

万方数据

有关理论分析确定合适的自溶工艺参数,因为速度常数 K_a 值是由一系列数据(Y 和 t)回归分析的结果,以 K_a 值为指标比一般优化时取某一点数据(如溶出酵母量 Y)为指标考察自溶反应的影响因素更合理准确.由于溶出产物中粗蛋白(KP)和真蛋白(LP)均和残余酵母量 Y 之间存在很好的线性相关性^[1],在本研究中略去 KP、LP 的测定,只研究酵母固形物的溶出情况.

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 仪器设备

恒温水浴锅,阿贝尔折光仪,721 分光光度计.

1.3 分析方法

酵母浓度测定采用折光率法^[1],粗蛋白(Kjeldahl Protein, KP)测定采用凯氏定氮法,β-葡聚糖酶活力测定采用兰色葡聚糖法.

2 结果与讨论

2.1 温度对酵母自溶速度的影响

根据 Arrhenius 定律,温度对于反应速度常数有着较大的影响,为了得到最佳的温度条件,在 pH 6.8 酵母浓度为 10% 时于 40~60℃ 进行一系列自溶试验,如图 1 所示.

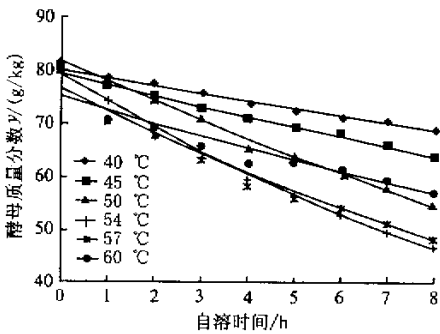


图 1 不同温度酵母自溶产物溶出情况

Fig.1 Kinetics of yeast autolysis at different temperatures

运用非线性最小方差法回归得到各温度条件下的动力学速度常数及相应的回归系数 r^2 .

不同温度下的反应速度常数差别很大,以表 1 中 K_a 的对数值对 T_k (绝对温度)的倒数作图,结果见图 2. 万方数据

表 1 温度对酵母自溶的影响 $Y = Y_0 e^{-K_a t}$

Tab.1 Effects of temperature on autolysis of yeast

温度/℃	K_a/h^{-1}	$Y_0/(g/kg)$	r^2
40	0.0188	80.38	0.97
45	0.0268	80.34	0.98
50	0.05075	83.16	0.99
54	0.06812	80.58	0.99
57	0.05796	77.45	0.96
60	0.0350	76.30	0.86

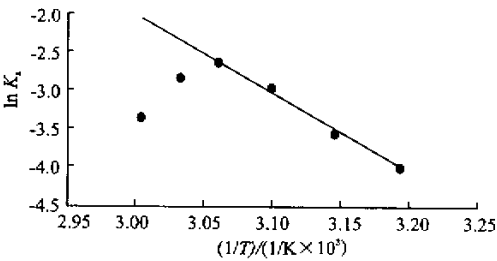


图 2 自溶速度常数和温度的关系

Fig.2 Relationship between rate constant of autolysis and temperature

通过回归分析可以得到如下类似 Arrhenius 方程的关系式:

$$\ln K_a = 27.27 - 9791/T_k \quad r^2 = 0.98 \quad (1)$$

此关系式成立的条件是 $T_k < 328\text{ K}$,即自溶温度低于 55℃. 根据 Arrhenius 方程:

$\ln K = \ln K_0 - E_a/RT$,可推知自溶反应中分子活化能为 $E_a = 81.40\text{ kJ/mol}$.

从表 1 可以看出,当温度从 40℃ 升高到 54℃,自溶速度常数增加了 2.6 倍,当温度升至 57℃, K_a 减小为 $K_{a\text{max}}$ 的 84%, 60℃ 时 K_a 为 $K_{a\text{max}}$ 的 57%.

如果把这个实验结果和酵母自溶的特点及酵母内源酶的性质联系起来分析,就很容易得到理想的解释.酵母细胞内的蛋白质大分子只有降解为可溶性小分子才能溢出胞外,温度较低时($t \leq 40\text{ }^\circ\text{C}$)适于内源蛋白酶中肽链端切酶 A 的作用,此时蛋白质降解为分子式量较小的肽和氨基酸,很容易释放到胞外介质中,但由于是端切酶作用,降解速度较慢,表现为自溶速度常数较小;当温度逐渐升至 45~55℃ 之间,内源酶中肽链外切酶 B 和内切酶 C 同时处于活性较高的最适作用状态,此时胞内蛋白质在内切酶 C 作用下快速降解为各种多肽或短肽片段,同时又受到外切酶 B 的作用使这些肽链片段进一步降解为易溶出的小肽和氨基酸,溶出速度自然是大大加快.从实验结果看,54℃ 左右时两种内源酶协同作用效果最好,当温度高于 55℃ 以后,胞内外切酶 A、B 和内切酶 C 的活力逐渐降低,只有内切

酶 D 发挥作用 ,虽然降解速度较快 ,无奈产物分子式量较大 ,溢出胞外过程受阻 ,自溶速度当然迅速下降 .

本试验结果表明 ,自溶温度对自溶速度影响非常显著 ,啤酒酵母自溶的最适温度在 54 ℃ 左右 .

2.2 外加破壁酶对酵母自溶速度的影响

根据对酵母细胞壁的结构分析并参考文献资料 ,酵母受到外加蛋白酶和葡聚糖酶的相继处理可加速自溶 .因此本研究添加一定的复合酶(主要成分为蛋白酶和 β-葡聚糖酶)于自溶介质 ,进行不同温度下的一系列自溶试验 .对实验数据进行非线性最小方差回归分析可得到表 2 所示的各温度条件下的速度常数 K_a 值 .

表 2 温度对加酶体系酵母自溶的影响 $Y = Y_0 e^{-K_a t}$ (20 U β-葡聚糖酶/g 酵母)

Tab.2 Effects of temperature on the autolysis of yeast added with enzymes 20 U β-glucanaze/g yeast

温度/℃	K_a/h^{-1}	$Y_0/(g/kg)$	r^2
40	0.0850	82.24	0.99
45	0.1088	81.93	0.99
50	0.1129	77.15	0.99
54	0.1339	72.62	0.97
57	0.1134	67.96	0.93
60	0.09168	69.00	0.90

以 K_a 为对数值对 T_k (绝对温度)的倒数作图 ,结果见图 3 .

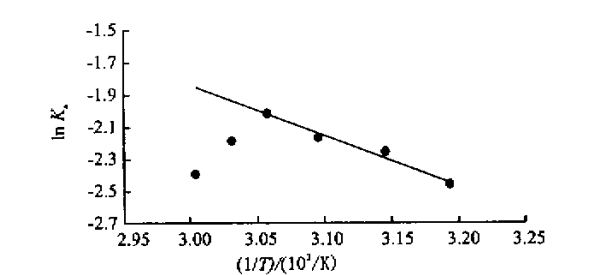


图 3 加酶自溶速度常数和温度的关系
Fig.3 Relationship between rate constant of yeast added with enzymes and temperature

通过回归分析可得到 :

$$\ln K_a = 7.269 - 3037/T_k \quad r^2 = 0.93 \quad (2)$$

由此可以推知相应的自溶反应中分子活化能为 $E_a = 25.75 \text{ kJ/mol}$,这个结果是一个典型的酶催化反应的数据 .一般化学反应的活化能在 40~400 kJ/mol ,多数在 50~250 kJ/mol^[21] ,而酶催化反应中反应物转变为产物的活化能为 25~63 kJ/mol^[31] .

比较表 1~2 中对应温度下 K_a 值及相应的活化能数据 ,可以发现 ,加入破壁复合酶后酵母自溶

速度明显加快 ,与不加酶相比 , $K_{a_{\max}}$ 提高了近一倍 ,分子活化能降低为原来的 1/3 .主要原因是细胞在内外源酶的作用下特别是引入外源破壁复合酶的作用后 ,产物溶出途径变得更为通畅 ,对分子式量的降解要求降低了 ,溶出速度显著提高 .

本试验结果同样证明自溶温度在 54 ℃ 左右溶出速度最快 ,这和不加酶的情况非常吻合 .

2.3 原料预处理对酵母自溶的影响

根据细胞壁的结构和自溶作用的理论 ,可以设想 ,采用一定的理化方法对酵母进行预处理 ,改变细胞壁的质构 ,可以影响自溶速度 .为此 ,研究了改变酵母细胞壁质构的预处理技术 ,并对经过预处理的酵母在一定条件下进行自溶及加酶自溶试验 ,实验数据的回归分析结果见表 3 .

表 3 预处理对酵母自溶速度常数的影响
Tab.3 Effect of pretreatment on the rate constant of yeast autolysis

自溶条件		速度常数 K_a/h^{-1}	r^2
不处理	无酶自溶	0.06812	0.99
	加酶自溶	0.1339	0.97
预处理	无酶自溶	0.1019	0.99
	加酶自溶	0.2462	0.98

注 :反应条件为 pH=6.8 ,质量分数 10% ,54 ℃ .

经过预处理的酵母其自溶动力学速度常数 $K_{a_{\max}}$ 比不处理组提高了 50% ,其加酶自溶组 $K_{a_{\max}}$ 比不处理的对应组提高了 80% ,说明预处理对破壁产生了明显的作用 .

2.4 酵母初始质量分数对自溶速度的影响

一般认为自溶体系中酵母初始质量浓度和反应时间、温度等因素是影响酵母自溶过程的主要变量 .为此作者考察了各种情况下酵母初始质量分数对自溶速度的影响 ,实验数据回归分析结果见表 4 .

表 4 酵母初始质量分数对酵母自溶速度的影响
Tab.4 Effects of concentration on the autolysis rate of yeast

原料处 理情况	质量分 数/%	无酶自溶		加酶自溶	
		K_a/h^{-1}	r^2	K_a/h^{-1}	r^2
不处理	6	0.06168	0.96	0.1218	0.96
	10	0.06812	0.99	0.1339	0.97
	14	0.06733	0.99	0.1398	0.98
预处理	10	0.1019	0.99	0.2462	0.98
	15	0.1143	0.99	0.2608	0.98

从表 4 的回归结果可以看出 ,不论酵母是否处理 ,酵母初始质量分数对自溶速度常数影响很小 ,这和一般化学反应动力学理论相符 .这一结果的指导意义在于 :在生产酵母提取物时 ,可以提高反应物质量分数从而降低提取、分离及干燥的成本而不

致于影响提取速率和得率.

2.5 NaCl 添加对自溶的影响

质壁分离是提取工艺中常用的快速引发细胞降解过程的一种技术. NaCl 是常用的质壁分离促进剂^[4,5]. 在食盐量较高的介质中, 酵母细胞为了和介质达到渗透压平衡而失去水分, 在极端条件下比如象质壁分离, 原生质膜内的成分随着膜脱离细胞壁, 只占据细胞壁内的一部分细胞体积. 质壁分离现象持续一段时间后就就会导致细胞死亡, 引发细胞的降解过程^[6]. NaCl 在促进质壁分离的同时还能起一定的杀菌效果, 使自溶过程中微生物污染减少.

但是过量的 NaCl 会限制产品在食品工业中的应用, 因为低钠提取物更受欢迎, 过量 NaCl 还可能抑制内源酶的活性, 影响自溶速度. 表 5 反映了不同 NaCl 添加量对自溶速度的影响.

表 5 NaCl 添加量对预处理酵母自溶的影响

Tab.5 Effects of additives on the autolysis of pretreated yeast

NaCl 质量分数/%	K_a/h^{-1}	r^2
0	0.1019	0.99
2.5	0.1278	0.97
5	0.1222	0.98

显然 NaCl 添加质量分数以 2.5% 为宜.

试验表明外加破壁复合酶与 NaCl 均能加快自溶速度, 这两种自溶促进剂是否具有协同效应值得进一步探索, 图 4 为加盐和加酶复合效应的试验情况.

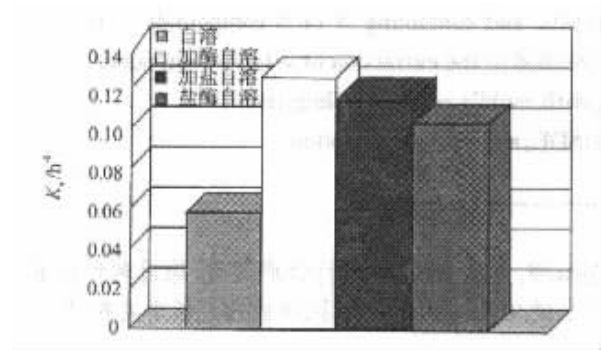


图 4 加盐和加酶复合效应的试验情况

Fig.4 Combined effects of salts and enzymes on the autolysis of yeast

由图 4 可以发现, 当 NaCl 和复合酶一起添加时, 其效果反而不如单独加盐或加酶组, 可能是由

于 NaCl 对复合酶的活性有抑制作用, 加入复合酶对质壁分离也有影响, 从而影响破壁效果, 降低自溶速度, 因此在制取酵母提取物时两者不宜同时添加.

2.6 酵母自溶工艺条件

根据酵母自溶动力学研究结果, 酵母自溶产物溶出遵循一级反应速率方程, 动力学过程呈指数衰减规律. 溶出产物中蛋白质的量(KP、LP)和溶出酵母量之间有很好的线性相关性. 因此对于一般的酵母蛋白质提取工艺, 只要有较高的酵母自溶速度, 就能保证较好的提取效率. 从以上实验结果可以归纳出自溶工艺.

啤酒废酵母→清洗除杂→脱苦脱臭→破壁处理→自溶提取→离心分离→干燥→成品

其中 酵母质量分数为 10% ~ 15%, 自溶温度 54℃ pH 6.8.

表 6 自溶法提取酵母蛋白质

Tab.6 Extraction of yeast protein by autolysis

NaCl 质量分数/%	蛋白质提取率/%	
	自溶 8 h	自溶 12 h
0	65.89	76.14
2.5	82.10	84.51

3 结 论

利用酵母自溶动力学方程考察了温度、破壁酶、酵母预处理、酵母初始质量分数、盐等理化处理对啤酒酵母自溶过程的影响. 温度对酵母自溶速度有很大影响. 通过回归分析得到不同体系中反映自溶温度和速度常数关系的 Arrhenius 方程及相应的自溶反应的活化能 E_a . 破壁预处理能显著加速酵母自溶, 经过预处理的酵母其自溶动力学速度常数 $K_{a_{max}}$ 比不处理组提高 50%. 添加破壁复合酶或食盐均有利于加速酵母自溶反应, 但两者复合添加有相互抑制作用. 酵母初始质量分数对自溶影响不大. 优化后的酵母自溶工艺条件为: 预处理酵母, 初始质量分数 10% ~ 15%, 自溶温度 54℃ pH 6.8, 自溶时间 8 ~ 12 h. 酵母粗蛋白提取率达到 65.89% ~ 76.14%, 加盐自溶条件下达到 82.10% ~ 84.51%, 这一指标明显高于一般自溶法提取蛋白质的水平.

参考文献：

[1] 张晓鸣. 啤酒酵母自溶动力学研究[D]. 无锡：无锡轻工大学, 1997.

(上接第 157 页)

[2] 天津大学编. 物理化学[M]. 北京 : 高等教育出版社 ,1983.

[3] 王璋. 食品酶学[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 ,1990.

[4] PEPPLER H J. Production of yeasts and yeast products in microbial technology[M]. NEW YORK : Academic Press ,1999. 157 ~185.

[5] NURMI J. Design of a yeast extract plant in food process engineering[M]. LONDON UK : J Applied Science Publishers ,1980. 646 ~652.

[6] GERALD REED , TILAK W NAGODAWITHANA. Yeast technology[M]. Milwaukee Wisconsin : Univeral Foods Corpopation ,1990. 376 ~377.

万方数据

(责任编辑 : 李春丽)