

日晒干燥面包酵母酶促磷酸化合成 ATP*

杜汝慧 陈青山

(河北大学生物学系, 保定)

好氧性或厌氧性酵母都须经过预处理才能用于酶促磷酸化合成 ATP, 好氧性酵母的预处理方法尤为复杂, 而转化率仅有 75% 左右^[1-7]。因此一般认为面包酵母不适于应用到工业生产 ATP 上。我们通过试验发现, 干燥的面包酵母糖酵解酶系可以耐受 45℃ 左右的温度, 为利用酵母生产 ATP 提供了可能的途径, 现报道如下。

材料与方 法

一、酵母粉的制备

面包酵母系天津幸福食品厂生产的鲜酵母

* 刘福英、李新建等同学参加了工作。

块,将其掰碎,室温电扇风干3—5小时,再放日光下曝晒1—3小时,使酵母含水量降至5%以下。研磨成粉状密封于双层塑料袋内,保存于-4℃冰箱或室内阴凉处。

二、反应系统及操作方法

将5'-AMP 0.1克, MnSO₄·H₂O 0.0025克,葡萄糖 0.45克,先溶于15毫升 pH 7.0的0.5 M磷酸缓冲溶液中,预热至37℃,然后加入面包酵母粉1.6克,37—39℃水浴保温。反应半小时后,每20分钟取样一次,用薄板层析法检查反应产物,用纸电泳法对反应产物定性和定量。

三、分析方法

1. 反应过程的检查用薄板层析法: 铺板材料为DEAE-纤维素(Cl⁻型), 60℃烘干备用。将样品1毫升3000转/分离心1分钟,取上清液10微升,薄板上点样,在0.1M的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH4.0)中展层,吹干置于紫外光灯下观察,鉴定反应产物。

2. 转化率的测定用纸电泳法: 取离心后的上清液20微升,点样于快速滤纸(或新华三号滤纸)上,在0.02M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.0),电流5—10安培350—400伏电压下,电泳1.5—2小时。另取空白滤纸,在同样条件下电泳,吹干后再精确吸取上清液20微升,点样后即吹干,此作为原点(该样品中核苷类物质的总量)。然后将紫外光灯下显现的各斑点划出,剪下。用10毫升0.01N的HCl,40℃保温洗脱2小时,室温静置1小时左右,过滤。最后测定滤液的光密度260毫微米,同时作相应的空白对照,用下列公式计算其转化率。

ATP 转化率(%)

所测物斑点洗脱液光密度_{260毫微米}
= $\frac{\text{一空白光密度}_{260毫微米}}{\text{原点斑点洗脱液光密度}_{260毫微米} - \text{一空白光密度}_{260毫微米}} \times 100$

试验结果

一、日晒干燥面包酵母酶促磷酸化合成 ATP 的反应过程

在上述反应系统中进行反应,每隔20分钟取样分析,结果见图1。

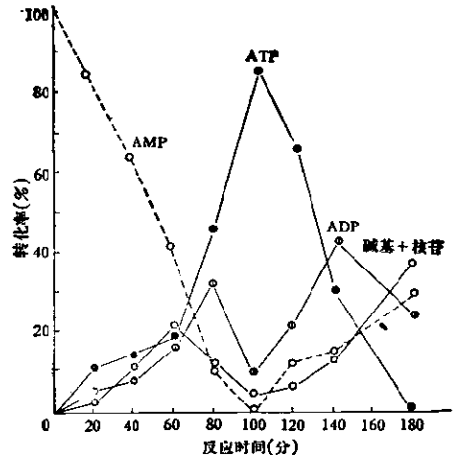


图1 面包酵母酶促磷酸化反应过程

按上法反应,采用离子交换法纯化ATP^[7], 纯度为90%的AMP原料1.4克,可得1.0克纯度为90.8%的ATP(含水量为6.1%)。

二、温度对面包酵母的糖酵解酶系活性的影响

将新鲜的小酵母块放于20—30℃室温下用电扇吹干和日晒干燥,在不同时间取样进行酶促磷酸化反应,结果见表1。

表1 面包酵母的不同干燥条件与含水量 ATP 转化率的关系

处理方法	20—30℃,电扇风干					45℃±5,日晒	
	3	5	7	15	20	1	2
处理时间(小时)							
酵母含水量(%)	19.7	12.9	9.85	9.62		6.5	4.78
ATP 转化率(%)	0	14	62.2	70.6	71	71.5	89.4

试验说明,经日晒干燥的酵母活性最高。即使在日晒温度高达45±5℃的条件下,酵母的糖酵解的酶活力不变,见图2。

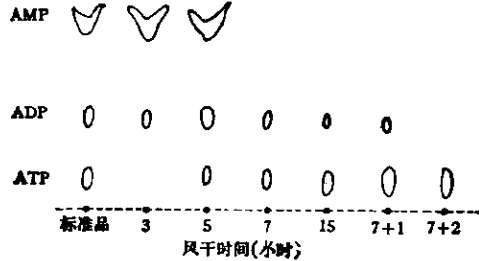


图2 酶促磷酸化反应的层析图谱

7+1 为风干7小时再日晒1小时;
7+2 为风干7小时再日晒2小时。

用此方法干燥的酵母在普通冰箱中(8℃)保存

65 天,或在室温保存 20 天,酶活力不变。

三、面包酵母含水量与酶促磷酸化活力的关系

面包酵母在含水量降至 5% 左右时,ATP 转化率最高,见表 1 及图 3。

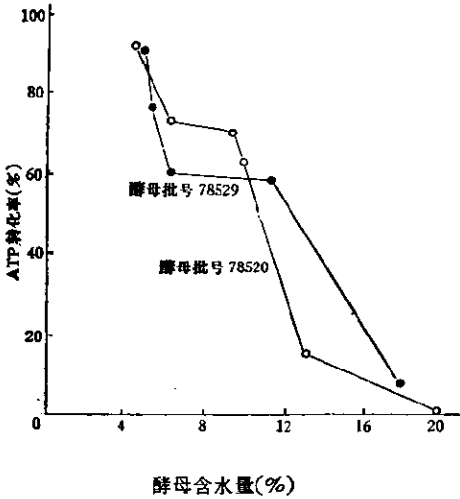


图3 面包酵母含水量与 ATP 转化率的关系

在 78529 批干燥酵母的试验中,原酵母酶活力偏低,经延长日晒时间,其含水量降至 5% 以下时,酶活力可迅速提高。表 2 的试验数据说明,不同面包酵母干粉用量能明显地影响反应的速度。

表 2 面包酵母干粉用量与 ATP 转化率及反应速度的关系

酵母干粉重量(克)	1.6	1.4	1.2	0.8
ATP 转化率(%)	89.9	83.0	85.6	70.1
反应达高峰时间(分)	90	120	160	180

四、磷酸盐浓度对干燥酵母酶促磷酸化的影响

在面包酵母酶促磷酸化反应系统中,磷酸盐浓度以 $\frac{1}{2} M$ 为宜,见表 3。

五、 M^{++} 对干燥面包酵母酶促磷酸化的影响

在反应系统中添加 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 毫克分子/

表 3 磷酸盐浓度对 ATP 转化率的影响

ATP 转化率(%) 磷酸盐浓度 (M) 菌粉批号	1/5	1/3	2/5	1/2	3/5	4/5
78421	30.7	59.3	74.1	85.3	81.5	64.7
78425	43.0	79.6	80.0	86.1	80.3	73.1
78427	43.0	83.4	87.5	87.5	87.3	61.7

表 4 M^{++} 对 ATP 转化率的影响

ATP 转化率(%) M^{++} 浓度 (mM/ml) 菌体批号	0	0.1	0.5	1.0	1.5	5.0
78603	85.1	81.2	97.8	93.1	91.3	92.8
78620	74.4	80.9	87.4	94.4	90.4	70.9
78621	80.4	82.9	84.9	86.0	89.0	85.1

毫升时,可提高其转化率 10% 左右,见表 4。

讨 论

目前对于什么是酶促磷酸化合成 ATP 的限制因子有两种看法:一种认为是代谢类型^[2];

另一种认为是细胞膜的透性^[1-4,6,7]。

我们采用直接日晒干燥处理面包酵母,发现严重脱水的面包酵母,其磷酸化的活力才能充分表现出来。只要含水量低于 5%,ATP 转化率可稳定在 90% 左右。由此初步推测:日晒干燥处理面包酵母使细胞膜因严重失水而受

到较大损伤,使反应底物与糖酵解酶系充分接触,因而能使合成 ATP 的转化率较高且稳定。所以我们认为面包酵母酶促磷酸化的限制因子,主要是细胞膜的通透性。

参 考 文 献

[1] Tochikura, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **45**:511—529, 1967.

[2] 上海实验生物研究所核酸组等: *生物化学与生物物理学进展*, **3**: 37—42, 1974.

[3] 秦皇岛市微生物制药厂等: *微生物学通报*, **3** (2): 16—17, 1976.

[4] 中山大学生物系生化教研室: *微生物学报*, **13** (2): 185—187, 1973.

[5] 欧伦英等: *中山大学学报(自然科学版)*, **4**: 97—105, 1974.

[6] Tanaka, A. and J. Hironaka: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 867—869, 1972.

[7] 胡兆庆等: *微生物学报*, **18**(3): 239—247, 1978.