

简单节杆菌 17 α 羟基-16 β 甲基孕甾-4,9(11)二烯-3,20-二酮脱氢酶产酶条件研究

王普^{1,2}, 岑沛霖¹, 陈希杨² (1. 浙江大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310027; 2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘要:目的 优化简单节杆菌 17 α 羟基-16 β 甲基孕甾-4,9(11)二烯-3,20-二酮(简称 HMPDD)脱氢酶产酶条件。方法 采用摇瓶培养方法,考察培养基组成及发酵条件对 HMPDD转化率的影响。结果 较佳产酶培养基为:葡萄糖 0.4%、玉米浆 1.2%、KH₂PO₄ 0.2%、蛋白胨 0.3%。较佳产酶条件为:培养基初始 pH7.0;接种量 20%;摇瓶装量 100mL/250mL三角瓶;接种后 4h内添加 0.05g/L底物作为诱导物对产酶有利;添加 10⁻⁴ mol/L Co²⁺和 Mg²⁺,可使酶活分别较对照提高 12.9%和 6.1%;菌体培养 12h时酶活达最大值,为 24.46 μ mol/g $\cdot$ min。结论 通过培养基组成及产酶条件的优化,酶活力有较大幅度的提高。

关键词:简单节杆菌; 甾体; 微生物脱氢

中图分类号: TQ464.8 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)03-0194-05

Optimization of producing conditions for Δ^1 -dehydrogenase of 17 α -hydroxy-16 β -methylpregna-4, 9, (11)-diene-3, 20-dione by *Arthrobacter simplex*

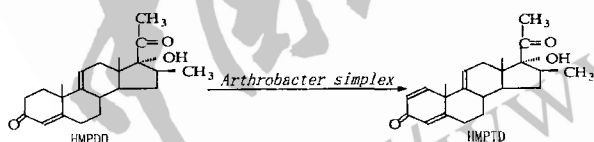
WANG Pu^{1, 2}, CEN Pei-lin¹, CHEN Xi-yang² (1. Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE 17 α -hydroxy-16 β -methylpregna-4, 9, (11)-diene-3, 20-dione (HMPDD) was one of the important intermediates used for the production of beta-methasone. In this paper, optimum conditions for the microbial dehydrogenation of HMPDD by *Arthrobacter simplex* were studied. **METHOD** Effects of culture medium and bioconversion conditions on dehydrogenase activity were investigated by shake culture. **RESULTS** Optimized culture medium for dehydrogenase production was as follows: glucose 0.4%, corn steep liquor 1.2%, KH_2PO_4 0.2%, peptone 0.3%. The optimum conditions for enzyme formation were as follows: initial pH of medium 7.0, inoculum volume 20% (V/V), loading amount 100 mL for 250 mL shake flask. By adding 0.05 g/L HMPDD as inducer, the dehydrogenase activity could be enhanced obviously. Added 10^{-4} mol/L Co^{2+} and Mg^{2+} , the enzyme activity was increased by 12.9% and 6.1% respectively, compared to the contrast. Maximum dehydrogenase activity of 24.46 $\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$ was obtained at 12 h for shake culture. **CONCLUSION** At optimum conditions, the dehydrogenase activity is increased obviously.

KEY WORDS: *Arthrobacter simplex*; steroid; microbial dehydrogenation

倍他米松 (betamethasone) 是目前糖皮质激素中作用最强的药物之一, 其抗炎作用为氢化可的松 (hydrocortisone) 的 35 倍, 是地塞米松的 2.5 倍^[1]。当抗炎甾体激素药物母核的 $\text{C}_{1,2}$ 位导入双键后, 能成倍地增加其抗炎作用。化学法进行 $\text{C}_{1,2}$ 位脱氢一般多采用二氧化硒法, 此法脱氢时 21 位甲基亦会发生氧化, 致使收率较低。采用微生物脱氢具有反应条件温和, 专一性强, 转化率高等特点。

HMPDD 经微生物催化 $\text{C}_{1,2}$ 脱氢反应生成 17 α -羟基-16 β -甲基-孕甾-4, 9(11)-三烯-3, 20-二酮 (简称 HMPTD) 是倍他米松生产中的一步关键反应, 反应式如下:



简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) 产生的甾体脱氢酶为胞内酶, 其催化 $\text{C}_{1,2}$ 脱氢反应机制为在酶催化下先发生酮醇化, 然后形成烯醇氢与酶结合而直接脱去氢^[2]。据报道, 甾体脱氢酶对底物的转化率与甾体底物的化学结构有关^[3]。Bae 等^[4]采用三步层析法对简单节杆菌产生的甾体 $\text{C}_{1,2}$ 脱氢酶进行了纯化, 收率为 13%。Choi 等^[5]克隆了简单节杆菌 IFO12069 的 3-酮基甾体 $\text{C}_{1,2}$ 脱氢酶基因, 并在变青链霉菌中进行了表达。本实验对简单节杆菌产生的 HMPDD 脱氢酶的产酶工艺条件进行了研究, 得到了优化的产酶培养基组成和较适的产酶条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

简单节杆菌诱变株 Q4-2-51, 系本实验室自行选育得到。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 (%) 葡萄糖 1.3, 酵母膏 1.3, 琼脂 2.0, pH 7.0 ~ 7.2。

1.2.2 摇瓶培养基 (%) 葡萄糖 0.6, 玉米浆 0.8, 蛋白胨 0.3, KH_2PO_4 0.15。pH 7.0 ~ 7.2。

1.3 培养条件

1.3.1 斜面培养 30℃ 培养 3 d。

1.3.2 摇瓶培养 菌体生长阶段: 30℃, 旋转式摇床 120 r/min 振荡培养 12 ~ 14 h; 转化阶段: 摇床转速为 150 r/min, 转化温度为 33℃。

1.4 HMPDD 脱氢酶活力测定

采用底物转化法测定。

1.4.1 含 HMPDD 转化液的配制 50 mg HMPDD 溶解于 5 mL 甲醇溶液中, 然后滴加到 43 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液中, 制备得到的水析料 33℃ 恒温 30 min 后供转化反应应用。

1.4.2 酶活力测定 取 30 mL 培养至一定菌体浓度的发酵液, 10 000 r/min 离心 10 min, 所得菌体经洗涤后, 用磷酸缓冲液定容至 10 mL。吸取此菌悬液 5 mL, 烘干至恒重后测得菌体干重。另取 2 mL 含有菌体的磷酸缓冲液, 加入到由“1.4.1”项下的转化液中, 33℃, 150 r/min 转化 10 min 后, 取出 2 mL 转化液置沸水浴中加热 5 min 使菌体所含的酶失活, 通过高效液相色谱法测定产物的生成量。以脱氢产物 HMPTD 的形成定义脱氢酶活力, 即一个酶活力单位定义为: 每分钟每克干菌体将 1 μmol 的 HMPDD 转化成脱氢产物 HMPTD 所需的酶量。

酶活力 [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$] = $(A \times C \times 10^6) / (M \times m \times T)$

式中: A 为 HMPDD 转化率, C 为加入的底物 HMPDD 量 (g), M 为 HMPTD 的相对分子质量, m 为菌体干重 (g), T 为转化反应时间 (min)。

为确保酶活力测定时处于反应初速度范围内, 试验中考察了洗涤细胞在磷酸缓冲液介质中转化不同时间的转化率, 结果表明, 转化时间不超过 30 min 时, HMPDD 转化率随转化时间的延长呈线性增加。故在产酶条件试验中将转化时间选定为 10 min。

2.1.1 不同碳源对产酶的影响 由于不同菌种含有的酶系不同,因而对不同碳源的利用情况亦不同,进而影响产酶。试验中考察了培养基中加入蔗糖、麦芽糖、棉籽糖、可溶性淀粉和葡萄糖等五种不同碳源对简单节杆菌生长和产脱氢酶的影响,添加浓度均为 0.6%,结果见表 1。数据表明,以葡萄糖为碳源时的酶活力最高,达到 13.51 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$,其次为可溶性淀粉和棉籽糖,其相对于葡萄糖为碳源时的酶活力分别为 95.5% 和 85.6%。

2.1.2 葡萄糖浓度对产酶的影响 在确定了葡萄糖为产酶的较佳碳源后,试验中还考察了不同葡萄糖浓度对产酶的影响,见图 1。结果表明,当葡萄糖浓度低于 0.6% 时,提高葡萄糖浓度对菌体生长影响不大,但对产酶有明显的促进作用。葡萄糖浓度为 0.6% 时的酶活力最高。继续提高糖浓度,菌体产酶能力迅速下降,表明高浓度的葡萄糖对产酶存在碳分解代谢物阻遏作用。

表 1 不同碳源对产酶的影响

Tab 1 Effects of various carbohydrates on HM PDD dehydrogenase activity

碳源	A_{620}	酶活 [$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$]	相对酶活 (%)
蔗糖	0.540	10.46	77.4
麦芽糖	0.499	8.66	64.1
棉籽糖	0.486	11.57	85.6
可溶性淀粉	0.546	12.90	95.5
葡萄糖	0.483	13.51	100

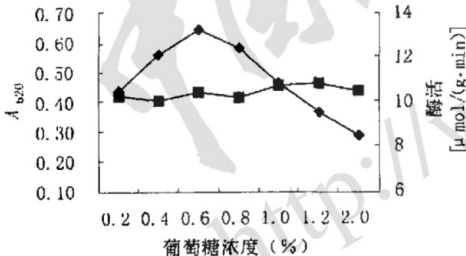


图 1 葡萄糖浓度对菌体生长及产酶的影响

Fig 1 Effects of glucose concentration on biomass and HM PDD dehydrogenase activity

2.1.3 不同氮源对产酶的影响 试验中考察了添加 0.3% 的蛋白胨,浓缩酵母浸出物, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , 尿素, NH_4Cl 等六种不同氮源对菌体产酶的影响,见表 2。结果表明,采用浓缩酵母浸出物为氮源时的酶活力最高,达 14.68 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。但由于其所含成分比较复杂,包括多种生长因子、氨基酸和糖类,易因产地和生产批号的不同而出现质量波动。相比较而言,蛋白胨价格便宜,质量易控制,因而确定蛋白胨为较适的氮源。采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 尿素, NH_4NO_3 , NH_4Cl 等无机氮源发酵时,对微生物的生长影响不大,但酶活力却与有机氮源相比下降较多,表明迅速利用的

蛋白胨	0.460	13.75
浓缩酵母浸出物	0.415	14.68
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.442	10.47
NH_4NO_3	0.437	7.42
尿素	0.439	5.82
NH_4Cl	0.427	9.78

2.1.4 蛋白胨浓度对产酶的影响 蛋白胨中含有丰富的氨基酸,易被菌体所利用,因而是一种良好的氮源。Ohlson 等^[6]在研究菌株 C_L 脱氢酶时发现,蛋白胨对产酶有显著的刺激作用。试验中考察了不同蛋白胨浓度对产酶的影响,见图 2。结果表明,蛋白胨浓度对产酶影响较大,其浓度过高或过低对产酶均不利。采用 0.4% 蛋白胨浓度时的酶活力最高,为 15.48 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。当蛋白胨浓度大于 0.4% 时,菌体产酶能力下降很快,其原因可能是由于高浓度的蛋白胨带入培养基中的磷含量较高所致。

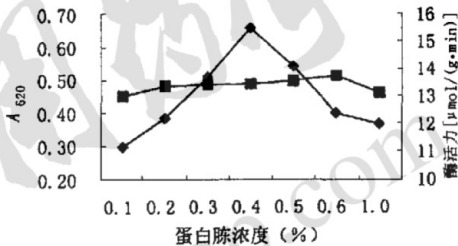


图 2 蛋白胨浓度对产酶的影响

Fig 2 Effects of peptone concentration on dehydrogenase activity

2.1.5 玉米浆浓度对产酶的影响 玉米浆是一种营养丰富、价格低廉的发酵工业常用氮源。玉米浆中通常含有一定量的生物素,而适量的生物素对细胞膜通透性有一定的影响。试验中考察了不同玉米浆浓度对产酶的影响,见图 3。随着培养基中玉米浆浓度的提高,菌体的脱氢酶活力也随之提高。玉米浆浓度为 1.0% 时,酶活力可达 16.76 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。继续增加玉米浆浓度则不利于产酶。其原因在于玉米浆中含有丰富的氨基酸(如丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等)、还原糖、磷、微量元素和生长素,为易被微生物利用的速效性氮源。高浓度的玉米浆对菌株脱氢酶的产生存在氮分解代谢物阻遏。

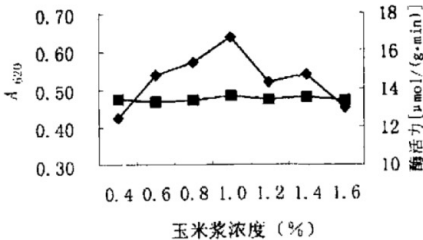


图 3 玉米浆浓度对产酶的影响

Fig 3 Effects of concentration for corn steep liquid on dehydrogenase activity

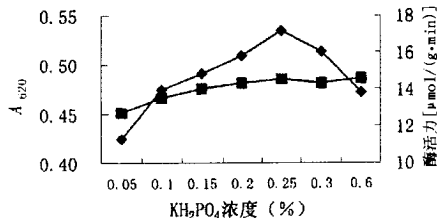


图4 KH₂PO₄ 浓度对菌体生长及产酶的影响

Fig 4 Effects of KH₂PO₄ concentration on biomass and dehydrogenase activity

2.1.6 KH₂PO₄ 浓度对产酶的影响 不同浓度的 KH₂PO₄ 对菌体生长及产酶的影响见图 4。结果表明, KH₂PO₄ 浓度对产酶的影响较大。当其浓度为 0.25% 时酶活力最高。KH₂PO₄ 浓度过高会阻遏酶的生成, 表现在酶活力降低。从菌体浓度的变化可知, 随着培养基中 KH₂PO₄ 浓度的增加, 菌体量亦有所增加, 表明 KH₂PO₄ 对菌体生长有一定的促进作用。兼顾菌体生长和利于产酶, 以选用 0.25% 的 KH₂PO₄ 浓度为好。

2.1.7 正交试验 在上述产酶影响因素的单因素试验基础上, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验, 结果如表 3 所示。

表3 正交试验设计及统计分析表

Tab 3 The orthogonal design and statistic analysis

试验号	A 葡萄糖 (%)	B 玉米浆 (%)	C 蛋白胨 (%)	D KH ₂ PO ₄ (%)	酶活力 [μmol/(g·min)]
1	0.4	0.8	0.3	0.20	18.28
2	0.4	1.0	0.4	0.25	16.85
3	0.4	1.2	0.5	0.30	17.10
4	0.6	0.8	0.4	0.30	14.21
5	0.6	1.0	0.5	0.20	15.40
6	0.6	1.2	0.3	0.25	15.56
7	0.8	0.8	0.5	0.25	14.66
8	0.8	1.0	0.3	0.30	16.52
9	0.8	1.2	0.4	0.20	17.30
k ₁	17.41	15.72	16.79	16.99	
k ₂	15.06	16.26	16.12	15.69	
k ₃	16.16	16.65	15.72	15.94	
R	2.35	0.93	1.07	1.30	

正交试验得到的理论最佳培养基配方为 A₁B₃C₁D₁, 即葡萄糖 0.4%, 玉米浆 1.2%, 蛋白胨 0.3%, KH₂PO₄ 0.2%。由极差分析可知, 葡萄糖浓度对产酶的影响最为显著, 随后依次是 KH₂PO₄, 蛋白胨和玉米浆浓度。试验中还对正交试验得到的较佳培养基组成进行了验证试验, 酶活力达到 19.74 μmol/(g·min), 比采用实验最佳培养基组成时的酶活力提高 8%。

2.2 简单节杆菌产酶条件研究

2.2.1 培养基初始 pH 对产酶的影响 用一定浓度的 NaOH 或 HCl 溶液调节发酵培养基的初始 pH 分别为 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 以考察培养基初始 pH 对产酶的影响。当培养基初始 pH 值为 7.0 时, 酶活力最高。见图 5。

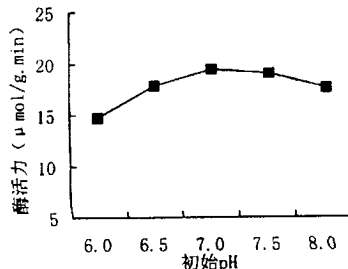


图5 培养基初始 pH 对产酶的影响

Fig 5 Effects of initial pH on dehydrogenase activity

2.2.2 不同接种量对产酶的影响 不同接种量对菌体产酶的影响见图 6。随着接种量的增大, 菌体浓度一直在增加, 而酶活力则在接种量为 20% 时达到最高, 接种量过大时酶活力反而下降。较适的接种量以 20% 为好。

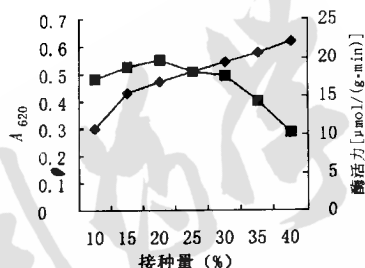


图6 接种量对产酶的影响

Fig 6 Effects of inoculum volume on dehydrogenase activity

2.2.3 摇瓶装量对产酶的影响 摇瓶培养时发酵液的溶氧水平受摇床振荡方式、摇床转速和培养基装量等诸因素的影响。试验中考察了不同摇瓶装量对产酶的影响。结果表明, 250mL 摇瓶装 40mL 培养基时, 由于通气量较大, 菌体浓度 (A₆₂₀) 达 0.61, 酶活力并不高。当装液量为 100mL 时, 菌体浓度 (A₆₂₀) 为 0.472, 但酶活力较高。继续提高摇瓶装量, 则由于发酵液中溶氧水平的降低, 造成酶活力和菌体浓度均有所降低。见图 7。

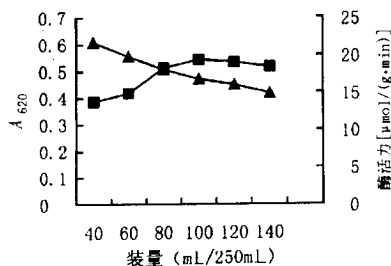


图7 摇瓶装量对产酶的影响

Fig 7 Effects of medium volume on dehydrogenase activity

2.2.4 诱导物加量对产酶的影响 简单节杆菌 C_{1,2} 脱氢酶为诱导酶, 不同底物对酶活力的诱导作用不同^[4]。试验中考察了 HMPDD 加量对脱氢酶的诱导效果, 结果表明, 添加诱导物对酶活力提高效果比较明显, 当诱导物加量为 0.05g/L 时酶活力最高。过量添加 HMPDD 则对菌体生长有一定的抑制作用, 酶活力亦随之有所降低。见图 8。

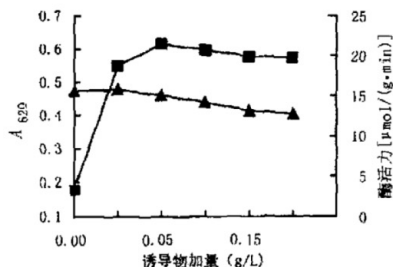


图 8 诱导物加量对产酶的影响

Fig 8 Effects of inducer concentration on dehydrogenase activity

2.2.5 诱导物添加时间对产酶的影响 接种后按不同时间加入 HMPDD, 考察诱导物添加时间对产酶的影响, 结果表明, 在接种后 0~4h 内加入 HMPDD 诱导物对菌体产酶有利。延迟加入诱导物, 则诱导作用减弱。见图 9。

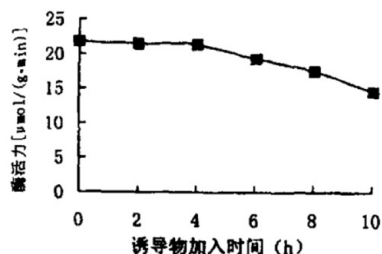


图 9 诱导物加入时间对产酶的影响

Fig 9 Effects of adding time for inducer on dehydrogenase activity

2.2.6 金属离子对产酶的影响 考察了 Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 等不同金属离子对产酶的影响, 添加浓度均为 $10^{-4} mol/L$ 。结果表明, 添加一定浓度的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对产酶有较强的抑制作用, Zn^{2+} , Fe^{2+} 对产酶的抑制作用较弱。 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 对产酶则有一定的促进作用, 酶活力分别较对照提高 12.9% 和 6.1%。见表 4。

表 4 金属离子及微量元素对产酶的影响

Tab 4 Effects of various mineral components and trace elements on dehydrogenase activity

金属离子	A_{620}	酶活 [$\mu mol/(g \cdot min)$]
对照	0.472	21.16
Zn^{2+}	0.470	19.56
Fe^{3+}	0.468	12.34
Cu^{2+}	0.473	13.47
Co^{2+}	0.475	23.89
Mg^{2+}	0.470	22.45
Fe^{2+}	0.467	18.12

2.2.7 间歇培养过程中菌体生长及产酶时间曲线 间歇培养过程中酶活力、生物量、pH 随时间变化曲线见图 10 和图 11。数据表明, 菌体浓度随培养时间的增加而升高, 12 h 后菌体生长进入稳定期, 此后菌体浓度基本不再增加, 培养液的 pH 维持在 7.2 左右。酶活力在 12 h 时达最大值, 继续延长培养时间酶活力开始下降。较适的 HMPDD 投料时间以 12 h 为好, 此时菌体所含的甾体脱氢酶活力较高, 可高效催化 HMPDD 的 C_{11} 脱氢反应。

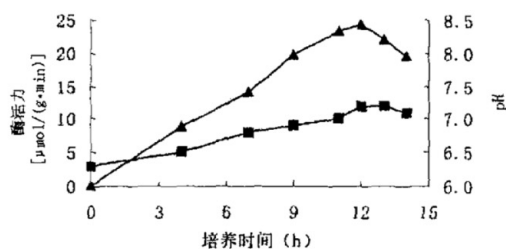


图 10 间歇培养时简单节杆菌产酶过程曲线

Fig 10 Time courses of pH and dehydrogenase activity in batch culture by *Arthrobacter simplex*

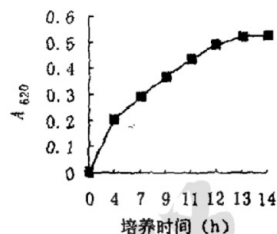


图 11 菌体浓度随时间变化曲线

Fig 11 Time course for biomass in batch culture

3 结论

3.1 通过正交试验, 得到较佳的产酶培养基组成为: 葡萄糖 0.4%, 玉米浆 1.2%, 蛋白胨 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, 此条件下酶活力可达 $19.74 \mu mol/g \cdot min$ 。培养基中添加 $10^{-4} mol/L$ 的 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 对产酶有一定的促进作用。

3.2 较佳产酶条件为: 培养基初始 pH 7.0 接种量 20%, 摇瓶装量为 250 mL 三角瓶装 100 mL 培养基, 添加 0.05 g/L 的 HMPDD 利于诱导产酶, 但加入过量的诱导物则会抑制菌体的生长, 诱导物添加时间以接种后 4 h 内加入为宜。金属离子 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对产酶有很大的抑制作用, Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对产酶的抑制作用较弱, Co^{2+} 和 Mg^{2+} 则对产酶有一定的促进作用。

3.3 考察了间歇培养时的产酶时间曲线, 发现随着培养时间的增加酶活力迅速增加, 12 h 时酶活高达 $24.46 \mu mol/g \cdot min$ 。继续延长培养时间, 则引起酶活力的下降。HMPDD 投料时间以菌体培养 12 h 为宜。

参考文献

- [1] 徐诗伟, 法幼华. A 环饱和甾体的微生物转化作用 III 倍他美松中间体 16 β -甲基-5 α - $\Delta^9(11)$ -孕甾烯-3 β , 17 α , 21-三羟基-20-酮-21-醋酸酯的 Δ^1 作用 [J]. 微生物学报, 1984, 24(1): 46
- [2] 褚志义. 生物合成药理学 [M]. 北京, 化学工业出版社, 2000, p658
- [3] Lee MK, Bae M. Enzymatic characteristics of steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* [J]. Microbiol Biotechnol 1994, 4(2): 119
- [4] Bae M, Lee MK. Purification of steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* [J]. Microbiol Biotechnol 1993, 3(3): 181
- [5] Choi KP, Molnar I, Yamashita M. Purification and characterization of the steroid 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans* [J]. Biochem (Tokyo), 1995, 117(5): 1043
- [6] Ohlson S, Larsson P O, Mosbach K. Steroid transformation by activated living immobilized *Arthrobacter simplex* cells [J]. Biotechnol Bioeng 1978, 20: 1267.

收稿日期: 2003-06-12