

# 固定化犁头霉菌在含有丙二醇的体系中转化 RSA 为皮质醇

王 俊\* 陈长治 李保安 张金红 俞跃庭

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

皮质醇是重要的甾体激素类药物之一,目前国内采用淡紫色犁头霉菌(*Absidia orchidis*)催化 11-脱氧皮质醇醋酸酯(RSA)生成皮质醇。RSA 首先转化为中间体 11-脱氧皮质醇(RS),在 11-位羟化酶作用下生成皮质醇( $\beta$ 体)和表皮固醇异构体( $\alpha$ 体)及少量副产物,其中  $\beta$ 体为目的产物。反应是在水相中进行的,存在着反应底物浓度低,皮质醇产率低,仅为 45%~50%, $\beta$ 体与  $\alpha$ 体的比值( $\beta/\alpha$ )为 0.9-1.2 且不能连续生产等问题<sup>[1]</sup>。有文献报道<sup>[2-3]</sup>,在反应体系中加入有机溶剂可影响酶催化的立体选择性。为此本文采用固定化细胞,在反应体系中添加一定量 1,2-丙二醇,以增加底物(RSA)的溶解性,并试图提高产物中  $\beta/\alpha$  值,提高  $\beta$ 体的产率。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及药品

淡紫色犁头霉菌由天津药业公司提供;RSA 由东北制药总厂提供;其它药品均为市售。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种培养:**采用土豆汁斜面接种后,28℃培养 4~5d。摇瓶培养:培养基组成(g/L):无水葡萄糖 10,玉米浆 12,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,酵母膏 2.5,加水至 1L 煮沸,待冷却后调 pH 至 6.4。120℃灭菌 25min,培养 10h,待固定化用。

**1.2.2 固定化细胞的制备:**取上述培养液 2ml,放入 10ml 量筒中,加入 2ml 4%海藻酸钠溶液,用玻璃棒混匀。用滴管吸取混合液滴入 0.5mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中,在磁力搅拌下,交联固化成球。固化 1h 后,用无菌水洗 2 次,得直径 2~3mm 小球。

**1.2.3 转化反应:**将固定化细胞置于 50ml 三角瓶中,加入 16ml 液体培养基,并加入 0.8ml Tween80,在 28℃、150r/min 的恒温振荡器中增殖 18h。另称 50mg RSA,加入 2.5ml 1,2-丙二醇,加热至底物完全溶解(120℃),趁热(RSA 未析出)将该混合液缓慢倒入上述固定化细胞培养液中,边倒边振荡使底物分散均匀。调反应液 pH 为 5.8,并调体积至 20ml。转化条件为 28℃,150r/min,反应 45h。反应过程中,每 6~10h 调一次 pH 值至 5.8。

**1.2.4 分析方法:**高压液相色谱法(HPLC)检测。取 2ml 反应液于一试管中,加入 2ml 乙酸乙酯,用硫酸纸封口,加热至初沸。待溶液冷却,从酯层取 1ml,加入 2% ml 甲醇-水溶液(60:40)混匀。用孔径为 0.45-0.6 $\mu$ m 的滤膜过滤。取滤液 1ml 待测。检测条件:C-18 反相色谱柱;流动相:甲醇-水(60:40);流速:1ml/min,进样量:20 $\mu$ l;紫外检测波长:254nm。根据底物与样品在相同条件下 HPLC 检测所得峰面积的比值确定  $\beta$ 体生成率和  $\beta/\alpha$  值。

$$\beta \text{体生成率}(\%) = (\beta \text{体峰面积} / \text{反应前底物峰面积}) \times 100\%$$

$$\text{反应前底物峰面积} = \text{反应后}(\text{残留 RSA} + \text{残留 RS} + \alpha \text{体} + \beta \text{体} + \text{副产物}) \text{峰面积}$$

$$\beta/\alpha = \beta \text{体峰面积} / \alpha \text{体峰面积}$$

\* 现工作单位:广州暨南大学生物工程学系,广州 510632。

本文于 1995 年 1 月 23 日收到。

## 2 结果

### 2.1 1,2-丙二醇浓度的选择

研究了不同浓度丙二醇对转化反应的影响(图1)。结果表明,当反应体系中1,2-丙二醇浓度为12.5%时, $\beta$ 体生成率最高为59.5%, $\beta/\alpha$ 值为2.3;高于或低于此浓度 $\beta$ 体生成率均会降低。但 $\beta/\alpha$ 值随1,2-丙二醇浓度增大而增加。当1,2-丙二醇为20%时,已不能检测出 $\beta$ 体和 $\alpha$ 体的生成。

### 2.2 表面活性剂对转化的影响

在分别含有不同浓度的表面活性剂 Tween80 或 Span80 的体系中进行转化反应。结果列于表1。

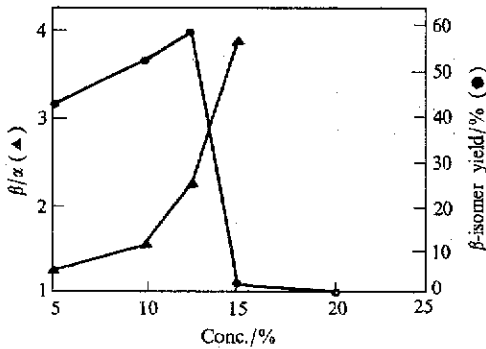


图1 1,2-丙二醇浓度对转化反应的影响

▲  $\beta/\alpha$ , ●  $\beta$ 体生成率

由表1可见,Span80和Tween80均使 $\beta$ 体生成率显著提高。当反应体系中表面活性剂为4%时,含Tween80和Span80两反应体系的 $\beta$ 体生成率均达到最高值。其中前者是未加入表面活性剂时的反应体系的 $\beta$ 体生成率的4.7倍。

### 2.3 pH值对转化的影响

选择不同pH值的反应体系分别进行转化(图2)。结果表明,固定化细胞与游离细胞在pH5.8时, $\beta$ 体生成率均最高。当pH>7.0或pH<5.2时,与固定化细胞相比,游离细胞 $\beta$ 体相对生成率较低。这表明固定化细胞有较强的抗酸碱碱性。

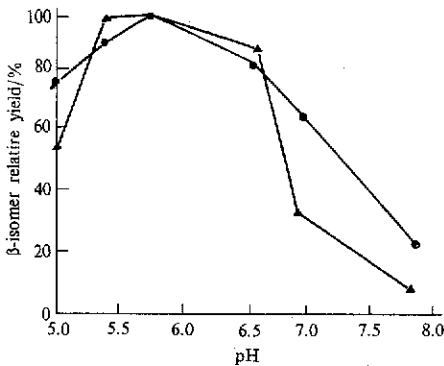


图2 pH对转化反应的影响

▲ 游离细胞, ● 固定化细胞

表1 表面活性剂对转化反应的影响

Conc./%	$\beta$ isomer yield/%	$\beta/\alpha$	Remnant RSA/%
Span80			
0	11.6	1.6	51.5
2.5	21.7	2.2	42.6
4.0	39.5	2.4	13.4
5.0	39.4	2.8	8.5
7.5	36.0	2.5	11.4
Tween80			
2.5	51.2	2.1	6.7
4.0	55.0	2.3	0.0
5.0	47.1	2.1	1.7
7.5	44.1	2.0	0.0

注:固定化时取2.5ml 4%海藻酸钠溶液与2.5ml培养液混匀固化成球。

### 2.4 温度对转化的影响

固定化细胞在不同温度下进行转化,其转化情况列于表2。

表2 固定化细胞的最适反应温度

t/°C	$\beta$ isomer yield/%	$\beta/\alpha$	Remnant RSA/%
24	53.0	2.2	0.0
28	61.0	2.4	0.0
32	54.0	2.1	0.0

结果表明,28°C为最佳转化温度。这与游离细胞的最适转化温度相同。在此温度下,RSA全部转化, $\alpha$ 体与 $\beta$ 体共占86.4%,副产物与少量残留RS占13.6%。将同样条件下制备的固定化细胞与游离细胞分别在不同温度下保温1h,然后在28°C进行转化反应(图3)。结果表明,细胞经固定化后热稳定显著提高。

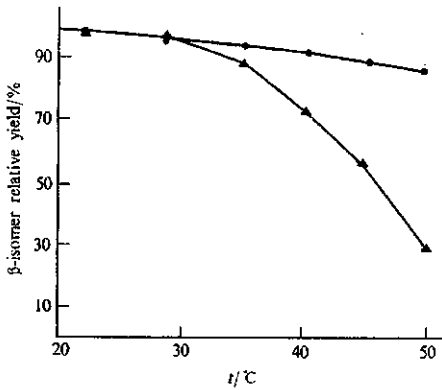


图3 固定化细胞与游离细胞热稳定性比较

▲游离细胞 ●固定化细胞,  $t/^\circ\text{C}$  为保温 1h 的温度

物浓度增加,有利于转化反应的进行。文献<sup>[4]</sup>有类似报道。另外,表面活性剂还可增加细胞膜的通透性<sup>[5]</sup>,有利于 RSA 进入细胞膜内。

### 3 讨论

反应体系中加入 1,2-丙二醇,可将  $\beta/\alpha$  值提高到 2.3~2.5,  $\beta$  体生成率提高到 60% 左右。出现这种情况的可能原因是:一方面由于 RSA 微溶于水,通过加入 1,2-丙二醇增加了底物的溶解度,有利于转化反应的进行;另一方面,1,2-丙二醇抑制了  $11\alpha$ -羟化酶而增加了  $11\beta$ -羟化酶的活性,从而提高了  $\beta/\alpha$  值。尽管反应体系中,增加 1,2-丙二醇浓度有利于提高  $\beta/\alpha$  比值,但当其浓度大于 12.5% 时,  $\beta$  体生成率却迅速降低,这可能是由于过高浓度的 1,2-丙二醇对酶的催化起了抑制作用。由于海藻酸钙凝胶是亲水性载体,疏水性较强的 RSA 要通过载体进入细胞比较困难,为此本实验在反应体系加入了表面活性剂。表面活性剂是由亲水集团和疏水集团构成,其疏水集团易于吸引疏水底物,而亲水集团则易于与亲水载体相吸引,从而使载体中底

### 参考文献

- [1] 俞俊棠,唐孝宣主编. 生物工艺学(下册),上海:华东化工学院出版社,1992, p291.
- [2] 俞跃庭,徐越平,高春丽. 生物工程进展,1992,12(4):19~24.
- [3] Kirchner G, Scollar M P. J Am Chem Soc, 1985, 107:7072~7076.
- [4] Cao G, Yan Feng, Tao Yu *et al.* Biochemical Engineering, 1992, 54:103~105.
- [5] 邬显章. 酶的工业生产技术,长春:吉林科学技术出版社,1988, pp.40~41.

## Conversion of RSA into Hydrocortisone by Immobilized *Absidia orchidis* in a Propanediol-containing System

Wang Jun Chen Changzhi Li Baoan Zhang Jinhong Yu Yaoting

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** In order to raise the yield of hydrocortisone from RSA, *Absidia orchidis* was immobilized with calcium alginate gel, and the conversion was conducted in a 1,2-propanediol-containing system. Experimental results showed that the  $\beta/\alpha$  ratio of the product was 2.3~2.5 and the yield of  $\beta$  isomer was reached to 60% in this paper comparing with  $\beta/\alpha$  of 0.9~1.2 and  $\beta$  isomer yield of 45%~50% in the aqueous solution by free *Absidia orchidis*. When Tween80 was added to the reaction system, the  $\beta$  isomer yield was increased remarkably. The optimum pH value was 5.8 and the optimum conversion temperature was 28°C.

**Key words** Immobilized cell, *Absidia orchidis*, hydrocortisone, 1,2-propanediol