

酵母细胞自溶过程的生物学研究*

江 慧 修

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从观察细胞的形态变化、测定细胞内物质的外溢动态以及分析自溶作用的产物等方面研究了酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BE-11 在 50℃ 温度处理下的自溶作用。在保温过程中细胞先经一段很短的迟缓期, 然后就向胞外溢出可溶性的具有强紫外吸收的物质, 测定自溶液中氨基酸、还原糖的含量, 其递增趋势也与上述类似, 而未降解的蛋白质的外溢量则很少。保温 22h, 细胞外溢物质的总量便达到原细胞重的 50%, 以后基本趋于稳定。用美蓝染色法观察了细胞从死亡到内含物外溢的过程, 细胞经保温 60h 仍保持着完整的轮廓, 但通过超声波处理和扫描电镜观察, 证明这些“完整”酵母的细胞壁已被相当削弱和部分分解。

关键词 细胞自溶; 酿酒酵母

长期以来人们就知道利用酵母细胞的自溶作用来瓦解细胞作为获取胞内组分的有效手段^[1], 如用于提取胞内蛋白质、核酸、胞内酶以及制备酵母浸提粉等^[2-5]。细胞自溶是由于在一定条件下触发了细胞能消化自身结构的自溶酶的分解作用所致^[4,6]。了解触发自溶酶作用的条件、细胞自溶的规律, 对于防止细胞自溶和有目的地控制自溶的程度均是十分重要的。本文报道酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BE-11 细胞在自溶过程中胞内物质被降解外溢的动态及与之相对应的细胞形态上发生的变化。

材 料 和 方 法

(一) 菌体

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BE-11 于 12Brix 麦芽汁 28℃ 培养 48h, 4000r/min 离心 10min 收集菌体, 蒸馏水洗涤三次后供自溶用。

(二) 自溶条件

菌体以 1:1 的重量比悬于 pH6.0 的 0.5mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液中, 搅拌均匀置 50℃ 水浴保温使其自溶。

(三) 细胞外溢物质和细胞残留物质的定量

定时取自溶物于 4000r/min 离心 15 min, 分别将沉淀部分与液体部分收集, 于 105℃ 烘至恒重, 并以未经保温处理的零时对照为基础, 计算外溢物和残留物各占原细胞总重的百分数。

(四) 氨基酸定量

用甲醛滴定法^[7]。

(五) 氨基酸分析

先用磺酸水杨酸将自溶液中的蛋白质沉淀, 离心除去, 然后上氨基酸自动分析仪测定。

(六) 蛋白质定量

Folin-Phenol 试剂法^[8,9]。

(七) 还原糖定量

3,5-二硝基水杨酸法^[10]。

(八) 菌体的显微观察

先进行美蓝染色, 即将菌液与 0.1% 美蓝液以 1:1 体积混合, 严格控制染色时间, 在接触染料 2min 时观察并照相。

(九) 菌体的超声波处理

将浓度约为 1×10^8 个/ml 的菌液置冰浴, 经受频率为 25kHz 的超声波处理 2min。

本文于 1987 年 6 月 24 日收到。

* 本工作承徐浩教授提出宝贵意见和审阅稿件; 刘如臻同志摄制电镜照片, 在此一并致谢。

(十) 菌体的扫描电镜观察

菌体先经1%高锰酸钾液于冰浴固定30min, 然后进行乙醇系列脱水, 醋酸异戊酯浸泡以及临界点干燥, 最后喷金再用国产扫描电镜观察。

结果与讨论

(一) 自溶过程中细胞内物质的外溢

以在50℃保温的小时数为横坐标, 胞内残留物占原细胞重的百分数为纵坐标作图1。从图1的曲线可看出, 保温到6h, 细胞内含物质呈直线下降, 至18h外溢速度减慢, 约经28h细胞失重达到50%, 以后基本稳定。

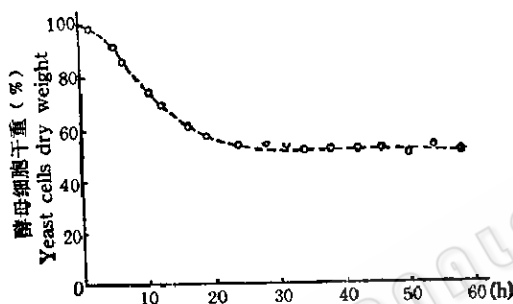


图1 自溶过程中酵母细胞物质的外溢
Fig. 1 Leakage of yeast components during autolysis

(二) 自溶产物的紫外吸收曲线

酵母细胞富含核酸和蛋白质, 这些大分子经自溶酶降解后便进入胞外的溶液中, 测定此溶液的紫外吸收曲线也可得知细胞自溶的大致动态。我们把经过30h保温自溶的样品离心, 取溶液部分作适当稀释后进行波长为200—300nm范围的紫外扫描, 得吸收曲线如图2, 其吸收高峰在260nm。

此外, 还分别测定了不同自溶时间的自溶液在260nm和280nm的吸收值(图3), 两条曲线均是从保温的第三个小时开始上升, 从9h速度加快呈直线上升, 其中

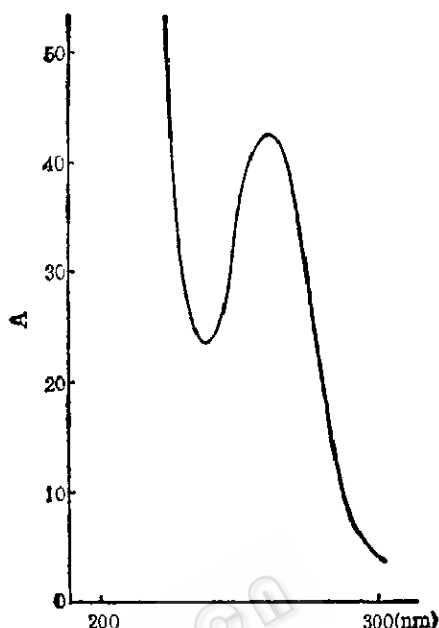


图2 酵母细胞自溶液的紫外吸收曲线
Fig. 2 U. V. absorption curve of yeast autolysate

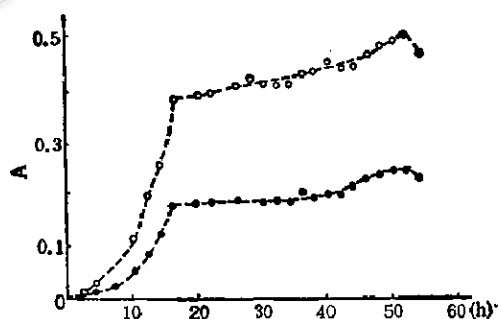


图3 保温自溶过程中自溶液在260nm和280nm的吸收曲线

Fig. 3 The A_{260} and A_{280} of yeast autolysate by 50℃ incubation
○—○ A_{260} ●—● A_{280}

260nm的吸收值上升速度更快。

(三) 自溶中蛋白质氨基酸的释放

图4表明, 整个自溶过程中溢出蛋白质的量不大, 占细胞总重的6%, 而氨基酸的释放量于22h已达20%以上, 且曲线的上升趋势与图1中细胞总量的下降趋势是相一致的。这说明蛋白质先在细胞内被

表1 自溶液于继续保温中蛋白质和氨基酸的含量

Table 1 A comparison of protein and amino nitrogen amounts in autolyzed extract before and after prolonged incubation at 50℃

自溶液的原自溶时间 (h) Extract from different interval (in hr) of autolysis	继续保温前 Before prolonged incubation		继续保温后 After prolonged incubation	
	蛋白质 (μg/ml) Protein	氨基氮 (μg/ml) Amino nitrogen	蛋白质 (μg/ml) Protein	氨基氮 (μg/ml) Amino nitrogen
5	1800	960	1800	950
21	7500	3920	7400	3920
28	7600	4560	7680	4550
45	8600	5920	8700	5950
52	9200	6560	9150	6600
69	9660	7620	9680	7600

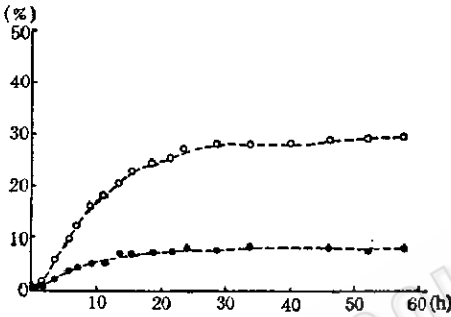


图4 自溶液中蛋白质和氨基酸含量的变化

Fig. 4 Changes in proteins and amino acids concentration (as percentage of total solids) in yeast extract during autolysis

○—○氨基酸 Amino acids
●—●蛋白质 Proteins

降解成氨基酸,然后进入溶液,这是细胞自溶时内含物外释的主要部分。也表明细胞内蛋白酶的分解活动是造成细胞自我消化的主要因子。再从两条曲线的趋向看,两者是平行的,相互间不存在互为消长的关系。

为进一步考察胞外溶液中的酶解情况,作者做了如下试验,即取经过不同自溶时间处理的自溶物离心除去细胞,把液体部分继续置50℃保温2.5h,测定保温处理前后蛋白质和氨基氮两者量上的变化,结果列于表1。

从表1可见,继续保温作用后蛋白质

表2 自溶液中氨基酸含量

Table 2 The yeast extract amino acid composition of 60 h autolysis

氨基酸 Amino acid	含量(%)
Asp	1.50
Thr	1.11
Ser	1.36
Glu	3.03
Gly	0.99
Ala	2.98
Val	2.09
Met	0.75
Ileu	1.83
Leu	2.99
Tyr	1.24
Phe	1.77
Lys	1.60
His	0.49
Trp	0.13
Arg	0.57
Pro	0.74
Cys	0.16

和氨基氮的量均基本未变,没有出现如Hough^[1]报道的两者在胞外存在互为消长的关系。从而证明在本实验的自溶条件下,细胞蛋白质的酶解反应基本上是在胞内进行的。

(四) 溶液中氨基酸组成的分析

表2列出了经过60h保温自溶的离心

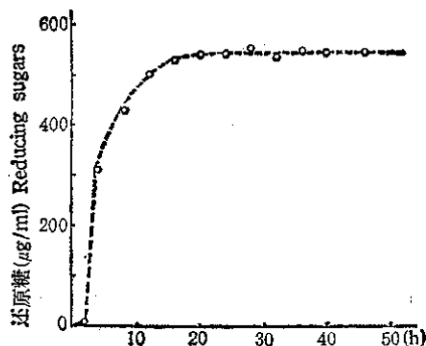


图5 自溶中还原糖的释放曲线

Fig. 5 The amount of reducing sugars released from cell during autolysis

液中氨基酸的种类和百分含量。

(五) 自溶液中还原糖的含量

自溶中的酵母细胞, 在其所含的糖原等多糖化合物被消化利用的同时, 不断有还原糖释出胞外。细胞释放还原糖的曲线(图5)说明, 自溶时胞外溶液中还原糖的量以很快的速度递增, 然后约在 20h 趋于稳定。

(六) 自溶过程中酵母细胞形态的观察

在做上述一系列分析的同时, 还用简便的美蓝染色法, 追踪了酵母细胞在自身的酶解作用下, 内含物被降解外溢时的形态变化。图 6-1 是未经保温自溶处理的正常对照细胞, 细胞基本上未着色, 显示了活细胞氧化还原势强的特征。图 6-2—6 分别为经过 2, 6, 12, 24 和 48h 保温处理的样

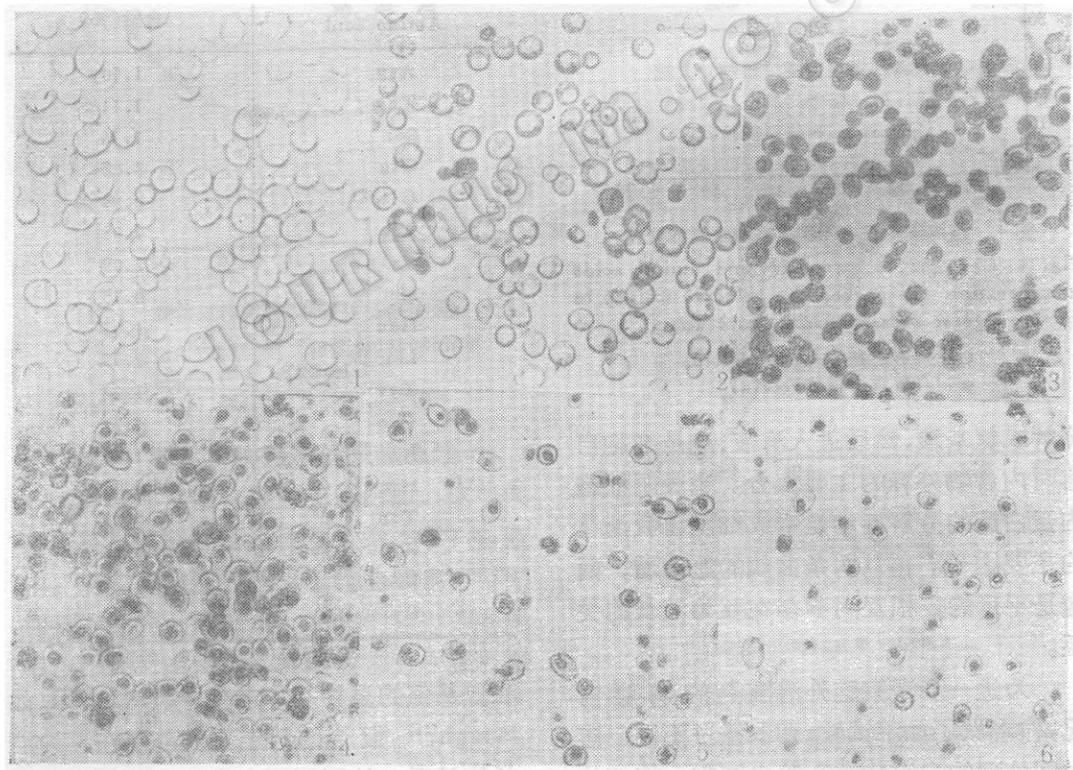


图6 经美蓝染色的酵母细胞的显微照片

1. 未经自溶处理的正常细胞(800 \times)。2—6. 分别为经过 2、6、12、24、48h 保温自溶处理的细胞(800 \times)。

Fig. 6 Micrographs of methylene blue stained yeast cells

1. Normal cells without autolysis treatment. 2—6. Cells with autolysis treatment for 2, 6, 12, 24, 48h respectively.

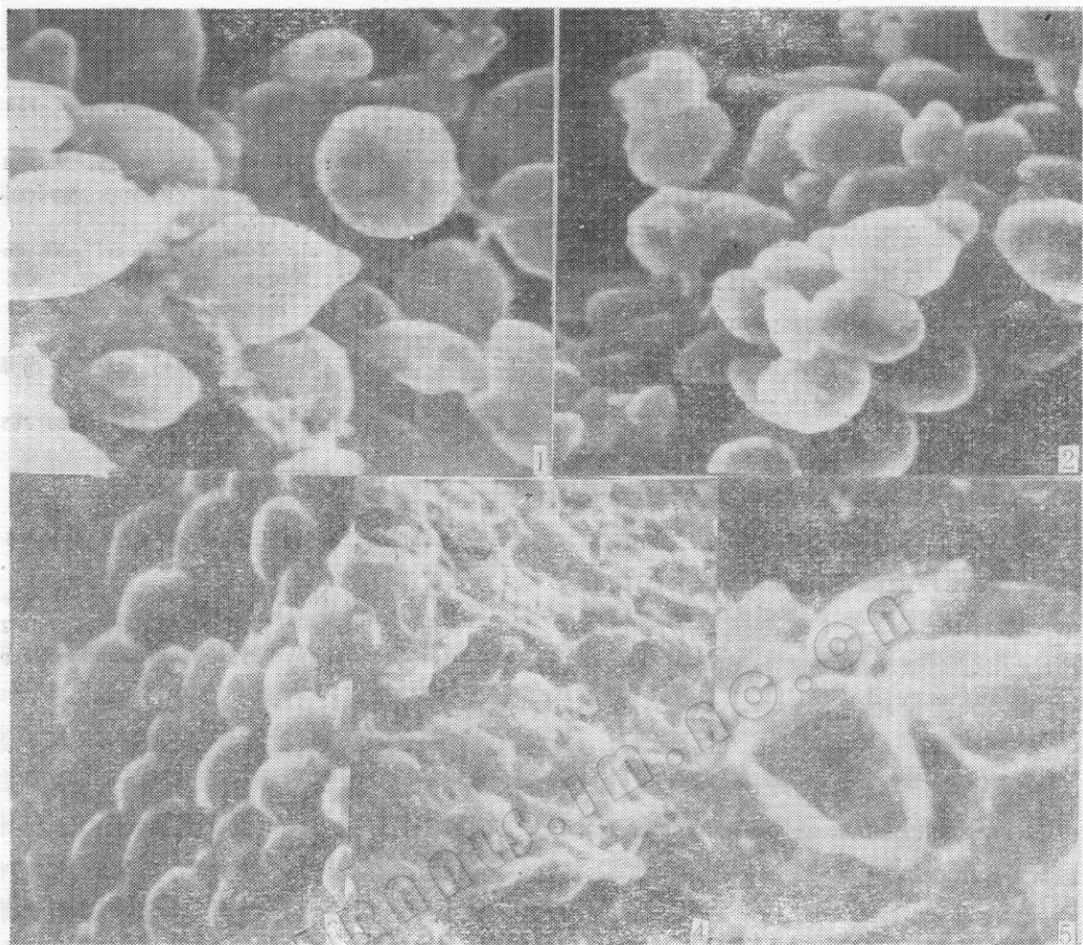


图7 酵母细胞的扫描电镜照片

1. 未经自溶和超声处理的正常细胞 (4500 \times)。2. 未经自溶处理的细胞, 超声波处理 2 分钟 (3000 \times)。3. 自溶 48h, 未经超声处理 (2500 \times)。4—5. 自溶 48h 的细胞, 经超声处理 2min (2000 \times , 5500 \times)。

Fig. 7 Scanning electron micrographs of yeast cells

1. Normal cells without autolytic and sonic treatments. 2. Cells with sonic treatment. 3. Cells with autolytic treatment. 4—5. Cells with autolytic and sonic treatment.

品。可以看到经保温 2h 便有少量细胞着色, 6h 则全部着色, 色浓且布满了整个细胞。表明此时细胞已经死亡, 进入了原生质降解的过程, 这与前面的测定结果, 即此时胞外已有分解产物被释出是相符的。作用 12h 的细胞虽然着色区的覆盖面仍很大, 但颜色却比前者浅多了, 胞内物质浓度下降, 作用 24h 的样品, 胞内着色区明显缩小, 出现了大的空腔, 而至 48h 这种空腔进一步增大。图 6 展示了酵母细胞在自溶处

理中由正常到死亡, 继之胞内组分被分解外溢的过程。从前面的分析数据知道, 这些仍维持着完整轮廓的细胞, 其胞内物质的外溢已达 50%。在探讨此时细胞壁的受损程度时, 作者发现这些经保温处理的细胞对火焰固定十分敏感, 一接触火焰就全部破碎瓦解, 这表明细胞壁至少已部分降解。为进一步证实, 把正常细胞和保温自溶的细胞分别作超声波处理, 观察其对超声波冲击的耐度有无差异。图 7-1 是超

声波处理之前的未经自溶的正常细胞。图 7-2 是超声波处理以后的未经自溶的细胞, 两者并没有形态上的不同, 说明在本实验的超声条件下正常细胞的壁不会破。图 7-3 是自溶 48h 未做超声处理的样品, 可看到细胞仍是完整的, 只是在某些部位有下凹的情况, 这可能是胞内有大的空腔所致。图 7-4, 7-5 分别为经 2min 超声处理后的自溶样品的不同放大倍数的图像。从整体看, 超声处理已将自溶物破碎成细胞匀浆, 从个体看, 细胞已破开, 呈现不同大小的空壳和碎片, 残留的细胞物质外露。说明细胞壁由于自溶酶的降解作用^[12]而大为削弱, 一经超声波的冲击, 细胞就彻底瓦解了。至于在自溶条件下细胞壁分解酶的活动情况和细胞壁精细构造所起的变化, 有待作深入的探讨和研究。

参 考 文 献

[1] Nolf, P.: United States Patent, 1, 012, 147,

1911.
 [2] Neuberg, G. et al.: *Arch. Biochem.*, 43: 191—196, 1942.
 [3] Chiu, C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 132: 361—369, 1967.
 [4] Peppler, H.: *Microbial Technology*, Vol. 1, (ed. Peppler, H. and D. Perlman), Academic Press, N. Y. p. 177, 1979.
 [5] Reed, G. et al.: *Yeast Technology*, AVI Publishing Co., Westport, pp. 355—366, 1973.
 [6] Richmond, M.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 33: 78—101, 1959.
 [7] 朱 俭等编: 《生物化学实验》, 上海科学出版社, 上海, pp. 1—4, 1981.
 [8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
 [9] Folin, O. et al.: *ibid.*, 73: 627, 1927.
 [10] Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, 31: 426, 1959.
 [11] Hough, J. S. et al.: *Process Biochemistry*, 5: 50, 1970.
 [12] Arnold, W. N.: *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics, and Ultrastructure*, Vol. 2, (ed. Arnold, W. N.) CRC Press, Florida, p. 132, 1981.

STUDIES ON AUTOLYSIS PROCESS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BE-11

Jiang Huixiu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* BE-11 at 50°C has been studied by morphological observation of its autolyzing cells as well as measuring the leakage of yeast components and analyzing the released constituents from autolyzed cells. During cell incubation at 50°C in a pH6.0 sodium acetate buffer, after a short delay, there is a rapid release of UV-absorbing materials, amino nitrogen and reducing sugars into the medium

linearly until the loss of cell contents approaches 50% of total cell weight. In contrast with that, the leakage of undegradated cell proteins is not significant. After 48 h autolysis, the yeast cells still maintain their intact cell form, but they are easier to be ruptured by sonic treatment.

Key words

Cell autolysis; *Saccharomyces cerevisiae*