

文章编号 :1009-038X(2000)01-0019-04

## 诱导啤酒酵母细胞溶解释放蛋白质\*

陈廷登<sup>1</sup>, 刘献军<sup>1</sup>, 宁 静<sup>2</sup>

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江杭州 310014; 2. 浙江常山万德富酒业有限公司, 浙江常山 324200)

**摘 要**: 采用自溶法、自溶+酶解法、诱导剂+自溶+酶解法对 *S. Cerevisiae* YJ 酵母细胞进行生物处理使其释放蛋白质及其分解产物. 对反应产物  $\alpha$ -氨基氮和细胞蛋白质溶出率及细胞干基提取率的测定结果表明: 诱导剂+自溶+酶解法的作用效果明显优于自溶+酶解法及自溶法. 诱导剂+自溶+酶解法比自溶+酶解法及自溶法的反应产物中游离  $\alpha$ -氨基氮分别提高了 9.0 mg/g 及 23.0 mg/g(以干酵母计), 细胞蛋白质溶出率分别提高了 13.50% 及 29.83%, 细胞干基提取率分别提高了 7.0% 及 20.90%.

**关键词**: 啤酒酵母; 自溶; 水解;  $\alpha$ -氨基氮; 蛋白质溶出率; 细胞干基提取率

**中图分类号**: TS262.5      **文献标识码**: A

## Release of Protein by Induced Brewer's Yeast Cell Lysis

CHEN Ting-deng<sup>1</sup>, LIU Xian-jun<sup>1</sup>, NING Jing<sup>2</sup>

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014;  
2. Zhejiang Changshan Wonderful Brewing Industry Co. LTD, Changshan 324200)

**Abstract**: In studies of a 5 L isothermal yeast hydrolytic tank, at 200 g/L cells, pH 6.5 and 50 °C, *S. cerevisiae* YJ cells were treated biologically by autolysis or by autolysis plus enzymatic hydrolysis or by inducer plus autolysis plus enzymatic hydrolysis in order to release yeast cell protein and its decomposition product. The effect of inducer plus autolysis plus enzymatic hydrolysis was investigated with the result that the rate of lysis was obviously superior to autolysis plus enzymatic hydrolysis and autolysis through the determination of the  $\alpha$ -aminonitrogen, the dissolved rate of cell protein and the extraction rate of cell (dry basis) of the product obtained by the three methods. There were 9.0 mg/g (dry yeast) and 23.0 mg/g (dry yeast) increase of the free  $\alpha$ -amino nitrogen, 13.5% and 29.83% increase of the dissolved rate of cell protein, and 7.0% and 20.90% increase of the extraction rate of cell (dry basis) by inducer plus autolysis plus enzymatic hydrolysis as compared with by autolysis plus enzymatic hydrolysis and autolysis.

**Key words**: brewer's yeast; autolysis; hydrolysis;  $\alpha$ -amino acid nitrogen; dissolved rate of protein; extraction rate of cell (dry basis)

\* 收稿日期: 1999-04-28; 修订日期: 1999-12-15.

基金项目: 浙江省科委重点科研项目(951089A).

作者简介: 陈廷登(1944年10月生),男,浙江温州人,副教授.

目前,对扩大蛋白质供应的研究主要集中在微生物领域,特别是酵母上<sup>[1]</sup>.啤酒酵母蛋白质含量约占其干物质的 45%~55%,比大豆的蛋白质含量还要高(大豆仅含蛋白质 37%~44%),而且营养丰富,含有包括人体必需氨基酸在内的 19 种氨基酸.此外,还含有维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub> 及其它微量元素.为了更有效地利用啤酒酵母细胞中的高蛋白质组分,从细胞中分离出蛋白质,Dunnill 和 Lilly 提出了几种使酵母细胞释放蛋白质的方法:细胞自溶法、化学处理法、酶解法和机械破壁法<sup>[2]</sup>.细胞自溶法通常反应时间较长,而蛋白质提取率却较低.化学处理法通常会引起蛋白质变性.最有吸引力的方法应该是机械破壁法和酶解法,而机械破壁法需要消耗较大能量,相应地其效率就低.故以酶解法为佳.作者采用酶解法在 150 L 的酵母水解锅中进行试验,并将其反应产物应用于浙江省科委重点科研项目——啤酒生产酵母全循环新工艺生产性试验研究,作为 50% 大米辅料比例啤酒酿造的补充氮源,并取得了成功.

作者利用 5 L 的恒温酵母水解锅对 *S. Cerevisiae* YJ 酵母细胞进行生物处理,使其释放蛋白质及其分解产物.通过大量的试验,探索了一条合理的啤酒酵母细胞自溶和水解的工艺路线,并在此基础上研究了 *S. Cerevisiae* YJ 啤酒酵母细胞在自溶和水解过程中蛋白质及其分解产物的变化规律.

1 材料与方法

1.1 菌株

取自北京双合盛五星啤酒厂杭州联合厂的大生产剩余压榨酵母,用水洗涤至无泡沫无啤酒味后,经过 100 目筛过滤,并在 5 000 r/min 下离心分离 10 min 后,收集菌体备用.

1.2 试剂

盐酸:AR 级;氢氧化钠:AR 级;木瓜蛋白酶:广东江门健德实业总公司健德生物化学厂出品;中性蛋白酶:丹麦 NOVO NORDISK 公司出品.

1.3 主要分析方法

细胞染色和显微观察:细胞用 0.1% 美兰溶液染色,细胞溶解情况用放大 400 倍的显微镜观察.

细胞干基提取率的测定:自溶或酶解后的悬浮液,在 5 000 r/min 下离心分离 3 次,每次倾出上清液后,用蒸馏水洗涤沉淀物.然后,将其在 105 ℃ 下干燥至恒重,按下式计算细胞干基提取率:

万方数据 
$$W = \frac{M_1 - M_2}{M_1}$$

式中:W——细胞干基提取率(%);M<sub>1</sub>——未经处理的酵母干重(g);M<sub>2</sub>——处理后沉淀物干重(g)

α-氨基氮的测定:茚三酮法<sup>[3]</sup>.

总氮、细胞蛋白质溶出率的测定:凯氏定氮法<sup>[4]</sup>.

1.4 研究方法

将经过洗涤并离心后的酵母菌体悬浮于水中,搅拌均匀,制成酵母菌悬液,细胞质量浓度为 200 g/L.在 pH 6.5、温度 50 ℃ 下选用了 3 种不同工艺条件进行比较试验,即 1)自溶 64 h 2)自溶 24 h 后再加蛋白质分解酶水解 40 h 3)自溶一开始添加诱导剂自溶 24 h 后,再添加蛋白质分解酶水解 40 h,使酵母细胞释放蛋白质及其分解产物<sup>[5]</sup>.

在自溶和加酶水解结束后,分别将处理液用 5 000 r/min 转速离心 10 min,收集上清液,即为第一提取液,然后,用适量水洗涤器底沉淀物,再经离心分离收集第二次提取液,如此重复 3 次.3 次上清液混合,并浓缩至 1/4 体积后进行总氮及细胞蛋白质溶出率的测定.器底沉淀物移至已知重量的烧杯内测定细胞干基提取率.

在自溶和水解过程中,用 5 mol/L 的 NaOH 溶液滴加来控制酵母乳所需保持的 pH 值,并且每隔 8 h 用茚三酮法测定自溶液及加酶水解液的 α-氨基氮含量,用凯氏定氮法测定细胞蛋白质溶出率,用重量法测定细胞干基提取率.

2 结果与讨论

2.1 YJ 酵母细胞在自溶和水解过程中游离 α-氨基氮的释放

酵母细胞在自溶和水解过程中,随着酵母细胞壁的破裂,细胞内蛋白质的溶出和降解,自溶和水解溶液中的游离 α-氨基氮含量随培养时间延长而增加,如图 1 所示.

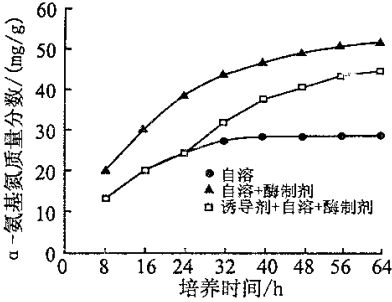


图 1 YJ 酵母细胞在自溶和和水解过程中 α-氨基氮的释放  
Fig.1 The release of α-amino acid nitrogen during the process of autolysis and hydrolysis of *S. Cerevisiae* YJ cells

由图 1 可见 ,啤酒酵母细胞只作自溶处理 ,虽然在 24 h 内自溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量上升幅度较大 ,达到 24 mg/g (以干酵母计) ,但 24 h 以后  $\alpha$ -氨基氮含量上升缓慢 ,到 32 h 以后基本趋于稳定 ,最终只能产生  $\alpha$ -氨基氮 28 mg/g (以干酵母计) .这说明只靠酵母本身固有的酶进行生化反应的作用是不够的 ,通过酵母自溶作用 ,虽然可使酵母细胞壁结构在一定程度上松散或破裂 ,壁的通透性有所增加 ,造成一定数量细胞内物质的外溢 .但在溶出细胞外的物质中相当大的部分是高分子物质 ,含氮物质是以蛋白质、肽、胺、氨基酸的形式存在于溶液中 .由于酶的缺乏 ,特别是蛋白酶数量不够 ,只够在开始 24 h 内将细胞内溶出的高分子蛋白质分解成  $\alpha$ -氨基氮 ,但并不足以把 24 h 以后由细胞内溢出的高分子蛋白质加以降解 .因此 ,自溶溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量并不高 .

针对只作自溶处理溶液  $\alpha$ -氨基氮含量的不足 ,在自溶 24 h 的基础上 ,向酵母中添加一定数量的蛋白质分解酶 ,则  $\alpha$ -氨基氮释放情况大为改善 .加酶水解的 24 h 内  $\alpha$ -氨基氮一直处于上升状态 ,到总时间 48 h 以后才逐步趋于缓慢 ,到 56 h 才平稳 ,并稳定在 44 mg/g .

为了使酵母细胞内含物更多地溢出细胞外 ,特别是细胞内蛋白质溢出细胞外 ,并把外溢的高分子蛋白质更大程度地降解为  $\alpha$ -氨基氮 ,又在自溶一开始向酵母乳中添加一定数量的诱导剂 ,自溶 24 h 后再添加蛋白质分解酶处理 40 h .从添加诱导剂自溶一开始 ,溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量一直处于上升 ,到 24 h 的时候  $\alpha$ -氨基氮增加到约 40 mg/g ,比仅自溶的溶液中  $\alpha$ -氨基氮提高了约 12 mg/g .然后 ,在自溶 24 h 后 ,添加一定数量的蛋白质分解酶 ,分解细胞内溢出的高分子蛋白质  $\alpha$ -氨基氮继续增加 ,一直到 56 h 才趋于基本平稳 ,最终 ,溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量达到 51 mg/g ,比仅自溶的溶液中  $\alpha$ -氨基氮提高了 23 mg/g .说明诱导剂能激活酵母自身含有的能引起自溶作用的酶 ,特别是蛋白酶 .

由于酵母本身所含的酶大部分以酶源的形式存在 ,没有催化能力或者催化能力很小 ,通过添加适量的诱导剂 ,借助于酵母的自溶作用 ,可使酵母细胞壁结构松散 ,壁的通透性进一步提高 ,细胞内大分子物质更多地外溢 ,增加酶水解底物浓度 ,加速酶促反应进行 .上述结果可见 ,添加诱导剂自溶 24 h 后追加蛋白质分解酶水解的工艺对提高酵母水解溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量有明显的效果 .

2.2 YJ 酵母细胞在自溶和水解过程中蛋白质溶出

率的变化

在自溶和水解 64 h 的过程中 ,每隔 8 h 将处理液在 5 000 r/min 离心分离 10 min ,收集上层清原液 .用蒸馏水洗涤并离心残渣 3 次 ,将洗涤液与原液合并 ,混合均匀 .用凯氏定氮法测定混合溶液的总氮 ,并扣除外加酶的含氮量 ,计算出 YJ 酵母细胞蛋白质溶出率 .以培养时间为横坐标 ,酵母细胞蛋白质溶出率为纵坐标作图 ,如图 2 所示 .

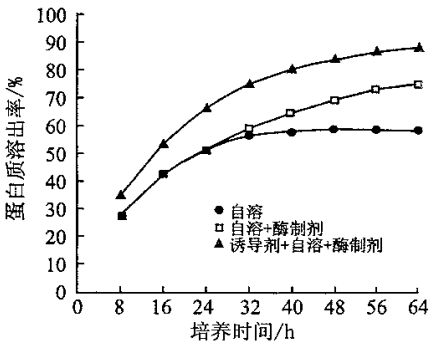


图 2 YJ 酵母细胞在自溶和水解过程中蛋白质溶出率的变化

Fig.2 The variance of the dissolved rate of cell protein during the process of autolysis and hydrolysis of *S. Cerevisiae* YJ cells

由图 2 可见 ,YJ 酵母细胞蛋白质溶出情况基本与  $\alpha$ -氨基氮的释放情况相一致 .自溶处理酵母细胞 ,在开始 24 h 内 ,蛋白质溶出速度较快 ,24 h 后减慢 ,到 32 h 趋于平稳 ,最终只能达到 59.3% ;而自溶 24 h 后添加酶制剂处理酵母细胞 ,自添加蛋白质分解酶开始 ,蛋白质溶出率就开始上升 ,到 56 h 才趋于平稳 ,最终达到 75.06% .与自溶处理酵母细胞相比 ,蛋白质溶出率增加了 16.33% ;但自溶一开始添加诱导剂自溶处理酵母细胞 24 h 后再添加酶制剂处理酵母细胞 ,则从自溶一开始蛋白质溶出率就比前两种处理方法高 ,并一直处于上升状态 ,到 56 h 才趋向平稳 ,最终可达 89.03% .比自处理酵母细胞增加了 29.83% ,比自溶结合酶制剂处理酵母细胞增加了 13.50% .上述这些结果表明 ,诱导剂不仅能激活酵母细胞壁的裂解酶 ,而且能激活蛋白质分解酶 ,增强酶制剂对 YJ 酵母细胞的溶解作用 ,使溶出细胞外的蛋白质及其分解产物数量增加 .

2.3 YJ 酵母细胞自溶和水解过程中干基提取率的变化

酵母细胞干基提取率表示酵母细胞中干物质 ,包括蛋白质、糖类、核酸类等物质通过自溶和水解后溶解到溶液中的百分比率 ,一定程度上反映了酵母细胞自溶和水解工艺条件控制的好坏 .

通过 64 h 的自溶和水解 ,测定酵母细胞干基提

取率,以自培养时间为横坐标,细胞干基提取率为纵坐标作图,如图 3 所示.

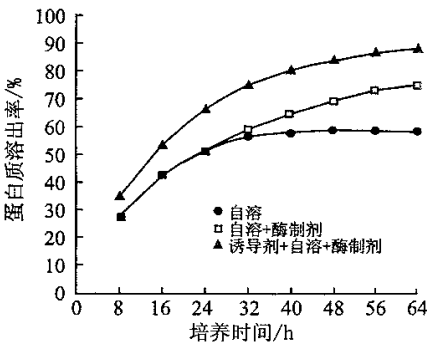


图 3 YJ 酵母细胞在水解过程中干基提取率的变化  
Fig. 3 The variance of the extraction rate of cell ( dry basis ) during the process of autolysis and hydrolysis of *S. Cerevisiae* YJ cells

由图 3 可知,对酵母细胞只作自溶处理,在自溶开始的 32 h 内,干基提取率直线上升,至 48 h 达到 60% 左右后基本稳定;对酵母细胞进行自溶结合酶解法处理,从自溶 24 h 后添加蛋白质分解酶开始,干基提取率就开始上升,并且上升速度始终大于自溶法,至 56 h 达到 74% 左右后基本稳定;对酵母细胞进行诱导剂自溶结合酶制剂处理,在添加诱导剂自溶 24 h 后添加酶制剂,其细胞干基提取率就开始处于上升状态,并且始终大于自溶结合酶解法及自溶法,40 h 后才变慢,至 48 h 达到 80% 后基本不变.根据 3 种处理过程中所得最大干基提取率可知,对酵母细胞进行添加诱导剂自溶结合酶制剂处理比另两种方法的干基提取率分别提高了 7.0% 及 20.90%. 这个结果与上述的  $\alpha$ -氨基氮及蛋白质溶出率的结果是相符合的.

通过以上分析可知,提高酵母细胞干基提取率,需添加自溶诱导剂,提高溶液  $\alpha$ -氨基氮,则需添加酶制剂,两者结合处理的效果较佳.自溶诱导剂能破坏酵母细胞壁的完整性,使细胞内干物质,特别是蛋白质外溢量增加,提高外加酶作用的底物浓度,从而提高酶促反应的速度.而酶制剂的添加,可增加生化反应的酶浓度,加速酶促反应进行,从而使水解液中  $\alpha$ -氨基氮含量、细胞蛋白质出率及细胞干基提取率有了更大的提高.

3 结 论

采用添加自溶诱导剂自溶 24 h 后结合外加酶制剂对啤酒酵母细胞进行处理,在选定的工艺条件下,每克干酵母可得 51 mg 的  $\alpha$ -氨基氮,酵母细胞蛋白质溶出率可达 89.13%,细胞干基提取率可达 81.0%. 与自溶结合酶制剂处理和只作自溶处理相比,其  $\alpha$ -氨基氮含量分别提高了 9.0 mg/g 及 23 mg/g (以干酵母计),蛋白质溶出率提高了 13.50% 及 29.83%,干基提取率提高了 7.0% 及 20.90%. 酵母细胞溶出及降解的产物构成了酵母提取物的独特风味和营养成分,其工艺路线是成功的.

啤酒酵母自溶和水解反应相当复杂,酶法水解的影响因素很多,诸如酵母种类和菌龄、贮存条件、添加酶制剂的种类、酶量、激活剂种类、自溶和水解反应的各种因素都会影响到酵母蛋白质的溶出率、降解速度及干基提取率.如何继续提高酵母细胞水解溶液的  $\alpha$ -氨基氮含量及细胞蛋白质溶出率和干基提取率,还有待进一步的研究和探讨.

参考文献

[ 1 ] GUILLERMO, ANTHONG J, CHOKYUN. Release of singlecell protein by induced cell lysis[ J ]. *Food Science*, 1982, 47( 6 ): 20732~32075  
[ 2 ] DUNNILL P, LILLY. Single cell protein I[ M ]. Ed. TANNENBAUM S R. Cambridge: MIT Press, 1975.  
[ 3 ] 天津轻工业学院. 工业发酵分析[ M ]. 1977. 北京: 轻工业出版社, 1980.  
[ 4 ] 管敦仪. 啤酒工业手册( 中册 ) [ M ]. 北京: 轻工业出版社, 1978.  
[ 5 ] 陈廷登. 啤酒酵母浸出物提取工艺的研究[ J ]. 浙江工学院学报, 1992( 3 ): 16~19

( 责任编辑 朱明 )