

# 简单节杆菌转化氢化可的松的 $\Delta$ -脱氢反应动力学

## 1. 简单节杆菌 BY-2-13 自由细胞转化氢化可的松的 $\Delta$ -脱氢反应动力学

钟丽婵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

曹竹安 李强 施燕

(清华大学化学工程系, 北京)

本文研究了简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) By-2-13 转化氢化可的松为氢化泼尼松的  $\Delta$ -脱氢反应动力学。其中包括溶解底物的底物浓度对反应速度的影响, 反应初速度与底物浓度的关系; 固体悬浮液中底物总浓度对反应速度的影响, 反应初速度与底物浓度的关系; 酶量对反应的影响以及产物的抑制作用等。溶解底物和固体悬浮液底物的反应初速度与底物浓度的关系都符合简单米氏方程, 米氏常数  $K_m$  分别为 0.33mg/ml 和 29.41mg/ml, 而两者的反应过程曲线均与简单米氏方程不符。无论在较低或较高浓度的固体悬浮液底物转化过程中, 产物对  $\Delta$ -脱氢反应都呈现抑制作用。由此建立了该反应的反应动力学模型及相应的动力学方程, 并经线性化后回归得出反应的动力学参数。当反应时间小于  $t_0$  (达到约 85% 的转化率所需要的时间) 时, 用此动力学方程拟合所得的数据与实验测定值相符。

**关键词:** 简单节杆菌; 转化; 氢化可的松;  $\Delta$ -脱氢反应动力学

70 年代开始, 已有不少用具有  $\Delta$ -脱氢酶活性的微生物固定化细胞在批式反应器中转化氢化可的松的研究, 但用固定化细胞连续反应器转化氢化可的松的研究却很少报道。氢化可的松在水溶液中的溶解度很小, 约为 0.1—0.2mg/ml<sup>[1]</sup>, 进行柱式连续反应只能采用低浓度溶解底物, 因此生产能力低。例如: Ohlson 等<sup>[2]</sup>用简单节杆菌固定化细胞连续转化 1mM (含 5% V/V 甲醇) 的氢化可的松; Constantinides<sup>[3]</sup>用骨胶膜包埋简单棒状杆菌连续转化 0.7g/L (含 15% 乙醇) 的氢化可的松; Arinbasarova<sup>[4,5]</sup>报道了固定化球形节杆菌转化 0.2g/L 氢化可的松的动力学等。

有些研究者<sup>[6,7]</sup>认为, 大于溶解度的氢化可的松底物, 转化可在非均相中进行(假结晶发酵)。但是一般的柱式反应器只适

用于可溶性底物, 为了设计适用于固液相反应的反应器, 必需研究氢化可的松  $\Delta$ -脱氢反应动力学。

Chen 等<sup>[8]</sup>对这一反应动力学进行了研究, 提出了产物竞争抑制的动力学方程, 并认为还可能存在产物和底物的非竞争性抑制。Constantinides<sup>[3]</sup>研究了此反应高浓度底物动力学性质, 提出了反应动力学模型, 并得出了反应为非单纯产物竞争性抑制的结论。最近 Chen 等<sup>[9]</sup>报道了用数学模拟简单节杆菌假结晶发酵中氢化可的松  $\Delta$ -脱氢反应过程的方法。我们的工作主要是研究简单节杆菌转化氢化可的松溶解底物和固体悬浮底物的反应动力学性质, 提出反应动力学数学模型, 并经线性回归得出反

本文于 1985 年 12 月 19 日收到。

应动力学参数。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

见前文<sup>[10]</sup>。

### (二) 材料

氢化可的松及产物抑制试验所用的氢化泼尼松(天津制药厂产品);维生素 K<sub>3</sub>、分析用氢化可的松、氢化泼尼松标准品(天津制药厂提供,含量大于 99%);其余化学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(%): 酵母膏 1, 葡萄糖 1, 琼脂 2, 用 10% 氢氧化钠调 pH 至 7.5, 在 250 ml 克氏瓶中装 70ml 培养基, 15 磅灭菌 20 分钟后摆成斜面。接种后在 28℃ 培养 2 天, 置 4℃ 保存。

2. 发酵培养基组分: 同前文<sup>[10]</sup>, 不加花生油, 不加诱导剂, 直接培养 22—24 小时。

### (四) 菌悬液的制备

将发酵液离心 (10,000r/min) 10 分钟, 弃去上清液, 用 0.05M pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液(以下同)洗涤一次, 离心 10 分钟, 收集细胞。用缓冲液稀释至 0.1—0.2g 细胞/ml, 放入 -20℃ 保存。

### (五) 氢化可的松转化反应

按实验要求的底物浓度将氢化可的松和氢化泼尼松加到 250ml 三角瓶中, 再加入 0.2—0.5ml 的 1% 维生素 K<sub>3</sub> 甲醇溶液, 使底物分散在甲醇溶液中(配制溶解底物时先配制 4mg/ml 的底物——95% 乙醇溶液, 然后按所需浓度取不同量的底物溶液加入 250ml 三角瓶中), 再加入缓冲液使反应总体积(包括菌悬液)为 25ml。在 30℃ 恒温摇床上(转速 200r/min, 偏心矩 2.5cm)保温 10 分钟后加入菌悬液开始反应。

### (六) 转化率的测定

在不同的反应时间取样, 用紫外分光光度法分析样品的转化率。

参照 Ivashkiv<sup>[11]</sup> 方法, 取 0.1ml 反应样品加入定量氯仿中, 摇匀, 离心, 使水相和有机相分离。取 1ml 有机相放入试管中, 于 60—70℃ 烘干后加入 95% 乙醇稀释约为 20μg/ml, 然后用 UV-120-02 型紫外分光光度计测定该样品在 240nm 和 270nm 的吸光度。

配制一不含底物但其它组分与反应样品相同的对照样品, 取出 0.1ml 液体, 经过同样处理作为空白对照。

用 95% 乙醇配制氢化可的松和氢化泼尼松不同配比的标准样品(总浓度为 20μg/ml), 测定在 240nm 及 270nm 的吸光度, 以转化率(即氢化泼尼松量占氢化可的松和氢化泼尼松总量的百分数)对 A<sub>270</sub>/A<sub>240</sub> 作图, 得到标准曲线, 根据标准曲线求得未知样品的转化率。

## 结 果 与 讨 论

### (一) 初速度与初始底物浓度的关系

以不同初始底物浓度的一组溶解底物和一组固体悬浮液底物进行转化反应, 分别测其初始反应速度  $V_0$ 。溶解底物的初始浓度分别为 (mg/ml): 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.225, 0.250, 菌量  $E_0 = 10\text{mg}$  湿菌体/ml, 维生素 K<sub>3</sub> 含量 0.007%; 固体悬浮液底物的初始浓度分别为 (mg/ml): 5.01, 7.96, 15.00, 20.01, 24.96, 30.00, 40.00, 50.00, 菌量为 40mg 湿菌体/ml, 维生素 K<sub>3</sub> 含量 0.02%。由二组反应样品测得反应初速度。

图 1 和图 2 分别为溶解底物和固体悬浮液底物的  $V_0$  与  $S_0$  的关系曲线。

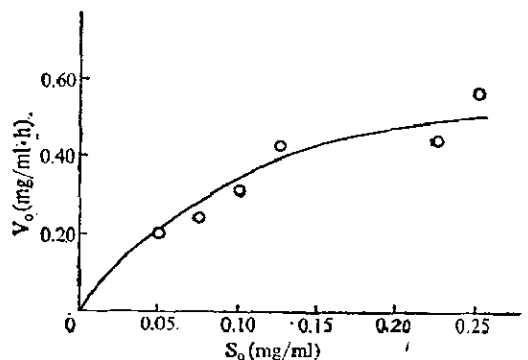


图 1 溶解底物初始浓度对反应初速度的影响  
Fig. 1 The effect of low initial substrate concentration (with no substrate suspended) on initial reaction rate

从图中看出二种底物的  $V_0$ - $S_0$  曲线的

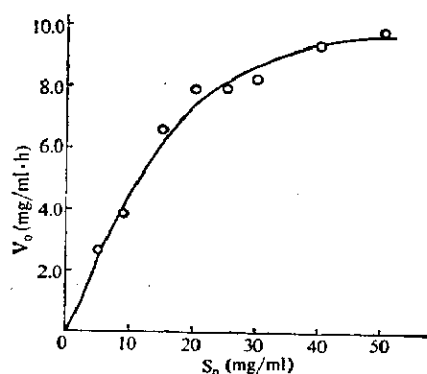


图2 固体悬浮液底物初始浓度对反应初速度的影响

Fig. 2 The effect of high initial substrate concentration (with substrate suspended) on initial reaction rate

形状与简单米氏方程的相似。Lineweaver-Burk 作图法分别以溶解底物和固体悬浮液的  $1/V_0$  对  $1/S_0$  作图, 得到相关系数分别为 0.980 和 0.996 的直线 (图 3)。由此说明  $V_0-S_0$  符合米氏方程的对应关系。

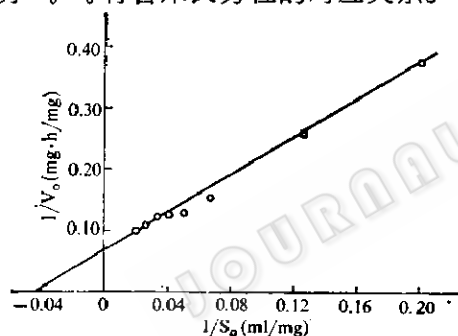


图3 Lineweaver-Burk 图(固体悬浮液底物)

Fig. 3 The Lineweaver-Burk plot (at high substrate concentration)

比较图 1 和图 2, 固体悬浮液底物与溶解底物相似, 其反应初速度随着初始总浓度 (液相浓度+固相浓度) 的增加而增大, 即反应初速度与底物的初始总浓度有关。转化固体悬浮液的氢化可的松时, 只有溶解底物才能与酶接触参加反应, 而固体底物不能直接与酶作用进行脱氢反应<sup>[1]</sup>。固体悬浮液底物的试验中, 初始底物浓度范围为 5—50mg/ml, 大大超过氢化可的松的溶解度, 因此, 底物中液相的底物浓度应达到饱和, 处于溶解平衡状态。在反应过

程中, 如果底物达到溶解平衡, 底物由液相到反应界面的推动力  $S_B-S_C$  应为常数。传质过程的速度表达式为:

$$J = k_c(S_B - S_C) \quad (1)$$

式中  $S_B$ : 液相主体的氢化可的松浓度 (mg/ml)

$S_C$ : 液相与细胞界面上的氢化可的松浓度 (mg/ml)

$J$ : 传质速率 (mg/cm<sup>2</sup>·s)

$k_c$ : 传质系数 (cm/s)

因为  $k_c$  为常数, 所以  $J$  也应为常数, 从而反应速度也为常数, 应与固体底物浓度无关, 这显然与实验结果不符。由此假设, 由于脱氢反应的进行, 氢化可的松转化为氢化泼尼松时液相中的氢化可的松处于非饱和状态。随着氢化可的松初始浓度增加, 底物溶解速度增加, 在反应的某一瞬间, (1) 式中的  $S_B - S_C$  随底物初始浓度增加而增加, 反应速度也随之增加。因此, 在固体悬浮液底物的  $\Delta'$ -脱氢反应中, 底物的溶解速度控制反应速度。

## (二) 底物浓度对反应过程的影响

图 4 和图 5 分别为溶解底物 (0.125—0.250mg/ml) 和固体悬浮液底物 (5—50

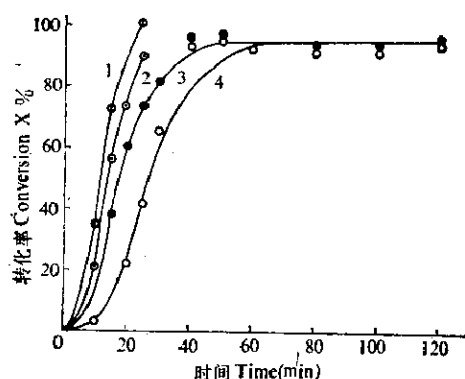


图4 溶解底物反应过程曲线

Fig. 4 Time course at low substrate concentration

1.  $S_0 = 0.050\text{mg/ml}$  2.  $S_0 = 0.100\text{mg/ml}$

3.  $S_0 = 0.200\text{mg/ml}$  4.  $S_0 = 0.250\text{mg/ml}$

$E_0 = 10\text{mg}$  湿菌体/ml  $E_0 = 10\text{mg wet cell/ml}$

$V_{K_3} = 0.007\%$

mg/ml) 的  $\Delta'$ -脱氢反应过程曲线。两组反应过程曲线形状相似, 均不遵循简单米氏方程积分式。底物初始浓度较低时, 转化率增加的速度很快, 且最终转化率  $X_f$  能达到 100%, 随着底物浓度的增加, 最终转化率  $X_f$  降低, 当  $S_0$  增加至 20mg/ml 时,  $X_f$  保持在 85% 左右。

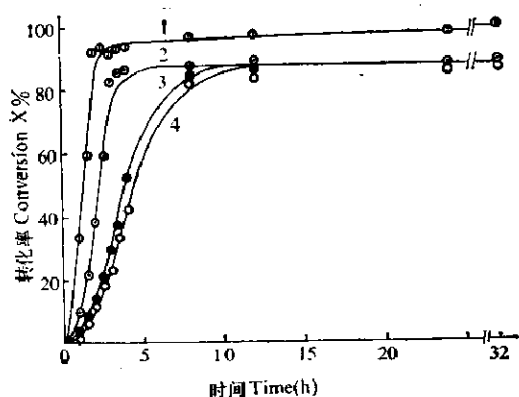


图 5 固体悬浮底物反应过程曲线  
Fig. 5 Time course at high substrate concentration

1.  $S_0 = 5\text{mg/ml}$  2.  $S_0 = 15\text{mg/ml}$   
3.  $S_0 = 40\text{mg/ml}$  4.  $S_0 = 50\text{mg/ml}$   
 $F_0 = 40\text{mg}$  湿菌/ml  $F_0 = 40\text{mg}$  wet cell/ml  
 $VK_1 = 0.01\%$

### (三) 菌量对反应初速度的影响

按本文所述反应条件, 用不同酶量  $E_0$  转化  $S_0$  为 16mg/ml 的氢化可的松。  $V_0$  随  $E_0$  的增加而增加, 但  $dV_0/dE_0$  却相反 (图 6)。

### (四) 装液量的影响

按所述反应条件, 用不同装液量转化初始浓度为 15mg/ml 的氢化可的松。实验结果表明 (装液量 25, 50, 100ml 和装液量 25ml, 密封瓶口): 反应速度随装液量增加而减慢, 但最终转化率  $X_f$  均能达到 80—85%。装液量少, 溶氧速度快, 反应速度也较快, 即使将瓶口密封, 也能在反应 3 小时后达到 82% 的转化率; 装液量较多时, 溶氧速度减慢, 反应速度也减慢, 但

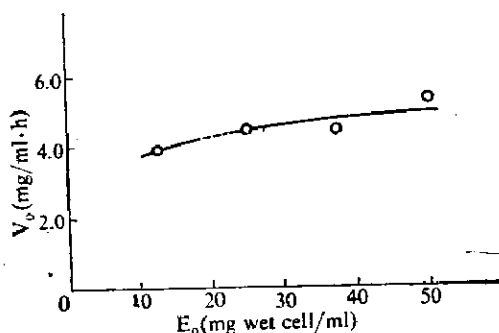


图 6 菌量对反应初速度的影响  
Fig. 6 The effect of cell concentration on initial reaction rate

溶氧速度对反应的最终转化率  $X_f$  没有影响。

### (五) 产物的抑制作用

为了证明反应系统中产物的抑制作用, 将产物按  $S_0$  的 0—50% 的量分别加入:  $S_0$  5mg/ml,  $E_0$  25mg 湿菌/ml, 维生素  $K_1$  0.01% 的反应系统中进行反应。图 7 为产物抑制反应过程曲线。

图 7 表明, 曲线的最大斜率  $(dx/dt)_{\max}$  随着初始产物浓度  $P_0$  的增加而下降, 说明

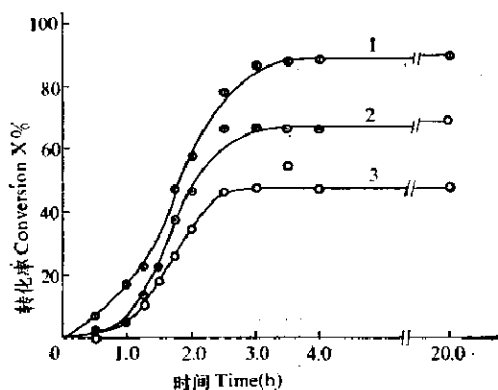


图 7 产物抑制反应过程曲线  
Fig. 7 Time course with product inhibition  
1.  $P_0 = 0$  2.  $P_0 = 1.00\text{mg/ml}$   
3.  $P_0 = 2.50\text{mg/ml}$

反应过程中存在产物的抑制作用。此外, 随着  $P_0$  的增加,  $X_f$  下降, 但反应体系中氢化泼尼松的最终总比例, 即由底物转化所生成的产物及加入的初始产物的比例总和

保持不变。 $S_0$  为 10mg/ml 时,  $X_t$  为 85%。当底物浓度增加至 32mg/ml 时, 少量产物的存在(5%)可以加速底物的转化(图 8)。

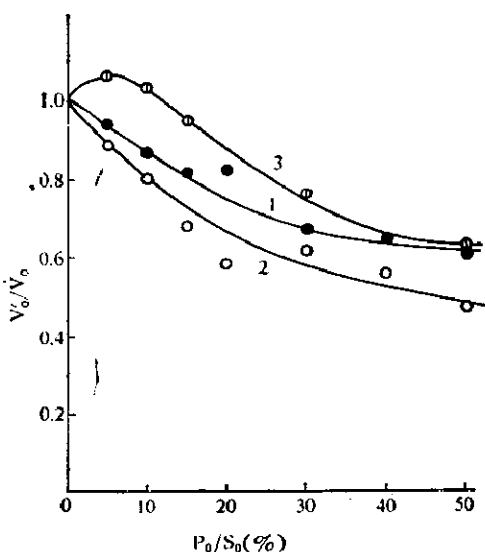


图 8 初始产物浓度对反应初速度的影响

Fig. 8 The effect of initial product concentration on initial reaction rate

1.  $S_0 = 10\text{mg/ml}$  2.  $S_0 = 20\text{mg/ml}$

3.  $S_0 = 32\text{mg/ml}$

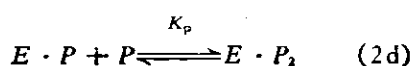
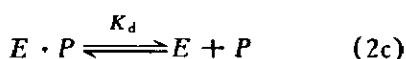
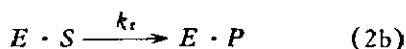
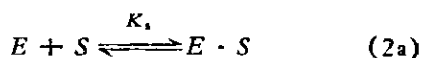
$V_0'$ : 添加产物后的反应初速度

$V_0'$ : Initial reaction rate after adding product

图 8 中曲线(2)与(3)的形状相似,  $V_0'$  随  $P_0$  的增加而迅速降低。初始底物浓度较高时, 比较低时产物抑制现象更为严重, 但在初始底物浓度更高的情况下, 少量的产物能使  $V_0'$  增大, 然后随着  $P_0$  的进一步增加,  $V_0'$  降低, 又出现产物抑制现象。

## (六) 反应动力学方程的建立及拟合

1. 反应动力学方程: 由上述实验结果, 提出下述反应机理来描述氢化可的松  $\Delta'$ -脱氢反应的动力学过程:



反应速度方程为:

$$V_1 = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{k_t E_0 K_s [S]}{1 + K_s [S] + K_d [P] + K_d K_p [P]^2} \quad (3)$$

由于底物的溶解是反应速率的控制步骤, 所以较大的固体量(固液接触表面积增大)提供了较大的溶解速率, 从而维持较高的液相浓度。因此认为:

$$S = K_1 S_T \quad (4)$$

$$P = K_2 P_T \quad (5)$$

$S_T$  为反应系统中氢化可的松总浓度 (mg/ml)

$P_T$  为反应系统中氢化泼尼松总浓度 (mg/ml)

$K_1$  为氢化可的松的比例常数

$K_2$  为氢化泼尼松的比例常数

将(4)、(5)式代入(3)得:

$$V = - \frac{dS_T}{dt} = \frac{k_t K_s [E_0] [S_T]}{\left[ 1 + K_s K_1 [S_T] + K_d K_2 [P_T] + K_d K_2 K_1^2 [P_T]^2 \right]} \quad (6)$$

将(6)式中参数合并, 并代入  $P_T = S_0 - S_T + P_0$ , 则(6)式可简化为:

$$V = \frac{[S_T]}{a + b[S_T] + c[S_T]^2} \quad (7)$$

将(7)式积分整理得:

$$t = a \ln(S_0/S) + b(S_0 - S) + 0.5c(S_0^2 - S^2) \quad (8)$$

(其中  $S_T$  以  $S$  表示)

式中

$$a = \left[ 1 + K_d K_2 (S_0 + P_0) \right]$$

$$+ K_d K_p K_2^2 (S_0 + P_0)^2 \Big] / \Big[ k_r E_0 K_s \Big] \quad (8a)$$

$$b = \Big[ K_s K_1 - K_d K_2 - 2 K_d K_p K_2^2 (S_0 + P_0) \Big] / \Big[ k_r E_0 K_s \Big] \quad (8b)$$

$$c = \frac{K_d K_p K_2^2}{K_s E_0 K_s} \quad (8c)$$

由图(4, 5, 7)可知, 氢化可的松的  $\Delta'$ -脱氢反应过程中存在诱导期, 因此, 用于回归的数学模型为:

$$Y = A_0 + A_1 \ln (S_0 / S) + A_2 (S_0 - S) + A_3 (S_0^2 - S^2)$$

线性化后:

$$Y = A_0 + A_1 X_1 + A_2 X_2 + A_3 X_3 \quad (9)$$

式中:  $y$ : 反应时间  $t$

$A_0$ : 诱导期  $t_0$

$A_1$ : (8)式中的  $a$

$A_2$ : (8)式中的  $b$

$A_3$ : (8)式中的  $c$

$X_1$ :  $\ln (s_0 / s)$

$X_2$ :  $S_0 - S$

$X_3$ :  $S_0^2 - S^2$

(9)式为线性化的多元函数, 利用所得实验数据, 用多元最小二乘法进行计算机线性回归, 可得模型参数  $A_0$ 、 $A_1$ 、 $A_2$  和  $A_3$ 。再将参数代入(9)式, 即得某一条件下的反应动力学方程式。

2. 动力学方程的拟合: 对于在特定的  $S_0$ 、 $P_0$ 、 $E_0$  下进行的反应, 可将  $S_0$ 、 $P_0$  和  $E_0$  代入参数中, 经回归得到相应的  $A_0$ 、 $A_1$ 、 $A_2$  和  $A_3$ 。将所得参数代入(9)式即得到用来拟合该反应实验值与计算值的方程式。以图(5)中  $S_0$  为 40mg/ml 的固体悬浮液底物的  $\Delta'$ -脱氢反应为例, 回归所得参数为:  $A_0 = 0.586h$ ,  $A_1 = 9.744h$ ,  $A_2 = -0.828h \cdot ml/mg$ ,  $A_3 = 0.0109h \cdot ml^2/mg^2$ , 相关系数  $r = 0.999$ 。拟合动力学积分式为:

$$t = 0.586 + 9.744 \ln (S_0 / S) - 0.828 (S_0 - S) + 0.0109 (S_0^2 - S^2)$$

由上式计算出的时间  $t_{\text{计}}$  与实验值  $t_{\text{实}}$  的比较列于表1。

表 1 固体悬浮液底物脱氢反应过程的拟合值与实验值的比较

Table 1 Comparison of calculated data with experimental data for dehydrogenation of substrate suspension

转化率(%) Conversion (%)	3.61	8.58	14.3	21.3	29.6	37.6	52.9	84.9
$t_m(h)$	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00	8.00
$t_c(h)$	0.99	1.49	2.00	2.53	3.03	3.42	4.03	8.00
$\frac{ \Delta(t) }{t_m} \%$	1.0	0.7	0.0	1.2	1.0	2.3	0.8	0.0

$m$  = measured;  $c$  = calculated

在拟合过程中发现, 当  $t$  值小于底物转化 85% 所需时间  $t_l$  时,  $t_m$  与  $t_c$  拟合良好; 当  $t$  大于  $t_l$  时, 由计算所得的转化率 (可达 100%) 与实验测得的转化率 (小于 100%) 不一致。如上述图 5, 7 的反应过程曲线中, 最终转化率  $X_f$  只能达到 50—85%。

$t$  大于  $t_l$  时, 方程(9)与该反应动力学行为不符的原因尚不清楚。实验结果表明, 在相同条件下转化不同浓度的底物时, 所达到的最终转化率  $X_f$  不同。因此, 热力学平衡不能解释方程(9)与该反应动力学行为不一致的现象。其它因素如溶氧浓度等也可能影响底物的转化。由结果与讨论(二)中可知, 底物浓度为 0.05mg/ml 时, 最终转化率能达到 100%, 可见反应系统中溶氧浓度低于饱和度时, 不会影响底物的最终转化率。此外, 在不同装液量对底物转化影响的试验中, 比较装液量为 25ml 的两组实验结果, 反应 4 小时转化率分别达到 82% 和 81.4%, 至 24 小时后, 转化率分别为 83.3% 和 82.5%, 两者区别不大, 因

此, 由于溶氧浓度太低而使底物的  $X_t$  不能达到 100% 的说法也不能成立。较可能的一种解释<sup>[9]</sup>是由于底物的转化, 反应系统液相中的产物达到饱和而与溶液中的底物共同析出而形成混合结晶, 因此阻止了这部分底物的继续反应。

### 参 考 文 献

- [1] Koepsell, H. J.: *Biotech. Bioeng.*, 4(1): 57, 1962.
- [2] Ohlson, S.: *Biotech. Bioeng.*, 20(8): 1267, 1978.
- [3] Constantinides, A.: *Biotech. Bioeng.*, 22(1): 119,

- 1980.
- [4] Arinbasarova, A. Yu.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 16(6): 854, 1980.
- [5] Arinbasarova, A. Yu.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 18(3): 331, 1982.
- [6] Kondo, E.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7(2): 113, 1961.
- [7] Ohlson, S.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7: 103, 1979.
- [8] Chen, J. W.: *Biotech. Bioeng.*, 4: 65, 1962.
- [9] Kuo-cheng Chen.: *Biotech. Bioeng.*, 27(3): 253, 1985.
- [10] 杨廉婉等: *微生物学报*, 23(2): 128, 1983.
- [11] Ivashkiv, E.: *Biotech. Bioeng.*, 13(4): 561, 1971.

## KINETICS OF $\Delta'$ -DEHYDROGENATION OF HYDROCORTISONE BY *ARTHROBACTER SIMPLEX* BY-2-13

### I. KINETICS OF $\Delta'$ -DEHYDROGENATION OF HYDROCORTISONE BY FREE CELL OF *ARTHROBACTER SIMPLEX* BY-2-13

Zhong Lichan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Cao Zhuan Li Qiang Shi Yan

(Tsinghua University, Beijing)

The kinetic behaviors of transformation of hydrocortisone to prednisolone by free cell of *A. simplex* BY-2-13, including: (1) the effect of initial substrate concentration on reaction and the relationship between initial rate and substrate concentration for both low substrate concentration (with no suspension) and high substrate concentration (with suspension of substrate); (2) the effect of enzyme concentration and (3) the product inhibition of the reaction system, were investigated. The time course of  $\Delta'$ -dehydrogenation of both low and high substrate concentrations did not follow Michaelis-Menton kinetics, although the initial rate-concentration profile were similar to that of Michaelis-Menton relation and showed a  $K_m$  of 0.33 mg/ml and 29.41 mg/ml,

respectively.

The product inhibition effect was found whether at high or low substrate concentrations. Based on the data, a kinetic model for the  $\Delta'$ -dehydrogenation of hydrocortisone was developed. By linearizing the model and regression, the parameters of the model were obtained, from which the calculated curves can fit the experimental data quite close up to 85% of conversion.

### Key words

*Arthrobacter simplex* BY-2-13; Biotransformation; Hydrocortisone; Kinetics of  $\Delta'$ -dehydrogenation