

# 用固定化简单节杆菌细胞转化氢化可的松

杨廉婉 钟丽婵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

前文报道了产3-甾酮- $\Delta'$ -脱氢酶的简单节杆菌固定化细胞的制备及其一般性质<sup>[1]</sup>。本文将进一步报道该菌的固定化细胞对氢化可的松转化为氢化泼尼松的结果。

## 材料和方法

1. 菌株、材料、培养条件、固定化细胞的制备及3-甾酮- $\Delta'$ -脱氢酶的活力测定方法, 均见前文<sup>[1]</sup>。

2. 转化: 在250ml三角瓶中, 加入25ml含0.01% 维生素K<sub>3</sub>的0.5% 蛋白胨溶液(pH7.2)和0.4%的氢化可的松, 在30℃下振荡20—24小时。

3. 薄层层析: 用三氯甲烷: 甲醇=9:1的混合溶剂溶解样品氢化泼尼松, 取10  $\mu$ l (内含30  $\mu$ g)于薄板点样层析, 并以已知氢化泼尼松标准样品作对照。薄板用硅胶G铺板, 100℃—120℃下活化1小时后使用。点样后用三氯甲烷: 乙醚: 甲醇: 水=77:14:6:0.4的溶剂系统展开后晾干, 用1:1的0.2% 四氮唑蓝甲醇溶液与12% 氢氧化钠甲醇溶液混合液喷雾显色。

## 结果和讨论

### (一) 简单节杆菌固定化细胞转化氢化可的松的条件

1. 转化介质对固定化细胞转化底物的影响: 选用了五种转化介质, 将包埋1g湿菌体的固定化细胞和底物分别加入转化介质(pH7.2)中进行转化, 结果见表1。以0.5% 蛋白胨加0.2% 葡萄糖和0.5% 蛋白胨作为转化介质时, 底物转化率较高, 转化率达93%以上。

2. 固定化细胞转化不同浓度底物的比较: 在250ml三角瓶中, 分别加入12.5ml含不同底物浓度的0.5% 蛋白胨溶液(pH7.2), 然后将

表1 转化介质对固定化细胞转化底物的影响

转化介质	转化率(%)
0.5% 蛋白胨加0.2% 葡萄糖	94.5
0.5% 蛋白胨	93.5
Tris 缓冲液 0.05M, pH7.2	91.5
磷酸缓冲液 0.05M, pH7.2	90.5
生理盐水	83.5

包埋0.5g湿菌体的固定化细胞加入三角瓶中, 在30℃下振荡反应。结果表明(图1), 底物浓度越稀(0.2%), 转化速度越快, 转化率也越高, 浓度为0.2%的底物反应12—24小时的转化率达96—100%。

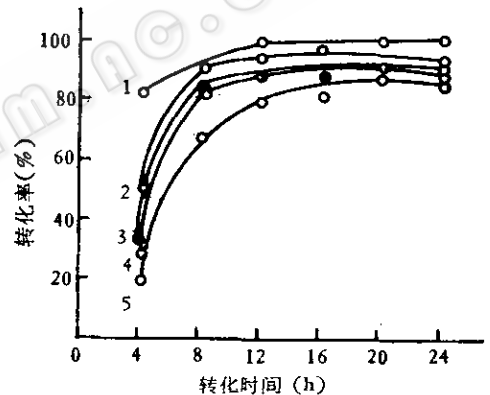


图1 固定化细胞转化不同浓度底物的比较  
底物浓度(%) 1.0.2; 2.0.4; 3.0.6; 4.0.8; 5.1.0

3. 不同量的固定化细胞转化底物的比较: 在装有25ml 0.5% 蛋白胨溶液(内含0.4%的底物及0.01% 维生素K<sub>3</sub>)的250ml三角瓶中, 分别加入含0.5g、0.75g、1.0g、1.25g和1.5g湿菌体的固定化细胞, 在30℃下振荡24小时, 结果见表2。包埋的细胞量为0.75—1.5g时, 底物转化率高达96%以上, 从使用观点出发, 以含菌量0.75—1.0g的固定化细胞较为适宜。

4. 添加防腐剂对固定化细胞转化底物的影响: 选用了五种防腐剂, 分别加入0.5% 蛋白胨溶液中, 结果(表3)表明, 添加0.1—0.25%的

表 2 不同量的固定化细胞转化底物的比较

固定化细胞		转化时间及转化率(%)					
重量(g)	含湿菌体量(g)	2h	4h	6h	8h	10h	24h
1.89	0.50	0	14	30	46	60	86
2.84	0.75	0	16	44	66	84	96
3.78	1.00	0	17	52	80	84	99
4.72	1.25	4	18	56	83	86	100
5.68	1.50	5	18.5	60	84	88	100

醋酸丁酯和 0.1% 苯甲酸钠对固定化细胞转化底物的酶活力没有影响,转化率和对照相同,达 95% 以上。叠氮钠和甲醛对固定化细胞转化底物的酶活力有影响,与对照相比,转化率下降。此结果说明后两种防腐剂可能对 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶有抑制作用。

表 3 添加防腐剂对固定化细胞转化底物的影响

防腐剂		转化率(%)
名称	浓度(%)	
对照	—	95.0
苯甲酸钠	0.1	97.1
醋酸丁酯	0.10	95.0
	0.25	96.6
叠氮钠	0.01	79.7
	0.02	70.1
甲 醛	0.01	25.4
	0.02	14.0

## (二) 保藏试验

将固定化细胞放入液体培养基中(成份见前文<sup>[1]</sup>),分别在 4℃、-11℃ 和 -22℃ 保藏,定期取样测定酶活力,结果见表 4。保藏在 -22℃ 的固定化细胞酶活力在 5 个月内稳定不变,酶活力没有下降。据 Skryabin 等<sup>[2]</sup>报道,在最适条件下保藏时,固定化细胞保留酶活力 100% 的时间为 15 天。Larsson 等<sup>[3]</sup>报道,将固定化细胞在 -20℃ 下保藏 4 个月后,剩余酶活力为 80%。结果说明,我们制备的固定化细胞酶保藏稳定性较好。

## (三) 固定化细胞的工作稳定性

将包埋 1g 湿菌体的固定化细胞放入 250ml 三角瓶中,加入 25ml 蛋白胨溶液(0.5%、pH7.2)、0.01% 维生素 K<sub>3</sub> 和 0.4% 氢化可的松,在 30℃

表 4 固定化细胞保藏过程中酶活力的变化\*

保留的酶活力(%)	保藏时间(月)	保藏温度(℃)				
		1	2	3	4	5
4		44	17.9	—	—	—
-11		68.5	30.0	—	—	—
-22		100	100	100	100	100

\* 保藏前的酶活力均为 100%

下震荡 20 小时,进行批式转化,连续 25 天共 25 批转化。产物采用薄层层析法进行定量分析。结果,氢化可的松转化为氢化泼尼松的转化率达 95%。据 Koshcheenko 等<sup>[4]</sup>报道,用 0.1% 的氢化可的松转化为氢化泼尼松的转化率为 90—95%,重复使用 160 次,净工作时间 20 天。Constantinides 报道<sup>[5]</sup>,用高浓度底物(1.5% 的氢化可的松)转化为氢化泼尼松的转化率为 85%,但作者未报道固定化细胞的工作稳定性。而我们制备的固定化细胞工作稳定性较好,底物转化率也较高,为今后用于工业生产提供有利条件。

## (四) 产物提取及其质量分析

将氢化泼尼松用 18 倍丙酮-水(丙酮:水=8:2)混合液及 2—3% 活性炭迴流 1—2 小时,过滤、减压浓缩(浓缩至投料与所保留的母液之比为 1:1)后,在 0℃ 放置过夜,然后过滤得结晶的产品。该结晶产品经分析测定:比旋光度为 +98.4°,熔点为 229.0℃,含量为 99.4%,此结果与标准品一致,符合中国药典规定的标准。

## 参 考 文 献

- [1] 杨廉婉,钟丽萍:微生物学报,23(2): 128—132, 1983.
- [2] Skryabin G. K. et al.: Fifth International Fermentation Symposium, Ed. H. Dellweg, Printed by: Westkrewz-Druckerei und Verlag. Berlin/Bonn, P. 326. 1976.
- [3] Larsson P. O. et al.: Methods in Enzymology, Vol. 44, Ed. K. Mosbach, Academic Press, New York, 183—190, 1976.
- [4] Koshcheenko K. A. et al.: European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12: 161—169, 1981.
- [5] Constantinides A.: Biotechnol. Bioeng., 22(1): 119—136, 1980.