

恢复高达 50 倍,重复性好,但仍然不表现 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力。脱氧胆酸-胆酸法操作繁琐,提取的酶复合体不仅水解活力在加入磷脂后无明显增加,更无 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力。从三种去垢剂 (TritonX100, 脱氧胆酸,胆酸)对亚线粒体 $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ 交换活力影响的比较实验(未发表资料)来看,脱氧胆酸对活力的影响较大。所以用 Hatefi 的方法从猪心线粒体中提取 H^+ -ATP 酶复合体是很困难的。

本工作得到生物物理所三室线粒体膜研究小组同志们的帮助,酶蛋白分离过程中的超速离心方面得到梁洪光同志的帮助。郭学弟同志也参加了猪心线粒体的制备等方面的工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Berden, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **501**, 424, 1978.
- [2] Hatefi, et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 956, 1978.
- [3] 杨福愉等,《生物化学与生物物理学报》,1980 年,12 卷,193 页。
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [5] Serrano, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2454, 1976.
- [6] Conner, T. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2831, 1963.

[本文于1982年6月9日收到]

由氯化胆碱和 CMP 发酵合成 CDP-胆碱

王世绪 高才昌 刘铁英 吕织云

(天津工业微生物研究所)

1955 年 Kennedy 等发现 CDP-胆碱是磷脂代谢中起重要作用的辅酶^[1]。1963 年用于临床,证明对恢复脑损伤引起的意识障碍及其它神经系统疾患有明显的疗效^[2]。

CDP-胆碱可用化学合成和酶促合成的方法制备。1970 年 Tochikura 等报道了用风干酵母由磷酸胆碱和 CMP 发酵合成 CDP 胆碱的方法^[3]。侯立向等用啤酒酵母泥代替风干酵母得到较好的收率^[4]。1972 年 Tochikura 等又报道采用胆碱激酶活力高的菌株 *Hansenula jadinii* IFO 0987 的风干菌体由氯化胆碱和 CMP 合成 CDP-胆碱^[5]。

本文报道以氯化胆碱和 CMP 为原料,用啤酒酵母泥直接合成 CDP-胆碱的反应条件。

一、材料与方法

1. 啤酒酵母泥 由天津啤酒厂提供。使用时用蒸馏水洗涤二次,3000 转/分离心 20 分钟,收集菌体。

2. 试剂 CMP 由天津啤酒厂提供,纯度为 98%。其它试剂均为市售商品。

3. CDP-胆碱相对转化率的测定 CDP-胆碱含量的测定、CDP-胆碱的分离纯化参见文献[4]。

二、实验结果

1. 发酵条件

(1) 初 pH 的影响 选择发酵液的初 pH 分别为 6.0、6.4、6.5、6.7、7.2。结果见图 1。pH6.5 左右 CDP-胆碱的转化率最高。pH 偏低或偏高转化率都明显下降。因此在以后的实验中均取 pH6.5。

(2) 氯化胆碱和 CMP 浓度的影响 从图 2 可看出氯化胆碱浓度的增加其转化率也增加。但当氯化胆碱浓度达到 80 微克分子/毫升以后,转化率无明显增加。

CMP 浓度在 10 微克分子/毫升时,CDP-胆碱的转化率最高。随着 CMP 浓度的增加而

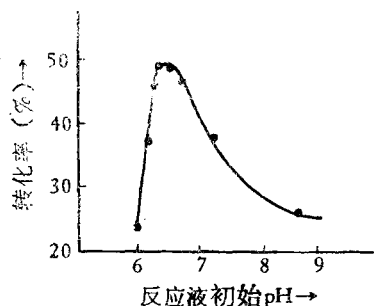


图1 初pH对CDP-胆碱合成的影响

发酵液组成: CMP20 微克分子/毫升, 氯化胆碱 80 微克分子/毫升, 葡萄糖 600 微克分子/毫升, 硫酸镁 50 微克分子/毫升, 磷酸二氢钾 300 微克分子/毫升, 酵母 0.5 克/毫升。用氢氧化钠调节 pH。

500 毫升三角瓶装 20 毫升发酵液, 于往复摇床 28—30℃ 保温培养 24 小时。

CDP-胆碱的转化率逐渐降低。如图 3 所示。从生产和经济效果考虑, 选择 CMP 浓度为 20 微克分子/毫升适宜。

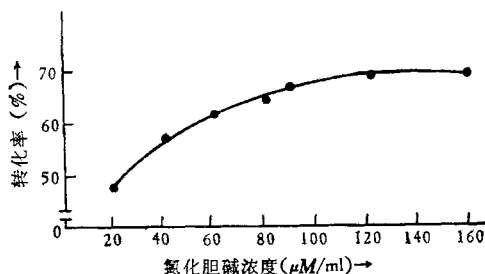


图2 氯化胆碱浓度对CDP-胆碱合成的影响

发酵液组成: 氯化胆碱浓度由 20 到 160 微克分子/毫升, 葡萄糖 800 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

(3) 葡萄糖浓度的影响 葡萄糖浓度在 1000 微克分子/毫升时, CDP-胆碱的转化率可

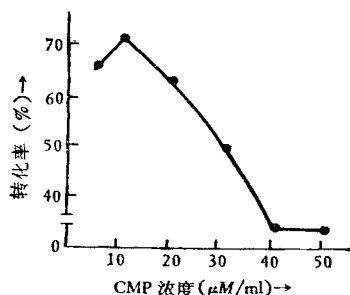


图3 CMP浓度对CDP-胆碱合成的影响

发酵液组成: CMP 浓度由 5 到 50 微克分子/毫升, 葡萄糖 800 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

达 80 % 左右, 当浓度低于 600 微克分子/毫升时, 转化率仅达 40 %; 当浓度增加到 1400 微克分子/毫升时, 转化率略有下降。如图 4 所示。

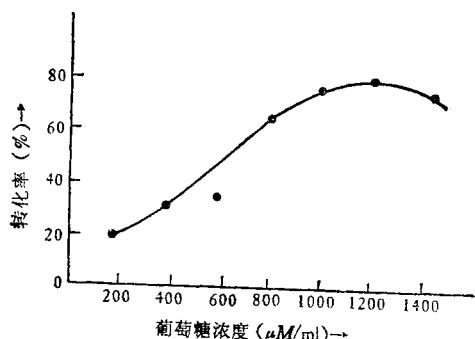


图4 葡萄糖浓度对CDP-胆碱合成的影响

发酵液组成: 葡萄糖浓度由 200 到 1400 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

(4) Mg^{++} 浓度的影响 结果如图 5 所示, 随着 Mg^{++} 浓度的增加转化率也增加。 Mg^{++} 浓度在 70—90 微克分子/毫升时, 转化率都比较高, 当浓度在 100 微克分子/毫升时, 转化率似略有下降。

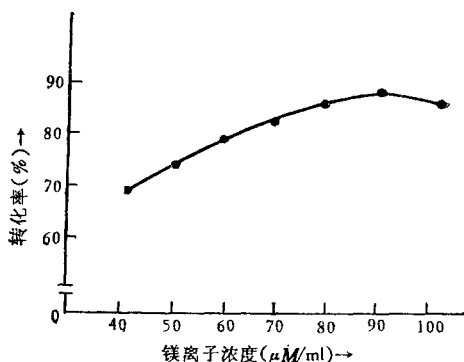


图5 Mg^{++} 浓度对CDP-胆碱合成的影响

发酵液组成: 氯化胆碱 120 微克分子/毫升, 葡萄糖 1000 微克分子/毫升, Mg^{++} 由 40 到 100 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

(5) 发酵时间与转化率之间的关系 在上述试验的基础上, 进行了发酵周期的试验, 见图 6。发酵到 17 小时转化率已达到最大, 再延长时间, 转化率没有明显提高。

通过以上实验, 选定了最适发酵条件, 见

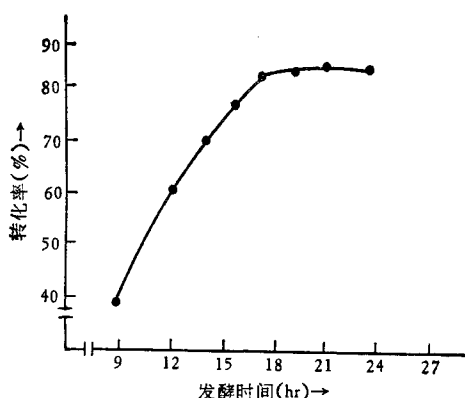


图6 发酵时间与转化率的关系

发酵液组成: 氯化胆碱 100 微克分子/毫升, 葡萄糖 1000 微克分子/毫升, 硫酸镁 100 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

表 1。转化率可达 80%，最高达 87%，总收得率为 40% 以上。现已扩大到 10 立升的规模。

表 1 CDP-胆碱发酵液组成

组 成 成 分	每毫升发酵液的含量
葡萄糖	1000微克分子
CMP	20微克分子
KH_2PO_4 -NaOH缓冲液 pH6.5	300微克分子
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	90微克分子
氯化胆碱	90微克分子
酵母泥	0.5克

(6) 氯化胆碱与磷酸胆碱的比较 用 90 微克分子/毫升氯化胆碱和 30 微克分子/毫升磷酸胆碱作底物, 比较其对 CDP-胆碱转化率的

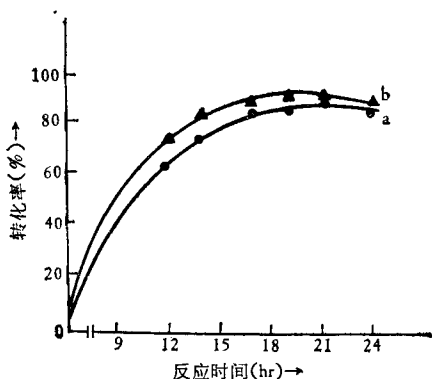


图7 氯化胆碱与磷酸胆碱的比较

发酵液组成: a. 氯化胆碱 90 微克分子/毫升, b. 磷酸胆碱 30 微克分子/毫升, 其它条件同图 1。

影响, 见图 7。初期以磷酸胆碱为底物, 生成 CDP-胆碱较快。当 17—24 小时, 两者的转化率基本接近。

用 6、7、8、9 代酵母泥做试验, 转化率相近, 证明酵母的代数对转化率影响不大。

2. 成品鉴定

(1) 紫外吸收光谱 pH1.5 时最大吸收处波长为 280 毫微米, 最小吸收处波长为 241 毫微米。280 毫微米和 260 毫微米波长处的吸收比为 2.07, 250 毫微米和 260 毫微米波长处的吸收比为 0.49。pH4.8 及 pH9.1 时最大吸收处波长都为 271 毫微米(图 8)。以上数据基本符合文献值^[6]。

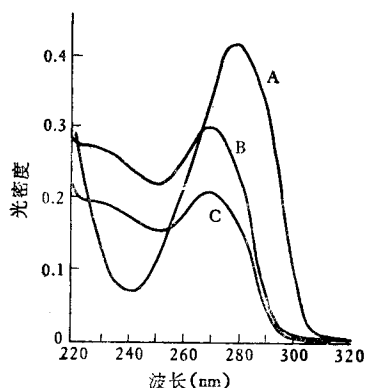


图8 紫外吸收光谱

A.pH1.5 B.pH4.8 C.pH9.1

(2) 红外吸收光谱 本品溴化钾压片的红外吸收光谱见图 9。与 CDP-胆碱钠盐的已知图谱一致^[7]。

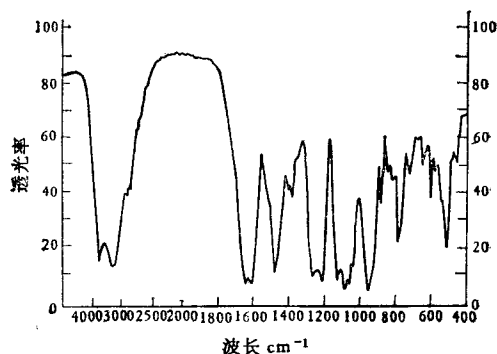


图9 红外吸收光谱

(4) 纸层析图 本品层析点与已知样品对照位置相同, 见图 11。

这样既节省了酵母的风干设备,又省去了先由氯化胆碱化学合成磷酸胆碱的工艺,因此原料来源方便,工艺简单,成本比较低。

荻谷泰弘等^[9]报道 *Hansenula jadinii* IFO 0987 生长期较长的老细胞, 由于胆碱激酶和 CDP-胆碱焦磷酸酶活力较低, CDP-胆碱产量显著下降。在 CMP 浓度高时, CMP 很快磷酸化成 CTP, 并证明 CTP 浓度高会抑制胆碱的磷酸化作用。如果采用流加 CMP 和葡萄糖的方法, 能促进 CDP-胆碱的合成, 最终亦能达到较好的产量。

本报道中氯化胆碱用量比较大,这可能与啤酒酵母中胆碱激酶的活力比较低有关。是否亦能通过流加 CMP 和葡萄糖的方法促进胆碱激酶的作用,以降低氯化胆碱的用量,这一问题有待进一步研究。

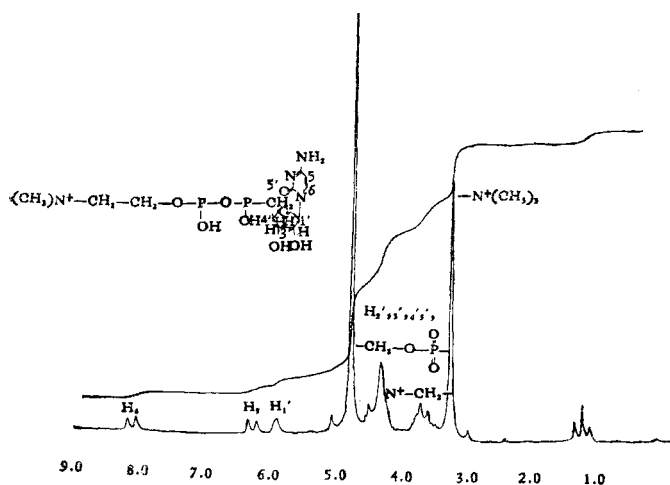


图 10 ^1H 核磁共振谱

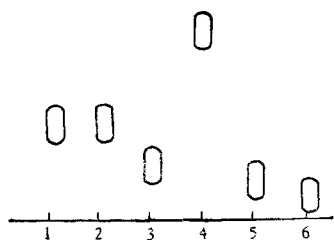


图 11 纸层析图谱

溶剂系统: 1M 醋酸铵: 95% 乙醇 = 1:2 1. 标准品 2. 本品 3. CMP 4. CR 5. CDP 6. CTP

三、讨论

虽然 Tochikura 等^[3]和侯立向等^[4]合成 CDP-胆碱都获得成功,但是反应的主要底物都采用磷酸胆碱。由氯化胆碱合成磷酸胆碱操作繁杂,收率亦不高。Tochikura 等以 *Hansenula jadinii* IFO 0987 的风干菌体由氯化胆碱和CMP

参考文献

- [1] Kennedy, E. P. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 250, 1955.
- [2] Shimamoto, K. et al.: *J. Tokeda. Res. Lab.*, **34**(2) 189, 1975.
- [3] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 763, 1970.
- [4] 侯立向等:《生物化学与生物物理进展》1979 年第五期第 40 页。
- [5] Tochikura, T. et al.:《讲演要旨集》,昭和 47 年度大会,日本农艺化学会, p22, 1972.
- [6] 矢敷孝司等:《武田研究所年报》(日) **26**, 44, 1967.
- [7] 荻谷泰弘等: *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. **33**, 4, 1976.
- [8] Tochikura, T. et al.: *ibid.* No. 25, 55, 1972.
- [9] 荻谷泰弘等: *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. 29, 75, 1974.

[本文于 1982 年 1 月 28 日收到]