超声波破壁提取葡萄酒酵母泥中多糖的研究

胡云峰[1*], 陈君然[2], 胡晗艳[1], 崔瀚元[2], 杨秋月[1]

(1. 天津科技大学食品营养与安全省部共建教育部重点实验室, 天津 300457;
2. 天津市食品加工工程中心, 天津 300457)

摘 要: 目的 利用超声波法提取葡萄酒酵母泥中多糖。**方法** 研究了酵母浓度、超声温度、超声时间对葡萄酒酵母泥中多糖得率的影响, 并采用响应面分析法对葡萄酒酵母泥中多糖提取工艺进行优化设计。**结果** 超声波法提取葡萄酒酵母泥中多糖的最佳条件为: 酵母浓度 9.10%, 超声温度为 65.42 ℃, 超声时间为 132.97 min。最终酵母多糖得率为 1.85%, 对最佳工艺条件进行验证, 酵母多糖实际得率为 1.86%, 结果重复性较好。**结论** 超声波辅助提取葡萄酒酵母泥中的多糖, 工艺简便, 多糖得率较高, 具有实际的应用价值。

关键词: 响应面法; 超声波辅助提取法; 破壁; 酵母多糖; 葡萄酒酵母泥

Study on extraction of polysaccharide by ultrasonic dilapidating walls from waste wine yeast slurry

HU Yun-Feng[1*], CHEN Jun-Ran[2], HU Han-Yan[1], CUI Han-Yuan[2], YANG Qiu-Yue[1]

(1. *Key Laboratory of Food Nutrition and Safety*, *Ministry of Education*, *Tianjin University of Science and Technology*, *Tianjin* 300457, *China*; 2. *Tianjin Food Engineering Center*, *Tianjin* 300457, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the extraction of polysaccharide of waste wine yeast slurry by ultrasonic method. **Methods** On the basis of single factor experiments, the effects of operating conditions, such as yeast concentration, ultrasonic-assisted extraction temperature, and ultrasonic-assisted extraction time, were analyzed by response surface methodology. **Results** The optimized conditions of ultrasonic-assisted extraction are as following: yeast concentration 9.10%, ultrasonic-assisted extraction temperature 65.42 ℃, and ultrasonic-assisted extraction time 132.97 min. Under the optimized conditions, the extraction yield of yeast polysaccharide was 1.85%. The optimum technological condition was validated. the actual extraction yield of yeast polysaccharide was 1.86%. It showed that the result was stable. **Conclusion** The ultrasonic-assisted extraction method has a high extraction rate in extracting the polysaccharide of waste wine yeast slurry. The method is simple and practical.

KEY WORDS: response surface methodology; ultrasonic-assisted extraction; cell wall disruption; yeast polysaccharide; waste wine yeast slurry

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种研究比较广泛的单细胞真核微生物, 其细胞壁主要由 *β-D*-葡聚糖、*α-D*-甘露聚糖两种多糖及少量的几丁质组成[1]。其中葡聚糖是酵母细胞细胞壁最主要的结构成分, 它与原生质体膜相连, 起到维持细胞正常渗透压及保护细胞形态的作用[2-4]。存在于酵母细胞壁中

*通讯作者: 胡云峰, 研究员, 主要研究方向为农产品保鲜加工。E-mail: hu-yf@163.com

***Corresponding author:** HU Yun-Feng, Professor, Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, No.29, 13th Street, Tianjin 300457, China. E-mail: hu-yf@163.com

的这些酵母多糖具有良好的生物活性, 在免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒和降低胆固醇等方面, 显示出良好的开发应用前景, 并且具有资源丰富、天然无毒的优点[5,6]。因此国内外学者展开了对其提取方法的研究, Ohno 等[7]利用次氯酸钠和二甲基亚砜联合提取废弃酵母中 β-葡聚糖, Suphantharika 等[8]研究了减法抽提葡聚糖的工艺。

目前细胞破壁的方法很多, 其中超声波法破壁技术在天然活性产物提取中具有巨大优势[9,10]。超声波法破壁是利用超声波的空化作用形成强大的冲击波, 而使细胞破碎。同时, 高速射流可对细胞组织产生物理剪切力, 使之变形破裂并释放出内含物, 进一步加速了细胞破碎的过程, 更加有利于多糖的溶出[11-13]。其与传统提取方法相比, 在保证较高提取率的同时, 还使提取操作步骤更为简化[14,15]。潘飞等[16]使用超声波破壁的方法成功从啤酒酵母中提取到还原型谷光甘肽。曾俊华等[17]研究了超声波法对酵母细胞破壁的影响, 发现在超声频率 24 Hz, 破壁时间为 13 min 时, 破壁效率可达 75%。本文在前人研究的基础上, 研究利用超声波提取葡萄酒酵母泥中多糖, 并通过响应面优化提取工艺, 确定了最佳提取条件, 此法工艺简便, 费用低廉, 为葡萄酒废弃酵母泥的综合利用提供了新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄酒酵母泥(河北昌黎耿氏酒堡提供); 浓硫酸(天津市化学试剂三厂); 苯酚(天津市永大化学试剂开发中心)。

1.2 主要仪器

KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 低温高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司); DGG-101-2 型电热鼓风干燥箱(天津市天宇试验仪器有限公司); 18 系列紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 多糖含量测定(分光光度法)

标准曲线的制作: 精密吸取葡萄糖工作液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL, 分别置于 10 mL 比色管中, 各以水补至 2.0 mL, 然后都加入 5%的苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 混匀, 在室温放置 30 min, 用 1 cm 比色管, 以加入葡萄糖工作液 0 mL 组为试剂空白, 于波长 490 nm 处测定吸光度值。以吸光度值 A 为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线, 并计算回归方程。标准曲线见图 1。

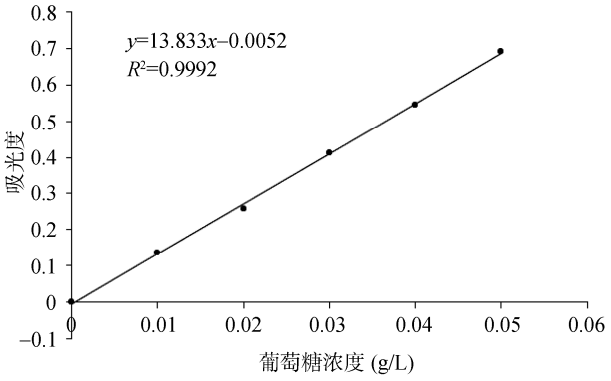

图 1 葡萄糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of glucose

样品测定: 将样品 0.2 mL 加水稀释到合适的倍数, 准确吸取此稀释液 2.0 mL 然后按上述方法测吸光度值, 并根据回归方程, 求得其浓度, 然后计算样品中总糖含量。

1.3.2 多糖得率的测定

$$多糖得率(\%)=\frac{C\times V\times F}{M\times(1\text{-}W)}\times 100 \qquad 式(1)$$

式中:

C——根据葡萄糖标准曲线计算出的多糖浓度, g/L;

V——酵母溶液的体积, L;

F——稀释倍数;

M——酵母重量, g;

W——酵母的水分含量, %。

1.3.3 单因素试验

破壁工艺: 酵母泥离心(4000 r/min, 15 min)→沉淀物→干燥(37 ℃, 24 h)→干酵母→分散→超声波破壁→离心(3000 r/min, 15 min)→上清液→浓缩(旋转蒸发仪)→醇沉→干燥→粗多糖

葡萄酒酵母泥按照上述破壁工艺进行破壁, 超声波功率为 99 W, 选取酵母浓度为 4%、6%、8%、10%、12%、14%; 超声温度为 40、45、50、55、60、65 ℃; 超声时间为 25、50、75、100、125、150 min 进行单因素实验, 测定破壁后上清液中多糖的含量, 计算多糖得率, 每组试验做 3 次平行, 取平均值。

1.3.4　工艺优化试验

以酵母浓度、超声时间、超声温度三个因素作为考察对象, 采用响应面分析法安排实验, 获取最适工艺参数。

2　结果与分析

2.1　酵母浓度对多糖得率的影响

分别取 2、3、4、5、6、7 g 干酵母分别配置成 50 mL 酵母细胞液, 在 50 ℃, 99 W 超声 50 min 后取样测定多糖含量, 根据标准曲线绘制多糖含量占酵母干重的百分比柱形图, 见图 2。

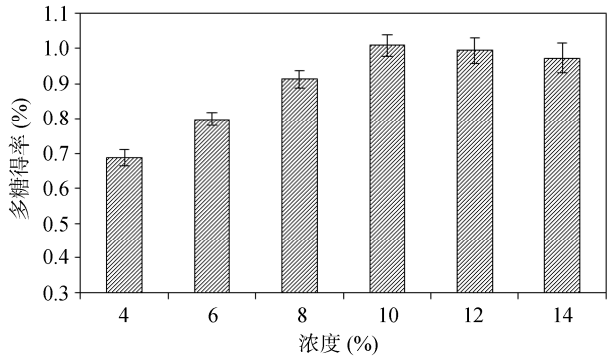

图 2　酵母浓度对多糖得率的影响

Fig. 2　Effect of yeast concentration on the content of polysaeeharide

酵母浓度即料液比是提取过程的一个重要影响因素, 从传质速率的角度讲, 主要表现在影响固相主体和液相主体之间的浓度差, 即传质推动力。由图 2 可知, 在超声功率、超声温度、超声时间不变条件下, 随着酵母浓度的增加, 多糖得率逐渐增大; 当酵母浓度达到 10%时, 多糖得率为 1.01%, 此时达到最大值; 但当酵母浓度超过 10%时, 随着浓度的增大, 多糖得率又略有下降, 其原因可能是酵母浓度较大, 给超声破碎造成了一些阻碍, 不能完全作用。因此在超声温度 50 ℃, 超声功率 99 W, 超声时间 50 min 的的条件下确定最佳酵母液浓度为 10%。把酵母浓度 8%~12%作为响应面法的考查范围。

2.2　温度对多糖得率的影响

取 6 份 10%的酵母细胞液, 分别在 40、45、50、55、60、65 ℃下, 99 W 超声, 50 min 后取样测定多糖含量, 根据标准曲线绘制多糖含量占酵母干重的百分比柱形图, 见图 3。

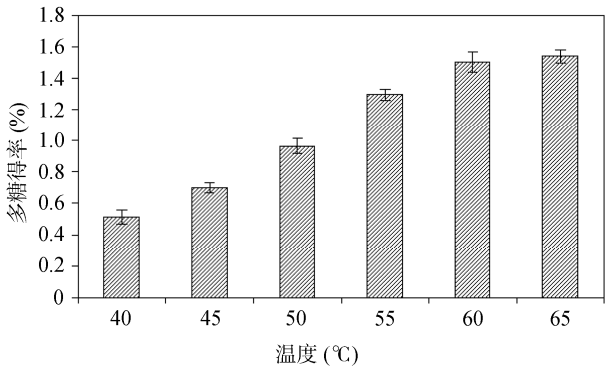

图 3　温度对多糖得率的影响

Fig. 3　Effect of temperature on the content of polysaccharide

由图 3 可知, 在酵母浓度、超声功率、超声时间不变的条件下, 多糖含量在 40 ℃时最低, 随超声温度的升高, 酵母的多糖得率呈逐渐升高的趋势, 到达 60 ℃~65 ℃左右时多糖含量达到最大值。考虑到能源消耗, 因此, 在酵母液浓度为 10%, 超声功率 99 W, 超声时间 50 min 的条件下, 初步确定温度为 60 ℃, 多糖得率为 1.50%。把 55~65 ℃作为响应面法的考查范围。

2.3　时间对多糖的影响

取 200 mL 的 10%的酵母细胞液, 在超声温度为 60 ℃, 超声功率为 99 W 超声, 每隔 25 min 后取样测定多糖含量, 绘制多糖含量占酵母干重的百分比曲线, 见图 4。

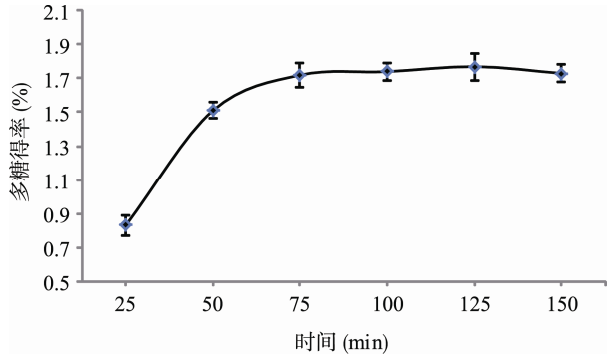

图 4　时间对多糖得率的影响

Fig. 4　Effect of time on the content of polysaccharide

由图 4 可见, 在酵母浓度、超声功率、超声温度不变的条件下, 随着时间的延长, 多糖含量逐渐增多, 当作用时间为 75 min 后随着时间延长多糖含量的变化趋势缓慢。可能是因为前 75 min 的超声提取酵母细胞大多数已破裂, 考虑到工作效率等因素与能源消耗, 因此在酵母液浓度为 10%, 超声功率 99 W, 超

声温度 60 ℃的条件下，初步确定超声时间为 75 min。把 50~100 min 作为响应面法的考查范围。

2.4 响应面法优化超声波细胞破壁

(1)响应面设计方案及结果分析

根据 Box Benhnken 的中心组合试验设计原理，综合单因素试验影响结果，在单因素试验的基础上，选取超声提取的酵母浓度、温度、提取时间为自变量，多糖得率为响应值，通过 Design Expert 8.0.4 软件设计 3 因素 3 水平的二次回归分析，预测超声波破壁的最佳工艺。分析因素与水平见表 1，响应面实验数据处理结果见表 2。

利用 Design Expert 8.0.4 软件对响应面试验数据进行二次多元回归拟合，得到酵母多糖得率与自变量 A、B 和 C 的二次回归方程:

$$Y=1.70+0.019A+0.12B+0.078C-5.0\times10^{-3}AB-0.012AC-0.013BC-0.018A^2-0.042B^2-0.015C \quad 式(2)$$

方差分析及显著性检验结果见表 3。结果表明，该回归模型极显著($P<0.0001$)，失拟项 $P=0.2346>0.05$，失拟性检验结果不显著。这说明该模型与数据拟合程度较高，实验误差小，可以用该模型分析和预测超声法破壁酵母细胞的结果。此外，回归方程各项的方差分析结果还表明，各因素中的一次项和二次项对多糖得率的影响极显著，交互项 AC、BC 对多糖得率的影响显著。因此，实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系，二次项对其也有很大影响。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 The factors and levels of response surface

水平	A 酵母浓度(%)	B 超声温度(℃)	C 超声时间(min)
–1	8	55	50
0	10	60	75
1	12	65	100

表 2 响应面实验设计及数据处理

Table 2 Experimental design and results of response surface

实验号	A	B	C	多糖得率(%)
1	1	–1	0	1.54
2	–1	0	1	1.73
3	1	0	1	1.75
4	1	1	0	1.77
5	0	0	0	1.70
6	–1	0	–1	1.56
7	0	0	0	1.70
8	0	–1	–1	1.43
9	0	0	0	1.70
10	0	1	1	1.83
11	1	0	–1	1.63
12	0	–1	1	1.62
13	0	1	–1	1.69
14	–1	1	0	1.75
15	0	0	0	1.69
16	–1	–1	0	1.50
17	0	0	0	1.71

表 3 方差分析表

Table 3 The table of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	0.18	9	0.020	260.29	< 0.0001	**
A	2.812E–003	1	2.812E–003	37.50	0.0005	**
B	0.11	1	0.11	1504.17	< 0.0001	**
C	0.048	1	0.048	640.67	< 0.0001	**
AB	1.000E–004	1	1.000E–004	1.33	0.2861	
AC	6.250E–004	1	6.250E–004	8.33	0.0234	*
BC	6.250E–004	1	6.250E–004	8.33	0.0234	*
A^2	1.289E–003	1	1.289E–003	17.19	0.0043	**
B^2	7.605E–003	1	7.605E–003	101.40	< 0.0001	**
C^2	9.474E–004	1	9.474E–004	12.63	0.0093	**
残差	5.250E–004	7	7.500E–005			
失拟项	3.250E–004	3	1.083E–004	2.17	0.2346	不显著
净误差	2.000E–004	4	5.000E–005			
总离差	0.18	16				

注: **为 $P<0.01$，差异极显著; *为 $P<0.05$，差异显著。

实验因素对多糖得率的交互影响如图 5 所示。

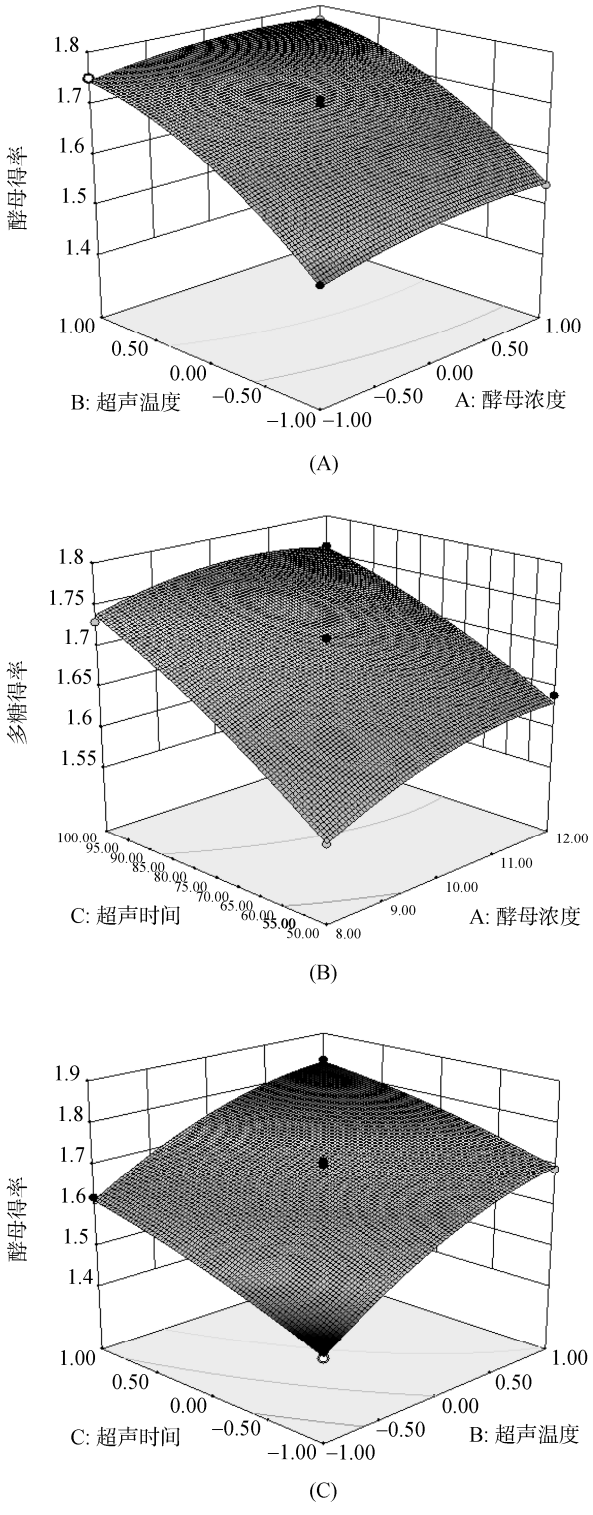

图 5　酵母多糖提取的各因素交互作用响应曲面图

Fig. 5　Response surface plot of yeast polysaccharide extracted from their interaction

注: a: 酵母浓度与超声温度; b: 酵母浓度与超声时间; c: 超声温度与超声时间

根据所得到的模型，可预测在稳定状态下超声波破壁的最佳工艺条件为：酵母浓度 9.10%，超声温度为 65.42 ℃，超声时间为 132.97 min，在该条件下，所得多糖得率理论上可达为 1.85%。

(3)工艺条件的确定及模型有效性的验证

根据响应面法的实验结论，结合实际操作，选取最佳工艺条件为：酵母浓度为 9%，超声温度为 65 ℃，超声时间为 130 min。

随机取 3 份样品进行验证试验，分别按照上述最佳工艺进行破壁，酵母多糖得率均值为 1.86%，略高于理论预测值，重复性好，说明优化结果可靠、可行。

3　结　论

根据单因素实验和响应面分析法研究显示，超声波提取葡糖酒酵母中多糖的最佳工艺条件为：在超声波功率为 99 W 的条件下酵母浓度 9.10%，超声温度为 65.42 ℃，超声时间为 132.97 min。最佳工艺条件下的验证实验表明：酵母多糖平均提取率可以达到 1.86%，具有有较高的重复性，优化结果可靠性较高。

参考文献

[1] Lonvaud-Funel A. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects [J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, (126): 209–214.

[2] Cabib E. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum [J]. Pure Appl Chem, 1991, 22(39): 483–489.

[3] Bohn JA, BeMiller JN. (1→3)–β–D–Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships [J]. Carbohyd Polym, 1995, 89(1): 3–14.

[4] Lipke PN, Ovall R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges [J]. J Bacteriol, 1998, 180(15): 3735–3740.

[5] Wasser SP. Medicinal mus hrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biot, 2002, 60(3): 258–2741.

[6] Bohn JA, BeMiller JN. (1→3)–β–d–Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships [J]. Carbohydr Polym, 1995, 28: 3–14.

[7] Ohno N, Uchiyame M, Tsutuzi A, *et al*. Solubilization of yeast cell–wall β–(1, 3) –D–glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction [J]. Carbohyd Res, 1999, 316(1–4): 161–172.

[8] Suphantharika M, Khunrae P, Thanardldt P, *et al*. Preparation of spent brewer's yeast β–glucans with a potential application as an

immunostimulant for black tiger shrimp, penaeus monodon [J]. Bioresource Technol, 2003, (88): 55–60.

[9] Valachovic P, Pechova A, Mason TJ. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction [J]. Ultrason Sonochem, 2001, 8(2): 111–117.

[10] Hromadkova Z, Ebringerova A, Valachovic P. Comparison of classical and ultrasound–assisted extraction of polysaccharides from Salvia officinalis L [J]. Ultrason Sonochem, 1999, 5(4): 163–168.

[11] 杨翠竹, 李艳, 阮南, 等. 酵母细胞破壁技术研究与应用进展[J]. 食品科技, 2007, (7): 138–142.
Yang CZ, Li Y, Ruan N, *et al*. Study and applications of technology about breaking yeast cell wall [J]. Food Sci Technol, 2007, (7): 138–142.

[12] 上官新晨, 陈木森, 徐睿庸, 等. 超声波法提取青钱柳多糖[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(6): 809–812.
ShangGuan XC, Chen MS, Xu RY, *et al*. Ultrasonicextraction of polysaccharide from cyclocarya paliurus(batal) ijinskaja [J]. Acta Agr Univ Jiangxiensis, 2006, 28(6): 809–812.

[13] 林松毅, 李海霞, 平红, 等. 超声波破壁释放啤酒废酵母细胞中核糖核酸的实验研究[J]. 食品科技, 2009, 34(5): 107–109.
Lin SY, Li HX, Ping H, *et al*. In ultrasonic wave extraction beer waste yeast cell ribonucleic acid research [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(5): 107–109.

[14] 周泉城, 申德超, 区颖刚. 超声波辅助提取经膨化大豆粕中低聚糖工艺[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 245–249.
Zhou QC, Shen DC, Qu YG, *et al*. Ultrasonic assisted extraction of oligosaccharide from defatted soybean meal after extrusion [J]. T CSAE, 2008, 24(5): 245–249.

[15] Hromadkova Z, Ebringerova A, Valachovic P. Ultrasound–assisted extraction of water–soluble polysaccharides from the roots of valerian (Valeriana officinalis L) [J]. Ultrason Sonochem, 2002, 9(1): 37–44.

[16] 潘飞, 邱雁临, 黄欣. 啤酒废酵母中还原型谷胱甘肽的抽提新方法探讨[J]. 生物技术, 2005, 15(4): 50–52.
Pan F, Qiu YL, Huang X. Study of glutathione (GSH) recovery from the waste yeast [J]. Biotechnology, 2005, 15(4): 50–52.

[17] 曾俊华, 王昌禄, 陈蓉蓉, 等. 破碎酵母释放腺苷蛋氨酸的研究[J]. 中国食品添加剂, 2005, 2: 24–26.
Zeng JH, Wang CL, Chen RR, *et al*. The study on releasing adenosyl methionine by breaking yeast [J]. China Food Addit, 2005, 2: 24–26.

(责任编辑: 赵静)

作者简介

胡云峰, 研究员, 主要研究方向为农产品保鲜加工。
E-mail: hu-yf@163.com