



酵母菌细胞的超微结构及其功能

张伟心 杨启瑞

(河北大学生物系,保定)

近年来,由于细胞分离技术的进步,可以从细胞中分离出各种细胞器;由于电子显微镜技术的发展,逐步查明了各种细胞器的超微结构。同时,细胞化学,放射自显影术,元素分析等方法与电子显微镜技术的结合,使我们得以探索各类物质在细胞内的分布状况。

各种细胞器在细胞中彼此保持着联系,共同维持细胞的生命活动。它们的结构与功能存在着密切关系。本文着重介绍酵母菌细胞中的微体和线粒体的超微结构与功能,以及环境对它们的影响。

微体^[1]

一、一般特征

微体是酵母菌细胞质中的细胞器,外面有一层单位膜,内含富集的颗粒,并有 DNA。如假丝酵母(*Candida*)的微体直径约 $0.3\mu\text{m}$,被一层 7 nm 厚的单位膜包围着(见图版 I-1)。

以葡萄糖为碳源时,一般酵母菌细胞内几乎观察不到微体,即使同化烷烃的假丝酵母,也只产生少数微体。但用正烷烃培养假丝酵母,在 8 小时适应期时即出现微体,16 小时对数期微体即充满细胞内,直至稳定期(46 小时)亦不见减少。在适应期,细胞几乎不增殖,但微体迅速增加,而且此时过氧化氢酶活性与微体数目增加相平行。有人用不同的烷烃进行实验,证明烷烃碳链长度不影响微体数目、大小及过氧化氢酶的活性^[2]。用甲醇为碳源培养克勒克氏酵母属(*Kloeckera*)和汉逊氏酵母属(*Hansenula*)的细胞,微体较用正烷烃培养时要大,且其基质中有结晶物(图版 I-2)。

微体以分裂方式增殖。在培养 6—8 小时的细胞内,可见长轴长达 $1\mu\text{m}$ 以上的微体,还可见到有横隔的微体。而且不管细胞内的空间是否充分,微体多相邻存在。这些现象表明微体是通过分裂增殖的。还有人认为微体是由内质网产生的小泡形成的。

二、微体的分离

从酵母菌中分离微体是困难的,尚未见到完全分离微体的报告。一般是用酶处理细胞制备成原生质球,然后制成匀浆。先以 $3500\times g$ 离心得到细胞碎片,以 $10000\times g$ 离心得到混有约 5% 微体的线粒体,最后以 $20000\times g$ 离心得到混有 2—5% 线粒体的粗微体制剂。再以蔗糖密度梯度离心法, $64000\times g$ 离心 4 小时,即可得到较纯的微体。酵母菌微体内的部分物质可因离心而失去,在电镜下观察时,基质的电子密度下降。因此分离操作应在短时间内完成。电镜观察时样品的制备也要特别小心。

三、微体的功能

微体的出现与培养基中存在甲醇,正烷烃等有密切关系,但微体在这些碳源的代谢中起什么作用还不完全清楚。

用细胞化学的方法证明,有甲醇时形成的微体,含有过氧化氢酶、D-氨基酸氧化酶,醇脱氢酶等。D-氨基酸氧化酶催化 D-氨基酸脱下的氢直接与分子氧结合生成过氧化氢,然后在过氧化氢酶催化下分解为水和氧气。醇脱氢酶催化甲醇和氧生成过氧化氢,当它分解时,又立即氧化另一分子甲醇。甲醇氧化成甲醛,甲醛又被甲醛脱氢酶、甲酸脱氢酶催化,最终氧化成

CO₂。这两种酶存在于细胞质中,因此可认为微体是甲醇初级氧化的场所。

在以正烷烃培养的酵母菌的微体中,除含有过氧化氢酶外,还有乙醛酸循环中的酶(如柠檬酸裂解酶,苹果酸合成酶等)以及D-氨基酸氧化酶和脂肪酸的 β -氧化酶系。但是它不含与正烷烃初级氧化有关的细胞色素p-450和NADPH-细胞色素C氧化酶。这些酶存在于微粒体中^[1]。因此一般认为正烷烃是在微粒体中完成初级氧化,生成高级脂肪酸,然后在微体中分解成乙酰辅酶A,大部分经过乙醛酸循环进入生糖体系。在脂肪酸 β -氧化体系中,由脂肪酰辅酶A脱氢酶(FAD酶)催化生成H₂O₂,被微体中的过氧化氢酶催化分解。因此认为,微体间接地和烷烃的初级氧化有关。

四、微体在细胞中的生物学地位

微体和线粒体一样,其中含有自身独具的DNA,每mg微体蛋白质,约含有5 μ g DNA。³H-胸苷或³H-腺嘌呤可掺入微体DNA中。用电子显微镜观察从微体中游离的DNA分子,可见到两个游离端,因此估计它是线状分子,它和核染色质及线粒体DNA分子的形状不同。而且用氯化铯密度梯度离心法测定,微体DNA比核DNA轻,比线粒体DNA重。因此,人们认为微体和线粒体一样,作为一种独立的细胞器官而处于半自主繁殖的地位。

用正烷烃为碳源培养的酵母菌中,D-氨基酸氧化酶存在于微体中,而以葡萄糖为碳源时却存在于线粒体中。在后一情况下,葡萄糖抑制微体形成。因此有人推测酵母菌细胞中本来微体和线粒体是共存的。微体不形成时,其功能由线粒体承担。这两种细胞器在细胞内维持着相关性,由核调节它们完成共同的生理功能。

线粒体^[4,5]

一、一般特性

酵母菌线粒体的直径一般为0.3—0.5 μ m,比动物的线粒体小,但基本结构相同。其特点是内膜内凹形成的嵴偏向基质中央。在非发酵

型的胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*),在呼吸活性高的时期,可看到非常发达的线粒体(图版I-3)。

根据吸收光谱曲线,可知其中含有细胞色素a、b和c。用氯化铯密度梯度离心法分离线粒体DNA。由浮力密度测定可知,它的DNA比核DNA要轻。不同种的酵母菌,其线粒体DNA的浮力密度相差不大。一般认为酵母菌线粒体DNA是长度为25 μ m的环状结构。线粒体DNA在整个细胞DNA中的百分数因细胞生长期而异。如啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),在生长对数期占总DNA量的6%,在稳定期占14%。这个比例比其它物种要大。

二、线粒体的形成

用电子显微镜观察厌氧条件下培养的酵母菌,其呼吸能力显著减弱,没有看到好氧培养时那样典型的线粒体。但观察到被异常单位膜包围的前线粒体。因为细胞质中有核区,又有线粒体DNA的纤维,所以可以确定它是线粒体结构。如使这种细胞在有氧环境中适应5—10分钟,前线粒体发展成有双层单位膜的嵴形线粒体。120分钟后,即发育成为有发达的嵴的成熟的线粒体。同时其中也合成了细胞色素a、b和c。这种线粒体的呼吸功能很强。

在呼吸缺陷型菌株的细胞中,线粒体的嵴结构异常。但嵴形线粒体结构仍可通过上述相同过程正常形成(图版I-4)。

这些事实表明,嵴形线粒体的形成与呼吸作用和氧化磷酸化无关,线粒体DNA所携带的信息也和上述两种过程无直接关系。另外,从正常菌具有呼吸适应现象中,推测在线粒体形成以前,存在着线粒体以外的氧的感受系统。这个问题目前尚未解决。

在有氧而又含高浓度葡萄糖的条件下培养的酵母菌,由于葡萄糖分解代谢产物引起的呼吸抑制作用,呼吸系统的酶活性降低,氧化磷酸化的能力减弱。此时,线粒体的发育受到阻遏,细胞内线粒体数目减少,而且几乎不存在完整

形态的线粒体。尤其是线粒体内膜发育不好。线粒体进行蛋白质合成的能力也低。当这种阻遏作用被解除时,线粒体数目即增加,且出现完整的形态。因此认为阻遏时只是线粒体发生解体,而去除阻遏时则发生装配。有人指出,对于线粒体的发育,去除阻遏是最重要的。

抗生素如氯霉素、放线菌酮、杀稻瘟素 S 等可抑制蛋白质合成。在含上述抗生素的培养基中,使啤酒酵母进行呼吸适应,发现其呼吸能力不能恢复,线粒体成为无嵴状态,或者仅略有分化,而看不到单位膜结构。因此,无论抑制线粒体蛋白质合成或细胞质中其它蛋白质合成,都会影响线粒体的正常发育。0.4% α -苯乙醇对清酒酵母也有类似的作用。还有人指出,2,6-二氨基嘌呤可抑制酵母菌线粒体蛋白质合成,而且高浓度时可引起线粒体突变。

在含抑制核酸合成的腐草霉素的培养基中(40 $\mu\text{g/ml}$),啤酒酵母平均分裂 2.5 次即停止分裂,同时停止 DNA 合成。但此时线粒体的数目增加了。从电子显微镜照片看,线粒体较正常情况下大一倍,每个细胞的呼吸活性平均可提高二倍。线粒体中细胞色素 c 正常地合成,但经常可见形态异常的线粒体,不过嵴的发育良好。由此可知,即使核停止合成,线粒体却仍能分裂。这可能由于线粒体 DNA 是周期地在一定时间合成的。

酵母菌的细胞表面结构

用不同碳源培养的酵母菌,其细胞表面结构会有所不同。将可以利用正烷烃的酵母菌先在麦芽糖培养基上培养 22 小时后,用扫描电镜观察其细胞,可见它们是椭圆形,表面粗糙。当

把这些细胞移入含正烷烃的培养基中培养时,在细胞表面可见疣状突起(图版 I-6)。但若移入含葡萄糖的培养基中,则看不到这种疣状突起(图版 I-5)。不能利用正烷烃的酵母菌,其细胞表面也没有这种疣状突起。由此可见,疣状结构与正烷烃的利用有关。进一步用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)研究,发现当把它们在含正烷烃的培养基中培养时,子细胞开始伸长,16 小时以后长成丝状,在其表面长出长约 200nm 的疣状突起。然而当 48 小时后培养基中正烷烃含量很少时,丝状细胞表面就看不到疣状突起了。若于 16 小时后补加正烷烃,仍可见到疣状突起。用这种细胞的超薄切片进行电子显微镜观察,可见到疣状突起的结构与细胞壁外层的粘液状结构相同(图版 I-7)。

疣状突起形成的原因尚未很好地查明。推测是由于正烷烃较难吸收,细胞靠形成疣状突起来增大自身的表面积。也可能是正烷烃的代谢使细胞壁的脂类组成改变所致。

以上所述的只是酵母菌细胞中几种超微结构,而且,我们所看到的并不一定是它们自然生活状态下的结构,因为在电镜观察前作了种种处理。随着技术的发展,我们将有可能在将来直接观察生活细胞的超微结构。

参 考 文 献

- [1] 大隅正子: 発酵と工業, 35(7): 542—565, 1977.
- [2] Tanaka, K. and M. Jida: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 23: 201—206, 1977.
- [3] Aoyama, Y., Y. Yoshida, S. Kubota et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 185: 362—369, 1978.
- [4] 上原悌次郎: 発酵と工業, 35(5): 374—383, 1977.
- [5] Wallis, C. and D. Wilkie: *Mol. Gen. Genet.*, 173(3): 307—313, 1979.