

聚乙烯醇固定化酵母细胞制备 CTP 研究 Study on CTP Production from CMP by Beer Yeast Cell Immobilized in PVA

杨红艺^{1,2*}, 钱世钧³, 黎高沃²

YANG Hong-Yi^{1,2*}, QIAN Shi-Jun³ and LI Gao-Wo²

1 中国科学院研究生院, 北京 100039

2 燕京中科生物技术有限公司, 北京 101300

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100080

1 China Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

2 Yanjingzhongke Biotechnology Limited Company, Beijing 101300, China

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 以聚乙烯醇为固定化载体, 固定化冷冻处理过的啤酒酵母细胞从 CMP 制备 CTP, 分别从胶的型号、浓度和固定化方法的优化等方面摸索了最适的固定化条件, 固定化细胞在试验条件下连续发酵 8 次, 转化率维持在 85% ~ 95%。同时, 还对固定化细胞的稳定性进行试验研究, 并用 HPLC 对产品进行了分离鉴定。

关键词 聚乙烯醇, 固定化细胞, CTP

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0323-04

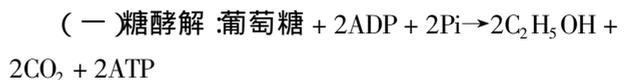
Abstract With PVA as the carrier, the frozen beer yeast cells were immobilized for production of CTP from CMP. we explored the optimal condition of the immobilization from the aspects of the type, concentration of the PVA, and the immobilizing methods of cells. In all 8 continuous batch of fermentation under the reactional condition of the immobilized cells, the conversion rate of CTP were maintained about 85% ~ 95%. Moreover, the storage stability of immobilized cells were investigated, and the products was also isolated and identified by HPLC.

Key words polyvinyl alcohol (PVA), immobilized cells, CTP

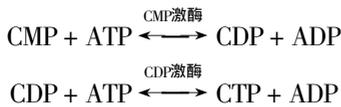
胞嘧啶核苷三磷酸 (Cytidine 5'-triphosphate, 简称 CTP) 是一种核苷酸药物, 因其透膜作用强, 能促进受损的神经细胞内磷脂、核酸及核蛋白的合成代谢^[1], 可调节已损伤的神经生物膜的合成和改建^[2], 并更有效地为神经细胞提供能量^[3], 所以在临床上应用于各种脑外伤、脑震荡及其后遗症, 严重的神经衰弱、老年性痴呆、原发性耳聋等疾病的治疗^[4,5]。

目前, 国内生产 CTP 的厂家很少, 日本有以 CMP 为底物, 利用游离酵母发酵生产 CTP 的报

导^[6], 邱蔚然等人报道了用卡拉胶-魔芋多糖复配胶固定化酵母细胞制备 CTP 的研究^[7]。根据微生物细胞内核酸的代谢规律, CTP 的合成和蓄积是通过底物 CMP 的酶促反应与糖酵解产生的 ATP 反应相偶联生成的, 它的反应如下:



(二) 酶促合成 CTP 反应:



在上述反应中,参与 CTP 合成的主要的酶都为胞内酶,而底物又因细胞通透性差难以进入反应,所以不对微生物细胞进行透性处理,底物与酶不能充分接触,合成反应不能顺利进行,难以得到高产率的 CTP。细胞被处理后,细胞只具有酶的活性,成为不能繁殖的“静态细胞”^[8],无法进行连续发酵。因此,考虑用固定化细胞的方法,固定“静态细胞”使之能多几次发酵直到连续发酵。

聚乙烯醇 (Polyvinyl Alcohol, 简称 PVA) 是一种人工合成的有机物多聚体凝胶,高强度,化学稳定,机械性能好,具有抗微生物分解性能,但对微生物等无毒性、价廉^[9],是近年来新发展的一种载体。同时用 PVA 固定化酵母细胞进行 CTP 的制备还未见到报导。本文首次报导用 PVA 固定化酵母细胞进行 CTP 制备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 北京燕京啤酒厂提供;PVA 124、PVA 224 日本可乐利公司出品;PVA 1799、PVA 1788 北京有机化工厂产品;胞嘧啶核苷一磷酸 (CMP) 燕京中科生物技术有限公司产品;磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、氯化镁和葡萄糖均为市售分析纯试剂;高效液相色谱仪为日本 HITACHI 产品。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌体细胞的制备: 步骤如下:①酵母用 100 目的筛网过滤,除去麦芽根等杂质,得到过滤液;②用 3 倍的生理盐水稀释过滤液,4℃ 沉降;③倒掉清液后得到沉降物;④重复②③各 1 次;⑤4℃、5000r/min 离心 20min 得到漂洗后的酵母细胞;⑥置于 4℃ 保存备用。

1.2.2 PVA 的筛选: 分别用 PVA 124、PVA 224、PVA 1799 和 PVA 1788 四种产品进行如下相同的操作:15% (W/V) PVA 20mL 加热煮沸溶解后,冷却至室温,-20℃ 冷冻 24h,次日放置室温,分别观察溶解效果和凝胶化效果。

1.2.3 固定化酵母细胞制备:

方法一:包埋切块法。 15% (W/V) PVA 124 20mL 加热煮沸溶解后,冷却至室温,与 20g 处理好的酵母细胞混合均匀,铺于培养皿中,-20℃ 冷冻 24h,取出后切割成 3mm × 3mm 的立体小方块,生理盐水清

洗后备用。

方法二:植物油成珠法。 15% PVA 124 20mL 与 20g 酵母混合均匀后,加入 200mL 植物油充分搅拌,固定化细胞形成了均匀的球状珠体,直径在 1~3mm 内,然后在 -20℃ 定型 24h,定型后植物油回收,固定化细胞珠体用生理盐水清洗备用^[10]。

方法三:复合载体成珠法。 将含 0.6% 海藻酸钠的 6% 的 PVA 酵母菌混合液(酵母细胞占 7.3%),用注射器滴入含 1% 的 CaCl₂ 的 5% 硼酸溶液中,边滴入边搅拌,形成珠体,在 4℃ 冰箱中固化 8h,取出在 -20℃ 冷冻 24h^[10]。

1.2.4 固定化酵母的反应条件: 称取 40g 固定化酵母于 100mL 三角瓶中,加入 10mL 底物溶液(含 CMP 0.02mol/L, KH₂PO₄-NaH₂PO₄ 0.22mol/L, MgCl₂ 0.02mol/L, 葡萄糖 0.22mol/L, pH6.5)于 30℃ 水浴恒温振荡器上反应,按一定时间取样分析。

1.3 分析测定方法

1.3.1 细胞包埋率: 被包埋的细胞个数占包埋前的总细胞个数的比率。具体操作为:用生理盐水洗涤包埋好的固定化酵母细胞 3 次,显微镜下分别记数未被包埋的细胞数量和包埋前的总细胞数量,然后进行计算。

1.3.2 活细胞数的测定: 血球板计数法。称取 1g 酵母悬浮到 50mL 生理盐水中,然后取 1mL 悬液按 10 × 10 逐级稀释 100 倍,之后在血球计数板上先滴入一滴酵母稀释液,再滴入一滴 0.1% 的甲基蓝,5min 后显微镜下观察,蓝色为死细胞,无色为活细胞。计数活细胞所占比例。

1.3.3 转化率的测定: HPLC 定量法:参照三磷酸腺苷二钠测量法^[11]。纸电泳定量法:在 pH3.5, 0.06mol/L 柠檬酸缓冲液中,20V/cm 电压梯度下电泳 120min,剪下电泳斑点溶于 pH2.0 水溶液测定 A₂₈₀ 值。

1.3.4 转化率的计算:

$$\text{CTP 转化率} (\%) = \frac{\text{OD}_{280}(\text{CTP}) \text{ 值}}{\sum \text{OD}_{280}(\text{CTP} + \text{CDP} + \text{CMP}) \text{ 值}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 透性处理(冷冻)和未处理的细胞与转化率的关系

很多研究表明,酵母细胞利用底物进行产物合成时细胞的透性对底物的转化率有很大的影响。细胞在用冷冻法处理过程中,发现细胞经过冷冻后,存活率迅速下降,到 18h 后细胞存活率只有 1% 左右,用这样经过不同冷冻时间处理过的酵母细胞,以

CMP 为底物,进行液态发酵试验,经预冻 18h 后细胞转化率达到 92%,而不经冷冻处理的酵母细胞,存活率高,其转化率比经过透性处理的低得多。由此可以看出我们要得到高转化率、短反应时间的固定化细胞,酵母细胞在固定前一定要经过冷冻(透性)处理。

2.2 固定化方法的选择

2.2.1 PVA 型号和浓度的选定:我们试验了四种 PVA 载体,经过溶解和凝胶过程发现,日本可乐利 PVA124 和 PVA224 加热时溶解效果好,醇解度 99% 的 PVA124 和 1799 凝胶效果好,经过比较综合考虑后,选用溶解效果和凝胶效果均较好的 PVA124 作为固定化载体。之后,我们又对 PVA124 载体的浓度进行了试验,分别考察了 9%、12%、15% 和 18% 四个浓度,综合比较固定化细胞的包埋率、机械强度和操作难易三个方面,确定以含量 15% 的 PVA 为合适浓度。

2.2.2 固定化细胞制备方法的比较:按“材料与方法”所述,取 1.2.3 三种方法制备的固定化细胞切块 20g,分别加入 10mL CTP 反应液,考察酶促反应和载体的外观变化。(1)复合载体法制备的固定化细胞首次酶促反应时间慢,可能是海藻酸钙阻碍了反应液与细胞的充分接触,随着反应的进行,反应液中的磷酸根与钙离子结合,虽然细胞与反应液得到充分接触,开始生成 CTP,但同时原有的珠体形状也不复存在了。(2)植物油成珠法得到的固定化细胞发酵正常,但清洗植物油比较繁琐,且很难清洗彻底。(3)比较而言,采用“方法一”包埋切块法最好,操作相对简便,反应正常,当然,如果有模具的话,操作将更方便。

2.2.3 固定化细胞透性处理方法的比较:活细胞经过冷冻处理后变成通透性较好的静态细胞,表 1 列出了获得静态细胞的三种固定化细胞透性的处理方法。三种方法均是 20mL 15% PVA 与 10g 湿酵母包埋。

表 1 固定化细胞透性处理方法对 CMP 转化 CTP 的影响
Table 1 The effect of different treatment methods of permeability for immobilized cells on conversion CTP from CMP

Reaction times	Treatment methods of permeability for immobilized cells	1 #	2 #	3 #
		PVA buried active cells then froze immobilized cells 26h	Froze active cells 24h and melted 20min, then frozen 2h after PVA buried	As above item 2 # except to frozen 5h for 3 times from it
First	conversion rate/%	80	95	95
	Reaction time/h	2	1.5	1.5
Second	conversion rate/%	85	95	95
	Reaction time/h	2	1.25	1.25
Third	conversion rate/%	85	90	90
	Reaction time/h	3	1.25	1.25
Fourth	conversion rate/%	80	85	90
	Reaction time/h	3.3	1.5	1.5
Fifth	conversion rate/%	50	85	95
	Reaction time/h	4	3	3

表 1 可见,包埋经过冻融的酵母(2#、3#)可以增加固定化细胞使用次数;包埋反复冻融的酵母(3#)比包埋只经过冻融一次的酵母(2#)发酵转化率高,但使用到第 5 次时 2# 和 3# 的反应时间都已经延长到原来 2 倍,继续增加使用次数,二者转化率都将大幅度下降,实际上二者使用次数一样。为了今后生产操作方便,以后试验我们都采用 2# 酵母固定化方法,即 PVA 包埋只经过冻融一次的酵母细胞。

2.3 固定化细胞稳定性

2.3.1 固定化细胞在不同条件下的储存稳定性:固定化细胞每次使用后,分别在不同条件下保存,5d 中每天做一次固定化细胞的发酵实验,结果表明,固定化细胞最适宜在 -20℃ 冷冻保存。

2.3.2 固定化细胞催化活力稳定性:按 PVA 包埋法用只经过一次冻融的酵母作成固定化细胞进行多次发酵,固定化细胞可反复使用 8 次,其发酵转化率在 85% ~ 95% 之间(图 1)。

2.4 固定化细胞反应液中产物分析

根据最适的固定化条件,将 15% PVA20g 与 20g 经过冻融 1 次的酵母进行包埋,获得固定化细胞。再将固定化细胞冷冻 2h 后,切成小块,加入 10mL CTP 反应液,在 30℃ 水浴恒温振荡器上反应,反应一段时间后取出反应后的溶液,再添加新的反应液,如此反复操作固定化细胞可使用 8 次。将固定化细胞反应液加入三氯乙酸调 pH2.5 终止反应,离心后,上清液通过 C18 柱进行 HPLC 检测,所得的液相色谱可见 CMP、GDP 和 CTP 依次被洗脱下来,其保留时

间分别是 4.64、5.95 和 8.99,其它为杂质洗脱峰。这为规模分离置备提供了依据。

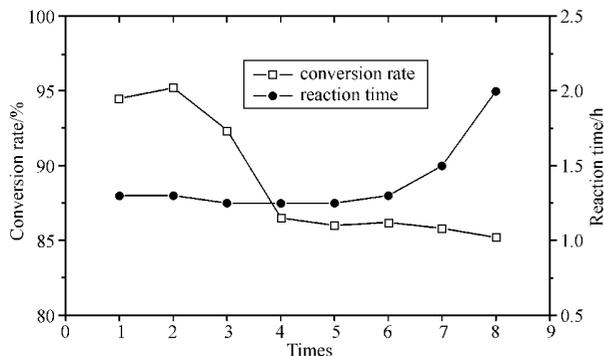


图 1 固定化细胞催化活力稳定性

Fig.1 The catalytic activity stability of immobilized cells

3 讨论

本实验所采用的固定化细胞必须经过透性处理后,胞内的酶系统才能有效地发挥作用,因此固定化细胞的实质就是固定化细胞内的酶系统。本实验采用了冷冻法增加细胞的透性,采用其它透性处理方法,如表面活性剂或超声波方法等是否会取得更好的结果将有待于进一步的试验。

为了减少固定化细胞内的酶泄漏,曾采用 0.5% 的戊二醛交联,这样得到的固定化细胞进行发酵,转化率大幅降低,其原因可能是戊二醛的浓度和交联时间不合适,包埋得过紧,阻碍了反应液与酶的充分接触。

实验中发现,若在只能使用 8 次的固定化细胞反应液中添加适量 ATP 或游离细胞,则固定化细胞还可以增加使用次数,说明固定化细胞的酶活力已经不足,如果在固定化时再增加湿酵母重量,则会

固定化操作难以进行,所以要使酶活力能经久维持,是否可以采用干酵母增加重量磨碎后进行包埋使用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shook JE, Pelton JT, Lemcke PK, *et al.* Mu opioid antagonist properties of a cyclic somatostatin octapeptide *in vivo*: identification of mu receptor-related functions. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, **242**: 1-7.
- [2] Heinricher MM, Morgan MM, Tortorici V, *et al.* Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action with the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 1994, **63**: 279-288.
- [3] Ota CY, Kimura RS. Ultrastructural study of the human spiral ganglion. *Acta Otolaryngol*, 1980, **89**: 53-62.
- [4] Paryini S, Hamann SR, Martin WR. Pharmacologic characteristics of a medullary hyperalgesic center. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, **265**: 286-293.
- [5] Schuknecht HF. Pathology of the Ear. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1974, pp.388.
- [6] Zhu BQ(朱宝泉). Biological Pharmacy Technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2004, pp.69.
- [7] Qiu WR(邱蔚然), Tang XY(唐学友), Ding WB(丁戊豹). Study on Production of CTP Using Immobilized Beer Yeast Cell. Collections of the 6th National Industry Biochemistry Academic Conference, 1999.
- [8] Nukao Kitajinou, Shiuro Watanabe, Isoo Takeda. *J Fermentation Technology*, 1970, **4**(2): 753-738.
- [9] Zhuge J(诸葛健). Modern Ferment Micro-organism Experimental Technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2005, pp. 223-225.
- [10] Ma ZK(马子骏), Lu ZH(陆志号). The Technology and Using of Immobilized Cell. Yinchuan: Ningxia People's Press, 1990, pp.71-73.
- [11] Pharmacopoeia of the People's Republic of China(II). Beijing: Chemical Industry Press, 2005, pp.24-25.