

文章编号 :1009 - 038X(2001)01 - 0048 - 03

啤酒废酵母蛋白水解物的制取工艺

张晓鸣¹, 袁信华¹, 徐 柔¹, 章克昌²

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036 2. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 :利用啤酒废酵母资源,通过破壁预处理与复合酶降解相结合的工艺,制取特定相对分子质量范围的蛋白水解物.响应面分析结果表明,在温度 55 ~ 60 ℃,pH 6.6 ~ 6.8, β -葡聚糖酶用量 15 ~ 20 U/g(以酵母计)的条件下,有最高的肽提取率.酶解 7 h,蛋白质提取率大于 82%,经 HPLC 测定,水解产物中 65% 组分的相对分子质量在 210 ~ 635 之间,处于二肽和三肽相对分子质量范围.

关键词 :啤酒废酵母 酶解 蛋白水解物

中图分类号 :TS 261.11

文献标识码 :A

Preparation of Protein Hydrolysates with Waste Brewer 's Yeast

ZHANG Xiao-ming, YUAN Xin-hua, XU Rou, ZHANG Ke-chang

(1. School and Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China ;

2. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract : Protein hydrolysates were prepared by enzymatic hydrolysis of pretreated waste brewer 's yeast. The hydrolysis parameters were specified by response surface analysis. The Parameters are as follows : initial yeast concentration 15 %, temperature 55 ~ 60 ℃, the β -glucanase-substrate ratio 15 ~ 20 U/g, and pH 6.6 ~ 6.8. When hydrolysed for 7 hour, more than 82 % of the Kjeldahl protein in yeast was extracted. Measured by high-performance liquid chromatography(HPLC), 65.26 % of the hydrolysates had molecular weights of 210 ~ 635 Dalton, which corresponded to dipeptides and tripeptides.

Key words : waste brewer 's yeast ; enzymatic hydrolysis ; protein hydrolysaes

利用质优价廉的啤酒废酵母资源,制取小肽为主要组分的蛋白水解物,该产品一方面可作为合成高生物活性的矿物元素蛋白盐的理想配体,同时也可用作食品蛋白质营养强化剂,经过适当处理还可直接用作肽类调味食品^[1].

1 材料与方法

1.1 材料

啤酒废酵母 无锡狮王太湖水啤酒有限公司

提供 破壁复合酶 无锡轻工大学生物工程学院研制.

1.2 仪器

恒温水浴锅,阿贝尔折光仪,721 分光光度计,PHS-25 型酸度计,日立 835-020 型氨基酸分析仪,715G 型分光光度计,HP1050 型高压液相色谱仪.

1.3 分析方法

酵母质量分数,折光率法^[2] 粗蛋白(KP),凯氏定氮法^[3] 肽,双缩脲法^[4] ;TCA 溶解指数,文献^[5]

报道的方法 水解度(DH),氨基滴定法 β-葡聚糖酶活力,蓝色葡聚糖法^[6] 酵母提取物相对分子质量测定,HPLC 法.

2 结果与讨论

2.1 破壁预处理和破壁复合酶对酵母水解的影响
根据细胞壁的结构和自溶作用的理论,作者研究了改变酵母细胞壁质构的预处理技术.同时,资料表明酵母受到外加蛋白酶和葡聚糖酶的相继处理时可加速酵母水解.在不同处理条件下进行了啤酒酵母的水解试验,结果见图 1.

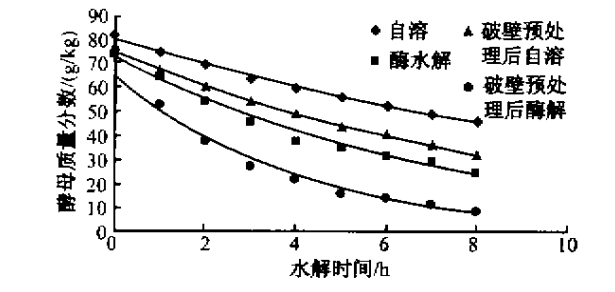


图 1 各种处理条件下的酵母水解动力学曲线
Fig.1 Kinetics of yeast hydrolysis under different treatments

结果显示,破壁预处理技术能显著地加速酵母水解过程中产物的溶出,在此基础上添加破壁复合酶效果更加明显,因此,制取蛋白水解物采用如下的工艺路线:

啤酒废酵母→清洗除杂→脱苦脱臭→破壁预处理→酶解→离心分离→干燥→成品

2.2 蛋白水解物制取工艺条件的优化

根据动力学研究结果、内源酶作用条件及单因子试验结果,初步确定酵母初始质量分数为 15%,酶解时间 6 h,在此基础上对酶解 pH 值(6.5~7.5)、温度(45~65 ℃)和破壁复合酶中起主要作用的 β-葡聚糖酶的用量(5~25 U/g)进行优化,响应面分析的设计与结果如表 1,2 所示:

表 1 优化试验的因素和水平

Tab.1 Factors and levels of optimization			
水平	温度 $X_1/^\circ\text{C}$	pH 值 X_2	葡聚糖酶 $X_3/(\text{U/g})$
- 1	48	6.5	5
0	55	7.0	15
1	62	7.5	25

由计算机分析得到以下结果:

(1) 回归方程
$$P = 56.75 + 12.41X_1 - 1.786X_2 + 3.209X_3 - 117.29X_1^2 - 2.314X_2^2 - 6.889X_3^2 +$$

$$0.8925X_1X_2 + 2.072X_1X_3 - 1.21X_2X_3$$

表 2 优化试验的安排和结果

Tab.2 Results of optimization

序号	X_1	X_2	X_3	肽提取率 $P/\%$
1	- 1	- 1	0	31.85
2	- 1	0	- 1	25.14
3	- 1	0	1	28.56
4	- 1	1	0	28.27
5	0	- 1	- 1	46.38
6	0	- 1	1	54.07
7	0	1	- 1	43.45
8	0	1	1	46.30
9	1	- 1	0	56.25
10	1	0	- 1	44.45
11	1	0	1	56.16
12	1	1	0	56.24
13	0	0	0	57.47
14	0	0	0	56.41
15	0	0	0	56.38

(2) 方差分析结果:

方程项	均方差	自由度	F 值
一次项	446.6	3	112.9
二次项	202.9	3	51.33
交互项	8.741	3	2.211
失拟项	1.847	3	0.4672
误差项	3.954	2	

$$F_{\text{回归方程}} = \text{回归项均方差} / \text{残余项均方差}$$
$$= 81.58 > F_{0.001}(9,5) = 27.24$$

(注:回归项包括一次项、二次项和交互项,残余项包括失拟项和误差项.)

因此回归方程是可靠的.方差分析表明,一次项和二次项都具有较高的显著性,说明响应值的变化相当复杂,交互项的显著性不高,说明 3 因素之间相互影响较小,此外,失拟项不显著,说明对酶解存在影响的主要因素都已考虑到,没有遗漏因素,误差项均方差很小,说明实验误差很小.

响应面分析结果说明,温度对肽的提取影响最大,β-葡聚糖酶的影响次之,pH 值的影响较小.在温度为 55~60 ℃,pH 6.6~6.8,β-葡聚糖酶用量 15~20 U/g(以酵母计)的条件下,有最大的响应值,即有最高的肽提取率.

2.3 酶解时间对产物的影响

在酶解温度、pH 值、酶用量等主要参数确定后，进一步考察酶解时间对产物的影响，从表 3 可以对蛋白质提取率、水解程度等指标的动态变化有清晰的了解。

从表中产物的 AAN/KPN、FAA/TAA 及 TCA 溶解指数 3 个指标可以看出，由于溶出时受到细胞壁的分子筛效应，不同时间溶出产物的相对分子质量分布基本上是一致的，蛋白质必须水解到一定的大小才能通过细胞壁上的孔隙渗出到介质中。对于蛋白质(KP)提取率而言，酶解时间达到 6 h 后这个指标基本不变，但氨基酸分析结果显示酶解 7 h 游离氨基酸在总氨基酸中的比例 FAA/TAA 较低，有利于小肽含量的提高。

2.4 蛋白水解物的制取与分析

2.4.1 蛋白水解物制取工艺条件

根据以上讨论，

可以确定由啤酒酵母酶法制取蛋白水解物的工艺条件为：酵母初始质量分数 15%，β-葡聚糖酶用量 15～20 U/g(以酵母计)，酶解温度 55～60℃，酶解 pH 值 6.6～6.8，酶解时间 7 h。

2.4.2 酵母蛋白水解物组分相对分子质量分布及光谱分析 由于测定相对分子质量所用的标准曲线的工作范围在 189～12 500 之间，因此表 4 说明产物中没有相对分子质量在 2400～12 500 的大分子存在。产物的相对分子质量分布集中在 210～1 500 之间，这是人和动物小肠粘膜细胞极易吸收的相对分子质量范围，其中相对分子质量在 210～635 的组分占总组分的 65.26%，这些组分基本上处于二、三肽的水平。

2.4.3 KP 蛋白质 采用凯氏定氮法测得酵母蛋白水解物中 KP 蛋白质质量浓度为 72.54 mg/mL，由此得到酵母酶解的粗蛋白提取率为 82.51%。

表 3 酶解时间对产物提取率的影响*

Tab.3 Influences of hydrolysis time on extraction ratio					
酶解时间/h	KP 提取率/%	($w_{\text{AAN}}/w_{\text{KPN}}$)/%	DH/%	($w_{\text{FAA}}/w_{\text{TAA}}$)/%	TCA 溶解指数/%
3	63.93	42.38	38.70	45.98	98.67
4	70.45	41.34	41.61	46.6	100.6
5	74.36	42.59	45.24	48.94	97.70
6	82.18	41.63	48.87	49.55	97.92
7	82.44	43.34	51.05	46.33	97.09
8	82.61	44.48	52.50	49.33	97.93

注：AAN,氨基氮；KPN,粗蛋白氮；FAA,游离氨基酸；TAA,总氨基酸。

表 4 酵母蛋白水解物的相对分子质量分布和 λ_{max}

Tab.4 Distribution of molecule weight and λ_{max} in the hydrolysate of yeast protein

保留时间 R_T/min	相对分子 质量 M	重均相对分子 质量 M_w	数均相对分子 质量 M_n	分布宽度 指数	质量分数/%	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
16.59	2 394				3.40	
17.18	1 747				5.33	210
17.96	1 156	1 211	1 193	1.015	8.03	210 282
19.10	635	662	642	1.031	13.45	210 282
20.04	386				1.09	
20.62	284	298.3	296.8	1.005	8.03	210 286
21.19	210	204	199	1.025	42.69	210 286
23.37	< 189				0.88	264
24.00					1.3	260
25.17						210 270
25.94						210 270

3 结 论

利用啤酒废酵母制取蛋白水解物,蛋白质提取

率高,提取时间短,小肽含量丰富,且相对分子质量分布集中于二、三肽,可作为一种理想的蛋白质营养强化剂,也可作为合成矿物元素蛋白盐的理想配体.

参考文献:

- [1] 周衍椒,张镜如.生理学[M].北京:人民卫生出版社,1994.
- [2] 张晓鸣.啤酒酵母自溶动力学研究[D].无锡:无锡轻工大学,1997.
- [3] AOAC. Official Methods of Analysis 13th ed[M]. Washington DC: Association of Official Analytical chemists, 1980.
- [4] 刘福岭,戴行钧.食品物理与化学分析方法[M].北京:轻工业出版社,1987.
- [5] LOWRY O H. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951,193:265 ~ 268.
- [6] 尹象升.啤酒酿造用复合酶的研制[J].无锡轻工业学院学报,1994,13(4):300 ~ 309.