

## 利用固定化简单节杆菌转化醋酸可的松

张 瑛 姚传义 王明耀  
(天津大学化工系 天津 300072)

卢彦昌 王致萍  
(天津药业公司 天津 300163)

**摘 要** 用聚乙烯醇-海藻酸钙复合载体包埋简单节杆菌 BY-2-3-51 的方法,制备了具有较高机械强度和较好活性的球形固定化细胞。确定了固定化条件、活化条件和酶的特性。在摇瓶中利用该固定化细胞进行醋酸可的松脱氢生成醋酸强的松的反应,初始底物浓度为 20g/L、反应 18h 的转化率可达 98%。在分批次反应中,适时地活化可保持固定化细胞的活性。

**关键词** 醋酸可的松,简单节杆菌,固定化细胞,聚乙烯醇  
学科分类号 R37

利用简单节杆菌进行甾体 $\Delta^1$ -脱氢是甾体生产中一个重要的反应,在过去 20 年间,有不少利用固定化酶或细胞进行甾体脱氢的研究报道<sup>[1~4]</sup>,且大多数都为氢化可的松的脱氢过程。由于难以制得兼备活性高和强度好的固定化简单节杆菌细胞粒子,所以均未得到实际应用。此外,甾体在水中的溶解度太低,也限制了该过程的开发。聚乙烯醇(PVA)是一种无毒高分子材料,近年来用它作为固定化细胞或酶的载体日益受到人们重视。Ariga 等<sup>[5]</sup>利用 PVA 溶胶反复冷冻与风化得到了凝胶。Hashimoto 等<sup>[6]</sup>将 PVA 溶胶滴入饱和硼酸溶液,形成一种单醇型的 PVA-硼酸凝胶网络,成功地用于固定化活性污泥。但该法使用了对细胞具有毒性的硼酸,势必损伤细胞酶活性。最近 Chen 等<sup>[7]</sup>报道了利用 PVA 和硼酸一磷酸二步凝胶法,缩短了细胞与硼酸接触时间,但还是摆脱不了硼酸。本文通过对多种固定化方法的实验,选出以 PVA-海藻酸钙复合材料为载体的细胞固定化方法。研究了该球形固定化简单节杆菌粒子的最宜制备条件及用于醋酸可的松脱氢时固定化细胞的特性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

醋酸可的松与醋酸强的松均由天津药业公司提供, PVA 为北京红星化工厂生产,聚合度为  $1750 \pm 50$ , 其余生化或化学试剂均为市售分析纯或化学纯。

#### 1.2 菌株与培养条件

**1.2.1 菌株:** 简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) BY-2-3-51 由天津药业公司提供。

**1.2.2 液体培养基(g/L):** 玉米浆 0.8, 葡萄糖 0.8, 蛋白胨 0.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24, 调 pH 至 7.5, 加泡敌, 灭菌后接种, 于转速 200r/min 的摇床, 30℃ 培养 24~28h。

天津市自然科学基金资助项目(No. 94145009)。

收稿日期:1997-04-14, 修回日期:1997-10-27。

### 1.3 固定化细胞的制备

1.3.1 菌悬液的制备:培养 18h 的发酵液于 4500r/min 冷冻离心机上离心 30min 后,用 0.05mol/L pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液洗菌体 2 次。用 Tris-HCl 缓冲液制成菌悬液。

1.3.2 固定化细胞制备方法:海藻酸钙法、聚丙烯酰胺法、块状 PVA 法和 PVA 硼酸法分别参照文献[5,6,8,9]。PVA 复合载体法:将 6%~15%的 PVA 和 0.5%~1.5%的海藻酸钠溶胶充分混合,加入一定量菌悬液,在旋涡混合器上充分混合后,用蠕动泵注射法滴入 0.3mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液中,固化 5h 后进行冷冻-风干硬化处理,再在含有磷酸盐的培养基中活化,便制得粒径约为 3mm 的球形固定化细胞。

### 1.4 固定化细胞的活化

将一定量固定化细胞粒子装入 50ml 不同活化介质中,加入添加物,于 30℃、150r/min 下活化,每隔 12h 测固定化细胞活性。

### 1.5 固定化细胞催化醋酸可的松脱氢实验

在装有 25ml pH7.5 含有 7%乙醇的 Tris-HCl 缓冲液的摇瓶中,加入一定量经活化的固定化细胞粒子,再加入一定量的醋酸可的松粉末,置于 34℃、150r/min 的摇床中反应。

### 1.6 醋酸可的松转化率测定和固定化细胞酶活力的测定

参照 Ivashhiv<sup>[10]</sup>等报道的方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化细胞制备方法的比较

用不同方法制备的 5 种固定化细胞强度、韧性及醋酸可的松脱氢能力见表 1。由表可知:(1)海藻酸钙法的强度最差,且在含有多价磷酸盐的发酵液中易脱凝胶化;(2)块状 PVA 和 PVA 硼酸法的强度好,但由于其结构致密,致使通透性差,故脱氢活性欠佳,再者硼酸的影响使之活性更差;(3)PVA 复合载体法的强度、柔韧性、成球性与脱氢能力都好,由于其中含有少量海藻酸钙,在含有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  发酵液中活化时,部分海藻酸钙被溶出,从而改善了固定化细胞通透性,致使内扩散阻力减小。

表 1 不同固定化方法的比较

Table 1 Comparison of different immobilization method

Immobilization method	Shape	Structure	Strength	Flexibility	Conversion /%
Calcium alginate	Bead		+	+	75
Polyacrylamide	Cube		++	++	80
PVA freezing	Cube	Compact	++++	+++	20
PVA-Boric acid	Bead	Compact	++++	+++	15
PVA complex carrier	Bead	Porous	+++	++	90

### 2.2 PVA 复合载体法固定化的最适条件

2.2.1 PVA 复合载体组成:当 PVA 浓度太大,溶胶过于粘稠,固定化细胞有拖尾,球形度差;浓度太低,制得的固定化细胞强度差。海藻酸钠的浓度既影响固定化细胞的球形度

与强度, 且还影响其通透性。最适宜浓度: PVA 6%~15%, 海藻酸钠 0.5%~1.5%。

表 2 冷冻-风干次数对固定化细胞脱氢能力的影响

Table 2 Effects of freeze-drying time on the dehydrogenation activity of immobilized cells

Freeze-drying	t/h	Conversion/%				
		3	5	12	17	24
2		7	18	55	92	98
3		6	20	53	91	98

Note: Substrate concentration is 20mg/ml in Tris-HCl buffer

2.2.2 PVA 复合凝胶冷冻-风干次数: 在 PVA 复合载体组成固定情况下, 凝胶粒子冷冻-风干次数对脱氢能力影响如表 2, 可见其对固定化细胞脱氢能力影响不大, 说明其对固定化细胞通透性影响不大。但是, 实验发现随着冷冻-风干次数增加, 粒子的机械强度加大, 3 次以上基本不变, 且是 2 次时 2 倍。综合结果, 以 3 次为宜。

2.2.3 固定化细胞中菌体的初始浓度: 固定化细胞中菌体初始浓度对其脱氢能力影响见图 1。计算相应条件下, 醋酸可的松转化率从 0%~90% 时的平均反应速率( $r_p$ ), 结果见图 2, 当初始菌体浓度大于 4% 后, 其脱氢能力基本不变。

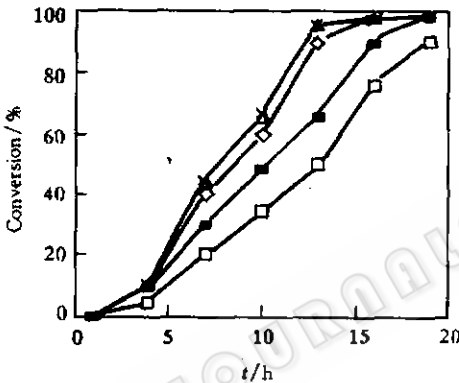


图 1 细胞浓度对转化率的影响

Fig. 1 Effect of cell concentration on conversion

Cell conc./% □ 1, ■ 2, ◇ 4, x 6, △ 8

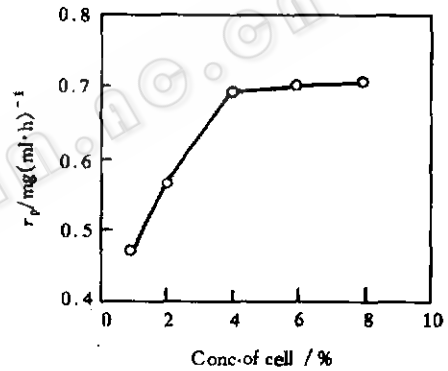


图 2 初始细胞浓度对反应速率的影响

Fig. 2 Effect of initial cell concentration on reaction rate

reaction rate

## 2.3 固定化简单节杆菌的活化

2.3.1 活化介质: 不同活化介质对脱氢反应的影响见表 3。活化介质为发酵液添加少量醋酸可的松诱导剂和乙醇溶剂, 可显著改善固定化细胞脱氢活性。这是由于醋酸可的松脱氢酶属诱导酶, 加入诱导物能加速醋酸可的松脱氢酶的生物合成过程。

2.3.2 活化时间: 考察了固定化细胞在发酵培养基中活化时间对脱氢酶活性影响。当活化 48h 后, 酶活力不再增加, 其为起始酶活的 3.8 倍。这是由于包埋的是活细胞, 活化能使细胞增殖。此外, 活化介质中有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 所以活化时间太长也影响了凝胶粒子的通透性, 出现了漏菌现象, 使得固定化细胞脱氢能力下降。

## 2.4 PVA 复合载体法制备的固定化简单节杆菌的一般特性

2.4.1 酶反应的最佳温度: 在不同温度下固定化简单节杆菌的醋酸可的松脱氢酶活力如图 3, 该固定化细胞酶反应的最佳温度为 34℃。

表 3 活化介质对催化脱氢反应的影响

Table 3 Effects of activation medium on dehydrogenation reaction

No.	Activation medium	Addition	Conversion / %			
			t/h	5	12	17
1	0.5 % Peptone	Cortisone acetate(CNA) 1mmol/L		21.4	76.2	98.0
	0.2 % Glucose					
	0.25 % K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>					
2	0.5 % Peptone	Ethanol 4 %		6.0	33.0	62.0
	0.2 % Glucose					
3	Ferment liquor			25.8	82.2	98.0
4	Ferment liquor	CNA 1mmol/L		20.8	52.3	95.0
5	Ferment liquor			19.6	47.0	91.0

2.4.2 酶的热稳定性: 将固定化细胞悬浮于 0.05mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 在不同温度下保温 2h 后, 于 34℃ 下分别测定其酶活力的结果亦示于图 3。在温度超过 34℃ 时, 固定化细胞酶的热失活大大加剧; 温度小于 30℃ 时, 酶的热稳定性较好。

表 4 不同反应介质对醋酸可的松脱氢的影响

Table 4 Effect of reaction medium on dehydrogenation of cortisone acetate

Batch No.	Time reguied at conversion yield 90 % / h			
	Tris-HCl buffer	Ferment liquor	Physiological saline	Sterile water
1st	18	48	24	24
2nd	18	28	18	19
3rd	18		19	24
4th	19		28	32
5th	20		36	47

2.5 固定化细胞的脱氢反应

2.5.1 反应介质: 在不同反应介质中进行醋酸可的松脱氢, 测定转化率为 90% 时的反应时间, 结果见表 4。在发酵液中反应, 其营养丰富, 且含有磷酸根离子, 致使载体中的海藻酸钙溶胶化, 造成孔隙太大有漏菌现象, 采用其它介质均无此现象。这些均被四氮唑蓝法定性实验所证实。所以 Tris-HCl 缓冲液应为最佳反应介质。

2.5.2 底物初始浓度: 不同底物浓度下的脱氢反应结果如表 5。随着底物浓度的增大, 达到相同转化率的时间增长。初始底物浓度为 20mg/ml 时, 催化剂的生产能力最大。

表 5 底物初始浓度对脱氢反应的影响

Table 5 Effect of initial concentration of substrate on dehydrogenation reaction

Initial substrate conc. / g·L <sup>-1</sup>	6	10	15	20	25	30
t/h(at conversion 98 %)	7.2	11	14.5	18	25	38
Productivity of catalyst/mg(h·g) <sup>-1</sup>	1.4	1.5	1.7	1.8	1.6	1.3

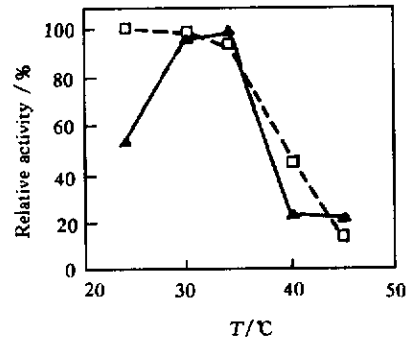


图 3 温度对反应活性和稳定性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on reactive activity and heat stability

▲ Enzymatic activity at different temp. □ Heat stability

2.4.3 酶反应的最适 pH: 在不同 pH 条件下, 测定 PVA 复合载体固定化简单节杆菌的酶活力。结果表明, 该固定化细胞酶反应的最适 pH 为 7.5。

2.4.4 固定化细胞的 pH 稳定性: 将固定化细胞悬浮于不同 pH 缓冲液中。于 30℃ 保温 20h 后, 在 pH7.5 的条件下测定其酶活力, 结果表明该固定化细胞在 pH7.5~8.0 范围较稳定。

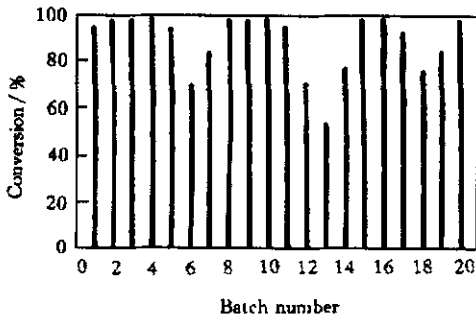


图 4 固定化细胞稳定性

Fig. 4 Stability of the immobilized cells

和制备方法简单。用该法制得的固定化简单节杆菌在发酵液中活化 48h, 酶活提高 3.8 倍。用其进行醋酸可的松脱氢反应, 在最适温度 34℃、最适 pH7.5 条件下, 当底物浓度为 20mg/ml 时, 反应 18~20h 的转化率可达 98%。

## 参 考 文 献

- 1 Koshcheenko K A, Turkins M V, Skryabin G K. *Enzyme Microb Technol*, 1983, 5:14~21
- 2 Sonomoto K, Jin L N, Tanaka A *et al.* *Agri Biol Chem*, 1980, 44(5):1119~1126
- 3 Pinheiro H M, Cabral J M S. *Appl Microb Biotechnol*, 1992, 40:1123~1127
- 4 Kloosterman IV J, Lilly M D. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28:1390~1395
- 5 Ariga O. *J Ferment Technol*, 1988, 65:651~658
- 6 Hashimoto S, Furukawa K. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 15:52~59
- 7 Chen K C, Lin Y F. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16:79~83
- 8 Ohlson S, Larsson P O, Mosbach K. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, 7:103~110
- 9 Ohlson S, P O Larsson, Mosbach K. *Biotech Bioeng*, 1978, 20:1267~1289
- 10 Ivashiv E. *Biotechnol Bioeng*, 1971, 13(4):561~567

## Transformation of Cortisone Acetate Using Immobilized *Arthrobacter simplex* Cell

Zhang Ying Yao Chuanyi Wang Mingyao

(Department of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Lu Yanchang Wang Zhiping

(Tianjin Pharmaceutical Company, Tianjin 300163)

**Abstract** A new cell immobilization method is developed in which cells of *Arthrobacter simplex* BY-2-3-51 are immobilized by entrapment with polyvinyl alcohol-alginate complex carrier. The immobilized cells preparation contains spherical beads with high mechanical strength and  $\Delta^1$ -dehydrogenase activity. The activation conditions and enzymatic properties of the immobilized cells are studied. When the initial substrate concentration is 20mg/ml, the conversion of cortisone acetate to prednisone acetate by immobilized cells in shake flasks is 98% at 18h. The stability of immobilized cells is maintained by activation at proper time.

**Key words** Cortisone acetate, *Arthrobacter simplex*, immobilized cells, polyvinyl alcohol