

酿酒酵母酶促磷酸化合成腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)

秦皇岛市微生物制药厂
河北省轻工业研究所
河北大学生物系毕业实践小分队

酶促磷酸化法生产腺嘌呤核苷三磷酸(以下简称 ATP),多利用啤酒酵母、面包酵母等的酶系进行反应^[1,2],尚未见到以酿酒酵母合成 ATP 的报道。我国有很多白酒厂,酿酒酵母取材容易,而且培养条件要求低,对糖的发酵力强,对酸和乙醇的耐受力较好。研究用酿酒酵母进行酶促磷酸化合成 ATP 适于白酒厂土法上马。

材 料 和 方 法

一、酵母泥的制备

菌种:酿酒酵母南阳 6 号,属强发酵型。

将试管原菌接入米曲试管斜面,28℃ 培养 3—4 天,转入糖液固体培养基,28℃ 静止培养 48 小时,接入液体糖液三角瓶扩大培养,28℃,静置 24 小时。之后,再接入糖液三角瓶,以同样温度条件扩大培养 18 小时。

培养好的菌体,经 900 转/分离心 20 分钟(离心半径 610 毫米),用冷的无离子水洗涤沉淀,再离心取酵母泥,每升培养液可得含水 78—80% 的酵母泥 20—25 克。

二、反应系统及反应条件

AMP (以纯品计) 1 克, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4 克, KH_2PO_4 1.2 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 克,葡萄糖 4.4 克,加水 120 毫升,溶解后预热至 36℃,投入酵母泥 30 克, pH 6.0—6.5, 33℃ ± 1℃ 静置反应 30—50 分钟。

三、分析方法

(一) 反应进程的检查

试验用 DEAE-纤维素(二乙胺乙基纤维素)薄板层析作为反应进程的检查手段,用以控制反应终点。层析条件:干法点样 10 微升(试样系经 2000 转/分离心 2 分钟的反应上清液)。溶剂系统为 0.1M pH 4.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。上行层析至溶剂前沿距点样处 10—12 厘米。当层析图谱上出现 ATP 单点时停

止反应。

(二) AMP 到 ATP 转化率的测定

电泳条件:干法点样 20 微升,在 0.05 M pH 3.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中电泳 2—2.5 小时,电压 250—300V,电流 15—20mA。

斑点洗脱条件:用 10 毫升 0.01 N 的 HCl 室温浸泡 2 小时,每隔 1 小时振摇一次*,G₅*垂熔漏斗过滤。

转化率计算:滤液用“751”型分光光度计测定 260nm 的光密度(O. D.),按下式计算 AMP 到 ATP 的转化率。

转化率(%) =

$$\frac{\text{ATP 斑点洗脱液 O. D.}_{260\text{nm}}}{\text{反应开始时 AMP 斑点洗脱液 O. D.}_{260\text{nm}}} \times 100\%$$

(三) 无机磷含量的测定

在酶促磷酸化反应中无机磷的下降与 ATP 的积累之间并无十分严格的函数关系,但大体是一致的,可作为一个参考数值。试验采用钼蓝比色法测定无机磷含量。

结 果 和 讨 论

一、酿酒酵母南阳 6 号酶促磷酸化活力

实验证明酿酒酵母南阳 6 号具有良好的酶促磷酸化活力,由 AMP 酶促合成 ATP 的转化率可达 80—95%,在反应 30—40 分钟 ATP 积累达到高峰。在这一时间,反应液在 DEAE-纤维素薄层层析图谱上仅显出 ATP 一个斑点。反应至 50—60 分钟,又复出现 AMP 和 ADP 斑点(见图 1)。

在该试验条件下,用啤酒酵母进行酶促磷酸化,则转化率较低,产品较杂,终点不易控制。

二、菌体的预处理对 ATP 合成的影响

先前,曾有不少工作者以各种不同方法处理菌体,

* 用此法所测得的转化率结果比用 45℃ 水浴保温、振摇洗脱 2 小时所测得的结果低一些,但为了和我厂生产上的方法一致,仍然沿用了这一方法。

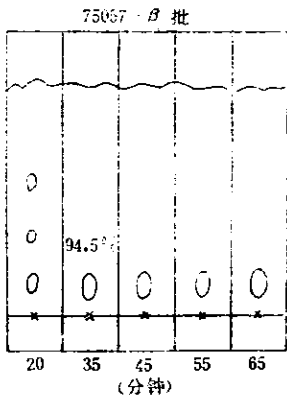


图1 酿酒酵母南阳6号酶促磷酸化合成ATP反应过程薄层析图谱 图中斑点上方的百分数为该时AMP生成ATP的转化率

取得了良好效果^[3,4]。我们在试验中发现新鲜的南阳6号酿酒酵母无明显的磷酸化活力。而在采取后立即冰冻成块,并于冰冻状态中保存3天以上,或用5℃水浸洗3天以上的酵母均表现出良好的磷酸化活力。而酵母丙酮粉和风干酵母粉只有50—60%的批数表现出明显的磷酸化活力,而且反应过程拖长,需4—5小时方可使转化达到高峰,制粉过程中的温度等条件对菌体的磷酸化活力影响较大。

图2是应用不同冰冻天数的酵母进行酶促磷酸化反应测得的AMP生成ATP的转化率。结果表明:利用酿酒酵母南阳6号进行酶促磷酸化反应时,冰冻3天是必要的,否则会影响转化活力。实验还表明,冻冰时间延长至10天不影响转化活力,延长至15—20天,仍有较好的磷酸化活力,这一点对于生产是有利的。

三、反应系统对ATP合成的影响

日本曾有人研究了无机磷和葡萄糖浓度对酶促磷酸化合成ATP的影响^[2],在以磨碎的面包酵母进行酶促磷酸化反应时,葡萄糖与AMP的克分子比为11:1—22:1,无机磷与AMP的克分子比为16.7:1—22:1是适宜的。酿酒酵母南阳6号则对反应系统的组成有较广泛的适应性。在葡萄糖与AMP克分子比为8.5:1,无机磷与AMP克分子比为9.1:1的反应系统中,得到了良好的ATP转化效率(见表)。反应结束时反应液中还原糖残余量很低,这不仅有经济上的价值,而且产生的糖类磷酸酯较少,利于ATP的提纯。

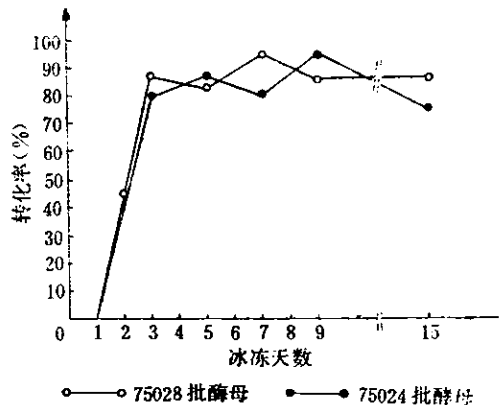


图2 酿酒酵母冰冻天数对ATP转化率的影响

在不同反应系统中ATP转化率

反应系统编号		1	2	3	4	5
名称	数量					
AMP在反应液中的浓度(微克分子/毫升)		24	24	24	24	24
葡萄糖与AMP的克分子比		8.5:1	13.5:1	13.5:1	13.5:1	13.5:1
无机磷与AMP的克分子比		9.1:1	11.1:1	13:1	16:1	18:1
酵母泥与AMP的重量比		30:1	30:1	30:1	30:1	30:1
ATP转化率%(平均值)		89.45	73.1	72.89	81.6	72.2

此外,还试验了乙醛、乙醚、甲苯等对酶促磷酸化反应的作用,结果均不产生影响。反应过程中搅拌与否对反应结果也无明显影响。

参 考 资 料

- [1] 中山大学生物系生物化学教研室:《微生物学报》13: 127—185, 1973。
- [2] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 45: 511, 1967。
- [3] 中山大学生物系微生物生化专业:《中山大学学报》4: 1974。
- [4] Tanaka, A. & Hironaka, J.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 867, 1972。