

酵母抽提物中呈味核苷酸含量偏低的原因探讨(II)

啤酒酵母自溶过程核酸的降解规律研究

陈洁, 王璋

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本论文通过详细测定酵母自溶过程中蛋白质、核酸以及各种核苷酸在产物中的变化量, 研究 pH、外加 5'-磷酸二酯酶(麦芽根核酸酶)、外加蛋白酶等对酵母自溶的影响, 从而探讨外加 5'-磷酸二酯酶不能显著提高酵母自溶产物中呈味核苷酸含量的原因。研究结果显示: 在自溶过程直接添加麦芽根核酸酶只能略提高酵母抽提物中呈味核苷酸的含量, 但提高程度不明显; 在 pH8 自溶的产物中 5'-核苷酸和 3'-核苷酸的量均显著低于在 pH5 自溶的产物中的量。酵母在 pH8~8.5 条件下自溶时, 外加蛋白酶可以显著提高酵母自溶物产物中可溶性固形物含量、可溶性蛋白质和核苷酸的含量, 显著降低核酸含量, 产物中的 5'-核苷酸含量显著比 3'-核苷酸含量高。上述结果说明了酵母在外加麦芽根核酸酶条件下自溶时, 核酸未能迅速降解并生成大量的呈味核苷酸的原因之一是由于酵母细胞壁的存在阻碍了细胞器中核酸的溶出, 致使外加的 5'-磷酸二酯酶不能很好与核酸底物接触, 从而不能有效提高呈味核苷酸的产量。

关键词: 酵母提取物; 自溶; 5'-核苷酸

The Reason for the Low Content of Flavor Enhancer (5'-GMP) in the Yeast Extract (II) RNA Degradation Properties in Yeast Autolysis

CHEN Jie, WANG Zhang

(The School of Food Science and Technology, South Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of pH value, RNase from malted barley roots and the added proteinase on the yeast autolysis were researched. The results showed that: (1) 5'-nucleotide contents in yeast autolysate was slightly increased by adding RNase from malted barley roots; (2) higher pH did not improve the 5'-nucleotide contents even in the presence of RNase from malted barley roots, but at the pH 8.0, the addition of Acalase could increase the final yield, soluble protein contents and 5'-nucleotide in the presence of RNase from malted barley roots. These results suggested that the reason for the low content of flavor enhancer (5'-GMP) in the yeast extract may be due to the yeast cell wall that block the degradation of the adding RNase from malted barley roots on the RNA.

Key words: yeast extract; autolysis; flavor enhancer

中图分类号: Q524

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)02-0103-04

在酵母核酸酶的催化性质中, 仅有 pH 稳定性和温度稳定性与麦芽根核酸酶(5'-磷酸二酯酶)的性质有较大差别。酵母核酸酶的 pH 稳定性和温度稳定性均比麦芽根核酸酶的要差。这说明自溶法生产酵母提取物时, 即使外加 5'-磷酸二酯酶不能有效提高呈味核苷酸的原因并

非由于外加的 5'-磷酸二酯酶性质不稳定, 而是另有其它原因。因此, 本论文将从啤酒酵母自溶过程核酸的降解规律的研究出发, 试图从本质上揭示采用现有的工艺通过外加 5'-磷酸二酯酶不能有效提高呈味核苷酸的原因。

收稿日期: 2003-06-18

作者简介: 陈洁(1969-), 博士, 副教授。

1 材料与试剂

啤酒废酵母泥 太湖啤酒厂提供。

麦芽根核酸酶 按文献的方法从麦芽根制备。

磷酸氢二钠、柠檬酸、NaCl、NaHCO₃、NaOH、HCl、钼酸铵、高氯酸、Na₂CO₃、CuSO₄、硫酸锂、液溴、酒石酸钾、钨酸钠、钼酸钠 均为分析纯；磷酸 优级纯；甲醇 色谱纯；甘氨酸 上海康达氨基酸厂产品；5'-GMP、5'-AMP、3'-AMP、5'-CMP、3'-CMP、5'-UMP、3'-UMP、RNA 均为 Sigma 公司产品；沉淀剂 0.25% 钼酸铵溶于 25% 高氯酸中。

超滤膜 截留分子量分别为 1 万和 3 千，天津纺院；超滤器：天津纺院。

HPLC Varian, 5000 型；C₁₈ 柱：Micro PAK MCH-5-30cm × 4mm。

7520 紫外分光光度计 上海分析仪器厂；722 光栅分光光度计 上海第三分析仪器厂。

2 主要测定方法

2.1 可溶性蛋白质 Folin-酚法^[1]。

2.2 核酸 紫外吸收法^[1]。

2.3 核苷酸 HPLC 法^[2]。

样品 将浓缩 4 倍的酵母抽提物离心，取上清液，采用截留分子量为 3000 的膜超滤以除去大分子。所得透过液采用 HPLC 检测其中的核苷酸含量。采用 SIGMA 公司的 3'-AMP、5'-AMP、5'-GMP、5'-CMP、5'-UMP、3'-UMP 和 3'-CMP 作为标样。

HPLC 色谱条件 流速为 1.0ml/min；λ₂₆₅；采用梯度洗脱，0min 时的洗脱液组成为 30% 0.05% 磷酸水溶液+70% 水，5min 时的洗脱液组成为 30% 0.05% 磷酸水溶液+70% 水，15min 时的洗脱液组成为 50% 0.05% 磷酸水溶液+50% 水，18min 时的洗脱液组成为 50% 0.05% 磷酸水溶液+50% 水，22min 时的洗脱液组成为 30% 0.05% 磷酸水溶液+70% 水。

2.4 酵母核酸酶活力的测定方法 采用 Prentice 方法^[3]。

2.5 总核酸 定磷法^[1]。

3 方法

3.1 制备酵母抽提物的基本工艺

在 200g 酵母中加 2 倍无菌水(V/W)和 5%(W/V)NaCl，搅拌均匀后将料液升温至 55℃，保温 30h 并不断搅拌，期间每隔一定时间取样。所取样品立即置于 100℃ 水浴中保温 20min，然后离心分离，取上清液，测定总可溶性固形物、总可溶性蛋白质、总核酸及各种单核苷酸含量。

3.2 5'-磷酸二酯酶对自溶法制备的酵母抽提物中核苷

酸的影响

200g 酵母加 2 倍无菌水(V/W)和 5%(W/V)NaCl，再加 1%(W/V)麦芽根核酸酶，搅拌均匀，然后升温至 55℃，保温 30h 并保持不断搅拌，期间每隔一定时间取样。以下处理同 3.1。对照不加核酸酶。

3.3 pH 对于酵母自溶进程的影响

在 200g 酵母中加入 2 倍无菌水(V/W)和 5%(W/V)NaCl 后，搅拌均匀，用 4mol/L NaOH 将 pH 调至 8，再加 1%(W/V)麦芽根核酸酶，然后升温至 55℃ 自溶，同时用 4mol/L NaOH 维持 pH8，2h 后，用 4mol/L HCl 将 pH 调至 5。自溶期间每隔一定时间取样，以下处理同 3.1。对照组始终不调节 pH。

3.4 破壁对酵母自溶进程的影响

取 200g 酵母加 2 倍无菌水(V/W)和 5%(W/V)NaCl 后，搅拌均匀，用 4mol/L NaOH 将 pH 调至 8，再加 1%(W/V)麦芽根核酸酶和 0.5%(W/V)acylase，然后升温至 55℃ 自溶，同时用 4mol/L NaOH 维持 pH8，2h 后，用 4mol/L HCl 将 pH 调至 5。自溶期间每隔一定时间取样，以下处理同 3.1。

4 结果与讨论

4.1 麦芽根核酸酶对酵母自溶过程的影响

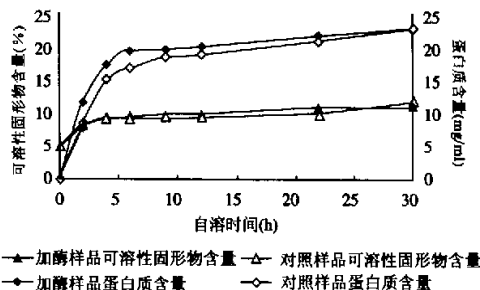


图1 麦芽根核酸酶对酵母自溶进程的影响

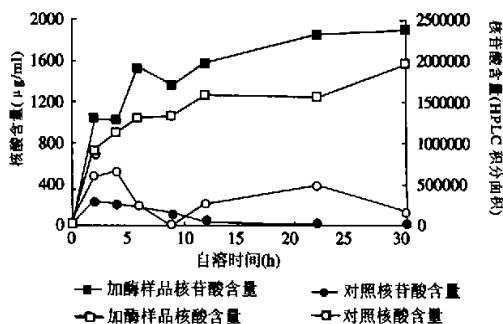


图2 麦芽根核酸酶对酵母自溶过程中核酸降解和核苷酸生成量的影响

表1 酵母自溶过程中各类核苷酸生成进程

核苷酸含量*	2h	4h	6h	9h	12h	22h	30h
3'-AMP	196000	296466	276980	254066	242621	168968	135849
3'-CMP	13409	8720	56708	56891	60177	77911	79357
3'-UMP	143941	53918	145156	291981	279171	328475	364458
5'-CMP,5'-UMP,							
5'-AMP,5'-GMP							

注: * 核苷酸含量由 HPLC 图谱积分面积表达。

表2 加麦芽根核酸酶的酵母自溶的核苷酸生成进程

核苷酸含量**	2h	4h	6h	9h	12h	22h	30h
5'-CMP	5100	7181	16887	9647	25587	45346	57542
5'-UMP	28211	61762	17175	19920	16098	22681	24310
3'-CMP	272107	243922	247025	208305	200796	187270	268037
3'-UMP	165860	329544	252800	131032	102380	105326	143515
5'-AMP		3106	75899	85366*	96005*	115796*	134540*
5'-GMP	6637	5051	14626				
3'-AMP	9076	6150	13756	6250	12660	6756	12500

注: * 由于 HPLC 分辨率的原因, 两个峰合并;

** 核苷酸含量由 HPLC 图谱积分面积表达。

麦芽根核酸酶对酵母自溶过程中蛋白质和总可溶性固形物的影响见图1, 对自溶过程中核酸的降解和核苷酸生成的影响见图1和图2。啤酒酵母所含的核酸酶主要为3'-核苷酸生成酶, 表1可以看出自溶产物中基本不含5'-核苷酸。而表2和图2可以看出, 在自溶过程直接添加麦芽根核酸酶只能略提高酵母抽提物中和呈味核苷酸的含量, 但提高程度不显著。从图1可以看出, 外加核酸酶对可溶性固形物和蛋白质含量没有明显影响。

4.2 pH对酵母自溶进程的影响

pH对酵母自溶总的得率影响不大, 但对于自溶产物的组成成分有显著影响。从图3可以看出, 在pH8自溶的产物中蛋白质含量显著低于对照(对照不调节pH, 自溶时本身pH在5左右); 从图4可以看出, 在pH8自溶的产物中核酸的含量则远高于对照, 核苷酸的含量又明显低于对照。从表3的核苷酸生成进程表来看, 在pH8自溶的产物中5'-核苷酸和3'-核苷酸的量均显著低于在pH5自溶的产物中的量。

在pH8自溶的产物中3'-核苷酸的量显著低于在pH5自溶的产物中的量, 说明pH8可以有效抑制酵母中产3'-核苷酸的核酸酶的活力。而在pH8自溶的产物中蛋白质含量显著低于对照, 则说明pH8对于酵母中的蛋白酶也有抑制作用。酵母中的蛋白酶主要有4种^[4], 这些蛋白酶的温度稳定性和pH稳定性均比较差^[5]。从试验结果看, 虽然试样在pH8保温2h后, 随即调pH回5.0, 仍然对蛋白酶造成了很明显的抑制作用。

另外, 由于外加的麦芽根核酸酶的pH稳定性较

表3 加麦芽根核酸酶的酵母在pH8下自溶的核苷酸生成进程表

核苷酸含量**	2h	4h	6h	9h	12h	22h	30h
5'-CMP	6445	9959	13932	9146	15482	11125	10813
5'-UMP	6984	45430	41286	64900	59772	17631	19591
3'-CMP	29120	50681	67996	145325	126382	137192	135190
3'-UMP	45640	56974	18950	5637	64712	52667	44478
5'-AMP	5735		18950*	7341	7642*	68303*	53203*
5'-GMP					19539		
3'-AMP		6282			18352		

注: * 由于 HPLC 分辨率的原因, 两个峰合并;

** 核苷酸含量由 HPLC 图谱积分面积表达。

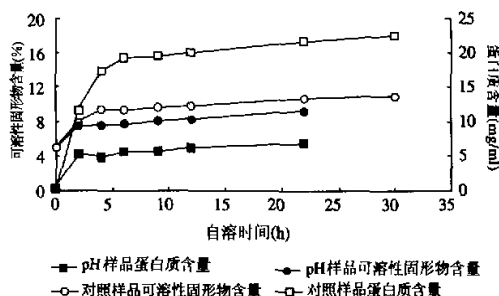


图3 酵母在不同pH条件下自溶时自溶进程的比较

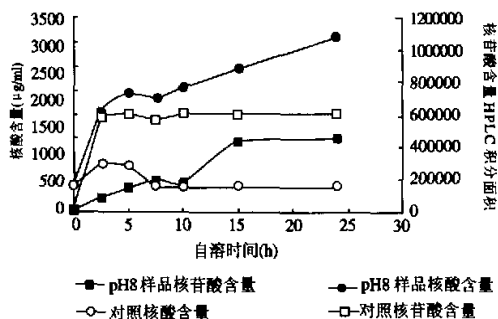


图4 酵母在不同pH条件下自溶的产物中核酸和核苷酸含量的比较

好, 理论上讲, 在pH8加酶的自溶过程中, 核酸的降解应该比较迅速并能生成大量的呈味核苷酸。但试验未达到预想结果。这可能有以下原因导致的: 由于pH8阻碍蛋白质降解, 也阻碍了细胞器中核酸的溶出, 导致在核酸酶失活前生成的核苷酸总量下降。这种推测可通过外加蛋白酶破壁试验来验证。

4.3 外加蛋白酶破壁对于酵母自溶进程的影响

从图5、6可以看出, 酵母在pH8~8.5条件下自溶时, 外加蛋白酶可以显著提高酵母自溶产物中可溶性固形物含量、可溶性蛋白质和核苷酸的含量, 显著降低核酸含量。表4显示: 酵母在pH8~8.5条件下并外

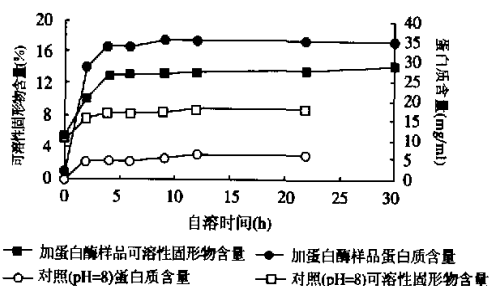


图5 蛋白酶对酵母自溶进程的影响

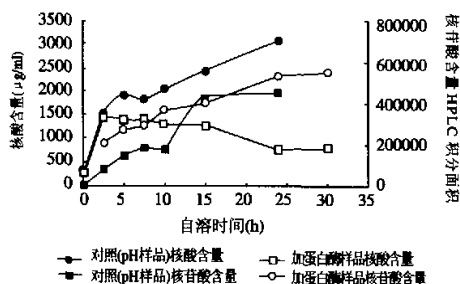


图6 蛋白酶对酵母自溶过程核苷酸生成量的影响

加蛋白酶和麦芽根核酸酶自溶得到的产物中的5'-核苷酸含量显著比3'-核苷酸含量高。这个结果说明了外加蛋白酶有助于蛋白质和核酸的溶出,也证实上述推论,即酵母在pH8并外加麦芽根核酸酶条件下自溶时,核酸未能迅速降解并生成大量的呈味核苷酸的原因之一是由于pH8阻碍了蛋白质降解,也阻碍了细胞器中核酸的溶出,致使外加的5'-磷酸二酯酶不能很好与核酸底物接触,导致了在核酸酶失活前生成的核苷酸总量下降,从而不能有效提高呈味核苷酸的产量。

比较图6和图2可以看出,酵母在pH8条件下并外加蛋白酶和麦芽根核酸酶自溶得到的产物中的核苷酸含量比在pH5条件下仅加麦芽根核酸酶自溶的低。这说明酵母自溶过程中细胞壁细胞膜的破裂、胞内物质的溶出及降解的机制比较复杂,改变pH自溶并非仅影响了酵母中的蛋白酶系,可能对其中的碳水化合物酶比如葡聚糖酶和甘露聚糖酶也有抑制作用,从而进一步阻碍了酵母细胞壁的降解,因此改变pH所导致的后果也并非仅通过外加蛋白酶所能弥补,可能还需要外源蛋白酶、葡聚糖酶和甘露聚糖酶的联合作用。

上述三个实验的结果说明:由于酵母中存在能生成3'-核苷酸的核酸酶,而自溶过程中由于酵母细胞壁的存在,内源性的核酸酶能优先接触底物并将之降解成不呈味的3'-核苷酸,外加的麦芽根核酸酶由于不能首先直接

表4 酵母在pH8条件下并外加蛋白酶和麦芽根核酸酶自溶得到的产物中的核苷酸含量

核苷酸含量**	2h	4h	6h	9h	12h	22h	30h
5'-CMP	1097	1340	2870	3128	8642	5945	10454
5'-UMP	13089	114402*	75446*	81638*	81935*	91464*	129988*
3'-CMP	64015	7883					
3'-UMP	7530	5130	3337	1195	9040	4353	992
5'-AMP	1641		8129	764	11385	13200	10544
5'-GMP	4440		54541	35596	57513	123117	141586
3'-AMP	8920		39309	15060	40764	65928	76044

注: * 由于HPLC分辨率的原因,两个峰合并。 ** 核苷酸含量由HPLC图谱积分面积表达

与底物核酸接触,导致了不能显著提高酵母自溶产品中呈味核苷酸的含量。

5 结论

本文通过详细测定酵母自溶过程中蛋白质、总核酸、核苷酸的变化,以及核酸降解成核苷酸的过程变化规律,研究pH、外加5'-磷酸二酯酶(麦芽根核酸酶)、外加蛋白酶对酵母自溶的影响,从而探讨外加5'-磷酸二酯酶不能显著提高酵母自溶产物中呈味核苷酸含量的原因。研究结果显示:在自溶过程直接添加麦芽根核酸酶只能略提高酵母抽提物中和呈味核苷酸的含量,但提高程度不明显;在pH8自溶的产物中5'-核苷酸和3'-核苷酸的量均显著低于在pH5自溶的产物中的量。酵母在pH8~8.5条件下自溶时,外加蛋白酶可以显著提高酵母自溶产物中可溶性固形物含量、可溶性蛋白质和核苷酸的含量,显著降低核酸含量,产物中的5'-核苷酸含量显著比3'-核苷酸含量高。上述结果说明了酵母在外加麦芽根核酸酶条件下自溶时,核酸未能迅速降解并生成大量的呈味核苷酸的原因之一是由于酵母细胞壁的存在阻碍了细胞器中核酸的溶出,致使外加的5'-磷酸二酯酶不能很好与核酸底物接触,从而不能有效提高呈味核苷酸的产量。

参考文献:

- [1] 张龙翔,等.生化实验方法及技术[M].高等教育出版社,1981.165-166.
- [2] 陈洁,王璋.食品工业科技,2000,(1):19-21.
- [3] L Fukal,J.Kas,Rauch J. Inst Brew,1986,92(7-8):357-359.
- [4] 宁正祥.食品与发酵工业,1993,(2):30-34.
- [5] J K Shetty,R C Weaver,J E Kinsella.Ribonuclease isolated from yeast:characterization and properties[J].Biotechnology and Bioengineering,1981,(5):953-964.