

啤酒废酵母中蛋白质提取工艺的研究

刘 蓉, 邓泽元, 李瑞贞

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌

330047)

摘 要: 本研究在采用诱导剂+自溶法的基础上, 结合多种提取方法, 通过对比和正交试验确定啤酒废酵母中蛋白质的最佳提取工艺及参数, 并用胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化法测定提取蛋白质的消化率。实验结果表明使用诱导剂+自溶+酶解法提取较好, 最佳工艺条件为: 温度 50℃、pH 值 7.0、酶解自溶时间为 40h、中性蛋白酶用量 25U/g 干酵母、 β -葡聚糖酶用量 15U/g 干酵母。在此条件下, 粗蛋白质得率达 27%。啤酒废酵母提取的粗蛋白质体外消化率为 81.06%。

关键词: 啤酒废酵母; 蛋白质; 酶解; 提取工艺; 体外消化率

Study on Extraction of Protein from Waste Brewer's Yeast

LIU Rong, DENG Ze-yuan, LI Rui-zhen

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang

330047, China)

Abstract: Proteins were prepared by the combination of various extraction methods based on the method of inducer plus autolysis from waste brewer yeast. The optimum technology processes and parameters were determined by comparison experiments and orthogonal tests. The protein digestibility was measured by a pepsin-trypsin method *in vitro*. The results indicated that the optimal method of cell-wall broken was inducer plus autolysis plus enzymatic hydrolysis, and the optimal parameters were as follows: temperature 50℃, pH 6.0, 40 hours, the neutral protease and the β -glucanase-substrate ratio 25 U/g and 15 U/g respectively. The protein digestibility *in vitro* was 81.06%.

Key words waste brewer yeast; protein; enzymatic hydrolysis; extraction technology; *in vitro* digestibility

中图分类号: TS261.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0168-03

啤酒废酵母是啤酒生产过程中最主要的副产物, 每生产 100 吨啤酒, 就会产生大约 1.5~2 吨的湿啤酒酵母^[1], 折合干酵母(含水 8%~10%)约 0.35~0.4 吨。啤酒酵母中含蛋白质约 50%, 其氨基酸组成接近理想蛋白质的水平, 尤其是谷物中所缺乏的赖氨酸在啤酒酵母中含量极为丰富^[2]。利用质优价廉的啤酒废酵母资源提取蛋白质, 既可以作为食品蛋白质营养强化剂, 同时经过适当酶解处理还可得到具有一定生理活性的多肽产品。

目前, 从酵母细胞提取蛋白质的方法主要有: 化学处理法、机械破壁法、自溶破壁法和酶解自溶法。化学处理法通常会引起蛋白质的变性; 机械破壁法能耗较大, 相应其效率较低^[3]; 细胞自溶法所需反应时间较长, 而蛋白质提取率不高^[4]。有研究表明, 适当添加促溶剂有利于提高酵母细胞抽提率^[5]。采用多种方法相结合提取蛋白质的研究则很少有报道。

作为评价蛋白质营养价值的一项重要指标, 蛋白质

消化率的测定有体内法和体外法。体内法能够较好的反映动物实际消化情况, 但因受到条件制约且操作比较复杂, 许多学者用体外消化法来代替。体外法中以胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化法在单胃动物体外消化模拟研究中应用最多, 测定的蛋白质消化率的结果最接近体内消化法^[6]。

本研究以诱导剂+自溶法为基础, 结合机械破壁和酶解法, 通过对比实验优选适宜的较高蛋白质得率的破壁方法, 并对酵母蛋白提取的工艺条件进行优化, 同时采用胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化法, 首次测定啤酒酵母蛋白质粗提物的体外消化率。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

啤酒废酵母(已初步除杂并干燥处理) 南昌亚洲啤酒有限公司。

收稿日期: 2007-07-26

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540); 南昌大学校基金资助项目

作者简介: 刘蓉(1973-), 女, 讲师, 研究方向为食品化学及营养学。

β -葡聚糖酶($\geq 6000.00\text{U/g}$)、1398 中性蛋白酶($\geq 50000.00\text{U/g}$)、胰蛋白酶($\geq 2500.00\text{U/g}$)和胃蛋白酶($\geq 1200.00\text{U/g}$) 国药集团化学试剂有限公司;小苏打、食盐、苯甲酸钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钾、氯化钾、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、2% 硼酸溶液、混合指示液(0.1% 甲基红乙醇溶液与 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液以 1:5 混合)均为分析纯。

1.2 仪器与设备

TDL-5-A 型离心机 上海安亭科学仪器厂; KDN-04C 数控消化炉 上海精隆科学仪器有限公司; KSY-9820 凯氏定氮仪 厦门精艺兴业科技有限公司; TDL-5-A 旋转蒸发器 巩义市英峪予华仪器厂等。

1.3 方法

1.3.1 啤酒废酵母的预处理

工艺流程:干啤酒废酵母→粉碎→过筛除杂→离心分离→脱苦、脱臭→离心分离

取 100g 废啤酒酵母,粉碎过 80 目的筛子,除去废酵母中的可见杂质。加入 1000ml 蒸馏水,搅拌均匀,将酵母悬浮液在 5000r/min 下离心 10min。沉淀再加入 0.5% 小苏打溶液 1000ml,搅拌,静置作用 1h 脱苦、脱臭^[7]。最后以转速 5000r/min,离心分离 10min,即得预处理的酵母泥。

1.3.2 破壁方法选择

通过对比实验以确定最佳的啤酒酵母破壁方法。

方法 1:胶体磨+诱导剂+自溶法

预处理酵母泥用胶体磨进行机械破壁处理后,取 20g,加 3 倍体积的水和 3% 的食盐,搅拌均匀,并同时加入 0.5g 苯甲酸钠,用 1mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 值到 5.0,于 55℃ 水浴锅中保温 24h。

方法 2:诱导剂+自溶+酶解法

取预处理酵母泥 20g,同方法 1 自溶 12h 后,加入中性蛋白酶 20U/g 干酵母, β -葡聚糖酶 10U/g 干酵母,酶解 12h。

方法 3:胶体磨+诱导剂+自溶+酶解法

预处理酵母泥经胶体磨机械破壁后,取 20g,进行同对比方法 2 的处理。

1.3.3 酵母蛋白的提取

工艺流程:自溶破壁后→加热灭酶→离心分离→真空浓缩→干燥

分别取以上三种破壁方法所得处理液,5000r/min 转速下离心 10min,收集上清液。适量水洗涤器底沉淀物,离心分离收集第二次、第三次提取液。合并上清液,即得蛋白质提取液。

将所得蛋白质提取液真空浓缩至一定体积,再真空干燥得蛋白质粗提物。浓缩和干燥过程中,温度保持

在 50℃ 到 55℃ 之间,以防止蛋白质变性。

$$\text{蛋白粗提物得率}(\%) = \frac{\text{蛋白质粗提物干重}}{\text{预处理酵母泥的干重}} \times 100$$

1.3.4 最佳工艺条件的确定

为确定蛋白质提取的最佳工艺条件,选取酶解温度、时间、pH 值、加酶量,设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,以总氮收率(含氮量采用凯氏定氮法测定^[8])为指标,试验设计如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素				
	A	B	C	加酶量(U/g干酵母)	
	温度(℃)	时间(h)	pH	中性蛋白酶	β -葡聚糖酶
1	40	24	5.0	10	5
2	50	32	6.0	20	10
3	60	40	7.0	25	15

1.3.5 啤酒酵母蛋白质体外消化率的测定^[9]

将 30ml 溶有胃蛋白酶的 HCl-KCl 缓冲液(pH 1.4)加入样品中,37±0.1℃ 下消化 3h;用 0.2mol/L NaOH 调节其 pH 值至 6.8,量取 30ml KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液(pH6.8)加入样品中,再移取 1.5ml 溶有胰蛋白酶的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液于样品中,37±0.1℃ 下振荡培养 3h,消化完成。抽滤,用蒸馏水反复冲洗滤渣。将滤渣连同滤纸一起放入 65℃ 恒温烘箱中烘至恒重。同样步骤做空白实验。

凯氏定氮法测定滤渣(含滤纸)的含氮量,利用下式计算啤酒酵母蛋白粗提物的体外消化率:

$$\text{啤酒酵母蛋白粗提物体外消化率}(\%) = \frac{a-b}{a} \times 100$$

式中, a 为样品蛋白粗提物含氮率; b 为复合酶消化后滤渣含氮率-空白样品的含氮率。

2 结果与分析

2.1 破壁方法选择

以诱导剂+自溶法为基础的多种破壁方法,其蛋白质粗提物得率及粗蛋白质提取率见表 2。

表 2 多种破壁方法的比较
Table 2 Comparison of several cell-wall broken methods

	方法 1	方法 2	方法 3
蛋白质粗提物得率(%)	73.66	73.34	73.23
蛋白质粗提物含氮率(%)	5.13	5.81	5.92
总氮收率(mg/g干酵母)	37.79	42.61	43.35
粗蛋白质提取率(%)	23.60	26.60	27.09

实验结果表明：三种破壁方法的蛋白质粗提物得率相差不大，但其含氮率及总氮收率由高到低顺序为：方法3 > 方法2 > 方法1。

酵母细胞自溶起始于细胞膜的降解，而细胞膜是由蛋白质和脂类分子组成的超分子复合物。外源型地加入蛋白酶（如木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶等）及葡聚糖酶可以加速酵母的自溶^[10]。研究表明，蛋白酶与葡聚糖酶结合使用能大大地加速酵母细胞的自溶速度。本实验证明，添加中性蛋白酶及β-葡聚糖酶的酶解法其酵母粗蛋白质提取率要明显高于无外源酶加入的方法1，而在方法2基础上再增加胶体磨处理，粗蛋白质提取率仅略有提高。由于使用胶体磨能耗较大，结合实际生产中的经济和节能问题考虑，选取方法2的破壁方法，即诱导剂+自溶+酶解法。

2.2 最佳工艺条件的确定

L₉(3⁴)正交试验设计及结果见表3。

表3 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal test L₉(3⁴)

试验号	A 温度(℃)	B 时间(h)	C pH	D 加酶量	总氮收率 (mg/g干酵母)
1	1	1	1	1	34.51
2	1	2	2	2	40.73
3	1	3	3	3	41.32
4	2	1	2	3	42.31
5	2	2	3	1	44.67
6	2	3	1	2	43.16
7	3	1	3	2	34.45
8	3	2	2	3	36.38
9	3	3	1	1	38.34
k ₁	38.85	37.09	38.67	39.17	—
k ₂	43.38	40.59	39.81	39.45	—
k ₃	36.39	40.94	40.11	40.00	—
R	6.99	3.85	1.44	0.83	—

由表1可知，A的极差最大，其次是B、C，而D的极差最小。极差越大，反映该因素水平变化时，总指标变化最大，即该因素对综合指标的影响越大，该因素越重要。因此，由极差分析可知，影响啤酒酵母自溶的因素主次顺序为：温度>时间>pH值>加酶量。其中，温度是影响啤酒酵母自溶的最主要因素，而加酶量对其影响最小。

极差分析得出最佳组合为A₂B₃C₃D₃，即温度50℃、酶解时间40h、pH7.0、加酶量为：中性蛋白酶为25U/g干酵母，β-葡聚糖酶为15U/g干酵母。

为验证最佳工艺参数，按其工艺参数提取酵母蛋白质，其总氮收率为45.23(mg/g干酵母)，与正交表中第5组试验进行对比，结果证明最佳工艺参数可靠。

2.3 啤酒酵母蛋白粗提物体外消化率测定

胃蛋白酶-胰蛋白酶联合处理法测定蛋白质体外消

化率的原理为：首先用蛋白酶在酸性条件下完成蛋白质在胃内的消化过程，再用胰蛋白酶继续消化，完成其在小肠上段的消化过程，近似地模拟人体胃肠道环境。

本实验采用胃蛋白酶-胰蛋白酶联合处理法，对样品进行三组平行实验。取三组实验平均值计算啤酒酵母蛋白粗提物体外消化率，计算如下：

$$\text{啤酒酵母蛋白粗提物体外消化率}(\%) = \frac{a-b}{a} \times 100$$

$$=[5.81\% - (0.69\% - 0.42\%)] / 5.86\% \times 100 = 81.06\%$$

结果表明：在消化道内主要酶（胃蛋白酶及胰蛋白酶）作用下，啤酒废酵母蛋白粗提物的体外消化率为81.06%。此数值远远高于豆粕、玉米等植物性蛋白质的体外消化率（分别为48.54%和36.38%）^[11]，也高于鱼肉蛋白的体外消化率74.16%^[12]。

由此可见，本研究所提取的啤酒废酵母蛋白粗提物中的蛋白质易于消化，具有较高的营养价值。

3 结 论

通过对比实验，选择诱导剂+自溶+酶解法作为酵母细胞破壁方法，其总氮收率为42.61mg/g干酵母，粗蛋白质得率达27%。啤酒废酵母自溶提取蛋白质的最佳优化工艺条件为：温度50℃、酶解时间40h、pH7.0、中性蛋白酶及β-葡聚糖酶用量分别为25U/g干酵母和15U/g干酵母。啤酒酵母粗蛋白体外消化率为81.06%，具有较高的营养价值。

参考文献：

- [1] 吴兰清, 庚念祖, 李汉超. 啤酒废酵母泥的综合利用[J]. 食品科学, 1993, 14(1): 31-33.
- [2] 张帅, 王秀道. 从啤酒废酵母中制备酵母抽提物[J]. 食品工业科技, 2002(9): 50-52.
- [3] 莫重文. 利用啤酒酵母生产酵母味素的研究[J]. 中国酿造, 2006(9): 38-41.
- [4] 左立, 邱龙辉, 周远明, 等. 酵母抽提物鲜味剂的工艺研究[J]. 化学工业与工程技术, 2002, 23(1): 9-11.
- [5] 汤务霞. 啤酒废酵母自溶条件的研究[J]. 食品工业, 2006(5): 28-30.
- [6] LEESON C S. *In vitro* estimation of dry matter and crude protein digestibility[J]. Poultry Science, 1984, 63: 89-96.
- [7] 杨李益, 黄安东. 用啤酒废酵母生产“酵母精”的探讨[J]. 酿酒科技, 1999(3): 76-78.
- [8] 刘兴友, 刁有祥. 食品理化检验学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 15-17.
- [9] 王卫国, 邓金明, 廖再生. 饲料粉碎粒度与蛋白质消化率的体外消化试验研究[J]. 粮食与饲料工业, 2000(11): 16-19.
- [10] 陈瑞峰. 从啤酒酵母中分离和提取氨基酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2005.
- [11] 王卫国, 付旺宁, 黄吉新, 等. 饲料粉碎粒度与能耗及蛋白质体外消化率的研究[J]. 饲料工业, 2001(10): 33-37.
- [12] 路红波, 刘俊荣. 热塑挤压蒸煮对鱼肉蛋白质营养价值的影响初探[J]. 水产科学, 2005, 24(2): 29-30.