

外源脂肪酸对酒精诱导自絮凝颗粒酵母细胞膜 磷脂脂肪酸组成变化的影响

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 实验将自絮凝颗粒酵母培养于同时添加脂肪酸(0.6 mmol/L)和酒精(6%~9%, V/V)条件下以考察其细胞膜磷脂脂肪酸组成的变化。与单独添加棕榈酸相比,同时添加酒精引起细胞膜磷脂棕榈酸含量明显增加,伴随9-十四碳烯酸、棕榈油酸和油酸含量明显减少;与单独添加亚油酸相比,同时添加酒精未引起细胞膜磷脂亚油酸含量明显变化,但引起油酸含量明显增加,伴随9-十四碳烯酸、棕榈油酸和棕榈酸含量减少;与单独添加亚麻酸相比,同时添加酒精引起细胞膜磷脂亚麻酸含量减少,伴随油酸含量显著增加,同时9-十四碳烯酸、棕榈油酸和棕榈酸含量减少。存活率实验证实,上述变化是菌体对酒精刺激的适应性响应,因为,与培养于仅添加脂肪酸条件下的菌体相比,培养于同时添加酒精条件下的菌体耐酒精能力明显提高。研究表明,棕榈酸和油酸都可通过加强细胞膜渗透屏障而提高菌体的耐酒精能力,这是饱和脂肪酸(SFA)与不饱和脂肪酸(UFA)可提高同一菌株耐酒精能力的新的实验现象,揭示 UFA 与 SFA 在影响酵母菌耐酒精能力的机制上存在共同的作用方式。

关键词 耐酒精, 磷脂脂肪酸组成, 细胞膜渗透屏障, 存活率

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0922-06

在酵母菌的乙醇发酵中,随着产物酒精在发酵液中的积累,发酵速率逐渐下降,导致底物转化时间延长和可达终点酒精浓度降低^[1]。长期以来,人们一直致力于探索导致酵母菌乙醇发酵速率下降的原因^[1],并就酒精毒害酵母菌的可能作用位点提出了不少假设,目前认为酵母菌细胞膜是酒精冲击的主要目标,对细胞膜的损伤是酒精毒害酵母菌和抑制乙醇发酵的主要方式^[1-4]。研究表明,酵母菌细胞膜的脂类成分与其耐酒精能力密切相关^[1,3,4,5]。一些工作表明,生长于酒精条件下的酵母菌,其细胞膜不饱和脂肪酸含量增加^[6]。另外,在培养基中添加不饱和脂肪酸也能促进酵母菌耐酒精能力的提高^[5,4,7],进一步研究表明,这些不饱和脂肪酸被菌体吸收后组入了细胞膜,从而增加细胞膜不饱和脂肪酸含量并由此提高膜的流动性^[7]。因此,许多报道认为增加细胞膜不饱和脂肪酸含量和膜的流动性是提高酵母菌耐酒精能力的关键^[4,7,8]。

然而,一些研究表明,酒精刺激并没有引起生长

中的酵母菌细胞膜不饱和脂肪酸含量增加,甚至耐酒精能力强的菌体膜不饱和脂肪酸含量反而明显下降^[9]。Arneborg 等人^[10]的研究则发现菌体在高浓度酒精刺激下膜中中链饱和脂肪酸(18:0)的含量增加,而不饱和脂肪酸含量几乎不变,菌体的耐酒精能力与膜不饱和脂肪酸含量无关,相反,与膜长链饱和脂肪酸(18:0)含量存在密切关系。有关酵母菌细胞膜脂肪酸组成与其耐酒精关系的研究已开展了不少工作,然而究竟不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸何者在菌体耐酒精中起关键作用,来自不同的研究尚未取得一致的看法,这客观上反映酵母菌耐酒精机制的复杂性,同时也可能与各自的实验条件和菌株本身特点具有一定关系。既然不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸在某种条件下都能提高酵母菌的耐酒精能力,那么,二者在提高菌体耐酒精能力的作用机制上是否存在共性?这也许是酵母菌耐酒精机制研究中不容忽视的潜在层面。这也正是本工作试图探索的问题。

收稿日期:2004-04-05,修回日期:2004-06-21。

基金项目:国家 863 高科技研究发展计划项目(No.2002AA647060)。

* 通讯作者。 Tel: 86-595-22693508; Fax: 86-595-87375826; E-mail: chkh0600@sina.com

1 材料与方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母——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^[11], 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/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。

1.2.2 培养方法:将生长培养基分为添加 0.6 mmol/L 棕榈酸、亚油酸和亚麻酸三个试验组, 每个试验组分为添加 0%、6% 和 9% (V/V) 起始浓度酒精的三个类别, 各加入终浓度为 0.1% 牛血清白蛋白作为乳化剂, 牛血清白蛋白预先按文献[12]方法脱脂后, 接入菌龄为 18 h 的融合株 SPSC 絮凝颗粒, 控制菌体(dry wt)浓度为 50 mg/L, 于 30℃ 培养 20 h。

1.3 高浓度酒精冲击下菌体存活率的测定

将按 1.2.2 方法培养的菌体, 用去离子水洗涤 2 次, 然后, 于 30℃ 和 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^[13]。

1.4 胞外核苷酸浓度和细胞膜透性系数(P')的测定

将按 1.2.2 方法培养的菌体用去离子水洗涤至上清液在 260 nm 处的吸收可以忽略。然后, 将菌体转入 15% (V/V) 酒精缓冲液并置于缓慢转动的旋转式摇床(30℃)上, 定期分别检测溶液在 260 nm 和 280 nm 处的吸收值直至二者均达到平衡值。

胞外核苷酸浓度由下式计算^[14]: $Nucleotide (\mu g/mL) = (11.87 \cdot A_{260} - 10.40 \cdot A_{280}) \cdot 100/9$;

细胞膜透性系数(P')由下式求得^[14]: $\ln(C_t^\infty - C_t) = \ln(C_t^\infty - C_0) - (1 + V_i/V_e)(A/V_i)P't$, 其中 t 表示时间(h), C_t 表示胞外核苷酸浓度(mol/cm³), A 表示细胞膜总表面积(cm²), V_i 表示胞内液体总体积(cm³), V_e 表示胞外液体总体积(cm³), C_0 和 C_t^∞ 分别表示 $t = 0$ 和 $t = \infty$ 时的 C_t 。

1.5 细胞膜的分离提取

将菌体分别用去离子水和 1.2 mol/L 山梨醇溶液各洗涤 2 次, 按文献[15]方法制备球形体。后离心(750~800 g)收获球形体, 用 1.2 mol/L 山梨醇溶

液洗涤 2 次, 将其悬于 0.9% (W/V) NaCl 溶液进行渗透裂解, 后于 4℃ 离心(29 000 g, 20 min)收获膜提取物, 按 Schibeci 等报道的方法^[16]分离细胞膜, 膜蛋白含量按 Bradford 报道的方法^[17]定量。

1.6 细胞膜磷脂脂肪酸组成的分析

取出一定量细胞膜提取物(相当于由 600 mg 干重菌体分离制备而成), 加入 60 mL 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 1 mmol/L), 悬液于室温搅拌 3 h。然后, 分离萃取物, 向萃取物加入 0.88% (W/V) KCl 溶液, 充分摇匀后于 4℃ 过夜分相。然后, 取出下相, 置于旋转蒸发器干燥浓缩, 后将浓缩物快速溶于少量氯仿:甲醇(2:1, V/V)溶剂, 采用薄层层析法^[18]分离细胞膜磷脂与其他脂类成分。然后, 将硅胶板上磷脂斑点连同吸附剂一起刮下, 通过甲基化反应^[18]以生成各种脂肪酸甲基酯, 冷却后用氯仿萃取。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)。

1.7 实验数据处理方法

所有实验重复 3 次, 每个测试至少重复 2 次, 最后结果以平均值表示。

2 结果与分析

2.1 生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成的变化

表 1 为培养于同时添加脂肪酸和酒精条件下与培养于单独添加脂肪酸条件下的融合株 SPSC 细胞膜磷脂脂肪酸组成特点的比较。与单独添加棕榈酸(16:0)相比, 同时添加酒精引起细胞膜磷脂棕榈酸含量明显增加, 表明酒精明显促进棕榈酸组入细胞膜; 与此同时, 伴随细胞膜磷脂 9-十四碳烯酸(14:1)、棕榈油酸(16:1)和油酸(18:1)含量明显减少, 并检测到亚油酸(18:2)的存在, 这是一个有趣的现象。已知酿酒酵母只有 Δ -9 脂肪酸去饱和酶^[19], 在正常生长条件下, 只合成单烯脂酸如棕榈油酸和油酸, 而不像其它真菌和植物可合成多烯脂酸如亚油酸和亚麻酸^[20]。由于单独添加棕榈酸时菌体细胞膜未出现亚油酸(表 1), 因此, 同时添加酒精引起细胞膜出现亚油酸可能与酒精刺激有关。

与单独添加亚油酸(18:2)相比, 同时添加酒精未引起细胞膜磷脂亚油酸含量明显增加, 表明酒精未明显促进亚油酸进一步组入细胞膜, 但酒精刺激显然引起细胞膜磷脂油酸(18:1)含量明显增加, 并

伴随 9-十四碳烯酸(14:1)、棕榈油酸(16:1)和棕榈酸(16:0)含量的减少。

表 1 培养于单独添加脂肪酸与同时添加酒精不同条件的融合株 SPSC 细胞膜磷脂脂肪酸组成的比较

Table 1 Fatty acid composition of phospholipids in plasma membranes of fusant SPSC grown on different fatty acid supplements in the presence or absence of ethanol^a

Fatty acid added	Ethanol added /(% , V/V)	Fatty acid composition/ %								Unsaturation index(Δ /mol) ^b
		14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	
16:0	0	1.4	3.2	48.6	20.8	8.6	17.3	0	0	0.41
	6	0.9	0.9	75.5	8.5	5.6	5.3	3.2	0	0.21
	9	0.5	0.3	82.3	4.8	6.0	4.2	1.8	0	0.13
18:2	0	3.5	2.6	28.3	17.4	11.5	16.6	20.4	0	0.77
	6	3.3	0.5	22.2	8.8	9.2	33.0	23.1	0	0.89
	9	3.0	0.5	24.0	7.6	13.0	31.3	20.8	0	0.81
18:3	0	2.7	3.0	25.0	15.5	12.0	16.0	0	25.7	1.12
	6	0.9	0.2	20.6	6.1	13.2	39.0	1.6	18.3	1.03
	9	1.5	0.3	20.1	5.3	9.3	42.0	3.6	17.8	1.08

^a Fatty acids are denoted by the number of carbon atoms; the number of unsaturated linkages;

^b Δ /mol = [1 × (% monoene) + 2 × (% diene) + 3 × (% triene)]/100

与单独添加亚麻酸(18:3)相比,同时添加酒精引起细胞膜磷脂亚麻酸含量减少,并伴随油酸(18:1)含量显著增加,油酸含量的这种变化趋势与同时添加亚油酸和酒精时出现的情况相似,但变化幅度比后者大。另外,同时添加亚麻酸和酒精也引起细胞膜磷脂 9-十四碳烯酸(14:1)、棕榈油酸(16:1)和棕榈酸(16:0)含量的减少。有趣的是,细胞膜中也出现亚油酸,推测可能也与酒精的刺激有关,因为在单独添加亚麻酸时细胞膜未出现亚油酸,说明亚麻酸组入细胞膜后未被加氢还原为亚油酸。Steels 等^[21]在厌氧条件下添加亚麻酸培养酿酒酵母时发现,菌体膜中磷脂脂肪酸组成 65% 以上为亚麻酸,然而却未出现亚油酸,提示菌体吸收的亚麻酸也未被加氢还原。

上述结果表明,无论添加何种脂肪酸,生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体与生长于单独添加脂肪酸条件下的菌体在细胞膜磷脂脂肪酸组成上存在明显差别。那么,生长于添加酒精条件下的菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成所出现的这些变化(表 1),是否是对酒精刺激作出的适应性响应呢?为了说明这个问题,考察培养于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体与培养于单独添加脂肪酸条件下的菌体耐酒精能力是否存在差别。

2.2 生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体耐酒精能力的变化

图 1 所示为培养于同时添加脂肪酸和酒精条件

下的菌体与培养于单独添加脂肪酸条件下的菌体于 30℃ 在 20% (V/V) 酒精冲击下存活率的比较。由图 1 可归纳以下三个主要特点:

(1) 对于添加任何一种脂肪酸而言,生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的耐酒精能力明显高于生长于单独添加脂肪酸条件下的菌体,说明与生长于仅添加脂肪酸条件下的菌体相比,生长于同时添加酒精条件下的菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成出现的上述变化(表 1)对菌体耐酒精是有利的,是对酒精刺激的适应性响应。(2) 生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的耐酒精能力随添加酒精浓度的升高而增强。(3) 对于添加任何一种酒精浓度(6%~9%, V/V)而言,菌体的耐酒精能力由高到低的排列顺序为:细胞膜富含棕榈酸、细胞膜富含亚油酸和细胞膜富含亚麻酸,且三者的耐酒精能力差别显著,这些特点与生长于单独添加脂肪酸条件下的菌体的状况相似。由表 1 知道,棕榈酸、亚油酸和亚麻酸各自对酒精诱导细胞膜磷脂脂肪酸组成变化的影响明显不同,即对于每个相同的起始酒精浓度,三者的细胞膜磷脂脂肪酸组成存在明显差别,这是形成它们耐酒精能力存在明显差异的基础。

2.3 生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体细胞膜透性的变化

图 2 比较生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体与生长于单独添加脂肪酸条件下的菌体于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下的胞外核苷酸浓度。

从图 2 可总结以下规律:

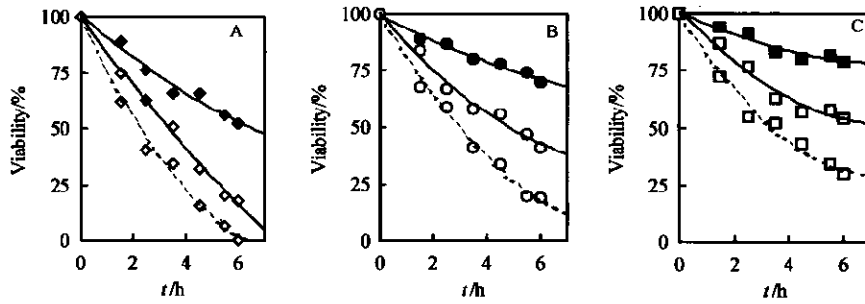


图 1 融合株 SPSC 菌体于 30℃ 在 20% (V/V) 酒精冲击下存活率比较

Fig. 1 Viability of fusant SPSC cells exposed to 20% (V/V) ethanol at 30℃

Symbols and lines denote: Cells grown with 0.6 mmol/L palmitic acid (16:0) (◆, ●, ■), linoleic acid (18:2) (◇, ○, □) or linolenic acid (18:3) (···◇···, ···○···, ···□···) in the presence of 0% (A), 6% (B), or 9% (C) (V/V) initial ethanol respectively, were incubated with 20% (V/V) ethanol at 30℃

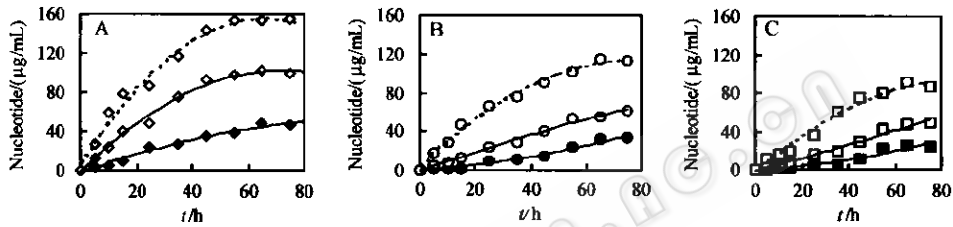


图 2 融合株 SPSC 菌体于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下胞外核苷酸浓度比较

Fig. 2 Extracellular nucleotide concentration in cell suspension of fusant SPSC exposed to 15% (V/V) ethanol at 30℃

The denotations of symbols and lines are identical to those described in Fig. 1 except that the concentration of ethanol with which cells were incubated was 15% (V/V)

(1)对于添加任何一种脂肪酸而言,生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的胞外核苷酸浓度低于生长于单独添加脂肪酸条件下的菌体的水平,这说明生长于同时添加酒精条件下的菌体耐酒精能力的提高(图 1)与其在高浓度酒精冲击下具有较低的胞外核苷酸浓度密切相关。(2)生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的胞外核苷酸浓度随生长时所添加的酒精浓度的升高而降低。(3)对于添加任何一种酒精浓度(6%~9%, V/V)而言,胞外核苷酸浓度由小到大的排列顺序为:细胞膜富含棕榈酸、细胞膜富含亚油酸和细胞膜富含亚麻酸,这恰与存活率由高到低的排列顺序完全一致(图 1),表明菌体耐酒精能力的提高与其胞外核苷酸浓度的降低密切相关,这些特点与培养于单独添加脂肪酸条件下的菌体的情况相似。

表 2 为生长于同时添加脂肪酸和酒精条件与生长于单独添加脂肪酸条件的菌体于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下细胞膜透性的比较。可见,细胞膜透性系数的变化趋势与上述胞外核苷酸浓度的变化趋势相似:生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下

表 2 培养于单独添加脂肪酸与同时添加酒精不同条件的融合株 SPSC 于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下细胞膜透性系数的比较

Table 2 Plasma membrane permeability coefficient (P') of fusant SPSC grown on different fatty acid supplements in the presence or absence of ethanol before exposure to 15% (V/V) ethanol at 30℃

Culture condition		P'/(cm/h)
Fatty acid added*	Ethanol added/(%, V/V)	
16:0	0	1.22 × 10 ⁻⁶
	6	5.16 × 10 ⁻⁷
	9	3.25 × 10 ⁻⁷
18:2	0	3.28 × 10 ⁻⁶
	6	1.48 × 10 ⁻⁶
	9	8.63 × 10 ⁻⁷
18:3	0	6.04 × 10 ⁻⁶
	6	2.89 × 10 ⁻⁶
	9	1.95 × 10 ⁻⁶

*0.6 mmol/L Palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2) or linolenic acid (18:3), was added to the medium in which fusant SPSC was grown.

的菌体的细胞膜透性系数均低于生长于单独添加同一种脂肪酸条件下的菌体的水平,表明生长于添加酒精条件下的菌体耐酒精能力的提高与其细胞膜透性的降低密切相关;同时细胞膜透性随添加酒精浓度的升高而降低;另外,对于添加任何一种酒精浓度(6%~9%, V/V)而言,细胞膜透性由小到大的排列顺序均与菌体耐酒精能力由高到低的排列顺序(图1)完全一致,表明菌体耐酒精能力的提高与其具有较低的细胞膜透性密切相关,这些特点与培养于单独添加脂肪酸条件下的菌体的状况相似。

3 讨 论

在单独添加脂肪酸条件下,棕榈酸、亚油酸和亚麻酸各自组入菌体细胞膜后形成的三种细胞膜的透性差异显著(图2和表2),提示三者对形成细胞膜渗透屏障的潜力明显不同,棕榈酸明显强于亚油酸和亚麻酸,表明饱和脂肪酸棕榈酸在维持细胞膜渗透屏障方面的作用显然优于多烯脂肪酸亚油酸和亚麻酸。在同时添加脂肪酸和酒精试验中可观察到菌体对这三种性质不同的脂肪酸的取舍(表1):在菌体生长中同时添加棕榈酸和酒精时,酒精的存在明显促进棕榈酸进一步组入细胞膜,并且组入的量随酒精浓度的升高而增加;在同时添加亚油酸和酒精时则观察到,酒精的存在未明显促进亚油酸组入细胞膜,取而代之的是膜中单烯脂肪酸油酸含量的明显增加;另外,在同时添加亚麻酸和酒精时观察到,酒精的存在降低亚麻酸组入细胞膜,取而代之的也是膜中单烯脂肪酸油酸含量的显著增加。与生长时仅添加脂肪酸相比,菌体生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下出现的细胞膜磷脂脂肪酸组成的这些调整策略(特别是棕榈酸和油酸含量的明显增加),已被存活率实验结果(图1)证实对菌体耐酒精是有利的,是菌体对酒精刺激的适应性响应,因为生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的耐酒精能力明显高于生长于单独添加同一种脂肪酸条件下的菌体的水平(图1);同时,这些调整策略已被细胞膜透性实验结果(表2)证实对加强菌体细胞膜渗透屏障是有利的,因为生长于同时添加脂肪酸和酒精条件下的菌体的细胞膜透性明显低于生长于单独添加同一种脂肪酸条件下的菌体的水平(表2)。可见,棕榈酸(饱和脂肪酸)和油酸(不饱和脂肪酸)都可通过加强细胞膜渗透屏障而提高菌体的耐酒精能力,提示饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸在影响酵母菌耐酒精能力的机制上存在共同的作用方式,而且,这种饱和脂肪酸

(SFA)与不饱和脂肪酸(UFA)对菌体耐酒精能力均可产生促进作用的现象出现于同一菌株。迄今为止,有关UFA与SFA何者在酵母菌耐酒精中起决定作用的问题,来自不同的研究尚未取得一致的看法,有的认为UFA起决定作用,有的认为SFA与酵母菌耐酒精关系密切,但是,这些实验现象均发生于不同的菌株。因此,本工作所取得的这些研究结果,可能有助于人们拓宽和加深对酵母菌耐酒精机制的了解,同时,对进一步探索SFA与UFA在酵母菌耐酒精中的共同作用本质可能具有一定的帮助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ingram LO. Microbial tolerance to alcohol: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology*, 1986, 4: 40-44
- [2] Ingram LO, Buttkle TM. Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 1984, 25: 253-300
- [3] D'Amore T, Panchal CJ, Russell I et al. A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1990, 9: 287-304
- [4] Mishra P, Kaur S. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34: 697-702
- [5] Casey GP, Ingledew WM. Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 1986, 13: 219-290
- [6] Odumeru JA, D'Amore T, Russell I et al. Alterations in fatty-acid composition and trehalose concentration of *Saccharomyces* brewing strains in response to heat and ethanol shock. *Journal of Industrial Microbiology*, 1993, 11: 113-119
- [7] Mishra P, Prasad R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 30: 294-298
- [8] Jones RP, Greenfield PF. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast*, 1987, 3: 223-232
- [9] del Castillo Agudo L. Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 37: 647-651
- [10] Arneborg N, Hoy CE, Jorgensen OB. The effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in a chemostat. *Yeast*, 1995, 11: 953-959
- [11] Bai FW(白凤武), Jin Y(靳艳), Feng PS(冯朴芬) et al. Studies of ethanol fermentation using a fusant SPSC flocs—description of flocs, growth and ethanol fermentation kinetics. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, 15: 455-460
- [12] Chen RF. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 25: 173-181
- [13] Hu CK, Bai FW, An LJ. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1191-1194

- [14] Mizoguchi H, Hara S. Effect of fatty acid saturation in membrane lipid bilayers on simple diffusion in the presence of ethanol at high concentrations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, 81: 406 - 411
- [15] Dickinson DP, Isenberg I. Preparation of spheroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology*, 1982, 128: 651 - 654
- [16] Schibeci A, Rattray JBM, Kidby DK. Isolation and identification of yeast plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, 311: 15 - 25
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254
- [18] Cartwright C, Veazey FJ, Rose AH. Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 1987, 133: 857 - 865
- [19] Palfauf F, Kohlwein SD, Henry SA. Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. In: Jones EW, Pringle JR, Broach JR (eds). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol 2, Gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, pp. 415 - 500
- [20] Kajiwara S, Shirai A, Fujii T *et al.* Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the *FAD2* gene from *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 4309 - 4313
- [21] Steels EL, Learmonth RP, Watson K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, 1994, 140: 569 - 576

Impact of Exogenous Fatty Acid on Ethanol-induced Alterations in Phospholipid Fatty Acid Composition of Plasma Membranes of a Self-flocculating Yeast

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 Ethanol-induced alterations in phospholipid fatty acid composition of plasma membranes of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* grown in the presence of exogenously supplemented fatty acid were investigated. The addition of palmitic acid (0.6 mmol/L) to the medium containing 6% ~ 9% (V/V) ethanol resulted in a marked increase in the palmitic acid content and decreases in the contents of myristoleic, palmitoleic, and oleic acids in the phospholipid fatty acid composition of plasma membranes, as compared with their contents in the absence of ethanol. On the other hand, the addition of both linoleic acid (0.6 mmol/L) and ethanol (6% ~ 9%, V/V) to the basal medium resulted in a striking increase in oleic acid and corresponding decreases in myristoleic, palmitoleic and palmitic acids, while the linoleic acid content was slightly increased. Moreover, the addition of both linolenic acid (0.6 mmol/L) and ethanol (6% ~ 9%, V/V) also resulted in a significant increase in oleic acid and corresponding decreases in myristoleic, palmitoleic and palmitic acids, however, the linolenic acid levels were decreased. All these alterations (especially increases in palmitic acid and oleic acid) were confirmed to be the adaptive responses of cells to ethanol because cells grown with both fatty acid and ethanol acquired a pronounced increase in viability and a corresponding decrease in plasma membrane permeability when they were subsequently exposed to high concentration of ethanol. These data suggest that both palmitic acid and oleic acid are able to enhance the tolerance of the self-flocculating yeast to ethanol by strengthening plasma membrane permeability barrier of this strain subjected to ethanol stress. This is a novel phenomenon because enhancement by unsaturated and saturated fatty acids on ethanol tolerance occurs in the same strain.

Key words ethanol tolerance, phospholipid fatty acid composition, plasma membrane permeability barrier, viability

Received: 04-05-2004

This work was supported by Grant from the State "863" High Technology Research and Development Project of China (No. 2002 AA647060).

* Corresponding author. Tel: 86-595-22693508; Fax: 86-595-87375826; E-mail: chkh0600@sina.com