



## 17 $\alpha$ -甲基睾丸素 C1, 2 位高效生物脱氢菌种的选育

陈莹, 李静文, 别松涛

(工业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:** 为利用简单节杆菌生物催化 17 $\alpha$ -甲基睾丸素 C1,2 位脱氢制备去氢甲基睾丸素,采用 N<sup>+</sup>离子注入与 Cs<sup>137</sup>- $\gamma$ 射线辐照两种方法进行菌种诱变,选育适宜于 17 $\alpha$ -甲基睾丸素 C1,2 位脱氢的高转化菌株.结果表明,从 16 株简单节杆菌筛选出的 TCCC11042,依次经 N<sup>+</sup>离子注入与 Cs<sup>137</sup>- $\gamma$ 射线辐照处理,通过甲基睾丸素为底物的摇瓶筛选,选育得到正变株 F2-20,该菌株对 17 $\alpha$ -甲基睾丸素脱氢转化率达到 60.8%,比出发菌株 TCCC11042 的转化率提高了 12.8%.经群体传代方式考察,诱变株具有良好的遗传稳定性.

**关键词:** 简单节杆菌; 17 $\alpha$ -甲基睾丸素; C1,2 位脱氢; 离子注入;  $\gamma$ 射线辐照

**中图分类号:** Q93-31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2009)01-0022-04

### Breeding of Strain for High-Level C1, 2-Dehydrogenation of 17 $\alpha$ -methyl-testosterone

CHEN Ying, LI Jing-wen, BIE Song-tao

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

**Abstract:** Two mutation methods of N<sup>+</sup> ion implantation and Cs<sup>137</sup>- $\gamma$ -ray irradiation were used to treat *Arthrobacter simplex*, and to obtain the mutant with high C1,2-dehydrogenation activity from 17 $\alpha$ -methyl-testosterone to dehydrogen-methyl-testosterone. The original *A. simplex* TCCC11042, which was screened from 16 strains of *A. simplex* based on the result of dehydrogenation of 17 $\alpha$ -methyl-testosterone in flask, was mutated by N<sup>+</sup> ion implantation and Cs<sup>137</sup>- $\gamma$ -ray irradiation successively. The results show that one positive mutant F2-20 from TCCC11042 was bred, and the mutant had a high bioconversion ratio of 60.8% from 17 $\alpha$ -methyl-testosterone to dehydrogen-methyl-testosterone, which was higher 12.8% than the original strain TCCC11042 with only 48%. The mutant kept a stable heredity with higher C1,2-dehydrogenation of 17 $\alpha$ -methyl-testosterone after colony successive inoculation test.

**Keywords:** *Arthrobacter simplex*; 17 $\alpha$ -methyl-testosterone; C1,2-dehydrogenation; ion implantation;  $\gamma$ -ray irradiation

简单节杆菌是催化甾体化合物 C1,2 位脱氢的常用菌株<sup>[1-2]</sup>,但并不是所有 C1,2 位饱和的甾体化合物都能够被其生物脱氢,要获得适合转化 17 $\alpha$ -甲基睾丸素的产业化菌株,可以通过菌种诱变的方法来实现.低能离子注入作为一种新的诱变源,与常规的辐射诱变及化学诱变有着明显的差异,当低能离子注入生物体时同时存在能量交换、能量沉积、质量沉积及

电荷交换四大效应;另一方面,由于注入离子的电荷数、质量数、能量、剂量的组合不同,可以提供众多的诱变效应,使离子注入诱变具有突变谱宽、突变率高的特点,从而可以筛选到符合生产要求、能够提高产量的突变体<sup>[3-4]</sup>. $\gamma$ 射线辐射诱变作为一种强的诱变剂,在经人工突变选育优良菌种上也取得了较好的效果<sup>[5-6]</sup>.

收稿日期: 2008-06-05; 修回日期: 2008-09-23

基金项目: 国家科技基础条件平台资助项目(2005DKA21204-10)

作者简介: 陈莹(1955—),女,天津人,实验师.

本文采用  $N^+$ 离子注入与  $Cs^{137}$ - $\gamma$  射线辐照两种方法对从 16 株简单节杆菌中筛选出的 TCCC11042 出发菌株进行诱变,选育适宜于 17 $\alpha$ -甲基睾丸素 C1,2 位脱氢的高转化菌株,并考察其群体传代的稳定性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

简单节杆菌(*Arthrobacter simplex* TCCC11037-TCCC11052),天津科技大学工业微生物菌种保藏中心。

### 1.2 培养基、培养条件和转化条件

斜面及分离平板培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母膏 10,琼脂 20,pH 6.4,121 $^{\circ}C$ 灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,玉米浆 12,酵母膏 5, $KH_2PO_4$  2.5,pH 6.4,121 $^{\circ}C$ 灭菌 20 min。

培养及转化条件:从培养成熟的斜面上挑取菌苔一环,接种于灭菌后的装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 种子瓶中,置回转式摇床,于 160 r/min、32 $^{\circ}C$ 培养 20 h。将经过扩大培养后的种子液转接至装有 80 mL 发酵培养基的 500 mL 发酵瓶中,置回转式摇床,于 160 r/min、32 $^{\circ}C$ 培养 22 h。将甲基睾丸素经球磨机磨成细粉状(95%的微粒达到 13~14 $\mu m$ ),直接投入到发酵液中,同时加入发酵液体积 4%的工业级甲醇,开始微生物转化反应。转化条件为摇床转速 180 r/min,转化温度 34 $^{\circ}C$ ,转化时间 48 h。转化结束后,料液经过滤,收集滤饼烘干,取样处理,用 HPLC 测定 17 $\alpha$ -甲基睾丸素的转化率。

### 1.3 $N^+$ 离子注入诱变处理

菌悬液的制备:以生理盐水将新鲜斜面上刚生长成熟的菌落洗下,用玻璃珠打散,制成  $10^6 mL^{-1}$  的菌悬液供诱变使用。

离子注入:将菌悬液涂于载玻片上自然风干后,放置于培养皿中,然后将培养皿放入低能加速器(LC-4 型离子注入机,郑州大学提供)靶室,打开培养皿盖,靶室抽真空。用能量为 30 keV 的不同剂量的  $N^+$ 离子束进行注入。

稀释涂平板:用 1 mL 无菌生理盐水洗脱,经过梯度稀释后,吸取 0.1 mL 涂布于分离平板培养基上,30 $^{\circ}C$ 培养 2~3 d,用于单菌落的挑选和存活率的计算。挑取的单菌落转接斜面,30 $^{\circ}C$ 培养至成熟,4 $^{\circ}C$ 冰箱保存,供后续的摇瓶发酵实验使用。

### 1.4 $Cs^{137}$ - $\gamma$ 射线辐照诱变处理

辐射诱变处理:采用培养至成熟的新鲜斜面直接

进行辐射,辐照源为  $Cs^{137}$ ,辐照剂量分别为 0.5 kGy 和 1.0 kGy。

突变株的分离:将经过辐照处理后的斜面菌体用无菌生理盐水洗下,制备得到菌悬液,经梯度稀释后涂布培养皿,30 $^{\circ}C$ 培养 2~3 d。从平板随机挑取单菌落转接斜面,30 $^{\circ}C$ 培养至成熟,4 $^{\circ}C$ 冰箱保存,供后续摇瓶发酵考察使用。

### 1.5 比浊法测生物量

取 1 mL 发酵液,经稀释 5 倍后,以灭菌后的空白培养基作为对照,用 7220 型分光光度计,在 620 nm 波长下测定稀释液的吸光度(A),以  $A_{620}$  表示发酵液中的菌体浓度。

### 1.6 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(简称 TTC)显色法估测菌体脱氢酶活力<sup>[7]</sup>

取 8 mL 发酵液样品于试管中,30 $^{\circ}C$ 水浴保温 10 min 后,加入 3 滴 1% TTC 溶液,摇匀,继续保温并开始计时,记录培养液颜色开始转变为微红时所需的时间,以显色时间的长短表示简单节杆菌细胞内菌体脱氢酶活力的高低。显色时间越短,表明细胞的酶活性越高。

### 1.7 转化率的测定

用甲醇提取滤饼,过滤,取滤液 1 mL 置于 Eppendorf 管中,加入一定量的甲醇稀释,使产物和底物的质量浓度保持在 0.5 g/L 以下,再加一定量的睾酮内标物(0.4g/L),然后将该样品液通过 0.45 $\mu m$  的膜过滤。色谱条件为:色谱柱 Kromasil  $C_{18}$  5 $\mu m$ ,流动相  $V_{甲醇}:V_{水}=75:25$ ,流量 1 mL/min,检测波长 241 nm、进样量 10 $\mu L$ 。

### 1.8 突变率的测定

取随机挑取的诱变后的菌株接摇瓶发酵,以出发菌株作为对照,测定转化率。规定转化率高出于出发菌 2%为正突变,低于 2%为负突变,二者之间为未突变。

## 2 结果与讨论

### 2.1 出发菌株的甲基睾丸素脱氢性能

实验所用的 16 株简单节杆菌,对醋酸可的松均具有较强的脱氢能力。据报道<sup>[8]</sup>,简单节杆菌产生的菌体 C1,2 位脱氢酶对底物的转化与菌体底物的化学结构有关,考虑到适合于不同菌体底物脱氢反应的菌种性能可能会有所不同,首先针对甲基睾丸素底物进行摇瓶初筛。结果表明,16 株供试菌株对 17 $\alpha$ -甲基睾丸素均有一定的转化能力。其中编号为 TCCC11042 菌株的转化率达到 48%,发酵终点 pH 为 6.8,确定此菌株作为后续研究的出发菌株。

### 2.2 N<sup>+</sup>离子注入诱变处理

设定靶室抽真空时菌株的存活率为 100%，随着 N<sup>+</sup>离子注入剂量增加，存活率呈现较明显的先降后升再降的“马鞍形”变化趋势，如图 1 所示。这种特有的变化被认为是能量、动量作用下的损伤效应和质量、电荷作用下的保护和刺激综合作用的结果。从分离平板上随机挑取典型的单菌落转接斜面（共转接 120 株），逐一接种摇瓶进行转化能力考察，按照 1.8 的方法测定突变率。由图 2 可见，注入剂量为 (30~50) × 10<sup>14</sup>ions/cm<sup>2</sup> 时正突变率最高，恰好在“马鞍形”区域内。超过 50 × 10<sup>14</sup>ions/cm<sup>2</sup> 后，菌株突变率继续增加，正突变率明显下降，分析其原因可能是随着离子注入剂量的增大，造成 DNA 和生物膜等严重损伤，对 120 株突变株的转化结果进行分析，结果表明，经 N<sup>+</sup>离子注入诱变处理后得到的诱变株的生产性能相差较大，其中编号为 N50-3-62 和 N50-3-105 的诱变株转化率较高，分别达到 52.8%和 51.4%。

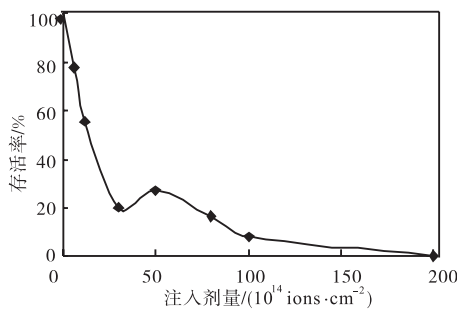


图 1 N<sup>+</sup>辐照的存活效应

Fig.1 Survival rate after N<sup>+</sup> ion implantation

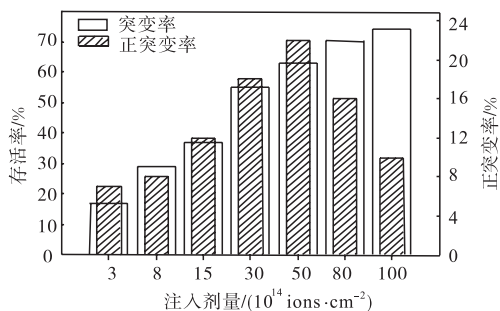


图 2 N<sup>+</sup>离子注入对菌株突变及正突变的影响

Fig.2 Mutation rate and positive rate of 31-2 strain after N<sup>+</sup> ion implantation

### 2.3 Cs<sup>137</sup>-γ 射线辐照诱变

诱变育种中常采用诱变剂复合处理，使它们产生协同作用<sup>[9]</sup>，为此，对 N<sup>+</sup>离子注入诱变株 N50-3-62 和 N50-3-105 均使用 0.5 kGy 和 1.0 kGy 两个剂量的 Cs<sup>137</sup>-γ 射线辐照进行诱变处理。从分离平板中随机挑取诱变株 100 株转接斜面，并逐一接种摇瓶后发

酵，以考察各菌株的转化性能。不同辐照剂量的诱变结果见表 1。结果表明，简单节杆菌对 Cs<sup>137</sup>-γ 射线辐照诱变处理比较敏感，在 0.5 kGy、1.0 kGy 两个剂量下，致死率都达到 99%以上。相对而言，在 0.5 kGy 处理剂量时出发菌株的正突变率较高，分别为 9.2%和 8.4%。对 100 株突变株的转化结果进行分析，结果表明，挑取的诱变株中出现了脱氢转化能力有较大提高的正变菌株，其中编号为 F2-20 菌株的转化率最高，经 HPLC 色谱分析，转化率达到 60.8%，比出发菌株 TCCC11042 的转化率提高了 12.8%。此诱变株平板培养时的菌落形态与 TCCC11042 相似，但生长速度明显加快。

表 1 不同辐照剂量下诱变结果的比较

Tab.1 Result of different mutant amount on the two strains

出发菌株	辐照剂量/ kGy	致死率/%	正突变率/%
N50-3-62	0.5	99.5	9.2
	1.0	99.9	5.6
N50-3-105	0.5	99.5	8.4
	1.0	99.9	4.3

### 2.4 诱变株 F2-20 传代稳定性考察

取诱变株 F2-20，通过连续传代的方式考察其遗传稳定性，结果(表 2)表明该菌株的遗传性能比较稳定。传代至第 8 代时，转化率为 59.8%，第 9 代为 57.9%。

表 2 诱变株 F2-20 的传代稳定性

Tab.2 Productivity of mutants F2-20 for each generation

斜面转接次数	转化率/%
1	60.8
2	60.8
3	60.5
4	60.6
5	60.7
6	60.3
7	60.0
8	59.8
9	57.9

## 3 结 论

对收集、保藏的 16 株简单节杆菌，以甲基羧丸素为底物进行摇瓶初筛，筛选出一株转化率相对较高的出发菌 TCCC11042，依次经 N<sup>+</sup>离子注入和 Cs<sup>137</sup>-γ 射线辐照两次诱变处理，选育得到正变株 F2-20，该菌株对 17α-甲基羧丸素脱氢转化率达到 60.8%，比出发菌株 TCCC11042 的转化率提高了 12.8%。经群

体传代方式考察,突变株 F2-20 具有良好的遗传稳定性.

#### 参考文献:

- [1] Songtao B, Lianxiang D, Liming Z, et al. Bioconversion of methyl-testosterone in biphasic[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3309-3313.
- [2] Manosroi J, Sripalakit P, Manosroi A. Biotransformation of chlormadinone acetate to delmadinone acetate by free and immobilized *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 and *Bacillus sphaericus* ATCC 13805[J]. Enzyme Microb Technol, 2003, 33: 320-325.
- [3] 张一青, 陆兆新, 邹晓葵. N<sup>+</sup>离子注入对 *Aspergillus sp.* 产原果胶酶的诱变效应[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, 23(3): 140-144.

- [4] 虞龙, 周剑, 余增亮. 低能离子注入 *L*-乳酸生产菌种选育与发酵条件初步优化[J]. 激光生物学报, 2005, 14(3): 184-188.
- [5] 魏赛金, 付学琴, 程新. Co<sup>60</sup>- $\gamma$ 射线对南昌霉素产生菌的诱变选育[J]. 中国抗生素杂志 2002, 27(10): 580-581.
- [6] 王普, 裘娟萍, 郑裕国, 等. 高产虾青素的红发夫酵母菌种的选育[J]. 微生物学通报 2002, 29(1): 15-19.
- [7] 金青萍, 郑自龙, 刘维达. 醋酸可的松微生物转化工艺条件的研究[J]. 微生物学通报, 1985, 12(1): 19-21.
- [8] Lee MK, Bae M. Enzymatic characteristics of steroid $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 4(2): 119-125.
- [9] 岑沛霖, 蔡谨. 工业微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 227.

(上接第 21 页)

#### 2.6 最佳提取工艺确定

通过 SAS8.1 编程得到的最佳提取工艺条件为超声温度 72.62  $^{\circ}\text{C}$ , 超声时间 48.64 min, 液固比 40.88 : 1, 理论得率为 8.46 mg/g. 值得注意的是本文所测得的马齿苋黄酮得率较高, 原因主要是本实验所用的马齿苋浸提溶剂为水, 由于水的极性大, 易把色素、蛋白质、糖类可溶于水的成分浸提出来, 这些成分会影响分光光度计对马齿苋黄酮的测定, 使测得的吸光度较大, 故所得的马齿苋黄酮含量偏大.

#### 2.7 马齿苋黄酮提取的优化与验证

参照理论上的最佳提取工艺条件: 超声温度 73  $^{\circ}\text{C}$ , 超声时间 49 min, 液固比 41 : 1, 所得实验结果为 8.24 mg/g, 实际的平均得率与理论得率极为接近.

### 3 结 论

(1) 超声波方法可较好地应用于马齿苋黄酮的提取, 其有效成分黄酮类化合物可较好保留. 整个过程在较低的温度下操作, 有利于马齿苋黄酮不被破坏.

(2) 应用响应面法得到最佳的操作工艺为: 超声温度 73  $^{\circ}\text{C}$ , 超声时间 49 min, 液固比 41 : 1. 在此条件下测得黄酮得率为 8.24 mg/g, 与理论预测值的误差为 2.02%, 说明采用 RSM 法优化得到的浸提条件

可靠.

#### 参考文献:

- [1] 朱晓宦, 吴向阳, 仰榴青. 马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J]. 常熟理工学院学报: 自然科学版, 2007, 21(4): 60-64.
- [2] 贾光锋, 贾荣博. 马齿苋的功能特性及应用[J]. 粮食与食品工业, 2003, (4): 36-38.
- [3] 董立巍, 岳义田, 王万银. 马齿苋总黄酮抗小鼠缺氧作用及其机制研究[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(12): 1434-1436.
- [4] 肖玫. 马齿苋及其在食品工业中的利用现状和开发前景[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 159-163.
- [5] 张睿, 徐雅琴, 时阳. 黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 食品与机械, 2003(1): 21-22.
- [6] 毛跟年, 许牡丹. 功能食品生理特性与检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 557-558.
- [7] 黄泽元, 王海滨, 刘志伟. 芝麻叶中总黄酮的最佳提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 201-204.
- [8] Lee W C, Yusof S, Hamid N S A, et al. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM) [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 75(4): 473-479.