

Acinetobacter johnsonii G2 细胞的固定化及其非水相介质中催化合成葛根素糖苷

许婷婷¹, 项 梦², 潘 扬², 吴薛明^{2*}

(1. 南京中医药大学医学与生命科学学院, 江苏 南京 210023;

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 利用海藻酸钠包埋法固定化 *Acinetobacter johnsonii* G2 细胞, 在非水相介质中生物催化葛根素合成葛根素糖苷, 考察了细胞的固定化条件、转化条件以及固定化细胞的操作稳定性。结果表明, 最佳固定化条件为: 海藻酸钠质量分数为 2%, 氯化钙质量分数为 2%, 细胞包埋量的体积分数为 50%; 最佳转化条件为: 温度为 40℃, pH 为 6.47, 二甲基亚砜体积分数为 20%。在最佳条件下, 葛根素在催化体系中质量浓度提高至 31.92 g/L, 产率达 93%, 且固定化细胞的重复使用稳定性好。与游离细胞相比, 固定化细胞对 pH、温度及有机溶剂表现出更强的稳定性, 且在非水相介质中催化效率更高。

关键词: *Acinetobacter johnsonii*; 非水相介质; 固定化; 葛根素; 生物合成

中图分类号: R733.7

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)04-0131-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.04.030

Synthesis of puerarin glycoside over immobilized *Acinetobacter johnsonii* G2 cell in a non-aqueous media

XU Ting-ting¹, XIANG Meng², PAN Yang², WU Xue-ming^{2*}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: An effective method to produce puerarin glycoside in non-aqueous media by using *Acinetobacter johnsonii* G2 cells immobilized in sodium alginate is described. The immobilization conditions, biotransformation conditions and operation stability of immobilized cell are investigated. The optimal immobilization conditions are shown as follows: the mass concentrations of both sodium alginate and calcium chloride are 2% and the volumetric concentration of embedded cells is 50%; The optimal transform conditions are confirmed as that temperature is 40℃, pH is 6.47, and concentration of DMSO is 20%. The yield of puerarin glycosides can achieve 93% by the immobilization cell using 31.92 g·L⁻¹ puerarin as substrate under optimal conditions. The biosynthesis system remains higher recovery yield during repeated use for 10 reaction batch cycles. The immobilized cell exhibits stronger stability against pH, temperature and organic solvent than free cells, and appears higher catalytic efficiency in non-aqueous media.

Key words: *Acinetobacter johnsonii*; non-aqueous media; immobilization; puerarin; biosynthesis

葛根素是豆科葛属植物葛根异黄酮的主要活性成分之一, 具有降低血压、心肌缺血保护、抗氧化、降血糖等药理作用^[1-2]。但葛根素水溶性差限制了其药物活性的开发应用, 因此, 通过结构修饰提高水溶性是改善其药学价值的可行途径。对于结构复杂的天然活性产物来说, 利用生物转化方法能弥补化学合成法得率低、反应专一性差和副产物多等缺点。且近年来开展的天然产物生物转化研究也取得了可喜的进展^[3-4], 尤其是非水相体系的生物转化与生物催化具有提高非极性底物的溶解度、抑制依赖于

水的某些不利反应、转化体系不易染菌、可操控反应条件以提高转化效率等诸多优点, 为非极性天然活性产物的生物合成提供可行方案^[5-6]。

本课题组前期研究中筛选发现 *Acinetobacter johnsonii* G2 菌株(如图 1 所示)可催化葛根素合成葛根素糖苷^[7], 但其生产工艺中存在菌体利用效率低、菌体回收困难、底物浓度低等问题, 导致生产成本增加, 不适合大规模工业化生产。利用海藻酸钠包埋法制备的固定化细胞有利于细胞的反复使用, 且细胞活性高、制备条件温和简单, 已广泛应用于细

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20161038); 南京中医药大学青年自然科学基金(13XZR02)

作者简介: 许婷婷(1980-), 女, 博士, 讲师, 主要从事生物制药研究, xt05010368@sina.com; 吴薛明(1979-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然产物生物转化研究, 通讯联系人, 025-85811516, wuxuemingbbz@sina.com。

胞的固定化^[8-10]。故笔者考察了海藻酸钠包埋法的固定化条件和葛根素糖苷合成的转化条件,采用优化条件下的固定化细胞,在非水相介质中催化合成葛根素糖苷,旨在寻找一种适合在非水相体系中具有稳定催化活性与效率的固定化方法。

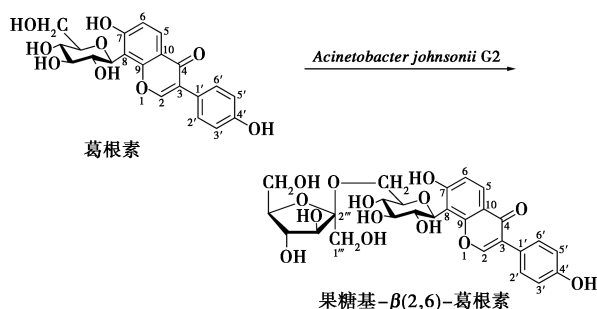


图 1 *Acinetobacter johnsonii* G2 催化合成葛根素糖苷

1 材料与方 法

1.1 材 料

约氏不动杆菌 G2 菌株 (*Acinetobacter johnsonii* G2), 实验室自行筛选获得; 葛根素 (质量分数 >98%), 南京泽朗医药科技有限责任公司生产; 发酵培养基: 蔗糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 3 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, pH 7.3。

1.2 方 法

1.2.1 HPLC 条件

高效液相色谱仪 (美国戴安 P600), Alltech C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 进样体积为 10 μL, 柱温为 30℃, 紫外检测器, 检测波长为 254 nm, 流动相为 V(甲醇):V(水) = 28:72, 流速为 1 mL/min^[7]。

1.2.2 游离细胞合成葛根素糖苷方法

种子细胞于 30℃、180 r/min 培养 12 h, 取此发酵液为粗酶液。转化体系以 1 mol/L Na₂HPO₄/15 mol/L KH₂PO₄ 溶液为缓冲液, 体系中酶液体积分数为 20%, 蔗糖质量浓度为 80 g/L, 葛根素质量浓度为 4 g/L。转化体系于 150 mL 带塞三角瓶中, 35℃、160 r/min 条件下反应 20 min, 产物经 HPLC 检测。产率 (yield, %) 定义为转化产物/底物的摩尔比。

1.2.3 菌体细胞的固定化方法

配制一定浓度的海藻酸钠溶液和 CaCl₂ 溶液, 121℃ 灭菌 20 min 后备用。取一定体积的粗酶液与海藻酸钠溶液混合均匀, 用注射器吸取混合液, 均匀滴至一定浓度的 CaCl₂ 溶液中, 制成大小均匀的凝

胶颗粒, 于 4℃ 冰箱中静置 12 h, 取出后用无菌水清洗 2 次即得固定化细胞。

1.2.4 固定化细胞合成葛根素糖苷方法

取固定化细胞并加入至上述转化体系, 于 150 mL 带塞三角瓶中, 40℃、160 r/min 条件下反应 20 min, 产物经 HPLC 检测。

1.2.5 最佳固定化条件的确定

利用单因素实验法考察不同浓度的海藻酸钠、CaCl₂、细胞包埋量对固定化细胞合成葛根素糖苷的影响。海藻酸钠质量分数分别为 1%、2%、3%、4%、5%; CaCl₂ 质量分数分别为 1%、2%、3%、4%、5%; 细胞包埋量体积分数为 20%、30%、40%、50%、60%。

1.2.6 最佳转化条件的确定

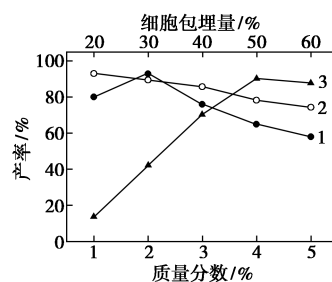
考察不同温度、pH 和有机溶剂对游离细胞与固定化细胞合成葛根素糖苷的影响。实验中所设温度范围为 25、30、35、40、45、50℃; Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 缓冲液 pH 范围为 4.92、5.91、6.47、6.98、7.38、8.04、8.67; 有机溶剂为甲醇 (Methanol)、乙醇 (Ethanol)、丙酮 (Acetone)、二甲基亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠包埋法固定化条件的优化

2.1.1 海藻酸钠质量分数对催化活性的影响

固定化条件对葛根素糖苷合成产率的影响如图 2 所示。由图 2 中曲线 1 可以看出, 海藻酸钠质量分数为 1% 时, 固定化细胞机械强度较差, 细胞易泄露, 催化活力也较低; 随着海藻酸钠质量分数的上升, 固定化细胞机械强度提高, 当海藻酸钠质量分数达到 2% 时, 产物合成产率最高; 随着海藻酸钠质量分数的继续提高, 导致凝胶网格过于致密, 使得固定化细胞内部的传质阻力逐渐增大, 不利于底物与细胞的接触, 转化产率随之降低。因此, 海藻酸钠的最适质量分数为 2%。



1—海藻酸钠; 2—CaCl₂; 3—细胞包埋量

图 2 固定化条件对葛根素糖苷合成产率的影响

2.1.2 CaCl_2 质量分数对催化活性的影响

Ca^{2+} 在海藻酸钠包埋法中主要起架桥作用,使海藻酸钠形成空间网络状结构从而固定细胞,故凝胶化剂 CaCl_2 对固定化细胞的制备同样有很大影响。由图2中曲线2可以看出,凝胶化剂 CaCl_2 质量分数越高,细胞催化活性越低,表明 CaCl_2 质量分数过大影响固定化细胞的通透性;但是过低的 CaCl_2 质量分数会导致固定化细胞强度不够,使固定化细胞容易破碎。综合考虑,以 CaCl_2 质量分数2%为最佳固定化条件。

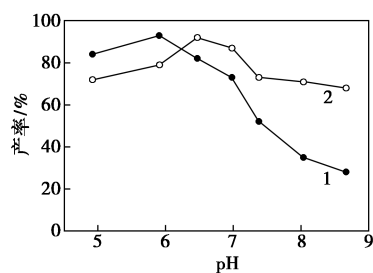
2.1.3 细胞包埋量对催化活性的影响

细胞包埋量对固定化细胞催化活性影响很大,随着细胞包埋量的增多,固定化细胞催化活性显著提高。由图2中曲线3可以看出,当细胞包埋量达到50%时,固定化细胞催化活性达到最高,继续增加细胞包埋量,固定化细胞催化活性趋于平衡并无明显变化,且细胞包埋量过多也将导致固定化颗粒容易涨裂,故选择50%为最佳细胞包埋量。

2.2 转化条件对细胞催化活性的影响

2.2.1 转化 pH 的影响

pH是影响酶活的重要因素,其过高或过低均会影响细胞的催化活性,pH对游离细胞与固定化细胞催化活性的影响如图3所示。



1—游离细胞;2—固定化细胞

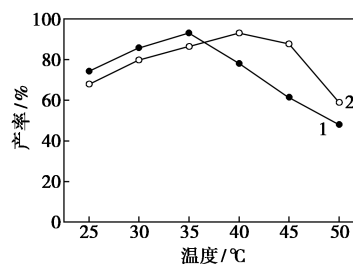
图3 转化 pH 对游离细胞与固定化细胞催化活性的影响

由图3可以看出,游离细胞在 pH 4.92~6.47 范围内催化活性较高,当 pH 超过 6.98 后,细胞催化活性显著降低;而细胞固定化后其 pH 稳定性得到显著提高,在 pH 4.92~8.67 范围内均保持了较高的催化活性,其最适 pH 为 6.47。

2.2.2 转化温度的影响

转化温度对游离细胞与固定化细胞催化活性的影响如图4所示。由图4可以看出,在 25~35℃ 范围内,随着温度升高,酶反应速率加快,游离细胞催

化活性逐渐增加,当温度为 35℃ 时催化活性最高;而随着温度的继续升高,细胞内酶蛋白的空间结构被破坏导致酶变性失活,催化活性显著降低。而细胞固定化后,细胞内酶的空间结构刚性提高,在较高的温度下其结构稳定性也相应提高,固定化细胞在 25~45℃ 范围内稳定性和催化活性均较高,因此,固定化细胞最适转化温度为 40℃。



1—游离细胞;2—固定化细胞

图4 转化温度对游离细胞与固定化细胞催化活性的影响

2.2.3 有机溶剂的影响

有机溶剂对细胞催化活性产生的影响如表1所示。由表1可以看出,游离细胞在 20% 甲醇和 DMSO 溶剂体系中催化活性较高,而在乙醇、丙酮和 DMF 溶剂体系中,细胞催化活性显著降低。而固定化细胞对上述有机溶剂耐受性显著提高,表明固定化可增加细胞的溶剂稳定性。由于 20% DMSO 体系中底物溶解度最高,故以此作为最佳反应体系。

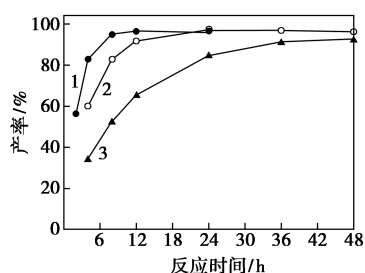
表1 有机溶剂对游离细胞与固定化细胞催化活性的影响

	产率/%				
	甲醇	乙醇	丙酮	二甲基甲酰胺	二甲基亚砷
游离细胞	96.8	49.0	27.6	38.8	91.2
固定化细胞	92.8	91.3	95.1	93.3	92.4

2.3 非水相介质中生物合成葛根素糖苷

2.3.1 底物质量浓度对催化活性的影响

与其他溶剂相比,DMSO 毒性更低且对底物的溶解度最高(葛根素在水相溶解度为 6.24 g/L),故以 20% DMSO 为最佳非水相介质。在最佳固定化条件下(海藻酸钠质量分数为 2%, CaCl_2 质量分数为 2%, 细胞包埋量为 50%), 增加葛根素质量浓度至 14.34、31.92、50.43 g/L, 于 40℃、pH 6.47 条件下合成葛根素糖苷。20% DMSO 中底物质量浓度对催化活性的影响及固定化细胞操作稳定性如图5所示。



1—14.34 g/L; 2—31.92 g/L; 3—50.43 g/L

图 5 20% DMSO 中底物质量浓度对催化活性的影响

由图 5 可以看出,随着底物质量浓度的提高,葛根素糖苷合成速率逐渐降低,达到产物最高产率的合成时间从 12 h 增加至 48 h,且最高产率也有所下降。从生产效率考虑,以葛根素质量浓度 31.92 g/L (5 倍于水相底物质量浓度),反应时间 24 h 为最佳葛根素糖苷合成条件,最终产物产率可达 93%。

2.3.2 固定化细胞的批次转化性能

固定化细胞的一个重要优势就是可以重复使用,考察了葛根素质量浓度为 31.92 g/L 时固定化细胞间歇批次反应的稳定性。每次反应后转化液抽滤,固定化细胞重新加入底物,考察同一批次固定化细胞的催化稳定性,结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出,固定化细胞重复使用 10 次后,转化产率仍能维持在 80% 以上,其催化的稳定性较好。

表 2 固定化细胞批次转化性能

转化批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
产率/%	100	100	99	99	98	95	92	89	86	82

3 结论

为了解决低水溶性黄酮类化合物在水相糖苷合成反应过程中底物浓度低、糖苷化产物产率低等缺点,利用海藻酸钠固定化细胞在水-亲水性有机溶剂的非水相反应体系中催化合成葛根素糖苷。结果表明,与游离细胞相比,固定化细胞对 pH、温度和有机溶剂的稳定性显著提高,为非水相催化反应提供了基础。在水-亲水性有机溶剂反应体系中,极性有机溶剂不但可降低反应体系的水活度,提高糖苷

产物产率,而且极性有机溶剂的加入也提高了疏水性底物质量浓度,使受热力学控制的逆水解反应平衡向着糖苷合成方向进行,提高了反应效率。以 20% DMSO 为非水相反应介质,以 5 倍于水相底物质量浓度的葛根素 31.92 g/L,反应 24 h,糖苷产物产率可达 93%。因此,海藻酸钠包埋法制备的固定化约氏不动杆菌 G2 细胞,其操作条件温和,操作方法简单,且在非水相介质中催化效率高、重复使用稳定性好,为黄酮类化合物糖苷合成的大规模工业化生产提供了研究基础。

参考文献

- [1] 张环宇,李大伟,史彩虹.葛根素的临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27:75-78.
- [2] Wu L D, Tong T, Wan S T, et al. Protective effects of puerarin against A β_{1-42} -induced learning and memory impairments in mice [J]. *Planta Medica*, 2017, 83(3/4): 224-231.
- [3] 吴薛明,许婷婷,储建林,等.黄酮类化合物酶法糖基化修饰的研究进展[J].中国天然药物,2010,8(5):389-400.
- [4] Greunke C, Glockle A, Antosch J, et al. Biocatalytic total synthesis of ikarugamycin [J]. *Angewand Chemie-International Edition*, 2017, 56(15): 4351-4355.
- [5] Aem N, Yuko I, Yasuhisa A. Effect of glycosylation on the biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from the passion fruit, *Passiflora edulis*: A comparison of natural and recombinant enzymes [J]. *Chem Bio Chem*, 2017, 18(3): 257-265.
- [6] Dong H, Francesco S, Xue C H, et al. Whole-cell biocatalytic synthesis of cinnamyl acetate with a novel esterase from the DNA library of *Acinetobacter hemolyticus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(10): 2120-2128.
- [7] Wu X M, Chu J L, Wu B, et al. An efficient novel glycosylation of flavonoid by β -fructosidase resistant to hydrophilic organic solvents [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 659-662.
- [8] Milan P, Juraj S, Marek B, et al. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: Systems development, reaction engineering and applications [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(5): 667-683.
- [9] 赵康,邸琴剑,邓利,等.吸附-交联固定化酶的制备及表征[J].现代化工,2016,36(12):63-67.
- [10] 李恒,赵欣,杨涛,等.固定化 *Pseudomonas putida* CGMCC3830 转化 3-氨基吡啶制备烟酸[J].食品与生物技术学报,2014,33(8):800-804. ■

欢迎订阅《现代化工》杂志,邮发代号 82—67。