

结果。这二者均可引起碳水化合物代谢的方向和速率改变,原有的碳水化合物代谢平衡被打破,向着还原糖积累的方向进行。

此外,贮藏过程中,淀粉、蔗糖和还原糖之间不断地发生着相互转化。淀粉可以转化为蔗糖和还原糖,使块茎“糖化”,“糖化”后的块茎中蔗糖和还原糖又可以转变为淀粉,这些变化的方向和速率取决于品种、块茎的生理状态和贮藏条件。本试验所选品种克新1号在10”贮藏期间马铃薯适于加工。也有学者发现采收时成熟度不同,块茎内的酶系统的初始数量不同,导致低温贮藏下的不同反应^[3]。

因此,“低温糖化”的机理在于,低温促进或抑制了碳水化合物代谢过程中一些酶的活性,增加了造粉体双层膜的透性,从而使碳水化合物代谢向还原糖积累的方向进行。

参考文献

- 1 陈芳,胡小松.马铃薯“低温糖化”机理的研究及进展.马铃薯杂志,1998,12(1):52~55.

- 2 龚国强.黄瓜果实冷害与活性氧代谢的研究(博士论文).北京:北京农业大学,1993.
- 3 韩亚珊.食品化学实验指导.北京:北京农业大学出版社,1991,18.
- 4 刘愚.果蔬贮藏中的逆境效应.中国农业科学,1992,25(5):1~5.
- 5 门福义,刘梦芸编著.马铃薯栽培生理.中国农业出版社,1994,300~345.
- 6 殷宏章,余志新,李嫔娥,沈允钢.水稻籽粒成熟过程中淀粉合成及水解酶活力的变化.实验生物学报,1956,5(1):34~36.
- 7 朱俭,曹凯鸣,周润琦,蔡武城,袁厚积编著.生物化学实验.上海科学技术出版社,1981.
- 8 Eileen.P.O'Donoghue, Rickey Y.Yada,Alejandro G.Marangoni.Low temperature sweetening in potato tubers:the Role of the amyloplast membrane.Plant Physiol,1995,145:335~341.
- 9 Hertog,M.L.A.,Tijskens,L.M.M.,Hark,P.S.The effect of temperature and senescence on the accumulation of reducing sugar during storage of potato (*Solanum Tuberosum* L.) tubers:a mathematical model Postharvest Biology and Technology,1997,10(1):67~69.

啤酒废酵母提取SOD研究

吴思方 方尚玲 童振球 湖北工学院生物工程系 武汉 430064

摘要 研究了从啤酒废酵母中提取、纯化超氧化物歧化酶(SOD)的方法和条件。所得SOD酶比活3048 μ /mg,对粗酶液的收率73%,纯化倍数96倍。

关键词 啤酒废酵母 超氧化物歧化酶(SOD) 提取 纯化

Abstract This paper studied the method and relevant conditions of extraction and purification of SOD from spent beer yeast. The specific enzymatic activity of resultant SOD was 3048 μ /mg. The yield from crude enzyme liquor was 73%. The purification multiple was 96-fold as such.

Key words Beer yeast waste SOD Extract

超氧化物歧化酶(EC1.15.1.1 Superoxide dismutase,简称SOD)是一种重要的氧自由基清除剂,对人体的超氧负离子自由基(Superoxide anionadical O_2^-)的氧化性损伤发挥着有效的清除作用和生理效用,因此能延缓衰老,提高人体免疫力,预防和治疗一些疾病。目前,SOD已较多地应用于医药、化妆品和保健食品的生产中,而且随着研究的深入,

它的应用范围还在不断扩大。目前我国SOD产品主要从牲畜血液中提取^[1],这个方法所用原料有限,SOD质量不稳定。八十年代后,美国和日本先后开发了用发酵法生产SOD,大大地降低了生产成本^[2]。SOD广泛分布于动、植物和微生物体内^[3]。酵母细胞中含有较多的SOD^[4]。我国已是世界第二啤酒生产大国,按啤酒年产量1800万吨,啤酒废酵母(酵母泥)占啤酒

产量的2%计算,我国每年有36万吨啤酒废酵母,这是一笔巨大的财富。目前我国啤酒废酵母尚未得到充分利用,一些啤酒废酵母被干燥为饲料蛋白,一些啤酒废酵母随废水排放,严重污染环境。因此,开展啤酒废酵母生产SOD的综合利用,有较好的经济意义和社会意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 啤酒废酵母:武汉欧联东西湖啤酒厂提供

1.1.2 试剂:甲苯、氯仿、无水乙醇、异丙醇、丙酮、磷酸二氢钾、EDTA、邻苯三酚等均为分析纯。

1.1.3 酵母培养基(%):葡萄糖8,蛋白胨1,酵母膏1。灭菌条件:121℃,30min。

1.2 方法

1.2.1 啤酒废酵母预处理

将回收的啤酒废酵母泥,用2~3倍的无菌(用砂滤棒过滤)冷水(0.5~2℃)洗涤,用80~100目的不锈钢孔板筛过滤,除去酒花树脂和其他较大的杂质,离心分离后,再用0.5~2℃无菌水漂洗1~2次,直到所得上层清液无色无味,酵母呈纯白色为止。

1.2.2 酵母复壮方法

经过洗涤的酵母,按30%接种比,接入酵母培养基中(1000ml三角瓶),于恒温摇床28℃,140r/min培养2h。

1.2.3 酵母SOD提取方法

1.2.3.1 甲苯法^[4]

按每克酵母湿细胞加入0.8ml甲苯,35℃破壁45min,以磷酸缓冲液(pH7.8,含0.1mmol/LDTA)提取5h,5000r/min离心25min,收集上清液,此即SOD粗提液。

1.2.3.2 乙醇-氯仿法^[5]

按每克酵母湿细胞加入4ml 0.1mol/L的NaHCO₃溶液,加3ml乙醇-氯仿(5:3.v/v)溶液,搅拌2h,5000r/min离心25min,收集上清液,此即SOD粗提液。

1.2.3.3 异丙醇法^[6]

按每克酵母湿细胞加入9ml异丙醇,浸泡120min,抽滤除去溶剂,加入3倍体积50mmol/L磷酸钾缓冲液(pH7.0),搅拌120min,离心除去菌体,即得SOD粗提液。

1.2.4 SOD纯化方法^[6]

用2mol/L HCl调节SOD粗提液pH至5.0,加入丙酮,搅拌均匀后,离心(5000r/min)除去沉淀杂蛋白。将上清液调pH到4.0,继续加入丙酮(丙酮二次沉淀),离心收集沉淀便得SOD纯化产品。

1.2.5 SOD活性测定

SOD活性测定采用改进的微量邻苯三酚自氧化法^[7]。

1.2.6 蛋白质含量测定 采用改良的Lowry法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 啤酒废酵母预处理结果

啤酒废酵母50g,经三次洗涤、分离,得纯酵母46.3g,得率为92.6%。

2.2 不同破壁方法提取SOD的比较

不同破壁方法提取SOD效果比较见表1。

表1 不同破壁法SOD粗酶液活力比较

破壁方法	酵母量(g)	总酶活力(u)	每克酵母酶活力(u)
甲苯法	10	7317	731.7
乙醇-氯仿法	10	6592	659.2
异丙醇法	10	8176	817.6

注:酵母未经复壮培养

结果表明,异丙醇破壁提取法酵母SOD粗提液总酶活力最高,以下试验均采用异丙醇法。

2.3 异丙醇法胞内SOD提取条件试验

2.3.1 异丙醇浓度

异丙醇浓度对胞内SOD提取的影响见表2

由表2可见,随着异丙醇浓度增加,酵母细胞内SOD的提取量也增加。同时,胞内杂蛋白释放也增加。所以,SOD的比酶活随着异丙醇浓度增加而下降。我们的目的是提取SOD,杂蛋白在纯化工艺中除去,所以确定异丙醇提取酵母SOD的浓度为90%。

表2 不同异丙醇浓度提取胞内SOD结果

异丙醇浓度(%)	50	60	70	80	90
总酶活力(u)	36028	41213	44318	45716	46615
总蛋白(mg)	83.6	102.5	124.4	135.2	148.1
酶比活(u/mg)	431	402	356	338	315

注:酵母量50g

2.3.2 提取时间

确定异丙醇浓度90%,做不同的提取时间实验:

60、80、100、120、140min。随着提取时间的增加, SOD的释放量增加, 杂蛋白释放量亦增加。140min与120min SOD增加变化不大, 只是杂蛋白量增加, 所以确定提取时间为120min。

2.3.3 提取 pH

在异丙醇浓度90%, 提取时间120min条件下, 比较不同提取溶液 pH: 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。粗酶液中SOD的总酶活, 在pH7.0时为最高, SOD释放量最多, 确定提取pH为7.0。

2.4 复壮酵母与未复壮酵母提取 SOD 的比较

啤酒废酵母多为第六、第七代酵母, 衰老细胞较多, 活力不够强, 有必要进行复壮培养与未复壮培养的SOD含量对比试验。表3为经过复壮的酵母与未经复壮的酵母用异丙醇法提取SOD粗酶液活力比较。

结果表明, 复壮酵母由于生命活动旺盛, 细胞内SOD含量相应增加。以下试验均采用复壮酵母。

表3 复壮与未复壮酵母 SOD 粗酶液活力比较

项目	酵母量 (g)	出芽率 (%)	总酶活力 (u)
未复壮酵母	10	3	8217
复壮酵母	10	13.8	9385

2.5 SOD 纯化

2.5.1 不同丙酮浓度对杂蛋白沉淀影响

酵母SOD的等电点在pH4.0左右^[6], 在pH5.0时SOD沉淀不多, 而杂蛋白沉淀很多。因此本试验确定采用降低pH到5.0, 结合丙酮法的影响见表4。

结果表明, 采用pH5.0, 丙酮:粗酶液(v/v)=0.8:1, 杂蛋白沉淀最多, SOD纯化效果最好, SOD酶比活最高。

表4 不同丙酮浓度对杂蛋白沉淀的影响

丙酮:粗酶液 (v:v)	0.6	0.8	1
SOD酶比活 (u/mg)	1432	2955	2587

2.5.2 不同丙酮浓度对 SOD 沉淀纯化影响

离心分离除去杂蛋白的上清液, 用HCl调节pH到SOD的等电点 (pH4.0), 然后用丙酮沉淀SOD。不同

表5 不同丙酮浓度对 SOD 沉淀纯化影响

丙酮:SOD清液 (v:v)	0.1	0.3	0.5
SOD酶比活 (u/mg)	2632	2911	2786

丙酮浓度对SOD沉淀纯化影响见表5。

结果表明, 采用pH4.0, 丙酮:SOD清液 (v:v)=0.3:1, SOD沉淀的酶比活最高 (纯度最高)。

2.6 啤酒废酵母 SOD 提取纯化结果

根据以上异丙醇提取酵母SOD的条件, SOD丙酮分级沉淀纯化条件, 重新进行100g酵母的系统试验, SOD提取纯化结果见表6。

项目	总蛋白 (mg)	总酶活力 (u)	酶比活 (u·mg ⁻¹)	酶活力回收 (%)	纯化倍数
异丙醇粗提液	301.1	9.42×10 ⁴	312.8	100	1
丙酮一次沉淀	25.7	7.95×10 ⁴	3093.4	84	9.89
丙酮二次沉淀	22.6	6.89×10 ⁴	3048.7	73	9.75

表6 啤酒废酵母 SOD 提取纯化结果

结果表明, 采用异丙醇提取啤酒废酵母SOD, 丙酮二次分级沉淀纯化SOD的方法, 所得SOD, 其酶比活达3048.7u/mg, 对粗酶提取液的酶活力回收率达73%, 纯化倍数达96倍。

2.7 讨论

2.7.1 采用异丙醇提取酵母胞内SOD, 丙酮二次分级沉淀纯化SOD, 使SOD酶比活达3048u/mg, 与胞内SOD提取纯化老工艺比, 一般要经过细胞破碎、离心、盐析、透析、离子交换层析、凝胶层析五至六个步骤, 才能达到酶比活大于3000u/mg。因此, 该工艺步骤少、设备少、操作简单、成本低。

2.7.2 利用啤酒废酵母生产SOD, 是啤酒厂综合利用废酵母, 提高经济效益, 减少排入污染的有效途径。提取SOD后的酵母残渣及杂蛋白可考虑加工为饲料或饲料蛋白添加剂。

2.7.3 丙酮分级沉淀操作时, 宜在4~10℃温度下进行, 有利于提高蛋白沉淀效果, 保护酶活性。

2.7.4 测定SOD酶活力, 国内有许多方法。本研究采用的是改进的微量邻苯三酚自氧化法, 操作时须严格控制自氧化抑制率在50%, 酶与邻苯三酚加入量仅10 μl, 加量须非常准确, 否则影响结果。

2.7.5 为降低成本, 异丙醇、丙酮均可考虑回收浓缩循环使用。

参考文献

- 1 阎家麒等. 中国医药工业杂志, 1992, 23 (11): 481~483.
- 2 Mosanki T.Kazuhiro H. Biotechnol Bioeng. 1992, 39: 869~890.
- 3 袁勤生. 生化药物杂志, 1988, 44 (2): 1~9.
- 4 冯清平等. 微生物学报, 1995, 34 (4): 280~286.

大豆卵磷脂的提纯

方嘉坚 陈龙 杭州应用工程技术学院化工系 310012

摘 要 探讨了以市售大豆油脚为原料, 用全溶剂法精制出符合药用(口服和注射)规格的大豆卵磷脂的工艺条件并建立了相应的数学模型。其主要性能指标为: $N\%=1.70$, $P\%=4.0\%$, 酸价 10.48, 碘价 95.35。

关键词 大豆 卵磷脂 提纯

Abstract In this paper the technique of purifying medicinal lecithin from soybean molasses by solvent extraction was discussed. Its main property targets were: $N\%=1.70$, $P\%=4.0\%$, acid value 10.48 iodine number 95.35.

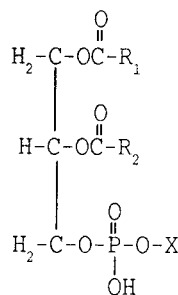
Key words Soybean Lecithin Purify

大豆卵磷脂是一种在动、植物中分布很广的磷脂, 它价廉而资源丰富, 是天然的乳化剂和营养补品。卵磷脂在食品中可用作乳化剂、润湿剂、分散剂、抗老化剂和稳定剂等。在医学上, 可降低血脂、治疗脂肪肝和肝硬化, 可使老年人动脉血管壁增强和减少坏死, 防止血管硬化。70年代以来, 美国就把卵磷脂用于保健食品, 总销量仅次于复合维生素 C 和维生素 E 名列第三位。卵磷脂大都来自于食物, 因此没有不良作用。据 WHO (世界卫生组织) 专门委员会报告, 磷脂比食用维生素更安全。

近年来, 对大豆磷脂的研究报道较多, 多为粗磷脂、浓缩磷脂以及各种改性磷脂的制造和应用研究, 而药用(口服和注射)高纯度精致卵磷脂的研究报道较少。国外对大豆磷脂作为乳化剂和药物载体的研究报道较多, 其精制方法研究也比较深入^[1~5]。我国自80年代开始对药用大豆磷脂精致工艺进行了研究。上海油脂一厂利用不同结构磷脂在溶剂中的溶解度不同, 率先制备出药用规格的大豆磷脂^[6]。最近, 有文献报道, 使用高分子膜和二氧化碳超临界萃取法可得到高纯度的磷脂^[7], 但该方法成本高, 设备复杂, 产品价格高, 难以被消费者接受。我们在综合国内外文献基础上, 根据大豆磷脂的多种物化性能, 研究出了以浓缩大豆磷脂为原料, 应用全溶剂法制备大豆卵磷脂的方法。该方法工艺简单, 成本低廉, 产率高, 颜色浅, 有着很高的实用和推广价值。

1 大豆磷脂的结构和组成

大豆磷脂主要是由磷脂酰胆碱(卵磷脂), 磷脂酰乙醇胺, 磷脂酰肌醇以及大豆油等组成。其一般的化学结构式为:



其中 R_1 和 R_2 是 $\text{C}_{14} \sim \text{C}_{20}$ 的饱和或不饱和脂肪酸链, 而 X 的不同则构成了不同的磷脂:

$\text{X}--\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 磷脂酰胆碱(PC)、卵磷脂

$\text{X}--\text{CH}_2\text{NH}_2$ 磷脂酰乙醇胺(PE)

$\text{X}--\text{C}_6\text{H}_6(\text{OH})_3$ 磷脂酰肌醇(PI)

$\text{X}--\text{H}$ 磷脂酸(PA)

从上述的结构特点中可以看出, 大豆卵磷脂之所以具有表面活性, 主要是因为这些分子中含有疏水性的脂肪酸链和亲水基团(磷酸基、胆碱式乙醇胺)。

纯磷脂经乙醇萃取, 可分为醇溶性组分和醇不溶性组分, 两者的化学结构不同, 醇溶性部分称为卵磷脂, 醇不溶性部分称为脑磷脂, 它们实际上都是几种磷脂的混和物。

由于大豆的产地、采集时间和原料处理精致方法不同, 其磷脂的组成在不同程度上有所差异。市售的

5 王岁楼等. 工业微生物, 1997, 27 (2): 45~47.

6 谭天伟等. 微生物学报, 1997, 37 (1): 68~71.

7 谢卫华等. 医药工业, 1988, 19 (5): 217~219.

8 Schacterle G R et al. Ann Biochem. 1973. 51: 654.