簡 报

影响酶促磷酸化合成三磷酸腺苷的一些因素

中山大学生物系生化微生物教研室

近几年来，椽川（Tochikura）等对直接利用微生物菌体将核苷酸物质磷酸化进行了大量研究[1-4]，田中（Tanaka）利用产氨短杆菌（*Brevibact. ammoniagenes* ATCC 6872）进行了酶促磷酸化合成 ATP 的研究[6]，1972 年绪方（Ogaxa）等综述了这方面的研究报告[5]，指出用此法可以合成三磷酸腺苷（ATP）、二磷酸胞嘧啶核苷胆碱（CDP-Choline）、二磷酸尿嘧啶核苷葡萄糖（UDPG）、二磷酸鸟嘌呤核苷甘露糖（GDMP）、辅酶 A(COA)、辅酶 I（NDP）等十余种生化医药制品。

ATP 作为医药早已用于临床，对垂危病人抢救、心肌炎、肌肉萎缩等疾病疗效显著，最初 ATP 是由兔子肌肉提取，现在是采用光合磷酸化和化学合成法制备，近来我校办工厂利用酶促磷酸化合成 ATP 已正式少量生产。实践证明，这种方法具有生产流程短，成本低，收率高，不受季节限制等优点。

本文简要报告综合利用啤酒厂下脚料——啤酒酵母坭进行磷酸化合成 ATP 的一些影响因素的研究。

材料和方法

一、反应系统： 5-AMP 10 克（溶于 200 毫升水，用 6*N* NaOH 调 pH 6.8，使溶解完全），10% KH_2PO_4 150 毫升，10% K_2HPO_4 376 毫升，10% $MgCl_2$ 10 毫升，葡萄糖 100 克和啤酒酵母坭（湿固体块）800 克，加水定容到 800 毫升。

5′-AMP 主要来自上海味精厂，纯度为 74.84%。酵母坭取自广州饮料厂。

上述物质混匀，在 32℃ 反应 1 小时半后缓慢加入 20% 乙醛 50 毫升，继续反应至 ATP 形成最高峰，投冰速冷至 5℃，然后按钡、汞沉淀法提取。

二、分析方法： 纸层析和电泳、用紫外分度光光度计进行定量测定。

由于各批酵母生理状态不同，酶促磷酸化合成 ATP 的高峰期也往往不同。为快速而准确地判断 ATP 形成高峰期，以便及时终止反应夺取高产，采用了薄层层析法，一般在 20—30 分钟即可看到结果。方法是：把 DEAE-纤维素（DEII）用 1*N* HCl 浸泡 6 小时，水洗到中性，研细，调浆后均匀涂于 6×20 厘米的玻片上，60℃ 烘干备用。自投料开始，每隔半小时自反应液中取样 5 毫升，用 10% 三氯乙酸调 pH 3.0，离心，用毛细吸管吸清液，点样 2 微升于已制好之薄板上，吹干，斜放于

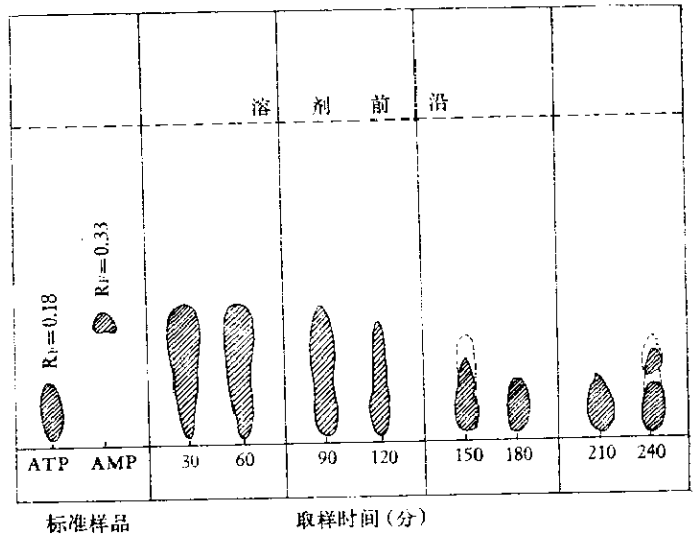

图 1 用薄层层析法确定 ATP 形成高峰期层析谱
展层剂：pH 3.5 柠檬酸缓冲液。层析 10 分钟

本文 1973 年 6 月 1 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

盛有 pH 4.8（或 pH 3.5）柠檬酸缓冲液的烧杯中展层。一般 10 分钟即可展层 13 厘米。取出吹干，在紫外层析灯下确定斑点位置。由于反应系统中杂质干扰，各斑点分得不够完全，但足以辨别 ATP 形成的高峰期。图 1 指出 ATP 形成高峰期为 180—210 分钟。

结果和讨论

一、AMP 形成 ATP 的转化率（简称 ATP 转化率）：利用上述反应系统试验结果指出，按 ATP 实得量计算，ATP 转化率平均在 90% 以上，最高的超过 110%（表 1）。因为 ATP 在提取中有损失，所以实际反应的转化率要比这高。

二、啤酒酵母代数与 ATP 形成的关系：啤酒厂把啤酒酵母坭中活的啤酒酵母划分为 2—12 代（有些单位划为 2—7 代），以区别酵母用于酿酒的次数。经镜检，2—7 代之酵母体形小，空泡少，而七代以后酵母体形逐渐增大，空泡也渐增多，生理状况有一定差异。但美蓝染色证明均是活细胞。不同代数的酵母是否会影响酶促磷酸化合成 ATP 的能力呢？结果（表 2）说明，影响并不显著，但若菌体因种种原因发生菌体自溶则丧失了合成 ATP 的能力。7—12 代酵母虽有不少衰老菌体，但酵母在迅速繁殖，所以对 ATP 转化率影响不大。这为啤酒酵母坭的综合利用开辟了新途径。

表 1 AMP 形成 ATP 的轉化率

试号	AMP 投料量			ATP 收得量			ATP 转化率（%）
	重量（克）	纯度（%）	实际量（克）	重量（克）	纯度（%）	实得量（克）	
720912(1)	2.5	74.84	1.871	2.8480	72.99	2.0787	111.10
720912(2)	2.5	”	”	2.3436	74.76	1.7521	93.64
720918	2.5	”	”	1.5840	84.75	1.3416	71.70
720925	2.5	”	”	2.2978	62.52	1.4366	76.78
720927	5.0	”	3.742	5.0112	88.31	4.4254	118.26

三、啤酒酵母的“新鲜度”对 ATP 形成的影响：我们把同一批酵母坭贮藏在 5—8℃ 冰水中，每天取出一定量测定其 ATP 转化率。结果（图 2）指出，从啤酒厂取来的“新鲜”酵母 ATP 转化率很低，经 5—8℃ 冰水贮藏 4—6 天的酵母合成 ATP 的能力显著提高。

表 2 不同代数啤酒酵母坭对 ATP 轉化率之影响

试号	啤酒酵母代数	ATP 转化率（%）
1	二代	71.87
2	三代	80.80
3	三代	91.94
*4	三代	0
5	六代	76.92
6	七代	72.14
7	八代	76.25
8	八代	102.37
9	九代	74.60
10	十二代	78.21

* 美蓝试剂能使细胞染色。

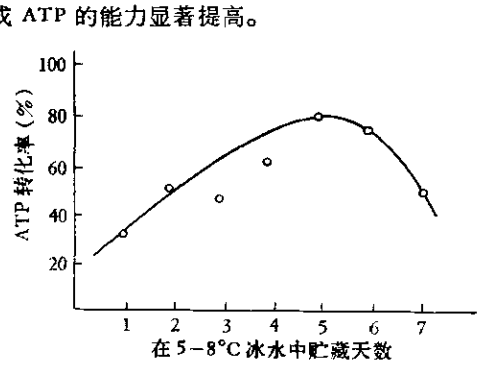

图 2 啤酒酵母“新鲜度”与 ATP 转化率间之关系

四、ATP 形成的高峰期：图 3 说明，酵母细胞外的 AMP 含量随反应的进行逐渐减少，ATP 则随之增加，3—4 小时内达到最高峰，以后 ATP 又较快地被分解，AMP 量回升。这与橡川及其同事所得的结果相似[1]，其不同的是 ATP 高峰出现的时间。在橡川的报道中，ADP 高峰在 ATP 高峰后，而我们的工作证明是在 ATP 高峰出现前。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

AMP 形成 ATP 的磷酸化途径待进一步研究。

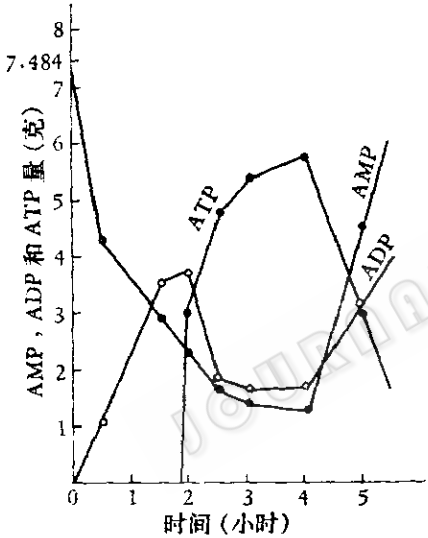

图 3　啤酒酵母磷酸化合成 ATP 时的反应进程

参 考 资 料

[1] Tochikura, T., Kuwahara, M., Yogi, S., Okamoto, H., Tominaga, Y., Kano, T., Ogata, K.: *J. Ferment, Technol.*, **45**:511, 1967.

[2] Tochikura, T., Kawai, H., Tobe, S., Kawaguchi, K., Osugi, M., Ogata, K.: *J. Ferment, Technol.*, **46**:957, 1968.

[3] Tochikura, T., Kawaguchi, K., Kano, T., Ogata, K.: *J. Ferment, Technol.*, **47**:564, 1969.

[4] Tochikura, T., Mugibayashi, Y., Kawai, H., Kawaguchi, K., Ogata, K.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **22**:144, 1970.

[5] Ogata, K., Kawaguchi, K.: *J. Ferment, Fechnol.*, **50**:46, 1972.

[6] Tanaka, H., Sato, Z., Nakayama, K., Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**:721, 1968.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn