

## 采用产氨短杆菌合成辅酶 A 的研究

丁兆坤 许友卿 黄溢明

(中山大学生物学系, 广州 510275)

用产氨短杆菌鲜菌体在以腺嘌呤代替 ATP 的反应系统中酶促合成辅酶 A (CoA), 每毫升反应液的 CoA 产量达 221 单位 (u); 在不加任何核苷酸类物质的条件下, 也可达 185u; 合成在 5 小时左右达高峰。CoA 合成主要在细胞内进行。提出了连续式碳-阴离子交换树脂柱提纯 CoA 的新方法, 既提高了收率, 又避免了原锌汞齐法的毒物危害, 方法简易可行。用本法制得的结晶品含 CoA 231u/mg, 收率 17.0%; 阴柱洗脱液不经结晶直接制成 CoA 注射液, 提取率 20.9%, 经广州药检所检验, 各项指标均符合国家标准。

关键词 辅酶 A; 产氨短杆菌

CoA 是生物体内糖类、脂类和一些氨基酸代谢不可缺少的辅酶, 它参与乙酰化反应, 有利于糖、脂肪及蛋白质的代谢。临床用于白细胞减少症、原发性紫癜及功能性低热等<sup>[1]</sup>。

CoA 的制备, 首先是 Lipmann 等人<sup>[2]</sup>于 1947 年从动物肝脏中分离制得。1959 年 Moffatt 等人<sup>[3]</sup>完成了 CoA 的化学全合成。1954 年 Pierpoint 等人<sup>[4]</sup>在研究 CoA 生物合成过程中, 发现阿拉伯糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus arabinosus*) 的活细胞在加有泛酸的葡萄糖溶液中进行反应, 可以得到一定量的 CoA, 但产量低, 无生产价值。1970 年 Ogata 等人<sup>[5]</sup>发现面包酵母在 ATP 参与下, 能迅速地将泛酸和半胱氨酸合成较大量的 CoA, 为工业生产提供了新途径。此后, 他们又连续报道了能积累 CoA 的产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) 和面包酵母等合成 CoA 的反应系统及其影响因素。1974 年 Nishimura 等人<sup>[6]</sup>用藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 直接发酵生产 CoA, 使 CoA 生产又进入一个新阶段。在 CoA 提纯方面, 1972 年 Ogata 等人<sup>[7]</sup>提出了实验室应用活性碳-DEAE 纤维素提纯的方法, 还提出了适于工业生产的连续式阳-碳-阴柱工艺<sup>[8]</sup>。Matuo 等人<sup>[9]</sup>于 1974 年用亲和层析法提纯 CoA。1973 年 Shimizu 等人<sup>[10]</sup>在 CoA 的反应系统中同时收集提纯<sup>γ</sup>-磷酸等 CoA 生物合成的中间产物, 为 CoA 生产的综合利用提供了依据。

长期以来, 国内 CoA 制备主要从白地霉和酵母中直接提取, 得率低, 且工艺采用汞盐沉淀法, 影响工人健康。为了解决这些问题, 我们用产氨短杆菌体进行 CoA 酶促合成的研究, 并摸索新的分离提纯方法。本文对最优合成条件及 CoA 的提取方法进行了探讨。

### 材料与方 法

#### (一) 试剂

腺嘌呤来自上海十九药厂, 纯度 99.83%。半胱氨酸盐酸盐和 ATP 是本系自制产品, 质量符合国家规定。泛酸钠和氯化十六烷吡啶为分析纯试剂。其他为 A. R. 或 C. P. 试剂。

## (二) 树脂和活性碳

弱碱性阴离子交换树脂和“766”活性碳是上海树脂厂产品。

## (三) 菌种

产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) AS1.844 和 AS1.846 来自广东省微生物研究所。

## (四) 菌种培养

1. 斜面培养基(%): 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 琼脂 2.5, 牛肉汁 3, pH7.0。

菌种先在斜面培养基中于 30℃ 培养 24 小时, 然后接入种子培养基进行培养。

2. 种子培养基(%): 葡萄糖 2, 蛋白胨 1, 酵母膏 1, NaCl 0.25, pH7.0。分装于 500ml 的三角瓶中, 每瓶 40ml, 1kg/cm<sup>2</sup> 蒸汽灭菌 20 分钟, 凉至室温, 接入活化菌种 1—2 环, 置于振幅为 10cm, 125r/min 的往复式摇床 30℃ 振荡培养 24 小时, 取样测 OD<sub>620</sub> 和残糖。

## (五) 菌体制备

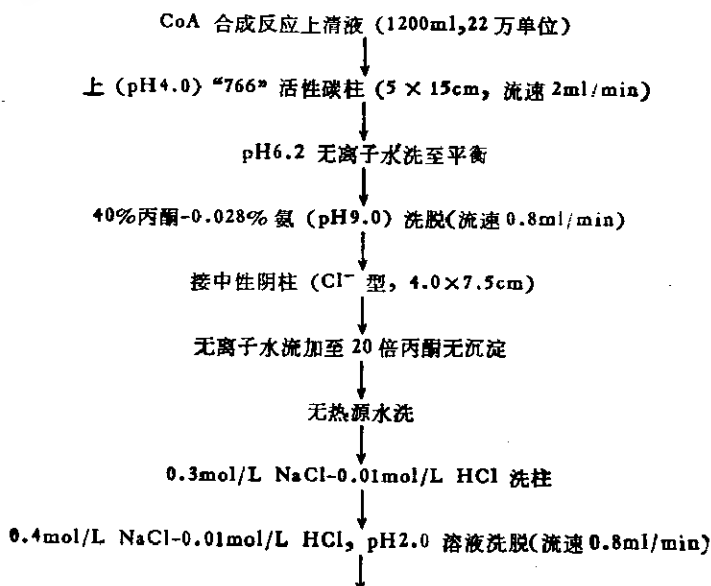
所用培养基成分为葡萄糖 10%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, 生物素 3μg/100ml, 尿素 0.6%, pH7.0。分装于 1000ml 三角瓶中, 每瓶 100ml, 1kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20 分钟, 凉至室温, 接入种子液 8—10%, 置摇床(同上) 30℃ 振荡培养 24 小时左右, 3000r/min 离心取鲜菌体, 用生理盐水洗涤后即用, 或放在 6℃ 冰箱冷冻备用, 或制成丙酮干菌粉。

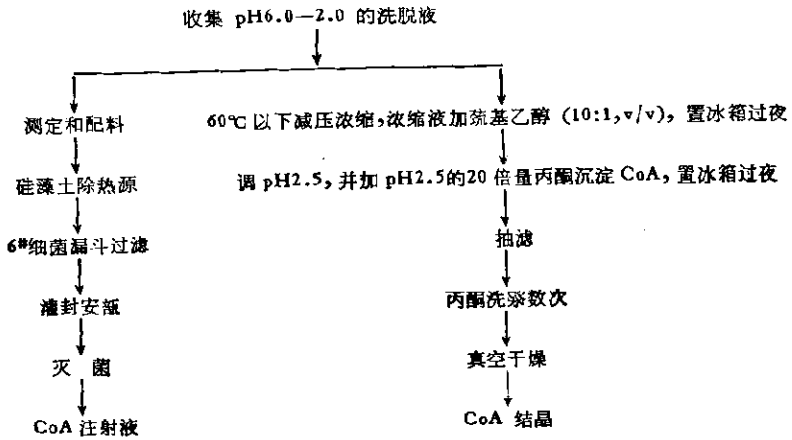
## (六) CoA 合成反应

取鲜菌体 30g, 半胱氨酸盐酸盐 110mg, 泛酸钠 50mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1000mg, 氯化十六烷吡啶 50mg, 加水至 100ml, pH6.0。装于 1000ml 三角瓶中, 置于往复式摇床(同上) 37℃ 振荡反应 4—5 小时, 煮沸 7—10 分钟, 投冰速冷至 10℃ 以下, 用 6mol/L HCl 调 pH4.0, 3000r/min 离心 10 分钟, 收集上清液, 提取。

## (七) 提取

采用简单可行的碳-阴离子交换树脂柱法, 方法如下:





### (八) 分析与测定

1. 菌体生长浑浊度 (OD): 样品稀释 20 倍, 用 721-分光光度计于 620nm 处测定。
2. 残糖: 斐林氏法。
3. CoA 活力测定: 采用经过改良的 Lipmann-Kaplan 的磺胺乙酰化法<sup>[12,13]</sup>。
4. 电泳检查: 采用 (1.2 × 8.0cm) 醋酸纤维薄膜(浙江黄岩化工厂产品)进行电泳分析。样品和标准 CoA、ATP、AMP 和 A 分别点样 10 $\mu$ l, 以 0.05mol/L (pH3.0) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 或 0.05mol/L (pH5.1) 醋酸-醋酸钠缓冲液为溶剂系统, 于电压 300V, 电流 12mA, 电泳 20 分钟, 电泳后放在 260nm 紫外滤光片下, 以标准品对照检查品中 CoA 及其他核苷酸类衍生物。

电泳谱上的 CoA 和巯基化合物还用 Toennies 和 Kolb 法显色检查<sup>[14]</sup>。

## 结果和讨论

### (一) 关于 CoA 合成反应系统

CoA 合成的原反应系统是参照 Ogata 等人<sup>[6]</sup>的反应系统, 用腺嘌呤和鲜菌体代替原反应系统中的 ATP 和丙酮干菌粉组成, 即泛酸钠 10 $\mu$ mol/L, 半胱氨酸盐酸盐 10 $\mu$ mol/L, 腺嘌呤 15 $\mu$ mol/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 $\mu$ mol/L, 磷酸钾 150 $\mu$ mol/L, 氯化十六烷吡啶 1mg, 鲜菌体 0.1g, 加水至 1ml, pH6.0。为了获得产氨短杆菌 AS1.844 在用腺嘌呤代替 ATP 的反应系统中合成 CoA 的最佳反应系统, 我们应用正交设计, 选用 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交表, 对反应系统中所用的新鲜菌体量、腺嘌呤、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、半胱氨酸盐酸盐和泛酸钠五项条件进行观察。结果如图 1 所示。

由正交分析图中最高点组成新的反应系统为: 鲜菌体 30g, 腺嘌呤 50mg, 半胱氨酸盐酸盐 110mg, 泛酸钠 50mg, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 100mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1000mg, 氯化十六烷吡啶 50mg, 加水到 100ml, pH6.0。用此新反应系统与原反应系统进行比较, 结果如表 1 示。

正交所得配方有利于 CoA 的合成, 产率为原反应系统的 180%, 除无机磷外, 其余原料都降低了, 腺嘌呤为原配方的 1/18, 泛酸钠为原配方的 1/4, 半胱氨酸盐酸盐为 1/2。

### (二) 关于菌体处理

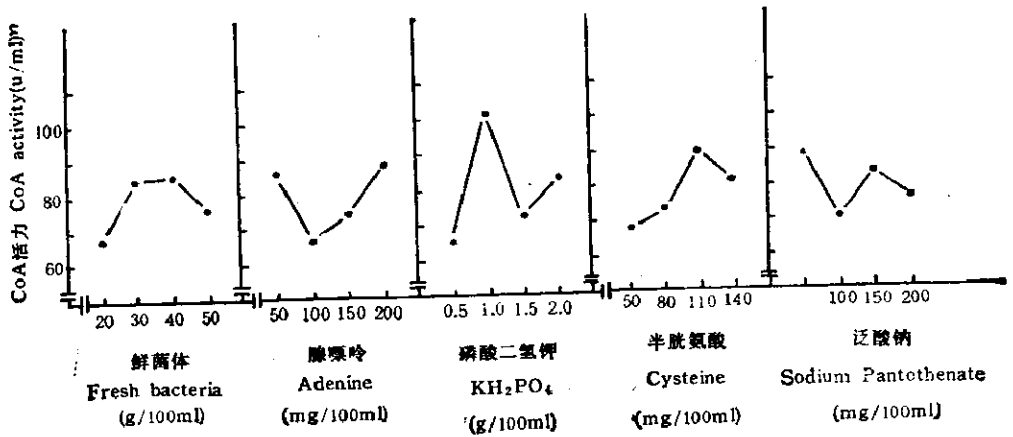
图 1 五因素四水平 [L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)] 正交试验直观分析图

Fig. 1 The analytic diagrams of crossing test in four levels of five factors

表 1 不同反应系统对 CoA 合成的影响

Table 1 The affections of synthesizing CoA in different reaction systems

项目 Item	反应系统 Reaction system	原反应系统 Original reaction system	新反应系统 New reaction system
CoA 活力 Activity of CoA (u/ml)		83.5	150
百分比 Percentage yield (%)		100	180

表 2 处理方法不同, 菌体分别在 ATP 和腺嘌呤参与下合成 CoA 的活力  
Table 2 Activity of CoA synthesized by bacteria that were treated in different ways and in ATP or adenine

处理方法 Treated ways	CoA 活力 CoA activity (u/ml)	
	加腺三磷 Added ATP	加腺嘌呤 Added adenine
丙酮干菌粉 Acetone bacteria powder	180	40
冰冻菌体 Frozen bacteria	190	170

我们对实验用的菌体进行冷冻处理,或用无水丙酮脱水,再真空干燥和研磨,制成丙酮干菌粉,并用等干重的两种菌体进行 CoA 合成活力的比较(但未及时与鲜菌体对照)。

表 2 表明,在反应系统中核苷酸类,如用 ATP 时,二种菌体合成 CoA 的能力相近,冰冻菌体稍高;而用腺嘌呤代替 ATP 时,冰冻菌体合成 CoA 的能力是丙酮干菌粉的 4 倍。说明了冰冻菌体合成 CoA 的活力高,这可能是由于丙酮干菌粉在处理中破坏了某些酶系所致。这个结果与 Ogata 等人<sup>[6]</sup>报道的产氨短杆菌经丙酮处理后合成 CoA 的能

力比冰冻菌体好的结论有出入。

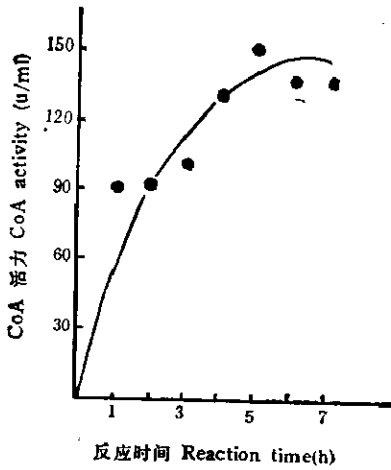


图2 CoA合成的时间进程

Fig. 2 The time of synthesizing CoA

### (三) CoA合成的时间进程

产氨短杆菌 AS 1.844 在用腺嘌呤代替 ATP 的反应系统中合成 CoA 的时间进程如图2。合成的高峰期在5小时左右,这一结果和 Ogata 等人的结果相似。图2又说明 CoA 合成在4小时后渐趋稳定,时间稍长也没有严重的分解现象。这有利于 CoA 的提取。

### (四) 核苷酸类物质对 CoA 生成的影响

Ogata 等人<sup>[8]</sup>指出, ATP 是 CoA 生物合成途径中的能源,同时它本身又是 CoA 的前体。但因 ATP 价格昂贵,来源困难,难以用于 CoA 生产。为了解决此问题,我们在正交所得系统中分别作 ATP、AMP、A 和不加任何核苷酸类物质对 CoA 生成影响的比较试验(表3)。

表3 核苷酸类物质和 CoA 生成的关系

Table 3 The relations between nucleotides and their derivatives and CoA synthesis

前体 Precursor added	腺三磷 ATP	腺一磷 AMP	腺嘌呤 A	不加核苷酸类 No precursor
CoA 活力 CoA activity(u/ml)	254.4	225	160	155.6

用于试验的核苷酸类对 CoA 生成的影响: ATP > AMP > A > 不加核苷酸类。ATP 对 CoA 的生成是最好的能源和前体,腺嘌呤作为前体也能合成较多的 CoA,甚至不加核苷酸类物质,也能获得较好的产量。

### (五) 不同菌种合成 CoA 的能力

我们曾用正交设计所得的新反应系统,对产氨短杆菌 AS 1.844 和 AS 1.846 进行比较试验,结果见表4。

产氨短杆菌 AS 1.844 无论在加腺嘌呤或不加核苷酸类物质的反应系统中,合成 CoA 的量都比 AS 1.846 高。因此,我们选为生产菌。

### (六) CoA 合成的部位

我们在 CoA 合成反应结束后,分别进行冷热破壁离心和直接离心取上清液测定 CoA 活力(表5)。由表5可见,破壁提取获得的 CoA 产量远比不破壁的高,不破壁的仅为破壁的17.2%。由此证明,CoA 的合成主要在胞内进行。胞外存在的少量 CoA,我们认为有两种可能,一是先在胞内合成,再渗出胞外。二是部分 CoA 合成酶系渗出胞外,在胞外进行 CoA 的合成。

Ogata 等人<sup>[9]</sup>曾报道,在反应系统中加入表面活性剂后,CoA 合成酶从细胞漏出,于是,CoA 合成部分发生在细胞外。

表 4 不同菌种合成 CoA 能力的比较

Table 4 Comparison of the capabilities of synthesizing CoA of different bacteria

前体 Precursor added	菌 种 Bacteria	AS1.844	AS 1.846
	CoA活力 CoA activity (u/ml)		
腺 嘌呤 Adenine		221	182
不加核苷酸类 No precursor		185	153

表 5 反应菌体破壁与否获得的 CoA 活力比较

Table 5 Comparison of CoA activities when bacteria were broken or not

处理方法 Treated way	CoA 活力 CoA activity (u/ml)	相对百分率 Relative percentage yield(%)
破 壁 Broken bacteria	254.4	100
不破壁 Intact bacteria	40.4	17.2

### (七) CoA 的提纯

国内提取 CoA 采用的生产工艺是汞盐沉淀法。此法不仅操作复杂、劳动强度大、收率低,而且影响生产者的身体健康和造成环境污染。为了克服这些缺点,我们采用连续碳-阴离子交换柱提纯 CoA。此法收率较高,可实行自动化连续上柱,中间不需浓缩。因为实验证明,碳柱洗脱峰较宽(图 3),大量的洗脱液,如果进行浓缩,不但困难,而且 CoA 在加热时易被破坏。阴柱洗脱时, pH 先升高,然后逐渐下降,变化明显,首先被洗出的是核苷酸类,然后是 CoA。从 CoA 洗脱峰来看,CoA 比较集中在 pH6.0—2.0 范围内,尤以 pH4.0 时 CoA 浓度最高(图 4)。

我们曾将最后 CoA 洗脱液经浓缩加适量巯基乙醇还原后制成白色粉末,结晶品含 CoA 231u/mg, 收率 17.0%。但此操作既费时间,又消耗大量的丙酮等试剂,而且巯基乙醇还会造成一些人过敏反应。因此又设计了阴柱流脱液经除热源及滤菌后,直接灌封安瓿制成针剂的简便方法,提取率 20.9%(表 6)。

表 7 温度对 CoA 活力的影响

Table 7 The affections of temperature to CoA activities

处理方法 Treated ways	CoA 活力 CoA activity (u/ml)	损失活力 Lossing activity (%)
不加热 No incubation	30	0
60℃ 保温 60 分钟 Incubated for 60 min in 60℃	28.8	4
100℃ 保温 30 分钟 Incubated for 30 min in 100℃	28.8	4
60℃ 保温 90 分钟 Incubated for 90 min in 60℃	17.7	41

表 6 CoA 的提取率  
Table 6 Extraction yield of CoA

项 目 Item	提取情况 Extraction	CoA 提取率 Extraction yield of CoA										
		体积 Volume (ml)	CoA 活力 CoA activity (u/ml)	总CoA活力 Total CoA activity (u)	不浓缩结晶 No concentration & crystallization		浓缩结晶 Concentration and crystallization					
					本柱提取率 Extraction yield for the column (%)	总提取率 Total extraction yield (%)	重量 Weight (mg)	CoA 活力 CoA activity (u/mg)	总 CoA 活力 Total CoA activity (u)	总提取率 Total extraction yield (%)		
CoA 合成反应液 CoA synthesis reaction solution		1200	183.34	220008								
碳柱提取 Extraction of carbon column		2000	42	84000	38.2							
阴离子柱提取 Extraction of anion exchange column		1200	34.5	46000	54.8	20.9	162	231	37,422		17.0	

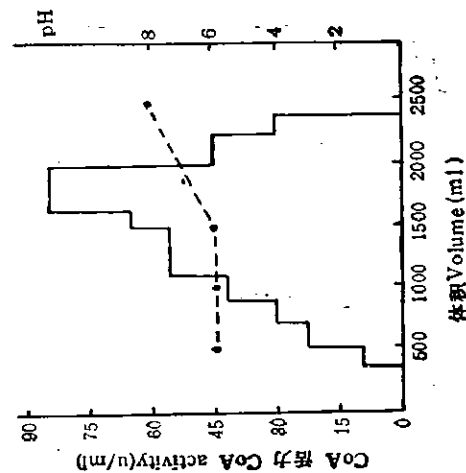


图 3 碳柱(6 x 23cm)洗脱图形

Fig. 3 Elution diagram of carbon column (6 x 23cm)

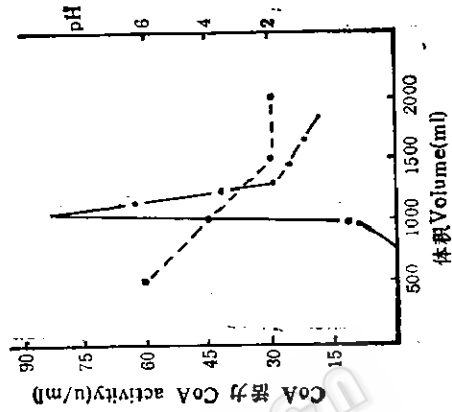


图 4 阴离子交换柱(4.0 x 7.5cm)洗脱图形

Fig. 4 Elution diagram of anion exchange column(4.0 x 7.5cm)

### (八) CoA 注射液的稳定性

我们制备的 CoA 注射液, 在加适量稳定剂灌封安瓿后, 对温度进行稳定性试验, 煮沸 30 分钟、60℃ 保温 1 小时之针剂, CoA 活力基本不变。超过此范围则 CoA 活力下降(表 7)。把同一批号的 CoA 针剂于室温放置五个月, CoA 活力不变。说明 CoA 注射液比较稳定。

### 参 考 文 献

- [1] 上海市卫生局: 上海市药品检验标准, p. 425—427, 上海人民出版社, 上海, 1974年。
- [2] Lipmann, F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **160**:173, 1945; **162**:743, 1946; **167**:869, 1947; **186**:235, 1950.
- [3] Lipmann, F.: *Bacteriol. Revs.*, **17**:116, 1953.
- [4] Moffatt, J.G. and H.G. Khorana *J. Am. Chem. Soc.*, **81**:1265, 1959.
- [5] Pierpoint, W. S. and D. E. Hughes *Biochem. J.*, **56**:130, 1954.
- [6] Ogata, K. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **34**:1757, 1970.
- [7] Nishimura, N. et al.: *Appl. Microbiol.*, **28**:117, 1974.
- [8] Ogata, K. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **36**:93, 1972.
- [9] 清水 昌·谷 吉樹·绪方浩一: 発酵と代謝, **27**: 77, 1973。
- [10] Matuo, Y. et al.: *BBA*, **338**:520—528, 1974.
- [11] Shimizu, S. et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **37**, 607—613, 1973.
- [12] Kaplan, N.O. and F. Lipmann *J. Biol. Chem.*, **174**:37, 1948.
- [13] 丁兆坤等: 广东生化通讯, **2**(3): 86, 1985。
- [14] Toennies, G. and J. J. Kolb: *Anal. Chem.*, **23**:823, 1951.
- [15] 中国科学院数学研究所统计组: 常用数理统计方法, p.34—54; p.225—240, 科学出版社, 北京, 1973年。
- [16] Brown, G.M.: *J. Biol. Chem.*, **234**:370, 1959.

## STUDIES ON CoA SYNTHESIZED BY *BREVIBACTERIUM AMMONIAGENES*

Ding Zhaokun Xu Youqing Huang Yiming

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

CoA was enzymatically synthesized by *Brevibacterium ammoniagenes*, using adenine in place of ATP as a precursor. The amount of synthesizing CoA was 221 units in every milliliter for the reaction mixture. If no adenine was used in the CoA synthesis reaction system, the amount of synthesizing CoA was as high as 185 units per milliliter. The optimum time of synthesizing CoA was about 5 h. CoA was mainly formed inside the bacterial cell. We had provided a new process of purifying CoA by a series of columns involving carbon and anion exchange resin. The process not only increased the yield of CoA, but also avoided the poison from applying the Zn-Hg amalgamation process. It also simplified the operation.

Crystal CoA obtained by this new method contained CoA 231 units per milligram, and the yield was 17.0 percent. If final CoA elution was directly collected, the yield could be raised to 20.9 percent.

**Key words** Coenzyme A; *Brevibacterium ammoniagenes*