

酵母菌复制衰老过程中絮凝机理分析

安文涛 杨迪 尹亚辉 刘宝祥 曲晶 董亮 赵长新*

(大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

摘要: 【目的】通过对连续传代过程中酵母菌的生理性质和细胞壁蛋白的观察与检测,分析复制衰老过程中酵母菌絮凝变化的原因。【方法】分别采用双向电泳法和红外光谱法对连续传代过程中酵母菌细胞壁蛋白进行检测。【结果】随着酵母菌传代次数的增加,双向电泳图谱上能清晰显示的蛋白质点在增加,同时,红外光谱图中在指纹区 890.51 cm^{-1} 和 808.48 cm^{-1} 处的吸收峰在减弱。【结论】在连续传代过程中,酵母菌细胞壁蛋白质的糖基化修饰程度在减弱,细胞壁表面蛋白质基团发生变化,可能引起细胞壁表面各种力的变化,最终导致酵母菌絮凝加强。

关键词: 酵母菌, 连续传代, 双向电泳, 红外光谱, 细胞壁蛋白, 絮凝

Mechanism analysis of yeast flocculation in the process of replicative aging

AN Wen-Tao YANG Di YIN Ya-Hui LIU Bao-Xiang QU Jing
DONG Liang ZHAO Chang-Xin*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: [Objective] An analysis of the reason for the yeast flocculation in the process of replicative aging by observation and determination to the physiological properties and cell wall proteins was done in the process of yeast continuous subculture. [Methods] 2-D gel electrophoresis method and infrared spectroscopy method were used to detect the protein on yeast cell wall in the process of continuous subculture. [Results] As the process of subculture continued, the number of spots that could be shown clearly in the 2-D gel electrophoresis picture

*通讯作者: Tel: 86-411-86323646; 信箱: zhaochangxin@126.com

收稿日期: 2012-12-20; 接受日期: 2013-03-06

increased. At the same time, the absorption at the wavelength of 890.51 cm^{-1} and 808.48 cm^{-1} decreased in the infrared spectroscopy picture. **[Conclusion]** In the process of yeast continuous subculture, the degree of glycosylation modification is gradually reducing and the protein groups on the yeast cell wall are getting different which brings changes on the strength of cell wall surface to make the flocculation of yeast stronger.

Keywords: Yeast, Continuous subculture, 2-D gel electrophoresis, Infrared spectroscopy, Cell wall protein, Flocculation

细胞衰老机理的研究是生命科学领域的前沿课题,而作为模式微生物的酵母菌则常被用于衰老机制的研究。酵母菌的衰老有两种模式,时序衰老和复制衰老,与此相应酵母菌的寿命也有两种定义方式,即时序寿命和世代寿命,前者指一定条件下单个细胞的存活时间,后者指酵母细胞在死亡之前的分裂次数^[1]。两种衰老情况下,酵母菌的表现有些差距,也有许多共同之处,如代谢能力下降、细胞形态发生变化以及出现絮凝等。

作为一种大规模应用的工业微生物,絮凝一直是酵母菌研究中的热点课题。此前,已经有许多文献对不同情形的酵母絮凝做了描述^[2]。许多研究者认为,酵母菌细胞壁在酵母菌絮凝中起着重要的作用。而在多方面起着重要作用的细胞壁蛋白质在酵母菌的絮凝中发挥着一定的作用。本文试图通过对连续传代过程中酵母菌细胞壁蛋白的观察与分析,了解复制衰老过程中酵母絮凝的变化与原因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) FFC2144, 实验室保藏菌种。

1.1.2 试剂: Tris、DTT (DL-Dithiothreitol, 二硫苏糖醇)、溶菌酶、 β -葡聚糖酶, 美国 Sigma 试剂公司; Protein Molecular Weight Marker, 大连宝生物试剂公司。

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]

propanesulfonate, 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸阿拉丁试剂。

破壁缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.9% NaCl (W/V), 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, 苯甲基磺酰氟), 1 mmol/L EDTA- Na_2 。

SDS 缓冲液: 2% SDS (W/V), 0.9% NaCl (W/V), 0.5 mol/L NaOH。

2-DE 电泳样品裂解液: 8 mol/L 尿素, 1% DTT (W/V), 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS (W/V), 2% 两性电解质 pH 3-10 (V/V)。

平衡液 1: 6 mol/L 尿素, 2% SDS (W/V), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 30%甘油(W/V), 1% DTT (W/V)。

平衡液 2: 6 mol/L 尿素, 2% SDS (W/V), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 30%甘油(W/V), 2%碘乙酰胺(W/V)。

斜面培养基(W/V): PDA 培养基(固体培养基), 20%马铃薯, 2%琼脂, 2%葡萄糖。

发酵培养基(W/V): YPD 培养基(液体培养基), 2%葡萄糖, 2%蛋白胨, 1%酵母膏。

1.2 主要实验仪器

4.5 L 微型发酵罐, 浙江森力科技有限公司; 低温冷冻干燥机, LABCONCO (美国); 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新科仪器有限公司; JSM-6460LV 型扫描电镜, 日本 JEOL; Unic-7200 可见分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器, 常州国华电器

有限公司; 多功能电泳仪, Amersham Bioscience; JM-250 垂直板电泳仪, 大连捷迈科有限公司; 傅立叶变换红外光谱仪 Spectrum One-B, 美国珀金埃尔默公司; JA2003 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌连续传代培养: 将斜面保藏酵母菌经过液体培养二次活化后, 按 5% 的接种量接入 YPD 培养基, 于 4.5 L 微型发酵罐中培养, 培养条件为 30 °C、300 r/min、溶氧 60%。将处于稳定前期的酵母细胞在无菌条件下转接进行液体培养。以第一次发酵罐中转接液体培养的酵母菌为第一发酵批次(Fermentation batches, fb)酵母, 每转接一次酵母代数增加一个发酵批次, 每 48 h 转接一次。

1.3.2 酵母菌生理性质检测: (1) 残糖检测: 发酵液残糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[3]。(2) 菌体密度检测: 可见光分光光度计在 600 nm 波长处, 以离心发酵液为空白样, 取发酵液摇匀后进行吸光度测定^[4]。(3) 菌体絮凝性检测: 取经过反复洗涤的酵母菌体, 用生理盐水配成菌体密度为 $(1-3) \times 10^6$ 个/mL 的悬浊液摇匀。分装到规格一致的玻璃试管(直径 3 cm, 装液 20 mL)中, 每组 10 个, 分装后再次统一摇匀, 竖直静置在试管架上, 每隔 3 min 分别从试管上部取样 4 mL, 在 600 nm 处用分光光度计检测吸光度, 记录 OD 值^[5]。(4) 菌体形态电镜检测: 取每批次培养 20 h 的酵母菌发酵液 5 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀; 洗涤 3-5 次, 然后把洗净的细胞用无菌去离子水稀释到适当的浓度, 涂布在干净的盖玻片上, 冷冻干燥, 在细胞表面镀上氯化金, 使用电子扫描电镜观察细胞形态^[6]。

采用明确絮凝的酵母菌细胞与未絮凝的酵母菌细胞对上述方法进行鉴定, 检测离心、洗涤等操作对酵母菌细胞聚集的影响。

1.3.3 酵母菌胞壁蛋白研究: (1) 酵母菌胞壁蛋白提取纯化: 采用反复冻融和超声波混合破碎法

对酵母细胞进行破壁, 并采用复合酶法提取细胞壁蛋白^[7-8]。将最后得到的细胞壁蛋白置于-80 °C 冰箱保藏备用。(2) 酵母菌胞壁蛋白双向电泳分析: 采用双向电泳的方法^[9]对提取到的酵母菌细胞壁蛋白进行分析^[10-12], 利用凝胶成像系统拍照获取凝胶图像并用 PDQuest 完成图像分析。(3) 酵母菌胞壁蛋白红外光谱分析: 取冻成干粉的酵母菌胞壁蛋白样品 50 mg, 加入 1 g 干燥溴化钾粉末在玛瑙研钵中混匀, 然后取出压片, 在拉曼红外光谱仪上进行扫描分析, 波长范围: 400-4 000 cm^{-1} , 保存图谱进行结构分析^[13-14]。

2 结果与讨论

2.1 连续传代过程中酵母菌生理性质变化分析

2.1.1 连续传代过程中酵母菌残糖和菌密度变化分析: 由图 1 可知, 随着酵母传代次数的增加, 酵母细胞对葡萄糖的代谢能力在逐渐降低, 当培养到 10 个发酵批次时, 与第 2 代酵母菌相比降糖速率略有降低; 当培养到 15 个发酵批次时, 前 20 h 葡萄糖浓度几乎不变, 可见细胞的衰老使得刚转接的酵母菌延滞期增加, 菌体对环境的适应能力下降, 同时 20 h 以后菌体的降糖速率也明显变缓。

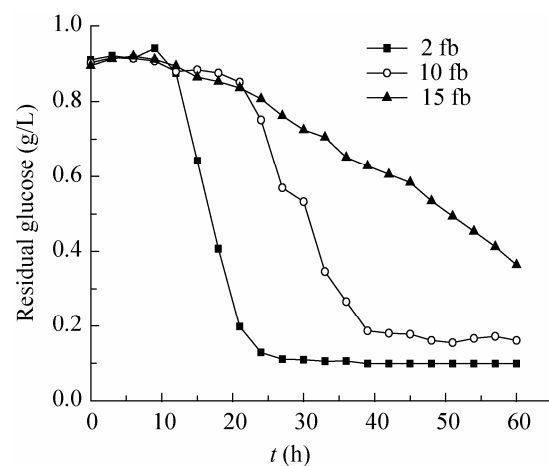


图 1 酿酒酵母 FFC2144 在液体培养基培养过程中残糖的变化曲线

Fig. 1 The residual glucose curve of FFC2144 during fermentation in liquid medium

由图 2 可以看出,随着酵母传代次数的增加,菌体的生长速率有变慢的迹象,稳定期的菌体数目逐渐降低,说明酵母菌的活力在逐渐降低。

2.1.2 连续传代过程中酵母菌絮凝性分析:从图 3 可以看出,随着酵母菌传代次数的增加,酵母菌的絮凝性逐渐增强。引起酵母絮凝性增强的因素可能是由于酵母在传代过程中细胞壁褶皱程度增加,从而增加了细胞与细胞表面的附着力,促进了细胞的聚集,导致絮凝速率加快。

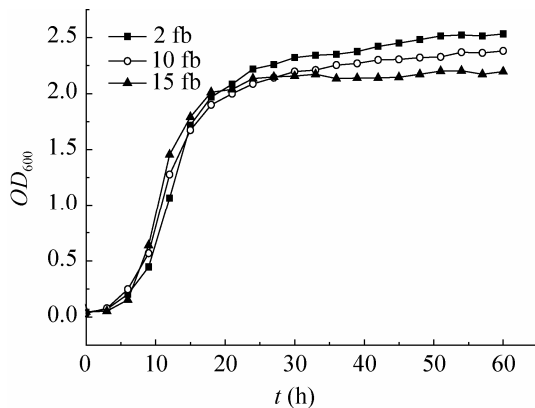


图 2 酿酒酵母 FFC2144 在液体培养基培养过程中菌体浓度变化曲线

Fig. 2 The cell concentration curve of FFC2144 during fermentation in liquid medium

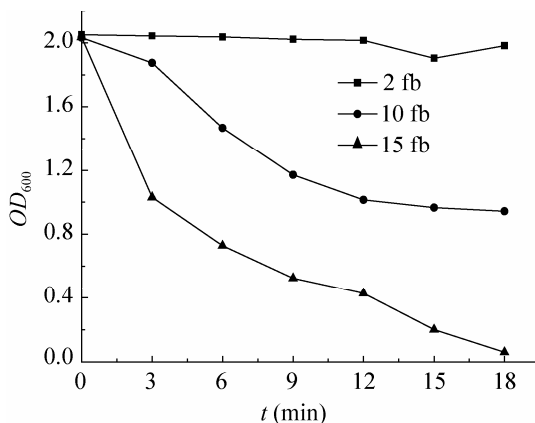


图 3 酿酒酵母 FFC2144 絮凝曲线

Fig. 3 The flocculation curve of FFC2144

2.1.3 连续传代过程中酵母菌形态电镜分析:从图 4 电镜图中可以看出,传代次数不同的酵母菌细胞形态差异很大。对比图 4 中 A、B 可以看出,第 2 个发酵批次酵母菌在电镜下为一个一个的单细胞状态,细胞与细胞之间没有相互附着现象,而第 10 个发酵批次酵母菌中有许多细胞聚集在一起成团,有个别的细胞还是单细胞状态。由图 4 C、D 能更加清楚的看到酵母菌连续传代之后絮凝成团现象。同时也表明,本文中对发酵液的后处理手段并没有对酵母菌的絮凝聚集产生大的影响,酵母菌的絮凝仍然能够通过电镜观察到。

2.2 连续传代过程中酵母菌胞壁蛋白变化分析

2.2.1 连续传代过程中酵母菌胞壁蛋白双向电泳分析:从图 5 可以看出,酵母菌细胞壁蛋白质分子量主要集中在 44.3–20.1 kD 之间,蛋白质等电点分布较广,但在 PI 5–8 之间分布最多。随着酵母菌传代次数增加,酵母菌细胞壁蛋白双向电泳图谱上可以清晰分辨的蛋白质点数逐渐增多,由此可知,在酵母菌连续传代过程中,细胞壁蛋白质发生了很大的变化。

第 1 个发酵批次酵母菌细胞壁蛋白质通过双向电泳得到的蛋白质点数稀少,只有 20 多个,而且都比较模糊,第 10 个发酵批次酵母菌细胞壁蛋白质点数与第 1 个发酵批次酵母菌相比比较清晰,且蛋白质点数比较多。第 15 个发酵批次酵母菌细胞壁蛋白质点非常清晰,可以分辨的蛋白质点数多达 50 多个。

细胞壁蛋白都是高度糖基化的,一般蛋白质在糖基化、磷酸化等修饰之后都会对电泳后续的染色过程产生较大影响。因此当酵母菌的清晰蛋白质点逐渐增多时,可知在连续传代过程中细胞壁蛋白质的糖基化修饰程度逐渐降低,这有利于染料和蛋白质的结合,所以蛋白质点能很好的染色显示出来。

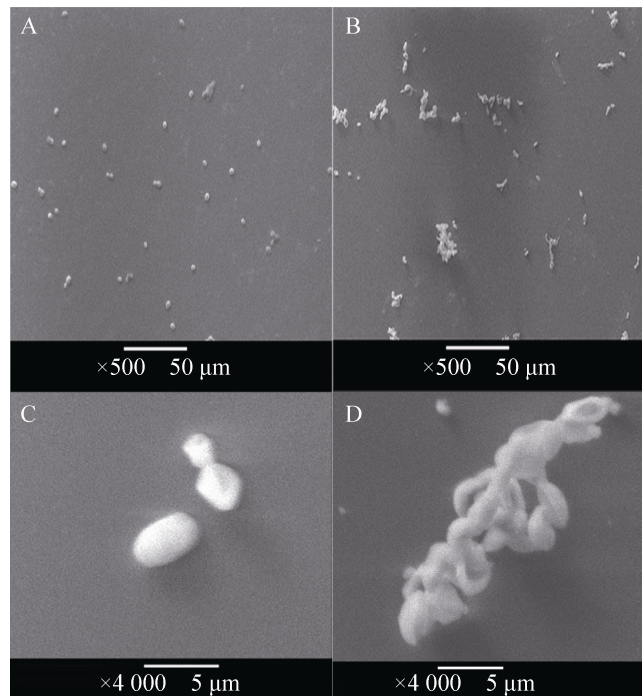


图 4 不同发酵批次酿酒酵母 FFC2144 电镜图

Fig. 4 Electron micrograph photograph for different fermentation batches of FFC2144

注: A, C: 第 2 批次酵母; B, D: 第 10 批次酵母.

Note: A, C: The second fermentation batch yeast; B, D: The tenth fermentation batch yeast.

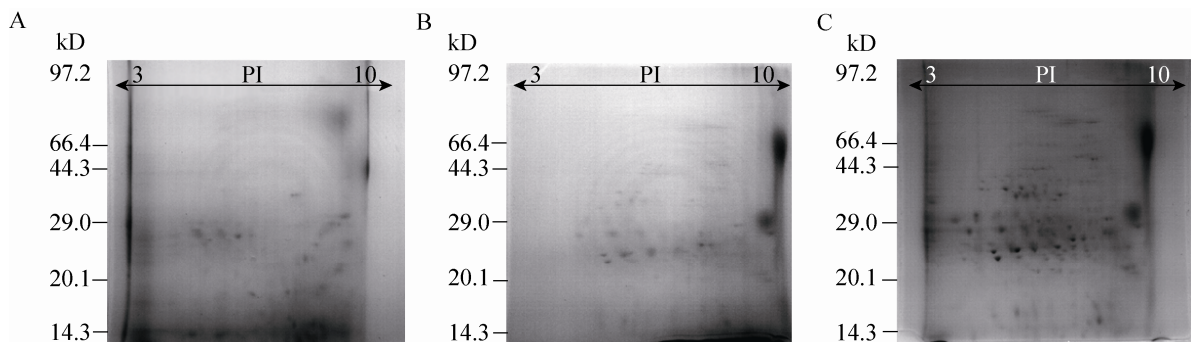


图 5 不同发酵批次酵母细胞壁蛋白双向电泳图谱

Fig. 5 Two-dimensional gel electrophoresis analysis of yeast wall proteins of different fermentation batches

注: A: 第 1 发酵批次酵母菌; B: 第 10 发酵批次酵母菌; C: 第 15 发酵批次酵母菌.

Note: A: The first fermentation batch; B: The tenth fermentation batch; C: The fifteenth fermentation batch.

2.2.2 连续传代过程中酵母菌胞壁蛋白红外光谱分析: 对不同传代次数细胞壁蛋白进行了红外图谱分析, 红外吸收光谱结果如图 6 所示。

从图 6 和表 1 中可以看出, 酵母菌细胞壁蛋白在 3367.23 cm^{-1} 处有很强的特征吸收峰, 为

C-H 分子内或分子间伸缩振动。在 2923.56 cm^{-1} 处有较强的吸收峰, 说明甘露糖链中有较多的甲基和亚甲基, 也说明了甘露糖分子链较长, 分子量很大。在 1657.82 cm^{-1} 处的吸收峰说明多糖中还含有大量的酰胺基, 为 O-和 N-糖苷键。在

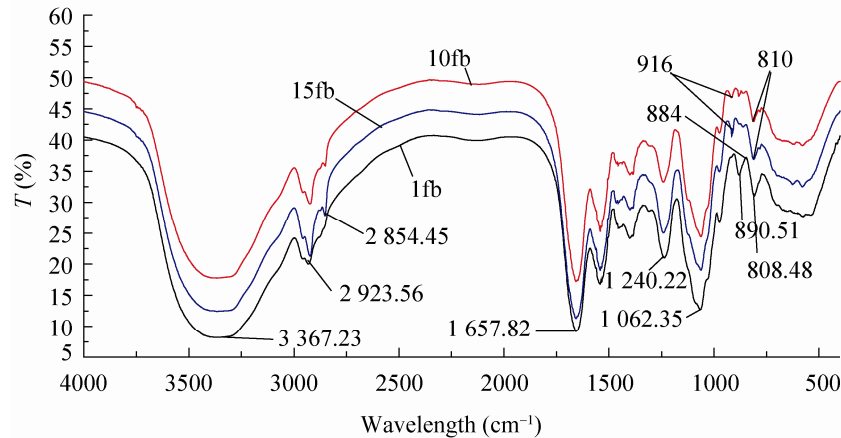


图 6 不同发酵批次酵母细胞壁蛋白红外图谱

Fig. 6 IR spectrum of yeast cell wall proteins of different fermentation batches

表 1 糖类物质红外特征吸收基团
Table 1 Infrared characteristic absorption of carbohydrate groups

吸收波段 Absorption wavelength (cm ⁻¹)	特征基团 Characteristic groups	吸收波段 Absorption wavelength (cm ⁻¹)	特征基团 Characteristic groups
3 600–3 200	C-H 分子内或分子间伸缩振动	2 950–2 830	伯酰胺键弱双吸收峰
3 200–2 800	C-H 伸缩振动	1 633±10	乙酰基的酰胺基吸收峰
1 700–1 400	C=O、C=C 伸缩振动	844±8	A-型 C-H 变角振动吸收峰
1 400–1 200	C-H 变角振动	891±7	B-型 C-H 变角振动吸收峰
1 200–1 000	C-O-H 和吡喃糖环的 C-O-C 的伸缩振动		
2 930–2 850	亚甲基弱吸收峰		

1 700–1 400 cm⁻¹波段的吸收峰是糖链中 C=C、C=O 键的特征吸收。在指纹区 890.51 cm⁻¹和 808.48 cm⁻¹处的吸收峰进一步证明是 β-D-吡喃结构。在 844 cm⁻¹处没有强吸收峰说明糖链中 α-型糖苷键很少。

综上所述,酵母菌细胞壁蛋白糖链中单糖主要以 β-型糖苷键相连接。第 1 个发酵批次酵母菌细胞壁蛋白在 890 cm⁻¹和 808 cm⁻¹有糖基的特征吸收,随着传代次数增加到第 10 个发酵批次和第 15 个发酵批次酵母菌时,在 890 cm⁻¹处已经没有特征吸收,在 808 cm⁻¹处吸收也逐渐减弱,说明在连续传代过程中,酵母菌细胞壁蛋白糖基化修饰强度减弱。这也进一步验证了双向电泳蛋白质点在酵母菌连续传代过程中清晰度增加的原理推断。

论推断。

糖基化修饰程度的降低使得大量蛋白质在酵母菌细胞表面裸露,这对细胞表面张力的维持起到了一定的负作用。之前在不同蛋白质、糖链之间维持的电荷力、氢键以及范德华力等遭到破坏,裸露出的蛋白质与其它蛋白质等大分子之间形成了新的电荷力、氢键和范德华力等。这种改变是由裸露出的蛋白质的电荷、分子性质以及所处位置所造成的。这种改变使得之前光滑的细胞形状遭到破坏,细胞表面变得褶皱。

3 结论

经过实验发现,酵母菌在连续传代过程中,菌体对糖的代谢速率变慢,菌体活力不断下降,

酵母絮凝程度加强, 这是典型的酵母菌复制衰老的表现。同时, 酵母菌细胞壁蛋白质的糖基化修饰在逐渐减少, 这种情况除了对酵母絮凝的影响外, 还可能对酵母菌的胞外信号传导产生影响, 对酵母菌的群体遗传与繁殖产生作用, 这需要更进一步的实验研究。

参 考 文 献

- [1] 张爱利. 酿酒酵母衰老机制研究进展[J]. 生命科学, 2009, 21(2): 303-306.
- [2] 栾静, 赵长新. 酵母提前絮凝的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 139-142.
- [3] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426-428.
- [4] Insenser MR, Hernandez ML, Nombela C, et al. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins[J]. Journal of Proteomics, 2010, 73: 1183-1195.
- [5] Smart KA, Whisker S. Effect of serial repitching on the fermentation properties and condition of brewing yeast[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1996, 54: 41-44.
- [6] 黄晓红, 张奇亚. 扫描电镜细胞样品制备方法的改进[J]. 电子显微学报, 2003, 22(6): 671-672.
- [7] Holbrook ED, Edwards JA, Youselff BH, et al. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10: 1929-1943.
- [8] Elorza MV, Amelia M, Rafael S. Dimorphism in candida albicans: Contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls[J]. Journal of General Microbiology, 1985(131): 2209-2216.
- [9] 王祥余, 朴永哲, 翟明昌, 等. 酿酒酵母 FFC2146 胞内蛋白及胞外蛋白双向电泳条件优化及图谱建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 270-274.
- [10] Nissen P, Arneborg N. Characterizaion of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Archives of Microbiology, 2003, 180: 257-263.
- [11] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis[J]. The Journal of Biological Chemierty, 1975, 62: 4007-4021.
- [12] Shi LB, Berg S, Lee A, et al. The carboxy terminus of EmbC from *Mycobacterium smegmatis* mediates chain length extension of the Arabinan in lipoarabinomannan[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(28): 19512-19526.
- [13] 赵颖, 罗璇, 钟晓凌. 红酵母细胞壁中几丁质及壳聚糖的红外光谱研究[J]. 红外, 2007, 11: 20-24.
- [14] 张声俊. 红外光谱法对冬虫夏草的三级鉴定和研究[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(3): 230-234.