

用毛霉生产核苷酸类衍生物

I. 利用毛霉酶促合成三磷酸腺苷

中国科学院西北水土保持生物土壤研究所微生物研究室

(武功)

由 76 株霉菌 (其中包括曲霉 8 株, 根霉 13 株, 毛霉 38 株和其它霉菌 17 株) 中, 筛选出 8 株毛霉, 它们由 AMP 酶促合成 ATP 的转化率在 90% 以上, 其中 5 株的转化率在 95% 以上。根据紫外吸收光谱, 纸上电泳谱及酸不稳定磷测定结果, 确证 AMP 酶促合成产物是 ATP。在酶反应液中加入碘乙酸和氟化钠, 强烈抑制 ATP 的合成; 加入 α , α' -联吡啶、丙二酸、叠氮化钠、2, 4-二硝基酚和对 ATP 的合成没有或只有微弱的抑制作用; 磷酸三钠, 可促进 ATP 合成; 同时反应过程中释放二氧化碳和生成乙醇, 因此, 这些毛霉菌株主要是通过糖酵解过程由 AMP 合成 ATP 的。

利用微生物的酶促磷酸化活性由 AMP 合成 ATP 较其它方法更优越。有关报道很多^[1-11]。但到目前为止, 工业生产上应用于微生物酶促合成 ATP 的都是酵母菌。在较难获得酵母的地区, 酵母在运输和贮存过程中活性易降低, 影响了此法的推广。为此, 我们在开门办科研的过程中, 用霉菌进行了筛选, 发现某些毛霉菌株具有很强的酶促磷酸化活性, 且其菌体较酵母更易培养和收集。某些毛霉菌株已在生产应用试验中得到进一步肯定。

本文先报道菌种的筛选、以 AMP 为底物进行酶促合成的产物的鉴定及合成途径的探讨。

材料和方法

(一) 供试菌种

供试菌有本室保藏的曲霉 8 株, 根霉 13 株, 毛霉 38 株和其他霉菌 4 株, 以及由土壤、霉腐有机物中分离得到的霉菌 13 株。

(二) 培养基组成

初筛培养基 (%): 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, pH 6.0—6.2。

复筛培养基: 4 份酒糟水加 1 份糖化液混

合, (混合液含还原糖约 2.0%), 补加 0.2% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% 的 KH_2PO_4 , pH 5.4—5.8。酒糟水是酒精厂酒精蒸馏废醪滤出液, 含还原糖约 0.5%; 糖化液是薯干经酶法糖化而得的糖液, 原液含还原糖 8.5% 左右。

斜面培养基: 成分同初筛培养基, 另加琼脂 2.0%。

(三) 菌体培养

500 毫升的三角瓶装培养液 100 毫升, 由试管斜面接入菌丝一小块, 于 27—29°C 下置于往复摇床 (振幅 6 厘米, 110 次/分) 振荡培养 12—14 小时作为种子液。取成分和体积同样的液体培养基, 每瓶接入种子液 5 毫升, 在同样条件下培养 12 小时, 用单层平布过滤、用水淋洗, 挤压除去多余水份, 得含水 80% 左右的鲜菌体, 立即使用, 亦可短期冰冻保存。

(四) 酶促反应及产物的测定

反应液: 0.7 克 AMP (0.78 克纯度 90.4% 的制剂), 3.3 克葡萄糖, 4.5 克 KH_2PO_4 , 0.1 克 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 加水溶解, 用 NaOH 调至 pH 7.0, 定容 100 毫升。

酶反应: 在试管中加入 2.5 毫升反应液,

本文于 1976 年 8 月 9 日收到。

文中所用的英文缩写: AMP——一磷酸腺苷;
ATP——三磷酸腺苷。

0.125 毫升甲苯, 1.0 克供试菌体, 充分摇匀, 置 37℃ 下保温, 反应 2 小时后, 加入 0.15 毫升 20% 的三氯醋酸, 充分作用后滤取清液, 测定产物 ATP 生成量。

在相同的酶反应系统中, 以先加三氯醋酸后加菌体所得之滤液中测定之 AMP 含量作为反应物之起始含量。

(五) 分析方法

初筛时, 用纤维素薄层层析判定 ATP 的生成与否。方法是: 用 1.0 M HCl 处理 DEAE-纤维素粉 30 分钟, 然后洗至中性, 涂板 (2.5 × 8 厘米²), 60℃ 干燥后, 点 2 微升样品, 以 0.04N HCl 展开在紫外光显影灯下观察有无 ATP 斑点。

复筛及其它试验中, 先用纸上电泳法分离反应物 AMP 和产物 ATP。纸上电泳用经 0.1N HCl 处理 12 小时后之新华三号层析滤纸, 点样 10 微升, 用 0.04M, pH 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 电压梯度 15 伏/厘米, 电泳 3—4 小时。将纸上电泳分离的 AMP 及 ATP 斑点在紫外光显影灯下划出并剪下, 用 10 毫升 0.01N HCl 在 40℃ 浸提 2 小时, 用紫外分光光度计在 260 毫微米处测定浸提液之光密度 ($O.D_{260}$), 按下式计算测定物的浓度:

$$\text{测定物浓度} = \frac{O.D_{260}}{E_{260}} \text{ (克分子/升)}$$

$$\text{或} \quad \frac{O.D_{260} \times M}{E_{260}} \text{ (克/升)}$$

将测定的 AMP 和 ATP 含量, 按下式计算 ATP 之转化率, 以此评价酶活的高低。

$$\text{转化率}(\%) = \frac{\text{产物 ATP (克分子)}}{\text{底物 AMP (克分子)}} \times 100$$

还原糖的测定: 用斐林试剂测定。

无机磷的测定: 用钼蓝比色法测定。

乙醇的测定: 用气相色谱法测定。

结果与讨论

(一) 筛选结果

由 76 株供试霉菌中选出 26 株有酶促 AMP 磷酸化合成 ATP 的能力, 它们几乎都是毛霉属的菌株 (见表 1)。

进一步复筛的结果表明 (表 2), ATP 之转化率在 90% 以上的有 8 株。其中有 5 株之转化率在 95% 以上, 并且菌体产率

表 1 76 株霉菌酶促合成 ATP 活性的初筛结果

种 类	有 活 性	无 活 性
毛霉 (<i>Mucor</i>)	27	11
根霉 (<i>Rhizopus</i>)	0	13
曲霉 (<i>Aspergillus</i>)	0	8
犁头霉 (<i>Absidia</i>)	0	3
青霉 (<i>Penicillium</i>)	0	1
其 它	1	12
总 计	28	48

表 2 26 株霉菌酶促合成 ATP 能力之比较

菌 号	鲜 菌 产 率* (克/100毫升)	转 化 率 (%)	菌 号	鲜 菌 产 率 (克/100毫升)	转 化 率 (%)
333	1.7	11.0	363	2.6	96.5
337	2.0	67.7	365	1.8	22.2
339	2.5	102.4	367	1.9	—
345	1.9	73.8	369	1.6	91.5
346	2.2	95.7	370	2.3	56.7
347	1.9	73.0	372	2.4	92.2
349	2.0	67.4	373	2.1	95.0
355	2.3	95.0	375	1.8	67.7
357	0.5	9.6	376	1.4	72.0
358	1.4	20.0	377	0.6	13.1
359	2.1	76.2	378	1.3	46.4
360	2.4	92.2	379	2.0	78.7
362	2.0	73.8	19-2	0.6	—

* 鲜菌体含水约 80%。

亦较高,较适合在生产上应用。

在筛选过程中发现,所试验的霉菌中,菌株由 AMP 酶促合成 ATP 的能力与该菌株发酵力有密切相关性,发酵力强的菌株,才有较强的生成和积累 ATP 的能力;没有发酵力的菌株,一般都未测出 ATP。前者主要是毛霉,后者是其它霉菌。有少数毛霉,虽然发酵力较强,但亦未能测出 ATP 的合成,这可能是酶促反应的条件未能得到满足所致,有待进一步试验。

(二) 合成产物 ATP 的分离及鉴定

用 10 克纯度为 61% 的 AMP,经毛霉的酶促反应后,加三氯醋酸沉淀蛋白质,滤液再用乙醇沉淀,分离出反应产物 ATP,经干燥后,可得纯度为 68.9% 的 ATP 二钠盐 13.5 克,按克分子计算,得率约为 85%。

将分离出的合成产物粗制品,用纸上电泳分离出纯品,将纯品溶于 0.01N HCl 中,测定其紫外光吸收光谱(图 1),并计算其 250 毫微米/260 毫微米,280 毫微米/260 毫微米和 290 毫微米/260 毫微米光密度之比值(表 3);用纸上电泳法将制得的合成产物纯品与试剂纯 ATP (E. Merck 厂出品)进行其电泳行为的比较(图 2);再将

合成产物纯品进行水解后测定释放之酸不稳定磷的克分子数(表 4)。以上几项试验证明,AMP 经毛霉酶促磷酸化反应后,合成的产物确是 ATP。

表 3 合成产物与对照样品在不同波长时光密度的比值

O.D. 比值	波长比 (毫微米)		
	250/260	280/260	290/260
项目			
合成产物	0.847	0.257	0.088
对照样品	0.855	0.246	0.087
腺嘌呤核苷 ^[12]	0.84	0.215	0.03

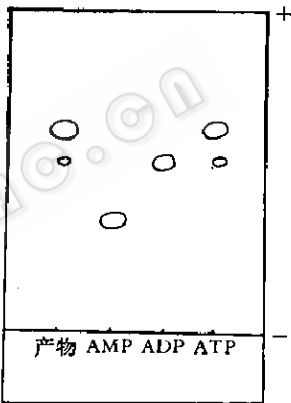


图 2 合成产物纸上电泳图谱
(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 0.04 M, pH 4.8
15 伏/公分 4 小时)

表 4 合成产物水解后释放出的酸不稳定磷 (Pi)

处 理	ATP (微克分子)	(Pi)	ATP:Pi (分子比例)
1N HCl 水解 7 分钟	0.109	0.190	1:1.87
1N H ₂ SO ₄ 水解 30 分钟	0.114	0.236	1:2.05
理 论 值	1.0	2.0	1:2.00

(三) 毛霉酶促磷酸化与糖代谢的关系

有关文献多已述及,酵母的酶促 AMP 磷酸化作用与其发酵过程密切相关^[2-7]。在毛霉中,也观察到类似情况,前面已有说明,为了探明毛霉酶促 AMP 磷酸化途径,选用了一些与糖代谢有关的酶抑制剂加入 AMP 的酶促磷酸化反应液中,观察其抑制

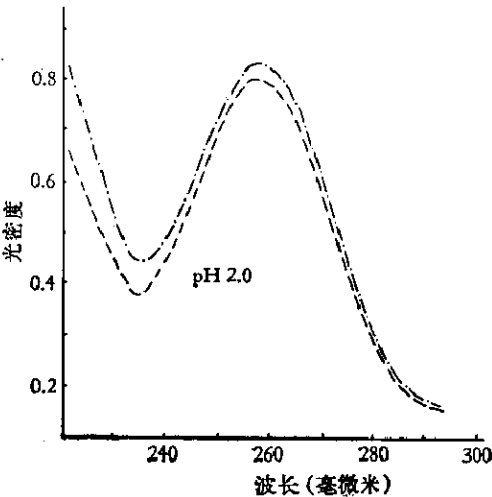


图 1 合成产物的紫外吸收光谱

表 5 不同抑制剂对毛霉酶促磷酸化效能的影响

抑 制 剂		转 化 率 (%)	抑 制 率 (%)
种 类	浓 度 (M)		
碘 乙 酸	10^{-1}	18.7	80.4
	10^{-2}	0	100.0
氟 化 钠	5×10^{-3}	0	100.0
	5×10^{-4}	9.2	90.4
α, α' -联 吡 啶	5×10^{-3}	88.1	7.8
	5×10^{-4}	94.5	1.1
丙 二 酸	10^{-1}	82.8	13.3
	10^{-2}	90.4	5.3
叠 氮 化 钠	10^{-1}	74.2	22.8
	10^{-2}	90.8	4.9
2, 4-二 硝 基 酚	5×10^{-5}	82.0	14.1
	5×10^{-4}	104.1	-9.0
磷 酸 三 钠	5×10^{-2}	102.3	-7.1
	10^{-2}	108.2	-13.3
对 照 (不加抑制剂)		95.5	0

注: 1. 菌体培养条件同复筛。
2. 除加入不同抑制剂外,其他反应条件同前。

效果。结果(表 5)表明: 酵解途径中的磷酸甘油醛脱氢酶抑制剂碘乙酸和烯醇化酶抑制剂氟化钠都强烈地抑制着 ATP 的生成; 三羧酸循环途径中乌头酸酶抑制剂 α, α' -联吡啶和琥珀酸脱氧酶抑制剂丙二酸, 以及含重金属氧化酶抑制剂叠氮化钠、氧化磷酸化解偶联剂 2, 4-二硝基酚等对 ATP 的生成都没有或只有微弱的抑制作用; 而戊糖支路抑制剂磷酸三钠^[13], 对 ATP 的生成不但没有抑制, 反而有促进作用。这些情况说明: 毛霉酶促 AMP 磷酸化反应中, ATP 的生成和累积, 与三羧酸循环、戊糖支路、以及偶联氧化磷酸化等都没有直接关系或关系不大, 主要是通过糖的酵解过程来实现的。

在毛霉酶促 AMP 磷酸化反应过程中, 除了 CO₂ 外, 还有乙醇形成(表 6)。这说明由 AMP 合成 ATP 的磷酸化反应与糖的生

酵解相伴进行; 酵解过程中由 3-磷酸甘油醛到 1,3-二磷酸甘油酸阶段所形成的还原型辅酶 I, 主要用于乙醛的还原而没有进入电子链传递。这就进一步证明了上述论点, 即毛霉酶促反应中 ATP 的生成和累积, 是酵解磷酸化的结果。

表 6 酶促反应前后体系中乙醇浓度的变化

浓度 (微升/毫升)	样 号	I	II	III
	时 间			
反 应 前	反 应 前	0.40	1.05	2.00
	反 应 后	6.70	6.80	7.20

毛霉能用于 ATP 的酶促合成, 是由于它具有很强的酵解磷酸化酶系活力, 能促成反应体系中葡萄糖的酵解, 酵解过程释放出来的能量, 被利用于具高能磷酸键的 ATP 的合成。可以认为: 毛霉的这种酶

促磷酸化合成 ATP 的原理,与酵母的作用原理基本上是相同的。

结 语

霉菌中的一些毛霉菌株,具有由 AMP 酶促合成 ATP 的能力。其中 339、363、346、355、373 等菌株的这种酶促能力很强,以 AMP 为底物的毛霉酶促反应产物,经鉴定证明是 ATP;可以用于 ATP 的酶法生产。反应中 ATP 的生成和累积主要是通过酵解磷酸化来实现的。

选得的毛霉菌株,不仅具有很强的酶促磷酸化能力,而且生长迅速,适应性强,培养和收集都比较简便,因而在生产上比使用酵母更为方便,这对 ATP 酶法生产的推广应用非常有利。

参 考 资 料

- [1] 中山大学生物系生化微生物教研室:微生物学报, 13: 185—187, 1973。
- [2] 中国科学院上海实验生物研究所等:生物化学与生物物理进展, 第 3 期, 第 37—42 页, 1974。
- [3] 欧伦英等:中山大学学报(自然科学版)第 4 期, 1974。
- [4] 渡辺史朗ら: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 24: 14—21, 1971。
- [5] 梶仓辰六郎ら: *ibid*, 29: 59—74, 1974。
- [6] 河合弘康ら: *ibid*, 30: 62—73, 1973。
- [7] Tatsurokuro Tochijura: *J. Ferment. Technol.*, 45: 511—529, 1967。
- [8] Horuo Tanaka et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32: 721—726, 1968。
- [9] Masanaru Misawa et al.: *ibid*, 33: 521—538, 1969。
- [10] Toshio Komuro et al.: *ibid*, 33: 1018—1029, 1969。
- [11] Akira Tanaka et al.: *ibid*, 36: 867—869, 1972。
- [12] Chargaff, E. et al.: 核酸, 黄德民译, 第一卷, 568 页, 科学出版社, 北京, 1963。
- [13] 沈善炯等: *Scientia Sinica*, 8: 733—745, 1959。

MUCOR USED FOR PRODUCING NUCLEOTIDE DERIVATIVES I. ENZYMATIC SYNTHESIS OF ATP BY MUCOR

Microbiology Laboratory, Northwest Institute of Soil and Water

Conservation Biology and Pedology

(Wugong)

From 76 strains of fungi (*Aspergillus*, 8; *Rhizopus*, 13; *Mucor*, 38; and other fungi 17;) 8 strains of *Mucor* were selected, which can convert AMP to ATP with a conversion rate of over 90% and 5 strains of them with a conversion rate of over 95%. The enzymatic converting product of AMP was identified as ATP by UV absorption spectra, paperelectro-

phoretograms and acid labile phosphate assay.

Formation of ATP occurred at the glycolytic level as evidenced by its being highly inhibited by iodoacetic acid and fluoride, not inhibited by α, α' -dipyridyl, malonic acid, 2,4-dinitrophenol and sodium triphosphate; and by releasing ethanol and CO_2 simultaneously.