

自溶-酶联技术制备啤酒废酵母抽提物工艺及产物理化参数研究

江凌¹, 田小群², 朱明军¹, 陈江², 梁世中¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)(2. 广州珠江啤酒集团有限公司, 广东 广州 510308)

摘要: 为了提高啤酒酵母的利用率, 利用啤酒废酵母资源, 采用自溶与添加外源酶相结合的方法制备酵母抽提物。以氨基氮得率、总氮得率和固形物得率为主要指标考察了对酵母自溶影响关键的几个因素, 包括自溶促进剂、自溶时间、酶解时间, 并在此基础上对酵母酶联自溶进行正交试验, 结果表明: 自溶-酶联技术是制备啤酒酵母抽提物的理想方法, 制成品中氨基氮得率、总氮得率和固形物得率分别达到 4.30%、8.98% 和 59.0%。并对其物理性状、溶解性、pH、干湿比、总氨基酸含量等理化参数指标进行评定。

关键词: 啤酒废酵母; 酶解自溶; 酵母抽提物

中图分类号: TQ92; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0444-04

Study on Production and Physiochemical Characteristics of Waste Beer Yeast Extract by Autolysis-enzymolysis Method

JIANG Ling¹, TIAN Xiao-qun², ZHU Ming-jun¹, CHEN Jiang², LIANG Shi-zhong¹

(1. College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)(2. Guangzhou Zhujiang Brewery Group Co., Ltd., Guangzhou 510308, China)

Abstract: The autolysis-enzymolysis method was adopted to prepare yeast extract in order to make full use of the waste beer yeast. The key factors influencing the autolysis of waste beer yeast were optimized, including autolysis promoter, autolysis time and enzymolysis time. Results showed that the autolysis-enzymolysis method was suitable for the yeast extract production. Under the optimized conditions, the yields of amino nitrogen, total nitrogen and solid reached 4.30%, 8.98% and 59.0%, respectively. Furthermore, the physiochemical characteristics of the achieved yeast extract were investigated.

Key words: waste beer yeast; enzymolysis; yeast extract

啤酒酵母抽提物 (yeast extract) 是以啤酒厂生产啤酒的下脚废料——啤酒废酵母为主要原料, 采用现代生化技术精制而成的一种集营养、调味和保健于一体的新型食品增鲜剂, 广泛应用于食品加工领域, 能显著增加食品鲜味, 改善风味^[1]; 同时, 酵母抽提物富含各种氨基酸、B族维生素, 是一种优良的微生物生长培养基, 可广泛应用于生化培养、生化制药等领域^[2]。据统计, 2006年我国啤酒产量达到3515.15万t, 按生产100 t啤酒可得到含水分75%~80%的啤酒废酵母1.5 t计算, 共可回收废酵母52.73万t, 开发利用的潜力巨大。

啤酒废酵母一般指发酵4~6代后排入发酵罐内的

收稿日期: 2007-11-13

基金项目: 广州市科技攻关项目 (2006Z3-E0271)

作者简介: 江凌(1982-), 男, 发酵工程博士研究生, 研究方向为生物工程

通讯作者: 梁世中教授

酵母泥, 其细胞逐渐老化, 壁增厚, 胞内酶活性降低, 自溶不彻底, 采用外加酶制剂水解酵母胞内大分子化合物可缩短自溶时间, 提高酵母自溶得率^[3]。本文通过在酵母自溶过程中添加促进剂和酶制剂, 考察酶解自溶后的氨基氮得率、总氮得率和固形物得率等指标, 探索具有工业应用前景的制取酵母抽提物的工艺路线。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜啤酒废酵母: 广州珠江啤酒集团有限公司提供 (含水量为 77.4%, 粗蛋白含量为 43.8%); 破壁酶 (最适温度 50 ℃)、酵母抽提酶 (最适温度 55 ℃), 购于诺维信公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酵母抽提物制备工艺流程

啤酒废酵母→过筛去酒花→水洗→碳酸氢钠溶液脱苦→调酵母浆→调 pH 6.0~7.0→升温至 50 °C→加破壁酶和促进剂→自溶 6 h→升温至 55 °C→加酵母抽提酶→酶促自溶 24 h→升温灭酶→离心去渣→酵母抽提液→真空浓缩→喷雾干燥→粉状酵母抽提物

1.2.2 分析方法

残余蛋白酶活力的测定：福林法^[4]；氨基氮的测定：甲醛滴定法^[4]；总氮的测定：凯氏定氮法^[4]；固形物得率的测定：干燥法^[4]；氨基酸的测定：分析柱为 PICO.tag 氨基酸分析柱，柱温 38 °C，流速 1 mL/min，检测波长 254 nm。

2 结果与讨论

2.1 废酵母存储时间对残余内源酶活的影响

酵母自溶过程中起主要作用的内源酶是 4 种蛋白酶^[5]，由于每批啤酒废酵母的存储时间与温度控制的差异，其残余的内源蛋白酶的活力差别很大，势必对酵母自溶过程以及产品指标的稳定性造成影响。本实验对沉淀池底一周内的废酵母泥残存的内源蛋白酶活进行检测，结果如表 1 所示。

表 1 存储时间对酵母残余蛋白酶活力的影响

Table 1 Effects of storage time on the activity of enzyme

放置时间/d	残余内源蛋白酶活/(U/kg)
1	1.20×10 ⁶
3	9.50×10 ⁵
5	7.30×10 ⁵
7	4.80×10 ⁵

由表 1 可见，放置 3 d 内的酵母中还残存着较高活性的内源蛋白酶，而放置一周后的残余蛋白酶活只有最初时的 40%；若是罐体冷却控制效果不佳的话，酶活损失将会更大。因此，后续操作所用的原料都采用放置 3 d 以内的废酵母，以保持实验数据的可比性。

2.2 促进剂对酵母自溶得率的影响

酵母自溶既是一个酶促反应过程，又是一个质壁分离过程，因此一切能提高酶促反应效率，促进质壁分离的方法理论上都能提高酵母的自溶程度。据报道，氯化钠、乙醇、乙酸乙酯、硫酸素、脂肪酸钠、甲苯、硫醇类试剂、氮酮、酵母抽提物、右旋糖等都能起到促进酵母自溶的作用。考虑到上述各物质的促溶效果、安全性、稳定性、后序分离及成本，氯化钠通常被选为最理想的自溶促进剂。在氯化钠含量较高的介质中，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，膜内的原生质成分大部分通过膜脱离细胞壁，形成了质壁分离。质壁分离现象持续一段时间

后就会导致细胞死亡，引发细胞的降解过程；但是过量的氯化钠（大于3%）不但会降低产品的档次，还会抑制内源酶的活性，影响自溶速度^[6]；而同样作为渗透压调节剂的氯化钾应当具备相同的促溶机理，却未见应用报道。本研究考察了氯化钾作为自溶促进剂对酵母自溶后产品得率的影响，结果如图1所示。

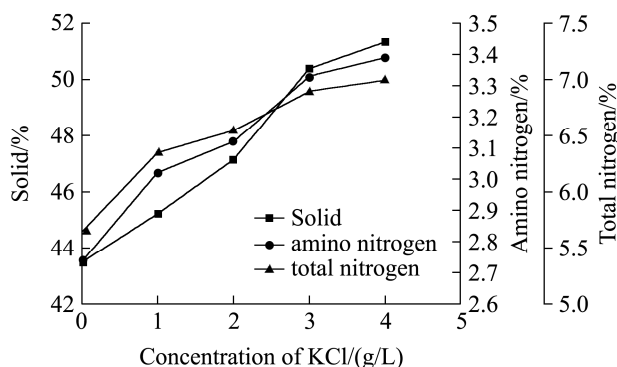


图 1 促进剂对酵母自溶得率的影响

Fig.1 Effects of the dosage of autolysis promoters on yields of amino N、total N and solid

由图1可知，氨基氮得率、总氮得率和固形物得率与氯化钾添加量成正比关系，添加3%的氯化钾时三个得率分别比对照样（不加促进剂）提高了21.5%、22.2%、15.9%，表明氯化钾确实能起到促溶作用；且均要好于相同实验条件下添加3%的氯化钠时的促溶效果（后者的三个得率分别为3.13%、6.49%、46.4%）。鉴于过量的氯离子会限制产品在食品工业中的应用，氯化钾作为促进剂的添加量不宜超过3%。

2.3 自溶温度和时间对酵母自溶得率的影响

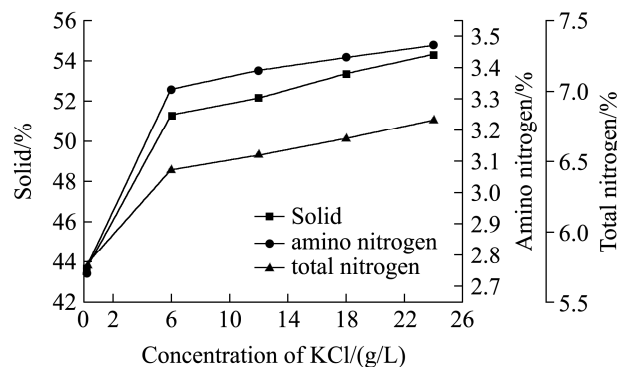


图 2 破壁酶作用时间对酵母自溶得率的影响

Fig.2 Effects of reaction time on yields of amino N、total N and solid

由于酵母体内残存着一定活力的内源酶，为减少外加酶制剂的用量，节约生产成本，将工艺改进为分段自溶的方式进行。由于自溶过程中起主要作用的4种内源蛋白酶作用的最适温度在50~60 °C^[5]；同时，外加破壁酶可以打破酵母细胞壁的复杂结构以利用自

溶产物的释放,本实验采用了最适温度在50 ℃的破壁酶,故在自溶工序的温度设定为50 ℃。现考察破壁酶作用时间对酵母自溶后产品得率的影响,结果见图2。

从图2可见,在酵母自溶过程中添加破壁酶可显著提高抽提物中的氨基氮得率、总氮得率、固形物得率;并且,三个得率伴随着自溶时间的延长而不断增加,但增幅逐渐放缓。综合考虑工艺成本、残余内源蛋白酶的活力以及最终产品的风味,选择自溶时间为6 h为宜。

表2 酵母抽提酶作用时间对自溶的影响

Table 2 Effects of reaction time on yields of amino N、total N、solid and the flavor

时间/h	氨基氮得率/%	总氮得率/%	固形物得率/%	风味
20	3.39	6.89	45.5	较好
24	3.72	7.26	48.8	好
28	4.00	7.67	53.7	醇厚
32	4.03	7.88	54.5	微苦
36	4.05	7.91	54.8	较苦

破壁酶和自溶促进剂的添加使得产物溶出途径变得更加通畅,溶出速度显著提高,表现为自溶时间的大大缩短,此时添加蛋白酶可进一步提高自溶产物的得率和风味。酵母抽提酶是一种高效酵母水解专用复合酶,其最适作用温度为55 ℃。现考察分段自溶的酶

促自溶阶段酵母抽提酶作用时间对酵母自溶后产品得率和风味的影响,结果见表2。

表2说明,随着自溶时间的延长,酵母抽提液的产品得率都在不断增加,其风味也不断改善。当自溶时间为28 h时,产品得率趋于稳定,风味醇厚。自溶时间超过28 h时,产品得率几乎不再增加,风味也发生不良变化,32 h时出现微苦味,36 h时出现严重苦味,因此最佳自溶时间为28 h。

2.4 酶促自溶工序条件的优化

根据上述动力学研究结果、内源酶作用条件及单因子试验结果,现对酵母悬浮液浓度(10%、15%、20%)、破壁酶添加量(0.25%、0.5%、1.0%)、自溶促进剂氯化钾添加量(1%、2%、3%)和酵母抽提酶添加量(0.25%、0.5%、1.0%)进行优化,正交分析结果如表3所示。

从表3可以看出,当酵母悬浮液浓度为10%、破壁酶添加量为1.0%、自溶促进剂氯化钾添加量为3%、酵母抽提酶添加量为1.0%时,氨基氮得率、总氮得率和固形物得率均达到最高,分别为4.30%、8.98%和59.0%。实际上,继续增加破壁酶和酵母抽提酶的用量,上述三个指标还会提高,但生产成本也随之大幅增长;而当破壁酶和酵母抽提酶添加量达到0.5%时就已经超过酵母抽提物行业标准的优级指标要求^[7]。

表3 自溶条件对得率影响的正交结果

Table 3 Results of optimization of the effect of autolysis conditions on yields

因素	悬浮液浓度/%	破壁酶添加量/%	氯化钾添加量/%	酵母抽提酶添加量/%	氨基氮得率/%	总氮得率/%	固形物得率/%
1	10	0.25	1.0	0.25	2.94	7.32	48.2
2	10	0.5	2.0	0.5	3.58	7.83	56.6
3	10	1.0	3.0	1.0	4.30	8.98	59.0
4	15	0.25	2.0	1.0	3.74	8.32	54.7
5	15	0.5	3.0	0.25	3.53	8.23	54.1
6	15	1.0	1.0	0.5	3.92	8.17	57.8
7	20	0.25	3.0	0.5	3.46	7.56	51.5
8	20	0.5	1.0	1.0	4.13	8.78	58.0
9	20	1.0	2.0	0.25	3.73	7.84	53.7

2.5 酵母抽提物理化参数的评定

2.5.1 物理性状

国内不同产地(湖北武汉、湖北宜昌、浙江德清、浙江温州、广东江门、山东烟台等)的酵母抽提物颜色大都比国外(以英国OXOID为例)生产的略深,呈土黄色,本实验室生产的产品也是如此,并且酵母抽提物粉末的细致程度比国外略差。

2.5.2 溶解性和pH

分别称取2 g酵母抽提物产品溶解到100 mL水中,

观察溶液的颜色、澄清度和pH。对比发现:本实验室生产的酵母抽提物呈黄色的溶液,澄清度略差,国外OXOID生产的为亮黄色澄清溶液;两种抽提物2%水溶液的pH分别为6.5和7.0,在溶解过程中都有结块现象,估计是喷雾干燥工序中为降低产品的吸潮性而加入一定比例的变性淀粉所致。

2.5.3 干湿比

称取约0.5 g酵母抽提物,于80 ℃烘箱中干燥4~6 h,称取烘前、后的质量,计算干湿比,得出的结果是:

英国OXOID公司生产的酵母抽提物的干湿比为94%，而本实验室生产的干湿比在93%~95%之间，两者差别不大。

2.5.4 氨基酸含量

表4 酵母抽提物中的总氨基酸含量

Table 4 Comparison of the total amino acid in yeast extract

氨基酸(Amino acid)	实验室制备抽提物中总氨基酸含量 (mg/mL)	OXOID 酵母抽提物中总氨基酸含量 (mg/mL)
丙氨酸(Ala)	0.801	0.142
天冬氨酸(Asp)	1.264	1.414
精氨酸(Arg)	0.842	0.662
胱氨酸(Cys)	0.039	0.152
甘氨酸(Gly)	0.604	1.19
谷氨酸(Glu)	1.66	2.698
组氨酸(His)	0.512	/
亮氨酸(Leu)	0.706	1.208
异亮氨酸(Ile)	0.525	0.962
蛋氨酸(Met)	0.243	0.16
赖氨酸(Lys)	0.686	1.08
苯丙氨酸(Phe)	0.513	0.756
丝氨酸(Ser)	0.646	0.684
苏氨酸(Thr)	0.707	0.546
缬氨酸(Val)	0.643	0.20
酪氨酸(Tyr)	0.515	0.99
脯氨酸(Pro)	0.642	0.176
色氨酸(Trp)	/	0.17
合计	11.546	13.230

注：“/”表示未检测出。

酵母本身含有的蛋白酶类和外源添加的复合蛋白酶都能有效地水解酵母体内的蛋白质生成各种氨基酸和肽类。而各种氨基酸均具有一定的味道，如谷氨酸和天冬氨酸呈鲜味，甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和丝氨酸呈甜味，而一些支链氨基酸和含硫氨基酸则呈苦味。由于制备工艺选择的不同，酵母抽提物产品中各种氨基酸的成分和比例也有所差异。表4列出了实验室制备抽提物和 OXOID 生产的酵母抽提物（配成 2% 水溶液）中总氨基酸的含量。

由表4发现，实验室制备抽提物中谷氨酸和天冬

氨酸的含量均超过 1 mg/mL，甜味氨基酸（甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和丝氨酸）的含量超过了 3 mg/mL，两者总量占到酵母抽提物干重的 53.6%；而 OXOID 生产的酵母抽提物中鲜味氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸）含量超过了 4 mg/mL，甜味氨基酸的含量与实验室制备产品几乎相等，两者总量占到酵母抽提物干重的 56.2%。从两者氨基酸含量的对比来看，本实验室制备的酵母抽提物鲜味不如 OXOID，甜味相当，但实际产品的风味还是略差于 OXOID。

3 结论

本实验以低温储存3天以内的啤酒废酵母为原料，采用自溶与添加外源酶相结合的方法制备酵母抽提物，对制取工艺的关键工序进行了正交优化，优化后得到的氨基氮得率、总氮得率和固形物得率分别达到 4.30%、8.98% 和 59.0%。制备的酵母抽提物产品指标虽略逊于国外同类名牌产品（英国OXIOD），但大都达到或超过酵母抽提物行业标准的优级指标要求^[7]。

参考文献

- [1] Itaru Matsushita, Yoshihisa Muramoto, Syoichiro Ozaki, et al. Production of tasty brewer's yeast extract by simulated moving-bed system chromatography[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogakkai, 1999, 46(2):75-80
- [2] 田卓玲, 于慧敏, 沈忠耀. 用于微生物培养基有机氮源的废酵母自溶液研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(5):1-6
- [3] Hee Jeong Chae, Hyun Joo, Man-Jin In. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics [J]. Bioresource Technology, 2001, 76: 253-258
- [4] 大连轻工业学院, 华南理工大学等合编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002
- [5] 李祥, 彭莉, 王毅, 等. 酵母自溶研究[J]. 中国酿造, 2001(5):17-19
- [6] 张晓鸣, 袁信华, 章克昌. 理化处理对啤酒酵母自溶的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(2):154-159
- [7] 康永璞, 李小瑶, 陈蓉, 等. 中华人民共和国轻工行业标准[S]. 中华人民共和国国家发展和改革委员会, 2003