

## 肌苷合成关键酶活性与肌苷积累之间的关系

宋勇波 蔡显鹏 储 炬\* 庄英萍 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘 要** 测定比较高产肌苷菌、低产肌苷菌和野生菌肌苷合成途径中 PRPP 转酰胺酶、sAMP 合成酶、IMP 脱氢酶和 5'-核苷酸酶的比活以及活细胞的肌苷水解能力,进一步阐明了菌株产苷性能与肌苷合成途径关键酶活力间的密切关系。根据高产肌苷菌的酶学特性,确定了高产肌苷菌进一步基因工程改造的方向。研究表明酶学研究对有目的、有方向地进行高产菌株的选育工作具有重要意义。

**关键词**: PRPP 转酰胺酶, sAMP 合成酶, IMP 脱氢酶, 5'-核苷酸酶, 水解能力

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0361-05

肌苷(Inosine)是次黄嘌呤和 D-核糖结合的多用途嘌呤核苷类化合物,肌苷大多用诱变的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)通过发酵法制得。有关诱变枯草芽孢杆菌得到高产苷菌株的文献报道很多<sup>[1-3]</sup>,他们大多以获取腺嘌呤、鸟嘌呤缺陷型和具有 8-氮鸟嘌呤、磺胺胍等抗性为主要目的和手段。然而对诱变后得到的高产菌株完整的酶学研究较少,以至于对造成缺陷的酶及其残留活性都不了解。另一方面,尽管获得必要的缺陷与抗性对产肌苷有很大的促进作用,但诱变后某些酶的微妙变化对肌苷的积累仍有非常关键的影响。H. Matsui 等人<sup>[4]</sup>证明 AJ11102 菌株积累肌苷能力的加强,基本上是通过提高 5'-肌苷酸酶实现的;汪景玉等<sup>[5]</sup>在 7171-91 菌的基础上得到 301 菌虽然在营养缺陷与抗性上与 7171-91 菌没有差异,但 301 菌对肌苷的降解能力比 7171-91 低很多,结果是肌苷的产量在 7171-91 的基础上提高了 1 倍。因此,仅仅以缺陷与抗性的获得作为筛选高产菌株的指标是远远不够的,必须全面地了解菌株的酶学信息。另外,对已经获得的高产菌株,本研究可以通过酶学研究,对它进一步改进的潜力有充分的认识,为以后的菌株基因工程改造提供明确的方向。

本文以产生肌苷菌株为例,系统测定了嘌呤核苷酸合成途径的 PRPP 转酰胺酶(5'-Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase, PRPP amidotransferase, E. C. 2.4.2.14) sAMP 合成酶(Adenylosuccinate synthetase, sAMP synthetase, E. C. 6.3.4.4) IMP 脱氢酶(Inosine 5'-monophosphosphate dehydrogenase, IMP dehydrogenase, E. C. 1.2.1.14) 5'-核苷酸酶(5'-Ribonucleotide phosphohydrolase, 5'-Nucleotidase, E. C. 3.1.3.5)以及活细胞水解肌苷的能力。从酶学角度解释了菌株间产苷差异,揭示了生产菌进一步诱变改良的可能与方向,并以酶

基金项目:上海市曙光计划资助项目(01SG28)

\* 通讯作者。Tel: 86-21-64253021 Fax: 86-21-64253702 E-mail: juchu@online.sh.cn

作者简介:宋勇波(1978-)男,山东青岛人,华东理工大学在读硕士研究生,主要从事微生物代谢调控与过程优化。E-mail: songyongbo@sina.com

收稿日期:2002-08-19,修回日期:2002-12-27

其他参与人员:徐 达,张少荣,刘咏梅(广东肇庆星湖生物科技股份有限公司 肇庆 526070)

学研究来指导菌种选育工作。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)野生菌 w 和肌苷低产菌 7171-91( $Ade^-$ 、8-AG<sup>r</sup>) ,购于上海工业微生物研究所 ;肌苷高产菌 jg( $Ade^-$ 、8-AG<sup>r</sup>)由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司提供。

### 1.2 摇瓶发酵培养基

每升培养基中含葡萄糖 1.2g、酵母粉 0.15g、 $(NH_4)_2SO_4$  0.2g、 $KH_2PO_4$  0.004g、KCl 0.05g、Biotin 0.00005g 和组氨酸 0.003g pH 7.0。

### 1.3 完全培养基

每升培养基中含葡萄糖 0.1g、酵母膏 0.15g、蛋白胨 0.05g、玉米浆 0.05g、氯化钠 0.04g、腺嘌呤 0.00025g pH7.0。

### 1.4 酶液和细胞悬浮液的制备

摇瓶发酵至 36h ,无菌取样 20mL。取 10mL 冷冻离心 ,用 pH7.0 的磷酸缓冲液洗两次 ,然后在悬浮液中加入 500mg/L 的溶菌酶和 5mg/L 的脱氧核糖核酸酶 ,37℃保温 30min ,然后 8 000r/min ,冷冻离心 30min ,上清即为酶液 ;另 10mL 冷冻离心 ,用无菌生理盐水洗两次 ,最后悬浮在 10mL 生理盐水中得细胞悬液。

### 1.5 仪器和测定方法

1.5.1 仪器 :UNICO WFZUV-2100 型分光光度计 ,配有 UNICO 用户软件和恒温装置。HP1100型高压液相色谱 ,色谱柱为 ODS C-18 型反相柱。

1.5.2 肌苷和次黄嘌呤的测定 :用高压液相色谱测定(HPLC) ,流动相为 pH5.0 的磷酸 buffer 柱温 34℃。

#### 1.5.3 PRPP 转酰胺酶的测定

根据 T. Nara 等人<sup>[6]</sup>的方法测定 ,比活力定义为 1min 内 ,1mg 的酶蛋白所能生成的无机磷的 nmol 数( nmol/min/mg 蛋白 )。

1.5.4 IMP 脱氢酶的测定 :肌苷酸脱氢酶根据 Nishkawa 等人<sup>[6]</sup>的方法测定 ,比活力定义为 1min 内 ,1mg 的酶蛋白所能引起的 340nm 处吸光度的变化的 1000 倍( $10^3 \Delta OD_{340}$ /min/mg 蛋白 )。

1.5.5 sAMP 合成酶的测定 :sAMP 合成酶根据 Nishkawa 等人<sup>[7]</sup>所修改的方法测定 ,比活力定义为 1min 内 ,1mg 的酶蛋白所能引起的 280nm 处吸光度的变化的 1000 倍( $10^3 \Delta OD_{280}$ /min/mg 蛋白 )。

1.5.6 活细胞肌苷水解能力的测定 :根据 Yamanoi 的方法<sup>[8]</sup>测定。

1.5.7 5'-核苷酸酶的测定 :根据 Fujimoto 的方法<sup>[9]</sup>测定 ,比活力定义为 30min 内 ,1mL 的细胞悬液所能生成的无机磷的 mmol 数( mmol 无机磷/30min/mL 细胞悬液 )。

1.5.8 蛋白的测定 :蛋白用 Lowry 法测定 ,以牛血清白蛋白为标准。

1.5.9 无机磷的测定 :磷钼蓝法。

### 1.6 试剂来源

PRPP( Na ) ,GTP 均为 Sigma 产品 ,NAD 均为进口分装生化试剂 ,其余试剂均为分析纯

试剂或生化试剂。

## 2 结果和分析

### 2.1 产肌苷结果比较

摇瓶中肌苷测量是在发酵 40h 左右进行的,此时发酵进入了中后期,通过比较野生菌 *w*、肌苷低产菌 7171-91 和肌苷高产菌 *jg* 的产苷结果(图 1),可以看出,在 40h 肌苷高产菌 *jg* 积累了 13.2g/L 的肌苷,肌苷低产菌 7171-91 积累了 6.4 g/L 的肌苷,约为肌苷高产菌的一半。而野生菌 *w* 几乎没有肌苷的积累。

### 2.2 3 个菌株肌苷合成途径关键酶的比较

3 个菌株的肌苷合成途径中 PRPP 转酰胺酶、sAMP 合成酶、IMP 脱氢酶和肌苷酸酶的比活测量结果如图 2 所示,所列结果均为 3 次平行测定的结果。从结果可以看出,3 个菌株的以上关键酶的比活存在着明显的差异,现分述如下。

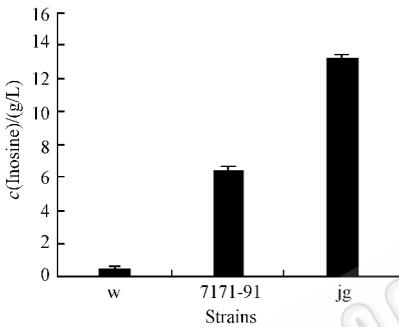


图 1 不同菌株肌苷生产水平的比较

Fig.1 Comparison of inosine production level with different strains

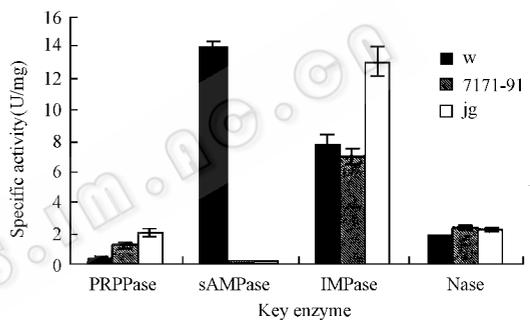


图 2 肌苷合成途径关键酶的测量

Fig.2 Assay of key enzymes relating to the pathway of inosine synthesis

**2.2.1 PRPP 转酰胺酶的活性比较**:PRPP 转酰胺酶是核苷酸合成途径中的第一个关键酶,PRPP 转酰胺酶受 AMP 系和 GMP 系任一物质的反馈抑制,并专一性被 AMP 和 ADP 强烈抑制,而被 IMP、GMP、ATP 和 XMP 抑制较弱,腺嘌呤对该酶有较强的阻遏作用,该酶活的高低直接影响进入核苷合成途径的流量。比较 3 种菌株该酶的比活(图 2)可以看出, *jg* 的该酶比活较 *w* 有较大的提高,约为 *w* 的 5 倍。对于 7171-91 来说,尽管该酶比活不如 *jg*,但较 *w* 也有明显的提高,约为 *w* 的 3 倍。如果从葡萄糖到 PRPP 的合成不是肌苷合成的限速步骤,那么首先 *jg* 和 7171-91 菌更能保证嘌呤核苷酸从头合成的总流量,使 *jg* 和 7171-91 具备成为肌苷高产菌的前提条件。

**2.2.2 sAMP 合成酶的活性比较**:该酶比活力的测量结果(图 2)表明, *jg* 和 7171-91 的比活为零,故它们的 sAMP 合成酶是缺失的,这就从酶学角度解释了为什么它们是腺嘌呤缺陷型的。sAMP 合成酶缺失首先切断了 IMP 的一个旁路,避免了物流及能量流的浪费;另外在补加“亚适量”的腺嘌呤的条件下,可以有效地解除 AMP 对 PRPP 转酰胺酶的反馈抑制和腺嘌呤对 PRPP 转酰胺酶的反馈阻遏。以上 sAMP 合成酶缺失造成两个结果都有利于肌苷合成。故可以不考虑对编码该酶的基因做进一步的遗传改造。

**2.2.3 IMP 脱氢酶的比活测定结果**:IMP 脱氢酶也是核苷酸合成途径的关键酶,它是 IMP

向 GMP 转化的第一个酶。该酶的存在对于积累肌苷是不利的。从该酶活力的测定结果(图 2)我们可以发现  $j_g$  菌的 IMP 脱氢酶的比活力约是 7171-91 的 2 倍,而 7171-91 的该酶比活与  $w$  的相差不大。我们可以认为从  $w$  到 7171-91,再到  $j_g$  的逐级诱变中, $j_g$  的 IMP 脱氢酶得到了加强。虽然  $j_g$  的 IMP 脱氢酶活力比 7171-91 高,但产苷仍比 7171-91 高,原因可能是  $j_g$  菌具有较高的 PRPP 转酰胺酶和较低的核苷降解能力(见图 2),这也说明对肌苷生产来说,IMP 脱氢酶重要性的体现需要一定的前提条件,比如较高的 PRPP 转酰胺酶和较低的核苷降解能力。但是从 IMP 脱氢酶的角度, $j_g$  菌是不利于肌苷的积累,因此我们可以考虑在进一步通过基因工程手段获得 IMP 脱氢酶缺失的肌苷高产菌,中断从 IMP 到 GMP 造成的物料流及能量流的浪费。另外我们如果得到 IMP 脱氢酶缺失的肌苷高产菌,通过控制鸟嘌呤为亚适量的前提下,还有利于解除 GMP、XMP 对 PRPP 转酰胺酶的反馈抑制,进一步加强嘌呤核苷从头合成途径的流量。

**2.2.4 5'-核苷酸酶的活性测定结果** 因为 IMP 膜透性较差,比较高的 5'-核苷酸酶活性对于生产菌积累肌苷是必要的。对几个菌株的 5'-核苷酸酶的测量结果列于图 2 中。从结果可以看出,7171-91、 $j_g$  的 5'-核苷酸酶较  $w$  的要高,但总体差异不大。因此, $j_g$  菌该酶的能力较野生菌  $w$  无明显优势,对于肌苷产生菌,较弱的 5'-核苷酸酶只能趋向于积累 IMP,这就说明在  $j_g$  菌的基础上进一步选育高 5'-核苷酸酶的突变株有可能进一步提高产苷水平。

### 2.3 活细胞的肌苷水解能力测定结果

对于生产菌株,低的核苷水解能力是高产肌苷的必要条件。活细胞对肌苷的水解结果见图 3。3 个菌株的水解结果表明(1) $j_g$  有较弱的肌苷水解能力,大约只有 10%的肌苷被水解成为次黄嘌呤(2)肌苷低产菌 7171-91 则有约 80%的肌苷降解,这一定程度上可以解释为什么 7171-91 菌的生产性能比  $j_g$  菌低(3)野生菌  $w$  将约 70%的肌苷降解,并由于野生菌的核苷酸合成途径是完整的, $w$  菌并非只将肌苷转化为次黄嘌呤。

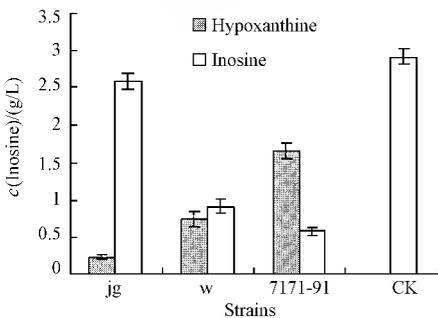


图 3 肌苷水解能力测定结果

Fig.3 Assay of hydrolysis ability of inosine

尽管  $j_g$  克服了 7171-91 菌高的肌苷水解能力,但  $j_g$  仍残留有部分肌苷水解能力,并非完全缺失,不能保证生成肌苷不被破坏,而且降解生成的次黄嘌呤给肌苷的后处理带来麻烦。今后可把获得完全丧失肌苷水解能力的肌苷高产菌作为下一步的菌株选育目标。

## 3 结论

利用诱变或基因工程手段改造枯草芽孢杆菌是提高菌株产肌苷水平常用的方法,然而缺乏从酶学研究角度指导高产菌株进一步选育的报道。本文比较全面地测量了 3 个菌株肌苷生成与降解有关的关键酶,首先考察了 3 个菌株酶活性与产苷的关系。研究表明, $j_g$  高产菌具有高的 PRPP 转酰胺酶活性;sAMP 合成酶的缺失及低的核苷水解能力。进而根据 3 个菌株的酶活差异,结合  $j_g$  菌在酶水平所存在的改进空间,提出了在  $j_g$  菌基础上进一步进行菌株改造的方向。本文认为,利用基因工程手段

进一步改造 *lg* 菌可从以下方向着手 (1) 获得 IMP 脱氢酶缺失的菌株, 进一步解除 XMP、GMP 对 PRPP 转酰胺酶的反馈抑制, 同时避免 IMP 进入 GMP 合成方向造成的物料流及能量流的浪费 (2) 造成 *lg* 菌的肌苷水解能力完全丧失, 避免肌苷转化为次黄嘌呤, 为肌苷的分离纯化提供方便 (3) 进一步提高 *lg* 菌 5'-核苷酸酶的活性, 确保 IMP 及时转化为肌苷。

由于缺乏菌株关键酶信息方面的研究, 往往使菌株的遗传改造工作具有一定的盲目性, 对菌株改造所要进行的关键工作缺乏了解。因此, 加强酶学研究来指导菌株遗传改造是十分有意义的工作。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 王敖全 程光胜 李逢英. 肌苷产生菌枯草芽孢杆菌 *B<sub>s</sub>* 菌株的选育和发酵条件. 微生物学报, 1973, 13(2): 136 ~ 141.
- [ 2 ] 徐建林 陈彦长 冯培忠, 等. 抗药性突变肌苷高产菌的选育. 微生物学通报, 1992, 19(6): 331 ~ 334.
- [ 3 ] 柏建新 邓崇亮. 产鸟苷的枯草杆菌缺失 GMP 还原酶活性突变株的选育. 生物技术, 1997, 7(3): 25 ~ 28.
- [ 4 ] Matsui H, Sato K, Enei H, et al. 5'-Nucleotidase activity in improved inosine-producing mutants of *Bacillus subtilis*. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(9): 2347 ~ 2352.
- [ 5 ] 王景玉 王国民 雷肇祖, 等. 肌苷生产菌 301 菌株的研究. 微生物学通报, 1983, 10(6): 254 ~ 257.
- [ 6 ] Nara T, Misawa M, Kinoshita S. Production of nucleic acid-related substances by fermentation processes. *Agric Biol Chem*, 1968, 32(5): 561 ~ 567.
- [ 7 ] Nishikawaw H, Momose H, Shiio I. Regulation of purine nucleotide synthesis in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biochemistry*, 1967, 62(1): 92 ~ 98.
- [ 8 ] Yamanoi A, Hirose Y, Aoki M, et al. Studies on the production of nucleosides by microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 1965, 11(4): 339 ~ 353.
- [ 9 ] Fujimoto M, Uchida K. Studies on 5'-nucleotidase-lacking mutants derived from *Bacillus subtilis*. *Agric Biol Chem*, 1965, 29(3): 249 ~ 259.

## Relationship Between Key Enzyme Activities of Inosine-producing Pathway and Inosine Accumulation

Song Yongbo Cai Xianpeng Chu Ju\* Zhuang Yingping Zhang Siliang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract**: The specific activities of key enzymes relating to the pathway of inosine synthesis of three different bacterial strains including high-yield, low-yield and wild strains were determined and compared systematically. A close relationship between inosine production and the specific activities of key enzymes was found. According to the enzyme characteristics of high-yield strain, suggestions on further strain improvement by modification of genetic engineering were proposed. Enzymology study is believed to be an effective way to make screening of high-yield strains more efficient.

**Key words**: PRPP amidotrasferase, sAMP synthetase, IMP dehydrogenase, 5'-nucleotidase, Hydrolysis ability

Foundation item Shanghai Shu Guang Plan (01SG28)

\* Corresponding author. Tel 86-21-64253021; Fax 86-21-64253702; E-mail: juchu@online.sh.cn

Received date 08-19-2002