

酵母细胞自溶条件优化研究

邵 伟, 乐超银, 陈 莎

(三峡大学 化学与生命科学学院, 湖北 宜昌 443001)

摘要: 以啤酒酵母为材料, 通过单因素试验在自溶时间、温度、pH值、助溶剂及外加酶等因素中确定对酵母自溶影响关键的因素, 然后根据Box-Behnken的中心组合试验设计原则, 选取对酵母自溶影响较大的3个因素, 即自溶温度、pH值和加酶量进行试验和响应面分析, 得出啤酒酵母自溶的最佳条件为每100g酵母泥中添加NaCl 3g、-葡聚糖酶0.3g, 控制自溶温度55.7℃、pH5.9, 经过18h自溶后, 酵母自溶液中氨基酸态氮含量可达0.592g/100mL。

关键词: 酵母 细胞 自溶 响应面分析法 优化

中图分类号: TQ926 文献标识码: A 文章编号: 2054-0571(2007)08-0010-04

Study on optimization for yeast cell autolysis

SHAO Wei, YUE Chao-yin, CHEN Shu

(College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang 443001, China)

Abstract: Using beer yeast as raw material, the factors such as time, temperature, pH value, additive and enzyme were confirmed by the single factor tests primarily, according to the Box-benhken center united experimental design principles, autolysis temperature, pH value and enzyme quantity were studied and analyzed with RSM, the optimum conditions were that time 18 h, temperature 55.7℃, pH 5.9 and addition of NaCl 0.3g/100g yeast slurry and enzyme 0.3g/100g yeast slurry, the content of amido-nitrogen would reached 0.592 g/100 ml.

Key words: yeast; cell; autolysis; response surface methodology; optimization

由于啤酒酵母中含有丰富的氨基酸和核苷酸IMP及GMP, 并且酵母抽提物具有呈味性、着色性, 已广泛地应用于味精、酱油等调味品中^[1]。我国虽是啤酒生产大国, 每年大约可产生4.5万t啤酒废酵母, 除部分作种子或饲料外, 大部分都直接排放, 严重地污染了环境^[2]。目前, 国内只有少数企业在利用啤酒废酵母生产酵母抽提物, 且产能不足, 得率较低, 主要原因是酵母抽提物的生产技术工艺落后、生产管理粗放。因此, 优化与改进酵母自溶条件就显得尤为重要, 而应用响应面分析法(RSM)优化酵母细胞自溶条件的研究还未见报道。为此, 采用响应面分析法, 以氨基酸态氮含量和抽提物得率为指标, 对影响酵母自溶的一些关键因素进行了研究, 为啤酒酵母的利用和啤酒酿造的清洁生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen): 购于北京食品发酵研究所菌种保藏中心。

培养基 5% Bé麦芽汁 pH值自然 0.1MPa灭菌20min, 作斜面培养基时添加1.5%~2.0%琼脂。

-葡聚糖酶(酶活: 45FBG/g): 丹麦诺和诺德公司产品。

所用分析测试试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备

电子天平, 电热恒温水浴锅, 全自动发酵罐, 离心机, 显微镜等。

1.3 方法

1.3.1 酵母培养、分离及处理

将活化的斜面酵母取1环于摇瓶培养基中, 30℃、150r/min培养12h后按3%的量接入发酵培养基, 30℃、200r/min培养24h左右, 添加酶制剂, 控制自溶条件(温度、pH值、时间等)进行细胞自溶, 并随时取样检测, 自溶结束后加热灭酶, 自溶液于3000r/min离心10min, 取上清液检测。

1.3.2 试验设计^[3]

由于酵母酶解自溶程度的大小主要受自溶时间、

温度、pH值及助溶剂、外加酶制剂等因素的影响,并且其自溶程度对产品质量的影响极大。因此,先通过单因素试验在自溶温度、时间、pH值及助溶剂等因素中确定对酵母自溶影响最为关键的因素,再利用Design-Expert6.0.10软件对试验进行设计和数据处理,以确立最佳自溶工艺。

1.3.3 测定及计算方法

氨基酸态氮的测定:甲醛滴定法^[4]。

酵母抽提物得率^[5]=

$$\frac{(\text{上清液总重} \times \text{上清液固形物含量} - \text{外加物干重})}{\text{自溶酵母干重}} \times 100\%$$

细胞破碎率:采用血球计数板法测定细胞总数和破碎率细胞数及空腔细胞数。

$$\text{细胞破碎率} = (\text{破碎细胞} + \text{空腔细胞}) / \text{细胞总数} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 酵母细胞收获时间的确定

在酵母培养过程中,其数量和代谢情况都随时间而发生变化,结果如图1所示。

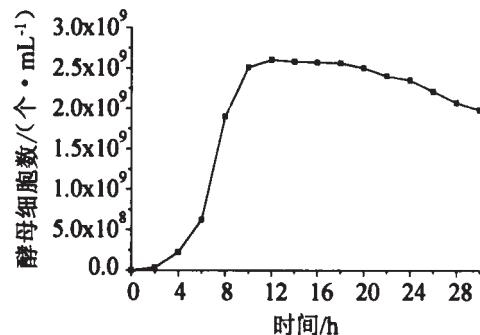


图1 酵母培养过程中数量变化情况

Figure 1. Variation of the amount during yeast cultivation

由图1可知,酵母菌经过12h左右的培养,在培养液中其细胞数量达到一个较高的值。18h后,由于部分酵母细胞的衰老、死亡、自溶,使得培养液中的酵母菌数逐渐减少。因此,确定酵母细胞收获时间为16h~18h。

2.2 酵母自溶时间对氨基酸态氮含量、抽提物得率的影响

将酵母乳的温度控制在55、pH 6.0的条件下进行自溶,自溶过程中,其氨基酸态氮含量、抽提物得率及品质都随时间而发生变化,结果见图2。

由图2可知,自溶开始以后,自溶液中的氨基酸态氮含量和抽提物得率随时间升高,在18h左右两者均达到最大值,且有相同的趋势。随后氨基酸态氮含量呈现缓慢下降的趋势,而抽提物得率则基本上维持在

最高水平,但自溶时间超过20h后,自溶液的口感开始出现一些苦味,这主要是由于酵母自溶时所产生的苦味肽和苦味氨基酸大量积累所致,因此,确定自溶时间为18h。

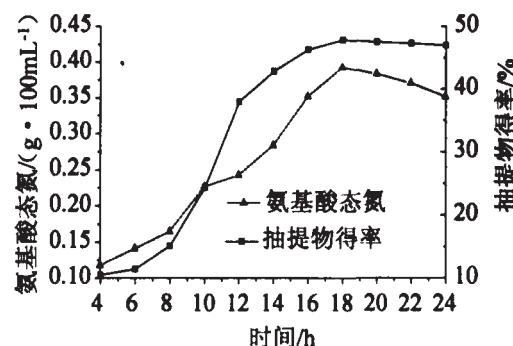


图2 自溶时间对氨基酸态氮含量、抽提物得率的影响

Figure. 2 Effect of autolysis time on content of amino nitrogen and yield of extractions

2.3 酵母自溶温度对氨基酸态氮含量、抽提物得率的影响

温度对酵母的生长代谢有着直接的影响,在pH6.0、自溶18h的条件下,观察其对酵母自溶的影响情况,结果(图3A)表明,温度在55左右时酵母抽提液的氨基酸态氮含量和抽提物得率均达到最大值,故初步确定自溶温度为55。

2.4 pH值对酵母自溶氨基酸态氮含量、抽提物得率的影响

酵母的自溶是在其体内酶的作用下进行的,而环境的pH值将直接影响其体内酶的活性。酵母在55,不同pH值条件下,自溶18h后,其抽提液中氨基酸态氮含量和抽提物得率的变化影响情况(图3B)表明,当pH值为6.0时,酵母抽提液中氨基酸态氮含量和抽提物得率均有最大值,因此,初步确定酵母自溶的pH值为6.0。

2.5 NaCl添加量对酵母自溶氨基酸态氮含量的影响

在酵母自溶过程中,添加自溶促进剂可加速酵母的自溶、提高抽提物的溶出率。从降低生产成本和食品安全性考虑,生产中多选用NaCl作为酵母自溶促进剂。在55、pH6.0的条件下,NaCl添加量对酵母自溶的影响情况(图3C)表明,在酵母自溶过程中,当NaCl添加量为酵母泥的1%时,它的促进作用不明显;当NaCl添加量为酵母泥的3%时,它的促进作用比较明显;而当NaCl添加量为酵母泥的5%时,促进作用也十分明显,但由于酵母抽提物中NaCl含量的提高,将直接影响酵母抽提物的口感和品质。因此,确定NaCl添加量为3%。

2.6 外加酶制剂对酵母自溶的影响

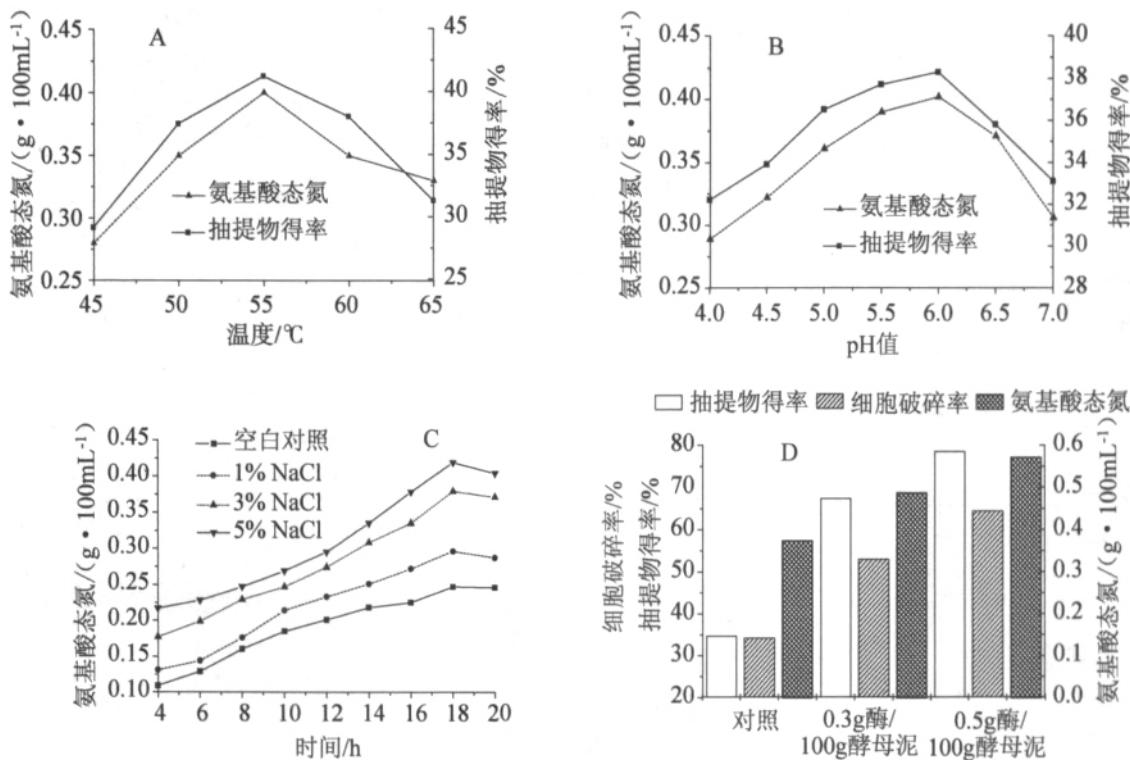


图3 温度、pH值、NaCl添加量、酶制剂用量对酵母自溶的影响

Figure 3. Effect of temperature, pH value, amount of NaCl and amount of enzyme preparation on yeast autolysis

在酵母自溶过程中，酵母细胞内源酶活力有限，并不断降低，抽提物得率很难提高，而采用外加酶制剂水解酵母细胞壁则有助于酵母自溶，提高抽提物得率。酵母在55℃、pH6.0及不同的α-葡聚糖酶添加量的条件下，自溶18h，其自溶的情况（图3D）表明，酶解酵母的破碎率比没有添加酶的破碎效果要好，抽提物得率要多，同时显微镜观察也发现，添加了酶的自溶液中空腔细胞和细胞碎片的数量比没有添加酶的自溶液中的要多；且随着酶的添加量增加，其破碎效果和抽提效果也相应地提高。

2.7 酵母抽提工艺条件的优化

2.7.1 试验因素水平编码与试验结果

综合单因素试验结果，在NaCl添加量为3%的条件下，根据Box-Behnken的中心组合试验设计原则，选择对酵母自溶影响较大的3个因素：自溶温度、pH值和加酶量，分别以 X_1 、 X_2 和 X_3 为代表，每一个自变量按低、中、高3个水平分别以-1、0、1进行编码，并以氨基酸态氮含量为评判指标，各因子及水平编码见表1，安排及结果见表2。

2.7.2 模型的建立与显著性检验

应用Design Expert软件，对表2中的数据进行多元回归拟合，选择对响应值显著的各项，可得自溶温度

（）、pH值和加酶量与酵母抽提液中氨基酸态氮含量间的二次多项回归方程：

$$Y = 0.590 + 0.015X_1 - 0.006X_2 + 0.004X_3 - 0.069X_1^2 - 0.034X_2^2 - 0.044X_3^2 + 0.001X_1X_2 + 0.030X_1X_3 + 0.018X_2X_3$$

表1 酵母抽提工艺试验因素水平及编码

Table1. Technical factors and levels of yeast extract

自变量	代码	编码水平		
		-1	0	1
自溶温度/℃	X_1	50	55	60
自溶pH值	X_2	5.5	6.0	6.5
加酶量/(g·100g ⁻¹)	X_3	0.1	0.3	0.5

对回归方程进行方差分析和显著性检验，结果见表3。由表3可知，该模型回归显著($p < 0.0001$)，方程的一次项、二次项的影响都是显著的，且交互项 X_1X_3 、 X_2X_3 也显著，该模型的 $R^2 = 0.9992$ 、 $R_{Ad}^2 = 0.9981$ ，说明该模型与试验值拟合较好，可用于酵母自溶效果的理论预测。

2.7.3 模型的验证

为了验证酵母抽提模型的有效性，在自溶温度（）、

pH值和加酶量的试验水平范围内,选择3个组合进行验证试验,结果见表4。

表2 优化酵母抽提工艺正交试验安排及结果
Table 2. Design and results of experiment

试验号	X ₁ 温度	X ₂ pH值	X ₃ 加酶量	氨基酸态氮含量(g·100mL ⁻¹)
1	-1	-1	0	0.481
2	1	-1	0	0.507
3	-1	1	0	0.467
4	1	1	0	0.495
5	-1	0	-1	0.487
6	1	0	-1	0.462
7	-1	0	1	0.434
8	1	0	1	0.528
9	0	-1	-1	0.531
10	0	1	-1	0.484
11	0	-1	1	0.505
12	0	1	1	0.528
13	0	0	0	0.591
14	0	0	0	0.590
15	0	0	0	0.589
16	0	0	0	0.592
17	0	0	0	0.590

表3 回归方程系数及其显著性检验结果

Table 3. Coefficients of regression equations and results of significant test

模型项	系数估计	标准差	平方和	均方	F值	p值
Intercept	0.5904	0.0010				<0.0001
X ₁	0.0154	0.0008	0.0019	0.0019	358.26	<0.0001
X ₂	-0.0062	0.0008	0.0003	0.0003	59.20	0.0001
X ₃	0.0039	0.0008	0.0001	0.0001	22.76	0.0020
X ₁ ²	-0.0686	0.0011	0.0198	0.0198	3751.04	<0.0001
X ₂ ²	-0.0343	0.0011	0.0050	0.0050	939.81	<0.0001
X ₃ ²	-0.0441	0.0011	0.0082	0.0082	1549.55	<0.0001
X ₁ X ₂	0.0005	0.0011	0.0000	0.0000	0.19	0.6765
X ₁ X ₃	0.0298	0.0011	0.0035	0.0035	670.68	<0.0001
X ₂ X ₃	0.0175	0.0011	0.0012	0.0012	232.07	<0.0001

表4 模型验证结果
Table 4. Results of the model test

试验号	温度/℃	pH值	加酶量/(g·100g ⁻¹)	氨基酸态氮含量(g·100mL ⁻¹)	
				试验值	预测值
1	50	6.5	0.3	0.467	0.465
2	50	6.5	0.5	0.434	0.437
3	55	5.5	0.5	0.508	0.505

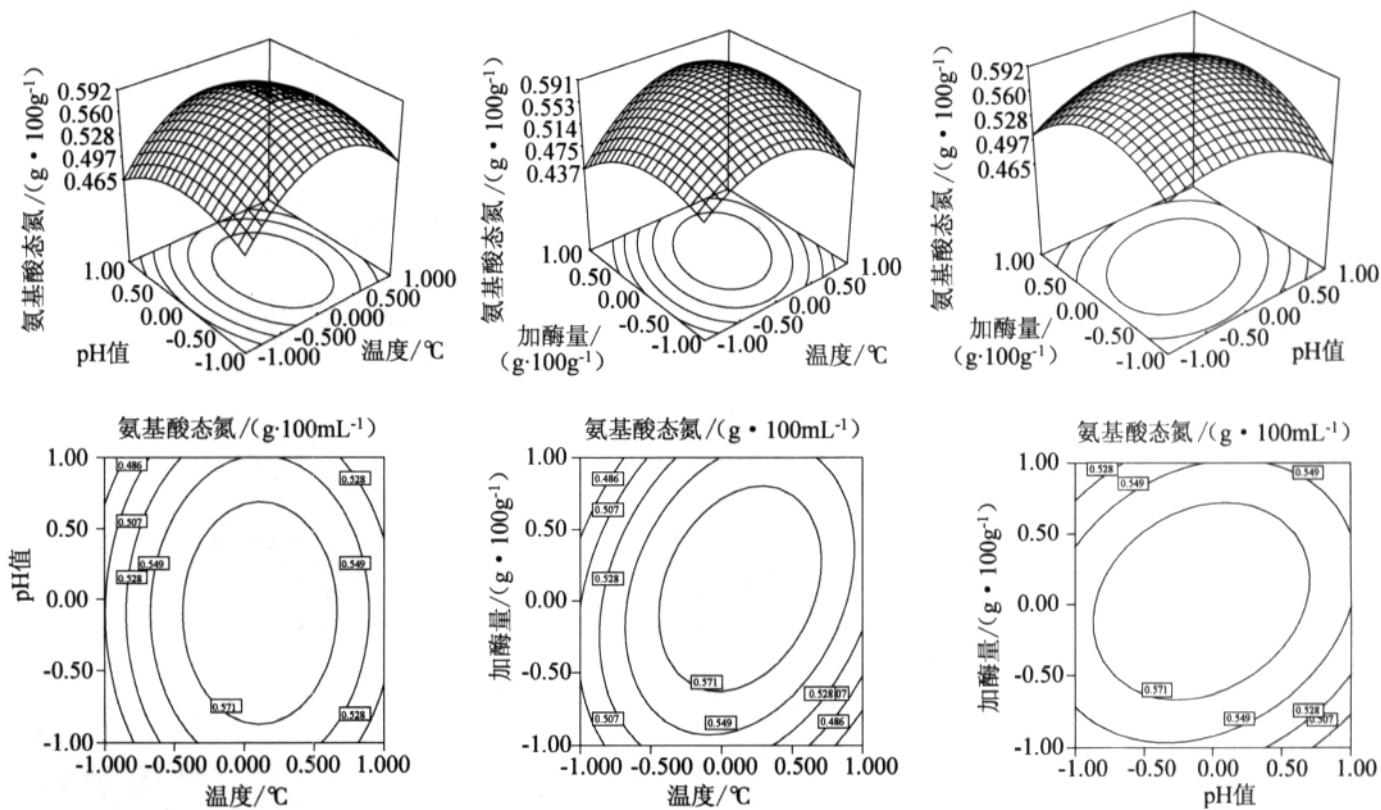


图4 交互项因素响应面图及其等高线图

Figure 4. Response graphs and contour graphs on interactions factors

大米渣蛋白提纯及增溶工艺研究

陶兴无¹, 高冰²

(1.武汉工业学院 生物与制药工程系, 湖北 武汉 430022; 2.武汉鑫宏食品酿造科研所, 湖北 武汉 430051)

摘要:探讨了大米渣蛋白的提纯及增溶工艺。结果表明,采用优化工艺制取的产品蛋白质含量超过92%,回收率约65%,溶解度在各种pH值条件下均超过90%。为米渣蛋白的研究及其产品的开发奠定了基础。

关键词:蛋白质,米渣,提纯,溶解度

中图分类号:TS209 文献标识码:A 文章编号:2054-0571(2007)08-0014-03

Study on the extraction and solubilization of rice dregs protein

TAO Xing-wu¹, GAO Bing²

(1. Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023 China;

2. Wuhan Xinghong Food and Fermentation Institute, Wuhan 430051, China)

Abstract: The extraction methods of protein from rice dregs were investigated so as to obtain high purity protein and improve its solubility. The result showed that the protein content of the product prepared by the optimum technology was more than 92% and the recovery rate about 65% and solubility more than 90% in various pH value which provided a basic study for protein of rice dregs.

Key words: protein; rice dregs; extraction; solubility

大米蛋白不仅具有合理的氨基酸组成和较高的生物利用率,而且不含影响食物利用的毒性物质和酶阻

碍物,具有低过敏性,被认为是一种优质的植物蛋白。由于大米中蛋白质含量较低,直接从大米中提取蛋白

收稿日期: 2007-02-06

作者简介: 陶兴无(1957-), 男, 湖北武汉人, 高级工程师, 研究方向为发酵工程及食品加工。

从表4可看出,模型预测值与实测值吻合极好,用此模型指导实践应具有非常好的效果。

2.7.4 响应因素水平的优化

由回归方程所作响应曲面图及其等高线图见图4。通过该组图即可对任何2因素交互影响酵母自溶液中氨基酸态氮含量的效应进行分析与评价。对回归方程求导数,当响应值Y有最大值时可求得各因素的水平: $X_1=0.13$ 、 $X_2=-0.07$ 、 $X_3=0.07$,转换后得到最佳自溶条件为:在每100g酵母泥添加NaCl 3g,添加-葡聚糖酶0.3g,控制自溶温度55.7℃,pH5.9,经过18h自溶,酵母自溶液中氨基酸态氮的含量可达0.592g/100mL。

3 小结

试验中以氨基酸态氮含量和抽提物得率为指标,通过考察酵母的自溶情况,对自溶条件进行了初步摸索,并以氨基酸态氮含量为评判指标,将响应面分析法应用于酵母自溶上,通过对试验结果的分析比较,确定

最佳自溶条件为:在每100g酵母泥添加NaCl 3g,添加-葡聚糖酶0.3g,控制自溶温度55.7℃,pH5.9,经过18h自溶,酵母自溶液中氨基酸态氮的含量可达0.592g/100mL。实践证明采用响应面分析法对酵母自溶条件进行优化是十分有效的。

参考文献:

- [1] 莫重文. 利用啤酒酵母生产酵母味素的研究[J]. 中国酿造, 2002(4): 38-41.
- [2] 顾国贤. 新世纪中国啤酒工业发展展望[J]. 酿酒科技 2002(4): 28-30.
- [3] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社, 2002:135-142.
- [4] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1992:25-28.
- [5] 晏志云, 蔡奕文, 彭志英. 提高酵母抽提物得率及氨基氮含量的研究[J]. 江苏食品与发酵, 2000(3): 9-13.