

# 酶促磷酸化合成腺三磷的 影响因素及其合成机制的初步报告\*

生物系生化微生物专业学员\*\*

歐伦英 张日新 徐錦田 李 敏

## 摘 要

对利用啤酒酵母活体的复合酶系磷酸化合成腺三磷(ATP)进行了研究。证明反应系统中葡萄糖浓度为0.1M时ATP的轉化率最高。啤酒酵母經8°C深水貯藏4—7天后磷酸化合成ATP的能力显著增强。在反应系统中乙醛和甲苯加入与否并不显著影响ATP的合成。用加入抑制剂的方法对啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP的途径进行了初步研究,結果是:丙二酸和NaF强烈抑制ATP的合成;而NaN<sub>3</sub>, 2,4-DNP只有很少的抑制效果。证明啤酒酵母磷酸化合成ATP主要是通过EMP途径代謝水平的无氧磷酸化,而氧化磷酸化不是主要的。据此理論,把属于有氧呼吸类型的白地霉置于通有氮气的水中,密封貯藏于8°C冰箱中7天后,代替啤酒酵母泥进行磷酸化合成ATP的試驗,結果得到了59.2%的轉化率,而不經处理的新鲜白地霉在同样条件下是不能把AMP磷酸化合成ATP的。这不仅进一步提供了上述論点的証据,且說明生产上採用核酸含量高的需氧菌株代替来源較少的属厌氧呼吸的啤酒酵母进行酶促磷酸化合成ATP是可能的。

## 前 言

ATP是生物体内能量代謝中重要的高能中间物质,与各种代謝有密切关系。数十年来它一直是人們进行理論研究的重要对象。近年来由于ATP作为药物用于临床,对垂危病人之抢救、心肌炎、肌肉萎縮等症治疗效果卓著而得到进一步的发展。我国人民遵照伟大领袖毛主席关于“自力更生, 艰苦奋斗”“综合利用大有文章可做”的

\* 1974.1.8接稿

\*\* 指导教师范培昌

教导,创造了许多生产ATP的新工艺。利用味精厂、啤酒厂、糖厂等下脚料酶促磷酸化生产ATP就是一例。生产的发展要求对此工艺所用原料、反应系统、菌株选择及反应机制进一步探索,这即是本文的目的。

1967年,日本 T. Tochikura 及其同事研究了丙酮干燥或磨碎的面包酵母磷酸化合成ATP的反应系统,提出了无机磷和葡萄糖浓度对合成ATP的影响,并对此合成机制提出了假设<sup>[2]</sup>。1968年日本 H. Tanaka 等采用产氨短杆菌ATCC6872磷酸化合成ATP获得成功<sup>[3]</sup>。自此开创了利用微生物体内复合酶系磷酸化合成种种核苷酸及其衍生物的工业生产途径。短短几年来已用此法原理相继合成了尿三磷(UTP)、尿二磷—葡萄糖(UDP—G)及尿二磷—半乳糖<sup>[4,5,6]</sup>,尿二磷—N—乙酰氨基葡萄糖(UDPAG)<sup>[7,8]</sup>;胞三磷(CTP)、胞二磷—乙醇胺(CDP—EA)及胞二磷胆碱(CDP—choline)<sup>[9,10,11]</sup>,鸟三磷(GTP)、鸟二磷甘露糖(GDPM)<sup>[8,12,13,14]</sup>,辅酶 I (NAD)<sup>[15]</sup>;辅酶 II—二磷酸(NADP—diphosphate)及辅酶 II 类似物(NADP—analogue)<sup>[16]</sup>,辅酶 A(CoA)<sup>[17,18]</sup>等十数种产品。1972年日本 k. Ogata 等综评了这方面工作<sup>[19]</sup>。最近日本 S. Watanabe 等采用一种称为 *Candida sp. N—25—2* 菌株进行直接发酵生产ATP的工作中,应用了酶促磷酸化合成ATP的某些原理取得了一定进展而引人注目<sup>[20,21]</sup>。但上述工作由于刚开始,尤其是对合成机制尚处于引用和假设阶段,缺乏直接证据。

我校办工厂自1971年试制成功酶促磷酸化合成ATP工艺以来,曾对所用活体的啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP的反应系统作了一些工作<sup>[1]</sup>。本文进一步探讨各种影响因素,并对其合成机制进行初步研究。

## 材料与 方法

**一、反应系统** 除采用我校办工厂目前所用反应系统外<sup>[1]</sup>,还以上海生物化学药厂所用反应系统进行比较。其反应系统组成是:腺—磷(简称AMP,上海味精厂出品,纯度80.3%) 12.23克加水500毫升,用6N NaOH调 $P^H$ 7.0;加 $NaH_2PO_4$  40克,4% $MgCl_2$  10毫升,4% $KCl$  10毫升,10%乙醛10毫升,甲苯15毫升,经离心的酵母坭(取自广州饮料厂,经试验菌体不能为“美兰”染色)400克,葡萄糖50克。用热水调到37℃,并使总体积达2000毫升。置37℃温箱反应6—7小时,反应过程中不断取样分析。

**二、分析方法** 自反应开始每隔30—60分钟取样10毫升,离心取上清10微升进行纸电泳。电泳条件是电压300V,电流10mA左右。缓冲液是 $P^H$ 3, 0.05M柠檬酸缓冲液。所得各电泳斑点分别浸于0.01N HCl中12小时后,用Unicam Sp. 500型分光光度计定量。对各斑点测除吸收光谱、吸收比外并用标准品核照。

### 三、试验处理

1. 关于不同葡萄糖量及酵母不同贮藏天数对ATP合成的影响:取自广州饮料厂

16代啤酒酵母泥，分数十缸同时置于8℃冰箱中。每缸酵母泥400克，加水1000毫升。每天取出一缸加上上述反应系统（葡萄糖除外）后，摇匀，均分为5组，分别加葡萄糖使其浓度为75、100、125、150、175毫克分子。反应开始后每隔30分取样分析，直到7小时为止。如此重复，每天5组，连续试验13天。

2. 关于乙醛、甲苯对ATP合成的影响：情况同1，但系取用8℃下贮藏6—7天的16代啤酒酵母泥。葡萄糖浓度均为100mM。反应系统中乙醛和甲苯或加、或不加，或反应90分钟后加。

3. 关于酶促磷酸化合成ATP途径的研究：采用8℃下贮藏4天的第3代酵母泥，加入甲苯的同时分别用0.1M丙二酸、0.1M NaF、0.1M NaN<sub>3</sub>及0.05M 2,4-D NP分别饲喂10分钟，再加前述反应系统，并使各抑制剂浓度维持上述浓度的1/10，各组酸碱度均调到P<sup>H</sup>7.0，对照用水代替。辅助试验证明，经8℃贮藏4天，加有甲苯之酵母泥（加入甲苯之酵母能被美兰染色）不用真空渗入法也能达到同样抑制效果。自反应开始后每隔30分钟取样分析测定，直到7小时为止。

4. 关于用白地霉进行酶促磷酸化合成ATP的试验：取自广州食品社液体培养所得新鲜白地霉，经水洗压榨后，菌体分缸贮藏于8℃冰箱中，每缸菌体400克，加水1000毫升。其中取三缸用贮氮钢瓶通氮气15分钟后密封贮藏。7天后取出，经离心，湿固块按啤酒酵母的比率加前述反应系统。对照除取用同样条件下贮藏而未通氮气的白地霉外，另取未处理之新鲜白地霉进行平行试验。反应开始后每隔一小时取样分析测定一次，直到7小时为止。

## 结果与讨论

### 一、不同贮藏天数对酵母酶促磷酸化合成ATP的影响。

(图1)是16代啤酒酵母泥贮藏于8℃下不同天数所得ATP转化率。虽然试验采用上海生物化学药厂所用反应系统，而其结果和采用我校办工厂所创反应系统的试验结果相似<sup>[1]</sup>。再次证明，新鲜的未经丙酮干燥或其他方法处理的活的啤酒酵母经8℃深水贮藏是必要的。图1表明新鲜的未经贮藏的往往毫无收获，贮藏1天的只有10%的转化率，而贮藏4—9天时ATP转化率较高，但贮藏过久往往许多菌体可被美兰染色而使转化率

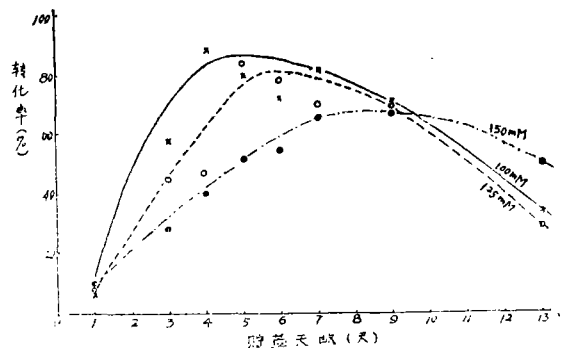


图1 16代啤酒酵母泥于8℃下贮藏不同天数，所得ATP转化率(示三种不同葡萄糖浓度)

下降,这可能是部分酵母菌产生自溶失去酶活力的结果。我们认为贮藏的效果在于使酵母在没有补充养料的情况下处于低能水平,有利于高能中间物质ATP的合成,但目前尚缺直接证据,有待进一步工作。

## 二、不同葡萄糖浓度对酶促磷酸化合成ATP的影响

(图1)所示三种葡萄糖浓度在不同贮藏天数时ATP转化进程。差别并不十分显著,但似乎浓度越大,ATP转化越少,且高峰有向后移的趋势。为了更进一步探讨各种葡萄糖浓度对ATP转化的影响,取8℃下贮藏7天的16代酵母分别给予75、100、125、150、175mM的糖量。结果如(图2)所示。葡萄糖浓度虽然不同,但ATP转化高峰都在3—4小时之间,反应进程也大致相同,而以葡萄糖浓度为100mM的转化率最高。在此反应条件下所得结果与T. Tochikura及其同事在磨碎面包酵母上所得葡萄糖浓度大时ATP形成迟缓的结论<sup>[2]</sup>不同,虽然采用葡萄糖浓度大于基本组成两倍时也未得此结果<sup>[1]</sup>。说明不同条件结果是不一样的。采用生活的啤酒酵母坭磷酸化合成ATP时,用100mM的葡萄糖量是符合节约原则的。

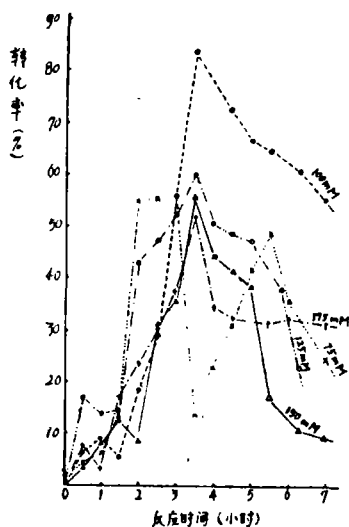


图2 不同葡萄糖浓度下ATP的转化进程

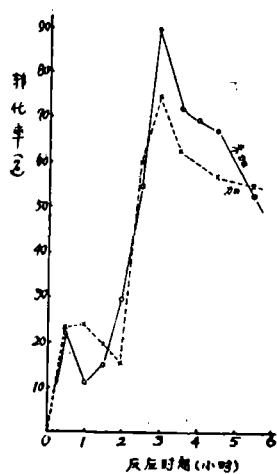


图3 甲苯对ATP转化进程的影响

至于较低浓度(75mM)的葡萄糖使ATP转化出现明显的双峰曲线的原因尚待进一步研究。

## 三、甲苯对磷酸化合成ATP的影响

对甲苯的作用国内的想法不一,或加或不加。我们试验的结果如(图3)所示。加不加甲苯对ATP转化进程影响并不显著,未加甲苯的转化率略有提高。多次试验证明,不加甲苯的酵母细胞不能为美兰染色,而加甲苯者多数细胞能为美兰染色。显然甲苯具有破坏活体胞膜加强透性的作用。我们认为酶促合成ATP主要是利用活

体中复合酶系，加甲苯后仍然能获得相当的产量，说明甲苯并未影响ATP的合成酶系。至于增加透性，我们认为ATP分子量不大，并不影响ATP排出胞外。有人认为加甲苯后可减少热原质的产生的说法有待进一步探讨。

#### 四、乙醛对磷酸化合成ATP的影响

乙醛的使用和甲苯一样，各地所用反应系统并不一样，可分为先加、不加或反应进行到90分钟后加三种情况。我们试验结果如图(4)所示。三种情况结果基本一致，说明乙醛对ATP转化进程和ATP转化率均无明显影响。但我们在生产ATP的过程中往往有这样情况，某些啤酒酵母虽经处理(也未发现反应前被美兰染色的情况)，但其合成ATP的能力仍然很差。用薄层层析法<sup>(1)</sup>跟踪反应进程，发现3—4小时后仍无大量ATP形成，如图(5)实线所示。此时加入乙醛(有些单位用补加酵母的办法补救)往往能促使ATP形成，如图(5)虚线所示。乙醛是乙醇的前体，是否乙醛具有反馈抑制控制ATP合成途径的作用值得深入研究。

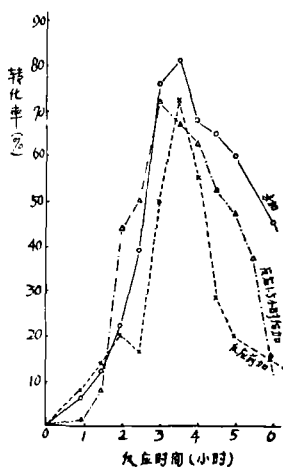


图4 乙醛对ATP转化进程的影响

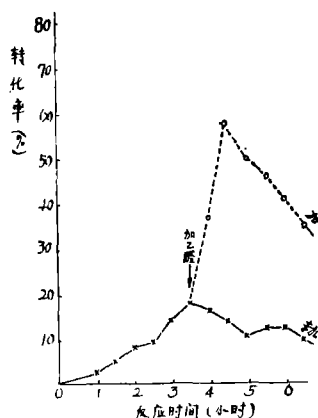


图5 因某种未知原因不能形成ATP的啤酒酵母补加乙醛的效果

#### 五、用各种抑制剂研究酶促磷酸化合成ATP途径的结果与讨论

学者们认为<sup>(22)</sup>，NaF抑制烯醇化酶活性，也就是抑制EMP途径；丙二酸抑制琥珀酸脱氢酶活性，也就是抑制TCA途径；NaN<sub>3</sub>抑制含重金属的氧化酶活性，而二硝基酚抑制氧化磷酸化过程。我们用这些抑制剂分别作用于同一条件的酶促磷酸化合成ATP的反应系统，发现NaF和丙二酸强烈抑制啤酒酵母磷酸化合成ATP。经计算，ATP的转化率二者均比对照低74% (见图6 A,B,C)；而NaN<sub>3</sub>和2,4-DNP对啤酒酵母磷酸化合成ATP影响并不显著，以ATP合成反应进程的最大值比较，二

者只比对照下降了14%和20% (见图 6D、E), 但反应进程的高峰明显地推迟, 尤其是用2,4-DNP的处理。这一结果清楚地说明用啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP主要是通过EMP途径无氧磷酸化作用合成并积累的, 而氧化磷酸化不是主要的。

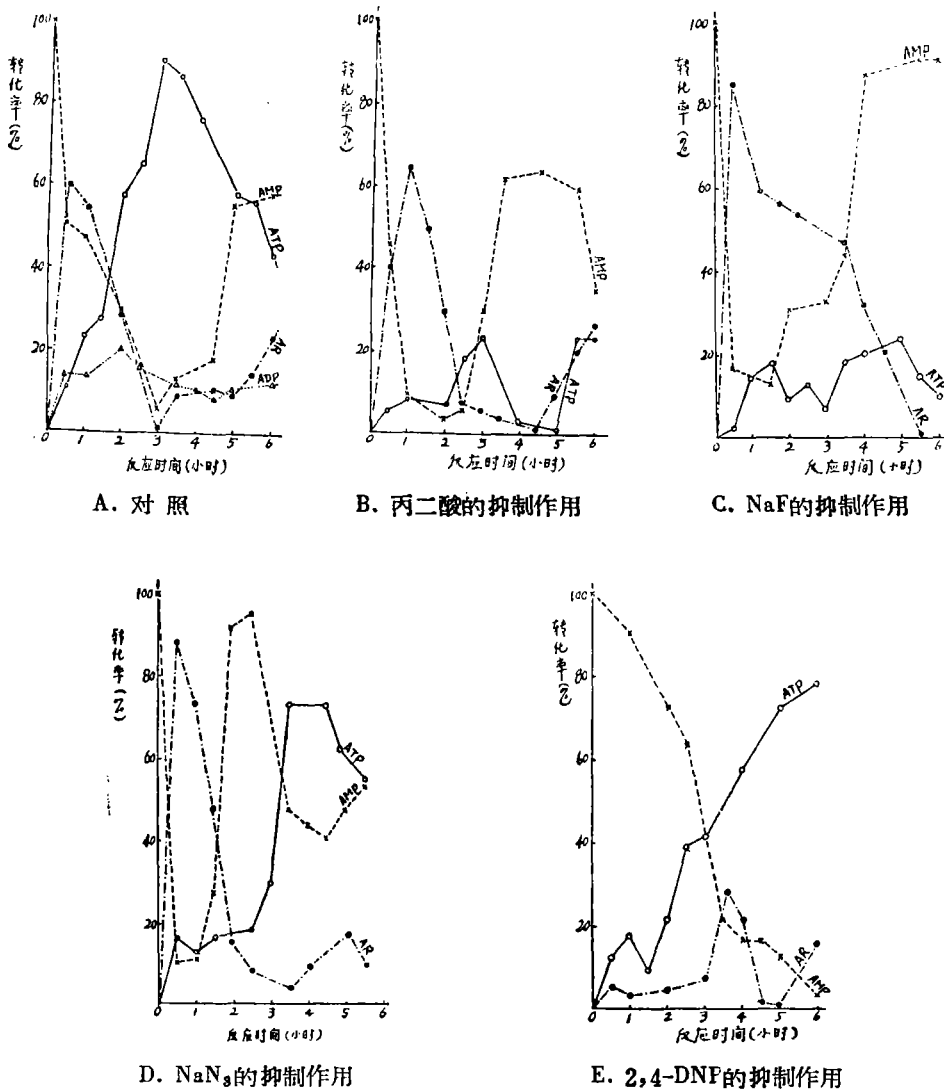


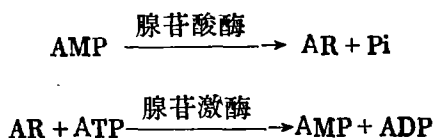
图 6 各种抑制剂对啤酒酵母磷酸化合成ATP的作用

值得注意的是, 凡采用上海生物化学药厂制定的反应系统的所有实验, 都在电泳谱上发现有向负极移动的物质, 经鉴定其在0.1NHCl中之吸收比为:

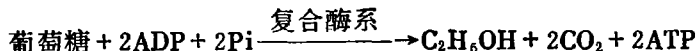
$$250\text{m}\mu/260\text{m}\mu = 0.88; 280\text{m}\mu/260\text{m}\mu = 0.195; 290\text{m}\mu/260\text{m}\mu = 0.04$$

此值与标准腺苷相似。其电泳泳动距离亦相等，确证是腺苷(简称AR)。正如图(6A)所示，AMP能在20分钟内脱磷形成AR，转化率竟达60%。以后随ATP的形成和增加而和AMP一起逐渐减少，当ATP在3—4小时内形成高峰时，AR和AMP降到最低点，以后又随ATP之减少而逐渐增加。抑制剂NaF和丙二酸强烈抑制了ATP之形成却不能抑制AR之形成。AMP和AR形成了明显的对映曲线(图6B、C)。抑制剂NaN<sub>3</sub>明显地推移了ATP形成的高峰期，在此之前AMP和AR呈明显的对映曲线，当ATP形成高峰时AMP和AR又如对照那样同时下降(图6D)。抑制剂2,4—DNP是个例外(图6E)，显然2,4—DNP对AMP脱磷的酶系有一定影响。

根据上述结果，我们认为啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP是通过下列途径(指上海生物化学药厂所用反应系统，该系统磷含量较低)：



式中ATP是酵母体内原有的。根据磷酸化合成ATP的途径几乎被NaF全部抑制的结果，我们认为上式所得ADP通过下式形成ATP，



因此，ADP作为中间体始终保持在15%左右的转化量上。

啤酒酵母磷酸化合成ATP不被二硝基酚和迭氮化钠所抑制，说明合成并不通过氧化磷酸化途径。但此结果又和ATP合成受丙二酸强烈抑制的实验结果相矛盾。学者们认为被丙二酸抑制的三羧酸循环是和氧化磷酸化相偶联<sup>(22)</sup>。是否可能因为酵母是兼性菌这种偶联并不紧密，抑或是在此试验条件下磷酸化合成ATP还存在着另一条可被丙二酸抑制的途径，值得进一步试验研究。

### 六、白地霉代替啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP的结果

白地霉属好气菌。核酸含量高。因其适应性强易于培养，我国许多工厂把它作为综合利用提取核酸和辅酶A的好材料。但用新鲜的生活的白地霉代替啤酒酵母酶促磷酸化合成ATP不能成功，AMP将毫无转化。我们根据

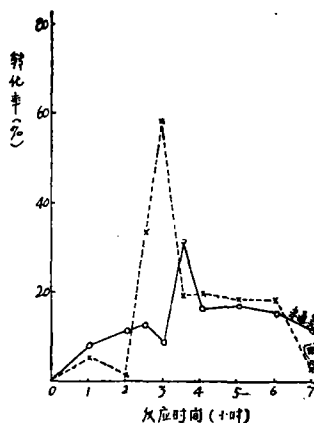


图7 用白地霉酶促磷酸化合成ATP的反应进程

上述ATP合成机制研究结果,把白地霉通氮气深水密封贮藏于8℃下7天,并用不通氮气的同样贮藏条件作对照。结果通氮气的白地霉把59.2%的AMP转化为ATP,对照也获得了32.6%的转化率,其反应进程如(图7)所示。由于我们这方面工作不多,反应条件尚未研究,因此转化率尚比不上啤酒酵母,但亦说明无氧磷酸化途径是酶促磷酸化合成并积累ATP的主要途径。充分理解这一点,就有可能采用生活的需氧菌株来代替来源较少的啤酒酵母进行酶促磷酸化合成ATP及其他核苷酸衍生物。事实上,广东江门甘蔗化工厂用厌气培养基培养好气菌—药用酵母坭24小时,代替啤酒酵母生产ATP已获得成功,更证明EMP是酶促磷酸化合成ATP的主要途径。

### 参 考 文 献

- (1) 中山大学生物系生化微生物教研室 《微生物学报》13(2), 185(1973)。
- (2) Tochikura, T., Kuwahara, M., Yogi, S., Okamoto, H., Tominaga, Y., Kano, T., Ogata, K: J. Ferment. Technol., 45,511(1967)。
- (3) Tanaka, H., Sato, Z., Nakayama, K., Kinoshita, S: Agr. Biol Chem. 32,721 (1968)。
- (4) Tochikura, T., kawai, H., Tobe, S., Kawaguchi, K., Csugi, M., Cgata, K. J. Ferment. Technol., 46,957(1968)。
- (5) Tochikura, T., Kawaguchi, K., Kawai, H., Mugibayashi, Y, Ogata, K: J. Ferment. Technol., 46,970(1968)。
- (6) Tochikura, T., Mugibayashi, Y., Kawai, H., Kawaguchi, K., Ogata, K., Amino Acid and Nucleic Acid., 22,144(1970)。
- (7) Tochikura, T., Kawai, H: Amino Acid and Nucleic Acid., 22, 38(1970)。
- (8) Tochikura, T., Kawai, H., Gotan, T: Amino Acid and Nucleic Acid., 22, 46 (1970)。
- (9) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Gotan, T: J. Ferment. Technol., 49 1005(1971)。
- (10) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Gotan, T: J. Ferment. Technol. 50, 178(1972)。
- (11) Tochikura, T., Kimura, A., Kawai, H., Tockiki, T., Gotan, T: J. Ferment. Technol., 48, 769(1970)。
- (12) Tochikura, T., Kawaguchi, K., Kano, T., Ogata, K: J. Ferment. Technol., 47,564(1969)。
- (13) Kawaguchi, K., Tanida, S., Nugibayashi, Y., Tani, Y., Ogata, K: J. Ferment. Technol. 49, 195(1971)。
- (14) Kawaguchi, K., Ogata, K., Toehikura, T: Agr. Biol. Chem., 34,908(1970)。
- (15) Nakayama, K., Sato, Z., Tanaka, H., Kinoshita, S: Agr. Biol. Chem., 32, 1331 (1968)。
- (16) Tochikura, T., Kuwahara, M., Komatsubara, S., Fujisaki, M., Suga, A., Ogata, K;

- Agr. Biol. Chem. 33,840(1969).
- (17) Ogata, K., Shimizu, S., Tami, Y: Agr. Biol. Chem., 34,1757(1970).
- (18) Ogata, K., Tani, Y., Shimizu, S., Uno, K: Agr. Biol. Chem., 36,93(1972).
- (19) Ogata, K., Kawaguchi, K: J. Ferment. Technol., 50, 46(1972).
- (20) Watanabe, S., Takeda, I: Amino Acid and Nucleic Acid, 24, 14(1972).
- (21) Watanabe, S., Takeda, I: Agr. Biol. Chem., 36,2265(1972).
- (22) James, W. O., 1953: Plant Respiration. Oxford, Clarendon Press.