

由腺嘌呤酶促合成三磷酸腺苷的研究

生物学系生化微生物学教研室

提 要

对利用啤酒酵母体内的酶系直接把腺嘌呤合成为三磷酸腺苷(ATP)进行了研究,提出了适用于工业生产的反应系统。经我校办工厂试产证明:由腺嘌呤形成ATP的重量转化率平均达120%。

用数学上的“正支设计”研究了反应系统中各物质对ATP形成的影响,证明啤酒酵母及无机磷量是主要因素;为了提高由腺嘌呤转化成ATP的转化率,使用两次发酵是必要的。文中同时介绍了由腺嘌呤直接酶促合成腺嘌呤和腺-磷(AMP)的反应系统。二者的重量转化率分别可达154.9%及205%。文中对由腺嘌呤合成ATP的途径作了初步讨论。

前 言

关于直接利用微生物菌体——主要是啤酒酵母、面包酵母和产氨短杆菌——将腺苷或AMP磷酸化合成ATP的研究已有不少报导^[1,2,4,5,6,7]。关于生物体内以嘌呤碱为前体和1-磷酸核糖或5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)相互作用形成嘌呤核苷或核苷酸,并进一步磷酸化形成相应的核苷二磷酸或三磷酸盐的生物合成途径,在本世纪五十年代初已得到证明^[7,8,9,10]。但是根据这些理论,利用微生物菌体中酶系直接把腺嘌呤合成ATP并用于医药工业生产,还是一个新的问题。

ATP作为医药,对垂危病人之抢救、心肌炎、肌肉萎缩,乃至妊娠生产延期患者^[11]疗效显著。近年来广泛利用微生物菌体复合酶系将AMP磷酸化合成ATP的生产取得很大成绩。但如果AMP来源不足,发展就会受到一定限制。1973年有些单位从谷氨酸发酵废液中提取腺嘌呤获得成功。据报导,此废液中腺嘌呤含量高达2—4%,提取工艺简单,成本仅为化学合成的5%。因此,利用微生物菌体直接把腺嘌呤合成ATP不仅有利于腺苷酸生物合成理论的研究,而且丰富了ATP的生产原料并为味精工业的综合利用开创了重要途径。

必须强调的是,伟大的批林批孔运动提高了我们的认识,进一步体会到理论必须联系生产实际,开展科学研究必须认真批判崇洋思想、爬行主义。工作初期,我们曾根据生物体内核苷酸生物合成理论,设计了加有磷酸核糖和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(NADP)等物质的反应系统。显然,这些来源困难、价格昂贵的物质尽管有利于ATP的合成,但却是不适于生产的。我们毅然放弃了这种设计。又如,按过去的洋框框,这类研究工作必然是先在实验室中摸反应条件,求得一系列足够写文章的数据后再考虑生产的可能性。不仅时间长,所得结果又往往不符生产要求,甚至会作出无法生产的错误结论。在批判了崇洋、爬行的科研路线后,我们的研究坚持在校办工厂进行,先用薄层层析法定性跟踪所计划的各种反应系统中ATP的转化情况,使我们在很短时间内获得了大量感性认识,从而很快建立了ATP转化率较高的反应系统,提出了两次发酵工艺。在此基础上边试产边用数学正交设计进一步探讨反应系统中诸因素对ATP形成的影响及其转化机理。事实证明,这种研究方法符合生产要求,符合多、快、好、省的总路线精神。

材料与方 法

目前用于ATP生产的,我们称之为“两次发酵”工艺的反应系统如下:

前发酵反应系统是:腺嘌呤18克溶于1升水中,用6N NaOH调 P^H 8.0。再加入AMP 2.4克、葡萄糖120克、 NaH_2PO_4 98克、4% $MgCl_2$ 24毫升、4% KCl 24毫升、经离心后的啤酒酵母泥1400克,加水定容到4.8升,调 P^H 7.0。控温 $37^\circ C$ 下发酵三小时后补加下列后发酵反应系统:50% NaH_2PO_4 98毫升、50% 葡萄糖120毫升、4% $MgCl_2$ 12毫升、4% KCl 12毫升、甲苯12毫升、10% 乙醚24毫升、经离心后的啤酒酵母泥700克。控温 $37^\circ C$ 继续发酵约三小时左右,即到ATP形成最高峰时投冰速冷到 $5^\circ C$ 以终止反应。离心后所得清液按一般钡汞沉淀法,或两步酒精沉淀树脂分离法提取ATP。

反应系统中腺嘌呤取自从谷氨酸菌废液中提取的腺嘌呤磷酸盐,内含腺嘌呤53.5%、磷酸42.3%。所用AMP纯度74.65%。至于啤酒酵母,生产用第5—16代不等,在 $8^\circ C$ 下贮藏1—5天;研究用第6代,在 $8^\circ C$ 下贮藏3天。

为了确定合成ATP的高峰期,采用了薄层层析法。即把DEAE—纤维素(DE-11)用INHCl浸泡6小时,水洗到中性,调浆后均匀涂于 6×20 厘米玻片上(纤维素不必研细、涂板尽可能厚), $60^\circ C$ 烘干备用。自投料起每隔1小时取样5毫升,过滤后用毛细管吸清液10微升,点样于已制好之薄板上,立即斜放于盛有 P^H 3.0, 0.05M 柠檬酸缓冲液的烧杯中展层。约8分钟即可展层18厘米。略经吹干即可在紫外层析灯下确定斑点位置。由于腺嘌呤不能全部转化,判断高峰期需要积累一定经验。在我们条件下,当ATP达高峰时,ATP斑点大而色深;AMP呈V字形且和腺嘌呤明显分开;腺嘌呤前沿开始分叉。图1指出ATP形成高峰期为6小时。即补加后发酵反应系统后的3小时。

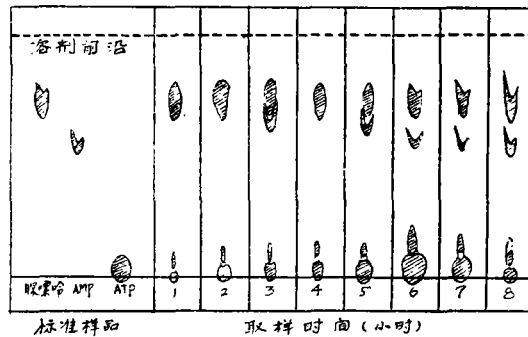


图1 用薄层层析法确定ATP形成高峰期的层析谱

为了研究ATP形成的各影响因素,进一步探索ATP合成的最佳反应系统,采用了数学上的“正交设计”。共选择了上述反应系统中所加酵母、无机磷、葡萄糖、AMP、腺嘌呤五项因素为研究对象。每因素定四个水平,考察指标是ATP、AMP及腺苷的产量。据此采用了L16(4⁵)正交表^[3]。因企图了解各因素最低水平时对ATP合成的影响,列表时未采用随机法,每个因素的水平全部由小到大地排列。按这些原则所列16组试验的反应系统如表1所示。

各组每小时取样5毫升,过滤后用刻度毛细管准确吸取10微升点样于3×27厘米新华层析滤纸上。在P^m3.0、0.05M柠檬酸缓冲液、电压300伏、电流5—10毫安条件下电泳2小时。在紫外层析灯下确定各物质位置后,分别剪下,用0.01NHCl浸泡一夜后用Unican SP 500型分光光度计波长260毫微米处定量测定。各物质除用标准品同时电泳参照外,还测定了250/260; 280/260毫微米处的吸收比进行核实。

结果与讨论

一、腺嘌呤形成ATP的重量转化率(简称ATP转化率):用上述反应系统进行试产,ATP转化率平均在120%左右,最高可超过150%。因提取过程有损失,实际反应的转化率高于此值。表2列入了5批的ATP转化率,作为引子的AMP也以投料量计算在内。按理论计算,腺嘌呤分子量为135.13,提取后所得ATP钠盐(C₁₀H₁₄N₅O₃P₃Na₂·3H₂O)分子量为551.19,ATP转化率可达408%。表2结果与理论值尚有相当距离。但就生产实效而言,并不亚于用腺苷酸酶促磷酸化^[1,2]所得结果。也说明本法尚有很大潜力。

二、两次发酵对ATP转化率的影响:用薄层层析跟踪各种反应系统的大量实验使我们认识到:在不外加磷酸核糖及NADP的情况下,一次发酵是很难获得较高的ATP转化率的。图2是一次发酵和两次发酵的对比试验结果。其中图2(A)是只用前发酵反应系统(称为一次发酵);图2(B)是(A)组发酵到3小时左右取出一半发

酵液,按体积比补加后发酵反应系统(称为两次发酵)。结果表明,一次发酵时ATP在5小时达高峰,仅得3.12mM ATP;两次发酵时ATP在6小时达高峰,产值为4.8mM,即增加了54%。图2(A)可以看出:3小时正是AMP达高峰,腺嘌呤将到最低值的时候,说明此时腺嘌呤和由酵母中酶系把葡萄糖转化成的核糖衍生物起反应形成了AMP。若不补加后发酵液,反应不再继续,甚至逆转。两次发酵的结果使反应在有大量AMP作为中间体的情况下ATP的合成继续进行。图2亦看出:不论一次发酵还是两次发酵,腺苷含量极低,变化并不显著。可以认为,这种条件下它并不参

表1 按 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计的16组实验安排⁽¹⁾

加 量 因 素 试 号	20% $N_2H_2PO_4$ (ml)	2%腺嘌呤 (ml)	1%AMP (ml)	20%葡萄糖 (ml)	酵母 ⁽²⁾ (8)
1	12.5	22.5	0	15.0	30
2	"	30.0	3	22.5	50
3	"	37.5	6	30.0	70
4	"	45.0	12	37.5	90
5	17.5	22.5	3	30.0	90
6	"	30.0	0	37.5	70
7	"	37.5	12	15.0	50
8	"	45.0	6	22.5	30
9	22.5	22.5	6	37.5	50
10	"	30.0	12	30.0	30
11	"	37.5	0	22.5	90
12	"	45.0	3	15.0	70
13	27.5	22.5	12	22.5	70
14	"	30.0	6	15.0	90
15	"	37.5	3	37.5	30
16	"	45.0	0	30.0	50

(注1) 各试号均加有4% $MgCl_2$ 1.2ml; 4% KCl 1.2ml; 各试号总体积均定容到240ml, $PH7.0$; $37^\circ C$ 。各试号每小时取样电泳,共8小时。

(注2) 经2000转/分离心10分钟之湿固块。

表2 由腺嘌呤合成ATP的重量转化率

批号	腺嘌呤投料量			AMP投料量			ATP收得量			ATP重量转化率(%)
	重量(克)	纯度(%)	实际重(克)	重量(克)	纯度(%)	实际重(克)	重量(克)	纯度(%)	实际重(克)	
740416	3.63	53.5	1.926	0.36	74.65	0.26	4.44	76.1	3.38	154.2
740514	18.00	"	9.630	2.40	"	1.80	12.54	84.2	10.55	92.3
740522	30.00	"	16.050	4.00	"	2.98	34.62	75.4	26.10	137.1
740523	72.00	"	38.520	9.60	"	7.16	45.40	91.1	41.36	90.4
740530	36.00	"	19.270	4.80	"	3.60	32.80	78.7	24.81	119.9

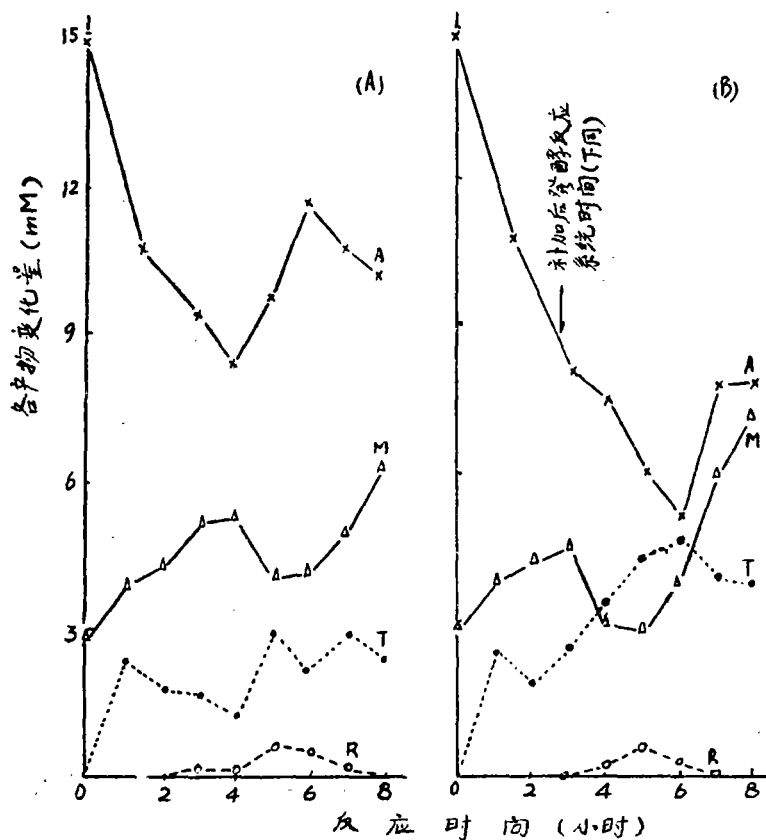
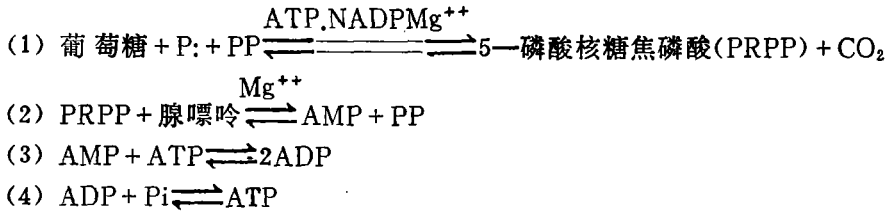


图2 两次发酵对ATP形成的影响 (A)一次发酵 (B)两次发酵

图中, A——腺嘌呤; M——AMP; T——ATP; R——腺苷(下同)。

与ATP的合成,似乎并不存在1-磷酸核糖和腺嘌呤形成腺苷⁽⁷⁾那样的合成途径。根据上述实验结果及有关生物合成理论^(8,9,10,1),我们认为在此条件下ATP的合成可能是通过下列途径的:



反应需要一系列的酶催化。式中ATP, NADP是酵母体中原有的。这一设想尚待进一步获得直接证据来证实。

三、正交设计的实验结果与分析:图3是用正交设计在同一时间所进行的16组处理结果(各组配比见表1),各组均未补加后发酵反应系统。

由图3可知:

(1)、任何处理组都未达到图2(B)的ATP转化率。最高的第6组ATP也只形成3.276mM,相当于图2(A)之水平。最低的如第一组仅形成0.624mM的ATP。

(2)反应系统中相同成份不同配比会影响酵母体内生物合成方向。如图3第5、14组中发现有一向负极泳动的带正电的物质,测其紫外吸收比为 $250/260\text{m}\mu = 1.63$; $280/260\text{m}\mu = 0.30$ 。此值与肌苷相同,经用标准品验证确是肌苷。第1.8.10组中主要产物是腺苷,最高时可达6mM左右。反应系统中未加AMP的第6.11组,却形成了4.5mM的AMP。更如第9组在肌苷和腺苷电泳斑点之间有一荧光很强的未知物。在第2.3.5组ATP斑点的前方有一总是形成弯月状的物质,其比值很类似四磷酸腺苷。这些结果说明,相同物质不同配比的反应系统,能影响酵母体内酶促合成的方向,据此可以控制一定比例来生产不同的物质。

(3)、腺嘌呤的消耗只占投入量的1/3-1/2。曾认为既然用不掉这么多腺嘌呤,就减少投料量。正如第1.5.9.13组的结果,腺嘌呤仍然按1/2-1/3这样的比率消耗,并不能改善ATP的合成或节约原料。此结果说明在我们的反应系统中还缺少某种有利于ATP形成的因素。也说明在应用这一反应系统时回收腺嘌呤是必要的。

(4)、许多组,尤其是第13组的核苷类产物总量超过了腺嘌呤投料量的一倍以上。这些多增加的量来自何物?是否在系统中发生着比腺嘌呤更为简单的物质参与了嘌呤类化合物之形成,这是一个很值得研究的问题。

四、各种因素对ATP等合成的影响:根据正交设计16组所考察的ATP、AMP和腺苷三项指标,依正交法数据处理要求,我们分别取图3各组三项指标在4-6小时高峰期的平均值,划出正交图4。正交分析认为⁽³⁾,正交图上点子散布距离大的是主要影响因素,散布距离小的是次要的。图4表明反应系统中加入的酵母量和无机磷量是ATP、AMP及腺苷合成的主要影响因素;其次是葡萄糖及AMP量;影响

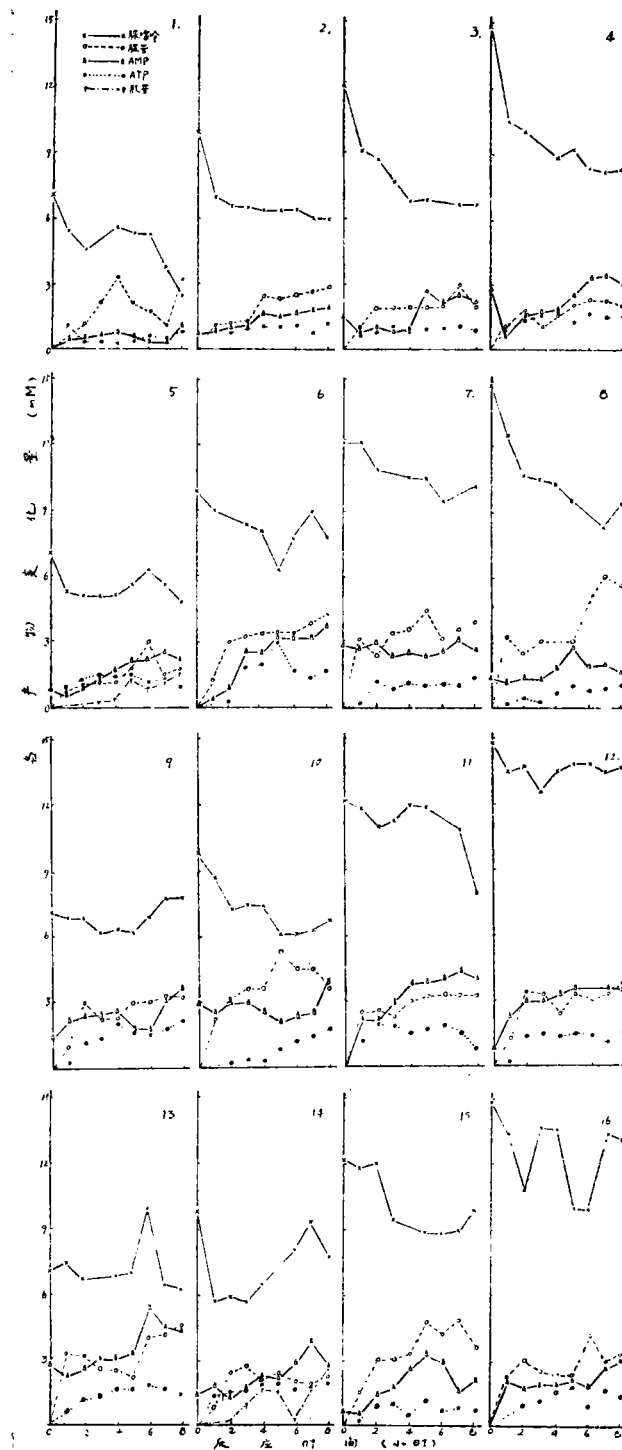


图 3
正交设计16组在
不同时间各产物
的变化量

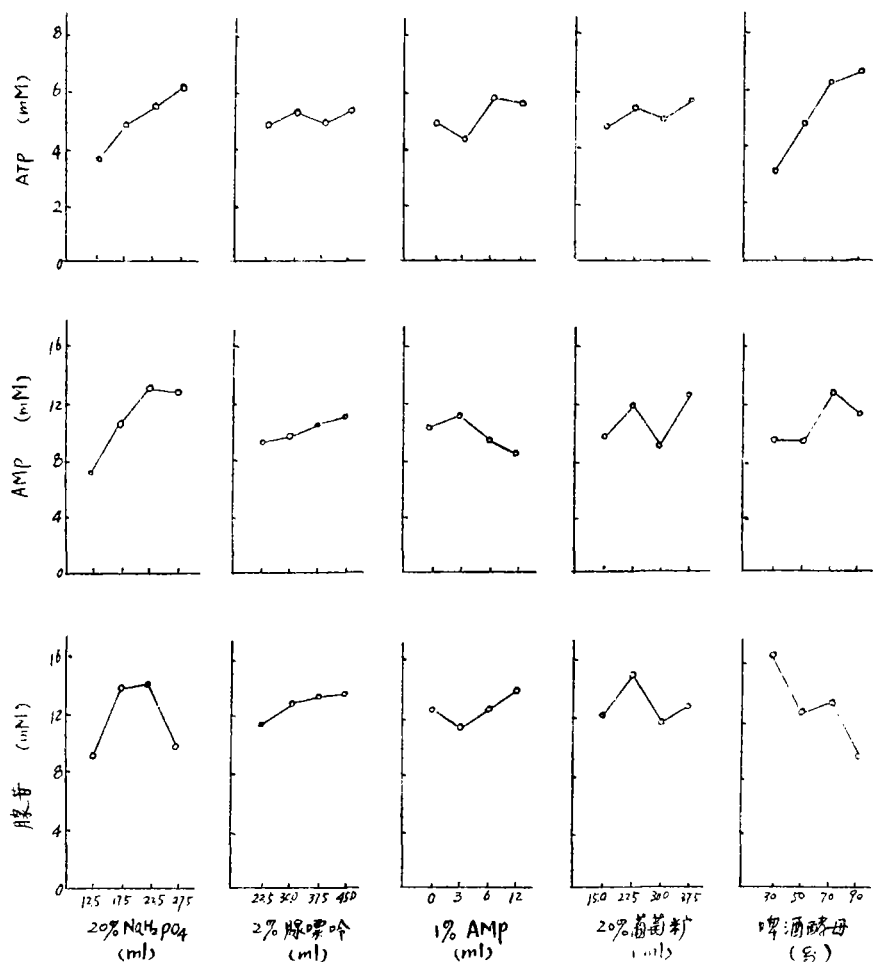


图4 表示反应系统中诸因素对ATP、AMP、腺苷形成的影响的正交图

最小的是腺嘌呤量。为了验证这一结果，我们采用同一种两次发酵反应系统进行不同酵母量的对比试验。第一组酵母量不变，第二组酵母量由第一组的1400克减为1000克，其它条件完全相同。结果ATP产量第一组为10.55克，第二组仅得2.066克，二者相差4倍以上。此实验的重复性极好，充分说明正交分析所得酵母量是主要因素的结果是正确的。

五、正交法所得新反应系统的结果与分析：按正交原理，分别取图4各考察指标中各因素的最高点组合成新的反应系统即是所考察指标的最佳反应系统。换句话说，用这些反应系统即能获得所考察的ATP、AMP或腺苷的最高产量。据此我们得到了表3中所列第1、2、3试号，分别代表ATP、AMP和腺苷的最佳反应系统。因考虑到上述两次发酵这一必要条件，又在第1、2、3试号发酵到三小时后分别取出100毫

升, 补加表 3 所列后发酵反应系统, 分别组成第 4、5、6 试号进行相应的 1、2、3 组的对比试验。温度和酸浓度各组完全一致。实验结果证明正交法所提供的新反应能获得考察的 ATP、AMP 和腺苷的最高产量, 而两次发酵更发展了这一预期结果。现分别讨论如下:

(1)、关于 ATP 的转化: 图 5 (A) 和 (B) 即是应用表 3 第 1、4 试号反应系统的结果。图 5 (A) 表明试 1 反应系统所得 ATP 产量为 3.12mM, 且在 4 小时即达高峰。和原有系统 (图 2) 比较, ATP 产值恰好相等 (见图 2 (A)), 但仍然比不上两次发酵 (见图 2 (B))。值得注意的是, 在此系统中腺苷在七小时达高峰, 产值为 8.329mM。

表 3. 经正交计标所得新反应系统及其两次发酵配比

(反应温度 37°C; PH7.0)

试号	20% NaH ₂ PO ₄ (ml)	2% 腺嘌呤 (ml)	1% AMP (ml)	20% 葡萄糖 (ml)	4% KCl (ml)	4% MgCl ₂ (ml)	酵母 (g)	10% 乙醛 (ml)	甲苯 (ml)	总体积 (ml)	说明
1	27.5	45	6	37.5	1.2	1.2	90	—	—	240	
2	22.5	45	3	37.5	1.2	1.2	70	—	—	240	
3	22.5	45	2	37.5	1.2	1.2	30	—	—	240	
4	7.0	—	—	9.0	0.3	0.3	22.5	1.2	0.6	141	系试 1 在发酵到 3 小时, 取出 100ml 补加此配方组成
5	5.5	—	—	9.0	0.3	0.3	17.5	1.2	0.6	134	同上、系试 2,
6	5.5	—	—	5.5	0.3	0.3	7.5	1.2	0.6	121	同上、系试 3.

因此采用试 1 反应系统作为由腺嘌呤直接合成腺苷的反应系统是有价值的。图 5 (A) 还指出: 当反应 4 小时后腺苷和 ATP 成对映曲线, 而腺嘌呤和 AMP 几乎保持不变。可以认为 4 小时后形成之腺苷系由 ATP 分解而来。

图 5 (B) 是试 1 的两次发酵 (即试 4)。可以看出, ATP 在 5 小时达高峰, 产值为 3.744mM, 比一次发酵增加了 20%。惊人的是, 在此反应系统中随着腺嘌呤的急剧下降 AMP 和腺苷大量形成, 二者均高达 8.5mM, 说明此时核苷磷酸化酶和核苷酸焦磷酸化酶的积极活动。我们认为采用试 4 两次发酵反应系统能同时获得 ATP、AMP 和腺苷的较高产量 (可用离子交换法进行分离), 具有重大的实际意义。

(2)、关于 AMP 的转化: 图 6 表明, 采用正交法所得 AMP 最高产量的反应系统试 2, 确能获得较高的 AMP 产值。图 6 (A) 表明: 在 6 小时 AMP 高达 4.156mM。此反应系统中 ATP 形成很少, 6 小时达高峰时仅有 1.404mM。正如预期的那样, AMP 的大量形成有利于两次发酵中 ATP 的形成。图 5 (B) 中 ATP 随腺嘌呤下降而急增到 4.96mM, 超过图 5 (A) 所得 ATP 160% 从而打破了所有实验记录。图 5 (B) 也再次证

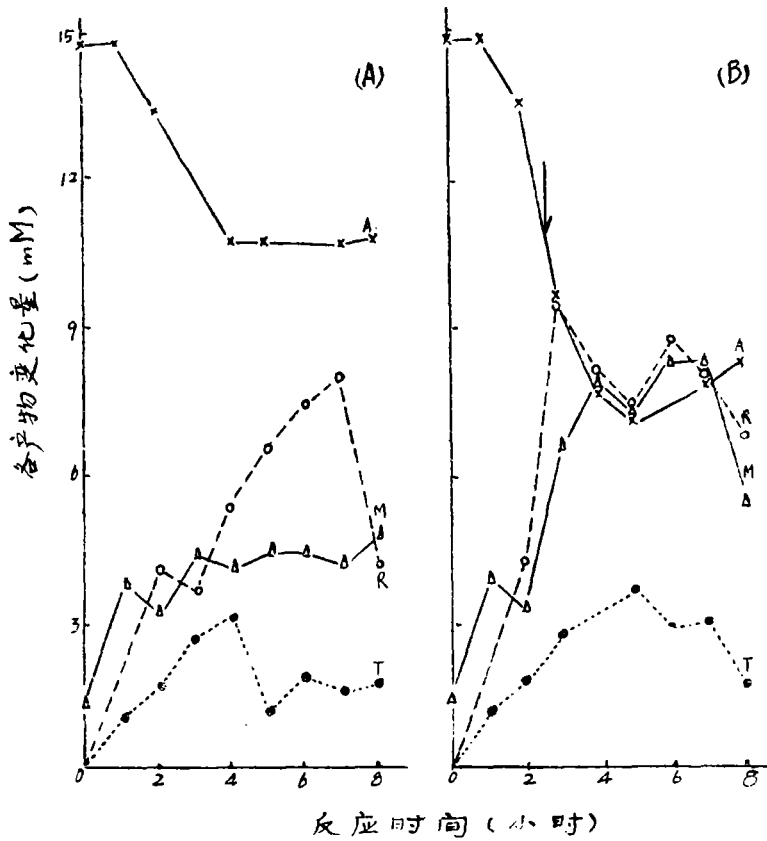


图5 试1号反应系统所得各产物变化及其两次发酵对比
(A) 一次发酵 (B) 两次发酵

明ATP直接来源于AMP之磷酸化而不是腺苷。因为在补加后发酵反应系统后腺苷迅速成倍下降，而AMP随之上升，说明发生了腺苷磷酸化合成AMP的反应。除此，腺嘌呤和AMP相同的下降曲线和ATP的增加相对映，而AMP又维持在一定水平上的现象，也说明了AMP作为中间体过渡到ATP的反应特点。我们认为采用试5两次发酵系统同时生产ATP和AMP是有益的。

(3)、关于腺苷的转化：也如前述，试3反应系统能获得较高的腺苷量，图7(A)所得为5.553mM在此条件下AMP和ATP量都较低。补加后发酵反应系统后看到AMP随腺嘌呤的下降而增加，腺苷和ATP变化不大。说明此时提高了磷酸核糖焦磷酸化酶活性，也再次证明，如果没有充分的AMP存在于系统中，ATP是很难形成的。由于此系统与试1.2.4.5相比较实用价值较小，不再详细讨论了。

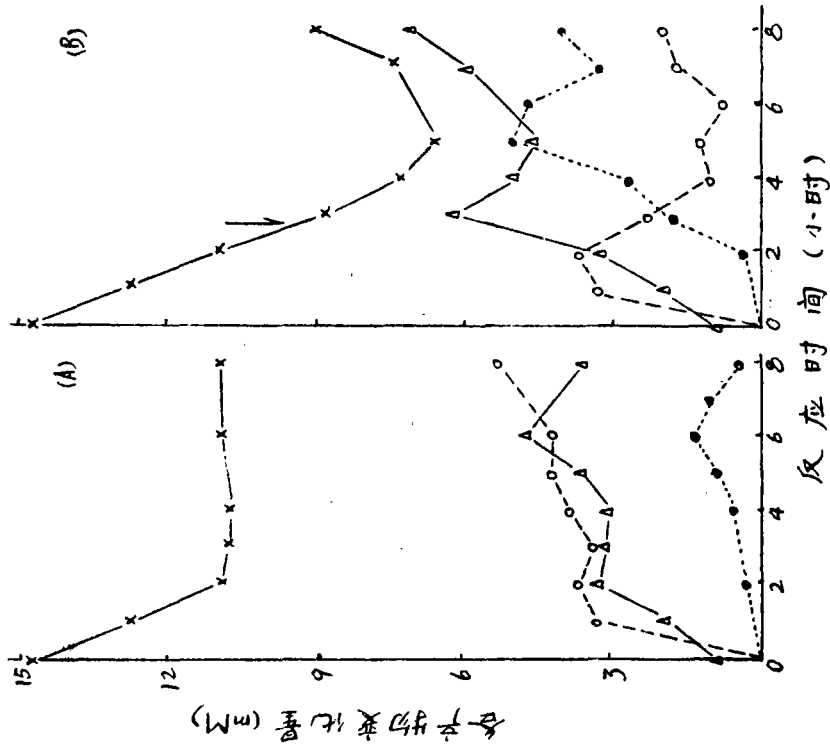


图6 試2号反应系統所得各产物变化及其兩次发酵对比
(A) 一次发酵 (B) 兩次发酵

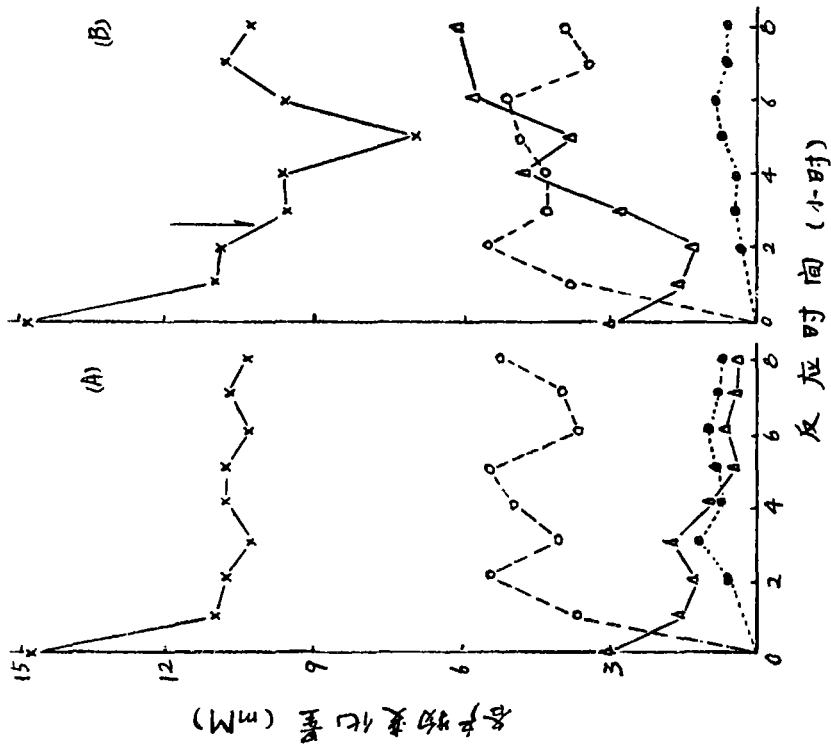


图7 試3号反应系統所得各产物变化及其兩次发酵对比
(A) 一次发酵 (B) 兩次发酵

參 考 文 獻

- { 1 } 中山大学生物系生化微生物教研室:微生物学报, 第13卷, 第2期, 185 (1973)。
- [2] 欧倫英等:中山大學学报(自然科学版) 4 (1974)97。
- { 3 } 中国科学院数学研究所統計組:常用数理統計方法, 科学出版社出版(1973)。
- { 4 } Tochura, T., Kuwahara, M., Yogi, S., Okamoto, H., Tominaga, Y., Kano, T., Ogata, K: J. Ferment, Technol., 45, 511 (1967)。
- { 5 } Tanaka, H., Sato, Z., Nakayama, K., Kinoshita, S: Agr. Biol. Chem., 32, 721 (1968)。
- { 6 } Ogata, K., Kawazuchi, K: J. Ferment, Technol., 50, 46 (1972)。
- { 7 } Kalckar, H. Symp. Soc. Exp. 1, 38 (1947)。
- { 8 } Kornberg, A., Lieberman, I., Simms, E. S.: J. Amer. Chem. Soc., 76, 2027 (1954)。
- { 9 } Brawerman, G., Chargaff, E., Biochim. Biophys. Acta, 15, 549 (1954)。
- [10] Murray, A. W., Anu. Rev. Biochem., 40, 811 (1971)。
- { 11 } Lapinski, Z., Zbl. Gynäk., 95, 652 (1973)。