

三、讨 论

小型纤维素板层析分离分析氨基酸较纸层析、大型纤维素板层析(20×20厘米)具有样品用量少、分析时间短等优点,单一的氨基酸检测量为10—50毫微克,多肽和蛋白质氨基酸组

表1 显色剂显色灵敏度比较

显色方法	最低检出量	最适范围
茚三酮	20毫微克左右	20—100毫微克
邻苯二甲醛	1毫微克左右	1—20毫微克
荧光胺	10毫微克左右	10—50毫微克

成分析仅需1—2微克。层析时不必平衡,双向层析谱一天内即可完成。氨基酸显色斑点小而集中,层析谱较清晰,易于定量测定。一般纸层析展层时间长,样品用量大,层析显色后不易得到很清晰的图谱。展层前必需经平衡,否则影响层析分离。显色后斑点扩散,定量误差较大。硅胶板层析分辨力较纤维素板差。但纤维素板层析不如纸层析方便,必须自己铺制板。

小型纤维素板层析适合作小肽(如激素多

肽)的氨基酸组成分析,当配用光密度薄层扫描仪时,可作定量分析。由于此方法灵敏度高,所以也可用于血清中微量游离氨基酸的测定。

三种显色剂在板层析上对氨基酸显色灵敏度的比较相差不大,其中邻苯二甲醛的灵敏度稍高一些。Schiltz等人^[4]也曾报道相似的结果。茚三酮仍是一种很好的显色剂,显色斑点肉眼就可见,不必用紫外灯。尤其是将茚三酮预先加入到第二向展层溶剂中一起展层,可得到更清晰的背景,避免了茚三酮喷制不匀的缺点。这三种显色试剂也适用于多肽的显色,荧光胺最灵敏,对多肽的薄层层析显色的价值更大。

参 考 文 献

- [1] Heathcote, J. G. et al.: *J. Chromatogr.*, 43, 84, 1969.
- [2] Heathcote, J. G. et al.: *J. Chromatogr.*, 78, 193, 1973.
- [3] 王玉梅:《生物化学与生物物理进展》, 1976年, 第3期, 第25页。
- [4] Schiltz, E. et al.: *Anal. Biochem.*, 79, 33, 1977.

【本文于1978年5月24日收到】

酶法生产三磷酸腺苷(ATP)

袁 惠 民

(北京首都啤酒厂)

以腺苷酸(AMP)为前体,用酵母发酵生产三磷酸腺苷已有很多报道^[1,2]。此法的缺点是:伴有大量酵母发酵,转化不稳定,转化终点不易判断,且“回返”现象严重,因此纯化困难、产率低、消耗大。

我们采用啤酒新鲜酵母在葡萄糖、磷酸盐、镁盐培养基中先发酵,除去菌体后用发酵液(酶液)转化腺苷酸成三磷酸腺苷。结果转化稳定、可靠,转化率在80%以上,终点易判断,无明显“回返”现象,纯化简便,可用一次阴柱纯化。三

磷酸腺苷总收得率稳定在65%以上,消耗低,质量完全达到药检要求,已被北京市卫生局药检所批准投入正式生产。由于发酵形成的酶液具有良好的保存性,适合于大规模均衡生产。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 酵母(*S. Casbergensis* Hansen) 系我厂生产菌株。使用菌体取自生产现场,水洗两次,10℃以下保存。使用时1,400转/分离心

10 分钟。

(2) 腺苷酸 我厂中间产品, 纯度 90—92%。

(3) 树脂 聚苯乙烯二乙烯苯季胺型, 100—150 目。使用时定 $[Cl^-]$ 型。

2. 方法

(1) 发酵 发酵配方及条件试验用正交表^[3] $L_{18}(2 \times 3^7)$, 选用因素及水平见表 1。发酵完, 1,400 转/分离心 5 分钟除去菌体, 离心液即为酶液。

(2) 转化 转化条件试验用正交表 $L_9(3^4)$, 选用因素及水平见表 2。转化完, 水浴加热 80℃ 保持 1 分钟, 立即测定转化率。

(3) 纯化 上柱条件试验用正交表 $L_9(3^4)$, 选用因素及水平见表 5。上柱: 转化液用单层滤纸抽滤, 滤液稀释上一次阴柱, 用稀盐

酸-氯化钠溶液洗杂质, 浓氯化钠液或盐酸洗脱三磷酸腺苷。

(4) 分析 酶液转化率测定反应系统: 腺苷酸 (200 微克分子/毫升) 2.0 毫升, pH7.0; 酶液 8.0 毫升; 28℃, 反应 3 小时。水浴 80℃ 1 分钟。转化率, 收得率, 均以克分子计, 即 ATP 克分子/AMP 克分子 $\times 100\%$ 。测定方法为电泳法^[4]。

二、结 果

1. 酶系统形成条件试验

在预备试验中证明, 酵母在葡萄糖、磷酸盐、镁盐培养基中发酵是形成酶系统的必要条件。我们试用正交表对各条件进行试验, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 28℃ 形成的酶系统比 32℃ 的好。因此我们只对 28℃ 形成的酶系

表 1 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 酶系统形成条件试验*

列 号 试验号	1 ℃	2 葡萄糖 (%)	3 KH_2PO_4 (%)	4 $MgSO_4$ (%)	5 pH	6 酵母 V/V (%)	7 发酵时间 hr	转化率 (%)
1	1(28℃)	1(5)	1(3)	1(3)	1(6)	1(25)	1(2.5)	37
2	1	1	2(5)	2(5)	2(7)	2(30)	2(4.5)	45
3	1	1	3(7)	3(7)	3(8)	3(36)	3(6.0)	54
4	1	2(10)	1	1	2	2	3	84
5	1	2	2	2	3	3	1	80
6	1	2	3	3	1	1	2	12
7	1	3(15)	1	2	1	3	2	63
8	1	3	2	3	2	1	3	24
9	1	3	3	1	3	2	1	6
10	2(32℃)	1	1	3	3	2	2	38
11	2	1	2	1	1	3	3	32
12	2	1	3	2	2	1	1	5
13	2	2	1	2	3	1	3	75
14	2	2	2	3	1	2	1	78
15	2	2	3	1	2	3	2	4
16	2	3	1	3	2	3	1	4
17	2	3	2	1	3	1	2	52
18	2	3	3	2	1	2	3	76
(1) $\Sigma 1$	只考虑 28℃	136	184	127	112	73	123	
(2) $\Sigma 2$		186	149	188	153	135	120	
(3) $\Sigma 3$		93	72	90	140	197	162	
(4) 效应		31	34	33	14	41	14	

* 28℃, 32℃ 分两批试验: 32℃ 发酵转化率测定用 32℃ 转化 3 小时

表 2 $L_9(3^4)$ 酶作用条件试验

试 验 号	列 号	1	2	3	转化率* (%)
		反应时间 hr	反应浓度 AHP $\mu\text{m/ml}$	酶液量 V/V (%)	
1		1(2)	1(25)	1(60)	82
2		1	2(20)	2(70)	80
3		1	3(15)	3(80)	73
4		2(3)	1	2	73
5		2	2	3	82
6		2	3	1	85
7		3(4)	1	3	77
8		3	2	1	71
9		3	3	2	66
(1) $\Sigma 1$		235	232	238	
(2) $\Sigma 2$		240	233	219	
(3) $\Sigma 3$		214	224	232	
(4) $\Sigma_1 \Sigma_2 \Sigma_3$		26	9	19	
中大减小效应		9	3	6	

* 转化温度 28℃

统进行分析。

(1) 由此表内条件形成的酶系统最高转化率达 84%。

(2) 形成酶系统的主次因素排列：酵母，磷酸盐、镁盐、葡萄糖、pH 及时间。

(3) 表内未出现“最佳条件”。最佳条件为：葡萄糖 10%，磷酸盐 3%，镁盐 0.5%，pH7，酵母 36%，发酵 6 小时。

我们用“最佳条件”验证试验结果，重复性很好。因此在转化试验中就用此条件发酵制取酶液。

2. 酶作用条件

用上述发酵条件制得的酶对腺苷酸转化是有效的。最低转化率为 66%，最高达 85% (表 2)。我们用每毫升 20 微克分子腺苷酸，酶液为总体积的 80%。28℃ 转化 3 小时左右，转化率稳定在 80% 以上，并且无明显“回返”现象。

3. 酶的热稳定性及保存性

表 3 酶液热稳定性

酶液热处理	40℃5'	50℃5'	60℃5'	70℃5'	对照
转化率%	83	50	25	15	85

考虑到生产实际，我们观察了酶液的热稳定性及保存性。结果见表 3、4。酶液对热较稳定，且保存性良好，有利于生产安排及中间检查。

表 4 酶液保存性

酶液保存 天 数	1	7	14	21	注
转化率%	82	81	82	80	4℃ 保存
转化率%	88	85	80	78	室温保存

4. 酶反应终点的判断及终止手段的选择

可用电泳法判断终点。用 DEAE 纤维素薄板，0.02N HCl 展层，能较好地分清腺苷酸、二磷酸腺苷及三磷酸腺苷，操作简便迅速，及时指导生产。

通常用加酸、加热终止酶反应。我们发现用冷却稀释效果很好，转化液比较稳定。用水稀释 3 倍后 10℃ 以下存放，防止微生物繁殖和三磷酸腺苷降解。

5. 三磷酸腺苷的纯化

(1) 为了采用一次阴柱纯化工艺，我们摸索了上柱条件，试用正交表 $L_9(3^4)$ ，对转化液稀

释倍数、终止条件、pH 等条件作了试验(表 5)。

表 5 $L_9(3^4)$ ATP 上柱条件选择试验

试验号	列号	1	2	3	吸附率 O.D260%
	稀释倍数	pH**	终止反应 条件*		
1	1 (1 倍)	1(6)	2(TCA)	16	
2	2 (2 倍)	1	1(0)	65	
3	3 (3 倍)	1	3(HCl)	66	
4	1	2(5)	1	66	
5	2	2	3	40	
6	3	2	2	19	
7	1	3(4)	3	18	
8	2	3	2	0	
9	3	3	1	37	
(1) $\Sigma 1$	100	147	168		
(2) $\Sigma 2$	105	125	35		
(3) $\Sigma 3$	122	55	124		
(4) $\Sigma_1 \Sigma_2 \Sigma_3$	22	92	133		
中大减小效应	7.3	30.7	44.3		

* (TCA) 转化液用三氯乙酸调 pH 2.5; (O) 不酸化;
(HCl) 转化液用浓 HCl 调 pH2.5

** pH 用 HCl 或 NaOH 调整

树脂吸附率随稀释倍数增加稍增大;pH 上升时吸附率增大;转化液不酸化具有较大的吸附效果。实际使用时转化液稀释 3 倍,自然 pH(pH 约为 6) 上柱效果较好。每克树脂上三磷酸腺苷 120 毫克有利于分离杂质和洗脱,整个上柱过程无发酵现象发生。

(2) 分离洗脱。转化液经过滤,用无离子水稀释 3 倍,自然 pH 上柱,柱直径比高为 1:4,流速 0.3—0.4 毫升/克树脂,分,每克树脂上 120 毫克三磷酸腺苷,全部吸附。洗杂质时三磷酸腺苷损失情况见表 6。当用 0.04 N NaCl—0.01 N HCl 洗杂质安全可靠,损失小,质量稳定,且出现明显二磷酸腺苷峰,越过此峰可洗脱三磷酸腺苷。但有时两峰重叠,严格控制质量,流出液随时电泳检查,判断洗杂质终点。一般洗液为树脂体积的 20 倍。提高酸、盐浓度能缩短洗杂质时间,但要小心谨慎,防止增大损失。

用 0.7 N 氯化钠/0.01 N 盐酸或 0.5 N 盐酸洗脱三磷酸腺苷,洗脱液 ATP 浓度约为 7%,有利

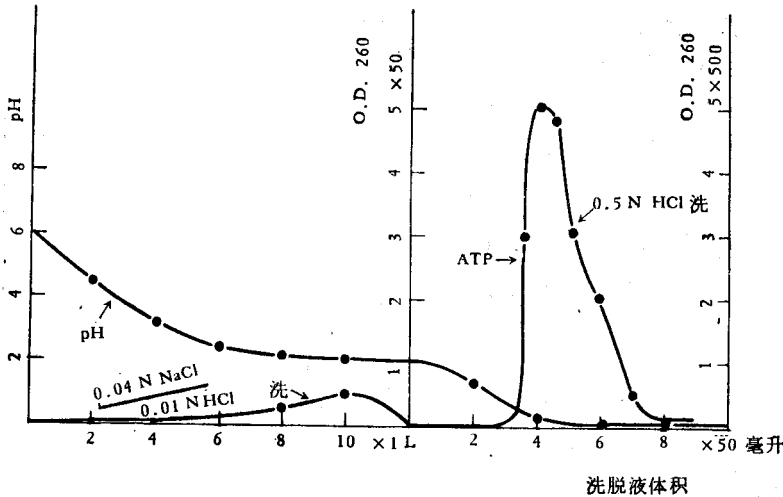


图 1 ATP 分离洗脱曲线

柱直径 4 厘米,装树脂 200 克,上柱 ATP 22 克

于除热源及沉淀结晶。用 0.7 N 氯化钠/0.01 N 盐酸洗脱 ATP 较用 0.5 N 盐酸操作方便。图 1 为一次试验分离洗脱曲线。

6. 生产试验

我们作了三次生产试验,共投料腺苷酸 5,355 克,产三磷酸腺苷 7,380 克,三次平均含量

82.7% 其它指标如热源、重金属等都合格。

(1) 发酵 配方: KH_2PO_4 12 公斤, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.2 公斤,葡萄糖 25 公斤,酵母(不离心) 170 公升,总体积 260 公升, pH 7.0, 28—30℃ 发酵 5.5 小时,冷却,离心,得发酵液(即酶液) 180—200 公升。

表6 三磷酸腺苷分离洗杂质损失情况

柱 号	洗 液 浓 度	洗 液 体 积	损 失	注
1	0.038N NaCl-0.01N HCl	树脂体积的 20 倍	8	上柱液转化率 92%
2	0.06N NaCl-0.01N HCl	同 上	12	
3	0.06N NaCl-0.02N HCl	同 上	15	
4	0.06N NaCl-0.03N HCl	同 上	30	
5	0.06N NaCl-0.06N HCl	同 上	90	

(2) 转化 取腺苷酸1,800克(三次平均1,785克)加水20公升,用NaOH调pH7.0溶解。取上述酶液170公升,加热至28℃,加腺苷酸溶液,充分搅拌,保温28℃转化,2小时后取样检查,延长至3.5小时。转化率3次平均为84%。

(3) 纯化 反应液,一层滤纸铺硅藻土过滤,滤液加无离子水成580公升,上柱。柱直径20公分,高70公分,流速250毫升/分钟。上柱完经水洗,0.01N HCl洗,0.01N HCl-0.04N NaCl洗,最后用0.7N NaCl-0.01N HCl冲下ATP。一般情况见表7。

表7 ATP上柱纯化情况

	$O.D_{260} \times 10^7$	占 $O.D_{260}$ (%)	数量 (公升)
反 应 液	7.59	100	185
上 柱 液	7.50	98	580
流 出 液	0.68	8.9	580
水 洗	—	—	400
0.01N HCl 洗	0.26	3.4	1200
0.04N NaCl-0.01N HCl 洗	0.51	67	420
0.7N NaCl-0.01N HCl 洗	5.65	73	36
酒精清液	—	—	130
成 品	4.95	65	2460克

(4) 成品 用活性碳硅藻土打泡除热源, pH 3—3.5, 加3倍酒精沉淀。沉淀用无水乙醇无水乙醚脱水五氧化二磷真空干燥得三磷酸腺苷2,460克。

三、结论与讨论

1. 酵母在葡萄糖、磷酸盐、镁盐培养基中发

酵, 推测发酵液含有活性很高的核苷酸磷酸化激酶系统, 能有效地转化腺苷酸成三磷酸腺苷。发酵条件以葡萄糖10%, KH_2PO_4 3%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5%, 酵母36%为好, 转化率稳定在80%以上。

2. 酶液稳定性良好, 4℃保存21天不丧失活力; 常温保存也较稳定, 极有利于生产安排。

3. 转化液稳定性高, 常温放置3天无不良影响; 转化液少菌体, 不会引起重新发酵, 有利于采用冷却稀释法终止反应, 有利于直接一次阴柱纯化工艺。

4. 一次阴柱纯化, 上柱量以每克树脂上120毫克三磷酸腺苷为好, 柱高比直径尽量增大, 但柱高比直径大于3.5时流速受到影响。用0.04N NaCl-0.01N HCl洗杂质较安全, 产品质量完全达到药检要求。纯化最好在10℃以下操作, 如果温度过高, 产品易出现热源。

5. 本文提出的工艺已在生产上长期使用, ATP克分子收得率稳定在65%以上。

6. 经实验证明: 本工艺同样适用于三磷酸胞苷(CTP)及三磷酸鸟苷(GTP)生产, 但三磷酸鸟苷生产转化率, 收得率含量要比三磷酸腺苷为低。

参 考 文 献

- [1] Ferment, J.: *Technol.*, 45, 551, 1967; 46, 959, 1968; 47, 564, 1969; 48, 762, 1970.
- [2] 上海细胞生物所核酸组: 《生物化学与生物物理进展》, 1974年, 第3期。
- [3] 北京市技术交流站: 《正交表试验设计简介》, 1974。
- [4] 中国科学院微生物研究所编: 《核苷酸类物质生产和应用》, 科学出版社, 1971。

[本文于1978年3月27日收到]