



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102051400 B

(45) 授权公告日 2013.05.15

(21) 申请号 200910212346.7

(22) 申请日 2009.11.06

(73) 专利权人 安琪酵母股份有限公司

地址 443003 湖北省宜昌市城东大道 168 号

(72) 发明人 俞学锋 李知洪 余明华 姚鹃

张彦 张海波

(74) 专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事

务所 11276

代理人 刘云贵

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

C12G 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101087872 A, 2007.12.12, 说明书 2-13 页.

WO 2008/128973 A2, 2008.10.30, 全文.

张玉香等. 甘露糖蛋白的提纯及分子量测

定. 《酿酒科技》. 2005, (第 4 期), 72-74.

Pascale Chalier et al. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *saccharomyces cerevisiae* strains. 《Food Chemistry》. 2007, 第 100 卷 22-30.

审查员 李影

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种酵母甘露糖蛋白产品的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种酵母甘露糖蛋白产品的制备方法,其步骤包括:将酵母细胞壁调节到 pH = 7.0-10.0, 温度 80-135℃ 进行处理;将酵母细胞壁调节温度为 30-70℃, 加入碱性蛋白酶, 进行处理, 离心分离收集上清液;将上清液低温 0-20℃ 保温 1-20 小时, 离心去除沉淀;将所得上清液采用剪切分子量为 200-400KD 膜进行分离, 收集透过液, 喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。本发明的提取甘露糖蛋白的技术方案与现有技术的教导相反, 即在酸性条件下进行上清液低温沉淀, 而且本发明的膜分离目的是让甘露糖蛋白通过, 通过截留去除大分子的蛋白和多糖更有利于酵母甘露糖蛋白发挥稳定葡萄酒中酒石和蛋白的作用。

1. 一种酵母甘露糖蛋白产品的制备方法,其步骤包括:

- 1) 将酵母细胞壁调节到 $\text{pH} = 7.0-10.0$, 温度 $80-135^{\circ}\text{C}$ 进行处理;
- 2) 将步骤 1) 处理后的酵母细胞壁调节温度为 $30-70^{\circ}\text{C}$, 加入碱性蛋白酶, 进行处理, 离心分离收集上清液;
- 3) 将步骤 2) 所得上清液低温 $0-20^{\circ}\text{C}$ 保温 1-20 小时, 离心去除沉淀;
- 4) 将步骤 3) 所得上清液采用剪切分子量为 $200-400\text{KD}$ 膜进行膜分离, 收集透过液, 喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

2. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 1) 中将酵母细胞壁调节到质量百分浓度为 $5\% -15\%$ 。

3. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 1) 中对酵母细胞壁处理 $0.5-5$ 小时。

4. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 2) 中碱性蛋白酶的质量百分含量为 $0.01-0.5\%$ 。

5. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 2) 中所述蛋白酶处理时间为 $2-15$ 小时。

6. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 2) 中还包括将所述用碱性蛋白酶处理过的酵母细胞壁升温至 90°C 灭酶的步骤。

7. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 2) 中所述离心分离在离心力大于 5000g 的条件下进行。

8. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 3) 中在低温沉淀前还包括将所述上清液真空浓缩至 $10-40\%$ 的步骤。

9. 一种如权利要求 8 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 3) 中在真空浓缩前还包括将所述上清液调节至 $\text{pH} = 3.0-6.0$ 的步骤。

10. 一种如权利要求 1 所述的酵母甘露糖蛋白产品的制备方法, 其特征在于所述步骤 4) 所得上清液采用剪切分子量为 400KD 的膜进行膜分离。

一种酵母甘露糖蛋白产品的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种酵母甘露糖蛋白产品的制备方法。

背景技术

[0002] 甘露糖蛋白是由甘露糖聚合物共价连接在蛋白质骨架上构成的,位于酵母细胞壁最外层,是组成酵母细胞壁的主要成分之一。酵母甘露糖蛋白分子量为 20-200KD,是由 5% -20%的肽与 80% -95%的甘露糖组成。甘露聚糖的主链是 α -1,2-甘露聚糖,以 O-糖苷键或 N-糖苷键连接到蛋白质或肽的丝氨酸、苏氨酸或天门冬氨酸上。

[0003] 科学研究表明,甘露糖蛋白有利于葡萄酒的蛋白和酒石稳定,能够减弱葡萄酒中单宁的收敛性和尖刻感,提高酒的饱满肥硕感。在法国勃艮第地区生产的霞多丽(Chardonnay)干白葡萄酒,通常是在橡木桶中发酵,然后在酒泥上陈酿数月,并且在陈酿过程中每周搅拌 1-2 次。研究表明,如果在第二年 3 月就将酒与酒泥分离,则发包方葡萄酒酒石不稳定,但如果到第二年 7 月再将酒与酒泥分离,则酒的酒石稳定性非常好。直到近年才从理论上将这一现象加以研究证实,用上述方法酿造的葡萄酒,通常含有丰富的细胞壁多糖,其中主要是甘露糖蛋白。甘露糖蛋白应用到葡萄酒中主要有以下作用:

[0004] 1) 防止酒石酸钾沉淀。

[0005] 2) 与香气的协作作用。

[0006] 3) 促进苹果酸-乳酸发酵。

[0007] 4) 与多酚物质的协作作用,提高葡萄酒圆润、柔顺感,削弱单宁的收敛感。

[0008] 5) 防止蛋白质浑浊。

[0009] 目前,酵母甘露糖蛋白的制备方法主要有两种:热提取和酶提取。

[0010] 热解:用高温处理 pH 为 7 的酵母缓冲溶液得到产品的方法,目前比较常见。Herlin 在 1977 年用活性干酵母按下述方法制备:蒸馏水洗,用 pH 为 7 的缓冲液配成悬浮液,125°C 条件下,锅内蒸煮 90min(此过程操作两次),离心,用 3 倍体积的酒精将离心液沉淀,干燥,得到甘露糖蛋白。

[0011] 酶解:酶解多采用 β -1,3 葡聚糖酶去降解酵母细胞壁,得到酵母甘露糖蛋白产品。Johanna Van Rinsum 等 (Van RINSUM J, KLIS Fs M, Van Den ENDEH. Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1991(7):717-726) 使用昆布多糖酶分离酵母细胞壁中的甘露聚糖,用亲和色谱和阴离子交换色谱进行纯化,得到甘露聚糖中 N-乙酰基葡糖胺、甘露糖、葡萄糖的摩尔比为 1:53:4。张玉香(张玉香,尹卓容. 甘露糖蛋白的提纯及分子量测定 [J]. *酿酒科技*, 2005(4):72-74) 用酶法从啤酒废酵母中提取的甘露糖蛋白,工艺流程为:啤酒废酵母→预处理→均质破壁→自溶→离心分离→沉淀(细胞壁)→酶解→离心→上清浓缩→喷雾干燥→粉状产品。产物中多糖含量为 60.57%,蛋白含量 28.1%。

[0012] 国外,US6139891 披露了一种制备酵母甘露糖蛋白的方法,包括使用葡聚糖酶处理细胞壁后膜分离得到酵母甘露糖蛋白。并验证了其产品在葡萄酒中对酒石稳定的作用。

WO2006/121803A1 披露了一种制备酵母甘露糖蛋白的方法,包括酵母自溶、蛋白酶处理细胞壁和膜分离得到酵母甘露糖蛋白,并同时制备得到酵母葡聚糖。

[0013] EP 1094117A1 公开了制备一种甘露糖蛋白制品的方法,其包括将酵母细胞壁在 pH 6-7、98-100℃ 下热解细胞壁 15-30 小时、离心分离收集上清液,上清液 4℃ 下沉淀至少 24 小时以除去胶体副产物,离心分离收集上清液,真空浓缩,喷雾干燥获得上述制品。

[0014] 国内, CN 1940084A 披露了一种制备酵母甘露糖蛋白的方法,包括酒泥酵母收集、酶解、热处理、酒精沉淀得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0015] 热处理提取酵母甘露糖蛋白会同时提取出大量的蛋白质,使后续处理困难,提取得率下降(胡朝晖等,酿酒酵母甘露糖蛋白的研究进展[J]. 酿酒,34(4):64-66)。酶处理得到的酵母甘露糖蛋白中同样会含有一定量的蛋白质,而且单纯的酶处理由于细胞壁的结构不够疏松也同样导致得率较低。此外,酵母甘露糖蛋白的分子量对于其在葡萄酒中发挥作用具有重要意义,因此不经过膜分离的酵母甘露糖蛋白不仅会影响其效果,而且其中的大量蛋白还会给葡萄酒带来不好的影响。

发明内容

[0016] 本发明的原料为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或其它种属酵母细胞壁,此原料可以从市场购买或通过对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或其它种属酵母自溶分离得到。

[0017] 1) 高温、高 pH 处理酵母细胞壁:将酵母细胞壁用稀盐酸、硫酸、磷酸等无机酸调节到 pH = 7.0-10.0,加热温度至 80-135℃ 进行处理;

[0018] 2) 蛋白酶处理:将步骤 1) 处理后的酵母细胞壁调节温度为 30-70℃,加入碱性蛋白酶,进行处理,离心分离收集上清液;

[0019] 3) 低温沉淀:将步骤 2) 所得上清液在储存罐中采用冰水降温到低温 0-20℃,并保温 1-20 小时,离心去除沉淀;

[0020] 4) 膜分离:将步骤 3) 所得上清液采用剪切分子量为 200-400KD 膜进行膜分离,优选 400KD,膜分离可采用包括有机膜、无机膜在内的各种管式、卷式膜分离装置,然后收集透过液,喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0021] 优选地,所述步骤 1) 中可将酵母细胞壁加去离子水调节到质量百分浓度为 5% -15%。

[0022] 优选地,所述步骤 1) 中对酵母细胞壁处理时间可为 0.5-5 小时。

[0023] 优选地,所述步骤 2) 中的碱性蛋白酶质量百分浓度可为 0.01-0.5%。

[0024] 优选地,所述步骤 2) 中还可以包括将所述用碱性蛋白酶处理过的酵母细胞壁升温至 90℃ 灭酶的步骤。

[0025] 优选地,所述步骤 2) 中的蛋白酶处理时间可以为 2-15 小时。

[0026] 优选地,所述步骤 2) 中离心分离可在离心力大于 5000g 的条件下进行。

[0027] 优选地,所述步骤 3) 中在低温沉淀前,还可包括将所述上清液用多效浓缩设备真空浓缩至质量百分浓度 10-40% 的步骤。

[0028] 优选地,所述步骤 3) 中在真空浓缩前,还可以包括用稀盐酸、稀硫酸、稀磷酸等无机酸调节所述上清液至 PH = 3.0-6.0 的步骤。

[0029] 本发明的提取甘露糖蛋白的技术方案恰恰与现有技术的教导相反,即在酸性条件下进行上清液低温沉淀,而且本发明的膜分离目的是让甘露糖蛋白通过,这与现有技术中通过膜分离截留甘露糖蛋白技术相反。膜分离的透过液澄清度明显的高于截留液。在截留液中还含有大量的高分子量的蛋白质和其他的多糖,这对于产品应用于葡萄酒稳定的效果带来不利的影响。通过截留去除这些大分子的蛋白和多糖更有利于酵母甘露糖蛋白发挥稳定葡萄酒中酒石和蛋白的作用。同时,本方法的热解所需时间较现有技术短,也简化了实验步骤,降低了实验成本。另外,参数的选取及优选方案也经历了多次试验获得。

具体实施方式

[0030] 实施例 1

[0031] 将市场购买的酿酒酵母细胞壁(富邦牌酵母细胞壁,安琪酵母股份有限公司)用稀盐酸调节到 $\text{pH} = 7.0$,加热温度至 100°C 放置 5 小时;

[0032] 调节酵母细胞壁温度至 50°C ,加入质量百分浓度为 0.01% 的碱性蛋白酶处理 15 小时,离心分离收集上清液;

[0033] 将上清液在储存罐中用冰水降温至 0°C 保温 10 小时,离心去除沉淀;

[0034] 将离心后的上清液采用剪切分子量为 200KD 的中空纤维膜进行膜分离,收集透过液,喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0035] 该产品为样品 1。

[0036] 实施例 2

[0037] 将酿酒酵母自溶分离得到的酵母细胞壁,加去离子水调节至浓度为 5%,用稀硫酸调节 $\text{pH} = 10.0$,加热温度至 80°C 放置 5 小时;

[0038] 调节酵母细胞壁温度至 30°C ,加入质量百分浓度为 0.5% 的碱性蛋白酶处理 8 小时,升温到 90°C 灭酶后,离心分离收集上清液;

[0039] 将上清液用稀硫酸调节 $\text{pH} = 3.0$,用多效浓缩设备真空浓缩至 30%,在储存罐中采用冰水降温至 20°C 保温 1 小时,离心去除沉淀;

[0040] 将离心后的上清液采用剪切分子量为 200KD 的陶瓷膜进行膜分离,收集透过液,喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0041] 该产品为样品 2。

[0042] 实施例 3

[0043] 将酿酒酵母自溶分离得到的酵母细胞壁,加去离子水调节至浓度为 15%,用稀磷酸调节 $\text{pH} = 8.0$,加热温度至 135°C 放置 0.5 小时;

[0044] 调节酵母细胞壁温度至 50°C ,加入质量百分浓度为 0.2% 的碱性蛋白酶处理 2 小时,升温到 90°C 灭酶后,在离心力等于 5000 克的条件下进行离心分离,收集上清液;

[0045] 用稀磷酸将上清液调节 $\text{pH} = 6.0$,利用多效浓缩设备真空浓缩至 10%,在储存罐中采用冰水降温至 10°C 保温 20 小时,离心去除沉淀;

[0046] 将离心后的上清液采用剪切分子量为 300KD 的陶瓷膜进行膜分离,收集透过液,喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0047] 该产品为样品 3。

[0048] 实施例 4

[0049] 将酿酒酵母自溶分离得到的酵母细胞壁,加去离子水调节至浓度为 10%,用稀盐酸调节 $\text{pH} = 8.0$,加热至温度 110°C 放置 3 小时;

[0050] 调节酵母细胞壁温度至 50°C ,加入质量百分浓度为 0.2% 的碱性蛋白酶处理 10 小时,升温到 90°C 灭酶后,在离心力 $7000g$ 的条件下进行离心分离,收集上清液;

[0051] 用稀盐酸将上清液调节 $\text{pH} = 5.0$,利用多效浓缩设备真空浓缩至 40%,在储存罐中采用冰水降温至 10°C 保温 10 小时,离心去除沉淀;

[0052] 将离心后的上清液采用剪切分子量为 400KD 的中空纤维膜进行膜分离,收集透过液,喷雾干燥得到酵母甘露糖蛋白产品。

[0053] 该产品为样品 4。

[0054] 所得样品各成分质量百分含量以及分子量等数值列表如下:

[0055]

	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
甘露聚糖含量	42%	53%	41%	48%
蛋白含量	19%	14%	21%	16%
分子量	167893	174873	226775	298441