

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

ZYGZEA

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

● 全国中文核心期刊

● 中国生物医学核心期刊

● 中国期刊方阵入选期刊

● 中国科技核心期刊

● 中国科学引文数据库来源期刊

● 华东地区优秀期刊

本期导读：

Negishi 交叉偶联反应在药物化学中的应用

张庆文

生理药代动力学建模在药剂学中的应用

刘宏锐，陈芳，相小强，全应军，金莎莎



微信号：cjph-cjph



主 办

上海医药工业研究院

中国药学会

中国化学制药工业协会

4
2019年4月

第50卷

Vol.50 No.4

ISSN 1001-8255



9 771001 825190

0 4>

中国医药工业杂志

二〇一九年

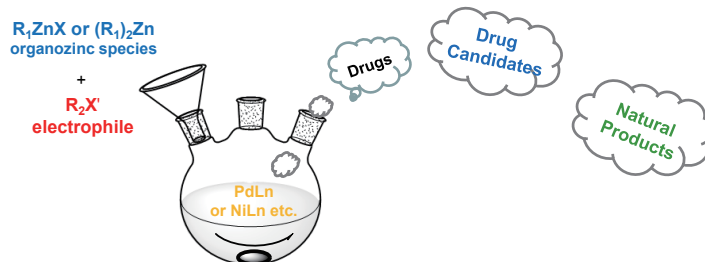
第五十卷

第四期

第359-470页

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

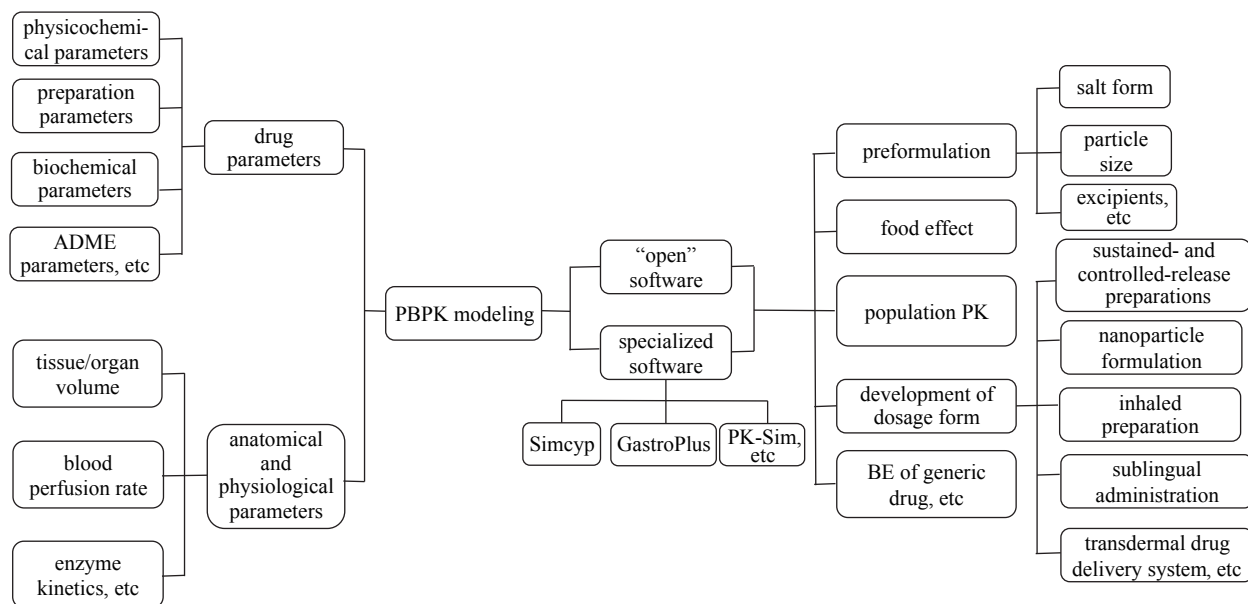
- 359 Negishi 交叉偶联反应在药物化学中的应用·····张庆文
Application of Negishi Cross-coupling in the Synthesis of Bioactive Molecules·····ZHANG Q W
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.001



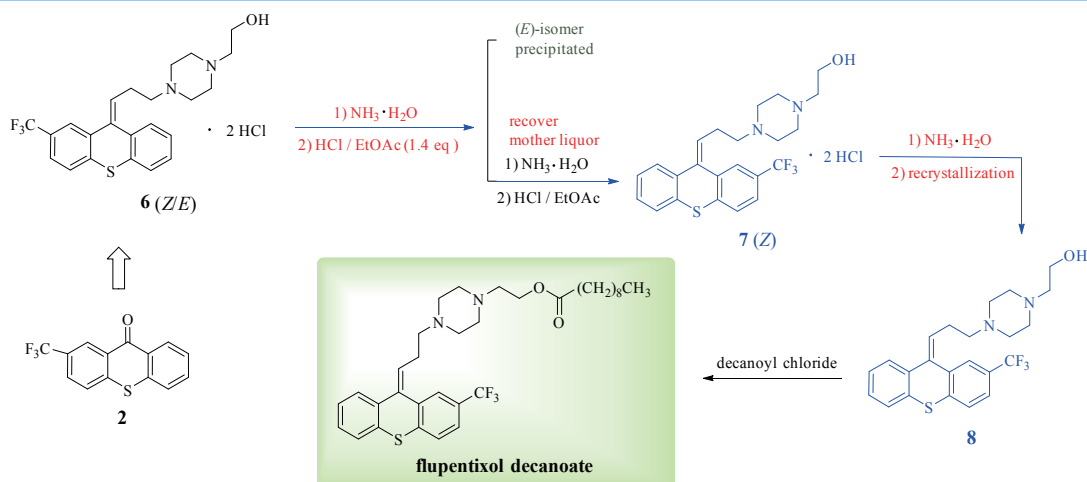
I therefore chose with much enthusiasm "Discovery and Development of New Organic Synthetic Reactions Catalyzed by Transition Metals" as the central topic of my life-long research projects.

---- Ei-ichi Negishi

- 383 生理药代动力学建模在药剂学中的应用·····刘宏锐, 陈芳*, 相小强, 全应军, 金莎莎
Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Pharmaceutics·····
·····LIU H R, CHEN F*, XIANG X Q, QUAN Y J, JIN S S
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.002

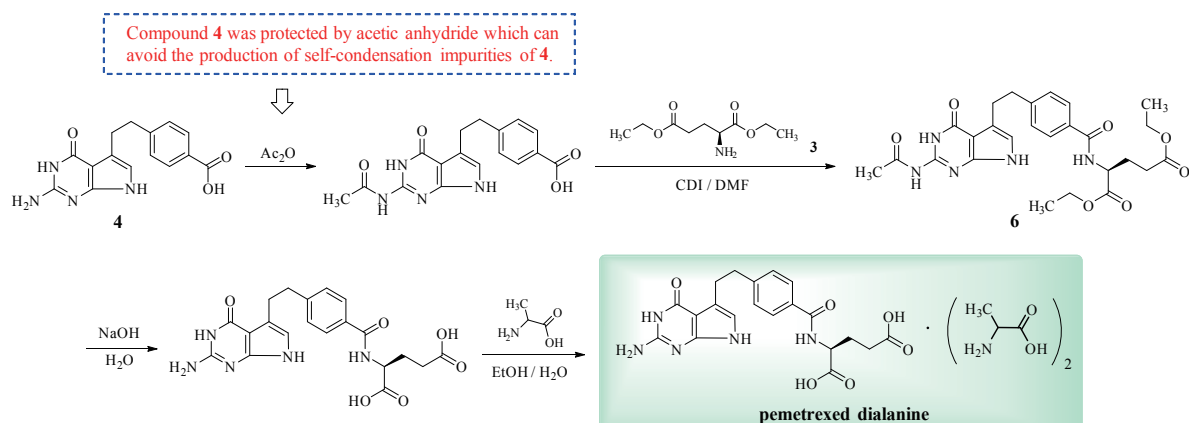


- 392 氟哌噻吨癸酸酯的合成·····陈道鹏, 王圣庆, 杨相平, 马彦琴, 张桂森
 Synthesis of Flupentixol Decanoate·····CHEN D P, WANG S Q, YANG X P, MA Y Q, ZHANG G S
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.003



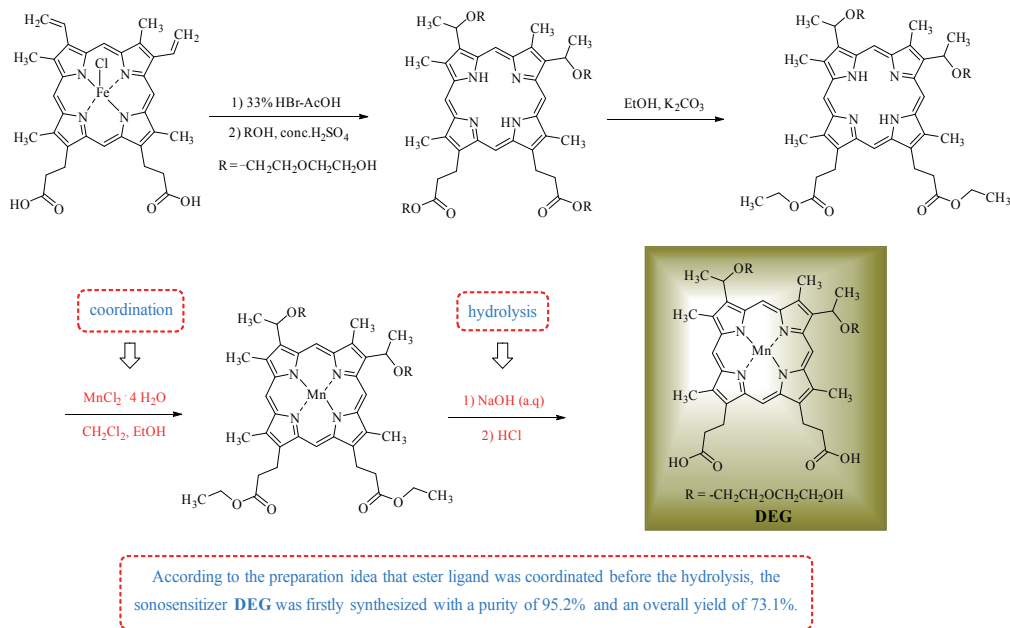
(Z)-Flupentixol (**8**) was separated via a new method with a purity of 99.9% and a yield of 29.6%, and the separation method has been patented and authorized in 2009.

- 396 培美曲塞二丙氨酸盐的合成·····高 纪, 许建国, 臧 超, 唐云峰, 张贵民*
 Synthesis of Pemetrexed Dialanine·····GAO J, XU J G, ZANG C, TANG Y F, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.004

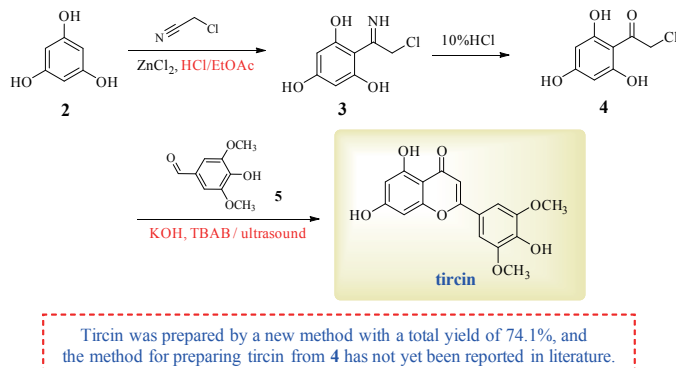


Pemetrexed dialanine which has more stable property was obtained with a purity of 99.5% and an overall yield of 69%.

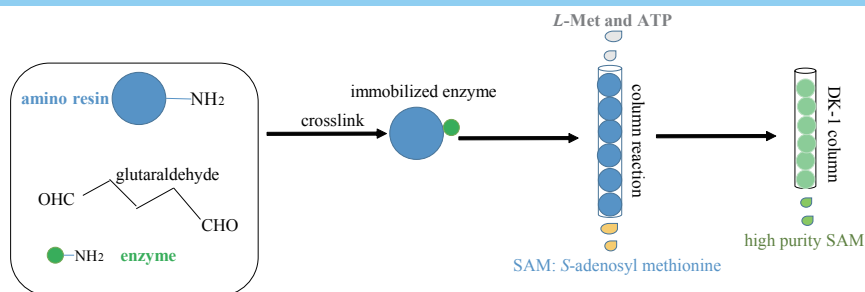
399 声敏剂DEG的合成……………陈俊磊, 赵明*, 时志春, 李军, 张树军
 Synthesis of Sonosensitizer DEG……………CHEN J L, ZHAO M*, SHI Z C, LI J, ZHANG S J
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.005



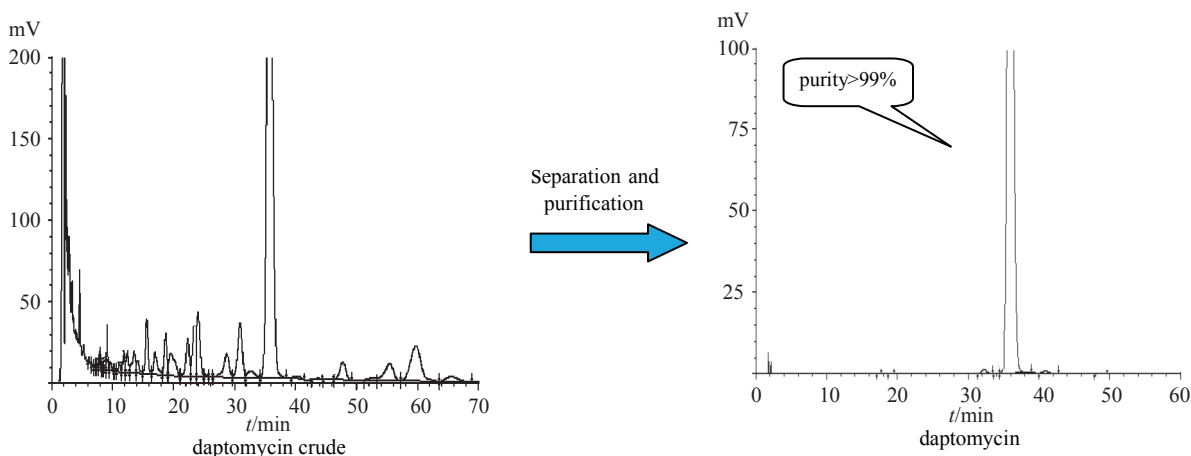
403 超声波相转移催化合成苜蓿素……………褚朝森, 王晓丽, 胡玉涛, 李天雪, 王政
 Synthesis of Tricin by Ultrasonic Phase Transfer Catalysis……………
 ………………CHU C S, WANG X L, HU Y T, LI T X, WANG Z
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.006



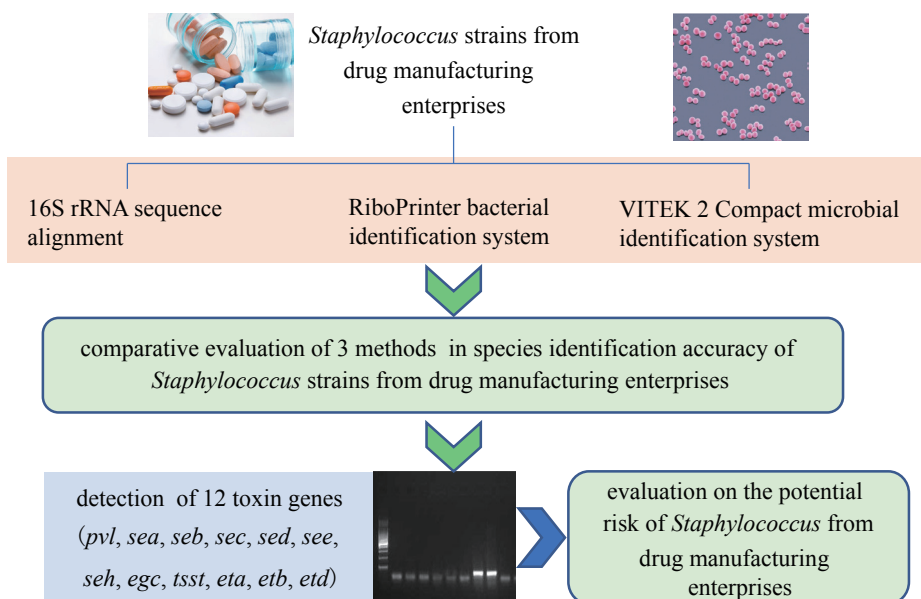
406 嗜热S-腺苷甲硫氨酸合成酶的固定化及S-腺苷甲硫氨酸的制备……………
 ………………化浩举, 吴勇, 黄宗庆, 张喜全, 冯军*
 Immobilization of Thermophilic S-Adenosylmethionine Synthetase and Preparation of S-Adenosylmethionine……………
 ………………HUA H J, WU Y, HUANG Z Q, ZHANG X Q, FENG J*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.007



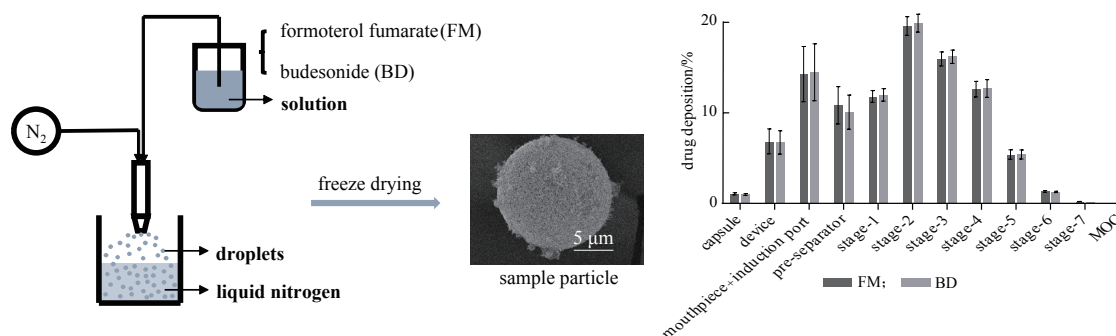
- 411** 达托霉素的分离纯化工艺.....郭朝江, 王 蒙, 刘 忠, 李春利, 张贵民*
 Separation and Purification Process of Daptomycin.....
GUO C J, WANG M, LIU Z, LI C L, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.008



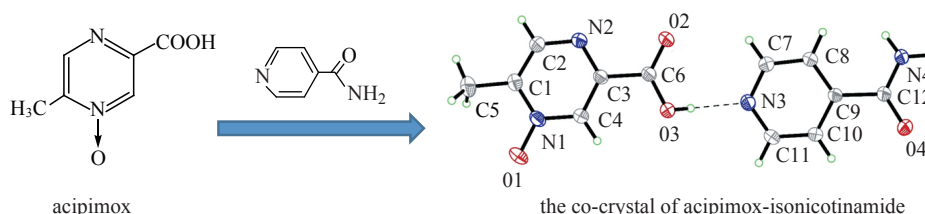
- 416** 制药企业生产环境中污染葡萄球菌菌种鉴定方法的比较评价及毒素基因调查分析.....
李琼琼, 宋明辉, 秦 峰, 刘 浩, 杨美成*
 Species Identification Analysis by Different Methods and Toxin Genes Detection of *Staphylococcus*
 Strains Isolated from Drug Manufacturing Enterprises.....
LI Q Q, SONG M H, QIN F, LIU H, YANG M C*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.009



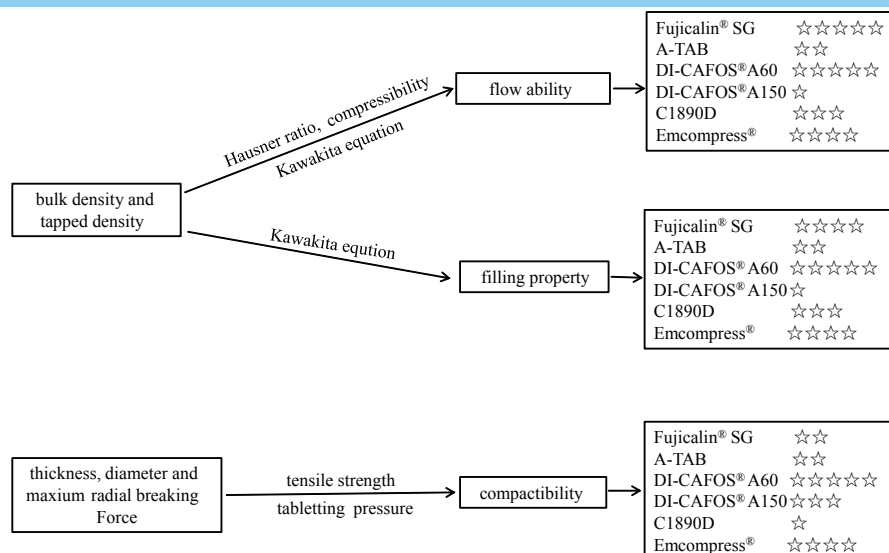
- 422 喷雾冷冻干燥法制备布地奈德富马酸福莫特罗干粉吸入颗粒及其特性评价.....许 莹, 王嘉新, 栾瀚森*, 王 浩
Preparation and Physicochemical Characterization of Budesonide and Formoterol Fumarate Composite Particles for Dry Powder Inhalation by Spray Freeze-drying.....XU Y, WANG J X, LUAN H S*, WANG H
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.010



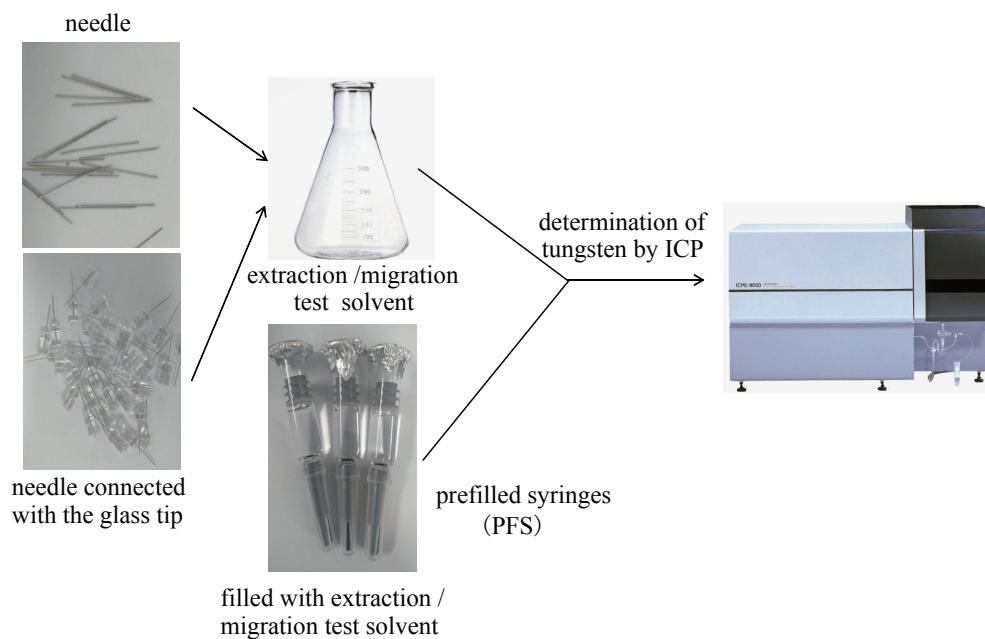
- 430 阿昔莫司-异烟酰胺共晶的制备、表征及性质研究.....郭立红, 夏祥来, 翟立海, 张贵民*
Preparation, Characterization and Properties of Acipimox-isonicotinamide Co-crystal.....GUO L H, XIA X L, ZHAI L H, ZHANG G M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.011



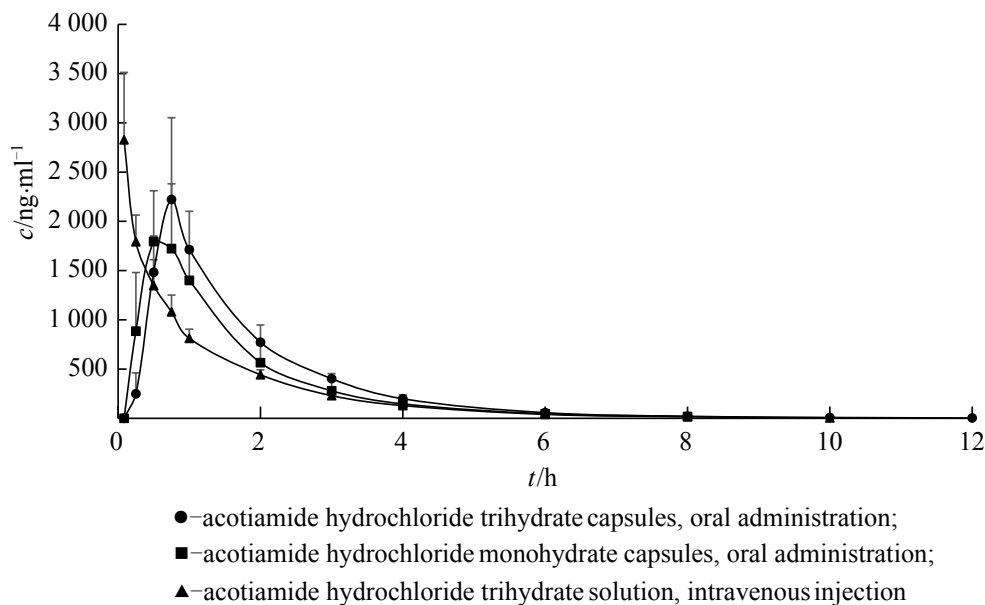
- 436 直接压片辅料无水磷酸氢钙的粉体学性质评价.....杨秋霞, 肖 燕, 陆伟根, 奚 泉*
Evaluation of Micromeritic Properties of Anhydrous Dicalcium Phosphate for Direct Compression.....YANG Q X, XIAO Y, LU W G, XI Q*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.012



441 ICP 法测定预灌封注射器中的可提取总钨量·····侯晴晴, 张 兵, 朱涵超, 张毅兰*
Determination of Total Tungsten Extracted from Prefilled Syringes by ICP·····
·····HOU Q Q, ZHANG B, ZHU H C, ZHANG Y L*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.013



445 两种盐酸阿考替胺水合物在Beagle 犬体内的药动学·····肖小阳, 张国顺, 张淑秋*
Pharmacokinetics of Two Forms of Acotiamide Hydrochloride Hydrate in Beagle Dogs·····
·····XIAO X Y, ZHANG G S, ZHANG S Q*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.014



- 450** 基于注册申请人视角的药品优先审评制度实施情况调查分析·····陆承坤, 王雨杉, 蒋 蓉, 邵 蓉*
Investigation and Analysis of the Implementation of Drug Priority Review System Based on the
Perspective of Registered Applicants·····LU C K, WANG Y S, JIANG R, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.015
- 456** 医药工业的计算机化过程中遗留系统的验证策略·····赵晨阳, 朱建伟*
Validation Strategy for Legacy Systems in Computerization of Pharmaceutical Industry·····
·····ZHAO C Y, ZHU J W*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.016
- 464** GMP 背景下的制药企业六西格玛管理应用研究: 以BT 公司为例·····李东昂, 梁 毅*
Application of Six Sigma Management in Pharmaceutical Enterprises Based on GMP: A Case from
BT Company·····LI D A, LIANG Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.017

· 其他 ·

广告索引 (402)

《中国医药工业杂志》征订 (470)

制剂技术文摘 P50-4~6 (391) P50-7~8 (463) P50-9 (469)

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第4期 4月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.4 April 10, 2019

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	刘玲玲	Executive Editor	LIU Lingling
编 辑 出 版	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号 (200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62474272	Tel	021-62474272
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com	E-mail	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*112*zh*P*20.00* *17*2019-04

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

嗜热 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶的固定化及 *S*-腺苷甲硫氨酸的制备

化浩举¹, 吴 勇¹, 黄宗庆¹, 张喜全², 冯 军^{1*}

(1. 上海多米瑞生物技术有限公司, 上海 201203; 2. 正大天晴药业集团股份有限公司, 江苏南京 210000)

摘要: 本研究以固定化酶比活力、酶活力回收率和反应稳定性为指标, 比较了氨基树脂和环氧树脂固定 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶的差别。结果显示氨基树脂固定化效果好, 固定化酶比活力为 (27.91 ± 1.33) U/g, 固定化酶活力回收率为 $(25.78 \pm 1.23)\%$, 连续反应稳定性好。优化后固定化酶的反应条件如下: 上样体积为 20 BV, 流速为 3 BV/h, 盐类型为硫酸钾与硫酸镁, 产物 *S*-腺苷甲硫氨酸的摩尔转化率达 $(61.78 \pm 1.91)\%$ 。固定化酶反应液经 DK-1 阳离子交换色谱柱纯化后得到纯度大于 98% 的 *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM), 收率为 $(71.50 \pm 1.61)\%$ 。

关键词: *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶; *S*-腺苷甲硫氨酸; 固定化; 纯化

中图分类号: TQ426.97 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)04-0-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.007

Immobilization of Thermophilic *S*-Adenosylmethionine Synthetase and Preparation of *S*-Adenosylmethionine

HUA Haojū¹, WU Yong¹, HUANG Zongqing¹, ZHANG Xiquan², FENG Jun^{1*}

(1. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203; 2. Chia-tai Tianqing Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210000)

ABSTRACT: The specific activities of immobilized enzyme, recoveries of enzyme activity and stabilities of continuous reaction were compared between amino resin and epoxy resin in the immobilization of *S*-adenosylmethionine synthetase. The results showed that amino resin was an effective immobilized matrix for *S*-adenosylmethionine synthetase with good stability of continuous reaction. The specific activity of immobilized enzyme and recovery rate of enzyme activity were (27.91 ± 1.33) U/g and $(25.78 \pm 1.23)\%$. The optimal reaction conditions of immobilized enzyme were listed as follows: the sample volume was 20 BV with the flow rate of 3 BV/h. The salt types were potassium sulfate and magnesium sulfate. The molar conversion rate of *S*-adenosylmethionine was up to $(61.78 \pm 1.91)\%$. The immobilized enzyme reaction solution was purified by DK-1 cation exchange chromatographic column. *S*-Adenosylmethionine with the purity more than 98% was obtained and the yield was $(71.50 \pm 1.61)\%$.

Key Words: *S*-adenosylmethionine synthetase; *S*-adenosylmethionine; immobilization; purification

S-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl methionine, SAM, **2**) 是生物体中重要的代谢中间体, 参与了生物体内 40 多种代谢过程^[1]。**2** 在临床上可用于肝脏损伤、关节炎、抑郁症和胆汁淤积的治疗, 同时

还可以作为保健品用来预防癌症和减缓衰老^[2-3]。我国肝病患者众多, **2** 具有非常好的销售前景。目前 **2** 的工业化生产方法主要是酵母菌发酵法, 该方法存在发酵操作体积大、杂质含量高和纯化步骤多等缺点, 同时伴有废水产生多和环保压力大的问题^[4]。近年来酶促转化法生产 **2** 成为研究热点, 主要利用 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶 (*S*-adenosyl methionine synthetase, **1**) 催化 *L*-甲硫氨酸 (*L*-methionine, *L*-Met) 与三磷酸腺苷 (adenylate triphosphate, ATP) 完成, 但由于游离酶催化存在产物不易分离和酶难以回收等问题, 因此采用固定化酶法是较好的选择^[5]。

收稿日期: 2019-01-29

作者简介: 化浩举(1991—), 男, 硕士, 从事酶的固定化研究。

Tel: 021-20572000×8715

E-mail: hhjatcpu@163.com

通信联系人: 冯 军(1971—), 男, 博士, 研究员, 从事蛋白质与多肽药物研究。

Tel: 021-20572000×8718

E-mail: fengj31@aliyun.com

本研究采用来源于古菌属詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 的 **1** 进行固定化研究, 该酶具有活性高和热稳定性好的优点, 方便操作^[6]。

1 仪器与试剂

JY92-II 型超声波细胞粉碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Alliance 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); SCG-100 型蛋白色谱系统 (苏州赛谱科技有限公司); 8200 型搅拌型超滤杯 (德国 Merck 公司)。

重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-MjSAM 由本实验室构建 (构建于 20140812); 丁二磺腺苷蛋氨酸对照品 (江苏正大天晴药业股份有限公司, 纯度 51.3%, 批号 20170110); 环氧树脂 LX-1000EP (批号 20160323) 和氨基树脂 LX-1000HA (批号 20160323) (西安蓝晓科技新材料股份有限公司); 30 kDa 超滤膜 (德国 Merck 公司, 批号 C8MA27302); 硫酸卡那霉素 (kanamycin sulfate, Kan, 批号 B817BA0104)、异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG, 批号 E112BA0015) 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 D619DA0001) (均购自上海生工生物工程股份有限公司); 预染蛋白质分子量标准品 (ProteinRuler I Marker, 北京全式金生物科技有限公司, 批号 L10406); 1,4-丁二磺酸 (江苏宇田生物医药科技有限公司, 含量 64.41%, 批号 P017161203); 三磷酸腺苷二钠 (ATP- Na_2 , 上海峥晨科技有限公司, 批号 151108); DK-1 树脂 (上海安澜德生物科技有限公司, 批号 20150716), 其余试剂均为分析纯。

培养基 I /g·L⁻¹: 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, Kan 0.1; pH 7.0。

培养基 II /g·L⁻¹: 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 氯化钠 20, Kan 0.1; pH 7.0。

2 方法与结果

2.1 酶活力的测定

取适量酶加入下述反应体系: 0.3 mol/L 氯化钾 (KCl)、0.04 mol/L 氯化镁 (MgCl_2)、0.016 mol/L ATP、0.032 mol/L L-Met 和 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 置 60 °C 反应 20 min, 用 HPLC 检测产物 **2** 的生成量。酶活力为在 pH 8.0 条件下于 60 °C 反应 20 min, 每 10 min 生成 1 μmol **2** 所需的酶量即为 1 个酶活力单位 (U)。酶比活力定义为 1 mg 酶所具

有的活力单位。

色谱条件: 色谱柱 Shodex C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.63% 甲酸铵-0.14% 1-庚烷磺酸钠溶液 (pH 2.8); 甲醇 (80:20); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μl 。

2.2 1 浓缩液的制备

将重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-MjSAM 接种至培养基 I 30 ml 中, 37 °C 振荡 (220 r/min) 培养 12 h, 按 2% 接种量转接于培养基 II 100 ml 中摇瓶培养, 37 °C 振荡 (220 r/min) 培养 4 h, 加入 IPTG 至浓度为 0.1 mmol/L, 调整温度至 25 °C, 继续培养 12 h, 结束后取发酵液离心 (6 000×g) 10 min, 收集沉淀菌体。按照每克湿菌体加入破胞液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 10 ml, 混匀后超声破碎菌体 (工作时间 5 s, 间歇 10 s, 功率 400 W, 循环工作 7 次)。破碎上清液置 70 °C 水浴 20 min, 结束后立即恢复至室温, 离心 (12 000×g) 10 min, 收集上清液得到 **1** 液, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析 (图 1), 结果显示, 粗酶液中含有较多的杂蛋白, 经过 70 °C 水浴后得到了较纯的 **1** 液。按“2.1”项下测定酶比活力, 结果为 (2.165±0.080) U/mg。1 液用 30 kDa 超滤膜进行浓缩, 再用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PB, pH 8.0) 顶洗 3 次, 得到 **1** 浓缩液, 用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定 **1** 的含量为 (19.09±0.39) mg/ml。

2.3 固定化酶活力的测定

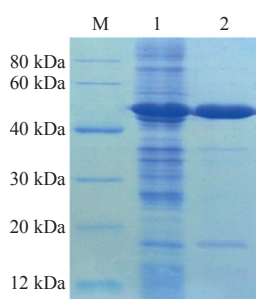
固定化酶活力的测定方法参照“2.1”项。固定化酶活力回收率按式①计算, 2 摩尔转化率按式②计算。固定化酶比活力定义为固定化 **1** 后 1 g 树脂所具有的酶活力 (U)。

$$\text{固定化酶活力回收率 (\%)} = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{投入游离酶总活力}} \times 100 \quad ①$$

$$\text{2 摩尔转化率 (\%)} = \frac{\text{反应产生 2 摩尔数}}{\text{投入底物完全转化产生 2 摩尔数}} \times 100 \quad ②$$

2.4 2 种树脂共价固定化 **1** 的比较

环氧树脂固定化酶: 取环氧树脂 10 g, 加入 0.1 mol/L PB (pH 8.0) 100 ml, 室温放置, 每隔 1 h 振摇数次, 持续 5 h 后在室温静置浸泡 10 h。抽



M-Marker; 1-粗酶液; 2-1液

图1 1的SDS-PAGE分析结果

Fig.1 SDS-PAGE Analysis Result of 1

滤弃去上清液，剩余的环氧树脂用0.1 mol/L PB (pH 8.0) 洗涤3次。取1浓缩液与上述活化树脂混合，10 g树脂中加入26.2 ml的1浓缩液、4 ml的1 mol/L PB (pH 8.0) 和9.8 ml的去离子水，在20℃、100 r/min 振摇18 h。抽滤弃去上清液，用0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤3次，得到环氧树脂固定化酶。用少量0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 浸泡固定化酶，置4℃保存。

氨基树脂固定化酶：取氨基树脂10 g，加入0.1 mol/L PB (pH 8.0) 100 ml，室温放置，每隔1 h 振摇数次，持续5 h后在室温下静置浸泡10 h。抽滤弃去上清液，剩余的氨基树脂用0.1 mol/L PB (pH 8.0) 洗涤3次。取10 g树脂加入20 ml的10% 戊二醛和80 ml的0.1 mol/L PB 缓冲液 (pH 8.0)，在20℃放置，每隔1 h 振摇数次，持续3 h。抽滤弃去上清液，用0.1 mol/L PB (pH 8.0) 洗涤3次以除去残留的戊二醛。取1浓缩液与上述活化树脂混合，10 g树脂中加入26.2 ml的1浓缩液、4 ml的1 mol/L PB (pH 8.0) 和9.8 ml的去离子水。在20℃、100 r/min 条件下振摇18 h。抽滤弃去上清液，用0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤3次，用少量0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 浸泡固定化酶，置4℃保存。

按“2.2”项下方法测定上述固定化酶比活力，并计算固定化酶活力回收率，结果见表1。环氧树脂对1的结合量比氨基树脂稍高，但是固定化酶比活力和酶活力回收率明显低于氨基树脂。推测环氧树脂与1结合时由于1分子空间半径较大，树脂表面键合的1的活性中心相互掩盖，导致固定化酶比活力和固定化酶活力回收率低。而氨基树脂与1结合时由于戊二醛的“架桥作用”，可避免1的活性中心相互掩盖。综上，从固定化酶比活力和固定化酶活力回收率分析，氨基树脂优于环氧树脂。

2.5 2种固定化酶连续反应稳定性的比较

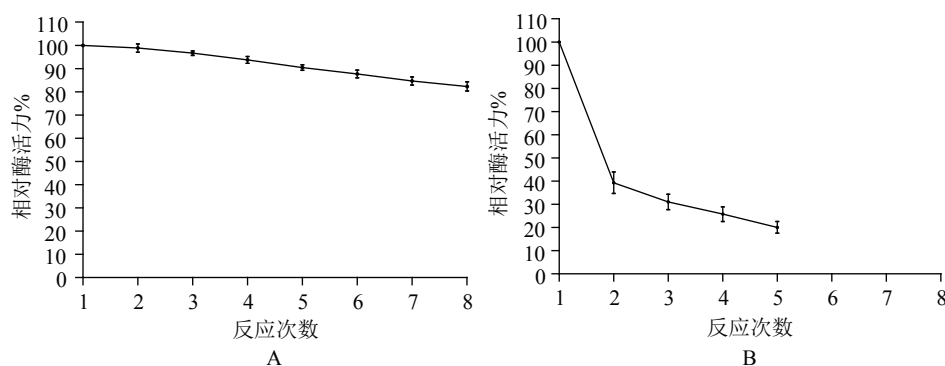
反应使用体系和条件参见“2.1”项，置60℃振荡 (50 r/min) 反应20 min，反应结束后直接抽滤，滤液稀释5倍后按“2.1”项下HPLC方法测定2含量并计算相对活力 (以第一次反应的酶活力为100%)。1次反应结束后，固定化酶用50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤3次后重复“2.1”项下方法进行下一次反应，结果见图2。氨基树脂固定化酶连续反应8次后，酶相对活力仍在80%以上。环氧树脂固定化酶在第2次反应后相对酶活力已低于50%，第5次反应后相对酶活力损失约80%，说明氨基树脂固定化酶具有较好的反应稳定性。综上，本研究选择氨基树脂固定化1进行后续实验。

2.6 固定化酶装柱反应条件的优化

取固定化酶装入3个相同含夹套的色谱柱内，固定化酶装柱体积均为20 ml，夹套温度控制60℃，上样体积为200 ml，pH 8.0，流速分别为0.5、1、2和5 ml/min，合并流出液后测定2摩尔转化率。从图3可以看出，当流速为1 ml/min时，2摩尔转化率最高；当流速在2或5 ml/min时，底物与固定化酶接触时间过短导致反应不充分，2摩尔转化率较低；流速0.5 ml/min时的2摩尔转化率略低于流速1 ml/min，原因是产物2在高温 (60℃) 条件下停

表1 固定化酶的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Tab.1 Comparison of Immobilized Enzymes ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

载体	单位载体结合酶量/mg·g ⁻¹	固定化酶比活力/U·g ⁻¹	固定化酶活力回收率/%
环氧树脂	28.64±4.15	17.94±2.12	16.57±1.96
氨基树脂	26.90±2.56	27.91±1.33	25.78±1.23



A: 氨基树脂, B: 环氧树脂

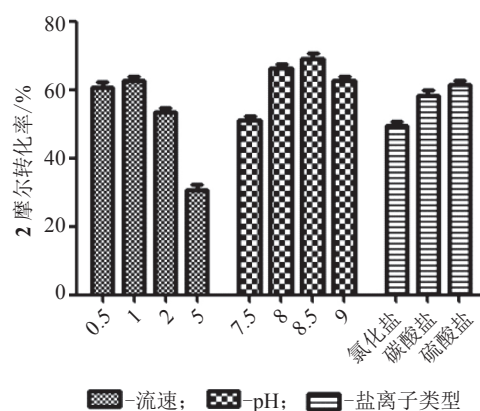
图2 固定化酶连续反应稳定性的比较 ($n=3$)Fig.2 Comparison of Stabilities of Immobilized Enzymes in Continuous Reaction ($n=3$)

留时间过长出现严重降解,不利于后续纯化。在流速 1 ml/min 条件下,将上样体系的 pH 分别设置为 7.5、8.0、8.5 和 9.0 进行比较分析。pH 8.5 时 2 摩尔转化率最高,说明在一定范围内,随着 pH 的升高,固定化酶活性逐渐增强,2 摩尔转化率逐渐增高,当 pH 9.0 时,碱性过强导致酶活性降低,转化率下降。

在流速 1 ml/min 和 pH 8.5 的条件基础上,将反应体系中的氯化钾和氯化镁分别替换为碳酸钾和碳酸镁及硫酸钾和硫酸镁进行试验并比较。结果发现当上样体积为 200 ml 时,3 个条件下的 2 摩尔转化率相差不大,考虑后期放大生产,将上样体积增加至 400 ml。图 3 中,采用含有二价阴离子的无机盐后转化率均有所提高且硫酸盐效果好于碳酸盐,推测是氨基树脂上残留的氨基吸附了酶促反应产生的磷酸根和焦磷酸根,进而抑制了固定化酶的活性,二价阴离子能够与磷酸根发生交换从而减弱抑制作用。综上,固定化酶最佳的装柱反应条件为固定化酶装柱体积 20 ml,流速 1 ml/min,无机盐为硫酸钾和硫酸镁,上样体积 400 ml,在此条件下 2 摩尔转化率为 $(61.78 \pm 1.91)\%$ 。

2.7 2 的纯化

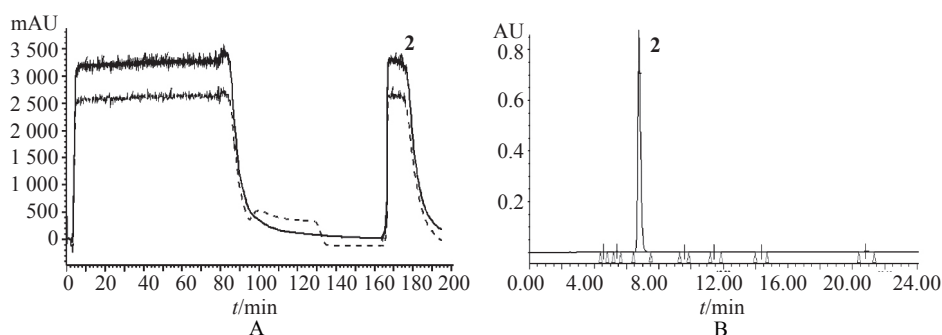
取“2.6”项下经固定化酶反应后含 2 的反应液 160 ml,加 6 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 4.0,上样于阳离子交换色谱柱^[7]。纯化系统为 SCG-100 型蛋白色谱系统[色谱柱 DK-1 柱 (10 mm×180 mm, 100~200 μm);流速 2 ml/min;检测波长 260 和 215 nm]。上样结束后分别用 2 BV 的去离子水、

图3 固定化酶装柱反应条件的优化 ($n=3$)Fig.3 Optimization of Immobilized Enzyme Column Conditions ($n=3$)

5 BV 的 100 mmol/L 乙酸、5 BV 的去离子水和 5 BV 的 100 mmol/L 丁二磺酸依次洗脱,2 在丁二磺酸洗脱时出峰(图 4A),纯度达到 98% 以上(图 4B),收率为 $(71.50 \pm 1.61)\%$ 。

3 讨论

关于酶的固定化目前没有统一适用的理论和方法。已报道的 1 的固定化方法均存在一些问题,使用 Ni 离子螯合柱固定化 1,不仅树脂价格昂贵,而且 3 次连续反应后固定化酶活力回收率仅剩 39.5%^[8]。尹春丽等通过海藻酸钠和明胶包埋法、壳聚糖与戊二醛交联法得到的固定化 1 存在机械强度低、重复使用过程中容易破碎以及固定后反应时间过长等问题^[9-10]。卢泓宇等通过离子交换树脂键合法得到固定化 1,不仅反应时间长,而且不能耐



A: DK-1 层析色谱图, B: HPLC 色谱图

图 4 2 纯化过程图谱

Fig.4 Chromatograms of 2 During the Purification Process

受高离子浓度, 难以在工业生产中应用^[11]。氨基树脂成本低、固定化后的酶比活力和酶活力回收率较高, 连续反应稳定性好且机械强度高, 具有明显的优势。

本研究使用重组大肠杆菌表达 1, 并利用 1 的耐热特性, 采用高温水浴的方法直接获得了电泳纯度较高的 1 液, 利用戊二醛交联法实现了氨基树脂对 1 的固定化, 固定化酶连续反应 8 次后相对酶活力仍在 80% 以上。2 极不稳定, 在常规酶促反应条件下制备 2 时, 若周期较长容易产生降解和氧化杂质, 增加纯化难度且难以保证较高的纯化收率^[12]。本研究进一步探讨固定化酶装柱反应的条件, 优化 2 的纯化方法, 得到了柱上操作方便、时间短 (20 min) 且产物 2 摩尔转化率高的反应条件。后续 2 的反应液直接上样 DK-1 树脂柱进行纯化, 方法简单, 纯度和收率高, 具有较好的工业化前景。

参考文献:

- [1] YUAN C S, YE Q Z, XIE S X. Methods for assaying inhibitors of *S*-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase and *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase: US, 2005 7384760 [P]. 2005-11-03.
- [2] LIEBER C S. *S*-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects-an introduction [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, **76**(5): 1148S-1150S.
- [3] MUDD S H, POOLE J R. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens [J]. *Metab*, 1975, **24**(6): 721-735.
- [4] HE J, DENG J, ZHENG Y, *et al*. A synergistic effect on the production of *S*-adenosyl-*L*-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of *S*-adenosyl-*L*-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase [J]. *J Biotechnol*, 2006, **126**(4): 519-527.
- [5] 秦胜利, 于建生. 酶固定化技术研究进展[J]. 河南化工, 2011, **28**(5): 24-25.
- [6] GRAHAM D E, BOCK C L, SCHALK-HIHI C, *et al*. Identification of a highly diverged class of *S*-adenosylmethionine synthetases in the archaea [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 4055-4059.
- [7] BARBATO G, CALABRIA R, CARTENÍ-FARINA M, *et al*. A physico-chemical approach to the study of the binding interaction between *S*-adenosyl-*L*-methionine and polyanions: binding constants and nature of the interaction with sodium poly(styrene sulfonate) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **991**(2): 324-329.
- [8] LUO Y, YUAN Z, LUO G, *et al*. Expression of secreted his-tagged *S*-adenosylmethionine synthetase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its characterization, one-step purification, and immobilization [J]. *Biotechnol Progr*, 2008, **24**(1): 214-220.
- [9] 尹春丽, 曹珊珊, 牛卫宁. 海藻酸钠固定化*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶的制备及其性质研究[J]. 化学与生物工程, 2012, **29**(10): 21-24.
- [10] 尹春丽, 陶桂荣, 许乐, 等. 壳聚糖固定化*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶[J]. 食品与生物技术学报, 2013, **32**(9): 945-950.
- [11] 卢泓宇, 姚文兵, 徐明波, 等. 树脂载体固定*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶的研究[J]. 生物技术, 2012, **22**(1): 90-93.
- [12] MORANA A, STIUSO P, COLONNA G, *et al*. Stabilization of *S*-adenosyl-*L*-methionine promoted by trehalose [J]. *Bba-gen Subjects*, 2002, **1573**(2): 105-108.