

URZĄD PATENTOWY
w WARSZAWIE
OPIS PATENTOWY

CO7d 57/38

Nr 28676.

Kl. 12 p, 7/11.

Paweł Ostern, Lwów.

**Sposób wytwarzania mięśniowego kwasu adenilowego (adenozyno-5-fosforowego)
i jego pochodnych z adenozyiny.**

Zgłoszono 13 października 1937 r.

Udzielono 22 czerwca 1939 r.

Mięśniowy kwas adenilowy jest estrem fosforowym adenozyiny (furanorybozydu adeniny) i, jak wykazały badania, reszta kwasu fosforowego znajduje się przy 5-tym węglu *d* - rybozy. Mięśniowy kwas adenilowy występuje w narządach zwierzęcych, cieczach ustrojowych i w drobnoustrojach (np. w *Bacterium coli*, *Bacterium Delbrücki*, w drożdżach) głównie w postaci wyższych połączeń fosforowych (kwasu adenzynodwufosforowego, kwasu adenzynotrójfosforowego, kozymazy). Otrzymywano go dotąd wyłącznie przez wydzielanie z wyżej wymienionych materiałów bądź w stanie wolnym, bądź też w postaci wspomnianych połączeń. Nie znano natomiast dotychczas sposobu otrzymy-

wania mięśniowego kwasu adenilowego i jego pochodnych na drodze syntetycznej.

Przedmiot wynalazku niniejszego stanowi sposób wytwarzania mięśniowego kwasu adenilowego z adenozyiny. Adenozyina (nukleozyd adeniny) jest związkiem łatwo dostępnym. Uzyskuje się ją z dużymi wydajnościami przez hydrolizę drożdżowego kwasu nukleinowego, w którym znajduje się w postaci kwasu adenzyno-3-fosforowego (drożdżowego kwasu adenilowego), różniącego się od mięśniowego kwasu adenilowego położeniem reszty kwasu fosforowego oraz właściwościami biologicznymi i farmakologicznymi.

Syntezę mięśniowego kwasu adenilowego i jego pochodnych przeprowadza się

według wynalazku niniejszego na drodze enzymatycznej działaniem drożdży, pleśni i drobnoustrojów lub sporządzonych z nich preparatów zaczynowych na mieszaninę adenozyiny i odpowiednich związków fosforowych. Odpowiednimi w tym sensie związkami fosforowymi są wszelkie rozpuszczalne w wodzie nieorganiczne sole kwasu fosforowego oraz niektóre organiczne związki fosforowe, a mianowicie estry cukrowo-fosforowe i ich ufosforylowane produkty rozkładu, jak np. ester fosforowy kwasu glicerynowego. Jeśli będzie się poddawało np. mieszaninę adenozyiny i fosforanów nieorganicznych działaniu drożdży albo plazmolizatów lub wyciągów drożdżowych, to następuje synteza mięśniowego kwasu adenilowego. Jeśli do mieszaniny reakcyjnej oprócz fosforanów i adenozyiny będzie się wprowadzało cukry fermentujące, estry cukrowo-fosforowe albo ester fosforowy kwasu glicerynowego, to następuje synteza pochodnych kwasu adenilowego, np. kofermentów fermentacji drożdżowej. Przy dodaniu estrów fosforowych następuje fosforylacja adenozyiny także w nieobecności fosforanów nieorganicznych. Zamiast adenozyiny można do syntezy mięśniowego kwasu adenilowego użyć także tych substancji, które rozkładają się na adenozyinę (np. drożdżowego kwasu adenilowego lub roślinnego kwasu nukleinowego).

Przykład I. W 1 l 1/10 molarne roztworu fosforanów nieorganicznych (fosforanu sodu, potasu, amonu, magnezu) o $p_h = 7$ rozpuszcza się 10 g adenozyiny, dodaje 300 g świeżych drożdży i 20 cm³ toluenu, miesza energicznie na trzęsiarce i wstawia do termostatu o temperaturze 37°C. Co 15 minut oznacza się na małych próbkach (1 cm³) ubytek fosforanu nieorganicznego. Z chwilą, w której związanie fosforanu nieorganicznego osiągnęło już stopień maksymalny, przerywa się reakcję przez zagotowanie lub odbiałczenie mieszaniny reakcyjnej. Zagotowaną lub odbiał-

czoną ciecz przesącza się; z przesącza suwa się niezwiązany nadmiar fosforanów nieorganicznych za pomocą wodorotlenku baru (przy stężeniu jonów wodorowych $p_h = 9$) albo amoniaku i magnezu, przesącza się, a z przesącza wydziela się za pomocą tych samych metodami mięśniowy kwas adenilowy. Otrzymuje się go z wydajnością wynoszącą 7 — 10 g czystego kwasu adenilowego (adenozyino - 5 - fosforowego).

Przykład II. Wyżej opisaną syntezę przeprowadza się jak w przykładzie I, z tą jednak różnicą, że zamiast świeżych drożdży dodaje się do mieszaniny adenozyiny i fosforanów nieorganicznych (fosforanu sodu, potasu, amonu, magnezu) 100 g drożdży suszonych albo wyciąg drożdżowy, otrzymany bądź ze 150 g drożdży suszonych, bądź też z 450 g drożdży świeżych splazmolizowanych za pomocą rozpuszczalników organicznych. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w termostacie w 37°C tak długo, aż maksymalna ilość fosforanów nieorganicznych ulegnie związaniu, po czym przerywa się reakcję zaczynową przez zagotowanie lub odbiałczenie. Otrzymaną ciecz przesącza się, a z przesącza wydziela się po usunięciu nadmiaru fosforanu nieorganicznego mięśniowy kwas adenilowy. Otrzymuje się go z taką samą wydajnością, jak w przykładzie I.

Przykład III. W 1 l 1/5 molarne roztworu fosforanów nieorganicznych (fosforanu sodu, potasu, amonu, magnezu) rozpuszcza się 10 g adenozyiny, 20 g cukru gronowego albo innego cukru fermentującego, dodaje 300 g drożdży świeżych lub odpowiednią ilość preparatów zaczynowych (jak w przykładzie II) oraz 20 cm³ toluenu wstrząsa energicznie na trzęsiarce i wstawia do termostatu o temperaturze 37°C. Co 15 minut bada się na próbkach stopień powstawania kwasów adenozyinowielofosforowych. Po osiągnięciu maksymalnego stopnia syntezy przerywa się reakcję i wydzielają znanymi metodami kwas adenozyinodwu-

fosforowy, adenozynotrójfosforowy i kozymazę (połączenia te są kofermentami fermentacji drożdżowej). Otrzymuje się około 20 g soli barowej kwasów adenozynewielofosforowych.

Przykład IV. Syntezę wyżej opisaną przeprowadza się jak w przykładzie III, z tą jednak różnicą, że zamiast glukozy lub cukrów fermentujących dodaje się 20 g soli sodowej kwasu fosfoglicerynowego albo też 20 g soli sodowej jednego z estrów cukrowofosforowych (estru fruktozo - 6 - fosforowego Neuberga, glukozo - 6 - fosforowego Robisona, glukozo- lub fruktozo - 1 - fosforowego, fruktozo - 1 - 6 - dwufosforowego Hardena i Younga, lub też estru Embdena, będącego mieszaniną estru glukozo - 6 - fosforowego i fruktozo - 6 - fosforowego). Otrzymuje się 20 — 25 g soli barowej kwasów adenozynewielofosforowych.

Przykład V. Wyżej opisaną syntezę przeprowadza się jak w przykładzie I lub II, z tą jednak różnicą, że zamiast adenozyiny używa się do syntezy drożdżowego kwasu adenilowego w ilości 15 g. Podczas reakcji następuje pod działaniem użytych preparatów zaczynowych stopniowy rozkład drożdżowego kwasu adenilowego na adenozyinę, która następnie przemienia się na mięśniowy kwas adenilowy. Otrzymuje się około 5 g mięśniowego kwasu adenilowego (adenozyino - 5 - fosforowego).

Przykład VI. 50 g roślinnego kwasu nukleinowego (drożdżowego) poddaje się

hydrolizie chemicznej lub zaczynowej, prowadzącej do otrzymania nukleozydów. Mieszaninę nukleozydów przerabia się w całości (bez wyodrębnienia adenozyiny) po zubożeniu jej odczynu na $p_h = 7$ w sposób, podany w przykładzie I lub II. Obecność innych nukleozydów nie przeszkadza syntezie, ponieważ w tych warunkach reakcji tylko adenozyina ulega fosforylacji. Otrzymuje się mięśniowy kwas adenilowy z wydajnością taką samą, jak w przykładzie I.

Zastrzeżenie patentowe.

Sposób wytwarzania mięśniowego kwasu adenilowego (adenozyino - 5 - fosforowego) i jego pochodnych z adenozyiny, znamienny tym, że wspomnianą syntezę przeprowadza się na drodze enzymatycznej działaniem drożdży, pleśni i drobnoustrojów lub sporządzonych z nich preparatów zaczynowych na mieszaninę adenozyiny (względnie drożdżowego kwasu adenilowego lub roślinnego kwasu nukleinowego) i rozpuszczalnych w wodzie nieorganicznych soli kwasu fosforowego, ewentualnie z dodatkiem cukrów fermentujących, albo organicznych związków fosforowych, a mianowicie estrów cukrowofosforowych lub np. estru fosforowego kwasu glicerynowego, w obecności lub nieobecności wymienionych fosforanów nieorganicznych.

P a w e ł O s t e r n .