

用细胞酶系转化法合成辅酶 A 的研究

程明哲 林 达 范培昌

(中山大学生物系生物化学教研室, 广州)

目前, 辅酶 A 的生产有提取法、化学合成法、微生物直接发酵生产法等, 均各有优缺点。1970 年 K. Ogata 等人采用的细胞酶系转化法合成辅酶 A 是又一种适合于工业生产的新方法^[1,2]。以后又发现产氨短杆菌 IFO12071 在 ATP 存在下能大量合成辅酶 A^[3]。

1974 年以来, 我们用我国自己筛选的产氨短杆菌 No. 1844 及 No. 1846 重复了 Ogata K. 等人的工作, 证明在 ATP 参与下该菌细胞能合成 254 和 290 单位/毫升的辅酶 A。但由于 ATP 价格昂贵, 改用腺嘌呤代替 ATP, 现将结果简报如下:

材料与amp;方法

(一) 材料

1. 试剂: 腺嘌呤为上海第十九制药厂生产; 半胱氨酸盐酸盐及 ATP 为我校生化厂自制; 泛酸钠和氯化十六烷基吡啶为西德进口。

2. 菌种: 产氨短杆菌 No. 1844 及 No. 1846 由广东省微生物所提供。菌种经活化, 种子培养后于 1 升三角瓶中扩大培养。培养液组成 (%): 葡萄糖 10, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, CaCl_2 0.01, 尿素 0.6 (分别消毒)、生物素 3 微克/100 毫升。调 pH7.0。于 1 公斤/厘米²压力下灭菌 20 分钟, 冷至室温, 接入种子液 10%。置往复摇床(125 次/分), 30℃, 振荡培养 24 小时。于 3000 转/分下离心取菌体, 即为完整细胞, 或用 12 倍体积的冷丙酮反复处理成丙酮菌粉。

(二) 方法

1. 辅酶 A 合成反应(克): 取完整细胞 30.0、半胱氨酸盐酸盐 0.11、泛酸钠 0.05、腺嘌呤 0.05、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、 KH_2PO_4 1.0、氯化十六烷基吡啶 0.05, 加水到 100 毫升, 调 pH 至 6.0, 装入一升三角瓶中, 置往复摇床(125 次/分), 37℃ 下振荡反应 5 小时。反应结束, 将反应液置沸水

浴中 7 分钟, 然后用冰速冷至 10℃ 左右, 用 6N 盐酸调 pH 至 4.0, 于 3000 转/分下离心 10 分钟, 上清液测辅酶 A 活力单位, 并进一步提纯。

2. 辅酶 A 的提纯: 1200 毫升上清液(辅酶 A 为 22 万单位)上 766 号活性炭柱(柱型 5×15 厘米, 流速 2 毫升/分)。上柱毕, 用无离子水洗至平衡, 再用含 0.028% 氨的 40% 丙酮液(pH9.0)洗脱。流出液再上“201×8”阴离子树脂柱(Cl^- 型)(柱型 4.5×7.5 厘米, 流速 0.5 毫升/分)。上柱毕, 用无离子水洗至流出液加 20 倍丙酮无沉淀为止。再依次用含 0.04、0.1、0.2 及 0.4 M NaCl 的 0.01 N HCl 洗脱(0.2 M NaCl 盐酸液中含有 ATP 等物质, 可综合利用), 流速 1 毫升/分。分部收集 0.4 M NaCl 盐酸溶液的洗脱液, 合并 pH 2.0—6.0 部分, 用 2N 硝酸调 pH 为 3.0, 上“LD601”大孔吸附剂柱脱盐。上柱毕, 用 pH 3.0 硝酸洗至无 Cl^- 后, 用 40% 乙醇(含 0.1% 氨)液洗脱, 洗脱液经测定含辅酶 A 300 单位/毫升。洗脱液于 60℃ 下减压浓缩, 然后加适量巯基乙醇使辅酶 A 还原, 置冰箱过夜。调 pH 2.5, 加 20 倍 pH 2.5 的冷丙酮, 辅酶 A 即沉淀。冰箱过夜, 抽滤, 沉淀用冷丙酮洗数次, 真空干燥得白色粉末, 含辅酶 A 231 单位/毫克。

3. 分析与测定: 菌体生长是将不同时间所取样品用水稀释 20 倍后于 660 毫微米处进行浊度分析。残糖用斐林法测定。辅酶 A 活力是用磺胺乙酰化法^[1]及大肠杆菌磷酸转乙酰化酶法^[4]进行测定。经提纯后的辅酶 A 纯度用纸上电泳分析, 溶剂系统为 0.5M, pH3.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液或 0.05M pH5.1 醋酸-醋酸钠缓冲液, 电压 300 伏, 电泳时间 2 小时。电泳后在紫外分析灯下定出辅酶 A 位置, 以无锡第三制药厂的辅酶 A 为标准品, 按 Buyske D. A. 等人所述方法^[7]以克分子消

本文于 1978 年 3 月 24 日收到。

光系数 E257 毫微米为基础进行测定。

结果与讨论

(一) 细胞处理

用 No. 1846 菌株作为多酶源, 除补加 0.5 毫克/毫升氯化十六烷基吡啶外, 反应系统中其它物质均按 Ogata K. 所述。用丙酮干燥细胞和完整细胞比较其合成辅酶 A 的能力, 结果如表 1 所示, 经丙酮干燥处理的细胞用腺嘌呤代替 ATP 时只能合成少量辅酶 A, 而在同样条件下的完整细胞合成辅酶 A 的能力则提高了近两倍。Ogata K. 等人认为加腺嘌呤代替 AMP 时既不能磷酸化到 ATP, 也不生成辅酶 A, 他们指出, 酵母能把 AMP 通过糖酵解合成 ATP, 但细菌对辅酶 A 的积累只是在加入 ATP 时才能进行^[1]。我们认为, 这可能是由于在干燥处理时, 破坏了细胞中由腺嘌呤合成 ATP 的酶系。虽然用腺嘌呤代替 ATP 时, 辅酶 A 的合成能力下降了 39%, 但腺嘌呤售价仅为 ATP 的 1/13, 从生产角度上看, 仍是可取的。

表 1 不同处理的细胞合成辅酶 A 的能力

细胞处理	辅酶 A 活力(单位/毫升)	
	加 ATP	加腺嘌呤
丙酮干燥细胞	180	40
完整细胞	190	117

注: Ogata K. 的辅酶 A 合成标准反应系统: 泛酸钠 10 微克分子, 半胱氨酸盐酸盐 10 微克分子, ATP 15 微克分子, MgSO₄·7H₂O 10 微克分子, 磷酸钾缓冲液 150 微克分子, pH6.0, 空气干燥细胞 100 毫克, 总体积 1 毫升。

(二) 辅酶 A 合成的时间进程

用 No. 1846 完整细胞作为多酶源, 在腺嘌呤与表面活性剂参与下 (其他反应条件均按 Ogata

K. 所述)。合成辅酶 A 时, 所需反应时间如图 1 所示, 合成高峰在 5 小时左右, 反应进行 4 小时后基本稳定, 无严重反馈现象, 这对提纯辅酶 A 是有利的。

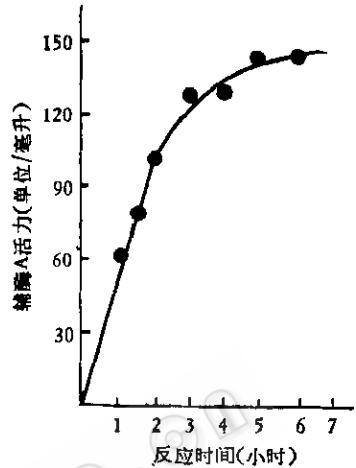


图 1 辅酶 A 合成的时间进程

(三) 辅酶 A 合成的反应系统

为获得 No.1846 完整细胞在腺嘌呤参与下的最佳反应系统, 我们用正交设计, 选用 L₁₆(4⁴) 正交表^[4], 对反应系统中所用完整细胞、腺嘌呤、KH₂PO₄、半胱氨酸盐酸盐及泛酸钠等含量进行初步观察, 结果如图 2。正交设计指出, 正交直观分析图中, 波动大的为主要因素^[4]。由图 2 可见, 无机磷是反应系统中的重要因子。因在辅酶 A 合成中, 泛酸的磷酸化 (或泛酸巯基乙胺的磷酸化) 和 3'-脱磷辅酶 A 的磷酸化都需无机磷^[9]。如在辅酶 A 的合成中 ATP 等核苷三磷酸盐确是必需的辅助因子, 则由腺嘌呤转化时更需无机磷的参与。在辅酶 A 的合成中, 其它底物如泛酸、半胱氨酸和腺嘌呤的浓度应是等克分子。

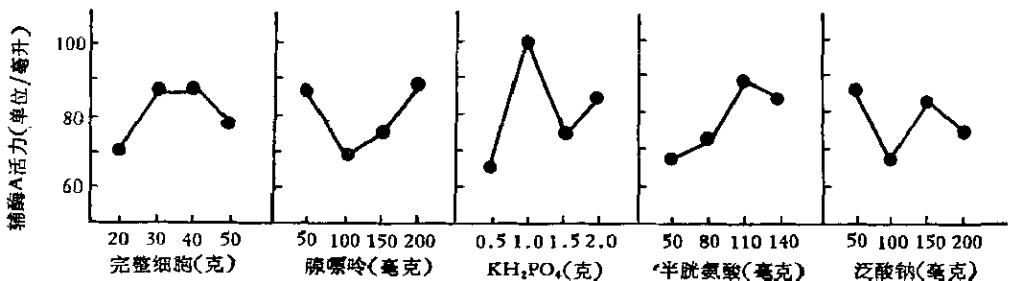


图 2 辅酶 A 合成系统中五因素四水平 [L₁₆(4⁴)] 正交试验直观分析图

由图 2 各因素最高点所组合的新反应系统, 即本文“材料与方法”中所述反应系统。用此反应系统和表 1 加腺嘌呤的反应系统进行比较试验, 结果如表 2 所示, 新反应系统使辅酶 A 收率提高了 78.3%, 而且除无机磷外, 其他物质的用量均比原反应系统少, 有利成本核算。

表 2 不同反应系统中 No. 1846 菌的完整细胞合成辅酶 A 的能力

合成的辅酶 A \ 反应系统	原反应系统 (即 Ogata K. 系统)	新反应系统 (正交法所得系统)
活力(单位/毫升)	106	189
百分比	100	178.3

注: 补加有 0.5 毫克/毫升氯化十六烷基吡啶, 并用等克分子的腺嘌呤代替 ATP。

参 考 文 献

- [1] Ogata, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**: 1757, 1970.
- [2] Ogata, K. et al.: *ibid.*, **36**: 93, 1972.
- [3] Shimuzu, S. et al.: *ibid.*, **36**: 370, 1972.
- [4] 中山大学生物系生化微生物教研室: 中山大学学报(自然科学版), 第 3 期, 15 页, 1975.
- [5] Kaplan, N. O. and Lipmann, F.: *J. Biol. Chem.*, **174**: 37, 1948.
- [6] Abiko, Y. et al.: *J. Biochem.*, **61**: 10, 1967.
- [7] Duyske, D. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**: 3575, 1954.
- [8] 中国科学院数学研究所统计组: 《常用数理统计方法》, p 34—54, 225—240, 科学出版社出版, 1974.
- [9] Brown, G. M.: *J. Biol. Chem.*, **234**: 379, 1959.