

# 腺苷三磷酸和环腺苷单磷酸 对丝状真菌纤维素酶合成的调节\*

王冬 曲音波 高培基

(山东大学微生物学系发酵工程国家重点实验室 济南 250100)

**摘要** 以虫荧光素酶法检验了四株丝状真菌在葡萄糖-无机盐液体培养过程中的胞内 ATP 含量。结果表明,只有当胞内 ATP 浓度低于  $10^{-8}$  mg/ml 时,真菌才开始合成胞外纤维素酶(FPA)。以不同浓度的各种碳源培养时,菌体胞内 ATP 含量只要超过  $10^{-7}$  mg/ml, FPA 的合成即发生阻遏。菌体胞内 ATP 含量与 FPA 合成呈显著负相关。以高效液相色谱(HPLC)法检测了菌体培养液中的 cAMP 含量。在非阻遏条件下,外源 cAMP 可以提高 FPA 的合成水平。但外源 cAMP 不能解除已经发生的酶合成阻遏。菌体 ATP 和 cAMP 水平是调节真菌纤维素酶合成的重要因子。

**关键词** 丝状真菌, 纤维素酶, ATP, cAMP

深入了解纤维素酶的合成机制是获得其过量生产的基础。许多研究表明,真菌纤维素酶的合成受诱导和阻遏的双重控制<sup>[1]</sup>。其中,分解代谢物阻遏是影响酶合成效率的重要原因。许多易代谢碳源都可以引起酶合成阻遏的发生。但是阻遏的本质原因一直未能得以阐明。生物体氧化过程中放出的自由能主要贮存于腺苷三磷酸(ATP)中。ATP 在糖代谢和蛋白质合成中起着“共同中间体”的作用<sup>[2]</sup>。纤维素酶是纤维分解真菌胞外蛋白的主要组分。因此,测定菌体的 ATP 水平将有助于对酶合成调节的了解。但菌体内 ATP 含量低,变化幅度小,精确测定十分困难。另外,由于已知在原核生物中环腺苷单磷酸(cAMP)具有解除酶合成阻遏的重要作用<sup>[3]</sup>,因此人们对 cAMP 在真核生物的丝状真菌酶合成诱导和阻遏中的作用十分重视<sup>[4]</sup>。本文采用目前已知的灵敏、特异性的检测 ATP 含量的方法——虫荧光素酶法,检测了酶合成过程中 ATP 的变化;以高效液相色谱技术检测了 cAMP 合成,并通过添加外源 ATP 和 cAMP,观察了其对菌体内 ATP 含量的影响和对酶合成阻遏的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

里斯木霉 (*Trichoderma reesei*) Rut C30, 美国 Natick Lab 提供。拟康氏木霉 (*T. pseudokoningii*) S38, 从土壤中分离纯化,本实验室保存<sup>[5]</sup>。斜卧青霉 (*Penicillium*

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 11 月 19 日收到。

*decumbens*) JU-A10, 抗阻遏突变株, 本实验室选育<sup>[6]</sup>。黑曲霉 (*Aspergillus niger*) L22, 本实验室选育菌株。

## 1.2 培养方法

液体分批培养, 基本培养基为 Mandels 营养盐<sup>[7]</sup>加不同浓度的各种碳源, 30℃, 160r/min 旋转式摇瓶培养。

## 1.3 测定方法

**1.3.1 ATP 含量测定:** 采用虫荧光素-荧光素酶法<sup>[8]</sup>。培养物经离心分离菌体后, 直接测定上清液中 ATP 含量。菌体加入 0.01mol/L pH5.0 磷酸缓冲液至原体积, 超声波破碎细胞, 得细胞浆后再测定胞内 ATP 含量。用 Sigma 公司的 ATP 作标准, 以液体闪烁计数仪 (Liquid Scintillation Counter, Beckman Co.) 进行定量测定。由于 ATP 与虫荧光素酶反应后产生的光强度随反应时间延长而衰减, 因此首先须确定适宜的测定时间。实验表明, 测定时间为加入虫荧光素酶后 15s 时, 产生的光强度与 ATP 含量呈正相关, 且操作也方便。另外, 为排除本底发光干扰, 实验中确定当 ATP 浓度在  $10^{-10}$  mg/ml 以下, 无法准确测定时, 就以 ATP 含量“趋近零”计。

**1.3.2 cAMP 含量测定:** 向离心得到的菌体中加入终浓度为 0.1mol/L HCl, 超声波破碎细胞后, 将菌悬液放入 100℃ 水浴中 10min, 冷却后, 11000×g 离心 5min, 取上清液, 调 pH 至 7.0, 用高效液相色谱 (HPLC) 法分析, 以 0.25mol/L pH3.5 的磷酸缓冲液洗脱, 速度为 1ml/min, 以标准 cAMP (Sigma Co.) 进行定量<sup>[9]</sup>。

**1.3.3 滤纸酶活性 (FPA):** 按文献[10]进行。

## 2 实验结果

### 2.1 纤维素酶合成过程中菌体内 ATP 含量的变化

**2.1.1 以葡萄糖等易利用糖类为碳源培养:** 分别以 0.5% (W/V, 下同) 和 2% 葡萄糖为碳源培养里斯木霉 (*T. reesei*) C30、拟康氏木霉 (*T. pseudokoningii*) S38、斜卧青霉 (*P. decumbens*) A10 和黑曲霉 (*A. niger*) L22, 观察其菌丝体内 ATP 含量与滤纸酶活 (FPA) 合成的关系。如图 1 所示, 以 0.5% 葡萄糖培养 2d 时, 4 个菌株的胞内 ATP 含量都较低 ( $10^{-8}$  mg/ml 以下)。除 L22 外, 其余菌株的 FPA 合成量均在 1.5IU/ml 以上。抗阻遏突变株 C30 可高达 4IU/ml。而用 2% 葡萄糖培养 2d 时, 各菌株胞内 ATP 含量均较高 ( $10^{-7}$  mg/ml 以上), FPA 合成量均显著减少, 除 C30 外, 其余 3 株菌的 FPA 均在 0.05IU/ml 以下。4d 后, 随着葡萄糖的消耗和胞内 ATP 含量的降低, FPA 合成才逐渐升高。虽然不同菌株胞内 ATP 含量与酶合成发生阻遏的程度有差异, 但两者变化趋势的相关性十分显著。

**2.1.2 以纤维素粉 (CF11) 为碳源培养:** 以 2% (W/V) 纤维素粉 CF11 为碳源培养, FPA 在 3d 左右开始上升, 至 7d 左右达到高峰, 在整个过程中可正常进行酶合成。与此相对应, 其胞内 ATP 含量一直较低 ( $10^{-8}$  mg/ml 以下), 且较稳定 (图 2)。

### 2.2 外源 ATP 与酶合成阻遏

分别以 0.5% 葡萄糖、甘油、纤维二糖及 2% 纤维素粉 CF11 为碳源单独培养, 或同时添加终浓度为 0.5mg/ml 的 ATP 培养 4 株真菌。结果表明 (表 1), 添加外源 ATP 可显

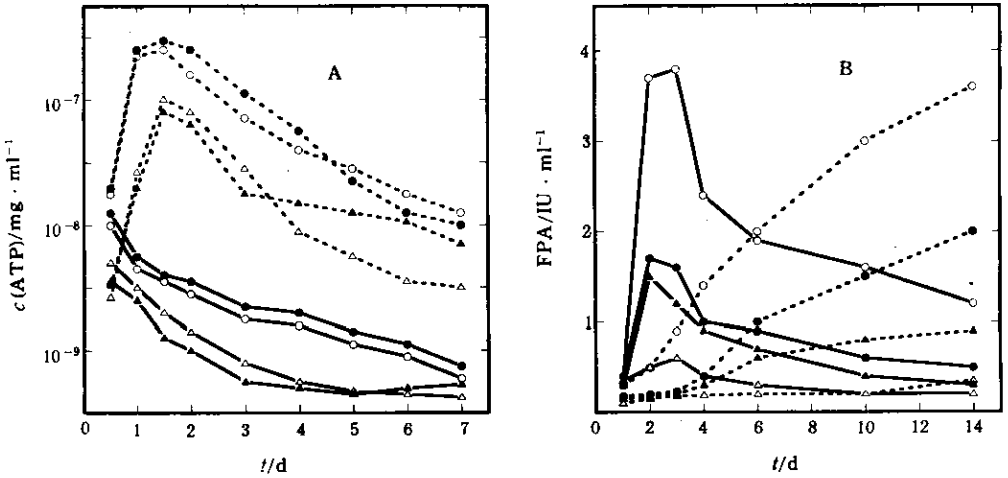


图1 不同浓度葡萄糖培养对四株真菌胞内 ATP 含量(A)和 FPA 合成(B)的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of glucose on the intracellular ATP content (A) and FPA synthesis (B) of four fungi

Symbols: ● *T. pseudokoningii* S38; ○ *T. reesei* C30; ▲ *P. decumbens* A10; △ *A. niger* L22;  
 — 0.5% glucose; — 2% glucose.

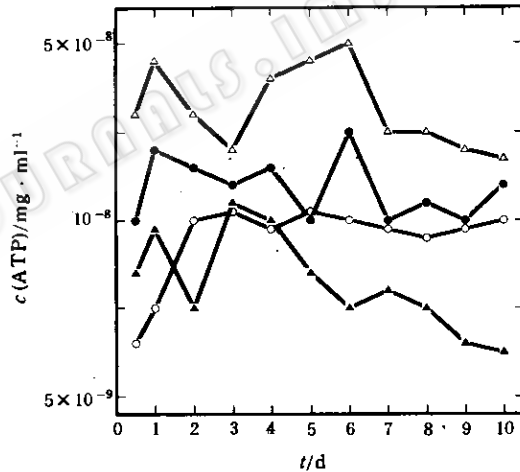


图2 以纤维素粉 CF11 为碳源培养时菌体内 ATP 含量的变化

Fig.2 Changes of the intracellular ATP contents of four fungi during the cultivation on cellulose CF11

Symbols are same as in Fig.1.

著提高胞内 ATP 含量,达到酶合成阻遏的水平。各菌株的 FPA 合成也都趋近零。但再提高外源 ATP 浓度却不能继续提高胞内 ATP 含量。而添加高浓度葡萄糖时的胞内 ATP 浓度,可高于直接加入外源 ATP 时的水平。单独加入 ATP 时,ATP 不能被运输入胞内和支持菌体生长。

以上三组实验的结果表明,无论以何种碳源培养,只要胞内 ATP 含量达到  $10^{-7}$ mg/ml 以上,纤维素酶合成即不能进行。虽然不同菌株对 ATP 敏感程度不同,表现

出种属差异,但胞内 ATP 的过量积累,均导致了酶合成阻遏的发生。

### 2.3 ATP 和 cAMP 在菌体内外的分布

实验结果显示,ATP 只存在于菌体细胞内,胞外上清液中基本测不出 ATP。而 cAMP 的分布与 ATP 不同,相当一部分都分泌到胞外(表 2)。

表 1 各种碳源及外源 ATP 对胞内 ATP 含量和 FPA 产量的影响(4d)

Table 1 Effects of various carbon source and exogenous ATP on intracellular ATP content and FPA production of four fungi (4d)

碳源 Carbon source	外源 ATP Exogenous ATP / mg · ml <sup>-1</sup>	C30		S38		A10		L22	
		ATP	FPA	ATP	FPA	ATP	FPA	ATP	FPA
葡萄糖 Glucose	0	0.5	2.4	1.7	1.1	0.2	1.0	0.2	0.3
甘油 Glycerol	0	0.7	2.0	0.8	0.8	0.3	0.4	0.1	0.2
纤维二糖 Cellobiose	0	0.2	2.9	0.2	1.8	0.2	1.5	0.5	1.2
纤维素粉 Cellulose CF11	0	1.1	1.8	1.5	2.1	1.0	1.1	8.0	1.6
葡萄糖 Glucose	0.5	55	0.3	45	0.1	30	0.3	50	0.0
甘油 Glycerol	0.5	65	0.1	48	0.1	40	0.1	46	0.0
纤维二糖 Cellobiose	0.5	45	0.4	48	0.2	25	0.4	44	0.1
纤维素粉 Cellulose CF11	0.5	48	0.3	60	0.1	35	0.2	62	0.3

单位: ATP, 10<sup>-8</sup>mg / ml; FPA, IU / ml.

表 2 cAMP 在菌体内外的分布(培养 2d)

Table 2 The distribution of cAMP in the mycelium of four fungi after 2 d cultivation

碳源 Carbon source	C30		S38		A10		L22	
	胞内 intra*	胞外 extra*	胞内 intra	胞外 extra	胞内 intra	胞外 extra	胞内 intra	胞外 extra
葡萄糖(0.5%) Glucose	3.5	45	2	30	2	40	2.5	35
纤维二糖(0.5%) Cellobiose	4	55	6	40	6	65	8	55
纤维素粉(1.0%) Cellulose CF11	15	130	10	160	9	135	12	125

单位: μmol / L; \* intra: intracellular, extra: extracellular.

为排除胞外大量 cAMP 对胞内 cAMP 含量精确测定的影响,需用 0.25mol / L pH3.5 磷酸缓冲液洗涤菌体 2~3 次,然后再破壁,进行胞内 cAMP 的测定。

### 2.4 外源 cAMP 对酶合成的影响

2.4.1 在非阻遏条件下 cAMP 对酶合成的促进作用:在各种碳源的培养基中分别添加终浓度为 10<sup>-3</sup>mol / L 的 cAMP。结果表明,以葡萄糖为碳源培养,外源 cAMP 的加入可使酶合成水平提高 50~60%(图 3)。而以槐糖(sophorose, sop)、CF11 为碳源培养,酶合成

水平提高 1 倍左右(图 4)。外源 cAMP 具有提高酶合成水平的作用。在原核生物中, cAMP 是通过与其受体蛋白(cyclic AMP receptor, CRP, 或称分解代谢基因活化蛋白 CAP)形成复合物,从而提高基因表达水平的。在丝状真菌中 cAMP 是否也是通过类似方式促进酶合成是有待研究的重要课题。

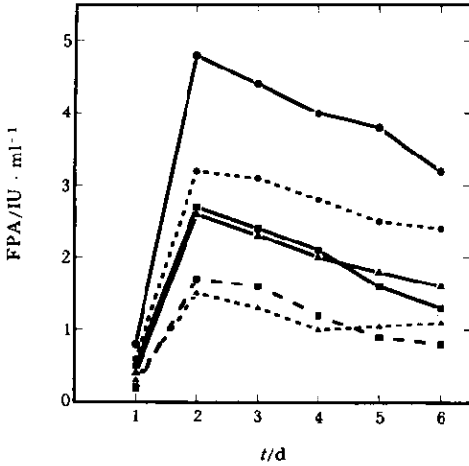


图 3 外源 cAMP 对三株真菌在 0.5% 葡萄糖培养基中 FPA 合成的影响

Fig.3 Effects of exogenous cAMP on the FPA synthesis of three fungi grown on 0.5% glucose medium

Symbols: ■ S38; ● C30; ▲ A10; — No cAMP (control); — Adding cAMP.

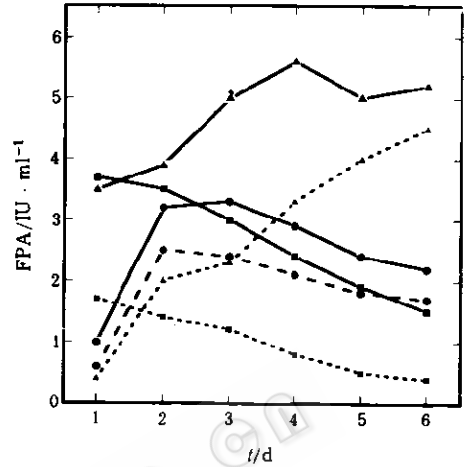


图 4 外源 cAMP 对斜卧育霉 A10 在不同碳源培养基中 FPA 合成的影响

Fig.4 Effects of exogenous cAMP on the FPA synthesis of *P. decumbens* A10 grown on various carbon sources

Symbols: ● Glucose; ■ Sophorose; ▲ CF11; — No cAMP; — Adding cAMP.

**2.4.2 在酶合成受阻遏条件下外源 cAMP 的影响:**以 2% 葡萄糖培养,添加终浓度为  $10^{-3}$  mol/L 的 cAMP,结果表明, cAMP 不能解除已发生的酶合成阻遏。与不添加 cAMP 的对照比较,纤维素酶合成时间与水平在葡萄糖耗尽以前没有明显差别。只有当葡萄糖基本耗尽后,添加 cAMP 实验组的酶合成水平才开始高出对照组。因此,真核生物与原核生物酶合成调节机制有明显的不同。

### 3 讨论

纤维素酶的合成受到诱导和分解产物阻遏机制的调节。酶合成阻遏一旦发生,就不会出现酶的诱导合成。许多易代谢碳源都被证实具有引起酶合成阻遏的作用<sup>[1]</sup>,同时都伴随着菌体的旺盛生长。众多研究表明,在分批培养条件下,酶的合成速率与菌体生长速率呈负相关<sup>[4]</sup>。酶的大量合成出现在易代谢碳源基本耗尽之后。由于糖代谢产生的能量主要储存于 ATP 等能量物质中,同时 ATP 等又是合成代谢的重要能量来源,因此,菌体内 ATP 含量及其能荷水平应该是菌体生长和合成调节的重要指征<sup>[11]</sup>。我们在研究中发现,以不溶性纤维素为碳源培养菌体时,胞内 ATP 含量明显低于以可溶性葡萄糖为碳源培养时的水平。而前者的 FPA 合成水平明显高于后者。另外,胞内 ATP 浓度随葡萄糖

浓度升高而增加,而酶合成水平则随之下降。只有当 ATP 浓度降到一定水平后,酶才开始合成。由此可推测,胞内 ATP 水平对纤维素酶的合成起负调节作用。

已知在原核生物中,cAMP 通过与其受体蛋白结合,而在转录水平上对酶合成起正调节作用<sup>[12]</sup>,其在真核生物中的作用仍在研究中。在我们的实验中,以纤维素为碳源时,FPA 合成水平较高,同时胞内 cAMP 含量也较高(表 2)。外源 cAMP 的加入可明显提高 FPA 合成水平,显示在非阻遏条件下 cAMP 对酶合成具有正向调节作用。而外源 cAMP 的加入不能解除已发生的酶合成阻遏,表现出真核生物调节的特殊复杂性。值得注意的是,cAMP 合成后大部分分泌到胞外,这一结果也曾被其他学者证实<sup>[13]</sup>,其机制有待进一步研究。

综合研究 ATP 及 cAMP 在纤维素酶合成调节中的作用,将有助于对真菌纤维素酶合成调节机制的阐明,也有助于真核生物蛋白质合成调节机制的研究。

本研究还显示,通过严格控制葡萄糖浓度,可使胞内 ATP 含量始终处于能起阻遏作用的水平之下,从而可能获得纤维素酶的持续生产。这表明有可能通过固定菌丝体,以可溶性碳源生产纤维素酶,除可获得高生产率外,还可避免不溶性纤维素底物给酶生产和提取带来的诸多不便。

### 参 考 文 献

- [1] Bisaria V S, Mishra S. *Crit Rev Biotechnol*, 1989, 9(2): 61~104.
- [2] 沈同等. 生物化学. 北京:高等教育出版社,1987. 444.
- [3] Fraser A D, Yamazaki H. *Can J Microbiol*, 1979, 57: 1037~1041.
- [4] Pall M L. *Microbiol Rev*, 1981, 45: 462~480.
- [5] Ma D, Gao P, Wang Z. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12: 631~634.
- [6] Qu Y, Zhao X, Gao P. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, 28 / 29: 363~368.
- [7] Mandels M. *Annual Report on Fermentation Processes*, 1982, 5: 35~78.
- [8] Lyman G E, Devincenzo J P. *Anal Biochem*, 1967, 21: 435~443.
- [9] Gilman A G, Murad F. *Methods Enzymol*, 1974, 38: 49~62.
- [10] Ghose T K. *Pure Appl Chem*, 1987, 24: 257~268.
- [11] Forrest W W, Walker D J. *Adv Microb Physiol*, 1971, 5: 213~274.
- [12] Pastan I. *Science*, 1970, 169: 339~344.
- [13] Lefebvre G, Raval G, Gay R. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 632: 26~34.

## STUDIES ON THE REGULATION OF CELLULASE SYSTEM BY ATP AND cAMP IN MYCELIAL FUNGI

Wang Dong Qu Yinbo Gao Peiji

(*Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*)

**Abstract** The intracellular ATP contents in 4 strains of mycelial fungi, grown on the glucose-inorganic salts medium, were determined by luciferin-luciferase system. The results showed that the extracellular cellulase (FPA) of the fungi was synthesized only when the intracellular ATP level was lower than  $10^{-8}$  mg/ml. No matter what carbon source was used, cellulase synthesis was repressed once the intracellular ATP level was over  $10^{-7}$  mg/ml. The cellulase synthesis of the fungi had a negative relativity to their intracellular ATP contents. The cAMP content of the fungi was determined by HPLC. The fungal cellulase synthesis was increased by exogenous cAMP under depression conditions. However, exogenous cAMP could not relax the repression of cellulase synthesis when it had happened. The levels of intracellular ATP and cAMP are the essential factors in the regulation of cellulase synthesis in mycelial fungi.

**Key words** Mycelial fungi, Cellulase, ATP, cAMP