

酵母细胞自溶动力学研究

宁正祥

(华南理工大学食品工程系 广州 510641)

摘要 对啤酒酵母细胞自溶的动力学进行了研究,结果表明,在 55℃、pH5.5 条件下,酵母自溶诱导期约为 1.85 小时,细胞内贮糖原降解最快, $t_{0.5}$ 值仅为 1.48 小时,蛋白质次之,核酸降解速率最慢, $t_{0.5}$ 值为 12.38 小时。酵母细胞生物大分子的降解动力学存在显著的正协同效应。对不同生理状态酵母自溶液的氨基酸分析表明,生理状态对自溶液的氨基酸组份影响极显著($p < 0.01$)。随着培养时间的延长,相应自溶液中的必需氨基酸、鲜味及苦味氨基酸的比例均显著增加,因而自溶液的鲜味增浓,营养效价提高,但苦味也上升。

关键词 啤酒酵母,细胞自溶,氨基酸分析

酵母细胞自溶是酵母细胞水解酶类在一定条件下被活化而将自身生物大分子降解成基本生物分子的过程。酵母自溶属内自溶型^[1],自溶主要是原生质的降解外溢,细胞壁通常只被部分水解。自溶结束后,细胞仍保持着完整的轮廓^[2]。利用酵母的自溶作用可获取丰富的单细胞蛋白、氨基酸、核苷酸以及制备酵母精等^[3]。因此,研究酵母细胞生物大分子的降解规律具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 啤酒酵母与自溶条件

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)接种于 11°Brix 麦芽汁培养基中,在恒温水浴摇床上 30℃振荡培养 16 小时,4000r/min 离心 15 分钟,蒸馏水洗涤三次,将 25g 菌体悬浮于 0.25mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.5)中,定容至 100ml,置 55℃水浴摇床上恒温自溶。

1.2 自溶产物定量分析

1.2.1 细胞自溶外溢物质干重测定:定时取自溶液于 4000r/min 条件下离心 20 分钟,分别收集上清液和沉淀,于 85℃真空干燥至恒重,计算细胞外溢物干重占自溶前细胞总重的百分比。

1.2.2 还原糖含量测定:采用碘量法^[4]。

1.2.3 核苷酸含量测定:采用地衣酚法^[5]。

1.2.4 氨基酸含量分析:氨基酸总量测定采用甲醛滴定法^[4],组成分析采用氨基酸自动分析仪。

• 广东省自然科学基金资助课题。

本文于 1992 年 11 月 6 日收到。

1.2.5 蛋白质含量测定:采用双缩脲法^[4]。

1.2.6 呼吸途径测定:用氧电极法^[6]测定抑制剂加入前和加入后的氧吸收速率,测定温度 30℃。所用抑制剂有:抑制糖酵解(EMP)途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶活性的碘乙酸(1mmol/L, pH6.5)^[7];抑制三羧酸循环(TCAC)中琥珀酸脱氢酶的丙二酸(0.05mol/L, pH4.5)^[7];抑制磷酸戊糖途径(HPS)的 Na_3PO_4 (1mmol/L, pH6.5)^[8]。

2 结果和分析

2.1 酵母菌体生物大分子降解动力学

将酵母悬浮液升温至 50—55℃时,酵母细胞死亡而各类水解酶系被活化,使菌体生物大分子降解为各种基本生物分子并溢出细胞。对不同自溶时间的自溶液的还原糖、核苷酸、蛋白质和氨基酸含量进行测定的结果(图 1)表明,生物大分子种类不同,其降解动力学方程类型亦不同(表 1)。现据回归方程和有关参数,对啤酒酵母自溶动力学特征归纳如下:

2.1.1 自溶动力学方程类型:对不同自溶时间外溢自溶产物的含量变化进行回归获得的酵母细胞自溶动力学方程基本可分为对数型、双曲线型和三角函数型三种。

自溶作用开始后,糖类降解极为迅速,自溶液中还原糖含量急剧增高,随之趋于平缓。降解动力学方程为对数二次曲线型。结合对自溶过程中酵母细胞形态变化的超声波处理和扫描电镜观察结果^[2],可认为自溶作用开始后的还原糖剧增主要是酵母细胞内贮糖原的降解所致,随后的缓慢增加则是胞壁部分降解的结果。

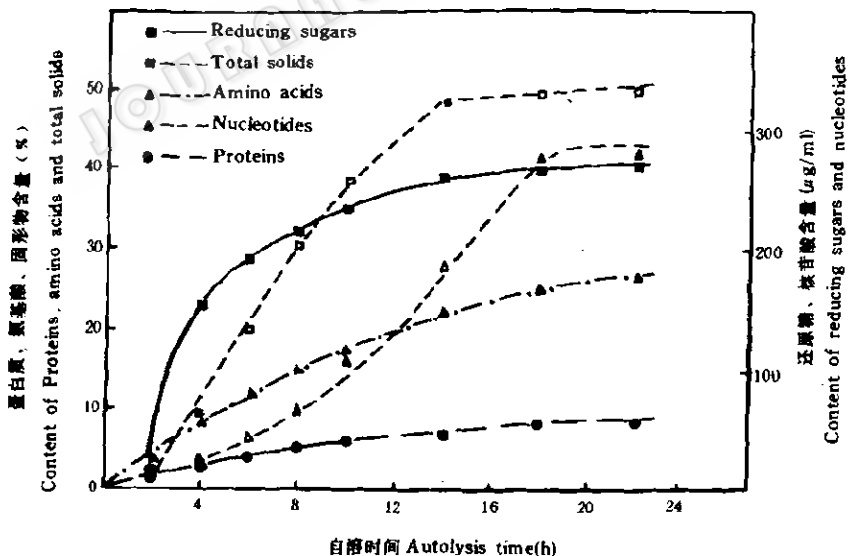


图 1 自溶过程中啤酒酵母细胞自溶物质的外溢

Fig. 1 Leakage of yeast components during autolysis

表 1 酵母自溶动力学方程及其参数*

Table 1 Dynamics functions and parameters of yeast autolysis

自溶外溢产物 Leakage components	动力学方程 Dynamics function	参 数 Parameters				
		γ	R_s	$t'_{0.5}$	t_0	$t_{0.5}$
外溢固形物(%) Total solids	$y = 62.1 \sin 5t - 9.97$ ($t \leq 14h$) $y^{-1} = 0.02458t^{-1} + 0.01885$ ($t > 14h$)	0.9993	4.47	6.79	1.85	4.94
还原糖($\mu g/ml$) Reducing sugars	$G = \sqrt{735971gt - 20390}$	0.9943	6.33	3.37	1.89	1.48
核苷酸($\mu g/ml$) Nucleotides	$R^{-1} = 0.016407(\sin 4.4t)^{-1} - 0.013048$	0.9976	3.79	12.38	0	12.38
氨基酸(%) Amino acids	$A^{-1} = 0.38154t^{-1} + 0.01896$	0.9987	15.60	7.75	0	7.75
蛋白质(%) Proteins	$P^{-1} = 1.2356t^{-1} + 0.04696$	0.9995	13.91	7.05	0	7.05

* t 值单位为小时(h),代表酵母自溶时间;
 R_s 值计算^[9], R_s =自溶率 90%时的 t 值/自溶率 10%时的 t 值。
 t (hour)stands for the time of yeast autolysis;
 R_s =time of 90% autolysis degree/time of 10% autolysis degree.

核苷酸、蛋白质和氨基酸的外溢动力学方程均为双曲线型。但核酸降解动力学方程的常数项为负值,后二者的变化趋势相一致,常数项均为正值。表明核酸在自溶前期的稳定性相对高于蛋白质,这可能是在生活细胞中,核酸主要存在于核蛋白中的缘故。由于核酸仅由几种核苷酸组成,其结构相对简单,核酸酶种类相对也少,专一性相对也低,因而核酸一旦开始降解,则降解速率迅速增加。而蛋白质由 20 多种氨基酸组成,不仅本身结构相当复杂,而且还与糖类、脂类、核酸等其他生物分子结合形成各种结合蛋白;其水解酶种类多,专一性强。通常情况下,需由多种蛋白酶类协同作用,才能将蛋白质彻底降解为氨基酸,因此降解速率变化平缓,蛋白质、氨基酸外溢量均依自溶时间的延长而缓慢上升,二者变化趋势基本一致,无彼此消长关系。这说明蛋白质自溶作用主要在酵母细胞内进行,蛋白酶类难溢出细胞而作用于外溢的肽类。这也说明在自溶的前期和中期,只有分子量较小的氨基酸和肽类等才有可能透过胞壁而进入自溶液中。从蛋白质和氨基酸的溢出动力学方程中的常数项为正值可以认为,结合蛋白的稳定性可能高于简单蛋白。在自溶的前期和中期,可能主要是酵母原生质中简单蛋白的水解,而结合蛋白的降解可能主要在中后期。

2.1.2 协同效应值 R_s :据 Koshland 协同效应判定式^[9]计算的 R_s 值可看出(表 1),各测定指标的 R_s 值均小于 81(无协同效应值),表明酵母自溶作用具有很强的正协同效应。生物大分子均由一些简单的基本生物分子重复组成,一旦开始降解,则底物浓度可因内切酶

的作用而呈几何级数增加,使降解速率加快,产生正协同效应;与此同时,由于各种水解酶类的化学本质都是蛋白质,在各类生物大分子降解的同时,蛋白酶类的作用又致使各种水解酶类的种类及其浓度减少,使降解速率减慢,最后停止。因此, R_s 值是内切酶作用使底物浓度增加、降解速率上升和随自溶时间的延长、水解酶类浓度减小使降解速率下降两种因素综合作用的结果。

2.1.3 自溶起始时间 t_0 : 酵母细胞自溶作用的起始时间不易准确测定,有效的方法是从自溶动力学方程计算各种生物大分子的 t_0 值。

蛋白质和核酸降解的动力学方程为双曲线型,因而 t_0 值趋近于零。在酵母细胞内,这两种生物大分子的代谢十分活跃。在高温诱导的自溶过程中,细胞正常代谢失控,降解与合成的比值随酵母细胞正常代谢失控程度的增加而上升,至酵母死亡时,比值达最大值。因而在自溶动力学上表现为渐变而无突跃过程。

还原糖和自溶外溢物质干重的 t_0 值分别为 1.89 和 1.85 小时,二者非常接近。与核酸和蛋白质代谢不同,酵母糖代谢主要是以分解代谢为主。糖被分解氧化,提供生活细胞所需的能量和合成其他生物分子的碳架或碳素基团。在有活性的正常酵母细胞中,糖类分解代谢以糖酵解(EMP)途径为主(表 2),经三羧酸循环(TCAC)氧化提供能量和氨基酸合成的碳架,而提供还原力和核酸合成所需碳架的磷酸戊糖途径(HPS)仅占总呼吸强度的 22.3%。由 EMP 和 TCAC 相对呼吸强度的差值可知,无氧呼吸的相对强度约为 10.3%。高温诱导自溶过程中,为合成代谢提供碳架、ATP 和 NADPH 的 TCAC 和 HPS 迅速消失,为多种有氧和无氧呼吸途径提供活化底物的糖酵解途径也随之停止。不难理解,呼吸代谢的终止即是死亡的降临,同时也是自溶作用的起始。可以认为,在本试验条件下,酵母自溶的 t_0 约为 1.8—1.9 小时。

表 2 不同自溶时间酵母细胞主要呼吸途径的相对强度*

Table 2 The relative intensity of mainly respiration pathways in yeast during autolysis(%)

呼吸途径 Respiration pathway	自溶时间(小时) Time of yeast autolysis(h)		
	0	1	2
磷酸戊糖途径(HPS) Hexosephosphate shunt	22.3	0	0
糖酵解途径(EMP) Embden-Meyerhof pathway	76.0	4.1	0
三羧酸循环途径(TCAC) Tricarboxylic acid cycle	65.7	0	0

* 表中各数据均以 0 时的总呼吸强度为 100% 计算。

Relative respiration intensity (%) = Respiration intensity of some respiration pathway / Total respiration intensity before autolysis.

2.1.4 自溶半衰期 $t_{0.5}$: 从动力学方程计算获得的 $t'_{0.5}$ 值为表观自溶半衰期,理论半衰期 $t_{0.5}$ 应为:

$$t_{0.5}=t'_{0.5}-t_0$$

$t_{0.5}$ 的大小反映了生物大分子自溶降解的速率。 $t_{0.5}$ 愈小,相应水解酶类的活性就愈高,降解速度也就愈快,完成相应自溶降解作用的时间也愈短。由表1可知,糖类降解速度最快,时间最短, $t_{0.5}$ 仅为1.48小时,蛋白质居中,而核酸自溶延时长, $t_{0.5}$ 长达12.38小时,说明核蛋白中核酸的释出有赖于蛋白酶的作用。因此,研究酵母自溶时,核酸的 $t_{0.5}$ 值可作为比较自溶速度的一个重要参数而用于各种自溶条件的优化研究。

表3 不同培养时间酵母自溶液的氨基酸组成*
Table 3 The yeast extract amino acid composition
of different growth stage

氨基酸 Amino acid	含 量 (n mol) Content			摩尔份数 (%) Mole fraction			风味特征 Taste
	12h	24h	B/A	12h	24h	D/C	
	(A)	(B)		(C)	(D)		
L-脯氨酸(Pro)	8.468	5.760	0.680	6.957	3.885	0.558	微苦味 Slight bitter
L-精氨酸(Arg)	13.636	11.366	0.834	11.203	7.665	0.684	
L-丙氨酸(Ala)	25.008	24.942	0.997	20.546	16.821	0.819	甜味 Sweet
L-半胱氨酸(Cys)	1.124	1.132	1.007	0.923	0.763	0.827	甜味 Sweet
L-甘氨酸(Gly)	6.392	7.198	1.126	5.252	4.854	0.924	
L-蛋氨酸(Met)	1.578	2.028	1.285	1.296	1.368	1.056	苦味 Bitter
L-丝氨酸(Ser)	5.592	7.442	1.331	4.494	5.019	1.117	微甜味 Slight sweet
L-谷氨酸(Glu)	16.924	23.200	1.371	13.904	15.646	1.125	鲜味 Delicate
L-苏氨酸(Thr)	4.716	6.504	1.379	3.875	4.386	1.132	微甜味 Slight sweet
L-组氨酸(His)	3.046	4.268	1.407	2.503	2.878	1.150	苦味 Bitter
L-赖氨酸(Lys)	4.484	6.554	1.462	3.684	4.420	1.200	苦味 Bitter
L-苯丙氨酸(Phe)	3.968	5.878	1.481	3.260	3.964	1.216	微苦味 Slight bitter
L-亮氨酸(Leu)	6.948	10.362	1.491	5.708	6.988	1.224	苦味 Bitter
L-异亮氨酸(Ile)	4.590	6.852	1.493	3.771	4.621	1.225	苦味 Bitter
L-酪氨酸(Tyr)	2.696	4.054	1.504	2.215	2.734	1.234	微苦味 Slight bitter
L-缬氨酸(Val)	7.122	11.346	1.593	5.851	7.652	1.308	苦味 Bitter
L-天冬氨酸(Asp)	5.424	9.374	1.728	4.456	6.322	1.419	鲜味 Delicate

* 进样量为50μl。Amount of used sample is 50 μl.

2.2 生理状态对自溶液氨基酸组成的影响

为研究生理状态对自溶液氨基酸组成的影响,测定了接种量为 7.53×10^6 个活酵母/ml 时的啤酒酵母在 11°Brix 麦芽汁培养基中,30℃ 恒温水浴摇床上的生长曲线,其动力学方程为:

$$y^{-1}(\times 10^6 \text{ 个酵母细胞/ml}) = 0.02643(\sin 4t)^{-1} - 0.02593$$

$$\gamma = 0.9873, \quad n = 13$$

在本试验条件下,啤酒酵母生长的缓慢期延时约 6 小时左右,对数生长期出现在 8—16 小时,17—28 小时为稳定期,28 小时后是衰亡期,生长半衰期 $t_{0.5}$ 为 12.72 小时。

分别取对数生长中期(12h)和稳定生长中期(24h)的酵母培养液离心,洗涤,然后以 5% 的重量比悬浮于自溶缓冲液中,55℃ 条件下自溶 24 小时,用磺酸水杨酸沉淀自溶液中的蛋白质。离心后用氨基酸自动分析仪测定上清液中的氨基酸组分,其结果列于表 3。不同生理状态的酵母自溶液中,其氨基酸摩尔组分存在极显著的差异($t = 6.729, t_{0.01}^{16} = 2.921$)。

在酵母细胞生长最旺盛的对数生长中期,自溶液中丙氨酸的摩尔份数最高,达 20.546%。其次是谷氨酸和精氨酸,分别为 13.904% 和 11.203%。半胱氨酸和蛋氨酸的最低,仅占 1% 左右。在稳定生长期的自溶液中,则是丙氨酸和谷氨酸含量高,二者摩尔份数相近,均约占 16% 左右。与对数生长中期相比,稳定期自溶液中脯氨酸、精氨酸的摩尔份数显著减少,下降幅度分别高达 44% 和 32%。甘、蛋、丝、谷、苏、组等氨基酸的摩尔组份则变化不大,天冬氨酸和缬氨酸的摩尔份数则显著增加,上升幅度分别为 42% 和 31%。

从风味化学的角度看,呈甜味的 L-丙氨酸随酵母细胞的衰老而含量下降,微甜味的 L-丝氨酸和 L-苏氨酸含量增加 30% 左右,而呈苦味和鲜味的氨基酸则均显著增加。

从营养学的角度看,除丙氨酸的摩尔份数下降外,其余必需氨基酸(色氨酸未测定)的摩尔份数均有不同程度提高。

上述结果说明,随着酵母细胞的衰老,其自溶液中必需氨基酸的摩尔份数增加,营养效价提高,鲜味增浓,但苦味也上升,致使风味变劣。

参 考 文 献

- [1] 宁正祥. 食品科学, 1991, 12: 16—19.
- [2] 江慧修. 微生物学报, 1989, 29(1): 33—38.
- [3] 宁正祥. 食品与发酵工业, 1993, 2: 30—34.
- [4] 黄伟坤. 等编著. 食品检验与分析, 北京: 轻工业出版社, 1989. 35—57.
- [5] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1979. 127—134.
- [6] 李德耀, 叶济宇. 植物生理学通讯, 1980, 1: 35—40.
- [7] 毕玉蓉, 梁厚果. 实验生物学报, 1987, 20(2): 109—114.
- [8] Shen S C et al. Scientia Sinica, 1959, 8(9): 733—745.
- [9] 沈 同, 王镜岩编. 生物化学, 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 304.
- [10] 宁正祥, 赵谋明. 食品生物化学. 广州: 华南理工大学出版社, 1993. 75.

STUDIES ON AUTOLYSIS DYNAMICS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ning Zhengxiang

(Department of Food Engineering, South China University
of Science and Technology, Guanzhou 510641)

Abstract The autolysis dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* was studied at 55℃ in a pH5.5 sodium acetate buffer. The induction phase of yeast cell autolysis is about 1.85h. Glycogenolysis carries out most rapidly, and its half time ($t_{0.5}$) is only 1.48h. Proteolysis proceeds faster than the lysis of nucleic acid. $t_{0.5}$ of nucleic acid degradation is 12.38h, which can be taken as an important parameter for optimization of yeast autolysis conditions. The degradation of macromolecules in yeast cells showed significant positive synergistic effects. The yeast cells extrude amino acids. Its composition varies with the age of yeast cells. With the extension of culture time, the fraction of necessary amino acids, and those with delicate and bitter taste increases obviously. The contents of Pro, Arg, Ala, Cys decreases.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Cell autolysis, Amino acid analysis