

面包酵母酶促磷酸化合成腺嘌呤核苷三磷酸*

胡兆庆 王建业 严美玲

(中国科学院上海实验生物研究所, 上海)

在有表面活性剂和乙醛的反应系统中, 面包酵母和白地霉可利用 AMP¹⁾、腺苷或腺嘌呤为底物, 通过酶促磷酸化作用合成 ATP。缺少表面活性剂和乙醛或其中之一都不能有效地合成和积累 ATP。季铵盐类阳离子表面活性剂对增加细胞壁透性的效果显著。菌体内合成 ATP 的酶系可逸出体外, 酶促反应在体外进行。葡萄糖除作为能源外, 对己糖激酶的释放有促进作用。酶促合成 ATP 的途径是 AMP 被直接磷酸化生成 ADP 后, 再由葡萄糖酵解途径磷酸化合成 ATP。在反应过程中未见到有积聚腺苷的阶段。在反应系统中加入乙醛可促进 ADP 形成 ATP, 乙醛起受氢体的作用。在进行酶促合成 ATP 的反应时, 好气菌受细胞壁透性和受氢体的限制, 厌气菌则不受此二者的限制。细胞壁是阻挡菌体内酶系的逸出, 而不是限制底物进入细胞内。

啤酒酵母和其它酿酒酵母等厌气菌可直接用于酶促磷酸化合成 ATP。使用面包酵母或白地霉等好气菌, 则菌体必须先经过处理, 显然两类酵母的性能不同^[1-6]。欧伦英等^[4]使好气菌白地霉代谢类型转化为厌气菌的代谢类型(俗称“转型”), 将底物 AMP 磷酸化合成 ATP。他们认为两类酵母酶促反应的性能不同在于代谢类型不同。Tochikura 等人^[5], Tanaka 等人^[6]则着眼于细胞壁的透性, 认为它是限制面包酵母进行酶促反应的因素, 他们把酵母磨碎或制成丙酮粉或用表面活性剂 S 处理, 获得磷酸化合成 ATP 的效果。因此, 根据这两种不同的观点, 采取的处理措施也各异。已有工作^[4,7]阐明, 酶促合成反应是通过糖酵解代谢而不是氧化磷酸化进行的。但是, 合成 ATP 反应为什么不是借效率更高的氧化磷酸化进行, 并未得到解释。因此, 弄清这些问题, 无论在理论上或生产实际上都是有意义的。

本文报道面包酵母酶促合成 ATP 的研究, 并与啤酒酵母及白地霉进行比较, 探讨了酶促反应与细胞壁透性和代谢类型的

关系, 发现好气菌与厌气菌在细胞壁透性和受氢体两方面都有差别, 而这二者是好气菌进行酶促反应的限制因子。

材料和 方法

(一) 材料和试剂

面包酵母是上海酵母厂出品压榨成块的鲜酵母。啤酒酵母由上海华光啤酒厂提供, 经离心得固块使用。白地霉系经压榨的新鲜菌体。

5'-AMP, Ado, Ade 纯度分别为 87%、99%、85%, 使用时折算纯重。NAD 纯度为 70%, 上海酵母厂产品。G-6-P 钡盐是 Light 厂产品, ADP 钡盐系上海东风试剂厂出品, 二者使用前均转化成钠盐。

(二) 反应系统和操作方法

取 4.6 毫升 0.25M pH7.5 磷酸钾缓冲液于

本文于 1977 年 7 月 29 日收到。

* 朱心良同志对本工作曾提出不少宝贵意见。
1) 本文所用英文缩写: AMP——腺嘌呤核苷三磷酸; ADP——腺嘌呤核苷二磷酸; ATP——腺嘌呤核苷三磷酸; Ado——腺苷; Ade——腺嘌呤; IMP——肌苷酸; Ino——肌苷; Hx——次黄嘌呤; G-6-P——葡萄糖-6-磷酸; NAD——辅酶 I; CTAC——十六烷基三甲基氯化铵; CTAB——十六烷基三甲基溴化铵。

50毫升三角瓶内,加6毫克表面活性剂(用液状表面活性剂时,加入量是使其最后浓度为0.1%),使溶解。然后加入面包酵母1克(啤酒酵母亦为1克,白地霉为2克),葡萄糖180毫克,2.4%氯化锰溶液0.05毫升。另取1.4毫升磷酸缓冲液溶解40毫克AMP(或31毫克腺苷,或12毫克腺嘌呤)并入上述三角瓶内,随即加入0.2毫升40%乙醛,然后将三角瓶置于37℃水浴中保温。反应开始后,每隔30—60分钟取样,观察反应情况以控制反应时间。样品在沸水浴中加热3分钟后离心,将上清液点样于DEAE纤维素薄板上进行板层析。此外并对各样品进行纸层析和纸电泳以鉴定和定量产物。用Ade作底物时,磷酸缓冲液浓度为0.33M,葡萄糖为360毫克。

(三) 分析方法

快速薄板层析鉴定法 采用DEAE纤维素Cl⁻型,照一般方法铺制薄板于载玻片上,每板点样两点,用0.02N HCl溶液展开1—2分钟。

纸电泳 将样品点于Whatman 3M滤纸上,用0.05M pH3.5柠檬酸缓冲液,电场强度为11伏/厘米。电泳后,纸上各斑点用紫外光显迹,剪下分别浸于4毫升0.01N HCl中,室温过夜,经过滤,滤液于Beckman DU分光光度计260微米下测定,同时做相应空白对照。所得光密度数以各化合物消光系数换算成克分子数。各产物生成量以克分子转化百分率表示。

纸层析 用两种溶剂系统:①异丁酸-0.5N NH₄OH(5:3)②正丁醇-冰醋酸-水(40:11:25)。滤纸用Whatman 1号。

(四) ATP的柱层析分离

当ATP合成达到高峰时,即在沸水浴中加热3—5分钟停止反应,冷却,离心去掉酵母,清液加水稀释一倍,用201×8阴离子交换树脂分离。用0.01N HCl-0.04M NaCl溶液洗脱AMP、ADP,用0.01N HCl-0.5M NaCl溶液洗脱ATP。ATP洗脱液调pH至1.5后加4倍酒精即得ATP钠盐结晶。

实验结果

(一) 面包酵母酶促磷酸化合成ATP

1. 用AMP作底物的ATP合成:面

包酵母的酶促合成ATP反应中各产物的电泳图和层析图见图1和2。反应在4.5小时左右达到高峰,持续约1小时后,ATP趋向降解。

不同种类的表面活性剂对合成ATP的影响见表1。季铵盐类阳离子表面活性剂效果较好,阴离子、非离子型的效果较差。

以AMP为底物,面包酵母酶促合成ATP反应产物的柱层析分离,见图3。在此反应中,投入5.7克纯度87%的AMP,可得纯度89.7%的ATP 4.3克。

2. 不同底物酶促合成ATP反应中,当ATP形成达到高峰时,各产物的比例情况见表2。

(二) 表面活性剂和乙醛以及底物对酶促磷酸化合成ATP的影响

所得结果见图4:1—4。我们发现,在缺少表面活性剂和乙醛时,面包酵母不能将底物AMP磷酸化合成ATP。单有表面活性剂而无乙醛时,面包酵母也不能大量合成和积累ATP,而是AMP转化生成大量的ADP,不能被进一步磷酸化成为

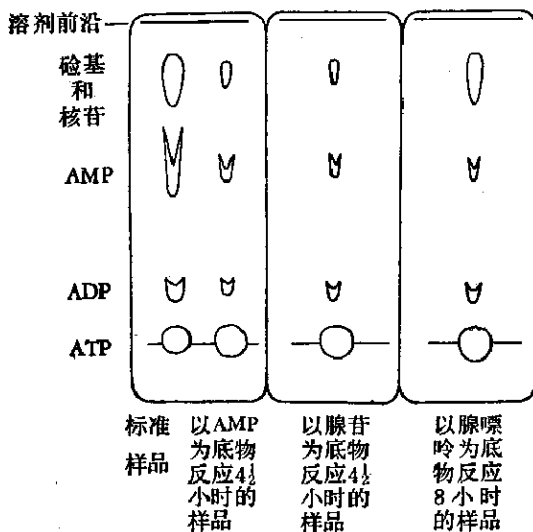


图1 面包酵母酶促合成ATP反应产物的DEAE纤维素薄板层析图谱
展层剂: 0.02N HCl, 展层1—2分钟

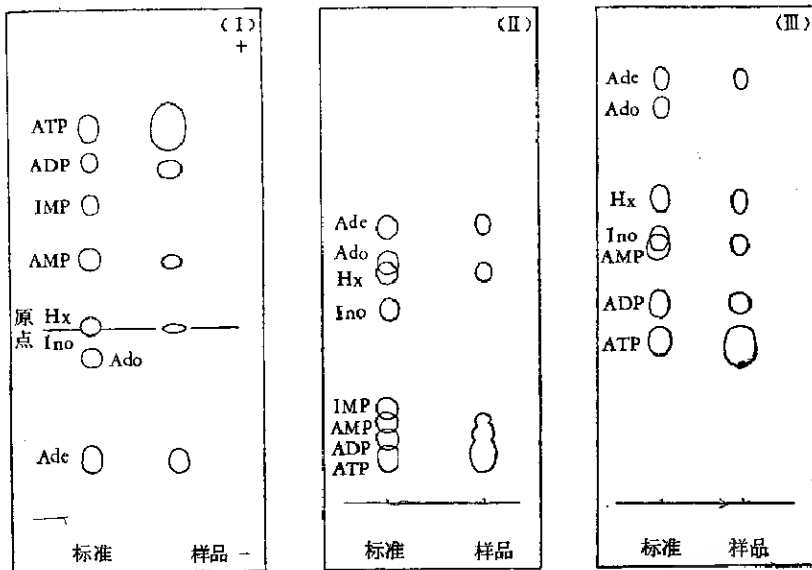


图2 面包酵母酶促合成 ATP 反应产物的纸电泳和纸层析图谱
I: 纸电泳; II: 纸层析(溶剂系统 1); III: 纸层析(溶剂系统 2)。

表1 不同表面活性剂对面包酵母酶促合成 ATP 的影响*

表面活性剂性质	表面活性剂	ATP 克分子转化率(%)
阳离子表面活性剂	十六烷基三甲基氯化铵	74
	十六烷基三甲基溴化铵	76.6
	Hyamine 1622	78
	新洁而灭	73.9
阴离子表面活性剂	十二烷基磺酸钠 (SDS)	12.9
非离子表面活性剂	Triton X100	41.2
	吐温 80	23.2

* 以 AMP 为底物。

表2 面包酵母酶促合成 ATP 各产物比例*

底物 \ 产物	ATP	ADP	AMP	Ado	Hx	Ade
AMP	74	12.6	0.3		12.6	
Ado	71.2	14.6		0.5	9.2	4.7
Ade	49.7	5.2			6.8	38.1

* 表中数字为克分子百分率; 表面活性剂用 CTAC。

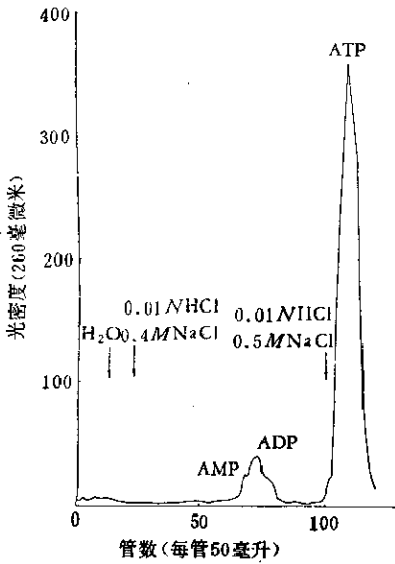


图3 阴离子交换树脂柱层析洗脱图谱
注: 图中第二↓上应为 0.04M NaCl

ATP (如图 4:2 所示)。若加入乙醛, 则 ADP 迅速转化成 ATP, 伴随 ATP 的生成 ADP 下降图 4:1。结果显示乙醛有促进磷酸化合成 ATP 的作用。如果反应系统中有乙醛但无表面活性剂, 此时面包酵母也无 ATP 的生成。

人们知道 AMP 受细胞壁阻碍不能进入菌体内, 而 Ado 则不受阻碍可透过细胞壁进入菌体。因而我们用 Ado 或 Ade 作底物进行试验, 结果表明, 无论 Ado 或 Ade 都不被磷酸化合成 ATP。与 AMP 一样, 也必须有表面活性剂 (乙醛也需要) 存在, 面包酵母才能将 Ado 或 Ade 酶促合成 ATP (见图 5)。因此, 无论底物能否透入菌体都不能解除细胞壁对酶促反应的限制作用。

乙醛可促使 ADP 进一步磷酸化形成 ATP, 用 NAD 代替乙醛可取得同样效果 (见图 6)。说明乙醛是以受氢体的作用促

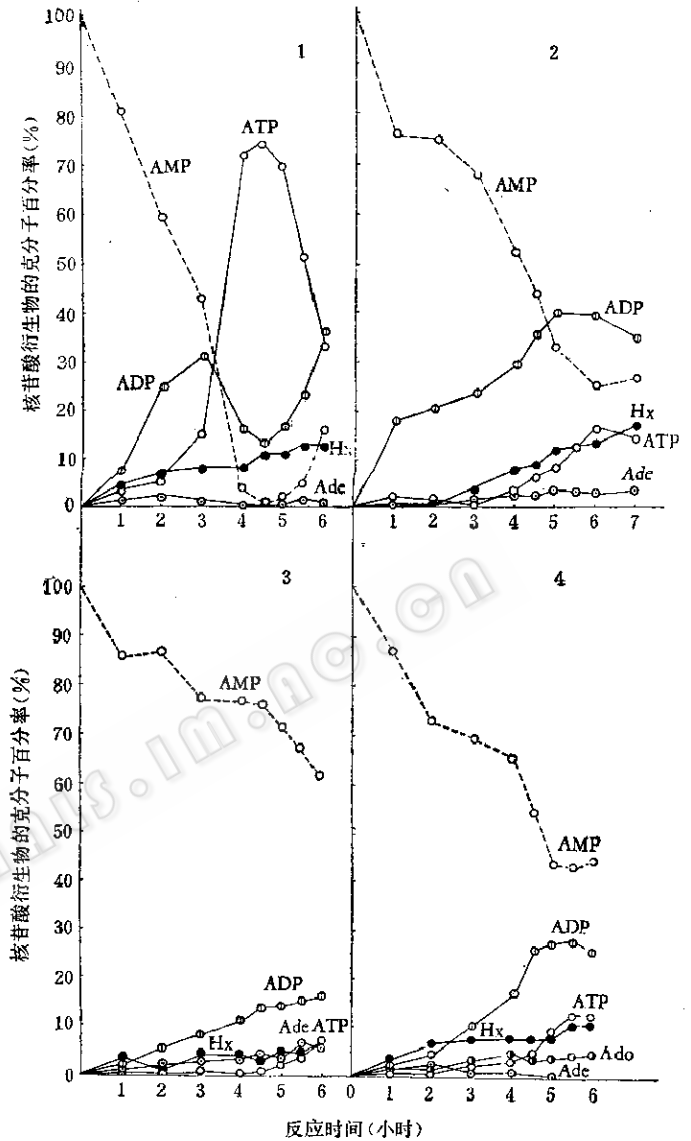


图4 表面活性剂 CTAC 和乙醛对面包酵母酶促合成 ATP 的影响 (以 AMP 为底物)

- 1: 反应系统中有 CTAC 和乙醛; 2: 有 CTAC 无乙醛;
- 3: 无 CTAC 有乙醛; 4: CTAC 和乙醛均无。

进了 ATP 的合成。可见面包酵母由于缺乏足够的受氢体从而限制了酶促合成反应。

(三) 面包酵母体外酶促合成 ATP 及合成酶系的释放

1. 经表面活性剂和葡萄糖预处理酵母

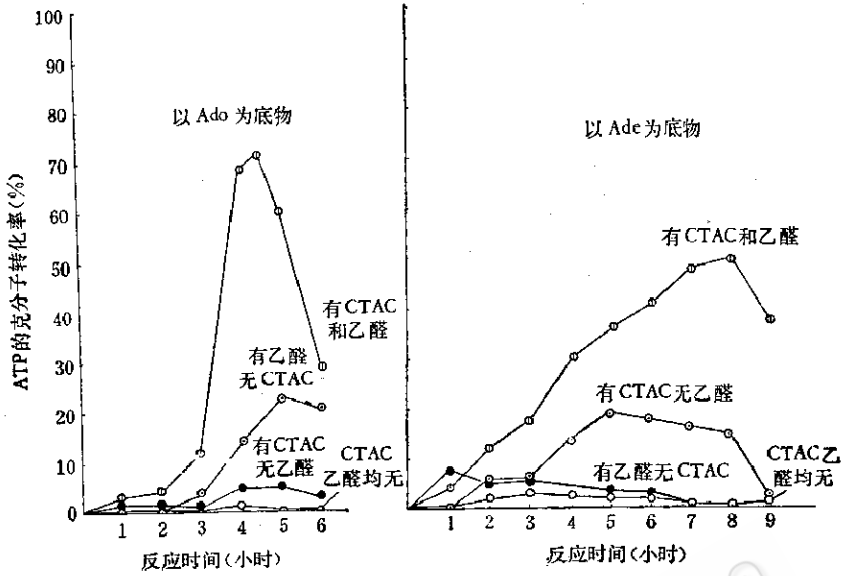


图5 以 Ado 或 Ade 为底物,CTAC 和乙醛对面包酵母酶促合成 ATP 的影响

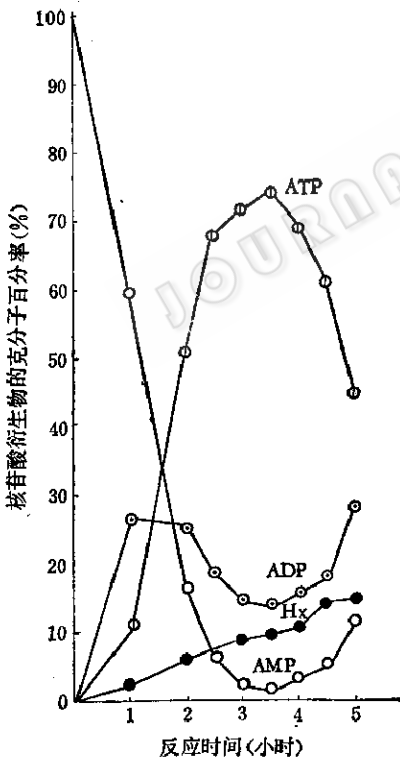


图6 以 NAD 代替乙醛时,面包酵母酶促合成 ATP 的过程(加入 NAD 0.01 毫克分子)

后的上清液及菌体

将 1 克面包酵母置于由 6 毫克CTAC,

180毫克葡萄糖,4.6毫升 0.25M pH7.5 磷酸缓冲液及氯化锰所组成的反应系统中,在 37°C 水浴中温育预处理 2 小时后,经 4000 转/分离心分成上清液和菌体两部分,此上清液再用 Janetzki K₇₀ 离心机 10,000 转/分离心 15 分钟得到预处理后的上清液,此时再加入底物 AMP,以 NAD (0.01 毫克分子)代替乙醛,37°C 保温。菌体用磷酸缓冲液冲洗一次,再经 4000 转/分离心,得到预处理后的菌体,此菌体按材料和方法一节中所述加入各试剂进行反应。结果如图 7 所示,上清液能有效地合成 ATP。用 Ado 和 Ade 为底物也可明显地体外合成 ATP。

这个结果表明,面包酵母处于反应系统条件下,其合成 ATP 的酶系是逸出菌体之外进行 ATP 合成的。底物无须进入菌体,因此细胞壁不起限制底物透入的作用。由于酶逸出,故菌体不再能合成 ATP。

2. 经葡萄糖预处理的酵母上清液及菌体

当预处理面包酵母时,反应系统中省去表面活性剂(含有葡萄糖),由此得到预处理后的上清液加入底物 AMP 及 NAD,

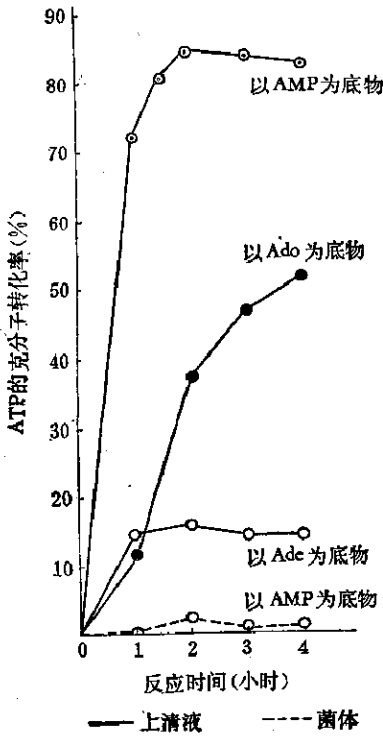


图 7 用 CTAC 和葡萄糖预处理后的面包酵母菌体和上清液酶促合成 ATP 的过程

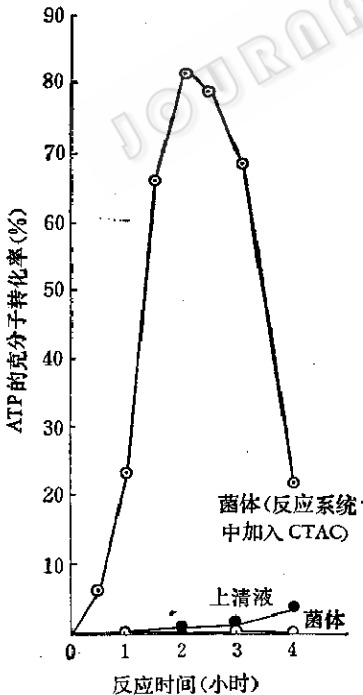


图 8 用葡萄糖预处理面包酵母后的上清液及菌体酶促合成 ATP 的过程

结果不能进行合成 ATP。说明细胞壁起着限制酶逸出的作用。

缺乏表面活性剂的作用，单有葡萄糖并不能使酶逸出，因而预处理后的菌体也不能进行体外反应，故亦无 ATP 合成。若添加 CTAC 则将迅速合成 ATP(见图8)。

3. 经表面活性剂预处理后的酵母上清液及菌体

用含有 CTAC 而无葡萄糖的反应系统来预处理面包酵母，可得到单以表面活性剂处理后的酵母上清液和菌体。此上清液添加反应所需的葡萄糖以及底物和 NAD 等，结果发现它不能酶促合成 ATP。但是用 G-6-P (0.3 毫克分子) 代替葡萄糖，以 ADP (0.03 毫克分子) 为底物代替 AMP，则此上清液呈现明显的 ATP 合成反应(见图 9)。

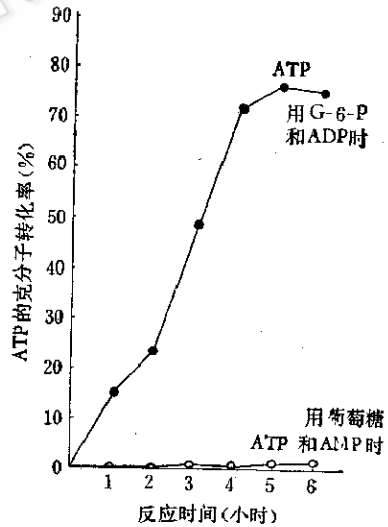


图 9 经 CTAC 预处理后的面包酵母上清液酶促合成 ATP

实验结果说明，单以表面活性剂预处理，改变了面包酵母细胞壁的透性后，即有酶逸出，但所释出的酵解酶系是不完整的，能够利用 G-6-P 进行酶促合成 ATP，然而缺乏己糖激酶逸出，所以不能利用葡萄糖进行反应合成 ATP。此结果与表面活

性剂和葡萄糖共同预处理后酵母上清液能有效地利用葡萄糖酶促合成 ATP 的实验相比较,显然,在表面活性剂存在下,葡萄糖有促使已糖激酶释放的作用。

此外我们也做了对照实验(将面包酵母仅悬浮于磷酸缓冲液中或单以葡萄糖预处理,即都不经表面活性剂作用),结果上清液不能用 G-6-P 和 ADP 合成 ATP,没有酶促反应。

(四) 啤酒酵母 ATP 合成酶系的释放与体外合成 ATP

用啤酒酵母进行体外合成 ATP 的实验,方法与面包酵母的相同,但反应系统中不加表面活性剂和受氢体。啤酒酵母用葡萄糖或只悬浮于磷酸缓冲液中进行预处理,所得上清液进行体外合成 ATP 实验,结果见图10。葡萄糖预处理的啤酒酵母上清液可以合成 ATP,相当于面包酵母用 CTAC 和葡萄糖预处理的情况。只悬浮于磷酸缓冲液预处理的啤酒酵母上清液不能

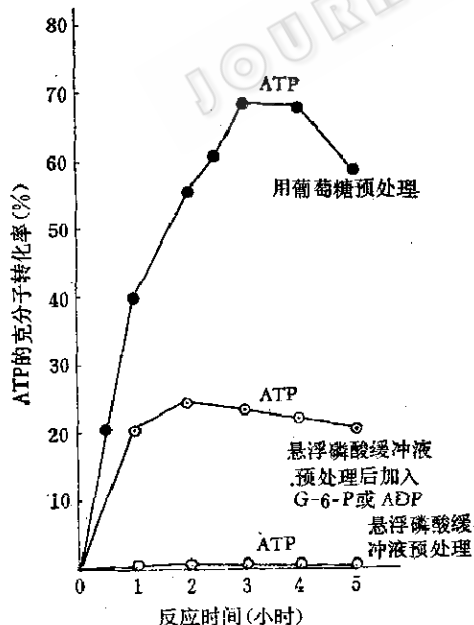


图10 不同预处理后的啤酒酵母上清液酶促合成 ATP

利用葡萄糖磷酸化 AMP 合成 ATP。可利用 G-6-P 和 ADP 合成 ATP,但效率不高。添加 NAD 也不能提高 ATP 合成效率。

这一结果表明,啤酒酵母也是体外进行酶促合成 ATP 的,同样葡萄糖参与预处理有促进合成的作用。啤酒酵母无须表面活性剂处理 ATP 合成酶系即可逸出表明其细胞壁透性较大,同时不存在受氢体限制的因素,故可直接用于酶促合成反应。但新鲜的啤酒酵母细胞壁透性却又不及经表面活性剂处理后的面包酵母,因此,它合成 ATP 的效率(无论以葡萄糖或 G-6-P 为能源)又比处理后的面包酵母为低,所以有人在使用啤酒酵母时也加表面活性剂以提高合成 ATP 的效率。

(五) 白地霉酶促合成 ATP

按照面包酵母酶促合成 ATP 的条件和方法,用白地霉进行酶促合成 ATP 反应。实验结果与面包酵母的情况一致。即在有表面活性剂和乙醚条件下,增大了细胞壁透性,补足了受氢体,白地霉即能有效地酶促合成 ATP (见图11)。

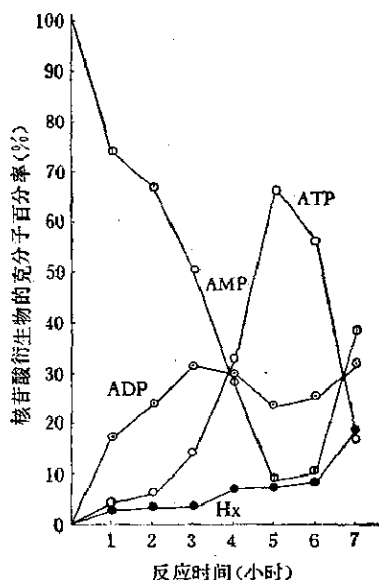
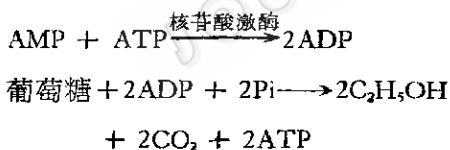


图11 白地霉酶促合成 ATP

讨 论

我们的实验结果表明,面包酵母或白地霉等好气菌酶促合成 ATP 的能力受到该菌细胞壁和受氢体的限制,而厌气菌则不受此两者的限制。在表面活性剂和乙醛的作用下,好气菌能够进行酶促合成反应。Tochikura 等及欧伦英等已报道过酶促合成 ATP 的机制,他们根据反应中出现多量的 Ado 提出底物 AMP 须先经核苷酸酶水解生成 Ado 再经腺苷激酶作用后通过酵解途径生成 ATP。我们所获得的结果与他们不同,无论用好气菌或厌气菌时,反应中都没有 Ado 明显出现,而是 AMP 先转化成 ADP,当 ADP 积累到一定量后,ATP 迅速合成并很快达到高峰。在酶促反应中同时存在着合成反应和分解反应,如 AMP 脱氨降解生成 Hx 等,被降解产生 Ado 也是可能的,但这并不意味着 AMP 必定先形成其降解产物 Ado 才能被合成 ATP。因此我们认为酶促合成 ATP 是通过下列方式反应的。



这个看法与我们发现酶促反应是在菌体外进行,因而底物 AMP 可直接被磷酸化无须先转化成 Ado 合成 ATP 是一致的。

根据我们所阐明的细胞壁起着限制合成酶系逸出的作用,而不限底物的通透;酶促反应须要合成酶系释出菌体之外进行等事实,因此我们对酶促合成 ATP 之所以不由氧化磷酸化而由酵解途径进行的问题提出下述解释:这是因为前者的酶系在线粒体膜上,不能透出细胞壁,而后者系可溶性酶,能释出菌体,从而达到在体外进行酶促反应之故。

对于酶系的逸出,葡萄糖参与预处理可促使己糖激酶释放。因此葡萄糖并不单纯起能源供体作用。对这一现象我们还不能很好地解释,有可能葡萄糖作为己糖激酶的底物,对酶有较强的亲和力形成酶-底物复合物,从而使己糖激酶易于逸出。但也不排除参与预处理的葡萄糖被菌体内源的 ATP (虽然量是极少)磷酸化生成 G-6-P 和 F-1,6-P 等产物的可能性,当除去菌体后,这些产物遗留在上清液中,即供作能源促使合成 ATP 的反应进行。总之,此问题有待进一步阐明。

好气菌与厌气菌二者在酶促合成 ATP 上的性能不同除由于细胞壁透性不同外,好气菌还受受氢体限制,而厌气菌则否。这一差异可能是二者的辅酶含量不同,已有工作^[8,9]表明厌气菌含 NAD 量高于好气菌,Sakai 等人^[10]测定市售商品面包酵母的 NAD 量为每克干酵母含 0.6 毫克较他们测定的啤酒酵母(*S. Carlsbergensis*)低 3—5 倍。根据我们的实验,当受氢体缺乏时,ADP 积累不能形成 ATP,外界添加 NAD 即促进 ADP 进一步磷酸化,我们认为这是由于好气菌含 NAD 不足,因而使酵解中 3-磷酸甘油醛进一步脱氢和磷酸化反应这一代谢环节受到了限制。由于受氢体不足,因此,在酶促合成 ATP 反应上,好气菌所表现不同于厌气菌的性能,并非由于两类酵母代谢类型不同之故。我们用未经“转型”的白地霉酶促合成实验也证明了这一点。乙醛作为受氢体促进 ATP 合成的作用,可能促进好气菌的 NAD 更新,加速还原型辅酶 I 氧化成氧化型辅酶 I,从而推动了 3-磷酸甘油醛进一步代谢合成 ATP。

参 考 文 献

- [1] 上海实验生物研究所核酸研究组,上海药用辅料厂:生物化学与生物物理进展,1974 年第 3 期,37—42 页。

- [2] 中山大学生物系生化微生物教研室: 微生物学报, **13**: 185—187, 1973年。
- [3] 秦皇岛市微生物制药厂等: 微生物学通报, **3**: 16—17, 1976年。
- [4] 欧伦英等: 中山大学学报(自然科学版), 1974年 **4**, 97—105。
- [5] Tochikura, A. et al.: *J. Ferment. technol.*, **45**: 511—529, 1967.
- [6] Tanaka, A. and Hironaka, J.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 867—869, 1972.
- [7] Kimura, A., et al.: *J. Bacteriol.*, **125**: 744—746, 1976.
- [8] Wimpenny, J. W. T. and Firth, A.: *J. Bacteriol.*, **111**: 24—32, 1972.
- [9] London, J. and Knight, M.: *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 241—254, 1968.
- [10] Sakai, T., Uchida, T. and Chibata, I.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 1049—1056, 1973.

THE ENZYMATIC PHOSPHORYLATING SYNTHESIS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE BY BAKER'S YEAST

Hu Zhao-qing, Wang Jian-ye and Yan Mei-ling

(Shanghai Institute of Experimental Biology, Shanghai)

Our experimental evidence revealed that Baker's yeast and *Geotrichum Candidum* could utilize 5'-adenylate, adenosine or adenine as substrate to synthesize ATP. The reaction mixture used contained phosphate buffer, glucose, manganese chloride, surfactant and acetaldehyde. If the surfactant or/and acetaldehyde was omitted, ATP could not be synthesized and accumulated. Among the surfactants tested, the quaternary ammonium hydrides were the most effective in increasing the permeability of cell wall of yeast. The enzymatic synthesis of ATP was carried out extracellularly, because the enzyme system of glycolytic fermentation was released from the cell to the external medium, when glucose was present in the pretreatment with surfactant. Hence glucose not only supplied the energy for synthesis, but also enhanced the release of hexokinase from the cell. In addition, acetaldehyde was used in place of coenzyme I (NAD) as a hydrogen acceptor, to promote the turnover of the latter and further phos-

phorylation of ADP. In the enzymatic reaction, the adenosine did not appear at all. Basing on the results of our experiments we suggest the pathway of enzymatic formation of ATP as follows:



It is obvious that our suggestion does not support the hypothesis of Tochikura et al. and Ou L. Y. et al. that the AMP is necessary to degrade adenylylate to form adenosine before its phosphorylation. Detail about the mechanism have been discussed. The ability of enzymatic formation of ATP by anaerobic strain differs from that by the aerobic strain in both the permeability of cell wall and certain metabolic links. The cell wall of aerobic strain prevents the release of enzymes from cell to the external medium, but does not prevent the entrance of substrate into the cell. Concerning the metabolism links, the available content of hydrogen acceptor is the limiting factor for aerobic strain to synthesize ATP, but is not for anaerobic.