

甲醇酵母细胞破壁与蛋白纯化工艺研究

刘东奇^{1,2}, 王 喆¹, 王 翔¹, 尹翠玉¹, 张宇峰¹

(1. 天津工业大学 天津市先进纤维与储能技术重点实验室, 天津 300160;

2. 新乡白鹭化纤集团有限责任公司, 河南 新乡 453242)

摘要: 利用碱溶、离心、破壁、酸沉对甲醇蛋白粗品进行纯化。研究了适合于甲醇酵母细胞破壁及胞内蛋白纯化的条件。结果表明: 热碱与高压均质联合处理法较生物酶解处理法、热碱处理法及高压均质处理法对细胞破壁效率高; 采用 pH 10.0、60 ℃ 热处理 2 h, 100 MPa 压力均质 3 次, 细胞破壁率可达 87.6%; 在 pH 4.5 时, 破壁后上清液蛋白沉淀量最大, 所得纯化甲醇蛋白中粗蛋白质含量达到 82.5%, 纯化效果较为理想。

关键词: 甲醇蛋白; 细胞破壁; 纯化

中图分类号: S816; Q936

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2016)06-0032-04

Methanol yeast cell - broken and protein purification

LIU Dongqi^{1,2}, WANG Zhe¹, WANG Xiang¹, YIN Cuiyu¹, ZHANG Yufeng¹

(1. Tianjin Municipal Key Laboratory of Advanced Fiber and Energy Storage, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300160, China; 2. Xinxiang Bailu Chemical Fiber Group Co., Ltd., Xinxiang 453242, Henan, China)

Abstract: The crude methanol protein was purified by alkali solution, centrifugation, cell - broken and acid precipitation. The cell - broken conditions of methanol yeast and intracellular protein purification conditions were researched. The results showed that the cell - broken efficiency of thermal alkali combined with high pressure homogenization treatment method was higher than the methods of biological enzymatic hydrolysis treatment, thermal alkali treatment and high pressure homogenization treatment. Under the conditions of pH 10.0, 60 ℃ heating for 2 h, pressure 100 MPa homogenization for three times, the cell - broken efficiency was 87.6%. The precipitation capacity of supernatant after cell - broken was the highest at pH 4.5, and the crude protein content of purified methanol protein reached 82.5%, so the purification result was ideal.

Key words: methanol protein; cell - broken; purification

甲醇蛋白是以甲醇、磷酸等作为培养基, 通过发酵形成的甲醇酵母细胞为单细胞菌体, 再经提炼形成单细胞蛋白^[1-3]。从甲醇酵母细胞中所提取的单细胞蛋白产品安全无毒, 其丰富的氨基酸含量是其他植物性原料所无法比拟的, 是一种营养价值非常高的蛋白质产品。单细胞甲醇蛋白胞内可溶性蛋白质占细胞总蛋白质的比例达 95% 以上。但是甲醇

酵母细胞是由葡聚糖、甘露聚糖和蛋白质等组成的网络结构, 且胞壁较厚, 结构坚韧, 所以大部分并没有破壁, 不利于胞内蛋白质提取。如果将其直接进行蛋白质提取, 收率很低。而且提取物里面还含有大量的磷脂、核酸和多糖等杂质。因此, 目前这类甲醇蛋白粗品主要作为饲料添加剂使用^[4-9]。

本研究利用甲醇蛋白粗品经过碱溶、离心、破壁、酸沉制取纯化甲醇蛋白, 研究了适合于甲醇酵母细胞破壁及纯化胞内蛋白质的方法, 为甲醇蛋白的有效利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

甲醇蛋白粗品: 自制。表 1 为甲醇蛋白粗品的

收稿日期: 2015-12-08; 修回日期: 2016-03-30

作者简介: 刘东奇(1971), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为粘胶纤维改性(E-mail) 13703731796@163.com。

通信作者: 尹翠玉, 教授, 硕士生导师(E-mail) yincuiyu@tjpu.edu.cn; 张宇峰, 教授, 博士生导师(E-mail) zyf9182@163.com。

成分。酵母破壁酶:广西南宁庞博生物工程有限公司;其他试剂均为分析纯。

表1 甲醇蛋白粗品的成分 %

粗蛋白质	粗脂肪	粗纤维	水分	粗灰分
50.0	11.5	7.4	18.5	12.6

1.1.2 仪器与设备

Q/SGYM1008 电子天平; BD-1A-70 冷冻干燥机; NanoGenizer 高压均质机:苏州微流纳米生物技术有限公司; Delta 320 酸度计:梅特勒-托利多公司; TDL-5A 离心机; DK-S24 恒温水浴锅; SHA-B 水浴恒温振荡器。

1.2 实验方法

1.2.1 甲醇蛋白细胞破壁

(1) 生物酶解处理。量取 25% 甲醇蛋白粗品溶液 500 mL, 调节 pH 4.5 后分装成 5 份, 每份 100 mL。在甲醇蛋白粗品溶液中分别加入 0.01%、0.02%、0.03%、0.04% 和 0.05% 的酵母破壁酶, 在水浴恒温振荡器中 50℃ 保温 12 h。酶解结束后, 测定细胞破壁率, 然后离心收集上清液, 并测定其中蛋白质含量。

(2) 热碱处理。量取 5 份 25% 甲醇蛋白粗品溶液各 100 mL, 调节 pH 至 7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 分别置于 60℃ 的恒温水浴中保温 2 h, 每隔 10 min 搅拌 1 次。热碱处理结束后, 测定细胞破壁率, 然后离心收集上清液, 并测定其中蛋白质含量。

(3) 高压均质处理。量取 5 份 25% 甲醇蛋白粗品溶液各 100 mL, 在高压均质机中进行高压均质破壁, 高压均质压力分别为 40、60、80、100 MPa 和 120 MPa。高压均质处理结束后, 测定细胞破壁率, 然后离心收集上清液, 并测定其中蛋白质含量。

(4) 热碱-均质处理。量取 2 份 25% 甲醇蛋白粗品溶液各 200 mL, 调节 pH 至 9.0、10.0 后, 分别置于 60℃ 的恒温水浴中保温 2 h 进行热碱处理。热碱处理结束后分装成 4 份, 每份 100 mL, 分别在 60、80、100 MPa 和 120 MPa 下进行均质处理。均质结束后, 测定细胞破壁率, 然后离心收集上清液, 并测定其中的蛋白质含量。

1.2.2 细胞破壁率测定

取各处理前后的甲醇蛋白细胞悬液 1 mL, 在显微镜下观察, 用血细胞计数板对具有完整形态的细胞进行计数, 每样品计数 5 次, 取平均值。细胞破壁率为破壁前后具有完整形态细胞数之差占破壁前细胞数的百分比。

1.2.3 蛋白释放量的测定

蛋白释放量为破壁处理后上清液中蛋白质总量

与甲醇蛋白粗品干重之比。

1.2.4 甲醇蛋白酸沉纯化

最取 5 份 500 mL 25% 甲醇蛋白粗品溶液, 选择适合甲醇蛋白细胞破壁处理方法, 处理结束后离心收集上清液, 用盐酸分别将上清液调节 pH 至 3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0, 静置 20 min 后, 5 000 r/min 下离心 10 min, 即获得蛋白沉淀。将蛋白沉淀冷冻干燥后称重, 并测定蛋白沉淀中粗蛋白质含量。

2 结果与讨论

2.1 生物酶解处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

酵母破壁酶是由 β -葡聚糖酶、甘露聚糖酶及几丁质酶等复配而成, 可降解细胞壁多糖, 使胞内蛋白质释放出来^[10-12]。图 1 为生物酶解处理对甲醇蛋白细胞破壁效果的影响曲线。

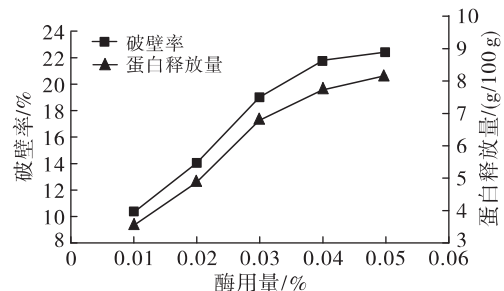


图1 生物酶解处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

从图 1 可以看出, 随酶用量增加, 甲醇蛋白细胞破壁率不断上升, 酶用量在 0.01% ~ 0.04% 时, 细胞破壁率快速上升, 蛋白释放量也迅速增加。但当酶用量大于 0.04% 时, 上升趋势减缓, 蛋白释放量增加不明显。但总体来看, 生物酶解处理对酵母细胞破壁效果较差, 最大破壁率仅约 22%, 蛋白释放量也较低。

2.2 热碱处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

图 2 为热碱处理对甲醇蛋白细胞破壁效果的影响曲线。

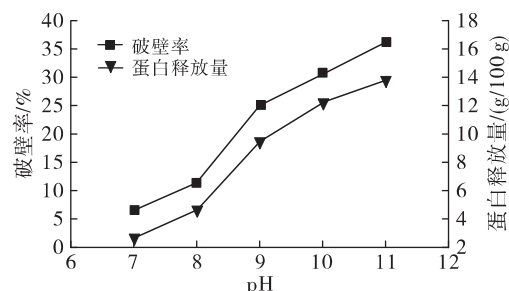


图2 热碱处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

从图 2 可以看出, pH 低于 8.0 时, 破壁效果较差。当 pH 升高, 细胞破壁率迅速上升, 在 pH 11.0 时, 细胞破壁率高达 36.2%。蛋白释放量与细胞破壁率变化趋势一致。实验发现, 当对甲醇蛋白粗品

溶液热处理时间延长及碱性增强时,纯化蛋白颜色也不断加深,并伴随有硫化物的特殊气味,这可能是由于胞内蛋白释放出来后,部分二硫键断裂,与碱反应变性所致。

2.3 高压均质处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

图3为高压均质处理对甲醇蛋白细胞破壁效果的影响曲线。

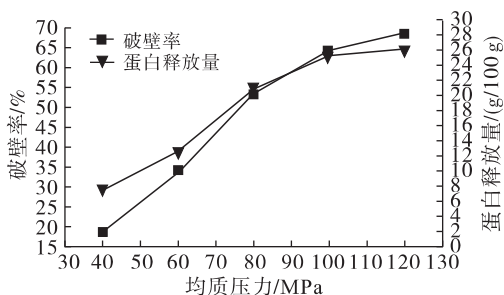


图3 高压均质处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

从图3可以看出,当均质压力低于60 MPa时,细胞破壁率很低,当均质压力增大至100 MPa,细胞破壁率快速上升,蛋白释放量也迅速增加。当均质压力再增高时,细胞破壁率和蛋白释放量增加不明显。实验发现,过高均质压力往往对设备损耗较大,易增加生产成本,生产中应考虑适当均质条件。

2.4 热碱-均质处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

比较了pH 9.0和pH 10.0两种碱性条件下,60℃热处理2 h并均质3次对甲醇蛋白细胞破壁的效果,结果见表2。

表2 热碱-均质处理对甲醇蛋白细胞破壁的影响

均质压力/ MPa	细胞破壁率/%		蛋白释放量/ (g/100 g)	
	pH 9.0	pH 10.0	pH 9.0	pH 10.0
60	51.1	65.5	19.80	26.20
80	69.4	79.1	27.41	32.29
100	80.1	87.6	30.77	35.48
120	86.6	89.1	35.07	35.64

从表2可以看出,随着均质压力的升高,pH 9.0和pH 10.0的甲醇蛋白细胞破壁率及蛋白释放量都不断上升。pH 10.0、100 MPa下,细胞破壁率达到87.6%,其破壁率及蛋白释放量均高于pH 9.0的。

2.5 均质次数对甲醇蛋白细胞破壁的影响

在100 MPa、pH 9.0条件下对甲醇蛋白粗品溶液进行均质,均质次数分别设为1~5次,结果如图4所示。

从图4可以看出,均质3次后,80%以上的细胞均能被破壁,相应胞内蛋白释放量也不断增多。当均质次数多于3次时,细胞破壁率及蛋白释放量并未显著提高。

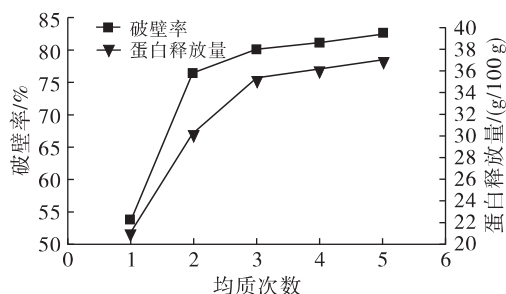


图4 均质次数对甲醇蛋白细胞破壁的影响

2.6 甲醇蛋白酸沉纯化

在100 MPa、pH 10.0条件下对500 mL 25%甲醇蛋白粗品溶液均质3次后离心所得上清液在不同pH下获得蛋白沉淀量如图5所示。

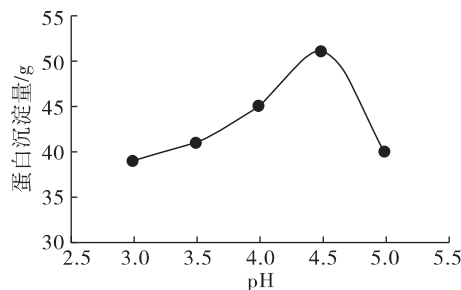


图5 不同pH对上清液中蛋白沉淀量的影响

从图5可以看出,在pH为4.5时,蛋白沉淀量最大,达到51.6 g。随着pH进一步增大,蛋白沉淀量逐渐降低。这说明从甲醇酵母细胞中提纯的蛋白质的等电点约为pH 4.5。在高于或低于此pH下进行蛋白沉淀,都会引起蛋白质损失^[13-14]。在pH 4.5条件下,得到的纯化甲醇蛋白产品中粗蛋白质含量达到82.5%,纯化效果较为理想。

3 结论

研究了几种甲醇蛋白细胞破壁方法对甲醇蛋白细胞破壁率及蛋白释放量的影响,以及pH对上清液中甲醇蛋白沉淀量的影响。结果表明,热碱与高压均质联合处理法较生物酶解处理法、热碱处理法及高压均质处理法对细胞破壁效率高。综合生产成本及提纯蛋白的用途和性质等因素,本研究获得了热碱-均质处理的最适条件:采用pH 10.0,60℃热处理2 h,100 MPa压力均质3次,细胞破壁率可达87.6%;在pH 4.5时,破壁后上清液蛋白沉淀量最大,所得纯化甲醇蛋白中粗蛋白质含量达到82.5%,纯化效果较为理想。

参考文献:

- [1] YURANOVA T, RINCON A G, BOZZI A, et al. Antibacterial textiles prepared by RF-Plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver [J]. J Photochem Photobiol A Chem, 2003, 161(20): 27-34.

油脂化学

不同制油方法对石榴籽油品质的影响

王林林, 祁 鲲, 杨 倩, 朱新亮, 胡 鹏

(河南省亚临界生物技术有限公司, 河南 安阳 455000)

摘要: 通过对超临界 CO_2 萃取法、亚临界丁烷萃取法、有机溶剂萃取法和压榨法所得的石榴籽油进行脂肪酸组成分析, 研究 4 种不同制油方法对石榴籽油石榴酸含量的影响, 并对石榴籽油进行理化指标及抗氧化性分析。结果表明: 亚临界丁烷萃取法所得石榴籽油的石榴酸含量最高, 可达 82.39%, 有机溶剂萃取法所得石榴籽油石榴酸含量最低。亚临界丁烷萃取法所得石榴籽油得率最高, 理化指标较好, 抗氧化性最强。

关键词: 亚临界萃取; 超临界萃取; 石榴籽油; 石榴酸; 抗氧化性

中图分类号: TS224; TQ644

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2016)06-0035-04

Effect of extraction methods on quality of pomegranate seed oil

WANG Linlin, QI Kun, YANG Qian, ZHU Xinliang, HU Peng

(Henan Yalinjie Biological Technology Co., Ltd., Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: The effects of four kinds of extraction methods on the content of puniic acid in pomegranate seed oil were studied through analysis of fatty acid composition of pomegranate seed oils obtained by the methods of supercritical CO_2 extraction, subcritical butane extraction, organic solvent extraction and pressing. The physicochemical index and antioxidation of pomegranate seed oil were analyzed. The results showed that the content of puniic acid in pomegranate seed oil extracted by subcritical butane was the highest, reaching 82.39%, while the content of puniic acid in pomegranate seed oil extracted by organic solvent was the lowest. The pomegranate seed oil extracted by subcritical butane had the highest yield, better physicochemical indexes and the strongest antioxidation.

收稿日期: 2015-09-08; **修回日期:** 2016-04-08

作者简介: 王林林(1987), 女, 助理工程师, 主要从事油脂深加工方面的研究工作(E-mail) wanglucy2006@126.com。

Key words: subcritical extraction; supercritical extraction; pomegranate seed oil; puniic acid; antioxidation

- [1] 张莉. 浅析甲醇蛋白生产技术与开发前景 [J]. 青海科技, 2005, 12(4): 36-38.
- [2] 任富强, 乔丽娟, 杨国锋. 浅析煤制甲醇蛋白工业化 [J]. 河南化工, 2012, 29(17): 30-32.
- [3] 李双娟. 甲醇蛋白的生产及发展前景 [J]. 中氮肥, 2006(3): 4-6, 20.
- [4] 谢克昌. 甲醇及其衍生物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 406-407.
- [5] 徐兆瑜. 甲醇产业的发展和工艺技术新进展 [J]. 精细化工原料及中间体, 2007(6): 23-26, 14.
- [6] 李峰, 朱铨寿. 甲醇及下游产品 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 104-113.
- [7] 韩天玉, 乔建芬. 甲醇蛋白的开发前景 [J]. 煤化工, 2002, 100(3): 28-30.
- [8] 吴国荃, 丁爽, 宋淑利, 等. 甲醇蛋白的生产应用及投资建议 [J]. 化工技术经济, 2003, 21(11): 7-8, 14.

- [9] 苟万晓, 卫红伟, 胡元森, 等. 毕赤酵母发酵生产甲醇蛋白工艺条件的优化 [J]. 中国酿造, 2014, 269(7): 78-82.
- [10] 林敏刚. 碱性蛋白酶在水解植物蛋白中的应用 [J]. 中国油脂, 2009, 34(12): 30-33.
- [11] 杨学昊, 尹春华, 傅四周, 等. 根霉脂肪酶发酵优化和酶性质的研究 [J]. 中国油脂, 2004, 29(7): 29-32.
- [12] 盛小娜, 王璋, 许时婴. 水酶法提取甜杏仁油及水解蛋白的研究 [J]. 中国油脂, 2007, 32(11): 26-30.
- [13] 杜蕾蕾, 郭涛, 万辉, 等. 核桃蛋白的分离纯化及功能性质的研究 [J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 21-24.
- [14] 刘宁, 朱振宝, 仇农学, 等. 苦杏仁蛋白提取工艺优化及氨基酸分析 [J]. 中国油脂, 2008, 33(1): 26-29.
- [15] 左雅慧, 蒋德群. 发酵法开发甲醇蛋白的研究 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 34-44.