

# 啤酒酵母中 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的水解条件的优化

徐希柱<sup>1</sup>, 郭英浩<sup>2</sup>, 李宝华<sup>1</sup>

(1. 泰山医学院医学检验系, 山东 泰安 271018) (2. 山东省新汶自来水公司, 山东 新汶 271219)

**摘要:** 对啤酒酵母中  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖(用碱-酶法从啤酒废酵母中提取)的水解条件进行了优化。研究表明影响  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解条件的因素顺序依次为: 预水解硫酸浓度>水解温度>水解硫酸浓度>水解时间; 水解参数为: 预水解硫酸浓度 12 mol/L、水解硫酸浓度 2 mol/L、水解温度 100 °C、水解时间 24 h。此条件下用苯酚-硫酸法测得的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量为 83.1%。

**关键词:** 废啤酒酵母;  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖; 水解条件

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0563-04

## Optimization of Hydrolysis Conditions of $\beta$ -(1,3)-D-glucan from Beer Yeast

XU Xi-zhu<sup>1</sup>, GUO Ying-hao<sup>2</sup>, LI Bao-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Taishan Medical University, Taian 271018, China)

(2. Xinwen Water Supply Company, Xinwen 271219, China)

**Abstract:** In this study, the hydrolysis conditions of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan from beer yeast were optimized by single factor and orthogonal design. The results showed that the sequence of the influential factors was as follows: sulfuric acid concentration in pretreatment > hydrolysis temperature > sulfuric acid concentration in hydrolysis > hydrolysis time. The optimum hydrolysis conditions were as follows: 12 mol/L of sulfuric acid in pretreatment, 2 mol/L of sulfuric acid in hydrolysis, 100 °C of hydrolysis temperature and 24 h of hydrolysis time. Under these conditions, phenol-sulfuric method showed that  $\beta$ -(1,3)-D-glucan content reached 83.1%.

**Key words:** waste beer yeast;  $\beta$ -(1,3)-D-glucan; hydrolyzation condition

啤酒是我国第一大饮料酒,2006年产量已达3515万千升,居世界第一位,年产啤酒废酵母可达5万多吨(干基)。啤酒酵母细胞壁中含有大量的 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖,约占酵母细胞壁干重的29%<sup>[1-2]</sup>。 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖能够通过刺激免疫系统而提高机体的免疫力,作为一种真菌多糖,已证实对肿瘤、肝炎、糖尿病等疑难病具有较好的疗效, $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖还能够改善食品的质地,可作食品中增稠剂、脂肪的替代物,能够在肉制品中作为持水持油剂,并可作食品中膳食纤维的来源,是一种非常优良的食品添加剂<sup>[3-5]</sup>。

$\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的分子量在80 kD~240 kD之间,既不溶于一般性的酸,也不溶于碱,是典型的沉淀物质。虽然可以溶于二甲基亚砜中,但是任何一种利用这种溶液进行测定的方法都改变了它的溶解状态,恢复为沉淀物质<sup>[6]</sup>。 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖是由葡萄糖键为主链,以 $\beta$ -(1,6)键为侧链连接的多糖,在一定条件下能够被浓硫酸水解,因此,可以将其彻底水解为葡萄糖

后再运用苯酚-硫酸法测定葡萄糖的含量,从而间接地得出产品中 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量。

目前,我国还没有统一的标准来测定啤酒酵母中 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量。由于水解条件对检测结果会产生直接的影响,鉴于此,本文对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的水解条件进行了优化研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

##### 1.1.1 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖

实验室用碱-酶法从酵母粉(山东泰山啤酒有限公司提供)中提取,方法如下:

干燥的啤酒酵母粉经过水洗、脱色后,按照150:10(V/m)的比例加入3%的NaOH溶液,在80 °C水浴条件下水解2 h,离心,洗涤,调整pH在8.5~9.0后加入600 U/g的碱性蛋白酶,在55 °C下水解24 h,离心,沉淀,干燥得到成品。

其它化学试剂均为分析纯。

##### 1.1.2 实验仪器

收稿日期: 2008-02-18

作者简介: 徐希柱, 硕士, 助教。研究方向: 食品理化性质检验

UV-2100 型分光光度计: UNICO (上海) 仪器有限公司; 高速万能粉碎机: 北京科伟永兴仪器有限公司; LXJ-IIB 低速大容量多管离心机: 上海安亭科学仪器厂; pH-3C 酸度计: 上海理达仪器厂; GR-200 分析天平: METTLER TOLEDO; 电子恒温水浴锅: 国华电器有限公司; KDN-04B 凯氏定氮仪: 上海新嘉电子有限公司; SC69-02C 水分快速测定仪: 上海精密科学仪器有限公司; 101A-3 电热鼓风干燥箱: 黄骅市卸甲综合电器厂。

### 1.2 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的水解

准确称取葡聚糖 5 mg, 放入 50 mL 的具塞刻度试管中, 加入 4.0~12.0 mol/L 硫酸溶液 5 mL, 水解 25 min 后, 加水稀释至 1.0~3.0 mol/L, 封管水解, 在 80~100 °C 水浴锅中水解 6~30 h。取出刻度试管后加水至 50 mL, 充分搅拌均匀, 取 10 mL 溶液, 再加入 40 mL 水, 充分均匀后加入 12~14 g BaCO<sub>3</sub>, 进行中和沉淀, 在反应基本没有气泡时用 pH 试纸测定 pH 值为 7.0, 反应结束。将溶液进行离心分离, 4200 r/min 条件下离心 10 min。取上清液用滤纸过滤, 滤液再进行同上条件离心。离心后的液体再次进行滤纸过滤, 即得葡聚糖的水解液。

### 1.3 葡聚糖含量的测定

#### 1.3.1 葡萄糖标准曲线的制作

准确称取标准葡萄糖 20 mg 于 500 mL 容量瓶中, 加水至刻度线, 分别吸取 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.6 mL、1.8 mL、2.0 mL, 各以水补足 2 mL。然后加入 6% 苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5 mL。静止 10 min, 摇匀, 室温放置 20 min 后于 490 nm 下测定吸光度。以 2.0 mL 水按同样显色操作为空白, 横坐标为糖溶液的 mL 数质量浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 纵坐标为吸光度值, 得到标准曲线。见图 1。

由图 1 得线性回归方程:

$$Y=0.2919X-0.0178 \quad (R^2=0.9979)$$

式中: Y-吸光度; X-标准葡萄糖溶液的质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。

#### 1.3.2 样品含量的测定

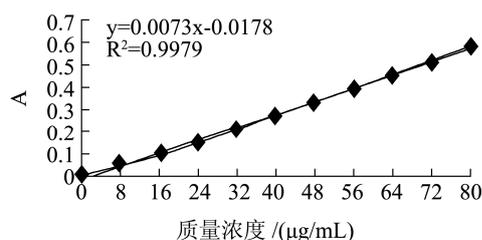


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Calibration curve of glucose

吸取样品液 1 mL (相当于 40  $\mu\text{g}$  左右的  $\beta$ -(1,3)-D-

-葡聚糖), 按上述步骤操作测吸光度值, 以标准曲线计算出样品中的葡萄糖的质量浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 预水解硫酸浓度对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解释的影响

按照 1.2 的水解方法, 在水解硫酸浓度为 2.0 mol/L、水解温度为 100 °C、水解时间为 24 h 的条件下, 考察 4~12 mol/L 的预水解硫酸浓度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解释的影响, 结果见图 2。

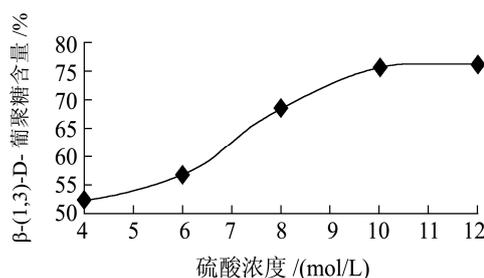


图 2 预水解硫酸浓度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量的影响

Fig.2 Effect of sulphuric acid concentration in pretreatment on content of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan

由图 2 可明显看出, 测得的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖样品的含量随着预水解硫酸浓度的增大而不断上升, 但是在较高的浓度时  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量趋于平缓, 这说明此时的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖预水解较好。因此该单因素选择 8 mol/L, 10 mol/L, 12 mol/L 作为正交条件。

#### 2.1.2 硫酸浓度对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解释的影响

按照 1.2 的水解方法, 在预水解硫酸浓度为 10 mol/L、水解温度为 100 °C、水解时间为 24 h 的条件下, 考察 1.0~3.0 mol/L 的硫酸浓度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解释的影响, 结果见图 3。

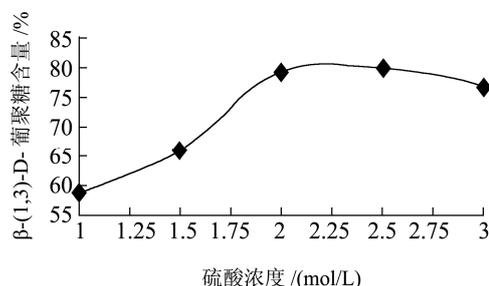


图 3 水解硫酸浓度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量的影响

Fig.3 Effect of concentration of sulphuric acid on content of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan

由图 3 可看出, 测得的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖样品的含量随着水解硫酸浓度的增大而不断上升, 但是在较高的浓度时  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量趋于下降, 这说明此时的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖已经被水解过度, 导致  $\beta$ -(1,3)-D-

葡聚糖含量下降。因此该单因素选择 2.0 mol/L, 2.5 mol/L, 3.0 mol/L 作为正交条件。

### 2.1.3 温度对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解的影响

按照 1.2 的水解方法, 在预水解硫酸浓度为 10.0 mol/L、水解硫酸浓度为 2.0 mol/L、水解时间为 24 h 的条件下, 考察 80~100 °C 的水解温度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解的影响, 结果见图 4。

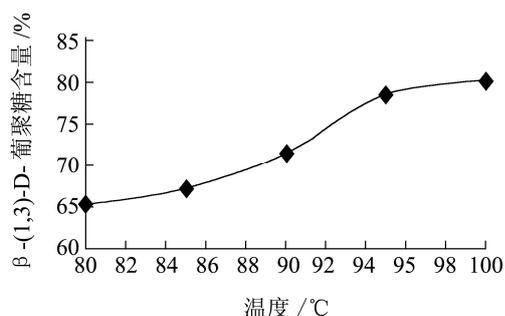


图4 水解温度对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis temperature on content of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan

由图 4 可明显看出, 测得  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖样品的含量随着水解温度的升高而不断增大, 在较高的温度时  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量增长幅度减缓, 这说明此时的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖已经接近于水解彻底。因此该单因素选择 90 °C、95 °C、100 °C 作为正交条件。

### 2.1.4 时间对 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解的影响

按照 1.2 的水解方法, 分别水解 6 h、12 h、18 h、24 h、30 h, 苯酚-硫酸法测定  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量。具体结果见图 5。

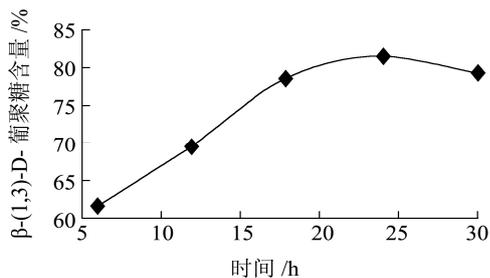


图5 水解时间对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on content of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan

由图 5 可明显看出, 测得  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖样品的含量随着水解时间的延长而不断增大, 在较长的时间时  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的含量呈下降的趋势, 这说明此时的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖处于水解过度状态, 时间不能再延长。因此该选择 18 h、24 h、30 h 作为正交条件。

## 2.2 正交实验

为了进一步提高  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解的程度, 在单因素实验的基础上, 采用正交实验的方法, 设计四

因素三水平实验, 对  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖水解条件进行优化。正交实验的设计及实验结果如表 1、2 和 3 所示。

表 1  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖分析因素水平编码表

Table 1 Factor levels of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan hydrolysis

水平	A 预水解硫酸浓度/(mol/L)	B 硫酸浓度/(mol/L)	C 水解温度/°C	D 水解时间/h
1	8	2.0	90	18
2	10	2.5	95	21
3	12	3.0	100	30

表 2 正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal test

编号	A	B	C	D	结果
1	1	1	1	1	66
2	1	2	2	2	73.6
3	1	3	3	3	72.5
4	2	1	2	3	80.3
5	2	2	3	1	79.5
6	2	3	1	2	72.5
7	3	1	3	2	82.5
8	3	2	1	3	74.5
9	3	3	2	1	77.5
均值1	70.700	76.267	71.000	74.333	
均值2	77.433	75.867	77.133	76.200	
均值3	78.167	74.167	78.167	75.767	
极差	7.467	2.100	7.167	1.867	

表 3 正交实验方差分析结果

Table 3 Variance analysis of the orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值
A	164.507	2	1.647	
B	72.507	2	0.726	
C	133.327	2	1.335	4.460
D	29.180	2	0.292	
误差	399.52	8		

以上正交实验经方差分析后可知: 对于  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量 A、C 两因素对其影响较显著, 而 B、D 两因素对其影响不显著, 其正交试验最佳水平为  $A_3B_1C_3D_2$  即: 预水解硫酸浓度为 12 mol/L、水解硫酸浓度为 2 mol/L、水解温度为 100 °C、水解时间为 24 h。

## 2.3 验证实验

采用上述条件经验证实验, 得到  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量为: 83.1%, 高于正交实验中所有实验组合。

## 3 讨论

在大多数有关  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的文献与研究中,

其中  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖测定选择的条件多是：先用 8 mol/L 的硫酸常温下短时间预水解 5 min，然后稀释为 1.5 mol/L，于 100 °C 下水浴水解 3 h，然后定容至 250 mL，取 1 mL 测多糖。但是采用这种方法，得到的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量相对较低，因此，葡聚糖在水解时的条件极为重要，既要完全将样品中葡聚糖彻底水解又要防其水解过度。需要说明的是，预水解硫酸浓度并非越高越好，在 12 mol/L 以上，预水解时易发生黑色沉淀现象。这可能是由于浓硫酸把  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖氧化为黑色腐殖物形成沉淀。己糖能够与酸共热生成 5-羟甲基糠醛，在酸性条件下受热可进一步作用，分解成己酰丙酸、甲酸和暗色的不溶缩合物 (humins)，称腐黑物，因此  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的结果非常低。

## 4 结论

通过单因素和正交试验，影响  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖含量测定各因素的顺序依次为：预水解硫酸浓度>水解温度>水解硫酸浓度>水解时间。水解参数为：预水解硫酸浓度 12 mol/L、水解硫酸浓度 2 mol/L、水解温度

100 °C、水解时间 24 h。 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖测定含量为 83.1%。

## 参考文献

- [1] Bron A. Donzis. substantially purified beta(1,3), finely ground yeast cell wall glucan composition with dermatological and nutritional uses[p]. us:5 576 015, 1996.11-19
- [2] 黄刚良,刘曼西,等.啤酒酵母中  $\beta$ -(1,3)-D 葡聚糖的提取及其机理研究[J].精细化工,2003, (8): 458-459
- [3] 李花霞,杨文鸽,等.废酵母中碱不溶性葡聚糖的制备及其理化性质.现代食品科技, 2004, 20(4): 53-55
- [4] 唐治玉,王淮等.自溶-酶-碱法提取啤酒酵母中  $\beta$ -1,3-葡聚糖的工艺研究[J].现代食品科技,2006,22(2): 28-30
- [5] 李祥,罗仓学,等.酵母残渣中  $\beta$ -(1,3)-葡聚糖的提取及性质表征[J].酿酒,2004, 31(4): 27-29
- [6] P.Thanardkit, P.Khunrae, M.Suphantharika and C.Verduyn. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed[J].World Journal of Microbiology & Biotechnology,2003,18:527-539

(上接第 570 页)

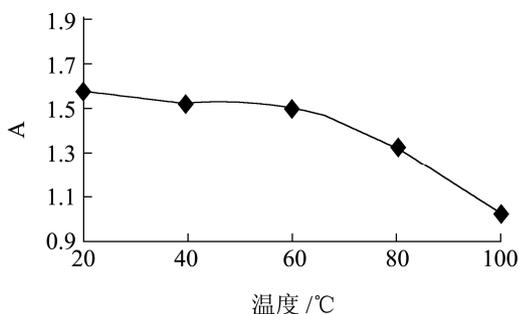


图 12 温度对长枣红色素稳定性的影响

Fig.12 Thermo stability of red pigment of long jujube

由图 12 可知，长枣红色素在 20~60 °C 吸光值变化不大，色素对低温较稳定，当温度大于 60 °C 时，吸光值变化较大，说明该色素在 60 °C 以上对热不稳定，可能发生了一定程度的降解<sup>[9]</sup>。

## 5 结论

5.1 由实验可知，酶解醇提长枣红色素最佳工艺参数为：料水比 1:20 (m/V)，粉碎度 60 目，酶解温度 50 °C，酶解时间 40 min，酶解 pH 为 6，加酶量 1%，酶解液用 3 倍体积的 80% 乙醇浸提，该条件下提取可得到深红色浸膏状粗色素，得率为 9.85%。

5.2 长枣红色素除在强氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和碱性条件中稳定性较差外，在光照、低温、还原剂、酸性条件中均

具有良好的稳定性。

## 参考文献

- [1] 杜芳艳,邓保炜.红枣色素提取工艺及理化性质研究[J].西北林学院学报,2005,(1):11-13
- [2] 张光弟,俞晓艳.影响灵武长枣保鲜效果的关键因素[J].宁夏农学院学报,2004,(1):30-33
- [3] 朱连成,魏卫东,菊芳.灵武长枣的优良性状及发展前景[J].宁夏农林科技,2002,(3):33-34
- [4] 王振宇,杨谦.酶法制备花色苷的研究[J].中国甜菜糖业,2004,(4):26-28
- [5] 冯璐,芮汉明.芒果皮中黄色素不同提取方法的比较[J].食品与发酵工业,2006,(12):15-157
- [6] 孙灵霞,陈锦屏,刘凤英.红枣色素的提取工艺的研究[J].食品工业科技,2005,(1):154-157
- [7] 陈晓惠,徐雅琴.酶法提取树莓叶黄酮类化合物的研究[J].食品研究与开发,2007,(2):37-39
- [8] 祖丽皮亚·尤努斯,帕孜来提·拜合提,阿不都拉·阿巴斯.红枣色素的提取及其稳定性研究[J].食品科学,2006,(3):154-156
- [9] 樊君,吕磊,李红燕.大枣红色素的提取及其稳定性[J].食品科学,2005,(6):52-54