

金属离子对面包酵母合成 ATP 的影响机制初探

廖鲜艳¹, 王蓓¹, 堵国成^{1,2}, 李寅^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对 Mg^{2+} , K^+ 和 Na^+ 在面包酵母酶系合成 ATP 过程中的影响机制进行了初步研究. 发现 Mg^{2+} 对 ATP 的合成影响很大, 当 Mg^{2+} 浓度为 40 mmol/L 时, ATP 合成量达到最大值, 为 6.07 mmol/L; 高浓度磷酸钾缓冲液会抑制 ATP 的合成, 进一步研究发现高浓度 K^+ 对 ATP 合成具有明显抑制作用, 但 K^+ 完全缺乏时, 也不利于腺苷的转化; Na^+ 可通过激活腺苷酸激酶的活性来促进 ATP 合成, 同时激活腺苷脱氨酶的活性, 其存在会使底物腺苷向肌苷转化.

关键词: 面包酵母; 酶法合成; ATP; 金属离子; 腺苷

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)04-0420-05

1 前言

三磷酸腺苷(ATP)是生物体内重要的代谢物质, 作为代谢的中间体、辅酶和能量供体, 参与生物体内许多生化反应^[1], 此外, ATP 作为酶反应的辅助因子在多步酶反应催化合成有用化合物中的应用也愈来愈广^[2,3]. 目前合成 ATP 的方法主要有化学合成法^[4]、酶催化合成法^[5]、利用微生物细胞酶系合成法^[6]及构建基因工程菌合成法^[7]等, 其中研究和应用较多的是利用微生物细胞酶系合成 ATP. Tani 等^[6]采用经山梨醇处理的 *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.) No.2201 细胞, 利用甲醇的氧化以还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)进入氧化磷酸化途径, 耦合腺嘌呤或腺苷的磷酸化反应合成 ATP. Murata 等^[8,9]利用面包酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞中糖酵解途径, 耦联腺苷的磷酸化反应作为 ATP 再生系统而用于谷胱甘肽(GSH)的合成, 由于菌株未经遗传改造, 实际研究结果不很理想, 但糖酵解途径仍被认为是最有希望的 ATP 再生途径. 微生物的糖酵解途径不仅可以用来合成 ATP, 还可以将其作为某些需要 ATP 的产物合成系统(如 GSH 合成系统)的 ATP 再生系统. 但到目前为止的报道主要集中在基质和辅因子的浓度对 ATP 合成的影响上, 对如何提高 ATP 合成的效率研究甚少, 同时也未能揭示对 ATP 合成有重要影响的某些金属离子在 ATP 合成过程中的作用.

本工作在前期研究^[10]的基础上, 利用面包酵母糖酵解途径耦联腺苷激酶(AK)和腺苷酸激酶(ADK)合成 ATP. 在糖酵解过程中, 己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PYK)是酵解途径的关键酶, 协调着整个糖

酵解的速率(如图 1 所示). 因此, 要实现采用面包酵母经济、高效地合成大量的 ATP, 首先要提高关键酶的活性, 而金属离子对参与反应的各种酶的活性有显著影响, 其中 Mg^{2+} 和 K^+ 是丙酮酸激酶的效应物^[11]. 本工作通过研究几种主要的金属离子(如 Mg^{2+} , K^+ 和 Na^+)对面包酵母合成 ATP 过程的中间产物腺嘌呤核苷酸的影响, 初步探讨了面包酵母合成 ATP 的反应机理.

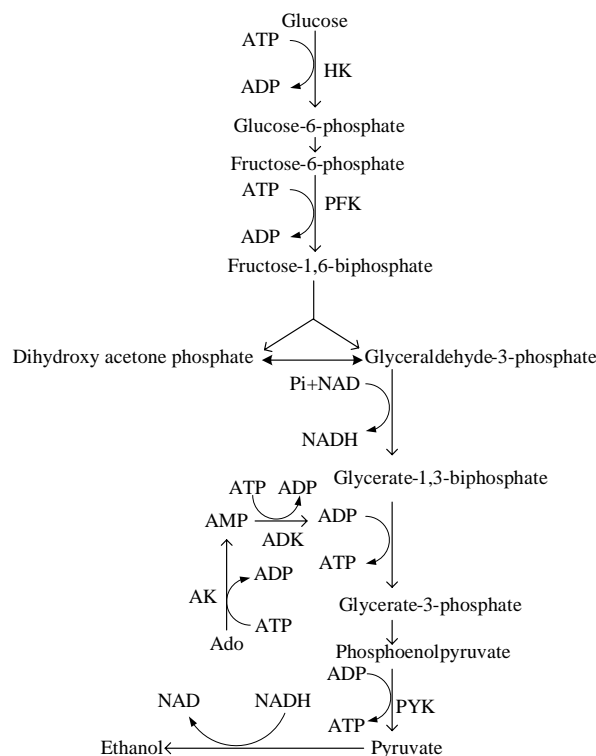


图 1 面包酵母合成 ATP 的代谢途径
Fig.1 The metabolic pathway of the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH-J701

收稿日期: 2004-08-19, 修回日期: 2004-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20376030), 江苏省自然科学基金资助项目(编号: BK2003020)

作者简介: 廖鲜艳(1975-), 女, 湖南省衡阳市人, 在职博士研究生, 讲师, 发酵工程专业; 堵国成, 通讯联系人.

2 材料与方法

2.1 菌种

面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)WSH-J701, 本研究室保藏.

2.2 材料

三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、单磷酸腺苷(AMP)、腺苷(Ado)、肌苷(Ino)均为 Sigma 公司产品. 葡萄糖购自无锡润生淀粉油脂公司(口服级), 酵母膏为广东一品鲜生物科技有限公司产品, 蛋白胨为上海东海制药厂产品. 其余试剂为国产分析纯.

2.3 培养基

种子和发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, pH 5.5.

2.4 面包酵母培养方法

种子培养: 将斜面种子在 30℃活化 3~4 h 后, 取 1 环酵母菌体接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中培养, 摇床转速 200 r/min, 温度 30℃, 培养时间 20 h.

发酵培养: 将培养好的种子培养液按照 10%(ϕ)的接种量, 接种至装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中进行培养, 培养时间为 18 h, 温度为 30℃, 摇床转速 200 r/min. 将培养液经 3000 r/min 离心后用蒸馏水洗涤菌体 2 次, 得到的湿酵母细胞贮存于超低温冰箱(-70℃)中.

2.5 面包酵母合成 ATP 反应过程

称取室温解冻的酵母湿菌体, 加入基础 ATP 合成反应液(反应体系中菌体浓度为湿重 200 mg/mL), 加入 2%(ϕ)甲苯, 37℃及 150 r/min 下振荡至 ATP 合成量达到最大时(4 h)进行取样分析测定.

基础 ATP 合成反应液(mmol/L): 葡萄糖 400, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 40, AMP 1, Ado 10, NAD 0.1, 溶于 250 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0), 用 0.1 mol/L KOH 调节 pH 为 7.0.

2.6 金属离子对面包酵母合成 ATP 的影响

ATP 合成反应前, 对反应体系中的成分进行如下调整, 以考察不同离子对面包酵母合成 ATP 的影响.

2.6.1 Mg^{2+} 对面包酵母合成 ATP 的影响

在基础 ATP 合成反应液中加入不同量 $MgCl_2$, 控制反应体系中的 Mg^{2+} 浓度在 0~50 mmol/L 范围内.

2.6.2 磷酸钾缓冲体系对面包酵母合成 ATP 的影响

改变基础 ATP 合成反应液中的磷酸钾缓冲液浓度, 使其分别为 100, 250, 400, 550 和 700 mmol/L.

2.6.3 K^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响

用 250 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)代替基础 ATP 合成反应液中的磷酸钾缓冲液, 用 0.1 mmol/L NaOH 调节 pH 为 7.0, 再向反应体系中加入不同量的 KCl, 使反应液中的 K^+ 浓度分别为 0, 50, 100, 150, 200, 250 和 400 mmol/L.

2.6.4 Na^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响

在基础 ATP 合成反应液中加入不同量的 NaCl, 使反应液中的 Na^+ 浓度分别为 0, 100, 250, 400 和 550 mmol/L.

2.7 分析方法

葡萄糖浓度的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[12].

ATP, ADP, AMP, Ado, Ino 的测定采用高效液相色谱法^[13].

3 结果与讨论

3.1 Mg^{2+} 对面包酵母合成 ATP 的影响

Mg^{2+} 是影响细胞活性的众多金属离子中最为重要的一种, 它是许多酶活性中心不可缺少的部分. 由图 2 可以看出, 当 $[Mg^{2+}]$ 为 0~40 mmol/L 时, ATP 合成量随 Mg^{2+} 浓度的增大而增加, 当 $[Mg^{2+}]$ 为 40 mmol/L 时, ATP 合成量达到最大, 为 6.07 mmol/L, 从腺苷到 ATP 的转化率达 63%. 但随着 $[Mg^{2+}]$ 的进一步增加, ATP 的合成量反而降低. 从图中还可看出, 只有当反应体系中没有外加 Mg^{2+} 存在时, 反应结束时腺苷(Ado)才会有残留 (5.49 mmol/L), 此时 ATP 的合成量仅为 0.19 mmol/L, 表明 Mg^{2+} 在 ATP 的合成中起着重要的作用. 另外发现, 在没有外加 Mg^{2+} 存在时, 虽然只有 45%的腺苷被转化, 但葡萄糖仍能被完全消耗, 表明在此条件下, 尽管由于 Mg^{2+} 的缺乏而造成 ATP 的合成受阻, 但葡萄糖的酵解过程仍能正常进行, 此时葡萄糖的消耗可能主要用于葡萄糖的磷酸化, 生成 6-磷酸葡萄糖和 1,6-二磷酸果糖^[2].

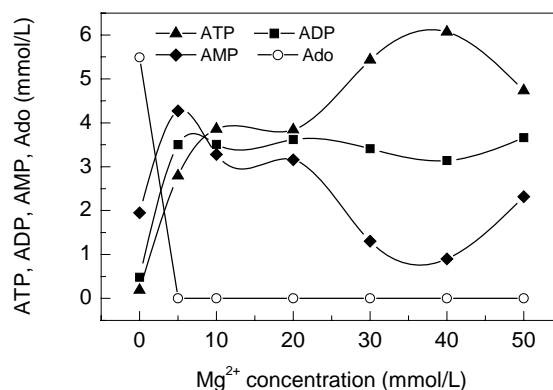


图 2 Mg^{2+} 对面包酵母合成 ATP 的影响
Fig.2 Effect of Mg^{2+} on the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH-J701

另外,即使在较低的 Mg^{2+} 浓度下(5 mmol/L),腺苷也能被完全转化,但主要积累大量的 AMP(4.27 mmol/L)和 ADP(3.50 mmol/L), ATP 的合成量相对较少(2.79 mmol/L). 而只有在较高的 Mg^{2+} 浓度水平下(40 mmol/L), ATP 才得以大量合成(6.07 mmol/L). 综合上述现象,从面包酵母合成 ATP 的代谢途径(图 1)分析可知,面包酵母合成 ATP 的反应过程主要包含葡萄糖的消耗(葡萄糖的磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖和 1,6-二磷酸果糖)、腺苷的转化(腺苷在腺苷激酶和腺苷酸激酶的作用下主要生成 AMP 和 ADP)和 ATP 的大量合成(ADP 经底物水平磷酸化反应合成 ATP)等几个主要的阶段,且上述几个阶段受 Mg^{2+} 浓度影响较大.

3.2 磷酸钾缓冲体系对面包酵母合成 ATP 的影响

对于面包酵母细胞酶系合成 ATP,如何提高参与反应的各关键酶的活性就显得尤为重要,这其中主要还包含反应体系的影响,为此,进一步研究了磷酸钾缓冲体系对面包酵母合成 ATP 的影响. 由图 3 可以看出,当磷酸钾缓冲液的浓度低于 400 mmol/L 时,腺苷均能被完全转化,但当磷酸钾缓冲液的浓度高于 550 mmol/L 时,反应体系中腺苷的转化率不足 50%. 当磷酸钾缓冲液的浓度为 250 mmol/L 时,ATP 合成量达到最大,为 5.94 mmol/L. 较低和较高的磷酸钾缓冲液浓度都不利于 ATP 的合成,特别是当磷酸钾缓冲液的浓度高于 550 mmol/L 时,几乎没有 ATP 合成. 由此可见,过高的磷酸钾缓冲液浓度会抑制腺苷的转化和 ATP 的合成^[14].

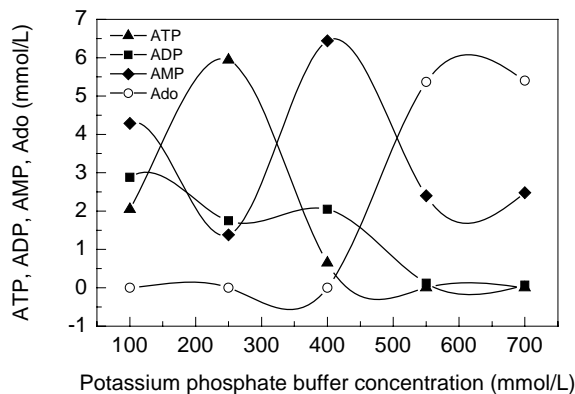


图3 磷酸钾缓冲体系对面包酵母合成 ATP 的影响
Fig.3 Effect of potassium phosphate buffer on the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH-J701

由图 3 还可看出,较高或较低的磷酸钾缓冲液浓度下,腺苷的消耗主要表现为 AMP 的积累,特别是当磷酸钾缓冲液的浓度高于 550 mmol/L 时,虽然此时腺苷转化率不足 50%,但 AMP 的积累量占转化的腺苷总量的比例却接近 60%,由此可以认为,低浓度磷酸钾缓冲

液主要通过影响腺苷酸的进一步磷酸化而影响 ATP 的合成,而较高浓度的磷酸钾缓冲液不但影响腺苷酸的进一步磷酸化,而且影响腺苷的磷酸化,从而影响 ATP 的合成.

3.3 K^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响

高浓度磷酸钾缓冲液会严重抑制 ATP 的合成,其影响因素可能包括磷酸根离子和 K^+ 的影响. Muruyama 等^[15]研究发现, K^+ 对腺嘌呤合成 ATP 的反应有明显的促进作用,但未能对其中的具体原因作出解释. 为了明确认识 K^+ 在 ATP 合成过程中的作用,本工作考察了不同 K^+ 浓度对面包酵母合成 ATP 的影响,结果见图 4.

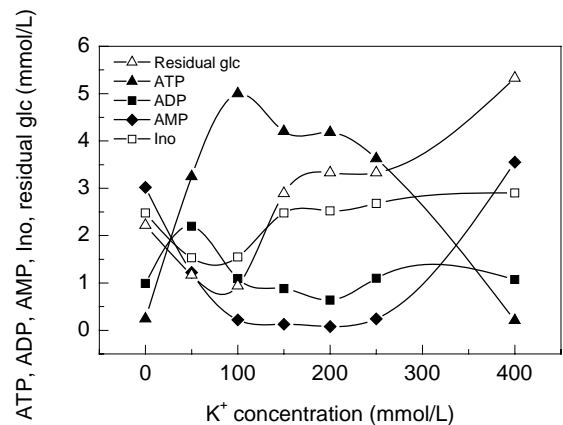


图4 K^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响
Fig.4 Effect of K^+ on the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH-J701

从图可以看出, K^+ 浓度过高(>400 mmol/L)或不足均不利于 ATP 的合成. K^+ 对 ATP 合成的影响主要归因于 K^+ 对丙酮酸激酶的激活作用,从而加速了糖酵解的进行,促进了 ATP 的合成,而高浓度 K^+ 则抑制了丙酮酸激酶的活性,从而抑制 ATP 的合成^[12]. K^+ 浓度为 100 mmol/L 时,ATP 合成量最大,此时,残糖浓度(Residual glc)也最小.

另一个有趣的现象是,反应体系中只要有 K^+ 存在,腺苷就能完全被转化,而没有 K^+ 存在时,反应体系中有腺苷残留(0.63 mmol/L). 由此推测, K^+ 对腺苷激酶可能具有激活作用. 另外,从图 4 还可以发现,在反应体系中无论是否存在 K^+ ,反应过程中都有肌苷的大量积累,而前期研究在磷酸钾缓冲体系中而非磷酸钠缓冲体系中肌苷的积累量较少(低于 1 mmol/L).

由图 3 可知,当磷酸钾缓冲液的浓度为 250 mmol/L 时(K^+ 浓度约 400 mmol/L),ATP 能大量合成,而由图 4 可知,当 K^+ 浓度为 400 mmol/L 时,ATP 合成量仅为 0.21 mmol/L,而且大量的肌苷生成(2.90 mmol/L). 比较图 3 和 4 所在的反应体系可以发现,当用磷酸钠反应缓冲

体系替代磷酸钾反应缓冲体系研究不同 K^+ 浓度的影响时, 反应体系中的 Na^+ 达 400 mmol/L, 可能由此导致底物的转化主要形成肌苷而非 ATP.

3.4 Na^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响

由图 5(a)可以看出, Na^+ 浓度在 100~250 mmol/L 时, ATP 合成量随 Na^+ 浓度的增大而增加, 当 Na^+ 浓度为 250 mmol/L 时, ATP 的合成量达到最大, 为 5.64 mmol/L. 但当 Na^+ 浓度高于 250 mmol/L, 反而会抑制 ATP 的合成. 另外, 研究发现, 无论是否有 Na^+ 的存在, 底物腺苷均能被完全转化(数据未给出), 因此 Na^+ 对腺苷激酶没有作用或作用甚小. 从图中 AMP 的变化曲线可以看出, 当 Na^+ 浓度在 100~250 mmol/L 时, AMP 的积累量不断减少, 之后随着 Na^+ 浓度的增加, AMP 的积累量又有所增加. 因此, 从不同 Na^+ 浓度条件下 AMP 的变化与 ATP 合成的关系不难发现, 低浓度 Na^+ 通过激活腺苷酸激酶的活性促进了 ATP 的合成, 这与 Yasuzo 等^[16]的研究结

果一致.

同时, 在研究过程中还发现, 随着 Na^+ 浓度的增加, 肌苷的积累量不断增加, 当反应体系中没有 Na^+ 存在时, 肌苷积累量仅 0.52 mmol/L, 当 Na^+ 浓度为 550 mmol/L 时, 肌苷的积累量达 3.38 mmol/L[见图 5(b)]. 在磷酸钠缓冲体系中(Na^+ 浓度约为 400 mmol/L)考察 K^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响时也发现, 反应体系中无论是否有 K^+ 的存在, 反应过程中都有肌苷的大量积累. 另外, 从图 5(b)还可看出, 随着 Na^+ 浓度的增加, 反应体系中 ATP, ADP, AMP 和 Ado 的总和(简称为 ΣA)不断下降, 但 ΣA 与 Ino 的总和[简称为 $\Sigma(A+Ino)$]基本维持不变. 分析上述现象可知, Na^+ 的存在促进了肌苷的积累, 可能是因为 Na^+ 的存在激活了腺苷脱氨酶的活性, 从而促进了腺苷向肌苷的转化. 另外, Na^+ 浓度过高也会影响糖的代谢, 导致残糖浓度较高[图 5(a)].

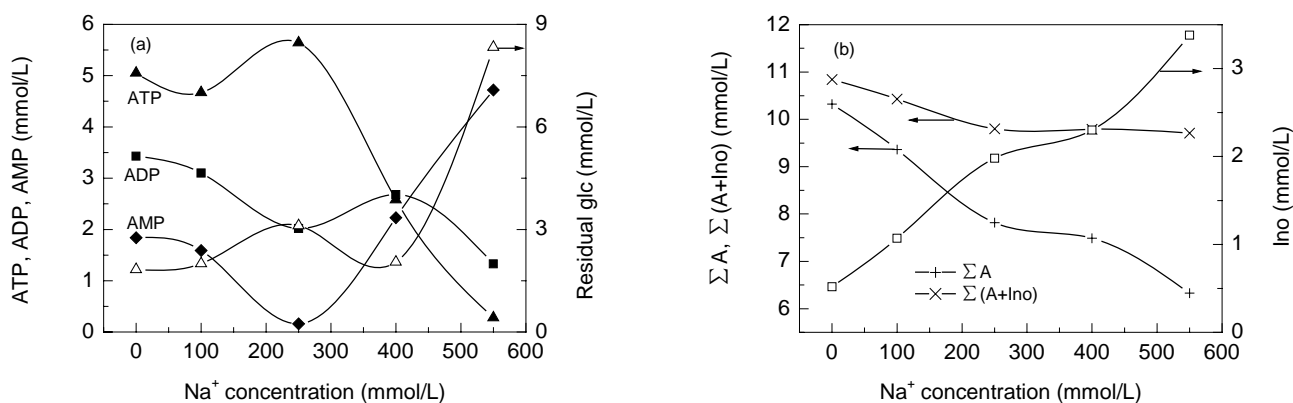


图 5 Na^+ 对面包酵母合成 ATP 的影响

Fig.5 Effect of Na^+ on the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH-J701

4 结论

(1) 确定了 *Saccharomyces cerevisiae* WSH-J701 酶法合成 ATP 的最适 Mg^{2+} 浓度为 40 mmol/L.

(2) 适当浓度的磷酸钾缓冲体系有利于 ATP 的合成, 但过高的磷酸钾浓度会抑制 ATP 的合成. 进一步研究发现, 当 K^+ 浓度较高(大于 100 mmol/L)时, 会对 ATP 合成产生明显抑制作用, 但 K^+ 完全缺乏时, 也不利于腺苷的转化.

(3) Na^+ 通过激活腺苷酸激酶的活性来促进 ATP 的合成, 但其存在会导致底物腺苷向肌苷的转化.

参考文献:

[1] Marriage B J, Clandinin M T, Macdonald I M, et al. Cofactor Treatment Improves ATP Synthetic Capacity in Patients with Oxidative Phosphorylation Disorders [J]. *Mol. Genet. Metab.*, 2004, 81(4): 263-272.

[2] Murata K, Tani K, Kato J, et al. Glycolytic Pathway as an ATP Generation System and Its Application to the Production of Glutathione and NADP [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1981, 3(3): 233-242.

[3] Widjaja A, Shiroshima M, Yasuda M, et al. Enzymatic Synthesis of Fructose 1,6-Diphosphate with ATP Regeneration in a Batch Reactor and a Semibatch Reactor Using Purified Enzymes of *Bacillus stearothermophilus* [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 1999, 87: 611-618.

[4] Fukuoka K, Suda F, Ishikawa M, et al. A Convenient Method for the Synthesis of ATP and Ap_4A [J]. *Nucleotides*, 1995, 14(3-5): 693-694.

[5] Langer R S, Hamillton B K, Gardner C R, et al. Enzymatic Regeneration of ATP [J]. *AIChE J.*, 1976, 22(6): 1079-1090.

[6] Tani Y, Yonehara T. ATP Production from Adenosine or Adenine by a Methanol-utilizing Yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.) No.2201 [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49: 637-642.

[7] Sakai Y, Rogi T, Yonehara T, et al. High-level ATP Production by a Genetically-engineered *Candida* Yeast [J]. *Biotechnol.*, 1994, 12: 291-293.

[8] Murata K, Tani K, Kato J, et al. Continuous Production of Glutathione Using Immobilized Microbial Cells Containing ATP Generating

- System [J]. *Biochimie*, 1980, 62(5-6): 347-352.
- [9] Murata K, Tani K, Kato J, et al. Glutathione Production Coupled with an ATP Regeneration System [J]. *Eur. J. Appl. M. Biotechnol.*, 1980, 10: 11-21.
- [10] 李华钟, 林金萍, 李寅, 等. 大肠杆菌-面包酵母种间耦合 ATP 再生系统中生物合成谷胱甘肽 [J]. *无锡轻工大学学报*, 1999, 18: 1-5.
- [11] 欧阳平凯, 应汉杰. 金属离子对 1,6-二磷酸果糖合成代谢流量的影响 [J]. *高校化学工程学报*, 2000, 14: 442-447.
- [12] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1984. 22-24.
- [13] Veciana-Nogues M T, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M C. Determination of ATP Related Compounds in Fresh and Canned Tuna Fish by HPLC [J]. *Food Chem.*, 1997, 59: 467-472.
- [14] 沈立新, 魏东芝, 张嗣良, 等. 大肠杆菌 BL(pTrc-gsh)与酵母耦联合成谷胱甘肽的研究 [J]. *生物工程学报*, 2001, 17: 452-455.
- [15] Muruyama A, Fujio T. ATP Production from Adenine by a Self-coupling Enzymatic Process: High-level Accumulation under Ammonium-limited Conditions [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65: 644-650.
- [16] Yasuzo I T O, Tomasselli A G, Noda L H. ATP: AMP Phosphotransferase from Baker's Yeast [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 105: 85-92.

Influence Mechanism of Metal Ions on ATP Production by the Cells of *Saccharomyces cerevisiae*

LIAO Xian-yan¹, WANG Bei¹, DU Guo-cheng^{1,2}, LI Yin^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Lab. Industrial Biotechnol., Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China;

2. Lab. Environ. Biotechnol., School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: ATP (adenosine 5'-triphosphate) is very important in all lives as a carrier of energy. It can also be used as an energy supply for some enzymatic reaction systems. In this report the cells of *Saccharomyces cerevisiae* WSH-J701 were used for the enzymatic production of ATP from glucose and adenosine. The influences of Mg^{2+} , K^+ and Na^+ on ATP production were investigated. The results showed that Mg^{2+} greatly affected the synthesis of ATP. The highest ATP production (6.07 mmol/L) could be achieved at Mg^{2+} concentration of 40 mmol/L. High concentration of potassium phosphate buffer was not favorable for ATP production. At high levels of K^+ concentration, ATP production was obviously inhibited, whereas adenosine could not be completely consumed in the absence of K^+ . Na^+ promoted ATP production by stimulating the activity of adenylate kinase. In the meantime, the presence of Na^+ resulted in the conversion of adenosine to inosine by stimulating the activity of adenine dehydrated ammonia enzyme.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; enzymatic synthesis; ATP; metal ions; adenosine