

文章编号 :1009-038X(2002)03-0277-04

复合载体固定化酵母生物合成胞二磷酸胆碱

余冬生¹, 邱蔚然², 张 灏³

(1. 安徽机电学院 生化工程系,安徽 芜湖 241000;2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237;3. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要:研究了复合载体固定酵母的条件,通过正交实验确定了 K-卡拉胶,魔芋多糖和去离子水用量. 用扫描电子显微镜观察了固定化酵母冷冻前后的形态变化,固定化酵母多次使用后,其生物合成胞二磷酸胆碱(CDPC)的活性仍较高.

关键词:胞二磷酸胆碱;固定化酵母;正交实验

中图分类号:TS 261.11

文献标识码:A

Biosynthesis of CDPC by Mixed Supports Immobilized Yeasts

YU Dong-sheng¹, QIU Wei-ran², ZHANG Hao³

(1. Department of Biotechnology Engineering, Anhui Institute of Mechanical & Electrical Engineering, Wuhu 241000, China;2. Chemical Engineering Research Center ECUST, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;3. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The conditions of entrapping yeasts by mixed supports, k-carrageenan and konjac glucomannan were studied. Through orthogonal experiments, the amount of k-carrageenan, konjac glucomannan and deionized water were determined. The shape of immobilized yeasts was observed by scanning electron microscope, which was different between immobilized yeasts and frozen immobilized yeasts. High activity of immobilized yeasts was shown after they were used several times for biosynthesis of CDPC.

Key words: CDPC; immobilized yeasts; orthogonal experiment

胞二磷酸胆碱(CDPC)是一种重要的核酸药物,能调节脑血管运动张力,改善大脑代谢功能. CDPC作用的靶器官是肝脏和脑组织,临床用以治疗颅脑外伤及颅脑术后昏迷、帕金森氏综合症、迟发性运动障碍、神经性耳聋和耳鸣、脑血管疾病以及小脑与脊髓共济失调. CDPC合成从20世纪50年代以来有着曲折的发展过程,早在1956年 Eugene P Kennedy 就报道了化学合成 CDPC^[1];1971年 Kiyomi Kikugawa、Motonobu Ichino 和 Takeshi

Kawashima 利用 Vilsmeier-Haack Reaction 化学合成 CDPC^[2]并且分离出 CDPC. 化学合成 CDPC 有其缺点,难与缩合剂分离,产品不适合药用. Eugene P Kennedy 和 Louise Fencil Borkenhagen 等人^[3]利用大白鼠及豚鼠肝磷酸胆碱胞苷酸转换酶(EC. 2. 7. 7. 15)使 CTP 和磷酸胆碱作用生成胞二磷酸胆碱;1977年 Ian R Poxton 和 David J Leak 抽提 *Streptococcus pneumoniae* 细胞液,用 CTP 和磷酸胆碱生物合成 CDPC^[4];酶和细胞抽提液合成 CDPC

收稿日期 2001-11-05; 修订日期 2002-01-06.

作者简介:余冬生(1962-),男,安徽芜湖人,工学硕士,讲师.

万方数据

需要底物 CTP,合成 CDPC 成本高.1959 年 Yukio Sugino 粉碎海胆蛋(Sea urchin eggs)后,抽提液调酸,通过两次离子交换柱分离得到 CDPC 和脱氧 CDPC^[5];由于海胆蛋资源有限,故此法不能成为 CDPC 的工业生产方法.1970 年 Hakko Kogaku Ias-sihi 杂志报道了啤酒厂废酵母作为生物催化剂生物合成 CDPC;1975 年 Shoji Shirota、Shiro Watanabet 和 Isao Takeda 研究酵母生物合成 CDPC 及其生物合成 CDPC 的影响因素以及分离过程^[6].游离酵母生物合成 CDPC 反应液粘稠,吸附 CDPC 不宜分离,只能一次使用,有很多的缺点.1979 年 Yutaka Ado、Yukie Suzuki、Toshio Tadokoro 等^[7]用乙基纤维素制微囊固定化酵母连续生物合成 CDPC;1978 ~ 1981 年 Akira kimurat、Yoshinori Tatsutomi 等研究固定化酵母生物合成 CDPC,他们把酵母固定在一个光联树脂上^[8,9].1992 年邱蔚然等其它研究人员用 K-卡拉胶固定啤酒厂酵母,实现连续生物合成 CDPC^[10].单一载体固定化酵母生物合成 CDPC 有其局限性,胡永红、欧阳平凯等人用 K-卡拉胶混合凝胶固定延胡索酸酶生产 L-苹果酸^[11],Isao Takata 等人用复合 K-卡拉胶固定 Fumarase 酶^[12].作者研究复合载体固定啤酒厂酵母生物合成 CDPC,通过正交试验研究了 K-卡拉胶和魔芋多糖固定化酵母生物合成 CDPC 的条件,并通过扫描电子显微镜观察了固定化酵母的形态.

1 材料与方法

1.1 材料

磷酸胆碱,广东省肇庆市化工研究所提供;胞苷酸,广东江门甘化厂提供;K-卡拉胶,众伟生化公司提供;魔芋多糖,无锡生物制品厂产品.

1.2 实验方法

1.2.1 固定酵母 称取一定量 K-卡拉胶和魔芋多糖置于一烧杯,加入去离子水,将烧杯置于 40 ℃ 水浴锅中不断加热,形成胶体溶液.在 35 ℃ 保温一段时间,加入一定量酵母和胶体溶液混合,倒入另一烧杯,加 0.3 mol/L 的 KCl 溶液,在 0 ℃ 放置数小时后再切块.

1.2.2 扫描电子显微镜样品制备 将冷冻前和冷冻后固定化酵母切成长、宽、高分别为 2 mm 的小块,放入表面皿,置于干燥器干燥 2 d,在真空条件下喷金,用电子显微镜扫描观察.

1.2.3 固定化酵母酶活测定 固定化酵母在 -20 ℃ 冷冻 4 h 后,称取 10 g 固定化酵母放入 50 mL 的三角瓶中,再加入 pH 8.0 的磷酸钠缓冲液

10 mL,加入 300 μmol/mL 的葡萄糖、50 μmol/mL 的磷酸胆碱、10 μmol/mL 的胞苷酸、10 μmol/mL 的 MgSO₄·7H₂O,振荡三角瓶使溶液混合溶解,再放入 35 ℃ 恒温振荡培养箱中,振动频率为 100 r/min,反应 8 h 后,采用琼脂糖电泳紫外分光光度法测定反应液中 CDPC 的含量^[13].

2 结果与讨论

2.1 固定酵母正交试验方案和结果

固定化酵母生物合成 CDPC 除受底物和反应条件的影响外,更要受固定化酵母本身质量的影响.酵母、K-卡拉胶、魔芋多糖和去离子水的用量都影响固定化酵母的质量.生物合成 CDPC 的酵母的用量,直接影响反应底物和 CDPC 在固定化酵母中的传递.K-卡拉胶和魔芋多糖形成三维网络结构,酵母固定在三维网络中,K-卡拉胶和魔芋多糖的用量影响网络结构的强度.去离子水用量决定了固定化酵母的半固体胶体性质,影响物质的传递速度.固定酵母的正交试验因素和水平见表 1,正交结果见表 2.

表 1 正交试验因素和水平

Tab.1 The factors and levels for the L₉3⁴ orthogonal experiment

水平	因 素			
	(A) K-卡拉胶质量/g	(B) 魔芋多糖质量/g	(C) 酵母质量/g	(D) 去离子水体积/mL
1	6	0.5	90	90
2	7	1.0	100	100
3	8	1.5	110	110

表 2 CDPC 生物合成能力的正交试验结果

Tab.2 The values of the CDPC biosynthesizing ability from the L₉3⁴ orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	CDPC 浓度/(μmol/mL)
1	6	0.5	90	90	3.508
2	6	1.0	100	100	3.114
3	6	1.5	110	110	5.031
4	7	0.5	100	110	5.800
5	7	1.0	110	90	3.440
6	7	1.5	90	100	5.920

续表 2

试验号	A	B	C	D	CDPC 浓度/ ($\mu\text{mol/mL}$)
7	8	0.5	110	100	3.150
8	8	1.0	90	110	5.968
9	8	1.5	100	90	4.499
K_1	11.653	12.458	15.396	11.447	
K_2	15.160	12.522	13.413	12.184	
K_3	13.617	15.450	11.629	16.799	
K_1	3.884	4.153	5.132	3.816	
K_2	5.053	4.174	4.471	4.061	
K_3	4.539	5.150	3.874	5.600	
R	1.169	0.997	1.258	1.784	

从表 2 可知正交试验固定化酵母生物合成 CDPC 量的大小,通过 R 值的大小可确定固定酵母因素的重要性,依次为 :去离子水、酵母、K-卡拉胶、魔芋多糖.固定酵母的最佳条件 :去离子水用量 110 mL,K-卡拉胶用量 7 g,魔芋多糖用量 1.5 g,酵母用量 90 g.在此最佳条件下,固定化酵母在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 4 h,测得其 CDPC 生物合成量为 $5.987\text{ }\mu\text{mol/mL}$.

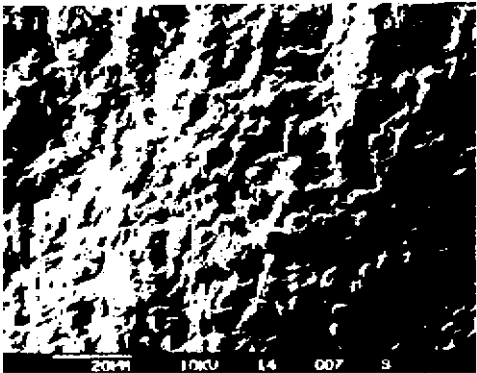
2.2 扫描电子显微镜观察固定化酵母

冷冻固定化酵母的 CDPC 生物合成量高于未冷冻固定化酵母的 CDPC 生物合成量.固定化酵母在低温下冷冻,酵母细胞中水分和酵母细胞周围水分均形成微晶体,微晶体破坏细胞壁.反应物和生成物易于进入细胞和运出细胞,因此冷冻固定化酵母的 CDPC 生物合成量增加.冷冻前和冷冻后固定化酵母细胞壁结构发生了变化,采用扫描电子显微镜观察、拍照,结果如图 1 和图 2 所示.

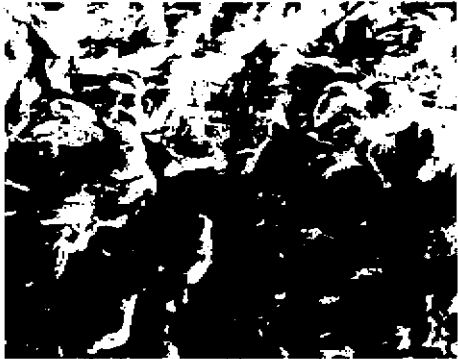
从图 1 可知,3 000 倍扫描电子显微镜照片和 5 000倍扫描电子显微镜照片均显示固定化酵母形态完整.从图 2 可知,3 000倍扫描电子显微镜照片和5 000倍扫描电子显微镜照片均显示固定化酵母冷冻后冰晶破坏细胞壁使胞液外流,酵母形态凹陷.从5 000倍扫描电子显微镜照片可见粗大的 K-卡拉胶和魔芋多糖的网络状结构.

2.3 固定化酵母多次使用后 CDPC 的生物合成量

游离酵母生物合成 CDPC,存在酵母胞液 CDPC 合成酶和易与酶相分离的辅酶从酵母细胞流入清液的情况,离心游离酵母不能二次使用.而固定化酵母胶体网络限制扩散,能够多次使用.多次使用后固定化酵母生物合成 CDPC 的能力见表 3.



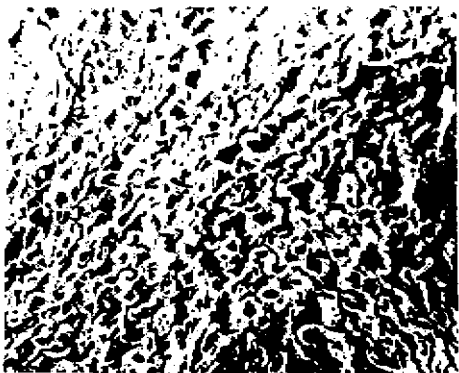
3 000 倍扫描电子显微镜照片



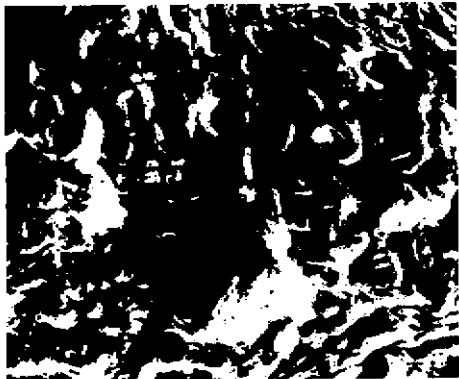
5 000 倍扫描电子显微镜照片

图 1 冷冻前固定化酵母扫描电子显微镜照片

Fig.1 SEM pictures of immobilized yeasts



3 000 倍扫描电子显微镜照片



5 000 倍扫描电子显微镜照片

图 2 冷冻后固定化酵母扫描电子显微镜照片

Fig.2 SEM pictures of frozen immobilized yeasts

表 3 多次使用后固定化酵母生物合成 CDPC 的能力

Tab.3 The ability of immobilized yeasts in biosynthesizing CDPC after using several times

次数	CDPC 浓度/($\mu\text{mol/mL}$)
1	5.899
2	5.161
3	4.669
4	3.631
5	2.986

由表 3 可知,经多次使用后,固定化酵母产 CD-PC 的合成量有一定降低.原因是:小分子辅酶或者激酶扩散到清液,酵母中酶的氧化活性中心失活;酵母泄露到清液等.固定化酵母使用 3 次仍能保持较高的 CDPC 生物合成能力.每次重新使用应该用 KCl 溶液洗涤,避免微生物污染.

3 结 语

酵母、K-卡拉胶、魔芋多糖和去离子水的用量都影响固定化酵母质量,影响固定化酵母生物合成 CDPC 的能力.固定酵母的 3 因素 4 水平正交试验结果表明,固定酵母的最佳条件是:去离子水用量 110 mL,K-卡拉胶用量 7 g,魔芋多糖用量 1.5 g,酵母用量 90 g.最佳条件固定的酵母在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 4 h,测定其 CDPC 生物合成量为 $5.987\text{ }\mu\text{mol/mL}$.以扫描电子显微镜观察了冷冻前和冷冻后固定化酵母的形态,结果表明冷冻前固定化酵母形态完整,而冷冻后固定化酵母形态凹陷.游离酵母生物合成 CDPC 存在合成酶和辅酶从酵母细胞流入清液的情况,离心游离酵母不能生物合成 CDPC.固定化酵母重新使用时用 KCl 溶液洗涤,避免微生物污染,3 次使用仍能保持较高的 CDPC 生物合成能力.

参考文献:

[1] EUGENE P K. The synthesis of cytidine diphoshate choline, cytidine diphosphate ethanolamine and related compounds[J]. *J Biol Chen*,1956,222 :185 – 191.

[2] KIYOMI KIKUGAWA, MOTONOBU ICHINO, TAKESHI KAWASHIMA. Studies on the vilsmeier-haack Reaction(Ⅲ), Synthesis of Cytidine Diphosphate Choline[J]. *Chem Pharm Bull*,1971,19(12) :2466 – 2471.

[3] LOUISE FENCIL BORKENHAGEN, EUGENE P KENNEDY. The enzymatic synthesis cytidine diphosphatecholine[J]. *Agr Biol Chen*,1957,227 :951 – 961.

[4] IAN R POXTON, DAVID J LEAK. The Biosynthesis of a choline Nucleotide by a cell-free extract from *Streptococcus Pneumoniae*[J]. *Journal of General Microbiogy*,1977,100 :23 – 29.

[5] YUKIO SUGINO. Studies on deoxynucleosidic compounds(Ⅱ),Deoxycytidine choline in sea urchin eggs[J]. *Biochim Biophys Acta*,1960,40 :425 – 434.

[6] SHOJI SHIROTA, SHIRO WATANABET, ISAO TAKEDA. Effects of pyrophosphate on formation of nucleotide derivatives [J]. *Agr Biol Chen*,1975,35(3) :1469 – 1474.

[7] YUTAKA ADO, YUKIE SURUKI, TOSHIO TADOKORO, *et al.* Regeneration of ATP by immobilized microbial cells and its utilization for the Synthesis of ATP and CDP-choline[J]. *Journal of Solid-Phase Biochemistry*,1979,4(1) :43 – 55.

[8] AKIRA KIMURA, YOSHINORI TATSUTOMI, NAOKI MIZUSHIMA, *et al.* Immobiliation of Glycolysis System of Yeasts and production of Cytidine Diphosphate Choline[J]. *European J Appl microbiol biotechnol*,1978,5 :13 – 16.

[9] AKIRA KIMURA, YOSHINORI TATSUTOMI. Some properties of an immobilized glycolysis system of yeasts in fermentative phosphorylation of nucleotides[J]. *European J Appl microbiol biotechnol*,1981,11 :78 – 80.

[10] 邱蔚然,徐茜,王永发,等.应用固定化细胞连续生产胞二磷胆碱的研究[J]. *中国生化药物杂志*,1992,62(4) :37 – 39.

[11] 胡永红,欧阳平凯,杨文革.卡拉胶混合凝胶固定延胡索酸酶生产 L-苹果酸[J]. *生物工程学报*,1995,11(4) :396 – 398.

[12] ISAO TAKATA, KEIKO KAYASHIMA, TETSSUYA, *et al.* Improvement of Stability of fumarase activity of *brevibacterium flavum* by immobilization with k-carrageenan and polyethyleneimine[J]. *J Fermem Technol*,1982,60(5) :431 – 437.

[13] 邱蔚然,王维育.胞二磷胆碱的简易快速测定方法[J]. *医药工业*,1985,16(2) :16 – 17.

(责任编辑 杨 萌,朱 明)