

微粒体膜苹果酸酶活性与 γ -亚麻酸含量的关系

禹慧明 姚汝华 卢涪德

(华南理工大学生物工程系 广州 510641)

摘要 用能生产不同 GLA 含量的油脂的被孢霉为试验材料,研究菌体所产油脂的 GLA 含量与菌体的微粒体膜结合的苹果酸酶活性之间的关系。结果表明,微粒体膜的苹果酸酶活性与菌体油脂的 GLA 含量存在显著的正相关关系,由苹果酸酶原位产生的 NADPH 是微粒体膜磷脂上脂酰基完成去饱和作用的关键所在,胞基质中的 NADPH 在脂肪酸的延长和去饱和中不能发挥作用。

关键词 被孢霉, γ -亚麻酸, 微粒体, 苹果酸酶

分类号 Q 939.5

多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 由于其广泛的生理活性^[1], 已引起了全世界的关注和重视, PUFAs 在药品和功能性食品中的应用越来越广泛, PUFAs 的需求量日益增加, 利用微生物等生物技术生产 PUFAs 已成为当今潮流^[2~4]。但由于对其代谢途径的认识还不够深入, 在微生物育种方面进展艰难。

一系列连续的去饱和及延长反应是亚油酸 (18: 2n-6) 和 α -亚麻酸 (18: 3n-3) 分别转化成 n-6、n-3 长链不饱和脂肪酸的基本途径^[5~7], 去饱和作用是全过程中的限速步骤^[7]。真核生物中油酸以后的去饱和作用, 需借助脂酰基连接到磷脂上, 是一种与微粒体相联系的行为^[8~12], 分别由不同的去饱和酶催化。这些去饱和酶既要求分子氧, 又要求 NADPH, 氧化脱氢反应可表示为: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2- + \text{H}^+ + \text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow -\text{CH}=\text{CH}- + \text{NADP}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ 。

前人根据实验结果推测, 胞基质中的可溶性苹果酸酶产生的 NADPH 用于脂肪酸合成^[13, 14], 而微粒体膜上的苹果酸酶则可能产生

脂肪酸去饱和及延长作用所需的 NADPH^[15]。

我们用能产生不同 γ -亚麻酸 (GLA) 含量的油脂的被孢霉为材料, 分别测定了它们的微粒体制剂和胞基质中的苹果酸酶活性, 以探索真菌体内 GLA 和其它 PUFAs 的合成及调控机理, 为更好地调控 PUFAs 代谢提供依据。关于这类问题的研究, 以前未见同类报道。

1 材料和方法

1.1 菌体培养

1.1.1 菌种: 由华南理工大学发酵工程研究室保藏的被孢霉 (*Mortierella*) 的三个菌株。

1.1.2 发酵培养基 (g/l): 葡萄糖 100, 麦芽糖 0.5, 尿素 3.0, KH_2PO_4 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, NaCl 0.2, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.3, 微量元素液 2.0 ml/l。

本课题为国家科委中国生物工程开发中心“九五”重点科技攻关项目及华南生物科学与技术研究中心资助项目

1997-01-27收稿

1.1.3 微量元素液(mg/ml): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2.

1.2 微粒体制备

湿菌体加 50mM pH7.5 磷酸缓冲液(内含 0.25M 蔗糖, 14mM 巯基乙醇, 1mM EDTA)在冰浴中磨成匀浆, 匀浆在 0~4℃, 20,000g 离心 20min, 上清液抽滤除去脂质, 滤液在 0~4℃, 100,000g 离心 80min, 沉淀(微粒体)和上清液(胞基质)分别测定酶活性。微粒体用提取液洗涤一次, 再用提取液重新浮成 5ml 溶液。

1.3 苹果酶活性测定: 详见文献 [15, 16]。

1.4 油脂中 GLA 含量测定

1.4.1 油脂提取及甲酯化: 干菌粉用 60~90℃ 石油醚抽提, 用 $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 法甲酯化。

1.4.2 GLA 含量测定: GC-9A 气相色谱仪, C-R3A 处理机, FID 检测器; 毛细管色谱柱, FFAP 50m × 0.32mm; 载气 H_2 , 柱前压 75KPa, 分流进样; 柱温 240℃, 进样器及检测器温度 260℃; 内标法定量。

2 实验结果

2.1 不同菌株油脂中 GLA 含量

不同菌株油脂中 GLA 含量不同。

2.2 不同菌株的微粒体膜中苹果酶活性

不同菌株的微粒体膜中苹果酶活性高则对应的 GLA 含量也高, 而胞基质中酶活性的菌株差异不明显。结果见表 1。

表1 不同菌株油脂中GLA含量及微粒体膜和胞基质中苹果酶活性

菌株编号	GLA含量 (%)	苹果酶活性 (活力单位/mg蛋白)	
		微粒体膜	胞基质
1	4.09	3.58	205.3
		4.59	204.5
2	3.88	5.33	239.2
		4.07	239.1
3	1.69	3.36	221.1
		2.08	172.9

2.3 菌株的苹果酶活性与油脂中 GLA 含量间的相关分析

不同菌株的微粒体膜的苹果酶活性与油脂 GLA 含量间的相关系数 $r = 0.75$, 经相关系数显著性 t 检验, $t = 2.27 > t_{4,0.05} = 2.132$, 表明微粒体膜的苹果酶活性与油脂 GLA 含量两者呈显著的正相关关系。

不同菌株的胞基质中苹果酶活性与油脂 GLA 含量间的相关系数 $r = 0.46$, $t = 1.038 < t_{4,0.05} = 2.132$, 说明二者间无相关关系。

3 讨论

18C 以下的脂肪酸的合成在胞基质中进行, 以 NADPH 作为必需的供氢体, NADPH 主要来自磷酸戊糖途径。18C 以后的多不饱和脂肪酸的去饱和及碳链延长反映则是通过脂酰基连接到膜磷脂上完成的, 需要 NADPH 和 O_2 。业已证明: 这些去饱和作用发生在真核生物的微粒体上, 磷脂是脂酰基去饱和和作用的载体^[8~12], 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇是去饱和和作用的底物^[15]。

Kendrick 等^[14]发现苹果酸能促进卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides*) 的微粒体的去饱和和作用, 使表观终产物 GLA 的含量提高。这可能是苹果酶为去饱和作用提供 NADPH 的结果。

我们的实验结果表明, 不同菌株的微粒体膜结合的苹果酶活性与菌体油脂中 GLA 含量呈显著的正相关性, 证实了该酶的作用即为脂肪酸的去饱和提供 NADPH, 该酶是 PUFAs 形成中的一个起关键作用的酶; 胞基质中苹果酶活性很高, 却与油脂的 GLA 含量无相关关系, 进一步证明了脂肪酸的去饱和作用发生在微粒体膜上, 而且需要在膜上原位产生的 NADPH 参与去饱和过程, 胞基质中的 NADPH 不能发挥作用。Kendrick 等^[15]用外源的 NADPH 不能促进 GLA 含量提高; 微粒体膜上其它能产生 NADPH 的酶只有葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 将葡萄糖-6-磷酸加入微粒体中培养, 不能促进去饱和作用, 而加入苹果酸的结构类似物羟基丙二酸抑制苹果酶活性, 则苹果酸

对去饱和的促进作用丧失。这些结果暗示着微粒体结合的苹果酸酶产生的 NADPH 与脂肪酸的去饱和作用可能存在一定程度的专一对应关系, 苹果酸酶有着不可替代的作用, 由苹果酸酶催化的 NADPH 的原位产生可能是成功地完成去饱和作用的关键所在。

在植物和动物中, NADPH 的氧化作用通过 Cyt b₅ 与脂肪酸去饱和作用相联系^[9, 12]。而真菌中的情况可能不同或更复杂, 因外源 NADPH 能还原 Cyt b₅, 却不能提高 GLA 含量^[15], 要证明真菌中 NADPH 与去饱和作用之间的联系, 还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Robert, G. A. & Stephen, C. C., Adv. Appl. Lipid Res. 1992, 1: 161~215.
- [2] 钟辉, 张峻, 邢来君, 微生物学报, 1994, 21(4): 237~239, 236.
- [3] 徐天宇, 食品与发酵工业, 1995, (1): 56~64.
- [4] 张峻, 邢来君, 王红梅, 微生物学通报, 1993, 20(3): 140~143.
- [5] Brenner, R. R., Mol. Cell Biochem. 1974, 3: 41~

52.

- [6] Brenner, R. R., The Role of Fats in Human Nutrition, 2nd edn. Academic Press, London, 1989, 45~79.
- [7] Voss, A. C. & Sprecher, H., Lipids, 1988, 23: 660~665.
- [8] Harwood, J. L., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1988, 39: 101~138.
- [9] Schweizer, E. In Microbial Lipids, Academic Press, London, 1989, Vol. 2, pp. 13~50.
- [10] Kearns, E. V., Hughly, S. and Somerville, C. R. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 284: 431~438.
- [11] Griffiths, G., Stobart, A. K and Stymne, S., Biochem. J. 1988, 252: 641~647.
- [12] Smith, M. A., Cross, A. K. and Jones, O. T. G. et al. Biochem. J. 1990, 272: 23~29.
- [13] Ratledge, C. & Evans, C. T. The Yeasts, Academic Press, London, 1989, Vol. 3, 367~455.
- [14] Ratledge, C. Microbial Lipids, Academic Press, London, 1989, Vol. 2, 567~668.
- [15] Kendrick, A. & Ratledge, C., Eur. J. Biochem. 1992, 209: 667~673.
- [16] 上海植物生理学会编, 植物生理学实验手册, 上海: 上海科技出版社, 1985, 177~179.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY OF THE MICROSOMAL MEMBRANE-BOUND MALIC ENZYME AND γ -LINOLENIC ACID CONTENT

Yu Huiming Yao Ruhua Lu Yingde

(Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract In this paper, the relationship between γ -linolenic acid (GLA) content of mycelial lipid and the activity of the microsomal membrane-bound malic enzyme of *Mortierella* is investigated. The results indicate that there is a significant positive relativity between the microsomal malic enzyme activity and the mycelial lipid GLA content. The generation of NADPH *in situ* by malic enzyme appeared to be the key of successful desaturation of the fatty-acyl group in the microsomal membrane phospholipids. The NADPH generated in cytosolic malic enzyme can not act for the desaturation of fatty acid.

Key words *Mortierella*, γ -linolenic acid (GLA), Microsome, Malic enzyme