

发酵法制备腺嘌呤核苷三磷酸

中国科学院上海实验生物研究所核酸研究组
上海药用辅料厂

腺嘌呤核苷三磷酸这种药物,临床证明可用于抢救病危患者,对治疗肝炎、肾炎、进行性肌肉萎缩以及冠心病等也有一定效果。本文介绍了一种用 5'-腺嘌呤核苷酸为原料,利用啤酒酵母,在一定条件下转化为腺嘌呤核苷三磷酸的简便方法。此法比光合磷酸化法优越,成本低,且生产不受季节限制。

——编者

前言

腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)是生物体内重要的代谢物质,它作为代谢的中间体、辅酶和能量的供应者,参与生物体内很多反应。用它治疗一些疾病,如进行性肌肉萎缩症、心肌炎,抢救垂危病人等,均取得良好的疗效,因此受到人们的重视。

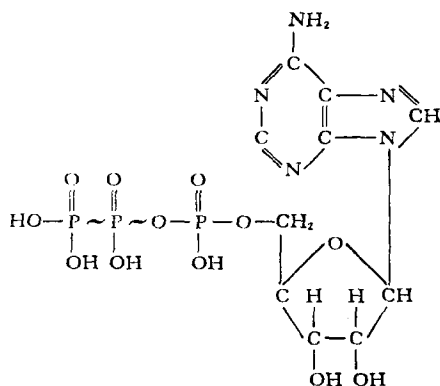
在毛主席的革命路线指引下,通过无产阶级文化大革命,我国的核苷酸生产迅速发展,并且把核苷酸生产和综合利用结合起来,化废为宝,取得了巨大成绩。核苷酸衍生物国内日益广泛地应用在医药上,广大工农兵对 ATP 的需求量大大增加。以往生产 ATP 采用从兔子肌肉中提取的方法,工艺落后,得率低,成本高。近年来我国曾用光合磷酸化方法合成 ATP,但工艺、设备较繁,如光照设备和从兔子中抽提腺苷酸激酶以及制备二氮蒽甲硫酸等,并且生产受到菠菜的季节性限制,因此,用光合磷酸化法生产 ATP 有局限性。

为进一步改革工艺,便于大量生产我们用腺嘌呤核苷酸(5'-AMP)作原料,利用啤酒酵母进行发酵,制备 ATP,初步建立了发酵法生产 ATP 的工艺。这一工艺操作方便,设备简单,

成本低,并有产量较高与纯度较好,生产不受季节限制等优点。

一、腺嘌呤核苷三磷酸的结构和酵母发酵生成腺嘌呤核苷三磷酸的原理

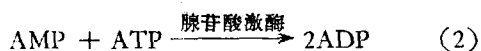
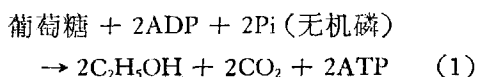
一分子 ATP 含有一分子腺嘌呤碱基、一分子核糖和三分子磷酸基团。其分子结构如下:



其中~代表高能磷酸键,与 AMP 相比多含两个高能磷酸键。因此 AMP 要转化成 ATP,需要磷酸化两次,要两个磷酸基团。

AMP 在生物体内经糖代谢的酵解和氧化

磷酸化,在有关酶的参与下,利用葡萄糖氧化产生的能量和无机磷,可被磷酸化,生成ATP。其反应如下:



在酵母发酵时,葡萄糖分解代谢生成ATP(反应1),ATP受腺苷酸激酶的催化与AMP生成ADP(反应2),而生成的ADP又经反应(1)形成ATP。这个反应不断地进行,于是ATP大量积累。

二、材料和方法

1. 发酵反应液的配制

称 KH_2PO_4 (磷酸二氢钾) 18.99 克, K_2HPO_4 (磷酸氢二钾) 54.12 克, MgCl_2 (氯化镁) 1.2 克,溶于 1200 毫升水中,配成磷酸缓冲液(pH 7.5)。取出 600 毫升,加 5'-AMP 溶解,待进行发酵反应。剩余磷酸缓冲液 600 毫升分成 300 毫升两份待用。

2. 定磷试剂的配制和测定

定磷试剂的配制:先配制 6N 硫酸溶液;2.5% 钼酸铵溶液;10% 抗坏血酸溶液。在测定前,按照 2 份蒸馏水、1 份 6N 硫酸溶液、1 份 2.5% 钼酸铵溶液、1 份 10% 抗坏血酸溶液的比例混合,配得溶液应透明呈微黄色。

测定步骤:吸取待测的样品溶液 3 毫升于试管中,加定磷试剂 3 毫升,在 45℃ 水浴中保温 20 分钟,溶液显蓝色,取出冷至室温,然后在 72 型分光光度计 660 毫微米波长下进行比色测定。所读光密度数从定磷标准曲线,即可查到无机磷的量。

定磷标准曲线可用磷酸二氢钾作基准物质,依照上述方法可测定含无机磷在 0—10 微克范围内,所得光密度数在 0—0.7 左右,为一条通过原点的直线。

3. 纸电泳方法

采用 0.02M 柠檬酸-柠檬酸钠溶液(pH3)作电泳缓冲液。电泳纸用华特曼 1 号滤纸。

三、工艺流程及操作

1. 发酵

我们用 5'-AMP 为原料,以磷酸缓冲液为无机磷来源,葡萄糖作氧化底物,用前发酵的啤酒酵母进行发酵,在整个反应期间测定反应液中无机磷的下降,据以控制发酵时间。

具体操作如下:

将取来的啤酒酵母进行离心,得到湿酵母块。每投料 10 克 5'-AMP,需 500 克酵母(将此 500 克酵母块分成 250 克、125 克及 125 克三份)。先将 250 克酵母块和 60 克葡萄糖加入 600 毫升发酵反应液中。整个反应过程维持 30℃—35℃,搅拌,即开始起泡发酵,此时立即取样,作为开始时反应液中的无机磷含量。以后每隔 20 分钟取样一次,测定无机磷的变化。在取第二次样品后,加入第二批酵母(125 克酵母块悬浮于 300 毫升反应液中),此时,将 50 毫升的乙醚分小批加入进行催化。经 20 分钟后,再加入第三批酵母(125 克酵母块悬浮于 300 毫升反应液中),同样方法,把 300 毫升乙醚分小批加入进行催化。当反应液中无机磷已降到很低,基本上不再下降时,把 20% 的乙醛 50 毫升分小批加入后,反应就此结束。整个反应时间为 1.5 小时至 2 小时。一般转化率在 80% 以上。

将此反应液冷却到 0°—5°C,然后加高氯酸调至 pH2—3,放置片刻,离心,取上清液待进一步分离。

2. 定磷

发酵反应液中无机磷的变化的测定:从发酵液中取 1 毫升样品,注入 5 毫升离心管中,加 0.5 毫升 10% 的三氯醋酸。充分摇匀,使蛋白沉淀,离心,取上清液 0.1 毫升定容至 100 毫升,然后取 3 毫升于试管中,加入定磷试剂 3 毫升。另外用 3 毫升蒸馏水加定磷试剂 3 毫升,同样品作对照。依照定磷步骤进行测定。

用测定无机磷下降方法来控制反应最适时间,先需要了解当投料 10 克 AMP 完全转化成 ATP 时,应消耗多少无机磷,同时反映在 660 毫

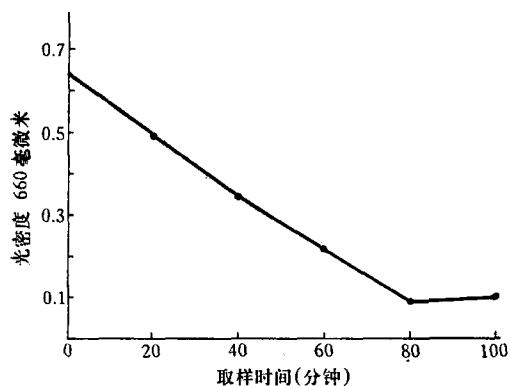


图1 发酵反应液中无机磷下降曲线

微米波长的光密度数相差应为多少。

从理论上计算：1分子AMP经磷酸化生成1分子ATP应消耗2分子无机磷，因此，投料10克AMP全部转化为ATP消耗无机磷量(X)应为：

$$365.2:2 \times 31 = 10:X$$

(365.2——投料ATP·H₂O的分子量)

(31——无机磷的原子量)

$$X = 1.7 \text{ (克)}$$

根据我们测定无机磷步骤，取每毫升发酵反应液从反应开始到反应终止，其无机磷下降应为：

$$1700,000\gamma/500 \times 1600 = 2.1\gamma$$

(500——稀释倍数)

(1600——反应液体积和酵母体积)

反映在660毫微米波长上应相差0.11光密度。但我们在测定时，发现反应由开始到结束，无机磷下降的光密度数(无机磷消失量)远远超过理论值。为进一步探讨此问题，我们按照上述发酵方法进行两组实验，I组加AMP，II组不加AMP，其余条件相同，进行发酵。每隔20分钟取样一次，观察无机磷的变化。同时取含AMP的I组在不同时间的样品，做电泳，观察AMP转化为ATP的情况。

反应开始时两组实验含有同样量的无机磷。随着反应时间的增加，无机磷逐渐减少。I组的无机磷降低较多，而II组降低较少，当反应终止时，发现两组实验的光密度数之差为0.1，消耗无机磷总量与理论值一致(见表1)。

表1 有AMP作底物和无AMP作底物时酵母利用无机磷的比较

	实验I组 (有AMP)	实验II组 (无AMP)
反应开始时测Pi 光密度(660毫微米)	0.63	0.63
反应终止时测Pi 光密度(660毫微米)	0.09	0.19
反应开始—终止,光密度差	0.54	0.44
I组—II组光密度差	0.1	
消耗(Pi)总量(克)	1.6	
ATP转化率(%)	94	

从表1可以看出，反应液中的无机磷一部分用于磷酸化生成ATP，大部分无机磷则用于葡萄糖的代谢(生成磷酸葡萄糖化合物)。由此可见，光密度下降超出理论值是由于糖代谢磷酸化造成的。AMP磷酸化生成ATP的光密度下降数仍在理论值范围内。

从电泳结果也可看出，反应开始时，仅有AMP存在，而随反应的进行，AMP不断转化成ATP，当80分钟时，无机磷即下降到最低值，电泳结果也表明此时AMP转化为ATP达到最高点(见图2，表2)。

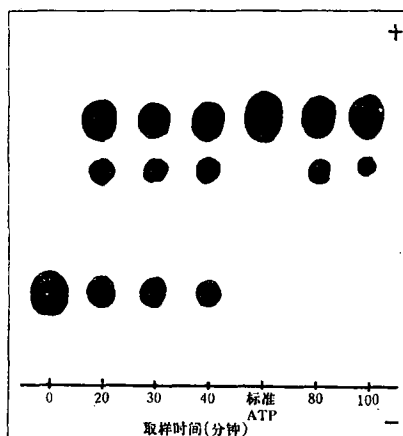


图2 AMP逐步转化为ATP的电泳分析
0.02M柠檬酸缓冲液, pH3, 500伏, 4小时。

上述测定无机磷的情况与电泳结果一致。因此，可以应用测定无机磷的下降来选择最适反应时间。

表 2 AMP 逐步转化为 ATP 的情况

转 化 率 (%)	取 样 时 间 (分 钟)					
	0	20	40	60	80	100
AMP	100	54.6	43.3	23.7		
ADP		19.3	21.0	25.7	8.0	7.2
ATP		26.0	35.4	50.5	92.0	92.8

3. 分离

(1) 上活性炭柱 已酸化的反应液经离心后,取上清液,上活性炭柱。每 10 克 AMP 需用 0.3 公斤的颗粒状活性炭,上柱流速每分钟约 30 毫升。上柱后用蒸馏水洗活性炭柱至 pH5—6 左右,然后用酒精-氨水-蒸馏水(5:2:3)混合液洗脱,洗脱液用饱和的氯化钡溶液来检验,当出现白色絮状沉淀时,进行收集。直至用氯化钡液检验洗脱液不再出现沉淀时为止。将收集的酒精-氨水洗脱液在 60°C 以下减压浓缩,除去大量的游离氨,使洗脱液的 pH 值为 8 或更近中性为止。

(2) 阴离子交换树脂分离 取上述酒精-氨水收集液,上 201 × 8(100—200目)Cl⁻型阴离子交换树脂柱(柱高 15 厘米;直径 3 厘米)。流速以每分钟 3 毫升/厘米² 来计算。测定阴柱流出液的 260 毫微米波长吸收值,观察 ATP 被吸附情况。上柱完毕后,用 0.01N 盐酸和 0.07M 氯化钠混合液洗脱 ADP、AMP 等。测 260 毫微米波长吸收值。当洗脱液中紫外吸收降到光密度单位每毫升为 5 时,即可更换 0.02N 盐酸和 0.2M 氯化钠混合液洗脱 ATP,进行分部收集。分离情况见图 3。

4. 产品

合并收集的 ATP 洗脱液,用 6N 氢氧化钠调 pH 至 3.8,加三倍体积的 95% 酒精,此时溶液中即有白色絮状沉淀产生。置冷库过夜。待自然沉淀后,小心地倾出上部酒精清液,把沉淀部分刮到研钵中,加入冷的丙酮研磨,并不断更换丙酮,到沉淀成白色粉末状,然后用 4 号砂芯漏斗抽滤,用冷的无水酒精和乙醚洗 2—3 次,最后放在五氧化二磷真空干燥器内干燥,即得白色粉末状腺三磷二钠盐(ATP-Na₂)。

得率:投料 10 克 AMP,可得到 ATP 7 克左右;纯度在 80% 以上。

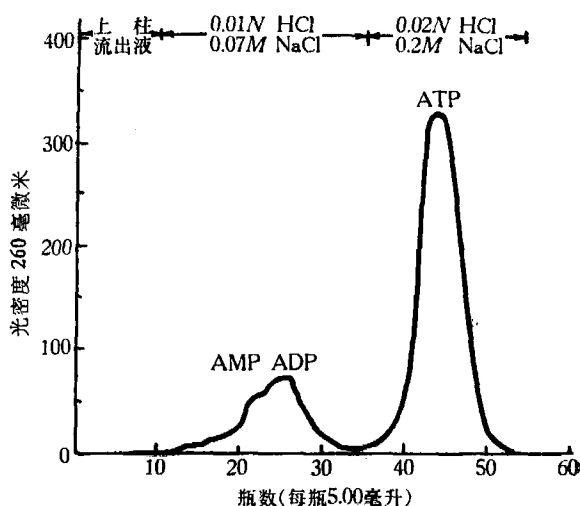
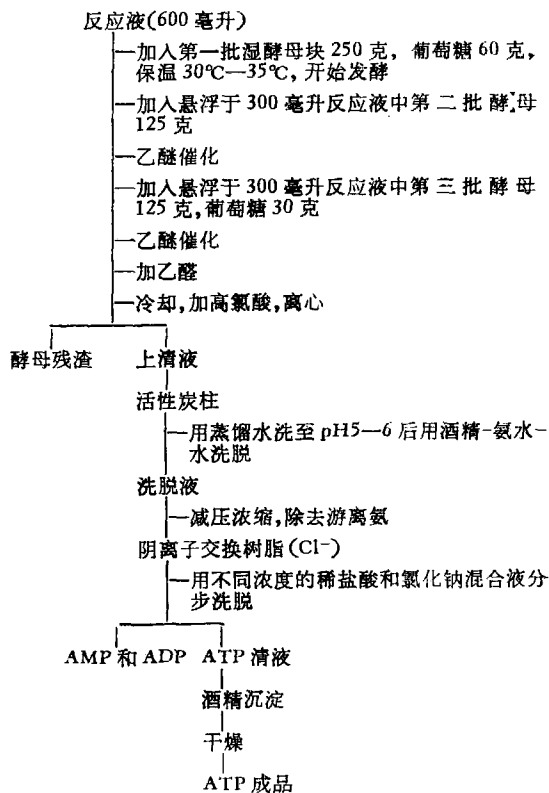


图 3 阴离子交换树脂柱层析分离 ATP

5. 发酵法制备 ATP 的工艺流程



四、产品的分析和鉴定

对分离得到的产品,我们进行下列分析:

1. 全波测定

AMP 在生物体内可能遭受腺嘌呤核苷酸

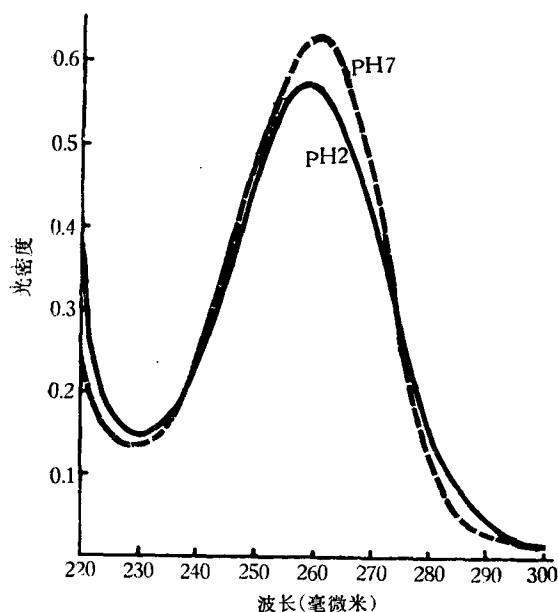


图4 产品(ATP)全波光谱的测定

脱氨酶作用,脱去氨基,产生次黄嘌呤衍生物。为证实我们获得的产品是腺嘌呤衍生物 ATP,

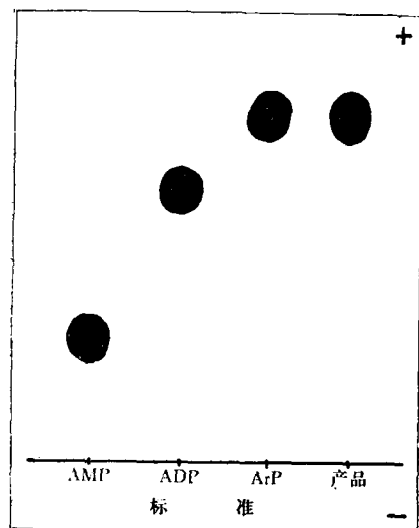


图5 产品(ATP)电泳图谱
0.02M 柠檬酸缓冲液, pH=3、500 伏、4 小时。

测定了产品的紫外吸收全波光谱,结果其图形与 ATP 的一致。

2. 纸电泳分析

取少量产品溶于水中,并取标准 ATP、ADP、AMP 作对照,做纸电泳。结果产品的电泳位置与标准 ATP 的相同。

3. 酸不稳定磷测定

ATP 有两个高能磷酸键,不稳定。经酸水解,每 1 分子 ATP 可产生 2 分子酸不稳定磷。其腺嘌呤与酸不稳定磷分子的比值应为 1:2。因此可用来鉴定 ATP。我们用 0.1N 盐酸水解产品,于 90℃ 水浴加热 30 分钟,然后测定无机磷。结果见表 3。

表3 产品的酸不稳定磷的分析

产 品	分 子 比
	腺嘌呤核苷 : 酸不稳定磷
	1 : 1.85

五、讨 论

微生物发酵法是近年来国内外生产 ATP 的新工艺。国外使用的微生物有产氨短杆菌和酵母等,对菌种有一定的要求。Tochikura 等人(1967)曾用面包酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae*) 的丙酮粉,但这一方法不适于工业生产。我们采用在乙醚催化作用下用啤酒酵母发酵,获得成功。在试制过程中,我们曾试图用面包酵母代替啤酒酵母,但无论有无乙醚催化,都未能成功。这是由于面包酵母与啤酒酵母的代谢类型不同,或是因为 AMP 不易透入面包酵母细胞壁的缘故,还不清楚。我们使用的是前发酵的啤酒酵母,由啤酒厂取来后,未经任何处理,直接离心使用。为了探索不同代数的啤酒酵母对合成 ATP 的影响,我们曾用自第 2 代至第 10 代以及黄、黑啤酒酵母进行实验,结果并未看到明显差异。在发酵过程中,我们认为将酵母分批加入比一次加入效果好,反应时间也短。用乙醚进行催化时,乙醚用量要视当时酵母发酵

发泡的情况而定,一般每次宜少用,尤其应当避免一次大量加入或酵母还未发起就加入,以免造成酵母不再发酵起泡,使 ATP 合成失败。

我们采用柱层析法分离 ATP,取代过去用钡盐、汞盐沉淀的方法,这样就排除了重金属可能造成的污染,有助于提高产品质量。在洗脱 AMP、ADP 时用 0.01N 盐酸和 0.07M 氯化钠混合液,分离效果较好;氯化钠浓度降为 0.05M 也可分离,但时间较长。我们曾试图不经活性炭柱,只通过阴离子交换树脂柱进行分离,但所得产品杂质多,颜色黄,质量受影响。原因可能是发酵过程中除产生 ATP 外,底物中的大量葡萄糖也被磷酸化生成葡萄糖磷酸酯,同时在发酵液中还有无机磷酸盐存在,直接上阴离子交换树脂柱,这些物质也被吸附在柱上,而难以与 ATP 分离。

在用 AMP 作底物合成 ATP 取得成功之后,曾试用其他鸟嘌呤核苷-5'-磷酸 (5'-GMP),胞嘧啶核苷-5'-磷酸 (5'-CMP) 作底物,代替 5'-AMP,观察能否生成相应的核苷三磷酸衍生物,结果得到相应的 GTP 和 CTP 产物。

关于 ATP 合成的原理,通常在细胞中 ATP 可由糖代谢的酵解和氧化磷酸化途径生成。

Tochikura 等人用酵母发酵合成 ATP,认为这是经酵解途径生成的。我们认为在外源底物和葡萄糖存在下通过酵解生成 ATP 这一途径是存在的,但是酵母是兼嫌气性微生物,当把它从长期酒精发酵的环境中改变到反应液的有氧情况下时,不能排除氧化磷酸化产生 ATP 的可能。总之,这个问题尚有待研究。

参 考 资 料

- 中国科学院微生物研究所: 核苷酸类物质的生产和应用资料汇编, 1971。
- 田中晴雄, 佐藤善六, 中山清, 木下祝郎: 发酵と代謝 17, 143—147, 1960。
- 田中晃, 弘中譲尔, 吉村嘉男: ATP の制造法, 特许公报, 20759, 1971。
- Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.: Methods in Enzymology. Vol. III, N. Y., 1957.
- Kitajima, N., Watanabe, S. and Takeda J.: J. Ferment. technol. 48;753—768., 1970.
- Marinica, T. et Marines, M.: Process for obtaining ATP. Rom. 48, 536.
- Redeker, J., Neuendorf, H.: Verfahren Zur Herstellung Höherer Adenosinphosphor säureester aus adenosin. Ger (east) 38, 338.
- Schaefer, G.: Natrium Adenosintriphosphate. Ger. (west), 1, 248057.
- Tochikura, T., Kuwahara, M., Tjaqi, S., Okamoto, H., Tominaga, Y., Kano T. and Ogata K.: J. Ferment. technol., 45, 511—529., 1967.

(上接 29 页)

比的“天人相应”学说,所以它受到了一定的限制。例如:把正经定为十二条,而把同时发现的其它经脉统统列入非正经的“奇经八脉”,这就影响对其它经脉的重视,也限制了进一步发现其它经脉的存在。

根据上面所述,古人在生产劳动的基础上,发明针灸术。首先发现穴位的存在,由对穴位的针刺而逐步引向经络的发现。因此说,经络的发现是有其实践基础的,而不是任何人凭空想象出来的。