

自溶法从啤酒废酵母中制取多肽的研究

凌秀梅^{1,2}, 邱树毅^{1,*}, 黄永光¹, 余勇²

(1. 贵州大学 发酵工程与生物制药贵州省重点实验室, 贵州 贵阳 550003

2. 成都市双流质量技术监督所, 四川 成都 610200)

摘 要: 对啤酒废酵母制取多肽的过程进行了研究, 采用正交法确定了自溶的最佳条件, 并用 SephadexG-25 凝胶层析分离出 10 种多肽, 其含量随着自溶的时间不同而有所变化, 通过氨基酸自动分析仪对多肽氨基酸和游离氨基酸的种类和含量进行测定, 结果发现自溶 60h 后多肽总含量达到 744mg/100ml。

关键词: 自溶; 多肽; 凝胶层析

Autolyzing Preparation of Peptides from Waste Yeast

LING Xiu-mei^{1,2}, QIU Shu-yi^{1,*}, HUANG Yong-guang¹, SHE Yong²

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy,

Guizhou University, Guiyang 550003, China

2. Shuangliu Institute of Calibration and Testing for Quality and Technical Supervision, Chengdu 610200, China)

Abstract: Both the preparation of yeast peptides and the optimum conditions of autolyzing were studied. 10 kinds of peptides were separated by SephadexG-25. The quantities of peptides changed according to the autolyzing time. The composition and content of amino acid was determined by amino acid analyzer. The results showed that the content of total peptides reaches 744 mg/100 ml.

Key words autolyze peptide; gel filtration; chromatography

中图分类号: TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0336-04

生物活性肽(biological active peptides, BAPs)是具有氨基酸顺序的多肽, 通过体内消化释放, 并在动物的肠道消化过程中, 充当新陈代谢的潜在生理效应物^[1]。许多小分子肽不仅能提供人体生长、发育所需的营养物质与能量, 而且还具有防治疾病、调节人体生理机能的功能。目前制取生物活性肽多采用大豆、花生为原料, 采用廉价的啤酒废酵母作为原料的研究几乎没有, 本实验采用自溶法从啤酒废酵母中制取多肽, 并且采用 SephadexG-25 进行多肽分离。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

啤酒废酵母 蓝剑瀑布啤酒集团有限公司; Tris、NaCl、NaHCO₃、NaOH、HCl 均为分析纯; 氨基酸标准品 Sigma公司; SephadexG-25 Superfine Amersham Biosciences 公司。

PHS-25 型精密数显酸度计 上海伟业仪器厂;

TG328A 型分析天平 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司; DKS-12 型电热恒温水浴锅 天津太斯特仪器有限公司; TDL-40B 型离心机 上海安亭科学仪器厂; Biochrom30 型氨基酸自动分析仪、AKTA purifine Amersham Biosciences 公司; 1.6cm × 100cm 层析柱 上海亚荣公司。

1.2 方法

1.2.1 啤酒废酵母自溶最佳条件的确定

采用正交法确定啤酒废酵母自溶的最佳条件。

1.2.2 自溶不同时间制取多肽

在其他最佳自溶条件不变的情况下, 改变自溶的时间, 采用 SephadexG-25 柱层析分离多肽。

1.2.3 最佳自溶条件下的多肽氨基酸和游离氨基酸含量

采用氨基酸自动分析仪器。

1.3 检测方法

1.3.1 自溶过程中氨基氮含量的测定

采用甲醛滴定法测定^[2]。

收稿日期: 2006-12-25

作者简介: 凌秀梅(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为啤酒废酵母的综合利用。E-mail: lxm19815431@tom.com

* 通讯作者: 邱树毅(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: syqiu@gzu.edu.cn

1.3.2 SephadexG-25 凝胶层析分离多肽

取一定量经过 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液溶胀过的 SephadexG-25 凝胶, 采用 2 倍该缓冲液配成匀浆装柱, 柱尺寸为 $\Phi 1.6\text{cm} \times 100\text{cm}$ 。取 5ml 自溶不同时间的废酵母液(0.45 μm 膜过滤), 以 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液平衡, 然后加样。采用 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 控制流速为 0.5ml/min。在波长 280nm 处检测洗脱液中的多肽, 结果见图 1~5。

1.3.3 自溶 60h 后的废酵母液中的多肽氨基酸组成及游离氨基酸含量的变化, 见表 4。

1.3.3.1 氨基酸检测条件

仪器: Biochrom 30; 分析柱: 带有 Peltier 加热/冷却系统的高压 PEEK\ 柱; 温度: 柱温在 20~90℃ 之间变化, 反应圈温度设置到 40℃ 和 145℃ 之间。检测波长: 440nm 和 570nm。

1.3.3.2 废酵母自溶液中的多肽氨基酸组成测定方法

酵母自溶液经 6mol/L 盐酸于 110℃ 水解 24h, 取出冷却, 并采用冷冻干燥除去盐酸, 用已知 pH2.2 的样品缓冲液定量稀释样品, 再用 0.45 μm 膜过滤, 滤液取适当后用自动氨基酸分析仪测定氨基酸的组成及含量。

1.3.3.3 废酵母自溶液中的游离氨基酸组成测定方法

直接取酵母自溶液离心 10min(4000r/min), 再用 0.22 μm 膜过滤, 滤液取适当后用自动氨基酸分析仪测定氨基酸的组成和含量。

2 结果与分析

2.1 最佳自溶条件的确定

许多研究表明, 自溶温度、时间、pH 值、自溶促进剂是影响啤酒废酵母自溶的几个主要因素, 本实验就这四个因素进行正交试验, 每个因素选三个水平, 以氨基氮含量为考察指标, 选用正交表 $L_9(3^4)$ 进行试验。每次试验称取预处理后的酵母泥 100g, 加水量为 200%(W/W)^[3]。结果如表 1、表 2 所示。

由极差分析可知影响酵母自溶的因素依次为: pH 值 > 自溶温度 > NaCl 用量 > 自溶时间。经上述正交试验分析, 酵母最佳自溶条件为 $B_1A_3D_3C_3$, 即 pH 值 6.0, 温度为 45℃, NaCl 用量为 4.0%, 自溶时间 60h, 在此条件下测得氨基氮含量为 405mg/100ml。

2.2 自溶不同时间多肽的变化

表 1 正交试验因素和水平 $L_9(3^4)$ Table 1 Factors and levels of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平	A 温度(℃)	B pH 值	C 时间(h)	D NaCl 用量(W/W, %)
1	50	6.0	36	2.0
2	55	6.5	48	3.0
3	45	7.0	60	4.0

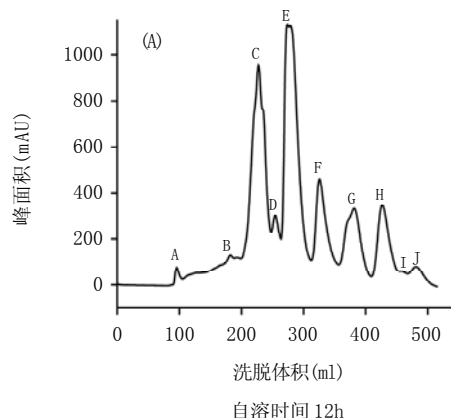
表 2 正交试验结果分析

Table 2 Analysis results of orthogonal test

试验号	A 温度(℃)	B pH 值	C 时间(h)	D NaCl 用量(W/W, %)	氨基氮含量 (mg/100ml)
1	50	6.0	36	2.0	336
2	50	6.5	48	3.0	217
3	50	7.0	60	4.0	339
4	55	6.0	48	4.0	382
5	55	6.5	60	2.0	301
6	55	7.0	36	3.0	337
7	45	6.0	60	3.0	397
8	45	6.5	36	4.0	316
9	45	7.0	48	2.0	398
I/3	297	372	330	345	
II/3	340	278	332	317	
III/3	370	358	346	346	
R	73	94	16	29	

由图 1 及表 3 的结果可以看出, 啤酒废酵母液在不同的自溶时间里所产生的多肽的种类及含量有一些变化, 在自溶 12h 时, SephadexG-25 柱层析分离得到 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 共 10 种多肽, 自溶 24h 后, 多肽的种类没有太大的变化, 从峰面积看, A、D、G、H、I、J 的含量在增加, 而 B、C、E、F 的含量在减少, 其中 F 的变化幅度较大。自溶 36h 后, 多肽的种类仍然没有什么变化, C、D、F、G、H、J 的含量在减少, 而 A、E、I 的含量却在增加, 同时 B 的峰面积检测不出来。自溶 48h 后, G 峰变为两个峰 G1 和 G2, I 和 J 峰重叠在一起, 其他多肽种类没有变化。A、H、I(J) 的含量在增加, 除了 B 峰检测不出来以外, 其余的多肽含量在减少。自溶 60h 后, C 峰变为两个峰 C1 和 C2, 其他多肽种类没有变化。A、B、D、H、I(J) 的含量在增加, 其中 I(J) 的含量几乎增加了一倍, 而其余的多肽含量都在减少。从整个自溶过程来看, A、I、J 的含量一直在增加, C、F 的含量一直在减少, 其他肽含量的变化则有一些波动。通过这一变化过程的分析, 可以有选择性地收集我们需要的多肽。

2.3 废酵母多肽峰面积的变化



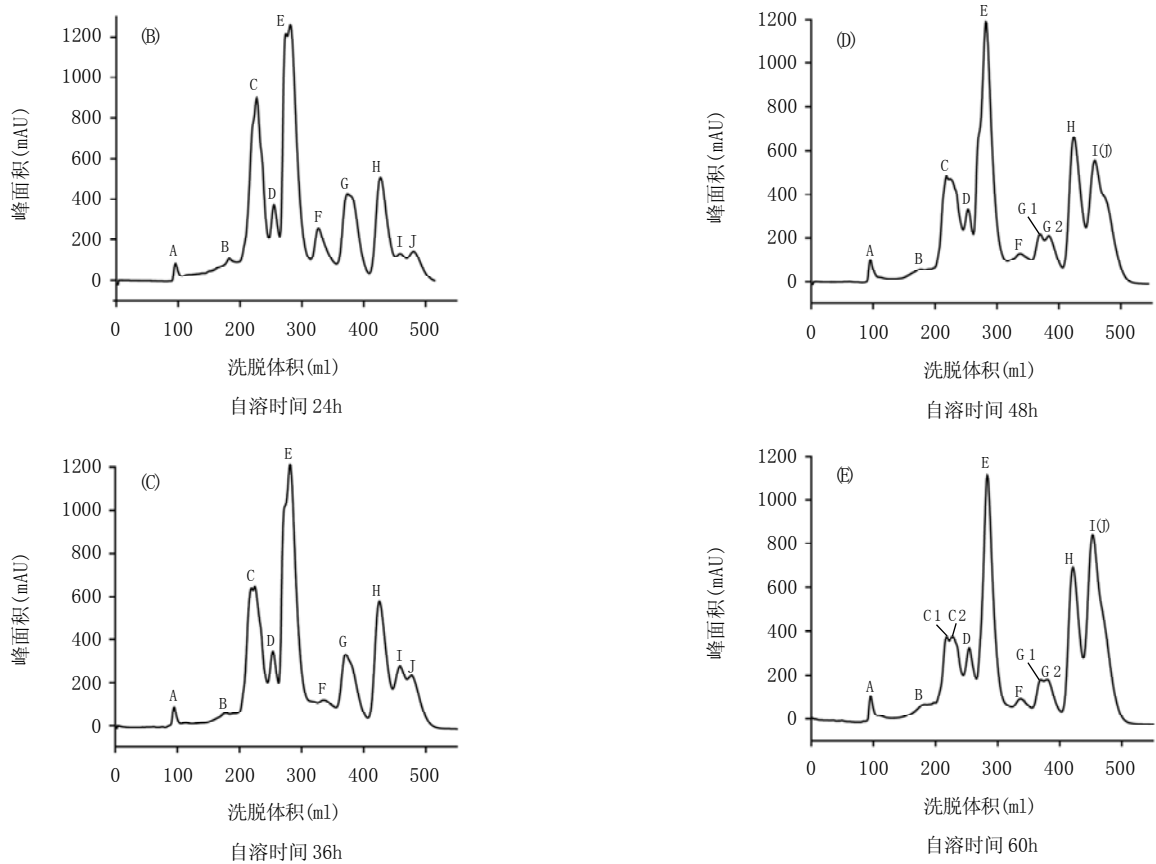


图1 自溶后废酵母多肽液的洗脱曲线
Fig 1 Autolyzed elution curve of polypeptides solution

表3 啤酒废酵母不同自溶时间多肽峰面积变化表

Table 3 Changes of peak area of waste beer yeast polypeptides

峰面积 mAU × ml	自溶 12h	自溶 24h	自溶 36h	自溶 48h	自溶 60h
A	271.97	499.23	531.92	754.53	903.69
B	115.85	75.46	—	—	32.51
C	C 1	17569.64	15676.82	12356.41	2773.95
	C 2				4094.08
D	1385.96	2096.73	1973.85	1860.46	2356.42
E	22232.13	17299.37	23664.19	20985.12	17165.42
F	5596.27	2298.83	118.39	104.41	89.91
G	G 1	5881.93	9429.13	4976.28	1398.15
	G 2				1853.70
H	5570.75	10000.88	8822.57	12008.72	12336.24
I	219.64	1826.65	3233.81	16849.09	24258.20
J	1228.09	3212.46	3194.76		

注：C 峰在自溶 60h 后出现两个峰 C1 和 C2，见图 5，G 峰同理；I，J 峰则在自溶 48h 后合并为一个峰。

其变化情况见表 3。

2.4 多肽氨基酸组成的测定

2.4.1 啤酒废酵母多肽液游离氨基酸组分及含量的测定

通过氨基酸自动分析仪测得该酵母自溶液中游离氨基酸的种类和含量，见图 2，一共包含 16 种氨基酸，精氨酸的含量很少几乎测不出来，这其中包括有七种人体必需氨基酸，其含量见表 4。

2.4.2 啤酒废酵母多肽液多肽氨基酸组分及含量的测定

多肽氨基酸的种类和游离氨基酸的一样，含量见表 4。

2.4.3 啤酒废酵母多肽液粗蛋白含量的测定

通过凯氏定氮法测得其中的粗蛋白含量为 1365mg/100ml。

从表 4 可以看到，该酵母自溶液中含有十六种氨

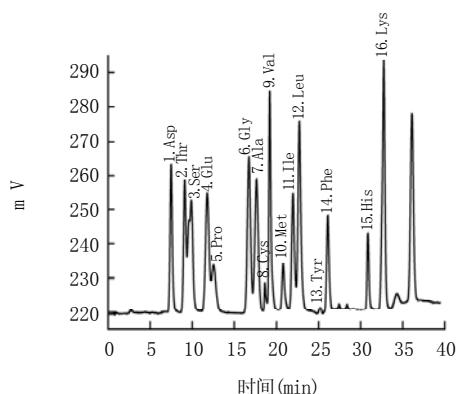


图2 自溶60h废酵母液游离氨基酸测定结果

Fig.2 Content of amino acid of waste beer yeast

基酸（七种必需氨基酸），其中游离氨基酸总量约223mg/100ml，多肽氨基酸总量为967mg/100ml，多肽氨基酸与游离氨基酸的差值则为多肽的含量约为744mg/100ml。粗蛋白的含量比多肽氨基酸的含量大，说明该溶液除了含有多肽之外，还含有一部分大分子蛋白质。

3 结 论

本实验就啤酒废酵母制取多肽的过程进行了研究，采用正交法确定了自溶的最佳条件，采用 SephadexG-25 凝胶层析分离出10种多肽，其含量随着自溶的时间不同而有所变化，通过这一变化过程的分析，有助于收集所需要的多肽。通过氨基酸自动分析仪对多肽氨基酸和游离氨基酸的种类和含量的测定，并结合凯氏定氮法测定的粗蛋白的含量，可以发现自溶60h后总的多肽的含

表4 酵母蛋白液氨基酸含量对比表(mg/100ml)

Table 4 Content of amino acid of waste beer yeast(mg/100ml)

氨基酸名称	多肽氨基酸量(mg/100ml)	游离氨基酸量(mg/100ml)
天冬氨酸 Asp	93	12.43
赖氨酸 Lys	82	27.69
丙氨酸 Ala	84	11.56
苏氨酸 Thr	67	10.82
甘氨酸 Gly	58	20.85
缬氨酸 Val	78	35.11
丝氨酸 Ser	73	17.25
脯氨酸 Pro	71	12.56
酪氨酸 Tyr	10	0.56
异亮氨酸 Ile	64	16.27
亮氨酸 Leu	103	20.82
蛋氨酸 Met	21	3.88
组氨酸 His	22	6.44
苯丙氨酸 Phe	34	11.38
谷氨酸 Glu	100	14.64
胱氨酸 Cys	7	1.04
精氨酸 Arg	—	—
合计	967	223.29

量达到744mg/100ml，这些多肽的生物活性还有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 周瑞宝, 周兵. 蛋白质的生物和化学改性[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 181-185.
- [2] 周利巨, 王君虹, 陈新峰, 等. 大豆蛋白酶解液脱色工艺的优化[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(3): 130-133.
- [3] 吴鑫颖, 邱树毅, 刘文龙. 利用啤酒废酵母进行营养型酵母调味品的研究[J]. 贵州工业大学学报, 2002, 31(3): 77-82.