

文章编号:1673-1689(2007)06-0052-06

面包酵母生物合成 ATP 的影响因素及机理初探

廖鲜艳¹, 王芸¹, 朱至¹, 陈坚^{1,2}, 堵国成^{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 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:在对面包酵母生物合成 ATP 的影响因素研究的基础上,初步探讨了生物合成 ATP 的反应机理。研究表明:在反应体系中直接添加终体积分数为 0.5 % 的甲苯,可显著提高面包酵母细胞膜通透性。 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 9.02 mmol/L。在面包酵母生物合成 ATP 的过程中,当葡萄糖磷酸化和腺苷磷酸化反应竞争时,葡萄糖磷酸化快于腺苷磷酸化,在体系中其它需能反应结束后 ATP 才开始大量积累。在面包酵母经糖酵解途径生物合成 ATP 的前期,NAD 的再生主要通过形成甘油和乙醇来实现,而在生物合成 ATP 的中期和快速合成期,NAD 的再生主要是通过形成乙醇来实现。

关键词:面包酵母;生物合成;ATP;NAD 再生

中图分类号:Q 939.9

文献标识码:A

Factors and Mechanism of ATP Biosynthesis by the Cells of *Saccharomyces cerevisiae*

LIAO Xian-yan¹, WANG Yun¹, ZHU Zhi¹, CHEN Jian^{1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:Based on the study of factors of ATP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* WSH2, the mechanism of ATP biosynthesis was investigated. The results showed that toluene direct treatment with the final concentration of 0.5% (v/v) was beneficial for the improvement of penetrability of cell membrane. Magnesium ion greatly affected the synthesis of ATP, and the highest ATP production (9.02 mmol/L) could be achieved at 40 mmol/L. It was found that the rate of glucose phosphorylation was faster than that of adenosine phosphorylation. ATP was accumulated rapidly only in the final phase. In case of ATP biosynthesis, NAD regeneration was mainly conducted via the formation of glycerol and ethanol. While in metaphase and fast synthesis phase of ATP, NAD regeneration was mainly conducted by the formation of ethanol.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; biosynthesis; ATP; NAD regeneration

收稿日期:2007-02-09.

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA10Z31);科技部中小企业创新基金项目(06C26213201074).

作者简介:廖鲜艳(1975-),女,湖南衡阳人,工学博士,讲师. Email: xyliao@jiangnan.edu.cn

通讯作者:堵国成(1965-),男,江苏常州人,工学博士,教授,博导,主要从事生化工程与发酵工程方面的研究.

Email: gdcu@jiangnan.edu.cn

三磷酸腺苷(ATP)是生物体内重要的代谢物质,它作为代谢的中间体、辅酶和能量供体,参与生物体内许多生化反应^[1]。此外,作为酶反应的辅助因子,ATP 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^[8]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^[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,报道主要集中在基质和辅因子的浓度对 ATP 合成的影响上,而对 ATP 合成反应的机理研究甚少。

作者在前期研究^[10-11]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(见图 1)。在对面包酵母生物合成 ATP 的影响因素研究的基础上,初步探讨了面包酵母生物合成 ATP 的反应机理。

1 材料与方法

1.1 菌种

面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) WSH2, 作者所在研究室保存菌株。

1.2 材料

三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、单磷酸腺苷(AMP)、腺苷(Adenosine, Ado)、腺嘌呤(Adenine, Ade)和肌苷(Inosine, Ino),均为 Sigma-Aldrich(上海)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。

1.3 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。

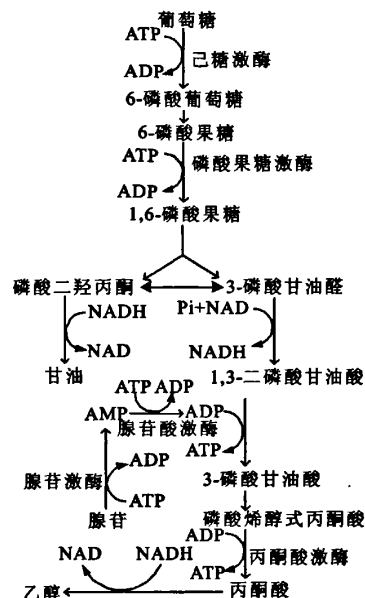


图 1 面包酵母生物合成 ATP 的代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathways of ATP biosynthesis by *S. cerevisiae*

1.4 面包酵母培养方法

1.4.1 种子培养 将斜面种子于 30 °C 活化 3~4 h,取一环菌体接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 的三角瓶中培养,摇床转速 200 r/min,30 °C 培养 20 h。

1.4.2 发酵培养 将培养好的种子培养液按照体积分数 10% 的接种量接种至装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 的三角瓶中培养,培养时间 18 h,温度 30 °C,摇床转速 200 r/min。将培养液经 3 000 r/min 离心后再用蒸馏水洗涤 2 次,得到的湿酵母菌体贮存于超低温冰箱(-70 °C)中。

1.5 面包酵母合成 ATP 反应过程

称取室温解冻的面包酵母湿菌体(反应体系中菌体浓度为 200 mg 湿重细胞/mL),加入基础 ATP 合成反应液,再加入不同终浓度甲苯(或面包酵母细胞经通透性预处理),37 °C、150 r/min 下振荡反应,沸水浴中加热终止反应,离心收集上清液进行分析测定。每批实验有 3 组平行对照样,取实验结果的平均值进行分析和计算。

基础 ATP 合成反应液(mmol/L):葡萄糖 400, Ado 10, AMP 1, NAD 0.1, MgCl₂ · 6H₂O 40; 溶于 200 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)。

1.6 面包酵母细胞膜通透性研究

1.6.1 甲苯预处理对面包酵母合成 ATP 的影响

将 10 g 面包酵母湿菌体悬浮于 100 mL 含有不同体积分数的甲苯和 0.5 mmol/L L-Cys 的 5.0

mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中,37℃振荡处理30 min,离心后收集菌体,并用0.5 mmol/L L-Cys的5.0 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)洗涤两次。

1.6.2 反应体系中直接添加甲苯处理对面包酵母合成ATP的影响 在生物合成ATP的反应体系中,直接添加含有不同体积分数甲苯的基础ATP合成反应液。

1.7 分析方法

葡萄糖浓度测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[12];ATP及其相关物质测定采用高压液相色谱测定(HPLC)^[13];甘油浓度测定采用变色酸法^[14];乙醇浓度测定采用气相色谱法^[15]。

2 结果与讨论

2.1 通透性处理对面包酵母合成ATP的影响

利用面包酵母合成ATP,主要是利用面包酵母细胞中糖酵解途径的关键酶和腺苷激酶及腺苷酸激酶等。通常情况下,这些酶系分布在胞内,而反应底物和能量物质以及一些金属离子都存在于胞外反应液中,胞内酶系要与胞外底物发生反应则需要大量物质的跨膜运输。因此利用面包酵母合成ATP,在保证胞内有关酶活性的基础上应尽可能地提高细胞膜的通透性。

目前,用于提高细胞膜通透性的处理方法主要有化学法,如:有机溶剂法、表面活性剂法等;物理法,如:超声波破碎、冻融法等;生物生理调控法,即通过调节细胞的生理环境来影响细胞膜的结构和化学组成,以达到提高细胞膜通透性的目的。沈立新等^[16]比较了几种不同有机溶剂和表面活性剂对大肠杆菌和酵母细胞膜通透性的影响,发现甲苯和丙酮的处理效果较好。Fujio和Furuya^[17]考察了表面活性剂、抗生素和有机溶剂等细胞通透性处理方法对产氨短杆菌合成ATP的影响,发现有机溶剂,如甲苯或二甲苯处理可以提高细胞膜通透性。因此,作者选择甲苯作为提高面包酵母细胞膜通透性的处理方法,比较了甲苯的不同处理方式(甲苯预处理和在合成ATP反应体系中直接添加甲苯处理)对面包酵母合成ATP的影响,结果见图2。

由图2(a)可知,当甲苯体积分数较低时,在反应体系中直接添加甲苯处理的面包酵母比甲苯预处理的面包酵母合成ATP效果好。当直接添加终体积分数为0.5%的甲苯时,反应3 h时ATP合成量为6.45 mmol/L,腺苷向ATP的转化率达到65%;而甲苯预处理(2%甲苯)的面包酵母合成ATP最大量为3.72 mmol/L,腺苷向ATP的转化

率为38%。随着甲苯体积分数的增加,两种处理方法的面包酵母合成ATP能力均呈现下降趋势,且直接添加甲苯处理的面包酵母合成ATP能力下降得更为明显,这可能是因为高体积分数甲苯的直接添加比甲苯预处理对面包酵母的糖耗能力影响更大(图2(b))。

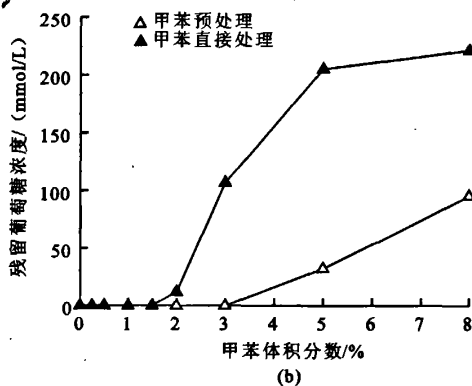
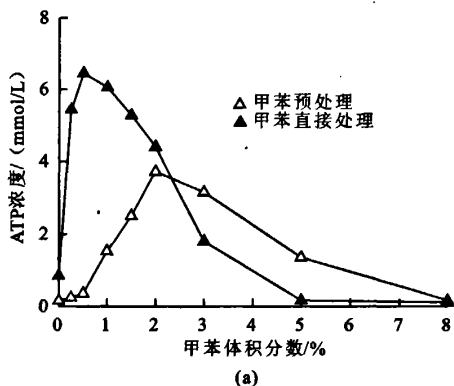


图2 通透性处理对面包酵母合成ATP的影响

Fig. 2 Effect of toluene pretreatment and direct treatment on the generation of ATP by *S. cerevisiae* WSH2

2.2 镁离子浓度对面包酵母合成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一部分。由图3可以看出,当 Mg^{2+} 浓度为0~40 mmol/L时,ATP合成量随 Mg^{2+} 浓度的增大而增加;当 Mg^{2+} 浓度为40 mmol/L时,ATP合成量达到最大,为9.02 mmol/L,从腺苷到ATP的转化率达90%。但随着 Mg^{2+} 浓度的进一步增加,ATP的合成量反而降低。从图3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(7.21 mmol/L),此时ATP的合成量仅为0.24 mmol/L,表明 Mg^{2+} 在ATP的合成中起着重要的作用。另外,在没有外加 Mg^{2+} 存在时,虽然只

有约 28% 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 Mg^{2+} 的缺乏会造成 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,生成糖酵解途径的中间产物。

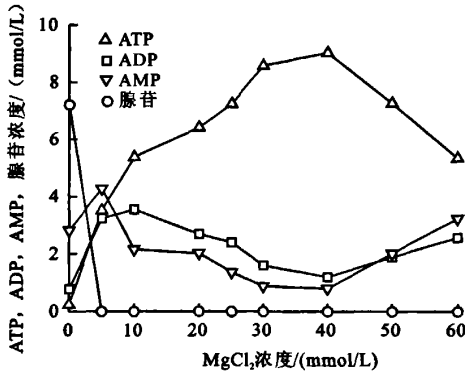


图 3 Mg^{2+} 对面包酵母合成 ATP 的影响

Fig. 3 Effect of Mg^{2+} on the production of ATP by *S. cerevisiae* WSH2

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 (4.28 mmol/L)和 ADP(3.25 mmol/L),ATP 的合成量相对较少(3.53 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(9.02 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糖酵解途径中间产物)、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+} 浓度影响均较大。

2.3 面包酵母合成 ATP 的过程分析

利用面包酵母合成 ATP,基质腺苷在腺苷激酶和腺苷酸激酶的作用下转化为 AMP 和 ADP,ADP 直接进入糖酵解途径合成 ATP。然而,葡萄糖消耗、腺苷转化及 ATP 合成之间的关系至今未有详细报道。作者考察了面包酵母以腺苷为底物合成 ATP 的过程曲线(见图 4),以初步探讨面包酵母合成 ATP 的反应机理。

由图 4 可以看出,ATP 合成过程可以明显地划分为 4 个阶段:即合成前期(反应进行 0~1 h)、合成中期(反应进行 1~2 h)、快速合成期(反应进行 2~3 h)、衰减期(反应 3 h 以后)。

ATP 合成前期,葡萄糖在这一时期被快速消耗,ATP 几乎没有积累。而腺苷的磷酸化反应明显

滞后于葡萄糖的消耗。根据文献[2, 18]报道,葡萄糖的消耗主要产生了大量中间代谢产物 6-磷酸葡萄糖和 1,6-二磷酸果糖,此阶段葡萄糖代谢产生的 ATP 又很快被葡萄糖和 6-磷酸果糖磷酸化所消耗,ATP 处于不断合成和不断消耗的动态变化中,因此 ATP 不能大量积累。

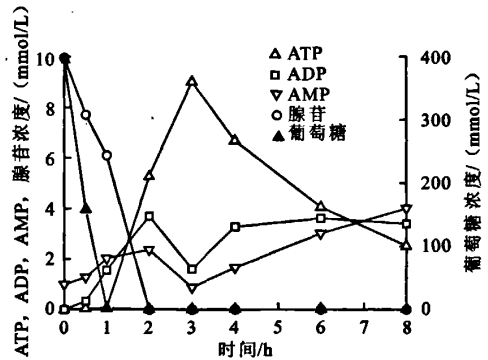


图 4 面包酵母以腺苷为底物合成 ATP 过程曲线

Fig. 4 Time course of ATP generation from Ado by *S. cerevisiae* WSH2

ATP 合成中期,腺苷在此阶段被完全转化,AMP 和 ADP 大量积累(ADP 为 3.70 mmol/L,AMP 为 2.37 mmol/L)。当葡萄糖磷酸化产生的 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖转化为 1,6-二磷酸果糖后,反应体系的需能反应基本完成,葡萄糖代谢产生的中间代谢产物再通过糖酵解途径生成 ATP,在腺苷激酶和腺苷酸激酶的催化下将底物腺苷磷酸化生成 AMP 和 ADP,并最终生成 ATP,此时 ATP 开始积累。

在 ATP 快速合成期,大量 ATP 快速合成,此时发生的主要是底物水平磷酸化反应,ATP 的积累量在此阶段达到最大(反应 3 h,ATP 浓度为 8.98 mmol/L)。

由此可以看出,在面包酵母合成 ATP 的过程中,当葡萄糖和腺苷的磷酸化反应竞争时,葡萄糖的磷酸化快于腺苷磷酸化,ATP 的大量积累是在体系中其它需能反应结束后才快速出现的。

2.4 面包酵母合成 ATP 过程中 NAD 的再生

在面包酵母经糖酵解途径合成 ATP 的过程中,需要辅酶 NAD 的不断供给。在反应过程中,辅酶 NAD 是作为氢原子受体从 3-磷酸甘油醛移走氢,而自身还原为 NADH。在酵母细胞内 NAD 与 NADH 以一定比例处于平衡状态,为了酵解的继续进行,NADH 必须以适当方式再生为 NAD。酵母处于好氧环境时,NADH 可以通过呼吸链氧化为 NAD。而在厌氧条件下主要存在两条 NAD 再生途

径:一是 NADH 作为醇脱氢酶辅酶,还原乙醛为乙醇;二是作为磷酸甘油脱氢酶辅酶,还原磷酸二羟丙酮为甘油,由此完成 NAD 的再生。在一般情况下,酵母细胞很少形成甘油。为了明确反应过程中 NAD 的再生途径,作者考察了反应过程中甘油和乙醇的积累情况,结果见图 5。

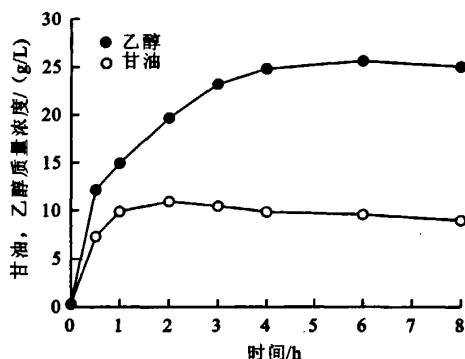


图5 面包酵母合成 ATP 过程中甘油与乙醇质量浓度变化

Fig. 5 Change of glycerol and ethanol concentration during the biosynthesis of ATP by *S. cerevisiae* WSH2

由图 5 可看出,在 ATP 合成前期,反应体系中甘油和乙醇都有所积累。这可能是因为此时还未形成足量的乙醛,通过形成乙醇来完成 NAD 的再

生不能满足糖酵解的需要。而为了再生 NAD,必然会有甘油形成^[19],这是细胞的一种自我调节机制。在 ATP 合成中期和快速合成期,一方面磷酸烯醇式丙酮酸的分解加速,产生更多的 ATP;另一方面,由于磷酸烯醇式丙酮酸的分解,通过形成乙醇来完成 NAD 的再生途径加强,因此反应体系中甘油量不再增加。

3 结 语

1) 在反应体系中直接添加体积分数为 0.5% 的甲苯,可显著提高面包酵母细胞膜通透性,有利于面包酵母将基质腺苷转化为 ATP。

2) Mg^{2+} 对 ATP 的合成影响很大,面包酵母 *S. cerevisiae* WSH2 酶法合成 ATP 的最适 Mg^{2+} 浓度为 40 mmol/L。

3) 在面包酵母合成 ATP 的过程中,当葡萄糖的磷酸化和腺苷磷酸化反应竞争时,葡萄糖的磷酸化快于腺苷磷酸化,ATP 的大量积累是在体系中其它需能反应结束后才快速出现的。

4) 在面包酵母经糖酵解途径生物合成 ATP 前期,主要是通过形成甘油和乙醇来完成 NAD 的再生,而在生物合成 ATP 中期和快速合成期,主要是通过形成乙醇来完成 NAD 的再生。

参考文献(References):

- [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 Tech*, 1981, 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] Fukuoda K, Suda F, Ishikawa M, et al. A convenient method for the synthesis of ATP and ApA[J]. *Nucleosides*, 1995, 14: 693-694.
- [5] Langer R S, Gardner C R, Hamilton B K, et al. Enzymatic regeneration of ATP[J]. *AIChE J*, 1976, 22: 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]. *Biotechnology*, 1994, 12(3): 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]. *Appl Microbiol Biot*, 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.
- LI H Z, LIN J P, LI Y, et al. Biosynthesis of glutathione in the ATP regeneration system established by the mixed culture of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999, 18: 1—5. (in Chinese)
- [11] 廖鲜艳,王蓓,堵国成,等.金属离子对面包酵母合成 ATP 的影响机制初探[J].过程工程学报,2005,5(4):86—90.
- LIAO X Y, WANG B, DU G C, et al. Influence mechanism of metal ions on ATP production by the cells of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2005, 5(4): 86—90. (in Chinese)
- [12] 卫功元,李寅,堵国成,等.*Candida utilis* 生物合成谷胱甘肽的营养和环境条件[J].应用与环境生物学报,2003,9(6):642—646.
- WEI G Y, LI Y, DU G C, et al. Fermentation conditions of glutathione by *Candida utilis*[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, 9(6): 642—646. (in Chinese)
- [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] Miller G L, Blum R, Glennon W E. Biochemical analysis of glycerol[J]. *Anal Biochem*, 1960, 2: 127—132.
- [15] Fu R Y, Chen J, Li Y. Heterologous leaky production for transglutaminase in *Lactococcus lactis* significantly enhances the growth performance of the host[J]. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(12): 8911—8919.
- [16] 沈立新,魏东芝,张嗣良,等.大肠杆菌 BL21(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(4):452—455.
- SHEN L X, WEI D Z, ZHANG S L, et al. Studies on synthesis of glutathione by *E. coli* BL 21(pTrc-gsh) coupled with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(4): 452—455. (in Chinese)
- [17] Fujio T, Furuya A. Production of ATP from adenine by *Brevibacterium ammoniagenes*[J]. *J Ferment Technol*, 1983, 61: 261—267.
- [18] Fukuda Y, Yamaguchi S, Hashimoto H, et al. Cloning of glucose phosphorylating genes in *S. cerevisiae* by the KU-method and application to ATP production[J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(11): 2877—2881.
- [19] Holzer H, Bernhardt W, Schneider S. Regulation of glycerol metabolism in yeasts[J]. *J Biol Chem*, 1981, 256: 1385—1394.

(责任编辑:李春丽)