

东方伊萨酵母生物转化法制备胞二磷胆碱

宋丽芳^{1,2}, 尤翠萍^{1,2}, 陶冠军³, 张梁^{*1,2}, 石贵阳^{1,2}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以 5'-胞苷酸和磷酸胆碱钙为底物, 利用东方伊萨酵母生物转化生成胞二磷胆碱, 并对转化条件进行优化, 得到最优的转化条件(胞苷酸 17.5 g/L, 磷酸胆碱钙 12.5 g/L, 磷酸氢二钾 12.5 g/L, 硫酸镁 3.0 g/L, 硫酸锰 0.6 g/L, 葡萄糖 50 g/L, 甲苯 30 mL/L, 酵母泥 375 g/L, 转化液 pH 8.0), 胞二磷胆碱产量可达 10 g/L 以上, 最高可达 11.592 g/L。对转化液去细胞、去蛋白质, 717 离子交换树脂吸附胞二磷胆碱, 以 0.05 mol/L NaCl 洗脱, 可以得到纯度在 98% 以上的胞二磷胆碱。

关键词: 东方伊萨酵母; 转化条件; 离子交换树脂; 胞二磷胆碱

中图分类号: Q 819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0201—08

Biological Preparation of CDP-C by *Issatchenkiaorientalis* CCTCCNO:M2011272

SONG Lifang^{1,2}, YOU Cuiping^{1,2}, TAO Guanjun³, ZHANG Liang^{*1,2}, SHI Guiyang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 5'-cytidine acid and choline calcium phosphate as the substrates were converted into CDP-C by *Issatchenkiaorientalis*. The optimal conversion condition was as follows: CMP 17.5 g/L, choline calcium phosphate 12.5 g/L, potassium hydrogen phosphate 12.5 g/L, seven hydrated magnesium sulfate 3.0 g/L, manganese sulfate 0.6 g/L, glucose 50 g/L, toluene 30 mL/L, Yeast mud 375 g/L, and the pH of convert liquid 8, the output of CDP-C can reach more than 10 g/L, up to 11.592 g/L. The conversion solution was decellularized, deproteinized and the CDP-C was obtained by eluting 717 ion exchange resin with 0.05 M NaCl, whose purity was more than 98%.

Keywords: *Issatchenkiaorientalis* CCTCCNO:M2011272, converting conditions, ion exchange resin, CDP-C

胞二磷胆碱又名胞苷-5'-二磷酸胆碱(Cytidine-5'-diphosphate choline, CDP-C, CDP-胆

碱), 是磷脂代谢的重要前体, 是磷脂酰胆碱合成的中间体, 为卵磷脂生物合成必需的辅酶, 对中枢神

收稿日期: 2013-12-26

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-11-0665)。

* 通信作者: 张梁(1978—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程和工业微生物方面的研究。

E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

经系统损害模型和脑病有显著疗效。研究证明: CDP-C 能促进生物代谢,尤其是磷脂的生物合成反应^[1]。

20 世纪 50 年代, Kennedy 博士等^[2]人发现并确定分子结构,稍后 Rossiter 等^[3]阐明其功能。60 年代,日本武田公司研发并用于治疗脑外伤、脑手术等伴随的意识障碍,临床获得成功,其商品名: Nicholin, 中译名: 尼柯灵^[4]。由此,胞二磷胆碱的研究在世界范围内展开。中国自 20 世纪 70 年代开发了利用酵母细胞生产胞二磷胆碱的工艺技术^[5]。华东理工大学牛红星等^[6]将 k-卡拉胶-魔芋-多糖复配胶包埋的啤酒酵母细胞,经冻融处理后用于合成胞嘧啶核苷二磷酸胆碱。

作者利用东方伊萨酵母,以磷酸胆碱钙和 5'-胞苷酸为底物,以葡萄糖为能量供体,通过添加无机离子提高 ATP 再生效率。胞二磷胆碱合成酶系—磷酸胆碱胞苷转移酶是“限速”酶,与膜的磷脂作用后才能被活化^[7],因此需要破坏细胞壁,添加甲苯提高细胞透性,提高胞二磷胆碱酶系的速率^[8]。东方伊萨酵母生长周期短,20 h 便可达到快速生长期,较容易获得大量酵母泥进行转化实验,缩短了实验周期。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 东方伊萨酵母。

1.1.2 培养基

1) YEPD 培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L; pH 7.0。

2) 一级种子培养基: 葡萄糖 50 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L; pH 自然。

3) 二级种子培养基: 葡萄糖 100 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L; pH 自然。

1.1.3 主要分离填料 717 阴离子交换树脂 DA-201B 大孔吸附树脂, 732 阳离子交换树脂 D301 阴离子交换树脂, D318 阴离子交换树脂 XDA-1 大孔吸附树脂 DA-201 DII 大孔吸附树脂。

1.2 实验方法

1.2.1 胞二磷胆碱生物转化方法 东方伊萨酵母经过一级种子培养 24 h、二级种子培养 20 h 后, 5 000 r/min 离心 5 min, 将离心获得的酵母泥加入到转化液中, 加入甲苯, 在 150 r/min、30 ℃ 反应 12 h。

1.2.2 胞二磷胆碱产量测定方法 将生物转化液于 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入等体积三氯乙酸 (10%), 沉淀过夜, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.45 μm 水膜, 稀释 10 倍, 以 0.02 mmol/L 醋酸铵为 A 相, 100% 乙腈为 B 相, Atlantis®HILIC Silica 亲水作用色谱柱, 进行高效液相色谱检测, 与标准样品比对, 计算 CDP-C 浓度。

胞二磷胆碱浓度 =

$$\text{胞二磷胆碱标准样品浓度} \times \frac{\text{胞二磷胆碱标准样品峰面积}}{\text{样品峰面积}}$$

$$\text{吸附率} = 1 - \frac{\text{胞吸附后样品浓度}}{\text{吸附前样品浓度}}$$

$$\text{洗脱率} = \frac{\text{洗脱收集液浓度} \times \text{洗脱收集液体积}}{\text{吸附总量}}$$

1.2.3 填料处理方法 3~4 倍树脂体积的 10% NaCl 溶液浸泡 20 h, 蒸馏水洗净, 5% 稀盐酸浸泡 2 h, 蒸馏水洗至中性, 4% NaOH 溶液浸泡 2 h, 蒸馏水洗至中性。经上述处理, 阴离子树脂已被处理成 OH⁻型, 用 10% NaCl 浸泡 2 h, 变为 Cl⁻型; NH₄HCO₃ 处理变为 HCO₃⁻型。阳离子树脂预处理过程与阴离子相同, 酸碱顺序颠倒即可。此时阳离子树脂被处理成 H⁺型, 再用 10% NaCl 浸泡 2 h, 蒸馏水洗净, 变为 Na⁺型。大孔树脂则用 95% 乙醇浸泡过夜即可, 用前蒸馏水洗净。

1.2.4 分离方法 将预处理过的树脂, 用蒸馏水洗净后抽滤, 称取适量抽滤过的树脂, 分别加入一定浓度的 CDP-C 溶液和胞苷酸溶液, 30 ℃、150 r/min 摇床反应适当时间。取样, 紫外分光光度计测吸光值。选择吸附效果好的阴离子交换树脂进行洗脱实验。

取适量抽滤过的各型号树脂分别加入 250 mL 三角瓶中, 加入一定浓度胞二磷胆碱 (CDPC) 和 5'-胞苷酸 (5'-CMP)。30 ℃、150 r/min 吸附 4 h, 取样测紫外吸光度。抽滤, 称适量于 50 mL 离心管中, 分别加入 3 倍体积的不同浓度的 NaCl、HCl、NaOH、NH₄HCO₃, 30 ℃、150 r/min 摇床洗脱 4 h, 取样测紫外吸光度。

2 结果与分析

2.1 胞二磷胆碱转化条件的优化

以东方伊萨酵母生物转化法制备胞二磷胆碱是一个生物转化过程。生物转化过程中, 转化液中无机离子、金属离子、能量供体葡萄糖、pH、酵母加

入量、底物浓度等对转化率均有一定程度的影响。通过对以上影响因素的单因素试验,考察各影响因素对转化率的影响程度,确定最佳转化条件。

2.1.1 胞苷酸加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图 1 可知,随着胞苷酸质量浓度的增大,胞二磷胆碱质量浓度呈递增趋势,而转化率则先增大后减小。且随着胞苷酸质量浓度的增大,胞二磷胆碱质量浓度也逐渐增大。胞苷酸达到一定质量浓度时会分解成尿苷和尿嘧啶等^[9],导致胞苷酸转化率下降。综合考虑转化率、产量及转化液中剩余胞苷酸质量浓度三个因素,胞苷酸加入量为 17.5 g/L 比较适宜。

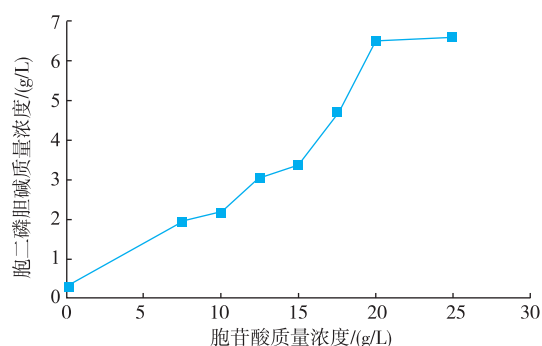


图 1 胞苷酸加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 1 Influence of added amount of CMP on the yield of CDP-C

2.1.2 磷酸胆碱钙加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图 2 可以看出,在胞苷酸及其他条件一定时,随着磷酸胆碱钙质量浓度的增大,胞二磷胆碱质量浓度先增加,后减少。当磷酸胆碱质量浓度为 12.5 g/L 时,胞二磷胆碱质量浓度达到最高。

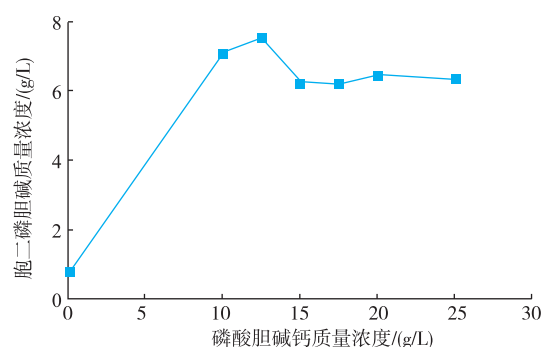


图 2 磷酸胆碱钙加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 2 Influence of added amount of choline calciumphosphate on the yield of CDP-C

2.1.3 葡萄糖初始加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图 3 可知,在胞苷酸及其他条件一定时,初始葡萄糖质量浓度并不是越高越好,相反,在初始葡萄糖质量浓度较低时,产量反而相对较高。当初始葡萄糖加入量为 50 g/L 时,产量最高。

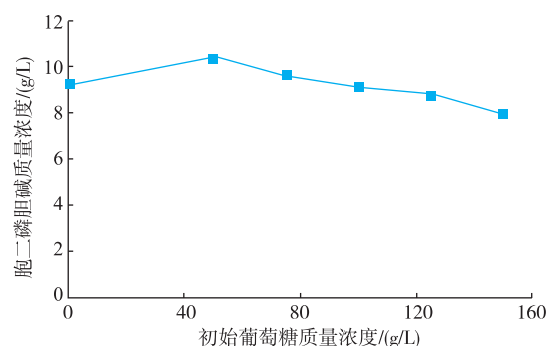


图 3 葡萄糖初始加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 3 Influence of added amount of glucose on the yield of CDP-C

2.1.4 磷酸氢二钾加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图 4 可以看出,在胞苷酸及其他条件一定时,随着磷酸氢二钾质量浓度的增大,胞二磷胆碱产量也呈递增趋势。当磷酸氢二钾质量浓度为 12.5 g/L 时,胞二磷胆碱质量浓度可达 11.592 g/L。考虑后续分离过程不宜引入过多盐,转化液中磷酸氢二钾质量浓度以 12.5 g/L 为宜。

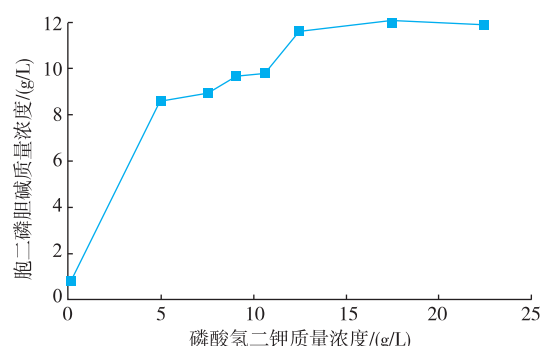


图 4 磷酸氢二钾加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 4 Influence of added amount of dipotassium phosphate on the yield of CDP-C

2.1.5 硫酸镁加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图 5 可以看出,在胞苷酸及其他条件一定时,随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度的增大,胞二磷胆碱产量变化不大。考虑后续分离不宜引入过多的盐,转化液中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度以 3.0 g/L 为宜。

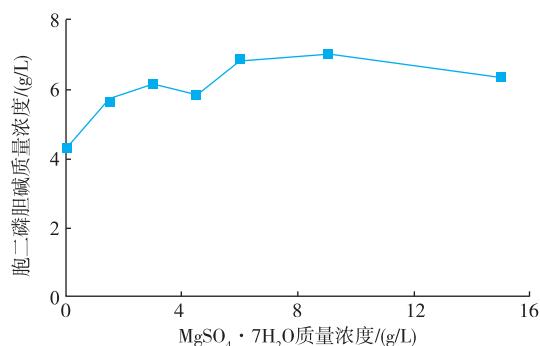
图5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 5 Influence of added amount of seven hydrated magnesium sulfate on the yield of CDP-C

2.1.6 硫酸锰加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图6可知,在胞苷酸及其他条件一定时,随着硫酸锰质量浓度的增大,胞二磷胆碱产量呈波动趋势。加入适量质量浓度的硫酸锰,胞二磷胆碱产量会有一定程度的提高,但影响不是很大。转化液中硫酸锰质量浓度以0.6 g/L为宜。

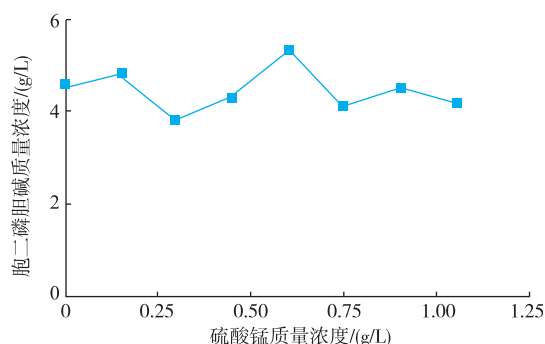


图6 硫酸锰加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 6 Influence of added amount of manganese sulfate on the yield of CDP-C

2.1.7 酵母泥加入量对胞二磷胆碱产量的影响

由图7可知,在胞苷酸及其他条件一定时,随着酵母泥加入量的增大,胞二磷胆碱产量先增大,后减小。加入适量的酵母泥,胞二磷胆碱产量会有一定程度的提高,酵母泥加入量过多,胞二磷胆碱转化率反而会下降。转化液中酵母加入量以375 g/L为宜。

2.1.8 甲苯加入量对胞二磷胆碱产量的影响 甲苯可以破坏酵母细胞壁,使其胞内酶释放出来。由图8可以看出,在胞苷酸及其他条件一定时,随着甲苯加入量的增大,胞二磷胆碱产量先增大,后减小。加入适量的甲苯,胞二磷胆碱产量增高,甲苯加入量过多,胞二磷胆碱产量反而会下降。转化液中甲苯加入量以30 mL/L为宜。同时,不加甲苯时,转

化液中是没有产物的,证明胞二磷胆碱合成酶系确是胞内酶。

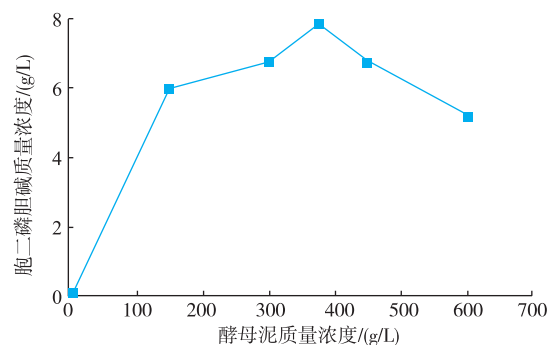


图7 酵母泥加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 7 Influence of added amount of yeast mud on the yield of CDP-C

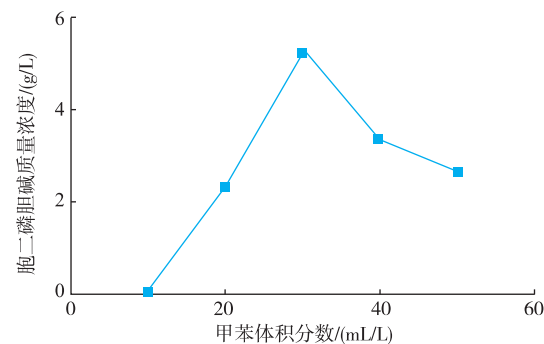


图8 甲苯加入量对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 8 Influence of added amount of toluene on the yield of CDP-C

2.1.9 转化液 pH 对胞二磷胆碱产量的影响 由图9可知,在以胞苷酸和磷酸胆碱钙为底物,其他条件一致的前提下,碱性环境更有利于胞二磷胆碱的合成,在pH为8.0或9.0时,胞二磷胆碱产量均可达到10 g/L以上。因用NaOH调pH,考虑尽可能少的引入杂质,选择转化液环境以pH 8.0为宜。

2.1.10 正交试验 通过以上单因素试验,胞苷酸、磷酸胆碱钙、酵母泥、pH值对胞二磷胆碱产量影响较大。针对这四个因素设计 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验,见表1。

由表2的正交试验结果可知,A、B、C、D四因素中对胞二磷胆碱产量影响最大的因素为A(胞苷酸质量浓度),其次为D(pH)值和C(酵母泥质量浓度),B(磷酸胆碱钙质量浓度)影响最小。分析结果表明, $A_3B_2C_1D_3$ 为最佳组合,即胞苷酸22.5 g/L,磷酸胆碱钙12.5 g/L,酵母泥300 g/L,pH为9.0时最适合东方伊萨酵母生物转化法制备胞二磷胆碱。

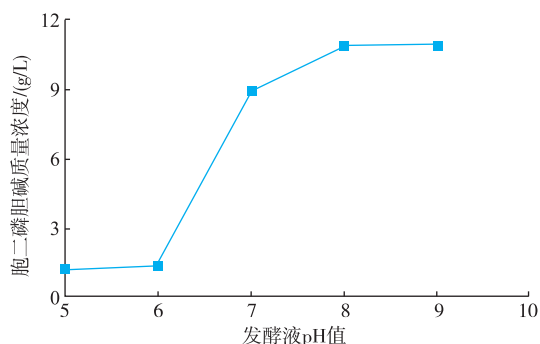


图9 转化液 pH 对胞二磷胆碱产量的影响

Fig. 9 Influence of added amount of convert liquid pH on the yield of CDP-C

表1 正交设计的试验因素和水平

Table 1 Test factors and levels of orthogonal design

水平	因素			
	A (胞苷酸 g/L)	B (磷酸胆碱钙 g/L)	C (酵母泥 g/L)	D (pH 值)
1	12.5	10.0	300	7.0
2	17.5	12.5	375	8.0
3	22.5	15.0	450	9.0

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

序号	因素				组合	产物质量浓度/(g/L)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	$A_1B_1C_1D_1$	4.515
2	1	2	2	2	$A_1B_2C_2D_2$	5.173
3	1	3	3	3	$A_1B_3C_3D_3$	5.132
4	2	1	2	3	$A_2B_1C_2D_3$	7.732
5	2	2	3	1	$A_2B_2C_3D_1$	4.847
6	2	3	1	2	$A_2B_3C_1D_2$	7.794
7	3	1	3	2	$A_3B_1C_3D_2$	7.747
8	3	2	1	3	$A_3B_2C_1D_3$	10.183
9	3	3	2	1	$A_3B_3C_2D_1$	6.948
k_1	14.820	19.994	22.492	16.310	—	—
k_2	20.373	20.203	19.853	20.714	—	—
k_3	24.878	19.874	17.726	23.047	—	—
K1	4.94	6.665	7.497	5.437	—	—
K2	6.791	6.734	6.618	6.905	—	—
K3	8.293	6.625	5.909	7.682	—	—
R	3.353	0.109	1.588	2.245	—	—

2.2 胞二磷胆碱的分离

胞二磷胆碱的分离主要采用离子交换树脂。70年代,将待分离样品分别通过 717×8 Cl-型阴离子交

换树脂柱、766 型活性炭柱、717×4 Cl-型阴离子交换树脂柱,再将洗脱液经丙酮、乙醇反复沉淀得到纯化的胞二磷胆碱^[10]。华东化工学院黄颖等^[11]通过 DH 846 离子交换树脂分离发酵液中的胞二磷胆碱。张剑等^[12]通过碳柱、大孔离子交换树脂柱进行浓缩、分离,再通过脱色、结晶进行精制。邱蔚然等^[13]用离子交换树脂组合层析法,通过 3 个离子交换层析柱分离 CDP-C 并回收未反应完全的胞苷酸。这些方法都要经过两种以上的柱子组合实现胞二磷胆碱的分离纯化。作者通过一种 717 树脂和不同质量浓度的洗脱液实现胞二磷胆碱的分离以及胞苷酸的回收,简化分离过程。

2.2.1 树脂静态吸附结果比较 作者对 717、D301 两种阴离子树脂的 OH-型、Cl-型、HCO₃-型,732 阳离子交换树脂的 H⁺型、Na⁺以及 DA201-B、DA201-D II、XDA 三种大孔树脂静态吸附胞二磷胆碱效果进行了比较,结果见图 10。

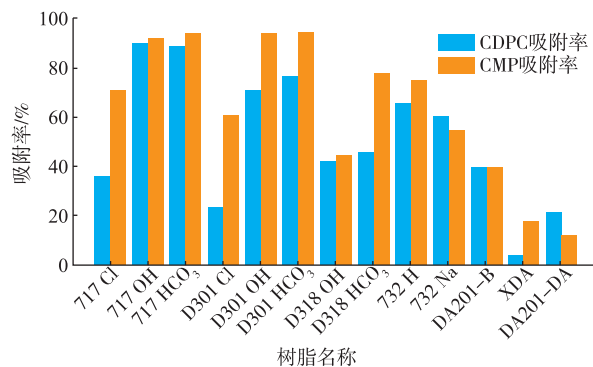


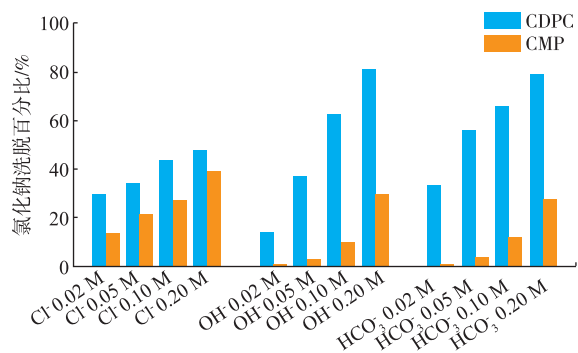
图10 各型号树脂静态吸附结果比较

Fig. 10 Resin static adsorption results of various sizes

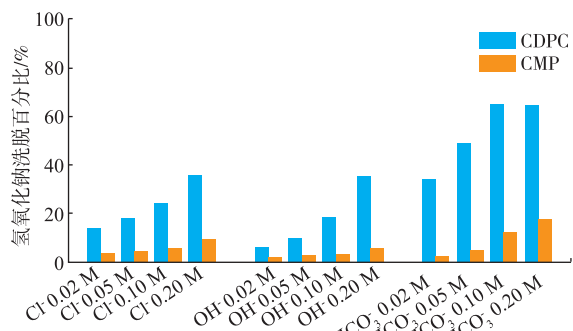
5 种树脂对胞二磷胆碱和 5'-胞苷酸都有一定的吸附能力,离子交换树脂吸附能力明显比大孔树脂吸附能力强;阴离子交换树脂 717、D301 的吸附能力又优于阴离子交换树脂 D318 和阳离子交换树脂 732。因此以 717、D301 两种阴离子交换树脂进行洗脱实验。

2.2.2 不同洗脱液洗脱效果比较 由于 NaCl、HCl、NaOH、NH₄HCO₃ 这 4 种溶液对后面的分离纯化影响相对较小,因此我们用这 4 种溶液进行洗脱实验,这 4 种溶液的洗脱效果分别代表钠盐、铵盐、酸、碱的洗脱效果。胞二磷胆碱和 5'-胞苷酸的离子强度不同,因此树脂的结合能力有所不同。用不同

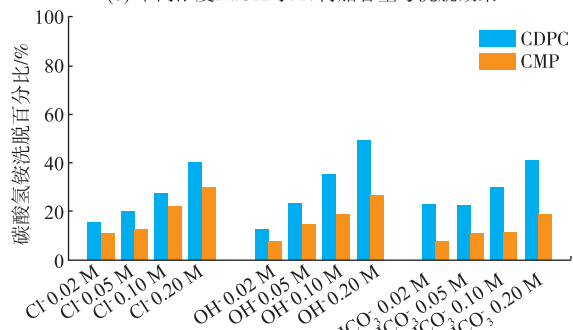
浓度的 NaCl、HCl、NaOH、 NH_4HCO_3 溶液进行洗脱,以期达到分离的效果,结果见图 11、12。



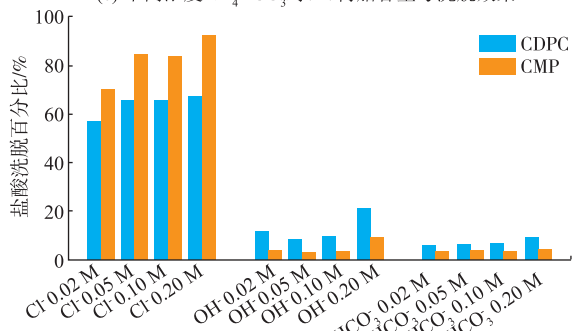
(a) 不同浓度NaCl对717树脂各型号洗脱效果



(b) 不同浓度NaOH对717树脂各型号洗脱效果



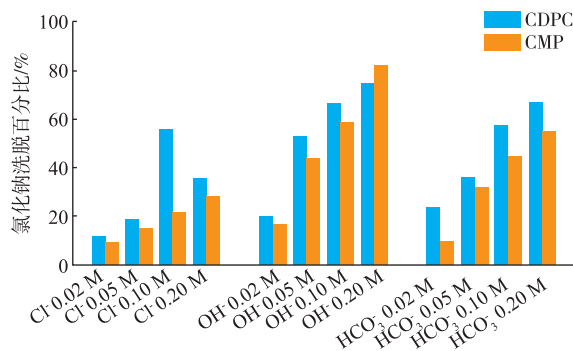
(c) 不同浓度 NH_4HCO_3 对717树脂各型号洗脱效果



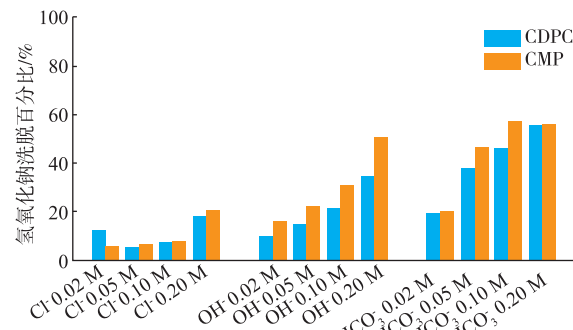
(d) 不同浓度HCl对717树脂各型号洗脱效果

图 11 不同洗脱液对 717 树脂各型号洗脱效果比较

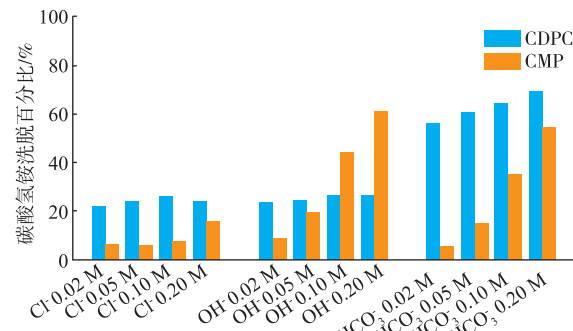
Fig. 11 Comparison of different eluent on 717 resin elution effect



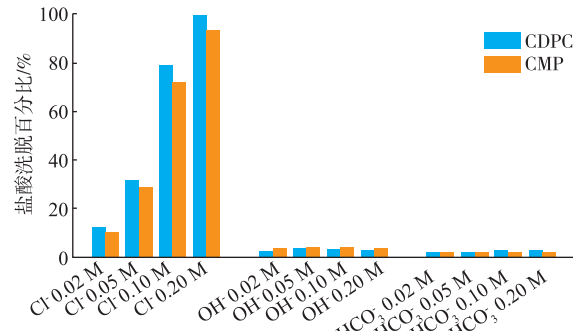
(a) 不同浓度NaCl对D301树脂各型号洗脱效果



(b) 不同浓度NaOH对D301树脂各型号洗脱效果



(c) 不同浓度 NH_4HCO_3 对D301树脂各型号洗脱效果



(d) 不同浓度HCl对D301树脂各型号洗脱效果

图 12 不同洗脱液对 D301 树脂各型号洗脱效果比较

Fig. 12 Comparison of different eluent on D301 resin elution effect

由图 11、12 可以看出, 不同浓度 NaCl、HCl、NaOH、 NH_4HCO_3 溶液对胞二磷胆碱和 5'-胞苷酸的洗脱效果不同。717 阴离子交换树脂的 OH⁻型和

HCO₃⁻型在以 NaCl、NaOH 溶液洗脱时,可以使胞二磷胆碱和 5'-胞苷酸达到一定程度的分离。综合考虑洗脱率与胞苷酸含量尽量少等因素,HCO₃⁻型 717 阴离子交换树脂,在以 0.05 mol/L NaCl 洗脱胞二磷胆碱时,洗脱率可以达到 60%,而胞苷酸质量浓度可以忽略不计。

2.2.3 装柱实验 由以上实验结果,进行预装柱实验。柱体积 60 mL,上样量 5 mL,样品质量浓度 3 g/L,然后以 0.05 mol/L NaCl 洗脱,收集洗脱液,并用紫外分光光度计测紫外吸光度,得到紫外吸收曲线,见图 13。

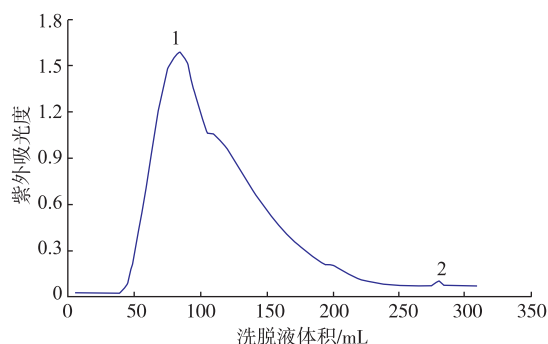


图 13 0.05 mol/L NaCl 洗脱曲线

Fig. 13 Elution curves of 0.05 mol/L NaCl

将图 13 中 1 和 2 两个峰处的收集液分别混合,进行 HPLC 测样,结果见图 14。

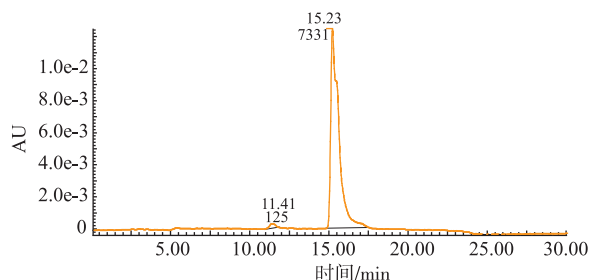


图 14 0.05 mol/L NaCl 洗脱曲线峰 1 的 HPLC 图谱

Fig. 14 Peak 1 HPLC of the eluting curve of 0.05 mol/L NaCl

图 13 峰 1 的 HPLC 图谱显示,目标物胞二磷胆碱的纯度可达到 98%以上。对洗脱收集液进行浓缩结晶等处理,得到纯品。

3 结语

通过单因素试验确定了东方伊萨酵母生物转化法制备胞二磷胆碱的最优单因素条件为胞苷酸 17.5 g/L,磷酸胆碱钙 12.5 g/L,磷酸氢二钾 12.5 g/L,硫酸镁 3.0 g/L,硫酸锰 0.6 g/L,葡萄糖 50 g/L,甲苯 30 mL/L,酵母泥 375 g/L,转化液 pH 为 8.0。通过正交试验,对影响胞二磷胆碱产量较大的 4 个因素胞苷酸、磷酸胆碱钙、酵母泥、pH 值进一步优化,最适条件为胞苷酸 22.5 g/L,磷酸胆碱钙 12.5 g/L,酵母泥 300 g/L,pH 为 9.0,CDP-C 产量可达 10 g/L 以上,最高可达 11.592 g/L。余冬升、邱蔚然等^[14]复合载体固定化酵母生物合成胞二磷胆碱最高只有 5.987 μmol/mL,即 2.928 g/L;顾复昌等^[15]胞二磷胆碱的生产中,利用啤酒酵母泥生产胞二磷胆碱转化率 70%~80%,即产量在 8.4~9.6 g/L。考虑胞苷酸利用率等因素,可适当调整各单因素。

东方伊萨酵母生长快,培养周期短。相较于化学方法^[6],东方伊萨酵母全细胞制备胞二磷胆碱,工艺简单,成本低,对环境污染少。以 717 离子交换树脂的 HCO₃⁻型一次吸附转化液,然后用 0.05 mol/L NaCl 洗脱,可得到纯度 98%以上的胞二磷胆碱,对洗脱收集液浓缩结晶,获得纯品。然后再用 0.2 mol/L NaCl 洗脱,可回收未利用的胞苷酸。

参考文献:

- [1] Roe J H, Papadopoulos N M. The determination of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1954, 210(2): 703-707.
- [2] Kennedy E P, Weiss S B. Cytidine diphosphate choline; a new intermediate in lecithin biosynthesis [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1955, 77(1): 250-251.
- [3] Rossiter R I, McLeod I M, Strickland K P. Biosynthesis of lecithin in brain and degenerating nerve participation of cytidine diphosphate choline [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1957, 35(11): 945-951.
- [4] 李良铸,李明晔. 最新生化药物制备技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:251-252.

- [5] 王永智,尉亚辉,聂利芳. 胞磷胆碱生物合成与化学合成的比较与展望[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(3): 235-236.
WANG Yongzhi, WEI Yahui, NIE Lifang. Comparison of chemistry complete synthesis and biosynthesis of citichaline sodium[J]. **Northwest Pharmaceutical Journal**, 2009, 24(3): 235-236. (in Chinese)
- [6] 牛红星,邱蔚然,丁庆豹. 用固定化啤酒酵母细胞合成胞嘧啶核苷二磷酸胆碱[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(8): 372-375.
NIU Hongxing, QIU Weiran, DING Qingbao. Biosynthesis of CDP-choline by Immobilized beer yeast cell[J]. **Journal of East China University of Science and Technology**, 2002, 28(8): 372-375. (in Chinese)
- [7] 王亮. 肝源性磷脂酰胆碱的分离纯化及其生物学功能的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2007.
- [8] 张梁,石贵阳,尤翠萍,等. 一株东方伊萨酵母及其全细胞转化产胞二磷胆碱的方法[P]. 中国专利: CN102286386 A, 2011-12-21.
- [9] Akamura Kimura, Makoto Morita, Mosaku Murata, Phosphorylation of CMP by the released CMP kinase system from a yeast: *Saccharomyces carlsbergensis*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1975, 39(3): 621.
- [10] 胡兆庆,王建业,朱邦宰,等. 一种简易分离胞二磷胆碱的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1975(4): 18-24.
HU Zhaoqing, WANG Jianye, ZHU Bangzai, et al. A Simple separation method of CDP-choline [J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 1975(4): 18-24. (in Chinese)
- [11] 黄颖,邱蔚然,孙翠萍,等. 发酵液中提取胞苷二磷酸胆碱的工艺改进[J]. 中国医药工业杂志, 1985(1): 3-5.
HUANG Ying, QIU Weiran, SUN Cuiping, et al. Improved process of purification of CDP-choline [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 1985(1): 3-5. (in Chinese)
- [12] 张剑. 胞二磷胆碱生产工艺[P]. 中国专利: CN101130797A, 2008-02-27.
- [13] 邱蔚然,闫蓬勃,丁庆豹. 一种从生物转化或多酶反应液中分离纯化胞二磷胆碱的方法[P]. 中国专利: CN101096380 A, 2008-01-02.
- [14] 余冬生,邱蔚然,张灏. 复合载体固定化酵母生物合成胞二磷酸胆碱[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(3): 277-280.
YU Dongsheng, QIU Weiran, ZHANG Hao. Biosynthesis of CDPC by mixed supports immobilized yeasts [J]. **Journal of WuXi University of Light Industry**, 2002, 21(3): 277-280. (in Chinese)
- [15] 顾复昌,杨亮懿. 胞二磷胆碱的生产[J]. 发酵科技通讯, 2007, 36(1): 9-11.
GU Fuchang, YANG Liangyi. The production of CDP-choline [J]. **Bulletin of Fermentation Science and Technology**, 2007, 36(1): 9-11. (in Chinese)

科技信息

英国公布民众食品消费行为、态度与常识调查报告

据英国食品标准局(FSA)消息,12月16日英国当局公布了英格兰、苏格兰、威尔士、北爱尔兰地区民众食品消费行为、态度与常识的调查报告。

该调查报告每两年发布一次。其中2014年英格兰地区的情况如下:总体上,第三轮约53%的受访者称,在过去的半年里,至少有一次出于经济原因更改过购买或者食用的计划,而第二轮的比例为62%。约有一半的受访者称,从未检查过冰箱的温度。

[信息来源]食品伙伴网. 英国公布民众食品消费行为、态度与常识调查报告[EB/OL]. (2014-12-17). <http://news.foodmate.net/2014/12/288506.html>.