

文章编号 1000-5013(2005)03-0251-04

自絮凝酵母细胞膜脂肪酸影响 乙醇激活 ATP 酶

胡纯铿 白凤武 安利佳

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011; 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要 首次揭示酵母菌细胞膜磷脂脂肪酸组成对影响质膜 ATP 酶对乙醇刺激的响应. 实验结果表明, 细胞膜磷脂脂肪酸组成特点, 对生长于未添加乙醇条件下的自絮凝酵母的质膜 ATP 酶活性没有影响, 但却明显影响生长于添加乙醇(体积分数为 0.01~0.10)的菌体质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性. 预培养于添加 0.6 mmol·L⁻¹ 棕榈酸、亚油酸或亚麻酸条件下, 菌体质膜 ATP 酶的最大激活水平分别为各自酶的基态水平(未激活)的 3.6、1.5 和 1.2 倍, 而对照组(预培养于未添加脂肪酸条件下的菌体)的相应值为 2.3 倍. 酶激活后, 米氏常数 K_m 、最适 pH 和对质膜 ATP 酶特异性抑制剂钒酸钠的敏感性等性质不变, 但最大反应速度 V_{max} 明显增加. 实验结果还表明, 细胞膜磷脂脂肪酸组成特点对提高菌体的耐乙醇能力越有利, 其质膜 ATP 酶被乙醇激活的幅度越大, 说明菌体耐乙醇能力的提高, 与其质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性的增加密切相关.

关键词 耐乙醇, 质膜 ATP 酶, 磷脂脂肪酸, 自絮凝酵母, 米氏常数

中图分类号 Q 550.4; Q 936

文献标识码 A

酵母菌质膜 ATP 酶位于细胞膜内侧, 是菌体生长必不可少的元件^[1]. 其主要功能是催化胞内 ATP 的水解并伴随将胞内 H⁺ 泵出胞外的反应^[2]. 随着 ATP 水解和 H⁺ 泵出偶联反应的不断进行, 质膜 ATP 酶为酵母菌细胞膜建立跨膜的 H⁺ 电化学梯度. 该梯度所蕴藏的能量, 可用于驱动菌体生长所需营养物质的主动运输^[3,4]. 质膜 ATP 酶还是维持酵母菌胞内 pH 值稳定的主要因素^[5], 它可调节胞内许多对 pH 值敏感的酶的活性^[6]. 此外, 质膜 ATP 酶在维持细胞结构稳定中具有重要作用^[4]. 虽然人们对质膜 ATP 酶在酵母菌生命活动中的作用的不断深入, 但是有关其与酵母菌耐乙醇关系的研究尚少. 因此, 本工作旨在考察改变酵母菌细胞膜磷脂脂肪酸组成对质膜 ATP 酶活性, 酶对乙醇刺激的响应, 以及其与菌体耐乙醇的影响关系. 在此基础上, 探索有关细胞膜脂类和蛋白质组分在酵母菌耐乙醇中的相互关系.

1 材料与方法

1.1 菌种

自絮凝酵母, 融合株 SPSC 系由 *Schizosaccharomyces pombe* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 两亲本经原生质体融合选育而成^[6], 融合株具强自絮凝特征. 该菌株由本实验室保存.

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 培养基 斜面保藏培养基($g \cdot L^{-1}$): 葡萄糖 10, 酵母浸出膏 3.85, 蛋白胨 3, 琼脂 20. 生长培养基($g \cdot L^{-1}$): 葡萄糖 30, 酵母浸出膏 3.85, 蛋白胨 3.

1.2.2 培养方法 生长培养基分为添加棕榈酸、亚油酸和亚麻酸(添加浓度均为 0.6 mmol·L⁻¹) 3 个试验组, 各加入质量分数为 0.001 的牛血清白蛋白(预先脱脂)作为乳化剂. 然后, 接入菌龄为 18 h 的融

收稿日期 2004-12-08

作者简介 胡纯铿(1964), 男, 副教授, 博士, 主要从事微生物分子生理与代谢工程的研究. E-mail: ckhu@hqu.edu.cn

基金项目 国家 863 高科技研究发展计划基金资助项目(2002AA647060)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合株 SPSC 絮凝颗粒, 于 30 ℃培养 20 h. 对照组除了不添加任何脂肪酸外, 其他培养控制条件同试验组. 收获试验组和对照组菌体, 分别接入添加体积分数为 0~ 0. 10 的乙醇的生长培养基中, 于旋转式摇床(150 r · min⁻¹, 30 ℃) 培养至对数中期.

1. 3 细胞膜的分离提取

按文献[7, 8]报道的方法进行.

1. 4 细胞膜磷脂脂肪酸组成的分析

参照文[2]的方法进行. 其中, 脂肪酸甲基酯采用气相色谱法分析(美国安捷伦 6890A 气相色谱仪, 配氢焰离子化检测器, 进样口温度 270 ℃, 检测器温度 250 ℃, 柱温采用程序升温控制).

1. 5 质膜 ATP 酶活力的测定

(1) 酶活力的测定方法. 按 Serrano 描述的方法^[9]进行. 1 个质膜 ATP 酶活力单位定义为, 每分钟释放 1 纳摩尔(nmol) 无机磷所需要的膜蛋白量. (2) 钒酸钠对酶的抑制作用. 在测定酶活力采用的体系的基础上, 添加一定浓度(50~ 300 μmol · L⁻¹) Na₃VO₄ · 14H₂O, 让质膜提取物与 Na₃VO₄ · 14H₂O 于 30 ℃预保温 10 min. 然后, 加入终浓度为 2 mmol · L⁻¹的底物 ATP 开始酶促反应, 然后, 测定酶活力. 所有实验至少重复 2 次, 每个测试重复 3 次, 最后结果以平均值表示.

2 结果与分析

2. 1 细胞膜磷脂脂肪酸组成影响菌体生长的耐乙醇能力

表 1 所示为试验组与对照组菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成(*w*) 特点的比较. 由表可见, 培养于添加脂肪酸条件下的菌体的细胞膜均富含各自添加的脂肪酸, 而对照组菌体棕榈酸含量低于细胞膜富含棕榈酸的菌体, 但高于细胞膜富含亚油酸或亚麻酸的菌体. 表中, 棕榈酸、亚油酸和亚麻酸的添加浓度均为

表 1 不同培养条件对自絮凝酵母细胞膜磷脂脂肪酸组成的影响

培养条件	脂肪酸组成								脂肪酸组成
	十四酸	9 十四烯酸	棕 榈 酸	棕榈油酸	硬脂酸	油 酸	亚油酸	亚麻酸	不饱和度
棕榈酸	0. 014	0. 032	0. 486	0. 208	0. 086	0. 173	0	0	0. 41
亚油酸	0. 035	0. 026	0. 283	0. 174	0. 115	0. 166	0. 204	0	0. 77
亚麻酸	0. 027	0. 030	0. 250	0. 155	0. 120	0. 160	0	0. 257	1. 12
对照组	0. 032	0. 016	0. 336	0. 268	0. 120	0. 226	0	0	0. 51

0. 6 mmol · L⁻¹, 对照组未添加任何脂肪酸(脂肪酸组成不饱和度= [1 × 单烯脂肪酸的质量分数+ 2 × 双烯脂肪酸的质量分数+ 3 × 三烯脂肪酸的质量分数]). 细胞膜磷脂脂肪酸组成不同的 4 类菌体, 其添加乙醇的生长状况, 如图 1 所示. 由图 1 可见, 改变细胞膜磷脂脂肪酸组成, 不影响菌体在未添加乙醇的比生长速率(*μ*), 但是, 却明显影响菌体生长的耐乙醇能力. 对于每个相同起始乙醇浓度, 细胞膜富含棕榈酸的菌体的比生长速率, 均明显高于对照组和细胞膜富含亚油酸或亚麻酸的菌体.

2. 2 细胞膜磷脂脂肪酸组成影响质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性

生长于相同起始乙醇体积分数的菌体, 因细胞膜磷脂脂肪酸组成的不同, 而导致各自的耐乙醇能力产生明显的差别, 如表 1 和图 1 所示. 在考察 4 类菌体生长的耐乙醇能力的同时, 分析它们在各个起始乙醇体积分数下的质膜 ATP 酶活力(*A*), 如图 2 所示. 由图 2 可见, 生长于未添加乙醇的 4 类菌体, 其质膜 ATP 酶活力相近(610~ 660 u · mg⁻¹), 这表明细胞膜磷脂脂肪酸组成的变化, 并不影响菌体固有的质膜 ATP 酶活性. 但是, 细胞膜磷脂脂肪酸组成特点, 却显著影响菌体质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性. 即生长于添加乙醇的 4 类菌体, 其酶活性均高于生长于未添加乙醇的同一类菌体的酶活性(基态酶活性). 其中, 细胞膜富含棕榈酸、亚油酸或亚麻酸菌体的最大酶活性, 分别为各自基态酶活性的 3. 6, 1. 5 和 1. 2 倍, 对照组的最大酶活性为基态酶活性的 2. 3 倍. 这说明菌体的细胞膜磷脂脂肪酸组成特点, 明显影响乙醇对质膜 ATP 酶的激活水平. 细胞膜磷脂脂肪酸组成会影响酵母菌质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性, 这是本研究观察到的新的实验现象. 值得注意的是, 酶被激活幅度越大的菌体(图 2), 其耐乙醇能力越强(图 1), 提示菌体的耐乙醇能力与其质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性密切相关.

2. 3 激活态和基态质膜 ATP 酶性质的比较

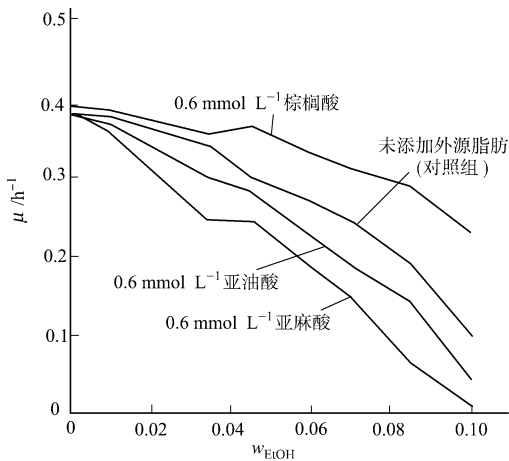


图 1 细胞膜磷脂脂肪酸组成对自絮凝酵母生长的耐乙醇能力的影响

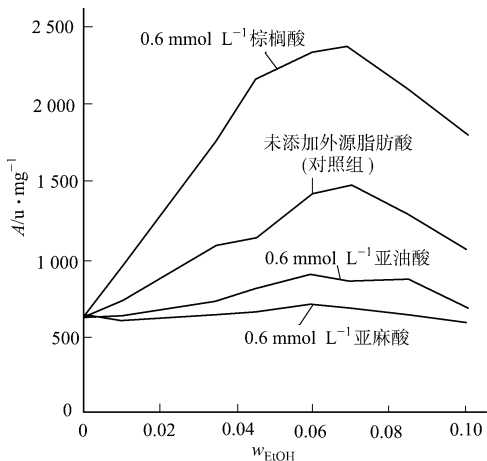


图 2 细胞膜磷脂脂肪酸组成对自絮凝酵母质膜 ATP 酶的影响

4 类菌体最大激活态(细胞膜富含棕榈酸的菌体和对照组培养于添加体积分数为 0.07 的乙醇中,而细胞膜富含亚油酸或亚麻酸的菌体培养于添加体积分数为 0.06 的乙醇中,基态(4 类菌体均培养于未添加乙醇的条件下,质膜 ATP 酶的一些基本性质.如图 3,4 和表 2 所示.图中,残留酶活力 $A_R = A' / A'_0$, A' 和 A'_0 分别表示与一定浓度钒酸钠(C_0)保温和未保温测得的酶活力.曲线 1~ 8 分别表示添加棕榈酸和 0.07 的乙醇;添加棕榈酸和未添加乙醇;添加亚油酸和 0.06 的乙醇;添加亚油酸和未添加乙醇;添加亚麻酸和 0.06 的乙醇;添加亚麻酸和未添加乙醇;未添加脂肪酸和添加 0.07 的乙醇;未添加脂

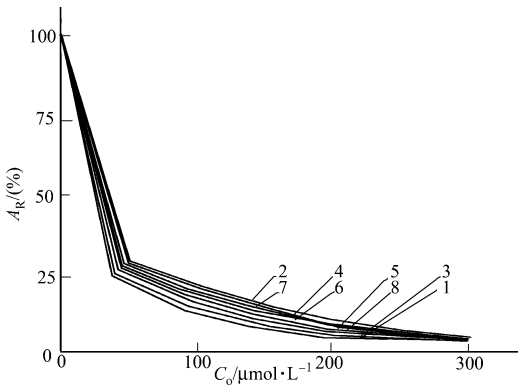


图 3 自絮凝酵母基态和激活态质膜 ATP 酶对钒酸钠抑制剂的敏感性

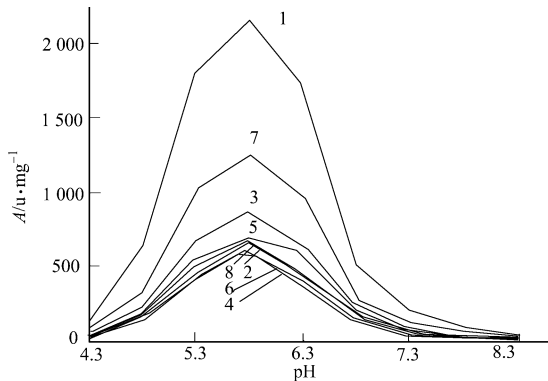


图 4 自絮凝酵母基态和激活态质膜 ATP 酶的适宜 pH 范围

表 2 不同培养条件对自絮凝酵母质膜 ATP 酶动力学参数的影响

加外源脂肪酸	w_{EtOH}	$K_m / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{max} / \text{nmol Pi} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$	加外源脂肪酸	w_{EtOH}	$K_m / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{max} / \text{nmol Pi} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$
棕榈酸	0	0.64	1 290	亚麻酸	0	0.67	1 230
棕榈酸	0.07	0.60	3 900	亚麻酸	0.06	0.63	1 830
亚油酸	0	0.66	1 250	未添加	0	0.66	1 310
亚油酸	0.06	0.63	1990	未添加	0.07	0.61	2 550

肪酸和乙醇.由此可见,4 类菌体的激活态酶和基态酶在对质膜 ATP 酶特异性抑制剂钒酸钠的敏感性(图 3)、米氏常数 K_m (表 2)和适宜 pH 范围(5.3~ 6.3,最适 pH= 5.8,图 4)等方面基本上是相同的,但是酶被激活后最大反应速度(V_{max})明显增大.

3 结束语

细胞膜磷脂脂肪酸和质膜 ATP 酶是酵母菌细胞膜的两大重要组分.本文尝试改变细胞膜磷脂脂肪酸组成特点,以探索对酵母菌质膜 ATP 酶活性的影响及其与菌体耐乙醇能力的关系.实验表明,细

胞膜磷脂脂肪酸组成特点不影响菌体固有的质膜 ATP 酶活性,但却明显影响酶对乙醇激活的敏感性,这是一个新的实验现象.同时,实验表明,细胞膜磷脂脂肪酸组成影响菌体耐乙醇能力,与影响质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性存在直接的相关性,即耐乙醇能力越强的菌体,其酶活力激活幅度越大.这说明菌体的耐乙醇能力与质膜 ATP 酶对乙醇激活的敏感性存在密切关系.

参 考 文 献

- 1 Serrano R, Kielland Brandt M C, Fink G R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} -ATPase[J]. Nature, 1986, (319): 689~ 693
- 2 Cartwright C P, Veazey F J, Rose A H. Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Gen Microbiol, 1987, (133): 857~ 865
- 3 Rosa M F, Sæ Correia I. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, (57): 830~ 835
- 4 Coote P J, Jones M V, Seymour I J, et al. Activity of the plasma H^+ -ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol, 1994, (140): 1 881~ 1 890
- 5 Sigler K, Hoffer M. Mechanisms of acid extrusion in yeasts[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, (1 071): 375~ 391
- 6 Hu Chunkeng, Bai Fengwu, An Lijia. Enhancing ethanol tolerance of a self flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability[J]. Biotechnol Lett, 2003, (25): 1 191~ 1 194
- 7 Dickinson D P, Isenberg I. Preparation of spheroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. J Gen Microbiol, 1982, (128): 651~ 654
- 8 Schibeci A, Rattray J B M, Kidby D K. Isolation and identification of yeast plasma membrane[J]. Biochim Biophys Acta, 1973, (311): 15~ 25
- 9 Serrano R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase[J]. FEBS Lett, 1983, (156): 11~ 14

Fatty Acid Composition of Plasma Membrane Affects in Vivo Ethanol Activation of ATPase in a Self-Flocculating Yeast

Hu Chunkeng Bai Fengwu An Lijia

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China;

School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, 116024, Dalian, China)

Abstract This work reveals for the first time that fatty acid composition of phospholipids in plasma membranes of yeast significantly affects the response of plasma membrane ATPase to ethanol stimuli. As shown experimentally, the characteristics of phospholipid fatty acid composition of plasma membranes significantly affected the sensitivities of plasma membrane ATPases to in vivo ethanol activation for a self flocculating yeast growing in the presence of ethanol(volume fraction is 0.01~ 0.10), although they had no effect on the activities of the enzymes of the cells growing in the absence of ethanol. The maximal levels of activated plasma membrane ATPases for the cells culturing in advance in the presence of 0.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ palmitic, linoleic or linolenic acid were 3.6, 1.5 or 1.2 fold higher than the basal(inactivated) levels respectively, while 2.3 fold was the corresponding value for the control(cells culturing in advance in the absence of fatty acid). After enzyme activation, the K_m values, the optimal pH values and the sensitivities of plasma membrane ATPases to specific inhibitor sodium orthovanadate kept constant but V_{\max} increased significantly. As also shown experimentally, the more advantageous for the characteristics of phospholipid fatty acid composition of plasma membranes to enhance ethanol tolerance of yeast, the greater in vivo ethanol activation of plasma membrane ATPases. This illustrates a close correlation between the enhancement in ethanol tolerance of yeast and the increase in sensitivities of plasma membrane ATPase to in vivo ethanol activation.

Keywords ethanol tolerance, plasma membrane ATPase, phospholipid fatty acid, self flocculating yeast, K_m