二甲基亚砜辅助分离酵母细胞壁中β-葡聚糖的工艺探索

曹桦强[1,2]，赵晨晨[1,2]，杨笑天[3]，段思佳[1,2]，张彭湃*[1,2]

(1. 河南大学 生命科学学院，河南 开封 475004；2. 河南省应用微生物工程研究中心，河南 开封 475004；3. 河南大学 药学院，河南 开封 475004)

摘要：酵母β-葡聚糖(yeast β-glucan)是一种难溶于水、酸、碱等常用溶剂的多糖，因传统的制备工艺复杂、烦琐且产品产量低或纯度不高，导致其产业化困难。作者用碱法结合二甲基亚砜(DMSO)辅助分离对酵母β-葡聚糖的生产制备工艺进行了探索和优化。结果显示：在0.7 g/dL NaOH中80 ℃处理2.6 h进行碱法除杂，除杂率最大为71.84%；在料液比为30 mg∶1 mL、体积分数80%的DMSO、80 ℃下分离纯化β-葡聚糖30 min，得到的β-葡聚糖产品纯度达到95.84%。通过薄层色谱和傅里叶红外光谱对产品进行鉴定，表明此产品是由葡萄糖单体聚合而成，呈β构型；抗炎试验表明，此产品具有一定的生物活性。该研究旨在简化生产工艺、扩大生产规模、提高产品质量，以期为工业化生产提供依据。

关键词：酵母β-葡聚糖；二甲基亚砜(DMSO)；辅助分离；工艺探索

中图分类号：TS 209　　**文章编号**：1673-1689(2024)06-0155-09　　**DOI**：10.12441/spyswjs.20230412003

Process Exploration for Separating β-Glucan from Yeast Cell Wall Assisted by Dimethyl Sulfoxide

CAO Huaqiang[1,2]，*ZHAO Chenchen*[1,2]，*YANG Xiaotian*[3]，*DUAN Sijia*[1,2]，*ZHANG Pengpai*[*1,2]

(1. School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Engineering Research Center for Applied Microbiology of Henan Province, Kaifeng 475004, China; 3. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Yeast β-glucan is a type of polysaccharide that is difficult to dissolve in commonly used solvents such as water, acids, and alkalis. Traditional preparation methods are complex, cumbersome, and often result in low product yield or impurities, causing difficulties in industrialization. In this study, an alkaline method combined with dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to explore and optimize the production process of yeast β-glucan. The results showed that under the conditions of 0.7 g/dL NaOH at 80 ℃ for 2.6 hour alkaline treatment, the highest impurity removal rate was 71.84%. Separation and purification of β-glucan were accomplished under the conditions of the solid-to-liquid ratio of 30 mg∶1 mL and 80% volume fraction of DMSO at 80 ℃ for 30 minutes,

收稿日期：2023-04-12　　**修回日期**：2023-06-13

基金项目：河南省科技攻关项目(222102110305)；河南省优秀硕士论文培育项目(SKYYSPY2022016)。

* **通信作者**：张彭湃(1978—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物发酵研究。E-mail：bio_apai@163.com

resulting in a β-glucan product with a purity of 95.84%. The product was identified by thin-layer chromatography and Fourier-transform infrared spectroscopy, and the product was indicated as β-glucan composed of glucose monomers. Moreover, Anti-inflammatory experiments showed that this product had a certain biological activity. The study aimed to simplify production processes, scale up production, improve product quality, and provide a theoretical reference for industrialized production.

Keywords: yeast β-glucan, dimethyl sulfoxide (DMSO), assisted separation, process exploration

啤酒酵母是啤酒工业的副产物,其细胞壁内含β-葡聚糖、蛋白质和甘露聚糖[1],具有多种用途。其中,β-葡聚糖(即β-1,3-葡聚糖)具有增强免疫力[2]、抗肿瘤[3]、抗氧化[4]、改善肠道菌群[5]等作用。在众多来源的β-葡聚糖中,酵母细胞壁来源的水不溶性β-葡聚糖具有免疫活性,而啤酒酵母作为安全的模式生物也广泛应用于食品和医药工业[6]。

酵母细胞壁是由甘露聚糖-蛋白质-β-葡聚糖形成的致密镶嵌结构,β-葡聚糖占酵母细胞壁组成的50%~65%[7]。β-葡聚糖的提取纯化主要是要把细胞壁中的甘露聚糖、水溶性β-葡聚糖、蛋白质及脂类分离出去。但是由于酵母β-葡聚糖具有特殊的三维螺旋结构而难溶于水、酸、碱等常用溶剂[7],所以在提取纯化时有一定的困难。在已报道的酵母β-葡聚糖制备方法中[8],常见的有酸法、酶法、超声波法、高压均质法等,但这些方法的提取物中均含有未除去的结构性蛋白质、脂质、不溶性灰质、酒花、麦麸等杂质,产品纯度较低。

二甲基亚砜(DMSO)是一种极性溶剂,研究表明酵母β-葡聚糖在DMSO溶液中具有一定的溶解性[9],利用二甲基亚砜可溶解酵母β-葡聚糖的性质来提取酵母β-葡聚糖,从而对提纯过程中的不溶性杂质进行分离[10]。因此,作者以市售酵母细胞壁为原料,以DMSO为纯化辅助溶剂,通过对碱法除杂和DMSO分离除杂条件的探索和优化,从而获得高效、可行的高纯酵母β-葡聚糖制备工艺,为简化酵母β-葡聚糖的提取过程和工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 市售酵母细胞壁:西蠡商贸公司;酵母β-葡聚糖标品:Sigma公司;BCA试剂盒:上海生工;NaOH、苯酚:天津德恩试剂公司;硫酸:洛阳昊华试剂公司;二甲基亚砜:上海麦克林生化公司。

1.1.2 主要仪器 EPOCH2酶标仪:BioTek(美国)有限公司;AL104分析天平:梅特勒托利多科技(中国)有限公司;X1R高速离心机:赛默飞世尔(中国)科技公司;FD-IE-80冷冻干燥机:上海比朗仪器制造有限公司;Spectrum Two傅里叶红外光谱仪:珀金埃尔默仪器有限公司;Vario Macro cube半常量元素分析仪:德国元素公司;HH-1J恒温水浴锅:常州国旺仪器有限公司;WSJB-03恒温磁力搅拌器:河南中良科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺路线 市售酵母细胞壁→热水浸提→碱法除杂→粗多糖→冻干→DMSO溶解→离心→冻干→水洗→冻干→高纯度酵母β-葡聚糖。

1.2.2 热水浸提 市售酵母细胞壁与蒸馏水,以1 g∶6 mL的料液比混合均匀,在90 ℃水浴浸提8 h[11-12]。浸提物于4 ℃、8 000 r/min离心10 min,沉淀烘干至恒质量,备用。

1.2.3 碱法除杂的单因素试验 准确称取5份经前处理的酵母细胞壁2 g,并配制质量浓度为2 g/dL的混悬液。采用控制变量法,变量条件为:NaOH质量浓度(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 g/dL)、处理温度(40、50、60、70、80、90 ℃)、处理时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h),在不同处理条件下进行试验。以除杂率和碱提液中总糖质量浓度、蛋白质质量浓度为测定指标,考察NaOH质量浓度、处理温度、处理时间对结果的影响。处理物于6 000 r/min离心10 min,水洗2次并用稀盐酸调整pH为中性,冻干,得到粗酵母β-葡聚糖。

1.2.4 碱法除杂的响应面试验设计 运用Design Expert 8.0软件,通过BBD(Box-Behnken)模型设计三因素三水平的响应面试验[13],结合单因素结果分

析,选择 NaOH 质量浓度、处理温度、处理时间 3 个因素为自变量,除杂率为响应值优化除杂工艺。

1.2.5 DMSO 辅助分离纯化过程和单因素试验 1)分离纯化过程 取 1.2.3 中制备的粗品若干,加入体积分数 90%的 DMSO 进行溶解,随后于 8 000 r/min 离心 20 min,分离上层清液和下层杂质沉淀,取上层清液进行冻干,得到高纯度β-葡聚糖。

2)DMSO 辅助分离纯化的单因素试验 准确称取若干份的粗酵母β-葡聚糖 50 mg,设定各因素水平分别为:料液比 5 mg:1 mL、体积分数 90%的 DMSO,处理温度 70 ℃,处理时间 30 min。设置不同处理条件:料液比为 25 mg:1 mL、30 mg:1 mL、35 mg:1 mL、40 mg:1 mL、45 mg:1 mL、50 mg:1 mL;DMSO 体积分数为 50%、60%、70%、80%、90%、100%;处理温度为 50、60、70、80、90、100 ℃;处理时间为 10、15、20、25、30、35 min 进行试验。以分离效率为测定指标,分析料液比、DMSO 体积分数、处理温度、处理时间 4 个因素对结果的影响。

1.2.6 纯度测定 采用刚果红法[14]对酵母β-葡聚糖产品的纯度进行测定。

1.2.7 元素组成测定 使用半常量元素分析仪对产品的元素组成进行测定。

1.2.8 薄层色谱法测定单糖组成 采用陈橙等的方法[15]稍加改动。分别制备核糖、木糖、甘露糖、葡萄糖标准品和酵母β-葡聚糖样品,展开剂 2 次展开后,用质量分数 5%的硫酸乙醇溶液显色。

1.2.9 傅里叶红外光谱分析 采用傅里叶红外光谱对样品结构进行分析。

1.2.10 抗炎活性测定 用体积分数 80%的乙醇对经 DMSO 溶解的酵母β-葡聚糖进行醇沉,静置过夜,8 000 r/min 离心 10 min,弃去上层乙醇,沉淀加水溶解,减压浓缩,冻干,所得样品用无菌水配制成所需质量浓度。抗炎活性测定参照王昭晶的方法并稍加改动[16]。将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)消化,离心后用 DMEM 完全培养基重悬,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,并在 37 ℃和体积分数 5%的 CO_2 下培养 24 h。用终质量浓度为 1 μg/mL 的 LPS 建立炎症模型,设为阳性对照组,试验组添加 LPS(1 μg/mL)和制备的酵母β-葡聚糖(20、40、60、80、100 μg/mL),空白组加入正常的 DMEM 完全培养基。目标基因(*IL-6*、*IL-1β*) mRNA 的相对表达水平(定义为倍数变化)使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法确定。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参基因,将表达水平标准化为在相应对照细胞(定义为 1.0)中检测到的倍数变化。

1.2.11 各成分检测方法 碱提液稀释 20 倍,进行以下各项指标测定。

苯酚-硫酸法测定总糖质量浓度参照 Nielsen 的方法并做调整[17]。绘制标准曲线,代入标准方程,计算总糖质量浓度。

BCA 法检测蛋白质质量浓度参照 Walker 的方法并做调整[18]。绘制标准曲线,代入标准方程,计算蛋白质质量浓度。

碱处理的除杂率见式(1):

$$W_R=(m_w-m_c)/m_w\times100\% \quad (1)$$

式中:W_R 为除杂率,%;m_w 为细胞壁质量,g;m_c 为粗β-葡聚糖质量,g。

β-葡聚糖得率见式(2):

$$W_{CP}=m_c/m_w\times100\% \quad (2)$$

式中:W_{CP} 为粗β-葡聚糖得率,%;m_w 为细胞壁质量,g;m_c 为粗β-葡聚糖质量,g。

二甲基亚砜分离杂质的效果用分离效率(β-葡聚糖得率)表示,见式(3):

$$W_S=m_p/m_c\times100\% \quad (3)$$

式中:W_S 为分离效率,%;m_p 为纯化β-葡聚糖质量,g;m_c 为粗β-葡聚糖质量,g。

1.2.12 数据处理 用 Origin 8.5 对所涉及的数据进行处理,采用 *t* 检验法进行多重比较,置信度为 95%,结合方差分析对相关数据进行统计。数据结果为 3 次实验的平均值,其中 $P<0.05$ 表示具有显著性。

2 结果与分析

2.1 碱法除杂单因素结果分析

2.1.1 NaOH 质量浓度对除杂率的影响 碱法是一种经典的提取方法[19]。经过热水浸渍的酵母细胞壁只除去了大量的细胞器、氨基酸、核酸和甘露聚糖。而碱的作用就可以除去细胞壁中少量残存的甘露聚糖和碱溶性β-葡聚糖。NaOH 质量浓度对除杂的影响见图 1。

随着 NaOH 质量浓度的升高,上层液中的总糖和蛋白质质量浓度逐渐增高。NaOH 质量浓度分别在 0.8 g/dL 和 1.4 g/dL 时达到最大;NaOH 质量浓度在 1.0 g/dL 时除杂率逐渐趋于平衡,达到

62.37%。碱对蛋白质的去除有很大帮助,但是由于在杂质的分离过程中,不是只有蛋白质这一种杂质成分。过高质量浓度的碱有可能对酵母 β-葡聚糖的空间三维结构及生物活性造成不可逆的损伤,大量的酸碱也会造成除杂成本的增加[20]。因此,综合多项指标,选取质量浓度 0.6、0.8、1.0 g/dL 进行响应面试验。

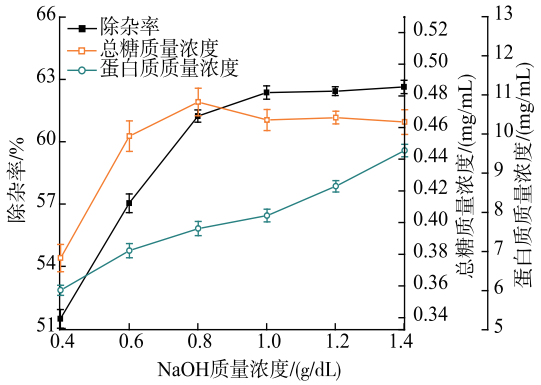


图 1 NaOH 质量浓度对除杂率的影响

Fig. 1 Effect of NaOH mass concentration on impurity removal

2.1.2 *处理温度对除杂率的影响* 温度是实验过程中的一个重要因素,它直接影响反应速率,处理温度对除杂率的影响见图 2。

除杂率随着温度的升高而增大,总糖和蛋白质质量浓度也呈现出逐渐升高的趋势。当处理温度达到 80 ℃时,除杂率达到最大,为 66.23%,但是此时总糖和蛋白质质量浓度变化不明显(P<0.05)。因此,综合多项指标,选取 60、70、80 ℃进行响应面试验。

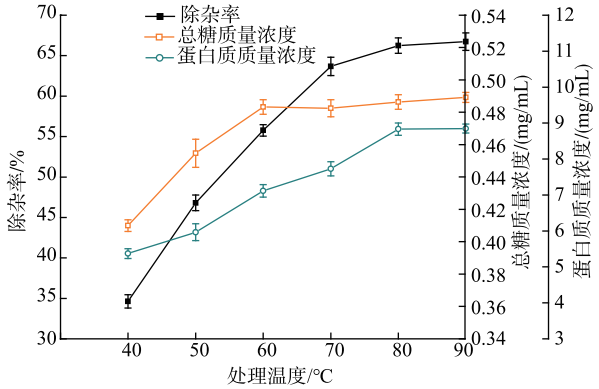


图 2 处理温度对除杂率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on impurity removal

2.1.3 *处理时间对除杂率的影响* 随着时间的延长,可以加剧反应的过程,处理时间对除杂的影响见图 3。

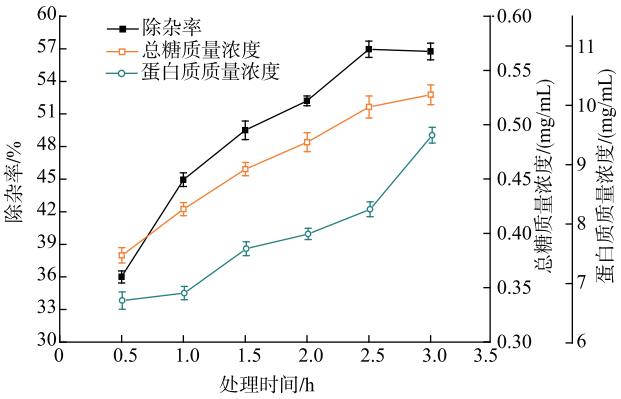


图 3 处理时间对除杂率的影响

Fig. 3 Effect of time on impurity removal

随着处理时间的增加,各项指标都随之增大。当处理时间为 2.5 h 时,除杂率和总糖质量浓度达到最大,此时除杂率为 51.65%,但是蛋白质质量浓度在 3.0 h 时达到最大。结合实际生产成本,以 2.0、2.5、3.0 h 进行响应面试验。

2.2 碱法除杂提取粗多糖的响应面试验

采用 BBD 方法设计评价 3 个自变量对除杂率的影响。共 17 次试验,取值范围分别为−1、0、+1。

2.2.1 *优化结果方差分析* 在对试验数据进行多元回归分析,用二阶多项式模型解释各变量的作用及其二阶相互作用。对试验设计及结果进行二次回归拟合,建立的回归方程如下:

$$Y=67.36+0.85A+5.74B+1.7C-0.41AB+0.42AB-0.78BC-0.64A^2-0.87B^2-1.62C^2$$

回归模型 P<0.000 1,表示该模型极为显著;失拟项 P=0.058 8,大于 0.05,为不失拟,即此模型有效。以上说明此模型拟合度较好,可以用此模型对碱法提取粗多糖进行优化。同时,2 种模型 A、B、C、BC、A^2、B^2、C^2 的 P 值均小于 0.05,说明 NaOH 质量浓度、处理温度、处理时间的单因素变化和处理温度与处理时间之间的交互作用对除杂率有很大的影响。模型中 $F(B)>F(C)>F(A)$,说明影响除杂率的因素由大到小为:处理温度>处理时间>NaOH 质量浓度。

2.2.2 *各因素交互作用分析及优化模型* 各因素交互作用响应面图及等高线图见图 4。

NaOH 质量浓度和处理温度、NaOH 质量浓度和处理时间之间的交互作用不显著(P>0.05)。无论温度的高低或者时间的长短,随着 NaOH 质量浓度的增加,除杂率的变化并不明显。而温度和时间的

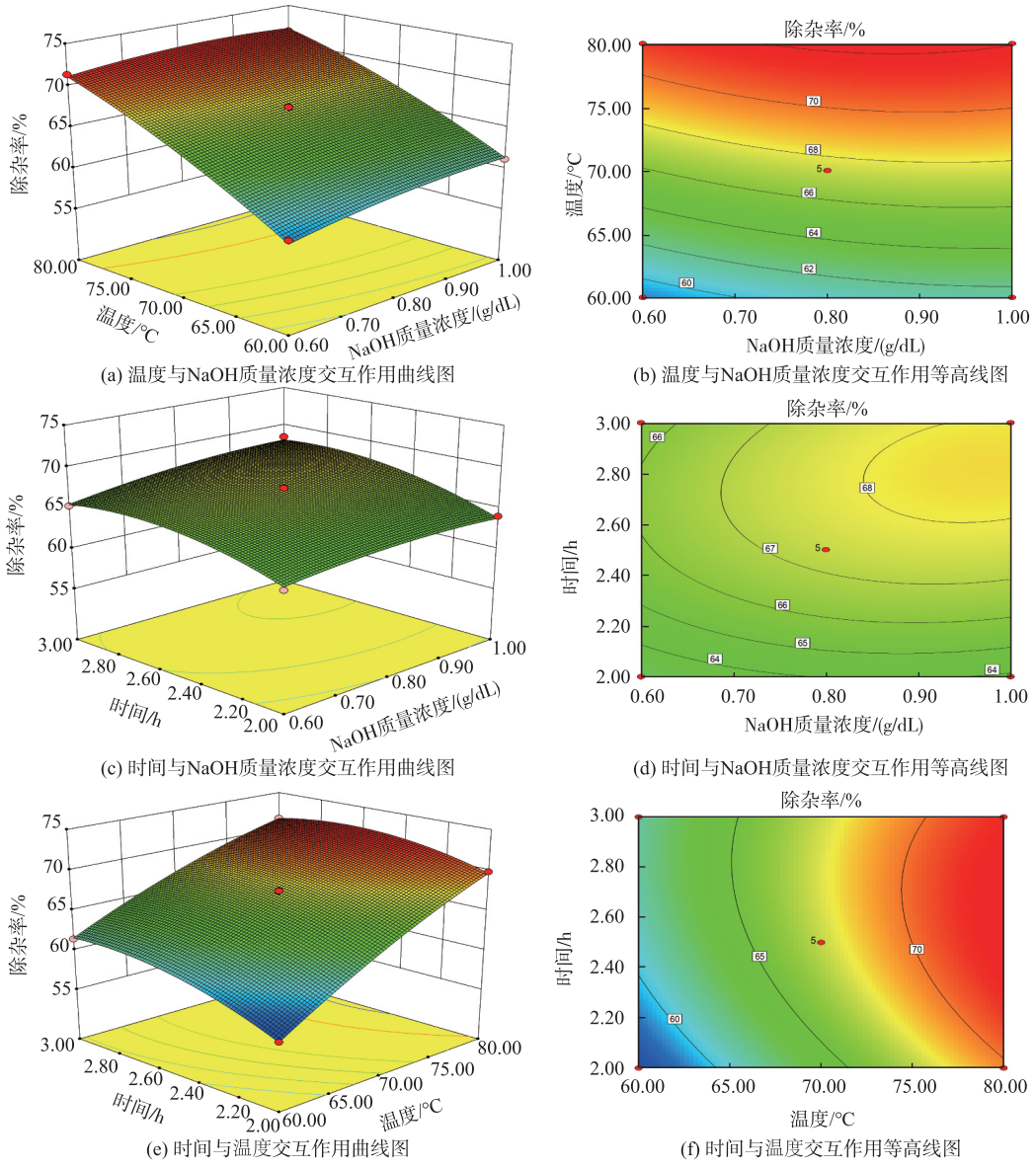


图 4　各因素交互项对碱法除杂的响应面和等高线图

Fig. 4　Response surface and contour plots of the interaction effects of various factors on the alkaline method for impurity removal

交互作用较显著(P<0.05)。在相对低温时,随着处理时间的增加,除杂率明显增加;但是当温度较高时,时间对多糖得率的影响较小,这也与方差分析结果一致。

对优化模型的最优条件进行预测,当 NaOH 质量浓度为 0.71 g/dL、处理温度为 79.82 ℃、处理时间为 2.63 h 时,除杂率达到最大,为 71.9%。此外,绿色的生产工艺应避免使用大量的酸和碱。因此,研究响应面优化条件,在获得最大除杂效果的同时应尽可能降低碱的质量浓度,减少碱的用量。

2.2.3　模型验证　通过模型拟合结果并结合实际情况,确定优化后的碱法除杂条件为:0.7 g/dL 的 NaOH,80 ℃处理 2.6 h。在此条件下进行 3 次重复试验,得到除杂率分别为 71.82%、71.80%、71.91%,平均值 71.84%。粗 β-葡聚糖得率为 28.16%,与理论值接近,证明该模型有效。

2.3　DMSO 分离纯化 β-葡聚糖的单因素试验

2.3.1　料液比对分离纯化(溶解能力)的影响　所有溶剂的溶解度都是有限的,DMSO 也不例外。DMSO 溶解 β-葡聚糖的分离效率见图 5。

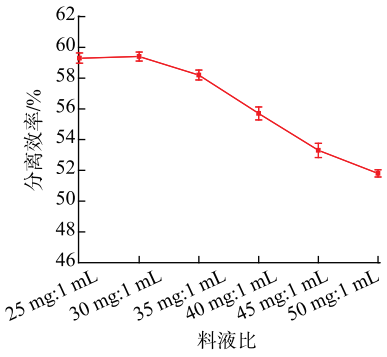


图 5　料液比对分离效率的影响

Fig. 5　Effect of solid-to-liquid ratio on separation efficiency

β-葡聚糖的分离效率在料液比为 25 mg:1 mL~30 mg:1 mL 时变化不显著(P>0.05)；当料液比为 30 mg:1 mL 时，分离效率达到最大，为 59.4%；随后逐渐降低。直接观测法发现，当料液比超过 30 mg:1 mL 时，溶液中 β-葡聚糖变为果冻状或黏稠状，与杂质沉淀混合充分而无法进行分离，说明此体积分数下的 DMSO 不足以使 β-葡聚糖完全溶解[21]。因此，选择 30 mg:1 mL 的料液比为最佳的分离条件。

2.3.2　DMSO 体积分数对分离纯化结果的影响　随着 DMSO 体积分数的增加，粗酵母 β-葡聚糖中杂质沉淀的分离效率逐渐提高，见图 6。

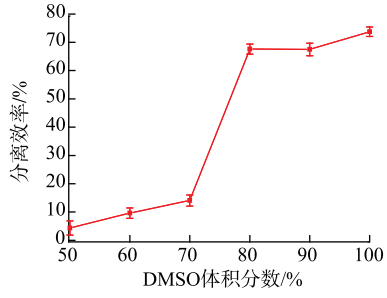


图 6　DMSO 体积分数对分离效率的影响

Fig. 6　Effect of volume fraction of DMSO on separation efficiency

当 DMSO 体积分数为 50%~70%时，分离效率并没有明显变化；而当 DMSO 体积分数为 70%~80%时，分离效率发生突变，达到 67.5%；当 DMSO 体积分数在 80%~90%时，分离效率并没有显著变化(P>0.05)；而当 DMSO 体积分数为 100%时，分离效率进一步提高，达到 73.3%。因此，体积分数 80%为最佳的分离条件。DMSO 是一种有机试剂，避免使用有机试剂是环境友好型工艺的基本要求之一，但目前看来，还没有找到一种更有效、更绿色，并具有制备出高产量和高纯度 β-葡聚糖能力的试剂来代替。有报道[22-23]表明，过高体积分数的 DMSO 可能会引起 β-葡聚糖的三维空间结构发生变化，导致其生物活性降低。

2.3.3　提取时间对分离纯化结果的影响　提取时间对 β-葡聚糖的分离也有很大影响，见图 7。

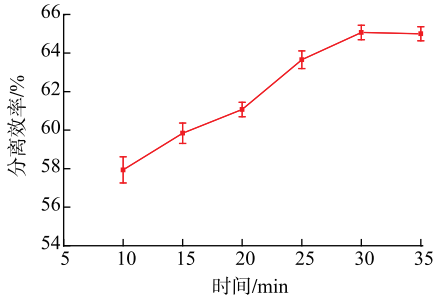


图 7　提取时间对分离效率的影响

Fig. 7　Effect of time on separation efficiency

随着提取时间的增加，分离效率逐渐提高。在 30 min 时达到最大分离效率，为 65.07%。因此，选择 30 min 为最佳提取时间。

2.3.4　处理温度对分离纯化结果的影响　处理温度对反应效能的影响见图 8。随着温度的升高，分离效率逐渐提高。当温度在 60~80 ℃时，DMSO 的溶解速率达到最大，且变化明显。当达到 100 ℃时，分离效率达到 67.78%。考虑到能源问题和工业化生产，选择 80 ℃为最佳分离温度。

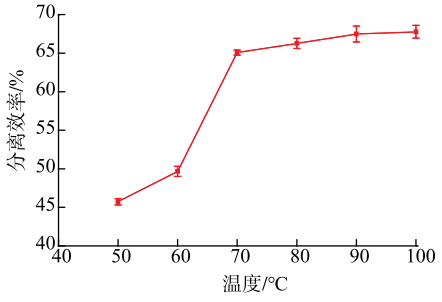


图 8　处理温度对分离效率的影响

Fig. 8　Effect of temperature on separation efficiency

2.3.5　最佳实验条件下的测定结果　精确称量 500 mg 粗 β-葡聚糖，根据单因素试验结果，设定分离条件为：DMSO 体积分数 80%，料液比 30 mg:1 mL，在 80 ℃溶解 30 min。溶液在 8 000 r/min 离心 20 min，对上清液和下层沉淀进行冻干，测定分离效率为(63.80±2.34)%。

2.4 理化性质分析

2.4.1 物理特性分析 经本方法制备的酵母β-葡聚糖外观见图9。经二甲基亚砜分离纯化后的酵母β-葡聚糖的外观呈洁白丝状,无臭无味。此外,对产品进行溶解度分析,结果为不溶于水、酸、碱、无水乙醇、丙酮等常用溶剂,这也与文献[7]报道的一致。刚果红法测定产品纯度为95.84%。

2.4.2 元素组成分析 使用半常量元素分析仪对所制备的β-葡聚糖的元素组成进行分析,结果见表1。本方法所制备的酵母β-葡聚糖中氮元素平均占比为1.14%,其中氮元素的来源主要是蛋白质,按照氨基酸平均相对分子质量估算,样品中蛋白质质量分数为8.96%,标准品中蛋白质质量分数为4.16%,样品中仍有一定比例的蛋白质尚未除尽。此外,由于不溶性酵母β-葡聚糖中蛋白质检测比较烦琐,因此本方法也为其蛋白质的检测提供了新的思路。



(a)经碱法处理的粗β-葡聚糖 (b)经DMSO分离纯化后β-葡聚糖 (c)分离的杂质

图9 酵母β-葡聚糖外观

Fig. 9 Appearance of yeast β-glucan

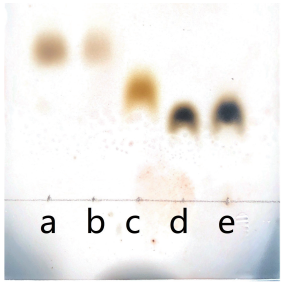
表1 酵母β-葡聚糖所含的主要元素

Table 1 Main elements in yeast β-glucan

样品	质量/mg	N面积	C面积	S面积	N比例/%	C比例/%	S比例/%
标准品	20.00	1 321	105 050	0	0.53	53.32	0
样品1	20.00	2 942	86 519	0	1.18	52.15	0
样品2	20.00	2 704	81 564	0	1.07	49.17	0
样品3	20.00	2 966	83 469	0	1.17	50.10	0
样品平均值	20.00	2 871	83 851	0	1.14	50.47	0

2.5 单糖组成分析

使用薄层色谱测定酵母β-葡聚糖产品的单糖组成,结果见图10。可知本产品的单糖组成为葡萄糖,进一步判定该产品为由葡萄糖单糖聚合而成的葡聚糖。



a. 核糖;b. 木糖;c. 甘露糖;d. 葡萄糖;e. 样品。

图10 薄层色谱图

Fig. 10 Thin layer chromatogram

2.6 傅里叶红外光谱分析

对提取样品进行傅里叶红外光谱扫描,结果见图11。在3 392.96 cm^{-1}处具有较宽较大的吸收峰,为O—H的伸缩振动吸收峰;在2 920.68 cm^{-1}处的吸收峰是亚甲基C—H的伸缩振动峰;而1 638.99 cm^{-1}和1 078.70~1 042.00 cm^{-1}处分别是C=O的弯曲振动吸收峰和伸缩振动吸收峰;在1 259.76 cm^{-1}是—OH的弯曲和伸缩振动的共同作用吸收峰;在1 419.35 cm^{-1}处是—CH_2的弯曲振动吸收峰;在891.72 cm^{-1}处的吸收峰表明糖苷键构型为β构型。由此可基本判定该化合物为β构型的糖苷类化合物。

2.7 抗炎活性分析

对β-葡聚糖的抗炎效果进行测定,使用LPS诱导RAW264.7细胞作为阳性对照组,试验组使用相同质量浓度的LPS和不同质量浓度的β-葡聚糖

(50、75、100 μg/mL)共同作用相同时间,结果见图12。与LPS组相比,加入β-葡聚糖后,随着β-葡聚糖质量浓度的升高,LPS刺激后的RAW264.7细胞中炎症因子IL-1β、IL-6的mRNA表达水平逐渐被逆转,结果具有显著差异性($P<0.05$),表明β-葡聚糖对LPS诱导的炎症有一定的抑制作用。此外,过高体积分数的DMSO是否会导致酵母β-葡聚糖的结构遭到破坏,而导致活性丧失。从抗炎试验来看:高体积分数的DMSO并没有对酵母β-葡聚糖的结构造成破坏或者破坏极小,这与其他文献报道的结果存在一定的差异,所以还需进一步探讨[24]。

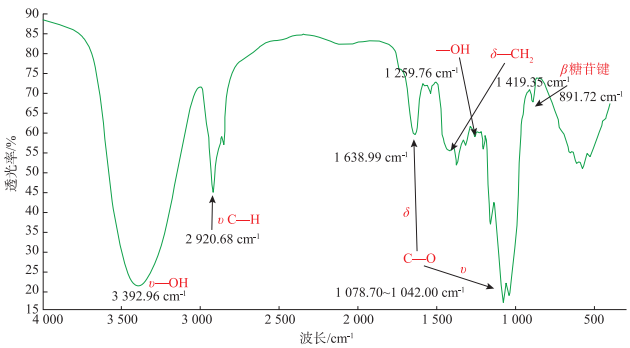


图11 傅里叶红外光谱扫描图

Fig. 11 FT-IR spectrum

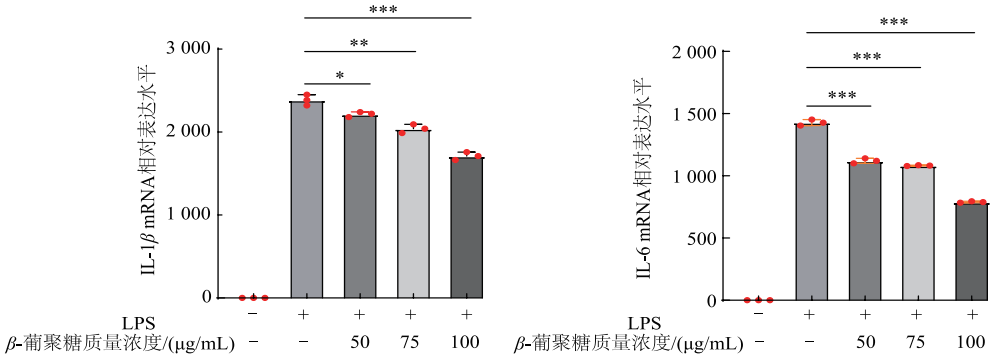


图12 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测β-葡聚糖的抗炎效果

Fig. 12 Real-time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR) in detection of anti-inflammation effect of β-glucan

3 结 语

作者对酵母β-葡聚糖的制备工艺进行了优化,改变了使用传统的酸、碱、酶等多种手段结合的复杂而又烦琐的制备过程。优化结果显示:碱法除杂的最适条件为:0.7 g/dL NaOH,80 ℃保持2.6 h。DMSO辅助分离杂质的最佳条件为:料液比30 mg∶1 mL,DMSO体积分数80%,80 ℃保持30 min。在此条件下得到的β-葡聚糖产品纯度可以达到95.84%。抗炎试验表明,所得β-葡聚糖具有一定的抗炎效果,说明本方法制备的酵母β-葡聚糖具有一定的生物活性。

通过对酵母β-葡聚糖的生产制备工艺进行研究,找到了一种方法简单、过程高效、产品质量较好的工艺流程,以期为工业化生产提供参考。

参考文献:

[1] 赵梓含,张爱忠,徐凡婷,等. 酵母细胞壁多糖的结构及生物功能[J]. 黑龙江畜牧兽医,2023(4):25-29.
ZHAO Z H,ZHANG A Z,XU F T,et al. Structure and biological function of yeast cell wall polysaccharide[J]. **Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine**,2023(4):25-29. (in Chinese)

[2] ZHEN W R,SHAO Y J,WU Y Y,et al. Dietary yeast β-glucan supplementation improves eggshell color and fertile eggs hatchability as well as enhances immune functions in breeder laying hens[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2020,159:607-621.

[3] SISWANTO F M,TAMURA A,SAKUMA R,et al. Yeast β-glucan increases etoposide sensitivity in lung cancer cell line A549 by suppressing nuclear factor erythroid 2-related factor 2 via the noncanonical nuclear factor kappa B pathway[J]. **Molecular Pharmacology**,2022,101(4):257-273.

[4] HE L J,GUO J X,WANG Y B,et al. Effects of dietary yeast β-glucan supplementation on meat quality,antioxidant capacity and

gut microbiota of finishing pigs[J]. **Antioxidants**, 2022, 11(7): 1340.
[5] MO X X, SUN Y H, LIANG X L, et al. Insoluble yeast β-glucan attenuates high-fat diet-induced obesity by regulating gut microbiota and its metabolites[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2022, 281: 119046.
[6] VLATKA P T, VESNA Z K, SLOBODAN G, et al. , Biological Effects of Yeast β-Glucans [J]. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 2010, 75(4): 149-158.
[7] BORCHANI C, FONTEYN F, JAMIN G, et al. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Food Chemistry**, 2016, 194: 1149-1155.
[8] LIU Y N, WU Q, WU X Y, et al. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β-glucan and mannan from yeast cell wall: a review[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 173: 445-456.
[9] OHNO N, UCHIYAMA M, TSUZUKI A, et al. Solubilization of yeast cell-wall β-(1→3)-*D*-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction[J]. **Carbohydrate Research**, 1999, 316(1-4): 161-172.
[10] PROZIL S O, COSTA E V, EVTUGUIN D V, et al. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L[J]. **Carbohydrate Research**, 2012, 356: 252-259.
[11] 张彭湃，毕赟文，钟祥，等. 啤酒酵母来源甘露聚糖的环境友好型提取工艺研究[J]. 化学研究，2019，30(1)：72-75.
ZHANG P P, BI Y W, ZHONG X, et al. Environment-friendly preparation of mannan from waste beer yeast [J]. **Chemical Research**, 2019, 30(1): 72-75. (in Chinese)
[12] Effect of preparation methods on physiochemical and functional properties of yeast β-glucan [J]. **LWT–Food Science and Technology**, 2022, 160(8):113284.
[13] 姚鉴芯，张哲皓，张帅，等. 火麻油水解提取多酚工艺优化及多酚对线虫行为能力的影响[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(6)：60-66.
YAO J X, ZHANG Z H, ZHANG S, et al. Process optimization of polyphenols extracted from hemp seed oil by hydrolysis and influence of *C. elegans* behavior[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(6): 60-66. (in Chinese)
[14] 曹桦强，刘琛仪，李赛芬，等. 刚果红法定量检测酵母β- 葡聚糖的方法研究[J]. 食品与发酵工业，2022，48(9)：261-266.
CAO H Q, LIU C Y, LI S F, et al. Study on quantitative determination of yeast β-glucan by Congo red[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2022, 48(9): 261-266. (in Chinese)
[15] 陈橙，丛媛媛，热米拉·米吉提. 薄层色谱法和气相色谱法分析 2 种侧耳多糖的单糖组成[J]. 食品安全质量检测学报，2017，8(1)：256-260.
CHEN C, CONG Y Y, REMILA M. Analysis of monosaccharide compositions of 2 kinds of *Pleurotus polysaccharides* by thin layer chromatography and gas chromatography[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2017, 8(1): 256-260. (in Chinese)
[16] 王昭晶，曹森. 石耳与黑石耳多糖的抗炎作用研究[J]. 中国药学杂志，2022，57(1)：24-29.
WANG Z J, CAO S. Polysaccharides with anti-inflammatory properties from *Umbilicaria esculenta* and *Dermatocarpon miniatum* [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2022, 57(1): 24-29. (in Chinese)
[17] NIELSEN S S. Food Analysis Laboratory Manual[M]. Boston: Springer, 2010: 47-53.
[18] WALKER J. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation[J]. **Methods in Molecular Biology**, 1994, 32:5-8.
[19] SHOKRI H, ASADI F, KHOSRAVI A R. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Natural Product Research**, 2008, 22(5): 414-421.
[20] 吴豪益，王彦波，傅玲琳，等. 酵母β- 葡聚糖提取方法及免疫活性研究[J]. 食品研究与开发，2022，43(18)：213-218.
WU H Y, WANG Y B, FU L L, et al. Current research on the yeast-β-glucan extraction methods and its immune activity[J]. **Food Research and Development**, 2022, 43(18): 213-218. (in Chinese)
[21] BALAKIN K V, SAVCHUK N P, TETKO I V. In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions[J]. **Current Medicinal Chemistry**, 2006, 13(2): 223-241.
[22] LIU Q Y, XU X J, ZHANG L N. Variable chain conformations of renatured β-glucan in dimethylsulfoxide/water mixture [J]. **Biopolymers**, 2012, 97(12): 988-997.
[23] XU S Q, XU X J, XU M, et al. Heat-induced conformation transition of the comb-branched β-glucan in dimethyl sulfoxide/water mixture[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 157: 1404-1412.
[24] SLETMOEN M, STOKKE B T. Higher order structure of (1,3)-beta-*D*-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities[J]. **Biopolymers**, 2008, 89(4): 310-321.

（责任编辑：李春丽）