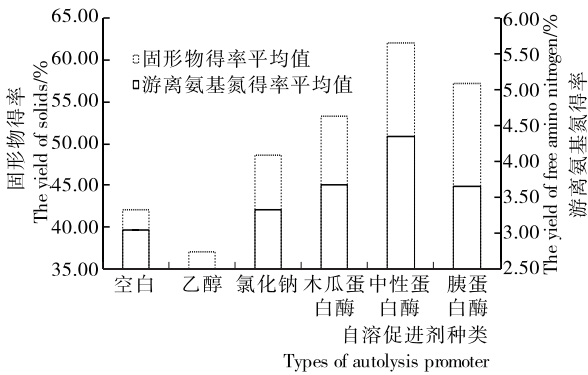


图 4 不同工艺条件处理效果的对比

Figure 4 The results of the contrast on a variety of optimum conditions

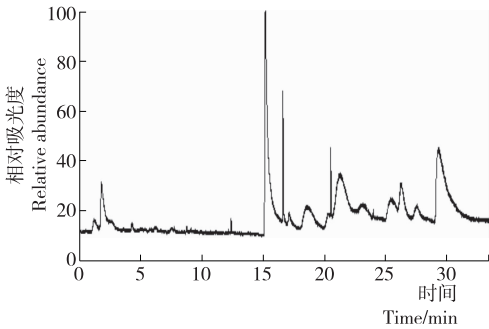


图 5 风味分析图谱

Figure 5 Analysis of Flavor Spectrum

参考文献

[1] FERREIRA I M P L V O, PINHO O, VIEIRA E, et al. Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications[J]. Trend Food Sci Technol, 2010(21): 77-84.

[2] 李科德, 曾庆孝. 啤酒废酵母泥综合利用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 63.

[3] 罗依雨, 罗维, 刘峻熙, 等. 啤酒废酵母自溶提取物的制备及抗氧化活性研究[J]. 华南师范大学报, 2016, 48(1): 89-93.

[4] 陈志颖, 张子健, 焦瑞杰, 等. 利用啤酒废酵母扩培物制备富含谷胱甘肽酵母抽提物[J]. 中国酿造, 2015, 34(11): 61-65.

[5] 蒋雪薇, 罗晓明, 刘永乐. 啤酒废酵母复合促溶剂促溶效果的研究[J]. 食品与机械, 2003(2): 15-17.

[6] 蔡奕文. 酵母抽提物生产工艺的优化[J]. 食品与机械, 2003(3): 16-18.

[7] 梁天姣, 叶盛权. 响应面法优化啤酒酵母粉酶解条件的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3): 1 080-1 087.

[8] 郭永, 庞宏建. 酵母抽提物的研究进展[J]. 中国调味品, 2010, 35(12): 24-27, 34.

[9] 李君兰. 牛羊胰脏提取、胰蛋白酶纯化及其酶化学特性研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2011: 1-4.

[10] 肖怀秋. 高活力产中性蛋白酶细菌菌株的选育及酶学性质研究[D]. 湖南: 湖南农业大学, 2006: 10-13.

[11] 陈洁, 王璋, 肖刚. 啤酒废酵母中酵母抽提物的制备[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(4): 356-362.

[12] 陈军. 从啤酒废酵母制备酵母抽提物的工艺研究[J]. 广西轻工业, 2011(4): 46-47, 62.

食品物流中的薄弱环节,定期进行评估、监测,减少食品在物流运输和仓储期间对食品的质量造成的破坏。其中首要的是增强食品物流中影响食品质量风险来源的识别。在食品的运输和仓储过程中,影响食品质量的风险存在很多种可能,每种风险发生的概率或者危害程度,以及发生危险的方式各不相同,食品物流企业应当根据风险种类的不同,寻找应对不同风险的解决方案,不断减少、化解影响食品质量、安全的各种风险。在判断食品物流中的风险时,应当主要参考危险物的数量和剂量的描述、对食品各个环节可能发生风险的程度及可能造成的后果进行分别评测^[10]。

另外,应当逐步建立食品物流的风险监管机制,让企业食品物流的风险管理和评估常态化,多方协调社会各方力量,包括政府、媒体、企业协会以及消费者等多方力量,利用整个社会的机制来约束和规范食品物流企业的行为^[11]。以政府和企业协会为例,政府应当建立统一的食物物流监管机制,避免不同监管部门执法间的冲突,不断加强对于食品物流企业的资格审查,逐步疏通食品物流行业的准入机制和退出机制,全面整顿食品物流业的市场秩序。企业协会则是逐步建立行业的内部约束规则,同时注重食品物流行业的宣传,做好行业的内部监管。

4 结语

为保障食品行业的健康发展以及危害食品消费者的合法权益,应当大力发展食品物流行业,加大食品物流基础设施投入,不断提高食品物流技术,建立食品物流安全的保障体系,完善食品物流现代化管理体系,注重食品物流配送过程中的安全监测与监控技术,不断引进先进的食品物流管理

经验,完善中国食品物流的法律法规,充分发挥政府、行业协会及社会大众对食品物流的监督作用,不断满足消费者对食品的更高要求,逐步奠定食品物流行业的坚实基础,促进中国食品物流行业快速、持续、健康发展。

参考文献

[1] 关锐捷, 龙文军. 中国现代农产品物流: 战略构想与政策建议明[J]. 中国农垦, 2007(4): 50-53.

[2] 王之泰. 物流如何面对食品安全问题[J]. 中国储运, 2011(8): 39-42.

[3] 赵飞, 王中东, 潘鸿, 等. 我国食品物流的发展现状及对策闭[J]. 安徽农业科学, 2008(8): 34-35.

[4] 李作战. 我国食品物流业发展的特征、瓶颈及其突破[J].中国酿造, 2009(1): 186-187.

[5] 重大农产品物流政策概述[J]. 中国农民合作社, 2011(11): 17-18.

[6] 叶勇, 张友华. 中国冷链物流的最新发展和对策研究[J]. 华中农业大学学报: 社会科学版, 2009(1): 23-26.

[7] 陈蓝荪. 现代食品物流学科专业建设与教学改革的探索[J]. 高等农业教育, 2008(7): 50-53.

[8] 徐亚妮, 张仁颐. 第三方冷链物流企业运营发展策略[J]. 物流科技, 2011(6): 118-120.

[9] 曾丽. 食品安全法律体系的缺陷及完善路径[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 274-276.

[10] 张峰学. 中国食品安全监管体系改革的法律思考[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 255-257.

[11] 虞巧颖. 区域物流对区域经济增长的作用分析——以长沙三角洲为例[D]. 北京: 北京交通大学, 2007: 15-32.

(上接第 162 页)

[13] 夏俊松, 阎淳泰, 葛向阳. 利用活性干酵母制备酵母抽提物的工艺研究[J]. 中国酿造, 2010(4): 83-88.

[14] 晏志云. 酵母抽提物的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1999.

[15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SB/T 1031—1999 蛋白酶活力测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[16] MORESI M, ORBAN K. Effect of enzymes industry[M]. New

York: The Nature Press, 1979: 21-23.

[17] 谢晓航, 韩宏明, 卢国伟. 啤酒酵母复合酶法生产酵母抽提物工艺的研究[J]. 中国调味品, 2012, 38(5): 62-67.

[18] 林美丽, 许倩倩, 宋焕禄, 等. 酵母抽提物香气活性化合物的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 259-262.

[19] 孙伟峰. 酵母活性肽制备及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009: 19, 24.

(上接第 166 页)

[8] 王信苏, 汪之和. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 148-150.

[9] 吴波, 陈运中, 律佳雪, 等. 响应面分析法优化鱼鳞脱钙条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 181-184.

[10] 潘杨, 许学勤. 酸碱法提取鱼鳞胶的工艺研究[J].食品科技, 2008(3): 183-186.

[11] 王屹, 刘剑虹, 李可伟. 胃蛋白酶法提取草鱼鳞胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(4): 134-136.

[12] 张俊杰, 段蕊, 潘秀楼. 鲤鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白提取工艺的应用[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2006, 15(4): 55-58.

[13] 刘艳, 刘章武, 唐婧苗, 等. 酶解淡水鱼鳞制备水解胶原蛋白的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(2): 11-17.

[14] 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 草鱼鱼鳞酶溶性胶原蛋白的提取

及基本特性[J]. 水产科学, 2007, 26(2): 91-94.

[15] 段宙位, 申铨日, 陈秀明, 等. 罗非鱼尾胶原蛋白的提取与鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 59-64.

[16] 周爱梅, 张培丽, 刘欣, 等. 淡水鱼皮胶原蛋白提取优化工艺研究(Ⅱ)[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 113-117.

[17] IKOMA T, KOBAYASHI H, TANAKA J, et al. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from Pafirus major[J]. Journal of Structural Biology, 2003, 142: 327-333.

[18] 刘文涛, 李国英, 缪煜清, 等. 鱼鳞的研究现状及应用前景[J]. 水利渔业, 2006, 6(1): 20.

[19] 刘艳, 刘章武, 唐婧苗, 等. 淡水鱼鳞水解胶原蛋白的酶法制备[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 99-103.

[20] 张俊杰, 曾庆孝. 鱼鳞盐酸脱钙过程中胶原蛋白含量的变化[J]. 食品与发酵工艺, 2004, 30(4): 40-43.