

产 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的简单节杆菌固定化细胞的制备及其性质

杨廉婉 钟丽婵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

研究了产 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) By-2-13 细胞包埋于聚丙烯酰胺凝胶中的制备条件。用 5ml 5% 聚丙烯酰胺凝胶包埋 1g 湿细胞为宜, 固定化后酶活力回收率为 80% 左右。添加 0.01% 的维生素 K₃, 固定化细胞酶活力可提高 40% 左右。

固定化细胞和自然细胞酶的最适温度分别为 35℃ 和 30℃, 米氏常数前者为 0.417mM, 后者为 0.33mM。固定化后热稳定性比自然细胞好, 其他性质基本相同。

甾体的微生物转化是生产甾体药物的重要途径, 但转化的产物往往纯度较低, 提取工艺复杂, 成本高。关于固定化细胞转化甾体的研究虽已引起注意, 但报道较少。

在甾体转化的反应中, 用微生物酶脱去甾核环上的 [C₁] 及 [C₂] 位上的氢, 形成双键, 能大大提高甾体的生物活性^[1]。至今, 有好几个皮质激素类的药物合成都包含这个反应。

基于上述, 我们研究了产生 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的简单节杆菌 By-2-13 固定化细胞的制备及其一般性质。

材料和 方法

(一) 菌株

简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) By-2-13 由天津制药厂提供。通常在含有 1% 酵母膏, 1% 葡萄糖的固体斜面培养基中, 28℃ 培养 2 天。然后放在冰箱中保存。

(二) 材料

丙烯酰胺为天津化学试剂一厂产品, N, N'-甲撑双丙烯酰胺 (BIS)、过硫酸钾为北京化工厂产品; N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 为英国 BDH 厂产品; 氢化可的松、去氢氢化可的

松、维生素 K₃ 为天津制药厂提供, 其他试剂均为化学纯或分析纯。

(三) 培养基和培养条件

1. 种子培养基组分同上。在 250ml 克氏扁瓶中装 70ml 培养基, 用 10% 氢氧化钠调 pH 至 7.5, 15 磅/20 分钟灭菌后, 摆成平面, 接种后在 28℃ 培养 2 天。

2. 发酵培养基组分 (%): 葡萄糖 0.8, 蛋白胨 0.3, 玉米浆 0.6, 磷酸二氢钾 0.2, 用 30% 氢氧化钠调 pH 至 7.5, 于 31 三角瓶中装 300ml 培养基, 加花生油 6 滴, 8 磅/30 分钟灭菌。将克氏扁瓶中培养的简单节杆菌 By-2-13 用 25ml 生理盐水洗下来, 做成菌体悬浮液, 按 3% 接种量接入发酵培养基中。在 30℃ 旋转摇床上 (转速 190 次/分钟, 偏心距 2.5cm) 培养 9—10 小时后添加氢化可的松甲醇溶液 (0.25mg/ml 培养基), 诱导 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的产生, 再继续培养 12—14 小时。

(四) 固定化细胞的制备

将发酵液离心 (10,000 转/分) 10 分钟, 弃去上清液, 用生理盐水洗一次, 再离心 10 分钟, 收集细胞, 用聚丙烯酰胺凝胶包埋法制备固定化细胞。参照 Chibata 等^[2,3]报道的方法, 取 1g 湿细胞悬浮于 4ml 生理盐水中, 加入丙烯酰胺 500mg, BIS

本文于 1981 年 4 月 3 日收到。

40mg, 5% TEMED 0.5ml, 2.5% 过硫酸钾 0.5ml, 抽真空聚合, 得到最终浓度为 10% 的丙烯酰胺凝胶, 切成边长 1mm 左右的小块, 分别用 100ml 蒸馏水和生理盐水洗净, 抽滤至干。

(五) 3-酮- Δ^1 -脱氢酶的活力测定

1. 自然细胞的酶活力测定: 在 100ml 三角瓶中加 0.05M pH7.2 Tris-HCl 缓冲液 8.9ml, 加 1% 维生素 K₁ 乙醇溶液 0.1ml, 细胞悬浮液 0.5ml (含湿细胞 0.1g), 在 30℃ 平衡 10 分钟, 加 0.4% 氢化可的松乙醇溶液 0.5ml, 搅拌反应 1 小时。取 2ml 反应液加入 2ml 三氯甲烷中, 摇动 5 分钟, 取溶剂层 1ml 在 70—80℃ 蒸干, 加 95% 乙醇 10ml。参照 Ivashkiv^[3] 的方法, 用 SP700 型紫外分光光度计测定氢化可的松和去氢氢化可的松在 270/242nm 波长的吸光度比, 查标准曲线求出底物转化成产物的转化率, 换算成酶活力百分数, 以此表示酶活力(将氢化可的松和去氢氢化可的松标准品分别用 95% 乙醇配成 20 μ g/ml 的溶液, 再由二种溶液配置成 0—100% 不同比例的混合溶液, 用 SP 700 型紫外分光光度计测定 270/242nm 波长的吸光度比。以去氢氢化可的松含量对 270/242nm 波长的吸光度比作图, 得出转化率与吸光度比关系的标准曲线)。

2. 固定化细胞的酶活力测定

于 100ml 三角瓶中加入 9.4ml 0.05M pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液, 0.1 ml 1% 维生素 K₁ 乙醇溶液, 0.5ml 0.4% 氢化可的松乙醇溶液, 在 30℃ 平衡 10 分钟, 加包埋 0.1g 湿菌体的固定化细胞, 搅拌 1 小时, 取样分析方法同自然细胞酶活力测定。

结 果

(一) 简单节杆菌 By-2-13 固定化细胞制备的最适条件

1. 细胞浓度的影响: 用 5ml 10% 聚丙烯酰胺凝胶包埋不同量的细胞, 结果见表 1。当细胞浓度增加至 2g/25ml 时, 固定化细胞酶活力回收率最高。

2. 聚丙烯酰胺浓度的影响: 分别用 5ml 不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶包埋 1g 湿

表 1 细胞浓度的影响

Table 1 Effect of the concentration of cells

湿细胞重量 Weight of wet cells (g/25ml)	固定化细胞酶活力回收率* Yield of enzyme activity of immobilized cells (%)
1	77
2	79
3	64
4	43

* 自然细胞酶活力为 100%

Take the enzyme activity of native cells as 100%

表 2 丙烯酰胺浓度的影响

Table 2 Effect of the concentration of acrylamide

丙烯酰胺 Acrylamide		BIS		酶活力 Enzyme activity (%)
重量 Weight (mg)	浓度 Concn. (%)	重量 Weight (mg)	浓度 Concn. (%)	
250	5	40	0.8	100
500	10	40	0.8	54.2
750	15	40	0.8	50.0
1000	20	40	0.8	20.8

表 3 固定化细胞颗粒大小的影响

Table 3 Effect of granule size of the immobilized cells

颗粒大小 Granule size (mm)	酶活力 Enzyme activity (%)
1	100
3	60.6
5	36.4
7	31.8

细胞。结果表明(表 2), 丙烯酰胺浓度超过 5%, 固定化细胞的酶活力明显下降。

3. 固定化细胞颗粒大小的影响: 将 1g 湿细胞包埋于 5ml 10% 聚丙烯酰胺凝胶中, 然后切成不同大小的颗粒, 结果见表 3。固定化细胞的颗粒越小, 其酶活力越高, 边长约为 1mm 的颗粒为最适宜。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶包埋简单节杆菌固定化细胞酶的一般性质

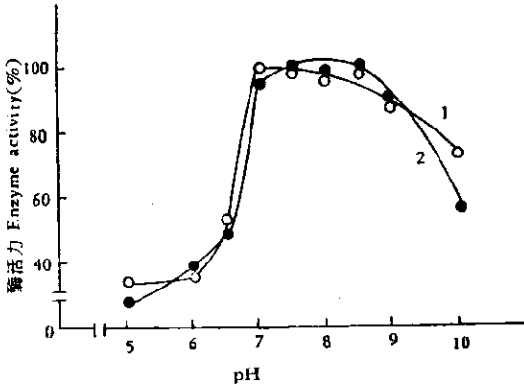


图1 pH对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on the enzyme activity

1.自然细胞 Native cells 2.固定化细胞 Immobilized cells

pH 5-7 为 0.1M 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 citric acid-disodium hydrogen phosphate buffer; pH 7.5-9 为 0.1M Tris-HCl 缓冲液 Tris-HCl buffer pH 10 为 0.1M 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 glycine-NaOH buffer

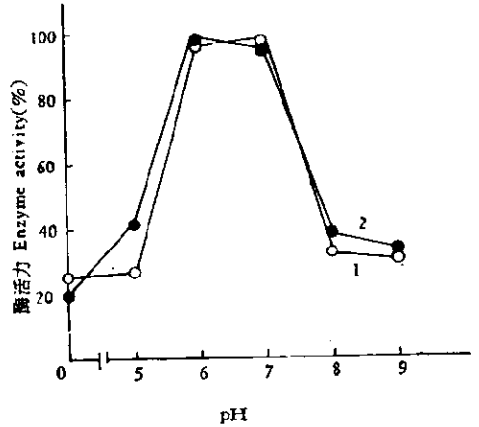


图3 pH稳定性

Fig. 3 pH stability

1.自然细胞 Native cells 2.固定化细胞 Immobilized cells

pH 4-7 为 0.1M 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 citric acid-sodium hydrogen phosphate buffer pH 7.5-9 为 0.1M Tris-HCl 缓冲液 Tris-HCl buffer

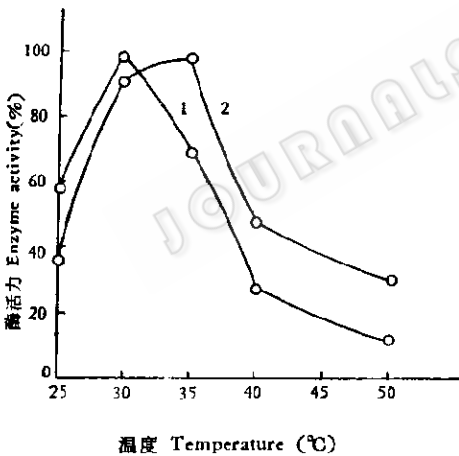


图2 温度对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme activity

1.自然细胞 Native cells 2.固定化细胞 Immobilized cells

1. 酶反应的最适 pH: 在不同 pH 条件下, 分别测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。如图 1 所示, 自然细胞和固定化细胞的最适 pH 均为 7-8.5。

2. 酶反应的最适温度: 在不同温度

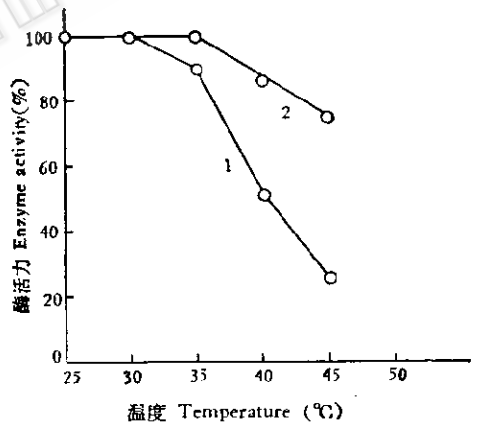


图4 热稳定性

Fig. 4 Heat stability

1.自然细胞 Native cells 2.固定化细胞 Immobilized cells

未经处理的酶活力为 100% Take the enzyme activity of untreated cells as 100%

下, 分别测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。图 2 说明自然细胞酶的最适温度为 30°C, 固定化细胞酶的最适温度为 35°C。

3. pH 稳定性: 将自然细胞和固定化细胞分别悬浮于 0.1M 不同 pH 缓冲液

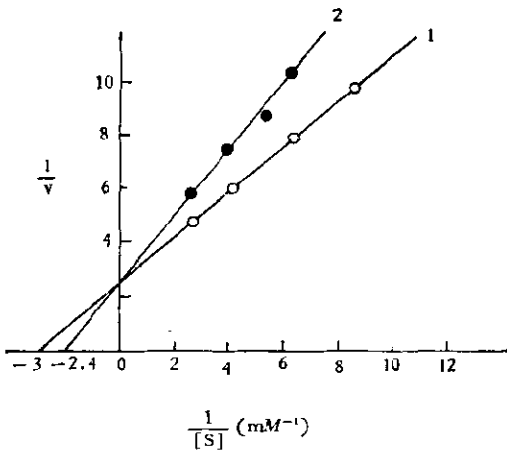


图 5 自然细胞及固定化细胞酶的米氏常数

Fig. 5 Michaelis constant of enzyme in native cells and immobilized cells

1. 自然细胞 Native cells
2. 固定化细胞 Immobilized cells

表 4 添加维生素 K_3 对酶活力的影响Table 4 Effect of VK_3 on the enzyme activity

维生素 K_3 浓度 VK_3 concn. (%)	酶活力 Enzyme activity (%)
—	100*
0.005	103.7
0.01	141.5
0.015	134.1
0.02	118.9
0.03	102.9

* 不加维生素 K_3 的酶活力为 100%Take the enzyme activity of immobilized cells in the reaction system without VK_3 as 100%

中,于 30℃ 保温 22 小时后,分别测定两者的酶活力。结果表明(图 3)两者均在 pH 6—7 比较稳定。

4. 热稳定性: 将自然细胞和固定化细胞分别悬浮于生理盐水中,在不同温度下保温 40 分钟,取出立即放入冰水浴中冷却,然后分别进行酶活力测定。图 4 表明固定化细胞比自然细胞的热稳定性好。

5. 添加维生素 K_3 的影响: 在固定化

细胞酶反应系统中,分别加入不同浓度维生素 K_3 。结果表明(表 4),在反应系统中加入 0.01% 的维生素 K_3 ,酶活力提高 40% 左右。

6. 固定化细胞和自然细胞酶的米氏常数 (K_m): 以氢化可的松为底物,用赖因韦尔 (Lineweaver) 和贝克 (Burk) 作图法求得两者的米氏常数分别为 0.417mM 和 0.33mM (图 5)。

讨 论

用聚丙烯酰胺凝胶包埋细胞是一种简便的方法,由于简单节杆菌 By-2-13 对温度较敏感,采用此包埋方法可在低温下进行操作,避免酶失活,所制备的固定化细胞机械强度高,适用于连续搅拌反应。但丙烯酰胺对微生物细胞和酶有毒害作用。所以丙烯酰胺浓度不宜过高,在保证固定化细胞有较好的机械强度的前提下,采用 5% 的浓度较适宜。在包埋过程中,应当尽量缩短菌体与丙烯酰胺接触的时间 (1 分钟左右),这样可以得到 80% 左右的酶活力回收率。我们制备的固定化细胞比 Larsson 等^[4] 报道的酶活力回收率高 40% 左右,与 Ohlson 等^[5] 的报道类似。

3-酮- Δ^1 -脱氢酶催化底物脱掉甾核环上的 $[C_1]$ 及 $[C_2]$ 位上的两个氢,需要一个辅因子作为受氢体,而维生素 K_3 是较好的辅因子。我们所得到的结果与 Ohlson^[6] 等的报道类似。

固定化细胞酶的米氏常数 (K_m) 比自然细胞的大,这可能是由于固定化细胞颗粒内扩散限制所致。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所: 微生物在工业上的应用,科学出版社,北京,1970, pp. 124—125
- [2] Chibata, I. et al.: *Appl Microbiol.*, 27(3): 878—885, 1972.

- [3] Ivashkiv, E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **13**(4): 561—567, 1971.
- [4] Larsson, P. O. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 44, ed by Mosbach K., Academic press, New York, 1976, pp183—190.
- [5] Ohlson, S. et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**(2): 103—110, 1979.
- [6] Ohlson, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**(8): 1267—1284, 1978.

PREPARATION AND PROPERTIES OF IMMOBILIZED *ARTHROBACTER SIMPLEX* BY-2-13 CELLS POSSESSING 3-KETOSTEROID- Δ^1 -DEHYDROGENASE ACTIVITY

Yang Lianwan Zhong Lichan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Cells of *Arthrobacter simplex* By-2-13 having 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase activity were immobilized in 10% polyacrylamide gel and retained about 80% of the original activity. The enzyme activity of immobilized cells could be raised about 40% by addition of a cofactor menadione (VK₃).

The enzymatic properties of immobilized *Arthrobacter simplex* By-2-13 cells were investigated and compared with those of the

native cells. After being immobilized, the Michaelis constant, K_m (0.417mM) differed from that of the native cells (0.33mM) and the heat stability was somewhat enhanced. The optimum temperatures of immobilized cells and native cells were 35°C and 30°C respectively. No change of other enzymatic properties of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase was found.