

不同方法对酵母细胞膜通透性的影响

刘晓艳^{1,2}, 丘泰球¹, 黄卓烈³

(1 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 2 仲恺农业技术学院 食品科学系, 广东 广州 510225;
3 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:通过测定超声处理前后发酵液中核酸、蛋白质及1,6-二磷酸果糖(FDP)浓度的变化,研究了功率超声及有机溶剂对酵母细胞膜通透性的影响。结果表明随着超声作用时间的增加,功率为600、500、400 W的处理都使胞内核酸、蛋白质及FDP的渗出浓度逐渐提高,其中,600 W超声的作用最为明显。超声处理后,细胞的存活率都逐渐减小,即细胞的破碎程度增大。其中,随着超声作用时间的延长,600 W的超声使细胞存活率下降最快,500 W超声次之,400 W超声使细胞的存活率下降最慢。有机溶剂中,甲苯和氯仿对胞内物质的渗出率影响非常大,但甲苯和氯仿对细胞的损伤非常严重。乙醚对细胞的存活率影响不大。

关键词:超声; 有机溶剂; 细胞膜; 通透性

中图分类号:Q272

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)01-0074-03

Effects of different treatments on yeast cell membrane permeability

LIU Xiao-yan^{1,2}, QIU Tai-qi¹, HUANG Zhuo-lie³

(1 College of Food & Biological Engineering, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640, China;

2 Dept. of Food Science, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China;

3 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:In this project, the effect of ultrasounding treatment with three sorts of organic solvents on yeast cell membrane permeability was studied, by measuring the concentration of nucleic acid, protein and fructose-1,6-diphosphate (FDP) before and after the treatment. The result showed that by increasing the effective time, the concentration of nucleic acid, protein and FDP in the broth increased gradually after ultrasound treatment with power of 600, 500 and 400 W, the most notable effect being achieved by 600 W ultrasounding. After treatment with those ultrasounds, the livability of cells decreased. That was to say, the number of disintegrated cells increased. With the extension of effective time, livability decreased most quickly when applying 600 W, then 500 W and 400 W. Among organic solvents, toluol and chloroform affected exudation from the cell very much, but damage the cell severely. Aether has little influence on the cell livability.

Key words:ultrasound; organic solvent; membrane; permeability

细胞膜的重要功能之一是选择通透性。通过选择性地通透,细胞能接受或拒绝,保留或排出某种物质^[1]。人为地改变细胞膜的通透性,可以改变原料的输入或代谢产物的排出速率,以利于代谢产物在细胞外(培养基中)的积累,使代谢朝着人们希望的方向进行,是实现代谢人工调控的重要方法之一。因此细胞膜对代谢产物的通透性在发酵工业是一个十分

重要的问题。目前应用较为广泛的是化学法。其缺点是效率低,胞内物质释放率低,处理时间长,试剂用量大,成本高,同时后处理也不便。且由于化学试剂的毒性,进一步分离时需用透析等方法除去^[2]。有报道认为低频超声的空化作用可以导致细胞的非热生物效应,使细胞膜短时局部破裂,从而改变细胞质膜的通透性,使胞内物质释放或胞外物质进入细胞

内^[3]. 本试验通过测定处理前后胞内核酸、蛋白质、FDP在发酵液中浓度的变化,研究了超声处理及化学方法处理前后细胞膜通透性的变化. 另外,通过次甲基蓝染色法来检验细胞的存活率. 本试验旨在比较2种方法对细胞膜通透性影响的不同.

1 材料与方法

1.1 材料

啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*. 培养基:葡萄糖 0.55 mol/L,磷酸氢钠 0.2 mol/L,磷酸二氢钠 0.2 mol/L,氯化镁 0.01 mol/L. 121 °C灭菌 20 min.

1.2 方法

1.2.1 培养条件 将酵母接种到培养基中,置于转速 120 r/min 的摇床上,37.5~38.5 °C下培养 1 h.

1.2.2 超声处理 将发酵液放置于冰水浴中,用超声处理. 将处理后的发酵液继续发酵 2 h. 发酵完毕后,取 20 mL 发酵液于 80 °C 的水浴中灭酶,剩余部分置于冰箱中备用(测细胞染色率). 以未经超声处理的瓶为对照. 每组试验平行 3 次,结果取平均值.

超声的作用参数:频率 20~25 kHz,功率分别为 600、500、400 W,超声的作用时间为每次 3 s,间隔时间为 4 s,作用的总时间分别为 0、90、135、180、225、270 s.

1.2.3 化学方法处理 向发酵液中分别加入甲苯、氯仿、乙醚. 有机溶剂在发酵液中的体积分数分别为 1%、2%、3%、4%、5%. 继续发酵 2 h 后,取 20 mL 发酵液于 80 °C 的水浴中灭酶,剩余部分置于冰箱中备用(测细胞存活率). 以不加入有机溶剂的处理为对照. 每组试验平行 3 次,结果取平均值.

1.2.4 测试方法 FDP测定按文献[4]方法进行.

核酸与蛋白质的测定:分别在 260 和 280 nm 波长下,测定发酵液的光吸收值.

核酸提高率 = [(处理后发酵液的光吸收值/未处理发酵液的光吸收值) - 1] × 100%.

细胞存活率的测定:取未经灭酶的发酵液 0.5 mL,用 9 g/L 的生理盐水稀释 100 倍后,用次甲基蓝染色 5 min,用血球计数板计数,计算出细胞的存活率.

酵母存活率 = [1 - (染色细胞总数/酵母细胞总数)] × 100%.

2 结果

2.1 不同功率的超声对细胞膜通透性的影响

由图 1~3 可知,随着超声作用时间的增加,不同功率的超声都使胞内核酸、蛋白质及 FDP 的渗出浓度逐渐提高. 其中,600 W 超声的作用最为明显,500 W 次之,400 W 最差. 综合图 1~3,超声的作用

时间在 135 s 以内时,核酸、蛋白质及 FDP 的渗出浓度的增幅不很明显,在 225 s 左右,胞外的核酸、蛋白质、FDP 的测定值增加较快.

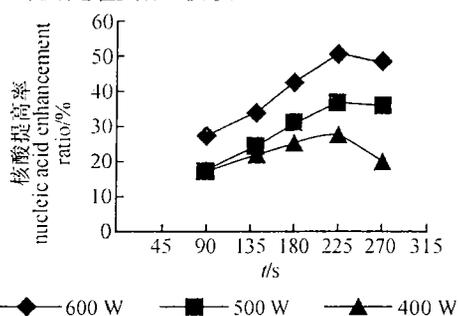


图 1 超声对核酸渗透的影响

Fig. 1 Effect of ultrasound on the permeation of nucleic acid

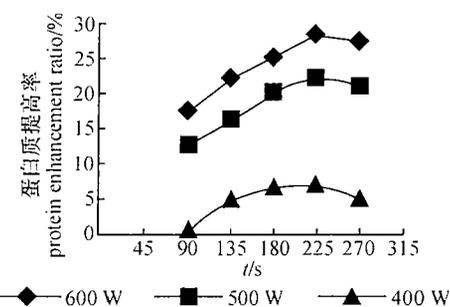


图 2 超声对蛋白质渗透的影响

Fig. 2 Effect of ultrasound on the permeation of protein

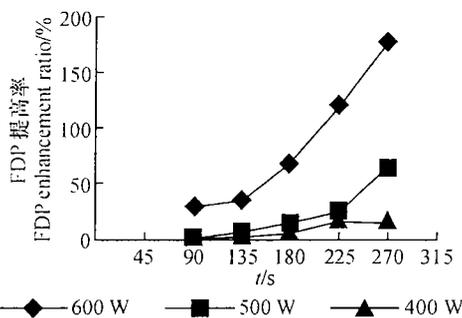


图 3 超声对 FDP 渗透的影响

Fig. 3 Effect of ultrasound on the permeation of FDP

由图 4 可知,随着超声作用时间的增加,细胞的存活率都逐渐减小,600 W 的超声使细胞存活率下降最快,500 W 次之,400 W 超声使细胞存活率下降最慢. 也就是说,400 W 超声对细胞的活性影响最小,600 W 超声对细胞的活性影响最大.

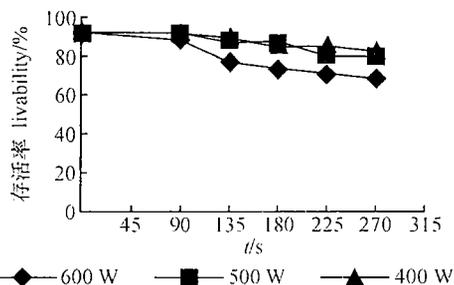


图 4 超声对细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasound on the livability of yeast cells

2.2 化学方法对细胞膜通透性的影响

由图5~7可知,经甲苯处理后,胞外核酸、蛋白质及 FDP 浓度的最大增加量分别为 40.2%、29.8%、955.0%,经氯仿处理后,胞外核酸、蛋白质及 FDP 浓度的最大增加量分别达到 29.8%、13.6%、759.0%。也就是说,经甲苯、氯仿处理后,发酵液中核酸、蛋白质浓度都有一定的增加。同时试验发现,体积分数低至 1% 的甲苯、氯仿处理后,细胞的存活率即几乎为 0。即甲苯和氯仿对胞内物质的渗出率影响很大,但甲苯和氯仿对细胞的损伤很严重。乙醚对细胞存活率影响不大,但由图5~7可知,经乙醚处理后,核酸、蛋白质及 FDP 的透过率最大分别为 18.6%、10.8%、139.0%,比甲苯、氯仿小很多。

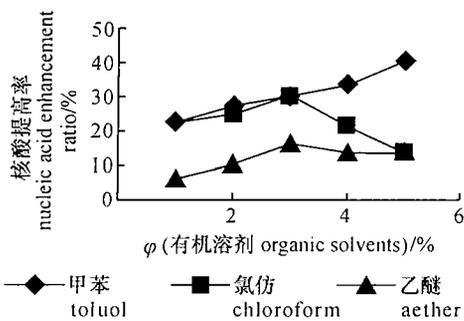


图5 有机溶剂对核酸渗透的影响

Fig. 5 Effect of organic solvents on the permeation of nucleic acid

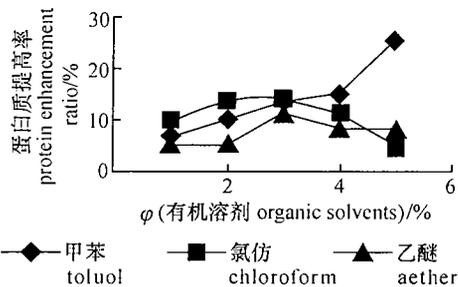


图6 有机溶剂对蛋白质渗透的影响

Fig. 6 Effect of organic solvents on the permeation of protein

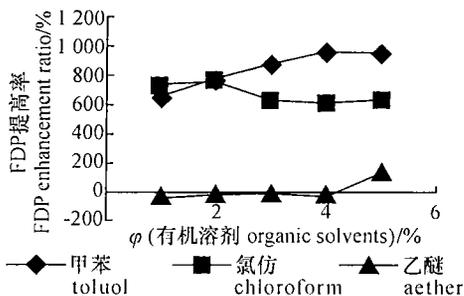


图7 有机溶剂对FDP渗透的影响

Fig. 7 Effect of organic solvents on the permeation of FDP

3 讨论

超声对细胞通透性影响的机理还不太清楚,但一般认为有以下2种可能。第一,超声引发的空化泡破裂时产生的高压与高温冲击波可能导致局部细胞

质膜破裂,在细胞质膜复原以前,就有可能释放胞内产物,从而造成通透性提高。第二,由 Zimmermann^[5] 等的电场机制模型发展而来,在超声作用下,细胞膜内流体静压力足够高以至于引发细胞膜的机械破裂。总之超声击穿细胞导致通透性增大的现象发生有可能是瞬态空化泡破裂时或稳态空化泡变化大小时产生的高压诱导膜的机械破裂;也许上述2种可能性同时存在导致细胞膜的机械破裂^[6]。本试验采用的容器口径大小一致,因而,功率的大小直接对应声强的大小。一般来说,在一定范围内,提高超声强度会使空化效应增强。因此,在本试验中,表现出功率越大,细胞的通透性增大的幅度也越大。但过高的声强也可能造成细胞的崩解,因而细胞的存活率下降。

有机溶剂中,甲苯和氯仿对胞内物质的渗出率影响非常大,但甲苯和氯仿对细胞的损伤非常严重。乙醚对细胞的存活率影响不太大,它对细胞的通透性影响比甲苯、氯仿小很多。有机溶剂提高了细胞膜通透性,一般认为是有机溶剂溶解了细胞膜上的磷脂层,从而改变了细胞膜的结构,使胞内物质释放。

将化学法与超声法进行比较,可以发现,超声法和化学法都对细胞膜的通透性产生影响,对细胞的存活率也有影响,一些化学试剂如甲苯,氯仿对细胞膜的通透性改变很大,但同时细胞的损伤也很大,经这2种化学试剂处理后,细胞几乎全部死亡。适当参数的超声可以在一定程度上改变细胞膜通透性,而且对细胞的存活率影响不太大,显示出超声处理提高细胞膜的通透性有实际应用的潜力。

通过比较,可以发现FDP的曲线变化比核酸、蛋白质明显。这可能是因为FDP的相对分子质量比核酸、蛋白质要小得多,因而比核酸、蛋白质更容易透过细胞膜。

参考文献:

- [1] 大连轻工业学院. 生物化学[M]. 北京:轻工业出版社, 1980. 492.
- [2] 段学辉,叶勤,张嗣良. 啤酒酵母的通透性对ATP生产活性的影响[J]. 华东理工大学学报, 2000,26(1):33-36.
- [3] DOUGLAS L M, SHIPING B, JAMES E M. Sonoporation of cultured cell in the rotating tube exposure system[J]. *Ultrasound in Med & Biol*, 1999,25(1):143-149.
- [4] 范贵增,熊占,熊国真,等. 发酵液中1,6-二磷酸果糖含量的测定[J]. 江西科学,1998,16(1):21-25.
- [5] ZIMMERMANN U, SCHNITZLER G, SCHNEIDER M, et al. Monolayer adsorption and thin film growth of big aromatic molecules on Si(III) [J]. *Biophys*, 1990,(14):881-899.
- [6] 丁志山,沃兴德. 超声波的生物学效用及其在转基因中应用[J]. 生命科学,1997,9(4):187-189.

【责任编辑 柴 焰】