



## 雷斯青霉的复壮及水溶性离子液体对其 15 $\alpha$ -羟基化的影响

胡晓杰, 毛淑红, 王娜, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 针对真菌培养过程中出现的退化问题, 对雷斯青霉采用灭菌胡萝卜作为斜面培养基进行了复壮处理, 并通过添加水溶性离子液体的方式提高底物的溶解与传递. 结果表明: 在相同培养条件下, 采用胡萝卜复壮后的雷斯青霉羟基化左旋乙基甾烯双酮产 15 $\alpha$ -羟基化左旋乙基甾烯双酮. 选用离子液体[EMIm][EtOSO<sub>3</sub>]代替有机溶剂作为促溶剂, 促溶剂添加量为 4%, 底物左旋乙基甾烯双酮投料量为 5 g/L, 投料时间为 30 h, 转化时间为 72 h 时的产物转化率最高可达 68.1%.

**关键词:** 复壮; 雷斯青霉; 离子液体; 15 $\alpha$ -羟基化

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2012)05-0007-04

## Rejuvenation of *Penicillium raistrickii* and the Effects of Water Miscible Ionic Liquid on 15 $\alpha$ -Hydroxylation

HU Xiaojie, MAO Shuhong, WANG Na, LU Fuping

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The strains of *Penicillium raistrickii* were rejuvenated and the conversion conditions for 15 $\alpha$ -hydroxylation of 13-methyl-estr-4-ene-3,17-dione were optimized. Carrots were used as slant to overcome the degradation of *Penicillium raistrickii*, and the water miscible ionic liquid was used as the co-solvent to overcome the low solubility of the substrate. The results showed that the yield of 15 $\alpha$ -hydroxylation by using rejuvenated *Penicillium raistrickii* reached as high as 68.1% after transformation for 72 hours under the following conditions: the amount of ionic liquid [EMIm][EtOSO<sub>3</sub>] was 4%, the cultivating time was 30 hours, and the substrate concentration of 13-methyl-estr-4-ene-3,17-dione was 5 g/L.

**Key words:** rejuvenation; *Penicillium raistrickii*; Ionic liquid; 15 $\alpha$ -Hydroxylation

15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮是合成目前最为理想的口服避孕药孕二烯酮的关键中间体<sup>[1]</sup>, 现已知其可以通过雷斯青霉对左旋乙基甾烯双酮进行 15 $\alpha$ -羟基化的方法得到. 雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) 属于真菌, 其发酵生产过程以生成菌丝为主要部分. 大量研究<sup>[2-4]</sup>发现, 微生物具有生长繁殖快、易培养、易控制、产量高、发酵成本低、易于通过现代生物技术改造遗传性状等优点, 使得全细胞生物催化具有良好的应用前景. 除此之外, 由于经多次传代菌种退化的现象逐渐明显, 即使得微生物个体和群体特征的

各个方面发生变化<sup>[5]</sup>, 其中最重要的问题是菌种退化现象所引起的所需产物的生产产量下降、营养物质代谢和生长繁殖能力下降、发酵周期延长、抗不良环境条件性能减弱等, 因此, 对菌种进行复壮, 也是实验及生产过程中最值得关注的一个环节.

离子液体 (ionic liquid), 被公认为是一种具有极大潜力的可代替有毒有机溶剂的液体<sup>[6]</sup>, 近年来, 离子液体在生物催化和生物转化中的应用研究<sup>[7]</sup>迅速发展, 相关文献的报道也逐年增多, 采用对细胞膜破坏更少的离子液体代替有机溶剂无疑对于工业生产

收稿日期: 2012-01-05; 修回日期: 2012-05-28

基金项目: 天津科技大学科学研究基金资助项目 (20110112)

作者简介: 胡晓杰 (1986—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn.

来说是一种新的选择.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) ATCC 10490, 购自美国典型菌种保藏中心.

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 麦芽提取物 20, 蛋白胨 3, 琼脂 20, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 玉米浆 10, NaNO<sub>3</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub> 0.5, FeSO<sub>4</sub> 0.02, KCl 0.5, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20 min.

胡萝卜斜面培养基: 将新鲜的胡萝卜纵切开, 按试管大小将胡萝卜削成斜面形状, 装入试管, 115 °C 灭菌 15 min.

### 1.2 标准曲线的制作

精密称取干燥至恒质量的 15  $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮标准品 1.0 mg 溶于甲醇中, 配制成 1.0 mg/mL 的标准品溶液, 并以此母液配制 0.050 ~ 0.350 mg/mL 的系列标准溶液.

### 1.3 菌体的复壮方法

以胡萝卜斜面培养基培养雷斯青霉, 按照菌苔厚、颜色等指标选择较优斜面, 接入斜面培养基培养.

### 1.4 孢子悬浮液制备及甾体转化

孢子悬浮液的制备: 用无菌水将菌种斜面制成孢子悬浮液, 双层纱布过滤, 除去菌丝. 利用血球计数板, 对单位体积内无菌水中所含有的雷斯青霉孢子数进行计算.

底物投料方式: 采用干粉投料, 即将底物左旋乙基甾烯双酮粉碎, 粒度 14 ~ 16  $\mu\text{m}$ . 在无菌条件下迅速投入已培养好的发酵液中, 并加入亲水性离子液体 [EMIm][EtOSO<sub>3</sub>](1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐). 在发酵液内, 采用干粉投料方式加入底物, 开始微生物转化.

液体发酵培养: 摇床转速 180 r/min, 转化温度为 28 °C, 转化 72 ~ 96 h 后, 料液经过滤, 滤液处理后, 分析测定转化率.

$$\text{转化率} = \frac{\text{目的产物质量(g)}}{\text{投料底物质量(g)}} \times 100\%$$

### 1.5 转化产物的检测

用高效液相色谱法 (HPLC) 分析发酵液中产物 15  $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮的含量. 分析条件: Agilent 1100 液相色谱系统, Agilent 色谱工作站, ODS-2HPERSIL 色谱柱, C<sub>18</sub> 柱 5  $\mu\text{m}$ , 流动相为甲醇

(色谱纯) 和水, 体积比为 80 : 20, 流量为 1 mL/min, 紫外检测波长为 241 nm, 柱温为 20 °C, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线的绘制

依本文色谱条件对不同浓度的产物标品进行测定, 以产物 15  $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮峰标品的峰面积为横坐标, 以其浓度作为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为  $y = 0.0355x - 0.002$ ,  $R^2 = 0.998$ , 线性范围为 0.050 ~ 0.350 mg/mL.

### 2.2 复壮结果

#### 2.2.1 菌落形态

培养 5 d 后观察, 以灭菌胡萝卜为斜面培养基所培养出的雷斯青霉, 菌苔相对较厚, 颜色呈深青绿色, 菌丝体生长较浓密, 如图 1 所示.

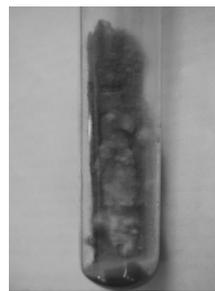


图 1 复壮后的雷斯青霉

Fig. 1 Rejuvenated *Penicillium raistrickii*

2.2.2 菌体复壮前后相同体积无菌水洗下孢子数对比  
复壮前单位体积内孢子数为  $10^9 \text{ mL}^{-1}$ , 而复壮后单位体积内孢子数可达到  $10^{12} \text{ mL}^{-1}$ , 说明经复壮之后, 雷斯青霉菌体的产孢子能力较之前有所增强, 有利于日后的微生物转化.

#### 2.2.3 菌体复壮前后底物转化率的对比

投料量为 3 g/L, 且不添加任何促溶剂, 复壮前和复壮后的菌体对底物羟基化转化率分别为 33.1% 和 41.8%, 转化率提高了 26.3%. 说明经过复壮之后的雷斯青霉, 其羟基化底物左旋乙基甾烯双酮的能力较之前要强, 更适用于进行发酵转化底物左旋乙基甾烯双酮.

### 2.3 复壮后菌种发酵条件优化

#### 2.3.1 可溶性离子液体的选用

用亲水性有机溶剂作为促溶剂加入到发酵液中进行转化是一类较常用的提高底物溶解度的方法, 但当前使用的有机溶剂大多数具有可挥发性, 这些有机

溶剂存在着有毒、易挥发、易燃易爆等诸多不安全的因素,对环境和人体的危害不容小觑。

离子液体是在室温或室温附近温度下呈液体状态的盐类.与有机溶剂相比,离子液体具有无毒、无蒸汽压、无可燃性、导电性良好、易于被循环利用的优势,从而获得了“绿色”溶剂的称号。

本文以段少军等<sup>[8]</sup>对左旋乙基甾烯双酮15 $\alpha$ -羟基化反应进行的研究作为基础,对复壮后的菌种发酵条件进行优化,并采取新型离子液体代替甲醇等有机溶剂作为促溶剂.同时,据文献<sup>[9]</sup>报道,水溶性离子液体1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐([EMIm][EtOSO<sub>3</sub>])具有很好的生物相容性,在一些生物催化反应中能够有效地提高产物转化率,但在真菌的微生物转化中还未见报道,所以本实验采用此种离子液体进行生物转化。

### 2.3.2 促溶剂添加量

由于任何促溶剂都会对微生物细胞的结构和代谢过程产生影响,使得培养基中加入有机溶剂的浓度也受到限制,在实验中,需确定促溶剂的适用量.将离子液体[EMIm][EtOSO<sub>3</sub>]单独使用作为促溶剂进行转化,平行实验3次,结果见表1.当发酵液中的离子液体添加量大于4%时,产物的转化率明显下降,故选择4%作为转化过程中较为适宜的底物添加量。

表1 促溶剂添加量对产物转化率的影响

Tab. 1 Effect of the adding amount on the product yield

促溶剂添加量/%	转化率/%
0	41.8 ± 0.91
2	47.1 ± 1.09
4	54.3 ± 1.32
6	50.8 ± 0.98
8	44.7 ± 1.13
10	39.8 ± 0.77

### 2.3.3 孢子浓度

配制不同浓度的孢子悬浮液,以相同接种量4%接种,按照方法1.4进行培养优化,结果如图2所示.结果表明:孢子悬浮液浓度在 $10^4 \sim 10^9$  mL<sup>-1</sup>时,转化率随着孢子浓度的增大而增大;当孢子浓度大于 $10^9$  mL<sup>-1</sup>时,转化率呈下降趋势.由此得出,孢子浓度为 $10^9$  mL<sup>-1</sup>时转化效果最佳,这是由于在孢子浓度适宜的时候,菌株生长迅速,形成的菌球体数量多,直径适中,与底物接触面积较大,但若孢子浓度过大,就容易造成菌体生长过快,后期转化时营养供给不足,从而对转化率产生影响。

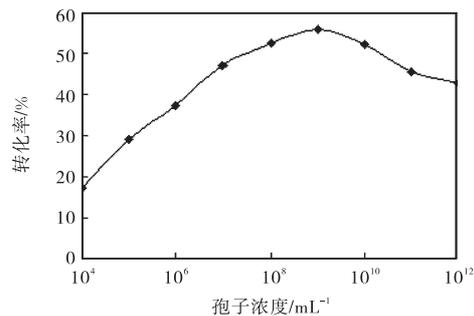


图2 孢子浓度对产物转化率的影响

Fig. 2 Effect of spore concentration on the product yield

### 2.3.4 投料量

底物对菌体的毒害作用,不仅体现在与菌体的接触面积较大,还由于底物的过量添加而造成.如图3,起初在底物投料量为3~5 g/L时,转化率随着底物浓度的增加而增加,而大于5 g/L时,产物转化率急剧降低,这说明过量的底物添加量对菌体的代谢活性产生很大影响.因此,综合考虑投料量选择5 g/L。

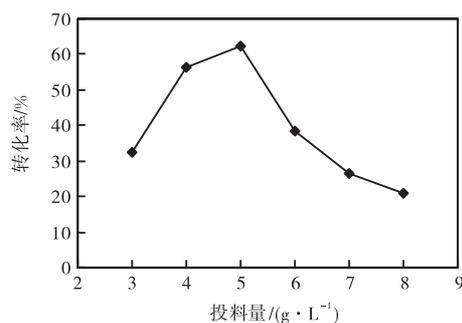


图3 底物投料量对产物转化率的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration on the product yield

### 2.3.5 投料时间

以5 g/L为投料量,分别在不同时间投料,转化结果如图4所示。

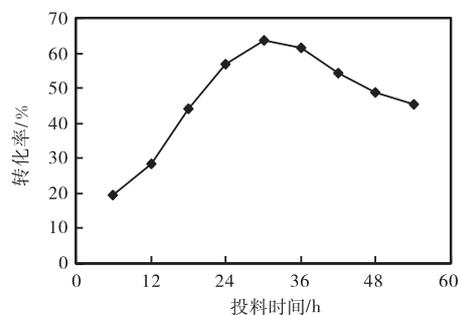


图4 投料时间对产物转化率的影响

Fig. 4 Effect of feeding time on the product yield

由图4可知:投料时间为30 h时产物的转化率

可达到最高,也就是说在 30 h 左右的时间范围内,雷斯青霉菌体的代谢能力最为旺盛,同时羟化酶的表达量较大;如果投料的时间过早或者过晚,则会对菌体造成伤害,或者因菌体的衰老代谢能力下降而未能进行转化,对产物转化率产生影响,因此选择 30 h 作为投料时间.

### 2.3.6 转化时间

根据上述优化后的条件(以水溶性离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐 ([EMIm][EtOSO<sub>3</sub>]) 作为促溶剂,促溶剂添加量为4%,孢子浓度为 $10^9$  mL<sup>-1</sup>,底物投料量为 5 g/L,投料时间为 30 h)对底物进行转化,分别在底物投料后以不同转化时间取样对转化率进行检测.转化时间对产物转化率的影响,如图 5 所示.

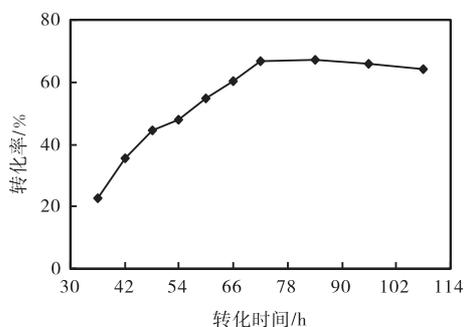


图5 转化时间对产物转化率的影响

Fig. 5 Effect of transformation time on the product yield

通常微生物对某种甾体化合物的催化作用都不是单一的转化反应,而是同时产生许多副产物,即雷斯青霉细胞内不仅含有 15 $\alpha$ -羟化酶,还含有其他多种酶系;如果转化时间过长,副产物增加,不仅会使底物产生歧化反应,并且会在微生物代谢过程中被降解成水和二氧化碳,因此不利于产物的积累.

从图 5 可以看出,转化时间在 38~72 h 间转化率呈现增长趋势,在 72 h 时转化率达到最大值,而转化 72 h 后,转化基本完成,继续延长转化时间转化率趋于平缓甚至有所降低,所以转化时间选择 72 h 为佳.

### 2.4 最优发酵条件验证实验

为验证最优发酵条件的有效性,在最优发酵条件下进行了摇瓶培养实验,平行实验 3 次,转化率分别为 68.1%、65.9%和 67.4%,平均值为 67.1%.

在最优发酵条件下,验证实验结果平均值与优选实验结果相近,说明本实验所选的最优发酵条件是可行的.

## 3 结 语

本研究结合实际条件,对雷斯青霉菌体进行复壮处理,结果表明:经复壮处理后的雷斯青霉对 15 $\alpha$ -羟基左旋乙基甾烯双酮的产物转化率提高了 26.3%.同时采用水溶性离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐 ([EMIm][EtOSO<sub>3</sub>]) 作为促溶剂,运用到雷斯青霉羟化甾体化合物左旋乙基甾烯双酮的体系中,并对其摇瓶发酵条件进行优化,在最优条件下,促溶剂添加量为 4%,底物左旋乙基甾烯双酮投料量为 5 g/L,投料时间为 30 h,转化 72 h 后,转化率最高可达 68.1%,其底物投料量较段少军等<sup>[8]</sup>的研究提高了 2 g/L.此外,实验中采用离子液体替代了具有挥发性的有机溶剂,降低了对环境和人体的危害.

由于离子液体的可设计性使得可选用的离子液体种类较多,探索能在甾体转化中利用的离子液体及离子液体在催化体系中的作用机理还需进一步研究.

### 参考文献:

- [1] Schloser D, Irrgang S, Sehmauder H P. Fermentation kinetics of free and immobilized *Penicillium raistrickii* able perform the 15-hydroxylation of 13-ethyl-gon-4-ene-3, 17-dione[J]. Acta Biotechnologica, 1995, 15(2): 161-171.
- [2] 陈利军,陈月华,史洪中,等. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2438-2440.
- [3] 郭明,胡昌华. 生物转化:从全细胞催化到代谢工程[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(4): 110-115.
- [4] 万红贵,赵宗松,蒋导航,等. 微生物全细胞催化技术在工业生产中的应用[J]. 安徽农业科技, 2011, 39(4): 1917-1919, 1955.
- [5] 路福平. 微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005.
- [6] 黄碧纯,黄仲涛. 离子液体的研究开发及其在催化反应中的应用[J]. 工业催化, 2003, 11(2): 1-6.
- [7] 石家华,孙逊,杨春和,等. 离子液体研究进展[J]. 化学通报, 2002, 65(4): 243-250.
- [8] 段少军,杜连祥,高艳玲,等. 雷斯青霉 15 $\alpha$ -羟基化左旋乙基甾烯双酮的发酵工艺优化[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(3): 41-44.
- [9] Marques M P C, Carvalho F, de Carvalho C C R, et al. Steroid bioconversion: Towards green processes[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(1): 12-20.

责任编辑:郎婧