

用阿拉伯糖乳杆菌测定泛酸

王 怀 栋

(河北大学生物系,保定)

夏 丽 群

(华北制药厂,石家庄)

利用产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) 1.844 发酵生产辅酶 A 是国内目前普遍采用的工艺。关于辅酶 A 的生物合成途径, Brown 提出在鼠肝中泛酸首先被磷酸化产生 4-磷酸泛酸,再与半胱氨酸缩合成 4-磷酸泛酸半胱氨酸^[1]。清水昌等人指出产氨短杆菌的辅酶 A 生物合成也按 Brown 所提出的途径进行^[2]。这说明,产氨短杆菌利用泛酸合成辅酶 A 的第一步反应,是在泛酸激酶的催化下将泛酸磷酸化。泛酸激酶活力的大小直接与辅酶 A 的生成量有关。而测定泛酸激酶的活力,首先需要解决泛酸的定量测定问题。

有关泛酸的定量测定,已报道了数种微生物测定方法。所利用的微生物有干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)^[3,4,5]、卡尔斯伯酵母菌 (*Saccharomyces carlsbergensis*)^[6]、阿拉伯糖乳杆菌 (*Lactobacillus arabinosus*) 17-5^[7]、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)^[8] 和乳酸足球菌 (*Pediococcus acidilactici*) NCIB 6990^[9,10] 等。微生物生长情况与泛酸量的依赖关系可以用比浊法^[11]、产酸滴定法^[7]和扩散法^[9,10]进行测定。

目前,国内尚无这方面的报道。本文介绍利用国内现有菌株——阿拉伯糖乳杆菌分别用比浊法、产酸滴定法和扩散法对泛酸进行定量测定的方法。

材料与方 法

菌种:阿拉伯糖乳杆菌 (*Lactobacillus arabinosus*) AS 1.300,由中国科学院微生物研究

所提供。

斜面培养基: 1% 酵母膏, 1% 葡萄糖, 1.5% CaCO_3 , 2% 琼脂, 自然 pH。

种菌培养基: 1% 酵母膏, 1% 葡萄糖, 1% 牛肉膏, 自然 pH。

基本培养基: 采用 Skeggs 和 Wright 的配方^[7], 其中无机盐 A 和无机盐 B 按 Snell 和 Wright 的方法^[12]配制, 酪蛋白用盐酸水解、活性炭处理除去泛酸^[13]。

泛酸钙标准溶液: 用真空干燥的 D(+)-泛酸钙配制, 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(一) 比浊法和产酸滴定法

从斜面上取一环菌体, 接种到 30ml 灭菌的 (1kg 压力, 120℃, 15 分钟) 种菌培养基中, 33℃ 静止培养 24 小时, 离心 (2000rpm, 15 分钟) 收集菌体。菌体用无菌生理盐水洗涤两次, 最后将菌体悬浮到 3ml 无菌生理盐水中, 制成种菌悬浮液。

将泛酸钙标准溶液稀释成 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的稀释液, 分别吸取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0ml, 放入大试管中, 每管的泛酸钙量分别为 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10 μg 。在每管中加入基本培养基 5ml, 用重蒸馏水定容至 10ml, 用棉花塞住试管口, 1kg 蒸汽压力, 120℃ 灭菌 15 分钟。

将种菌悬浮液用无菌生理盐水稀释成 660nm 处的光密度为 0.1 (光径 1cm) 的接种液, 于每个试管中接种 0.045ml, 33℃ 静止培养 18 小时后, 用 72 型分光光度计测定 660nm 处的光密

度(光径 1cm)。或在同样条件下培养 72 小时后,以溴有里酚蓝为指示剂,用 0.1N NaOH 标准溶液滴定产酸量。

(二) 扩散法

将泛酸钙标准溶液稀释成下列 9 种不同浓度: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025r/ml。

在基本培养基中加入 2.25% 的琼脂制成固体培养基, 1kg 蒸汽压力, 120℃ 灭菌 15 分钟。将前述种菌悬浮液用无菌生理盐水稀释成 660nm 处的光密度为 0.25 (光径 1cm) 的接种液。取该稀释的接种液 20ml, 加入到 500ml 熔化的 (48—50℃) 固体培养基中。立即把已接种的培养基转移到培养皿中 (直径 90mm, 高 15 mm), 每个培养皿中放入培养基 20ml。待培养基凝固后,制成内径为 7mm 的琼脂杯, 在每个培养皿中有六个分布均匀的琼脂杯。在琼脂杯的每个孔中分别依次加入上述 9 种不同浓度的泛酸钙稀释液 0.05ml, 使泛酸钙量的梯度为: 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0.00125r。用瓦盖把培养皿盖好, 于 33℃ 静止培养 18 小时,量取生长圈直径 (mm)。

结果与讨论

(一) 比浊法和产酸滴定法

阿拉伯糖乳杆菌 AS 1.300 在泛酸钙含量不同的基本培养基中培养 18 小时,菌体生长情况可用比浊法测量。用 72 型分光光度计测定波长 660nm 处的光密度(光径 1cm), 以不加泛酸钙的管为空白, 三次六组平行实验的结果如图 1 所示。

菌体生长情况,也可用产酸滴定法测量。在和比浊法相同的条件下培养 72 小时, 用 0.1N NaOH 溶液滴定产酸量, 用不加泛酸钙的管为空白,四次八组平行实验的结果如图 2 所示。

从图 1 和图 2 的结果可以看出, 根据菌体生长情况和菌体产酸量, 用比浊法和产酸滴定法测定泛酸是可行的, 二者的灵敏度都很高, 均可分辨 10^{-8} g 的泛酸量。尤其是比浊法简便快速, 灵敏度高, 菌体培养周期短, 且菌体生长情

况与泛酸量呈线性关系, 便于在生产实践中应用。

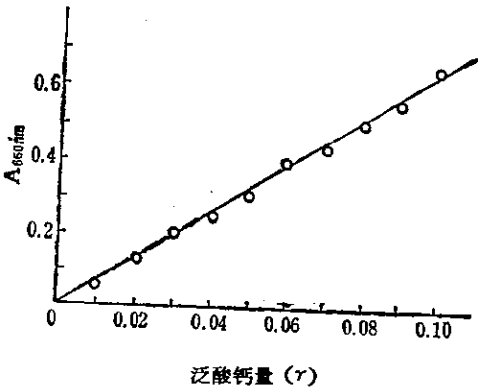


图 1 菌体生长情况与泛酸钙量的关系曲线

由图 2 的结果看, 菌体产酸量与泛酸钙量的关系曲线, 与 Skeggs 和 Wright 报道的曲线^[7]很相似。

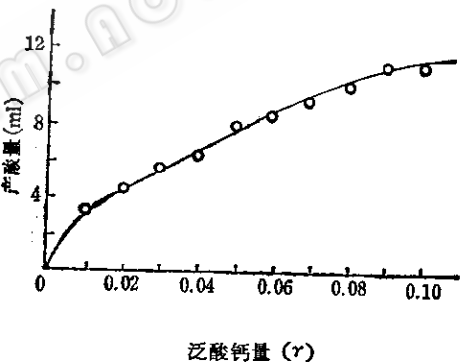


图 2 菌体产酸量与泛酸钙量的关系曲线

(二) 扩散法

用 9 种不同浓度的泛酸钙溶液, 获得 AS 1.300 菌株的生长圈直径 (mm) 与泛酸钙量 (r) 的依赖关系。每一种泛酸钙浓度一次实验做 12 组平行实验, 三次实验共 36 组, 菌体生长圈直径的平均值与泛酸钙量的关系曲线如图 3 所示 (琼脂杯内径为 7mm)。

从图 3 的结果可以看出, 菌体生长圈直径与泛酸钙量也有很好的线性关系, 灵敏度可达 10^{-7} g 的泛酸量, 同样具有操作简便, 测定速度快的优点。因此, 用扩散法测定泛酸也是可行的, 也可适于生产实践中应用。

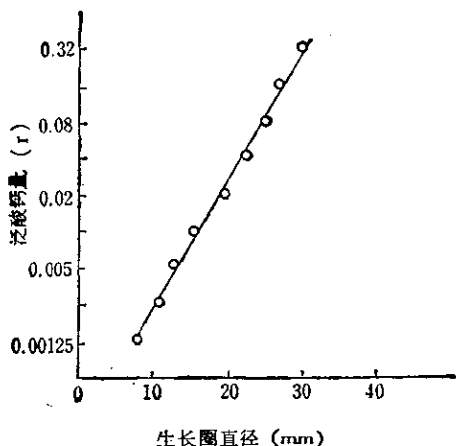


图3 不同泛酸钙量与菌体生长圈直径的关系曲线

为了考核验证上述泛酸定量测定方法，我们将培养 24 小时的产氨短杆菌 1.844 的菌体，稀释成 660nm 处光密度为 1.5—1.7 (光径 1cm) 的菌悬液，按表 1 中的反应体系 30℃ 摇瓶培养 30 分钟。

表 1 产氨短杆菌 1.844 利用泛酸合成 CoA 的反应体系

加入量 (ml)	名称	编号				
		1	2	3	4	5
400μM D-泛酸钙		2	2	2	2	2
20mM MgCl ₂		2	2	2	2	2
20mM ATP-Na ₂		2	2	2	2	2
0.2M 磷酸缓冲液		3.8	3.75	3.7	3.65	3.6
5% 新洁尔灭		0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
生理盐水		8	6	4	2	0
产氨短杆菌菌悬液		2	4	6	8	10

用阿拉伯糖乳杆菌 1.300 以比浊法测定泛酸量，发现泛酸钙的消耗量与产氨短杆菌的菌悬液添加量基本上成正比关系(图 4)。从而证明了用国内现有菌株阿拉伯糖乳杆菌 AS1.300 定量测定泛酸是可行的。

此外，为了验证上述方法在生产中应用的可靠性，曾用比浊法测定了辅酶 A 发酵罐中反应前和反应后的泛酸回收量，结果如表 2 所示。

从表 2 中的结果也可证明，用阿拉伯糖乳

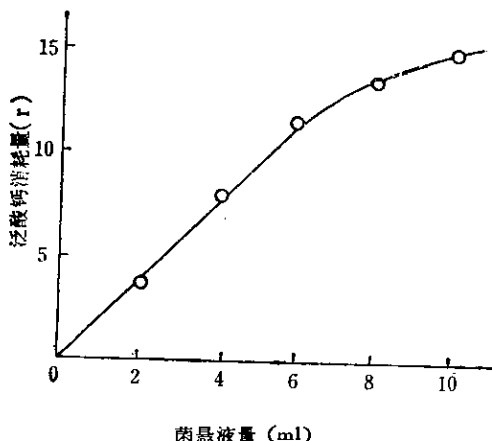


图4 产氨短杆菌菌悬液添加量与泛酸钙消耗量的关系曲线

表 2 辅酶 A 发酵罐中反应前后泛酸钙的回收量 (比浊法测定)

编 号	实际加入泛酸钙量(mg/ml)	用比浊法测定的泛酸钙回收量 (mg/ml)		
		反应前	反应20小时后	实际消耗
1	0.8	0.8	0.7	0.1
2	0.83	0.83	0.74	0.09

杆菌 AS1.300 以比浊法测定泛酸钙含量是可靠的，并在一定程度上反映出泛酸在辅酶 A 生物合成中的消耗量。根据表 2 中泛酸的实际消耗量，估算辅酶 A 的生成量分别为 138u/ml 和 125u/ml，这与发酵罐中辅酶 A 的实际生成量 147u/ml 和 130u/ml 的数值基本上相符。

用比浊法和产酸滴定法实验时，种菌悬浮液不宜太浓，以 OD_{660nm} 值为 0.1 较适宜，接种量也不宜太大，以 0.045ml 为好。这一点与 Skeggs 和 Wright^[7] 用浓的种菌悬浮液接种不同。

产酸滴定法用溴百里酚蓝为指示剂，每 10ml 待滴定溶液加指示剂 1 滴为适宜。但是，滴定终点较难判断，为了获得准确结果，可用 pH 试纸协助检验。当滴定由橙黄色到草绿色时，用 pH 试纸测 pH 值为 7.2 便达到滴定终点。

利用国内菌株阿拉伯糖乳杆菌 AS1.300 对泛酸进行微生物测定的三种方法结果表明，比

浊法、产酸滴定法和扩散法都是可行的,都有很高的灵敏度(可分辨 10^{-9} — 10^{-8} g 泛酸);而比浊法和扩散法由于操作简便,测定速度快,更适于在生产实践中应用。

参 考 文 献

- [1] Brown, G. M.: *J. Biol. Chem.*, 234: 370, 1959.
- [2] 清水昌ら: 発酵と代謝, 30: 30, 1974。
- [3] Pennington, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 135: 213, 1940.
- [4] Landy, M. and D. M. Dicken: *J. Lab. and Clin. Med.*, 27: 1086, 1942.
- [5] Styong, F. M. et al.: *Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13: 566, 1941.
- [6] Atkin, L. et al.: *Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed.*, 16: 67, 1944.
- [7] Skggs, H. R. and L. D. Wright: *J. Biol. Chem.*, 156: 21, 1941.
- [8] Freed, M. (Ed): *The Association of Vitamin Chemists*, Wiley (Interscience), New York, 1966, p. 201.
- [9] Solberg, O. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 39: 119, 1975.
- [10] Solberg, O. and Ida K. Hegna: *Methods in Enzymology*, 62: 201, 1979.
- [11] Hoag, E. H. et al.: *Abstracts American Chemical Society*, 107th Meeting Cleveland, 13B, 1944.
- [12] Snell, E. E. and L. D. Wright: *J. Biol. Chem.*, 139: 675, 1941.
- [13] E. H. 奥金佐娃著, 刘同昌译: 维生素的微生物学测定法, 科学出版社, 北京, 1961 年, 第 179 页。