

文章编号: 1673 1689(2010)05-0660-05

大麦麦芽中抗酵母蛋白提取的最佳条件确定

姜晓雷, 李明达, 陈霞, 董学艳, 赵睿, 赵长新*

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 利用响应面分析了硫酸提取抗酵母蛋白时的硫酸浓度, 浸提时间和料液比 3 个单因对抗酵母蛋白提取率的影响, 研究发现, 最佳工艺条件为: 硫酸浓度为 0.051 mol/L、浸提时间为 3.6 h、料液比为 1:5.75, 在此条件下抗菌蛋白质量分数为 391.8 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 大麦; 抗酵母蛋白; 响应面分析

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Extraction of Antiyeast Protein from Barley Malt and Determination of Optimum Conditions

JIANG Xiao-lei, LI Ming-da, CHEN Xia, DONG Xue-yan, ZHAO Rui, ZHAO Chang-xin*
(School of Biological Engineering, Dalian Institute of Light Industry., Dalian 116034, China)

Abstract: In this study, the effect of sulfuric acid concentration, extraction time and ratio of water to material on the extraction of antiyeast protein from barley were determined, the optimum conditions of antiyeast protein extraction were described as follows: sulfuric acid concentration 0.05 mol/L, extraction time 3.6 h, ratio of water to material 1:5.75. with the optimum extraction conditions, the best extraction rate achieved at 391.8 $\mu\text{g/g}$.

Key words: barley malt, antiyeast protein, response surface analysis

大麦在自然界的生长过程中, 不可避免的要遭受自然界中一种或多种病原微生物的侵害, 为了抵御这种侵害, 大麦自身逐渐形成了各种各样的防御机制^[1-2]。一些植物通过分泌一些化学物质来杀灭或抑制某种病原真菌的侵染或生长, 有些产生一系列的抗菌蛋白或抗菌多肽, 这些抗菌多肽或抗菌蛋白具有广谱抗菌性, 到目前为止, 一些类型的抗菌蛋白和抗菌肽已经被分离出来, 并且有些结构和功能已经研究得比较清楚, 如植物或昆虫, 哺乳动物

防御素, 硫堇, 橡胶素, 类打结素, 脂转移蛋白等^[3-5]。1970 年, Okada^[6] 等人从大麦和小麦中分离出了一种抗菌蛋白, 相对分子质量在 9 000 左右, 这种蛋白具有广谱抗菌性, 能耐受 100 $^{\circ}\text{C}$ 的高温; 2004 年和 2005 年, Gorjanović, S.^[7-8] 等人从大麦中分离出来一种相对分子质量在 16 000 的蛋白, 并指出是一种脂转移蛋白。2008 年, Sandra N. E.^[9] 等人从大麦中粗提出一类含抗菌的多组分蛋白, 里面含有 NS-LTP, 硫堇, 植物防卫素等, 具有强烈的

收稿日期: 2009-09-30

基金项目: 国家“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2007BAK36B01)。

* 通信作者: 赵长新(1955-), 男, 宁夏人, 教授, 主要从事酿造大麦蛋白组学及酵母代谢机理研究。Email: zha
ochangxin@126.com。

抗菌活性。本文在前人的基础上改变提取蛋白的方法,优化提取条件,提高了抗酵母蛋白的提取率。

1 材料与方

1.1 材料

大麦:澳大利亚大麦(*Hordeum sp.* Gairdner):由大连中粮麦芽集团提供。

1.2 方法

1.2.1 抗菌蛋白的制备 将绿麦芽粉碎后,取50目粉末与0.05 mol/L 硫酸以1:4混合,冰浴浸提3 h,中间每隔15 min 搅拌一次,提取结束后,在4℃,8 000 r/min,离心10 min,除去沉淀,上清用0.5 mol/L 氢氧化钠调Ph 值为7.0,上清液中加入硫酸铵使饱和度达到30%,放置2 h后,在4℃,10 000 r/min,离心10 min,除去沉淀,上清液加入硫酸铵至饱和度为80%,在4℃,10 000 r/min,离心10 min,除去上清,用少量去离子水复溶沉淀得抗菌蛋白液,将水复溶的抗菌蛋白液加入排阻1 000的透析袋中,用去离子水透析过夜,至无硫酸根离子(用氯化钡检测),在4℃,10 000 r/min,离心10 min,去除沉淀,上清液冷冻干燥后加入体积分数25%乙腈溶液(即乙腈:水=1:4)复溶,在4℃放置1 h后10 000 r/min,离心10 min 去除沉淀,保留上清液,保留的上清液用0.45 μm 的硝酸纤维滤膜过滤,即为抗菌蛋白液。实验组将抗菌蛋白液加入到酵母培养基中所得吸光值,空白对照为将体积分数25%乙腈溶液(即乙腈:水=1:4)加入到酵母培养液中所得吸光值^[6-7,9]。

1.2.2 抗酵母菌活性测定 对酵母抗菌活性的测定:将酵母接种酵母培养基中(质量分数1%葡萄糖、质量分数0.5%蛋白胨、质量分数0.5%酵母膏、质量分数0.3%大麦汁),28℃培养12 h,使酵母数量达到 1.25×10^7 个/mL。按5%接种量接种新的酵母培养基中,使酵母数量达到 6×10^5 个/mL,加入提取的蛋白液1 mL,使蛋白达到一定得含量,培养24 h,在600 nm 下测定吸光值。

抑菌率按如下公式:抑菌率 = $(A_D - A_S) / A_D$, A_D 为空白在600 nm 吸光值, A_S 为实验组样吸光值。

1.3 抗菌蛋白含量测定

用考马斯亮蓝法测蛋白质含量^[8]。

1.4 抗菌蛋白提取的单因素实验

不同浸提浓度、时间、液料比对抗酵母蛋白提取率的影响。

2 结果与讨论

2.1 不同浸提液所得蛋白抗酵母活性比较

由0.05 mol/L 硫酸、柠檬酸、水浸提所得蛋白,加入到酵母培养基中,使蛋白含量达到32 μg/mL,酵母数量为 6×10^5 个/mL,培养24 h,每4 h 在600 nm 测定吸光值,由图1看出硫酸所提蛋白抗菌蛋白抗菌活性明显,柠檬酸提取的和

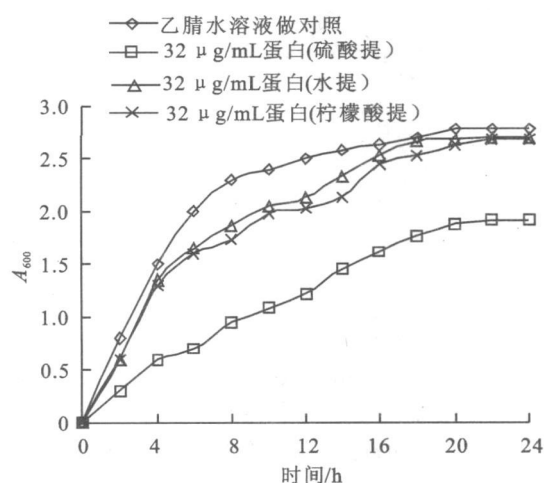


图1 不同浸提液所得蛋白对酵母生长影响

Fig. 1 Effects of crude protein from different extracts on yeast growth

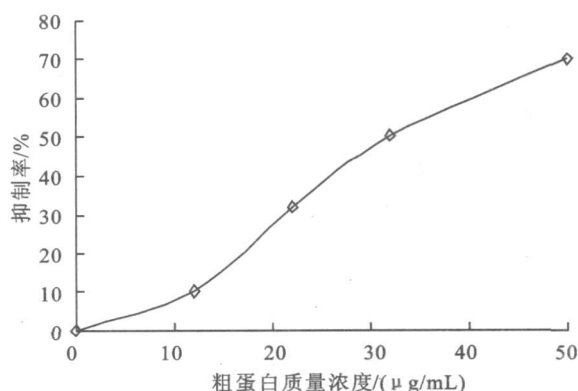


图2 不同含量的粗蛋白对酵母生长的影响

Fig. 2 Effects of the crude protein content on yeast growth

由图2可知,随着培养基中蛋白含量的增加,酵母生长抑制率也在增加,当蛋白含量达到32 μg/mL,培养12 h后抑菌活性接近50%。

2 2 不同浓度硫酸浸提对抗酵母蛋白提取率的影响

图 3 表示其它条件不变(提取时间 3 h, 液料比 6: 1(mL:) g), 不同硫酸浓度对抗酵母蛋白提取率的影响。由图 3 可以看出, 硫酸浓度在 0. 05 mol/ L 时候, 抗酵母蛋白的提取率最高, 每克大麦浸提量达到 390 μ g。硫酸浓度低于 0. 05 mol/ L 时, 提取率较低, 是由于酸浓度低对杂蛋白的酸解不够, 保留了很多的杂蛋白; 当硫酸浓度高于 0. 05 mol/ L 时, 由于酸浓度过高造成了抗菌蛋白的酸解, 故提取率降低。

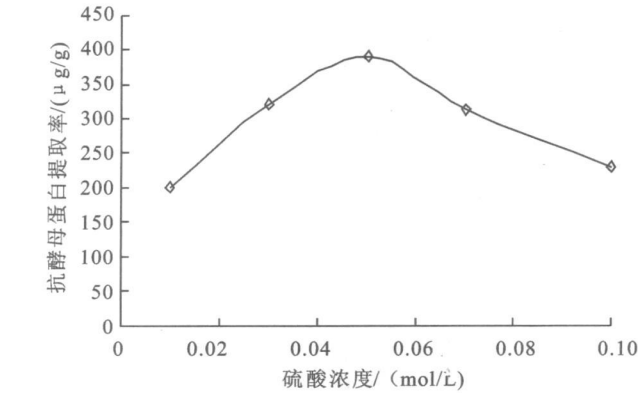


图 3 不同硫酸浓度对抗酵母蛋白提取率的影响
Fig. 3 Effect of sulfuric acid concentration on the extraction rate of Antiyeast protein

2 3 不同浸提时间对抗酵母蛋白活性检测

图 4 表示其它条件不变(硫酸浓度 0. 05 mol/ L, 液料比 6: 1(mL:) g), 不同浸提时间对抗酵母蛋白提取率的影响。由图 4 可知, 浸提 3 h 内, 抗酵母蛋白提取率随着浸提时间在上升, 3 h 以后提取率保持不变。

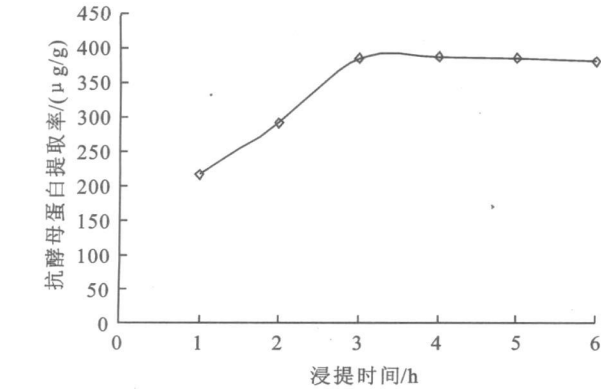


图 4 不同浸提时间对抗酵母蛋白提取率的影响
Fig. 4 Effect of extract time on the extraction rate of Antiyeast protein

2 4 不同液料比对抗酵母蛋白提取率的影响

图 5 表示其它条件不变(硫酸浓度 0. 05 mol/

L, 浸提时间 3 h) 不同液料比对抗酵母蛋白提取率的影响。由图 5 可以看出, 液料比在 6: 1(mL: g) 以内, 由于抗酵母蛋白没有完全浸提出来, 所以提取率在随着液料比的加大而增加, 大于 6 mL/ g 时, 蛋白已经浸提充分, 提取率基本不变。

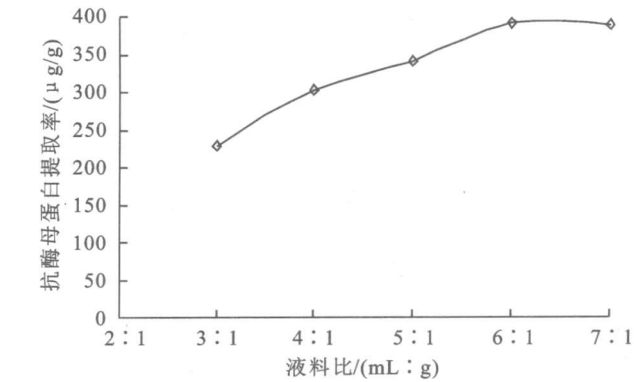


图 5 不同料液比对抗酵母蛋白提取率的影响
Fig. 5 Effect of water to material ratio on the extraction rate of Antiyeast protein

3 响应面法对抗酵母蛋白提取条件的优化

在单因素试验的基础上, 根据响应面分析软件提供的模型, 设硫酸浓度, 浸提时间, 料液比三因素为自变量, 抗酵母蛋白含量为响应值, 运用 Minitab15 数据处理软件进行响应曲面分析(response surface analysis , RSA), 对提取条件进行优化。响应面设计因素水平设计见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平

Tab. 1 Level of factor s chosen for the trials			
水 平	因 素		
	Z ₁ 硫酸浓度 (mol/ L)	Z ₂ 浸提 时间(h)	Z ₃ 料液比 (mL: g)
-1	0. 04	2	1: 5
0	0. 5	3	1: 6
1	0. 06	4	1: 7

以 $X_1 = (Z_1 - 0. 05)/0. 01$, $X_2 = (Z_2 - 3)/1$, $X_3 = (Z_3 - 6)/1$ 为自变量, 以抗酵母蛋白含量为响应值(Y), 进行响应面分析试验, 结果见表 2。

表 2 响应面分析试验结果

Tab. 2 Result s of RSM analysis				
试验号	X ₁	X ₂	X ₃	抗菌蛋白质质量分数 (μ g/ g)
1	0	- 1	1	371
2	0	0	0	393
3	- 1	- 1	0	382

续表 2

试验号	X_1	X_2	X_3	抗菌蛋白质量分数 ($\mu\text{g/g}$)
4	0	0	0	397
5	0	0	0	399
6	1	1	0	377
7	- 1	0	1	375
8	0	- 1	- 1	386
9	1	0	1	374
10	1	0	- 1	379
11	- 1	1	0	370
12	0	0	1	388
13	0	1	- 1	380
14	- 1	0	- 1	384
15	1	- 1	0	373

以抗菌蛋白含量为响应值, 根据表 2 的试验结果, 进行多元回归分析, 结果见表 3。从方差分析表中可以看出, 各具体试验因子对响应值的影响的线性关系, 其中方程二次项呈显著影响。经回归拟合, 试验因子对响应值的影响可表示为:

$$Y=396.33-X_1+0.38X_2-2.63X_3+4X_1X_2+X_1X_3+5.75X_2X_3-12.04X_1X_1-8.79X_2X_2-6.29X_3X_3$$

表 3 回归方程的方差分析

Tab. 3 Significance analysis of modle for quadratic response surface model

回归项	自由度	平方和	F 值	大于 F 的概率
一次项	3	64.25	1.49	0.325
平方项	3	851.32	19.73	0.003**
交互项	3	200.25	4.64	0.066
总回归	9	1115.82	8.62	0.014*

*** 显著性在 0.01, * 显著性在 0.05。

根据上述回归方程作出响应面分析图(图 6, 7, 8), 比较 3 个图可知, 存在极值的条件应该在圆心处, 对抗酵母蛋白含量影响的显著性从大到小依次是硫酸浓度, 浸提时间, 料液比。硫酸浓度的影响较大, 表现为曲线较陡, 液料比的影响较小, 表现为曲线较为平滑, 这与回归分析的结果吻合。

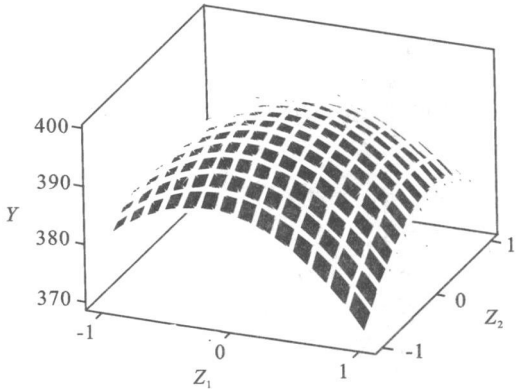


图 6 硫酸浓度(Z_1)与浸提时间(Z_2)对抗酵母蛋白提取率的影响

Fig. 6 Effects of sulfuric acid concentration (Z_1) and extract time (Z_2) on the antiyeast protein extraction rate

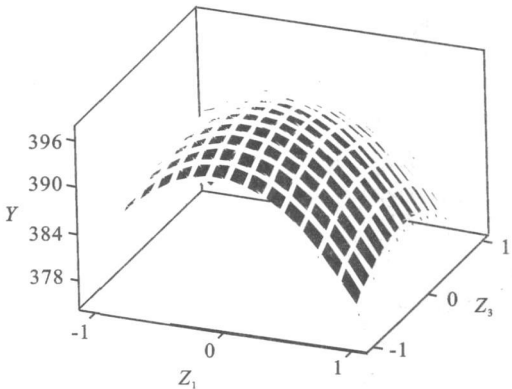


图 7 硫酸浓度(Z_1)与料液比(Z_3)对抗酵母蛋白提取率的影响

Fig. 7 Effects of sulfuric acid concentration (Z_1) and water to material ratio (Z_3) on the antiyeast protein extraction rate

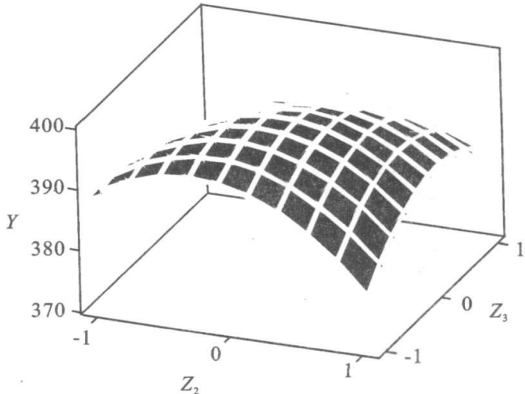


图 8 浸提时间(Z_2)与料液比(Z_3)对抗酵母蛋白提取率的影响

Fig. 8 Effects of extract time (Z_2) and water to material ratio (Z_3) on the antiyeast protein extraction rate

4 验证性实验

对回归方程求一阶偏导数等于零,可得到 3 个方程,

- 1- 24.08 X_1 + 4 X_2 + X_3 = 0 (1)

0.38+ 4 X_1 - 17.58 X_2 + 5.75 X_3 = 0 (2)

- 2.63+ X_1 + 5.75 X_2 - 12.58 X_3 = 0 (3)

联立方程组(1)、(2)、(3)解得 X_1 = 0.049 7, X_2 = 0.611 31, X_3 = - 0.248 即抗酵母蛋白提取的最优提取条件为:硫酸浓度为 0.051 mol/L、浸提时间为 3.6 h 和料液比为 1: 5.75 (mL: g),由回归方程可以确定抗酵母蛋白含量为 392.7 μ g/g。为检验结果的可靠性,采取响应面分析法求得的最佳条件进行三次平行试验,结果得出抗菌蛋白的实际平

均含量为 391.8 μ g/g。与理论预测值基本吻合,相对误差为 0.23%。因此,利用响应面分析法得到抗菌蛋白最佳提取条件真实可靠,为以后的实验提供了依据。

5 结 语

实验得出利用硫酸提取抗酵母蛋白,其杂蛋白含量低,有很强的抗菌活性。在单因素实验的基础上,将响应面法应用于优化抗菌蛋白的提取工艺。回归分析结果表明,硫酸浓度,浸提时间对抗酵母蛋白含量的影响比较显著。响应面分析结果表明,最佳工艺条件为:硫酸浓度为 0.051 mol/L、浸提时间为 3.6 h、料液比为 1: 5.75 (mg: g),在此条件下抗菌蛋白含量为 391.8 μ g/g。

参考文献(References):

[1] Shew rv P R , Casev R. Seed Proteins[M]. Dordrecht : Kluwer Academic , 1999.

[2] Scott J H , Schekman R. Endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis[J] . **Bacteriol**, 1980, 142:414- 423.

[3] Molina A , Garcí a Olmedo F. Developmental and pathogen induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins[J]. **Plant**, 1993, 4:983- 991.

[4] Garcí a Olmedo F, Molina A, Segura A, et al. The defensive role of nonspecific lipid transfer proteins in plants[J] . **Trends Microbiol**, 1995, 3, 72- 74.

[5] Douliez J P, Michon T, Elmorjani K, et al. Structure, biological and technological functions of lipid transfer protein and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels[J] . **Cereal Sc**, 2000, 32, 1- 20.

[6] Okada T, Yoshizumi H. A lethal toxic substance for brewery yeast in wheat and barley. Part II. Isolation and some properties of toxic principle[J]. **Agri Biol Chem**, 1970, 34, 1089- 1094.

[7] Gorjanovic S, Sužnjec D, Beljanski M, et al. Effects of lipid transfer protein from malting barley on brewers yeast fermentation[J] . **Inst Brew**, 2004, 110, 297- 302.

[8] Gorjanovic S, Spillner E, Beljanski M, et al. Malting barley grain non specific lipid transfer protein (ns LTP): importance for grain protection[J] . **Inst Brew**, 2005, 111(2) , 99- 104.

[9] Sandra NE, van Nierop, Barry C Axcell, et al. Optimised quantification of the antiyeast activity of different barley malts towards a lager brewing yeast strain[J]. **Food Microbiology**, 2008, 25: 895- 901.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J] . **Anal Biochem**, 1976, 72: 248- 254.

(责任编辑: 杨萌)