

细胞膜蛋白质氨基酸组成对自絮凝颗粒酵母耐酒精能力的影响及作用机制

胡纯铿¹ 白凤武² 安利佳²

(¹ 华侨大学生物工程与技术系 泉州 362011) (² 大连理工大学生物科学与工程系 大连 116024)

摘 要 揭示细胞膜组分与酵母菌耐酒精能力的一种新颖关系及其机制。实验显示,培养于添加和未添加 3 种氨基酸(异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸,添加浓度分别为 1.0、0.5 和 2.0 g/L)条件下的自絮凝颗粒酵母于 30℃ 经 20%(V/V)酒精冲击 9 h 的存活率分别为 57% 和 0,表明添加该 3 种氨基酸能显著提高菌体的耐酒精能力。细胞膜蛋白质氨基酸组成分析和细胞膜流动性测定表明,所添加 3 种氨基酸是通过组入菌体细胞膜、改变细胞膜流动性从而提高菌体的耐酒精能力的,即当细胞膜蛋白质氨基酸组成中异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量明显增加时,菌体能有效抵抗高浓度酒精冲击引发的细胞膜流动性的升高,从而维持细胞膜的稳定。细胞膜蛋白质氨基酸组成会影响细胞膜的流动性(膜蛋白中异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量明显增加时膜流动性降低)是一种新的实验现象。

关键词 耐酒精,细胞膜流动性,存活率

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0636-05

燃料酒精,作为一种可再生的清洁能源,对其开发和利用前景诱人。特别是近几年来,由于石油资源日益紧缺,许多国家对该产业的发展寄予厚望。但是,欲使燃料酒精成功开发为经济可行的生物燃料,尚需克服许多因素的制约,例如,原材料成本和酒精发酵工艺技术水平等因素,都明显影响燃料酒精生产的经济效益^[1-4]。虽然纤维素和其它农产品下脚料是潜在的生产燃料酒精的最廉价原材料,但是,目前能高效转化这些原材料为产物的技术尚不成熟^[1]。

在培养基中添加不饱和脂肪酸、磷脂或麦角固醇,均能在厌氧条件下促进酵母菌的生长和酒精生成^[5-7]。进一步的研究表明,所添加的这些脂类成分是通过组入酵母菌细胞膜,使菌体的耐酒精能力提高从而发挥其作用的^[8-9]。有关添加不饱和脂肪酸等脂类成分影响酵母菌耐酒精性能和乙醇发酵状况的研究已有不少报道,这类工作都说明细胞膜脂类成分在酵母菌耐酒精中的作用。事实上,到目前为止,有关酵母菌细胞膜组分(质膜 ATP 酶除外)与其耐酒精性能的关系的研究,人们所开展的工作主要集中于对膜脂类成分在菌体耐酒精中作用的探索。蛋白质和磷脂是构成细胞膜的两大主要成分,其中

膜蛋白约占 40%~50%。然而,迄今为止,人们对膜蛋白氨基酸组分在酵母菌耐酒精中的可能作用了解甚少,有关这方面的研究报道颇为罕见。本研究通过添加外源氨基酸,考察对自絮凝颗粒酵母耐酒精性能的影响,并探索可能的作用机制,揭示细胞膜组分与菌体耐酒精性能的新的关系。

1 材料和方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母——融合株 SPSC 系由 *Schizosaccharomyces pombe*^[10] 和 *Saccharomyces cerevisiae* 两亲本经原生质体融合选育而成^[11],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

斜面保藏培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母浸出膏 3.85,蛋白胨 3,琼脂 20。生长培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母浸出膏 3.85,蛋白胨 3。发酵培养基(g/L):葡萄糖 200,酵母浸出膏 5,蛋白胨 3。

1.3 酒精浓度的测定

酒精浓度由气相色谱法定量(美国安捷伦 6890A 气相色谱仪,配氢焰离子化检测器,进样口和检测器温度分别为 160℃ 和 230℃,柱温恒温控制为

基金项目:国家 863 计划(2002AA647060)

作者简介:胡纯铿(1964-),男,福建惠安人,副教授,博士,研究方向为微生物分子生理与代谢工程。Tel:86-595-2693508;Fax:86-595-7375826;E-mail:chkh0600@sina.com

收稿日期:2004-02-16,修回日期:2004-06-01

90℃,采用氮气为载气,正丁醇为内标物)^[12]。

1.4 菌体耐酒精性能的测定

为考察添加 3 种氨基酸对菌体在高浓度酒精冲击下存活率的影响,将生长培养基分成两组,其中一组添加 3 种氨基酸(异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸,添加浓度分别为 1.0、0.5 和 2.0g/L),另一组未添加 3 种氨基酸,于 100mL 生长培养基中均接入一环新鲜斜面菌体,在旋转式摇床(转速 150r/min)上于 30℃ 培养 18 h 后收获菌体,用去离子水洗涤两次,于 30℃ 在 20%(V/V)酒精条件下进行冲击试验。定期取样检测残余活细胞数目。菌体的耐酒精能力以存活率(Viability)表示, $Viability(\%) = (C_t / C_0) \times 100\%$, C_0 和 C_t 分别表示冲击时间为 0 和 t 小时的残余活细胞浓度^[12]。

1.5 细胞膜的分离提取

将菌体悬于预处理液(0.1mol/L EDTA, 0.1mol/L MES, pH6.0, 临用前加入终浓度为 5mmol/L 的二硫苏糖醇),控制浓度为 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞/mL,于 30℃ 振荡 30min。预处理后,离心(5000g, 1min)收获菌体,用 0.6mol/L 山梨醇溶液洗涤一次。然后将菌体悬于酶解液(含 3mg/mL Novozyme, 酶溶于 pH 5.85 柠檬酸-磷酸盐缓冲液,临用前加入终浓度为 5mmol/L 的二硫苏糖醇)并控制浓度为 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞/mL,于 30℃ 振荡 20 ~ 30min。后低速离心(750 ~ 800g)收获原生质体,并用 1.2mol/L 山梨醇溶液洗涤两次。将菌体悬于 0.9%(W/V) NaCl 溶液进行渗透裂解,后于 4℃ 离心(29000g, 20min)收获膜提取物,按 Schibeci 等^[13]报道的方法分离细胞膜。细胞膜蛋白质含量按 Bradford^[14]报道的方法以牛血清白蛋白为标准品进行定量。

1.6 细胞膜蛋白质氨基酸组成的分析

取出一定量细胞膜提取物(相当于由 600mg 干重菌体分离制备而成),加入 60mL 氯仿:甲醇(2:1, V/V)萃取溶剂,再加入对-氯汞苯甲酸(控制浓度为 1mmol/L),悬液于室温搅拌 3h。然后,分离萃取物,再向萃取物加入 0.88%(W/V) KCl 溶液(加入量为萃取物容积的一半),充分摇匀后于 4℃ 过夜分相。然后,从已分离的两相中取出上相用于膜蛋白氨基酸组成的分析:膜蛋白采用 6mol/L 盐酸水解,氨基酸组成按 Albers 等^[15]报道的方法用氨基酸分析仪测定。

1.7 细胞膜流动性的测定

膜流动性的测定参照文献[16 ~ 18]报道的方法,在以荧光探针 DPH(1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)

标记菌体细胞膜的基础上进行。DPH 溶液用四氢吡喃配制,浓度为 1mmol/L。将经酒精冲击过的菌体水洗后悬于 pH 6.0 磷酸盐缓冲液,然后,加入 DPH 溶液(添加比例为 3μL/mL 菌悬液),再将菌悬液置于旋转式摇床(30℃, 200r/min)上于黑暗条件下保温 45min。通过测定插入细胞膜的荧光探针 DPH 的荧光各向异性(r)确定膜的流动性: $r = (I_{VV} - G I_{VH}) / (I_{VV} + 2 G I_{VH})$ 。测定时采用的激发光和发射光波长分别为 358 和 426nm。其中 I_{VV} 和 I_{VH} 表示当激发光为垂直方向的偏振光,而发射光分别为垂直方向和水平方向的偏振光时测得的荧光强度。 G 为光栅校正因子,等于 I_{HV} / I_{HH} 。

2 结果和分析

研究添加氨基酸对融合株 SPSC 耐酒精性能的影响时首先必须确定拟添加氨基酸的种类和适宜浓度。在分别考察 20 种氨基酸对融合株 SPSC 乙醇发酵影响的基础上发现,当同时添加异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸 3 种氨基酸,添加浓度分别为 1.0、0.5 和 2.0g/L 时,发酵终点酒精浓度最高,因此,确定该 3 种氨基酸及其添加浓度为以下实验氨基酸的添加方案。

2.1 3 种氨基酸对菌体生长的耐酒精性能的影响

通过测定在生长培养基添加起始浓度酒精条件下菌体的生长,是考察酵母菌耐酒精能力的重要方法^[8]。为了考察添加 3 种氨基酸对融合株 SPSC 生长的耐酒精能力的影响,收获分别预培养于添加和未添加 3 种氨基酸条件下的菌体(分别称添加组和对照组),接入起始添加一系列不同浓度(0% ~

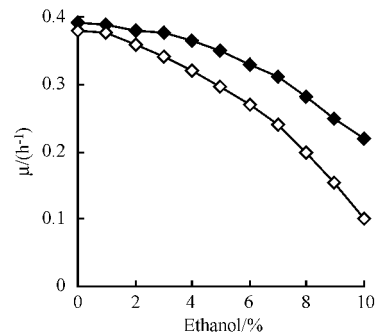


图1 不同预培养条件对融合株 SPSC 生长的耐酒精能力的影响

Fig.1 Effect of different pre-growth conditions on fusant SPSC growth activity tolerant to ethanol

◆ and ◇ represent cells pre-grown with or without three amino acids (including 1.0 g/L isoleucine, 0.5 g/L methionine and 2.0 g/L phenylalanine) before grown in the presence of ethanol respectively.

10% (V/V) 酒精的生长培养基中,于 30℃ 进行酒精抑制条件下的生长试验(图 1)。可见,预培养时添加 3 种氨基酸能明显降低酒精对菌体比生长速率(μ)的抑制程度:对于每一个起始酒精浓度,添加组的比生长速率均高于对照组的水平,尤其是随着酒精浓度的升高,二者的差异更为显著。以上结果表明,添加 3 种氨基酸能明显提高融合株 SPSC 生长对酒精抑制的抗性,即明显提高菌体生长的耐酒精能力。

2.2 3 种氨基酸对菌体在高浓度酒精冲击下存活率的影响

通过比较培养于添加和未添加 3 种氨基酸条件下的菌体(分别称添加组和对照组)于 30℃ 在 20% (V/V) 酒精冲击下的存活率,以进一步考察 3 种氨基酸在菌体耐酒精中的作用(图 2)。经过 9h 冲击,添加组和对照组的存活率分别为 57% 和 0,这表明添加 3 种氨基酸能显著提高菌体的耐酒精能力。那么,所添加氨基酸是以何机制提高融合株 SPSC 耐酒精性能呢?

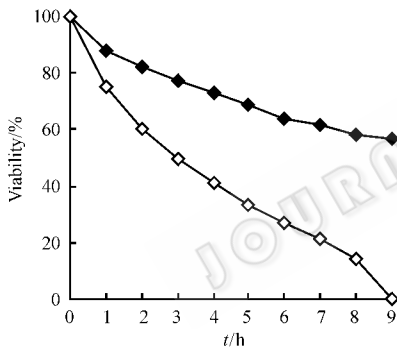


图 2 不同预培养条件对融合株 SPSC 于 30℃ 20% (V/V) 酒精冲击下存活率的影响

Fig.2 Effect of different pre-growth conditions on viability of fusant SPSC exposed to 20% (V/V) ethanol at 30°C

◆ and ◇ represent cells pre-grown with or without three amino acids (including 1.0 g/L isoleucine, 0.5 g/L methionine and 2.0 g/L phenylalanine) before exposure to ethanol respectively.

2.3 培养于添加 3 种氨基酸条件下的菌体细胞膜蛋白质氨基酸组成的变化

一些研究表明,在酵母菌培养基中添加不饱和脂肪酸或麦角固醇,这些成分会组入菌体细胞膜,从而提高菌体的耐酒精能力,并由此促进菌体生长和乙醇发酵⁵⁻⁷。图 2 所示的实验结果表明,培养于添加 3 种氨基酸条件下的菌体的耐酒精能力显著提高。那么,所添加氨基酸(异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸)是否也通过组入菌体细胞膜而发挥作用呢?由于有关这方面的研究颇为罕见,因此,假设正如添

加脂类成分那样,所添加的氨基酸也能组入菌体细胞膜发挥作用。于是,考察培养于添加和未添加 3 种氨基酸条件下的菌体(分别称添加组和对照组)的细胞膜蛋白质氨基酸组成是否存在差异,结果见表 1。可见,添加组细胞膜蛋白质氨基酸组成中异亮氨酸(Isoleucine)、甲硫氨酸(Methionine)和苯丙氨酸(Phenylalanine)的含量明显高于对照组的水平,这说明所添加的 3 种氨基酸确实能组入融合株 SPSC 菌体的细胞膜。

表 1 培养于添加 3 种氨基酸条件下的融合株 SPSC 细胞膜蛋白质氨基酸组成的变化

Table 1 Protein amino acid composition of plasma membranes of fusant SPSC cells grown in the presence (+) or absence (-) three amino acids^a

Amino acid	Content (mg/g of membrane protein)	
	-	+
Alanine	72.3	47.1
Arginine	55.0	46.2
Aspartic acid	50.1	30.3
Cysteine	6.4	5.6
Glutamic acid	121.2	93.0
Glycine	50.7	43.5
Histidine	26.9	16.5
Isoleucine	51.6	104.1
Leucine	103.2	80.4
Lysine	97.3	73.7
Methionine	30.3	80.6
Phenylalanine	56.1	143.4
Proline	57.5	36.6
Serine	48.6	42.4
Threonine	38.8	35.5
Tyrosine	42.0	46.2
Valine	72.7	66.0

^a The three amino acids included 1.0 g/L isoleucine, 0.5 g/L methionine and 2.0 g/L phenylalanine.

2.4 培养于添加 3 种氨基酸条件下的菌体细胞膜流动性的变化

所添加的 3 种氨基酸(异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸)组入融合株 SPSC 菌体细胞膜后,是通过什么途径提高菌体的耐酒精性能呢?由于添加氨基酸影响了细胞膜蛋白质氨基酸组成特点(表 1),而膜组分的变化可能影响膜的性质,因此,将细胞膜流动性作为主要考察对象。将培养于添加和未添加 3 种氨基酸条件下的菌体,分别于 30℃ 经不同浓度(0% ~ 15%, V/V)酒精冲击 6h,后以荧光探针 DPH (1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)标记菌体细胞膜,检测膜流动性的变化(图 3)。当酒精冲击浓度为 0% 时(即菌体未经酒精冲击),生长于添加氨基酸条件下的菌体(添加组)的膜荧光各向异性(r)值高于生长于未添加氨基酸条件下的菌体(对照组)的水

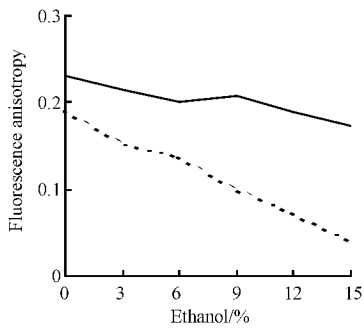


图3 酒精冲击对培养于不同生长条件的融合株 SPSC 细胞膜荧光各向异性(r)值的影响

Fig.3 Effect of ethanol on fluorescence anisotropy (r) values of fusant SPSC cells grown under different conditions

Solid and dashed lines represent cells grown with or without three amino acids (including 1.0 g/L isoleucine, 0.5 g/L methionine and 2.0 g/L phenylalanine) before exposure to ethanol respectively.

平,即3种氨基酸组入菌体细胞膜后 r 值升高。由于 r 值与膜流动性成反相关关系($r = 1/\text{膜流动性}$),即 r 值越大,表示膜流动性越低,反之, r 值越小,表示膜流动性越高^[16-18],因此3种氨基酸组入菌体细胞膜后(r 值升高)膜流动性降低;其次,无论是添加组,还是对照组,菌体经酒精冲击后膜流动性均升高,而且,膜流动性随酒精冲击浓度的升高而升高;但是,添加组膜流动性随酒精冲击浓度加大而升高的幅度明显比对照组的小,因此,在各个浓度酒精冲击下,添加组膜流动性均比对照组低,特别是在高浓度(如15% V/V)酒精冲击下,二者膜流动性的差异更为显著,这说明3种氨基酸组入菌体细胞膜后,菌体能够有效抵抗高浓度酒精冲击引发的膜流动性的升高,从而维持膜的稳定。由于前面的研究(2.2和2.3)表明,添加3种氨基酸组入细胞膜后能显著提高菌体在高浓度酒精冲击下的存活率,因此,添加氨基酸提高融合株 SPSC 耐酒精能力与所添加氨基酸组入细胞膜后使菌体能够有效抵抗高浓度酒精冲击引起的膜流动性的升高密切相关。

3 讨论

迄今为止,有关细胞膜组分(质膜 ATP 酶除外)与酵母菌耐酒精能力的关系的研究人们所开展的工作,主要限于膜脂类(含固醇类如麦角固醇)与菌体耐酒精能力的关系的探讨。本研究揭示细胞膜组分与菌体耐酒精能力的一种新颖关系——细胞膜蛋白质氨基酸组成与菌体耐酒精能力的关系,即当融合株 SPSC 细胞膜蛋白质氨基酸组成中异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量明显增加时,菌体的耐酒精能

力提高。

许多研究认为,细胞膜中 UFA/SFA(不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸)比例决定膜的流动性。例如,高温会引起膜流动性升高,酵母菌对高温刺激做出的响应是降低膜中 UFA/SFA 比例(即提高膜中饱和脂肪酸含量),从而降低膜的流动性^[19]。本研究发现,细胞膜蛋白质氨基酸组成也会影响膜的流动性,这是一个新的实验现象,即异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸组入融合株 SPSC 细胞膜后,使膜蛋白氨基酸组成中异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量明显增加时,膜流动性降低。而膜蛋白氨基酸组成中异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸含量增加具有降低膜流动性的这种本领,构成菌体可有效抵抗高浓度酒精冲击引发的膜流动性升高的基础,即当细胞膜组入这3种氨基酸后,菌体在高浓度酒精冲击下抵抗酒精引发的膜流动性升高的能力显著增强,从而在高浓度酒精胁迫下能维持细胞膜的稳定,这也许是融合株 SPSC 耐酒精的新的策略。

参 考 文 献

- [1] Thomas K C, Dhas A, Rossnagel B G, et al. Production of fuel alcohol from hull-less barley by very high gravity technology. *Cereal Chem*, 1995, **72**: 360 - 364.
- [2] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochem*, 1996, **31**: 321 - 331.
- [3] Wang S, Thomas K C, Ingledew W M, et al. Production of fuel ethanol from rye and triticale by very high gravity (VHG) fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, **69**: 157 - 175.
- [4] Barber A R, Henningsson M, Pamment N B. Acceleration of high gravity yeast fermentations by acetaldehyde addition. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 891 - 895.
- [5] Casey G P, Magnus C A, Ingledew W M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**: 639 - 646.
- [6] Ghareib M, Yousef K A, Khalil A A. Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiol*, 1988, **33**: 447 - 452.
- [7] Mishra P, Prasad R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **30**: 294 - 298.
- [8] D'Amore T, Panchal C J, Russell I, et al. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit Rev Biotechnol*, 1990, **9**: 287 - 304.
- [9] Walker-Caprioglio H M, Casey W M, Parks L W. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 2853 - 2857.

- [10] 白凤武, 秦金来, 谢 健, 等. 絮凝酵母颗粒悬浮床反应器中试及酒精连续发酵工艺的研究. *生物工程学报*, 1995, **11**: 255 - 259.
- [11] 白凤武, 靳 艳, 冯朴荪, 等. 融合株 SPSC 发酵生产酒精的工艺研究——自絮凝细胞颗粒粒径分布、细胞生长和产物酒精生成动力学. *生物工程学报*, 1999, **15**: 455 - 460.
- [12] Hu C K, Bai F W, An L J. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 1191 - 1194.
- [13] Schibeci A, Rattray J B M, Kidby D K. Isolation and identification of yeast plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **311**: 15 - 25.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254.
- [15] Albers E, Larsson C, Liden G, et al. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3187 - 3195.
- [16] Kim I S, Lee H, Trevors J T. Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and biphenyl on cell membranes of *Ralstonia eutropha* H 850. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **200**: 17 - 24.
- [17] Kim I S, Lee A B, Michael B C, et al. Alterations in fatty acid composition and fluidity of cell membrane affect the accumulation of PCB congener 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl by *Ralstonia eutropha* H 850. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, **77**: 793 - 799.
- [18] Sperka-Gottlieb C D M, Hermelter A, Paltauf F, et al. Lipid topology and physical properties of the outer mitochondrial membrane of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **946**: 227 - 234.
- [19] Suutari M, Liukkonen K, Laakso S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 1469 - 1474.

Influence of Protein Amino Acid Composition of Plasma Membranes of A Self-flocculating Yeast on Its Tolerance to Ethanol and The Mechanism

HU Chun-Keng^{1*} BAI Feng-Wu² AN Li-Jia²

(¹ Department of Bioengineering, Huaqiao University, Quanzhou 362011, China)

(² Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The aim of this work was to examine any possible correlation between protein amino acid composition of plasma membranes of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* and its tolerance to ethanol. After 9 h of exposure to 20% (V/V) ethanol at 30°C, no viability remained for the control whereas 57% remained for the cells grown with three amino acids including 1.0 g/L isoleucine, 0.5 g/L methionine and 2.0 g/L phenylalanine. The analysis of protein amino acid composition of plasma membranes and the determination of plasma membrane fluidity indicate that the striking enhancement in ethanol tolerance of the cells grown in the presence of the three amino acids is due to the incorporation of the exogenously supplemented amino acids into the plasma membranes of the cells, which leads to the increased capacity of the cells to effectively counteract the fluidizing impact of ethanol on the plasma membranes of the cells under ethanol stress, thus maintaining the plasma membrane integrity. This is the first report that protein amino acid composition of plasma membranes can affect plasma membrane fluidity: a marked increase in the contents of isoleucine, methionine and phenylalanine in protein amino acid composition of plasma membranes results in a decrease in plasma membrane fluidity.

Key words: Ethanol tolerance, Plasma membrane fluidity, Viability