



双液相体系下对黑根霉 $C_{11}\alpha$ -羟基化 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的研究

万金营, 杜连祥, 巩培, 武薇

(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: 研究了双液相体系下黑根霉对 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮 $C_{11}\alpha$ -羟基化的生物转化能力. 考察了 8 种有机溶剂对 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的溶解度的差异, 比较了它们对黑根霉细胞毒性的大小. 结果表明, 乙酸丁酯毒性最小, 乙酸丁酯与水双液相体系对转化比较有利, 达到了 44.2%. 同时考察了氧促进剂 H_2O_2 和外加电子受体维生素 K_3 对提高该体系转化率的影响, 分别提高了 8% 和 6%.

关键词: 黑根霉; $C_{11}\alpha$ -羟基化; $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮; 双液相发酵

中图分类号: TQ920.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)02-0013-04

Studies on the Reaction of $C_{11}\alpha$ -Hydroxylation of $16\alpha, 17\alpha$ -Epoxy Progesterone by *Rhizopus Nigricans* in the Two-Liquid-Phase System

WAN Jin-ying, DU Lian-xiang, GONG Pei, WU Wei

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

Abstract: The biotransformation of $C_{11}\alpha$ -hydroxylation $16\alpha, 17\alpha$ -epoxy progesterone by *Rhizopus nigricans* in the two-liquid-phase fermentation system was studied. Eight kinds of organic solvents were chosen, their toxicity were compared and their solubility to $16\alpha, 17\alpha$ -epoxy progesterone and $C_{11}\alpha$ -hydroxyl- $16\alpha, 17\alpha$ -epoxy progesterone were also researched. The toxicity of butyl acetate is in the lowest level and the conversion ratio (44.2%) is higher than other two-liquid-phase systems. The effect of H_2O_2 and vitamin K_3 on increasing conversion ratio in this system were also studied, reaching to 8% and 6%, respectively.

Keywords: *Rhizopus nigricans*; $C_{11}\alpha$ -hydroxy; $16\alpha, 17\alpha$ -epoxy progesterone; two-liquid-phase fermentation

甾体类药物是继抗生素之后的第二大类药物, 在医疗卫生领域应用非常广泛^[1]. 目前对甾体类药物的修饰主要包括母核加羟基、脱氢及侧链降解, 而 $C_{11}\alpha$ -羟基化是其中重要步骤之一, 其产物是甾体类药物的重要中间体. 1952 年, 美国普强 (Upjohn) 药厂的 Peterson 和 Murray 最早发现了黑根霉对甾体具有 $C_{11}\alpha$ -羟基化反应能力, 使孕酮一步转化成 $C_{11}\alpha$ -羟基孕酮^[2]. 而且黑根霉因其转化稳定、不产生色素等优点在工业中应用比较广泛.

以 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮为底物, $C_{11}\alpha$ -羟基化后生

成 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮, 其传统发酵工艺下转化率不高及分离程序繁琐一直是困扰工业生产的主要因素. 主要原因是甾体的水不溶性导致反应体系传质受阻. 采用双液相发酵的方法可以有效地解决底物和产物的溶解问题, 增加与细胞的接触面积, 还能简化分离过程^[3]. 但有机溶剂对细胞的毒性以及对转化系统氧传递的阻碍是该工艺的瓶颈, 也是此项技术应用于工业化的主要障碍, 因此还没有得到广泛的应用, 怎样克服上述缺点是本论文研究的主要内容.

收稿日期: 2008-09-01; 修回日期: 2008-10-20

基金项目: 国家科技基础条件平台资助项目 (2005DKA21204-10)

作者简介: 万金营 (1983—), 男, 黑龙江人, 硕士研究生.

本文以黑根霉催化 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的 $C_{11}\alpha$ -羟基化反应为研究对象, 采用双液相发酵的研究方法, 旨在提高 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的生物转化效率. 从溶剂的选择、氧促进剂及外来电子受体等几方面考察了双液相体系对 $C_{11}\alpha$ -羟基化转化率的影响.

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

黑根霉 (*Rhizopus nigricans*) TCCC 41047, 天津科技大学工业微生物菌种中心保存.

斜面培养基: 小米培养基. 小米称量后除杂, 用清水洗掉表面的淀粉, 然后以小米与水的配比为 100 g : 30 mL, 108 °C 灭菌 15 min. 自然冷却后, 将小米揉搓成粉末状, 分装于大试管中, 0.1 MPa, 121 °C 灭菌 30 min^[4].

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 玉米浆 30, 硫酸铵 1.5, 酵母膏 1, pH 4.4 ~ 4.6, 250 mL 三角瓶中装液体培养基 50 mL, 0.1 MPa, 121 °C 灭菌 20 min.

1.2 原料与实验仪器

甾体底物: $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮, 天津津津制药厂. 产物标准品: $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮, 天津津津制药厂. 试剂: 无水乙醇、乙酸乙酯、乙酸丁酯、四氯化碳、苯、甲苯、正辛烷、环己烷、丙酮、维生素 K_3 、 H_2O_2 . 主要仪器: Lab Alliance 高效液相色谱, 紫外全波长扫描仪.

1.3 孢子悬液的制备

斜面中加入适量无菌水, 玻璃棒刮下孢子, 无菌纱布过滤, 稀释一定倍数后用血球计数板计数. 接种后使发酵液中孢子浓度达到 $10^7 mL^{-1}$.

1.4 菌体培养方法

接种后 28 °C、150 r/min 摇瓶发酵 21~24 h, pH 降到 3.8, 镜检无杂菌即可干粉投料.

底物通过研磨后, 干粉颗粒直径范围 10~15 μm .

1.5 双液相体系的建立

由于甾体化合物的水不溶性, 需要选择合适的有机溶剂. 为了增强传质, 同时又不至于对菌体细胞的催化活性造成显著影响, 在双液相转化反应体系中, 有机溶剂一般选用甾体溶解度大、生物兼容性好的水不溶性有机溶剂, 水相采用发酵液.

250 mL 三角瓶中装液体发酵培养基 50 mL, 接种后摇床培养 21~24 h, 投入 1% $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮, 加入 20% 有机溶剂. 由于有机溶剂的存在阻碍了氧

的传递, 同时考虑加入氧促进剂 H_2O_2 或外来电子受体维生素 K_3 来优化发酵体系, 促进 $C_{11}\alpha$ -羟基化反应顺利进行, 提高转化率.

1.6 分光光度法测定甾体溶解度^[5]

特征波长的确定: 分别配制 10 g/L 的 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮溶液和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的无水乙醇溶液, 200~700 nm 范围内用紫外全波长扫描仪进行扫描, 选取最大吸收峰处的波长作为特征波长.

标准曲线的测定: 分别配制 3、6、9、12、15、18 g/L 的 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮无水乙醇溶液. 特征波长下测定各自吸光度, 以吸光度为 y 轴, 质量浓度为 x 轴绘制标准曲线.

溶解度的测定: 分别取 1 mL 乙酸乙酯、乙酸丁酯、四氯化碳、苯、甲苯、正辛烷、环己烷、丙酮, 配制 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮饱和溶液, 取 100 μL 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 通风橱内挥干. 再用 1 mL 无水乙醇溶解, 特征波长下测定吸光度 y . 由回归方程计算出质量浓度 x (g/L), 则最终溶解度 S (g/L) 为: $S=10x$.

1.7 转化率测定方法

待检测色谱样品的处理: 吸取 1 mL 发酵液中的有机相于 1.5 mL Eppendorf 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取 50 μL 上清液于同型号 Eppendorf 管中, 在通风橱内挥干, 再用 1 mL 色谱流动相溶解, 之后过 0.45 μm 有机膜.

色谱条件及方法: Cosmosil C_{18} 色谱柱, 流动相为 $V_{甲醇} : V_{水} = 75 : 25$, 进样量 10 μL , 流量 1 mL/min, 柱温为室温, 检测波长 240 nm.

转化率计算方法: 面积归一法.

2 结果与讨论

2.1 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的溶解度的测定

按照 1.6 方法, 经检测得知 10 g/L 的 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮的无水乙醇溶液在 240 nm 处均有一个明显的吸收峰, 因此 240 nm 为二者的特征吸收波长. 在 240 nm 下测定的回归方程分别为 $y=0.238 1x-0.227 7 (R^2=0.999 1)$ 及 $y=0.175 3x+0.105 1 (R^2=0.990 8)$. 由 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮和 $C_{11}\alpha$ -羟基- $16\alpha, 17\alpha$ -环氧孕酮在不同有机溶剂中的饱和溶液的吸光度和各自的回归方程计算二者的溶解度.

溶解度是双液相体系中溶剂选择的重要指标。如表 1 所示,其中乙酸乙酯、乙酸丁酯、四氯化碳对 16α,17α-环氧孕酮和 C₁₁α-羟基-16α,17α-环氧孕酮的溶解度比较大,苯、甲苯、丙酮次之,正辛烷、正己烷较差,因此前三者作为双液相的首选。

表 1 16α,17α-环氧孕酮和 C₁₁α-羟基-16α,17α-环氧孕酮在不同有机溶剂中的溶解度

Tab.1 Solubility of 16α,17α-epoxy progesterone and C₁₁α-hydroxy-16α,17α-epoxy progesterone in the different organic solvents

有机溶剂	S ₁ /(g·L ⁻¹)	S ₂ /(g·L ⁻¹)
乙酸乙酯	89.6	110.7
乙酸丁酯	84.2	96.3
四氯化碳	182.7	186.4
苯	44.8	63.9
甲苯	39.5	42.4
正辛烷	0.4	0.1
正己烷	1.7	1.5
丙酮	35.2	27.6

注: S₁ 为 16α,17α-环氧孕酮的溶解度; S₂ 为 C₁₁α-羟基-16α,17α-环氧孕酮的溶解度。

2.2 有机溶剂对细胞的毒性对比

通过有机溶剂对细胞生长的影响来评判有机溶剂对黑根霉细胞毒性的大小。250 mL 三角瓶中装 50 mL 发酵液,以 10⁷ mL⁻¹ 接种,28 °C、150 r/min 培养 12 h。分别加入 5 mL 表 1 中的有机溶剂。继续培养 24 h,过滤烘干后称取滤饼干重,与空白样的滤饼干重 m₁ 进行对照 (m₁ 的均值为 0.83 g)。

正常培养的菌体量与添加有机溶剂培养的菌体量的差值越小,说明此种有机溶剂对黑根霉的毒性越小。由表 2 可以看出,乙酸丁酯、正辛烷、正己烷毒性相对较低,而甲苯、乙酸乙酯、苯、四氯化碳、丙酮毒性相对较高。

表 2 有机溶剂对黑根霉细胞生长量的影响

Tab.2 Effect of different organic solvents on *Rhizopus nigricans*' biomass

有机溶剂	m ₂ /g	(m ₁ -m ₂)/g
乙酸乙酯	0.42	0.41
乙酸丁酯	0.53	0.30
四氯化碳	0.32	0.51
苯	0.39	0.44
甲苯	0.45	0.38
正辛烷	0.52	0.31
正己烷	0.50	0.33
丙酮	0.30	0.53

注: m₁ 为未添加有机溶剂滤饼的干重; m₂ 为添加有机溶剂后滤饼的干重。

2.3 双液相体系下的转化

2.3.1 不同双液相体系下的 C₁₁α-羟基化转化率

按照 1.5 的方法,投入 1% 16α,17α-环氧孕酮,加入 20% 有机溶剂,转化 48 h,对照为不添加有机溶剂的发酵液直接投料转化体系,结果如表 3 所示。

表 3 不同双液相体系下转化率的差异

Tab.3 Conversion ratio in the different two-liquid-phase fermentation systems

双液相体系	转化率/%
乙酸乙酯/水体系	21.5
乙酸丁酯/水体系	44.2
四氯化碳/水体系	10.0
苯/水体系	9.2
甲苯/水体系	13.3
正辛烷/水体系	39.6
正己烷/水体系	33.7
丙酮/水体系	11.6
对照	45.7

从表 3 可以看出,添加乙酸丁酯的转化体系比其他几种体系转化率稍高。同时,乙酸丁酯对菌体的溶解度也较大,毒性适中,因此,比较适合用于双液相发酵。

但是,从整体看,与对照相比,添加了有机溶剂的转化体系中转化率并未明显提高,可能是有机溶剂对菌体的毒害作用导致。有机溶剂对细胞毒性分为分子毒性和相毒性。吴兆亮^[6]等认为:分子毒性指在两液相培养中,与细胞的接触面中的有机溶剂会导致酶的钝化、蛋白质变性和细胞膜的破坏,甚至是细胞结构的改变,从而影响细胞的正常生长以及催化活性;相毒性指有机相萃取或破坏胞外培养液中的营养成分,从而影响细胞的正常生长。

2.3.2 添加氧促进剂对 C₁₁α-羟基化转化率的影响

羟基化反应中氧的供应是反应过程中的重要环节,是细胞呼吸、维持细胞正常的生理代谢的必要条件,同时产物羟基中氧也来源于氧气^[7]。在传统的改善氧气传质的研究过程中,人们主要采用加大通气量和增加摇瓶转速来增加溶氧。但双液相体系中这种方式对增加溶氧的水平有限^[8]。因此常在双液相反应体系中加入氧载体,作为氧化剂的 H₂O₂ 是比较好的氧载体。

(1) H₂O₂ 添加量的确定

H₂O₂ 作为氧载体,同时具有杀菌作用,因此需考察其作为氧载体的最适添加量。250 mL 三角瓶中装 50 mL 发酵液,以 10⁷ mL⁻¹ 接种,28 °C、150 r/min 培养 12 h。然后加入不同剂量的 30% H₂O₂ 溶液(添加

量为体积分数),添加方法为微量多次.继续培养12 h,过滤、烘干,称取滤饼干重.结果如图1所示.

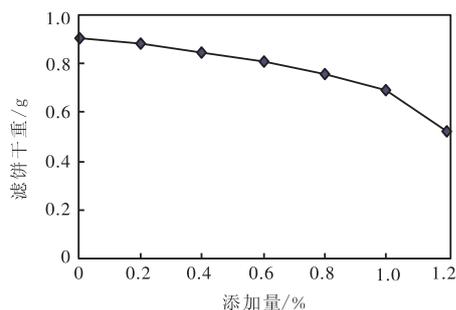


图1 黑根霉对H₂O₂耐受性曲线

Fig.1 Tolerance curve of the *Rhizopus nigricans* for H₂O₂

从图1看出,当H₂O₂溶液添加量超过1%后,滤饼干重下降速度加快,即生物量急剧下降.因此,对发酵液总体积来讲,其添加量应控制在1%以内.

(2) 添加H₂O₂对转化的影响

按照1.5的方法,投入1% 16 α ,17 α -环氧孕酮,加入20%乙酸丁酯及1% H₂O₂溶液,转化48 h,结果如图2所示.

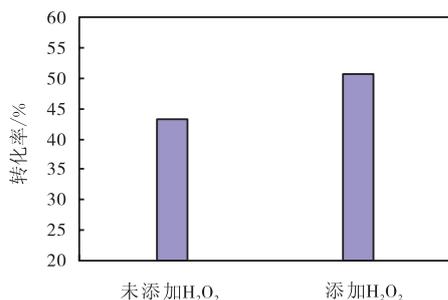


图2 添加H₂O₂对转化率的影响

Fig.2 Effect of H₂O₂ accession on the conversion ratio in the fermentation system

从图2看出,与未添加H₂O₂相比,添加了H₂O₂的乙酸丁酯转化体系中转化率提高8%,这充分说明黑根霉的羟基化过程是需氧的过程.因此,强化转化过程中氧的供应是必要的.

2.3.3 添加外加电子受体对C₁₁ α -羟基化转化率的影响

按照1.5的方法,投入1% 16 α ,17 α -环氧孕酮,加入20%乙酸丁酯及不同浓度的维生素K₃(添加量为质量分数),转化48 h,结果如图3所示.从图3看出,与不添加维生素K₃相比,添加了维生素K₃体系的转化率有所提高.其中添加量为0.1%的体系比对照转化率提高了近2%,而添加量为0.2%~0.4%的体

系比对照转化率均提高了近6%.因此,维生素K₃的合适添加量为0.2%.

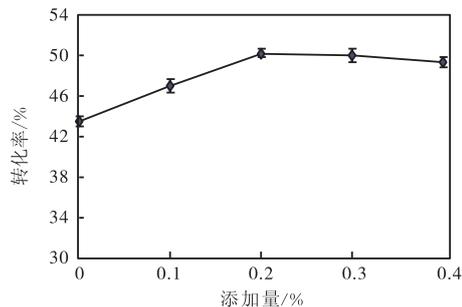


图3 添加维生素K₃对转化率的影响

Fig.3 Effect of vitamin K₃ accession on the conversion ratio in the fermentation system

3 结 语

实验中所试的8种有机溶剂中,乙酸丁酯对16 α ,17 α -环氧孕酮和C₁₁ α -羟基-16 α ,17 α -环氧孕酮的溶解度比较大,并且毒性适中,与水组成的双液相体系的C₁₁ α -羟基化转化率最高,达到了44.2%,与对照转化率基本持平.而添加了氧促进剂H₂O₂(添加量1%)和外加电子受体维生素K₃(添加量0.2%)对羟基化转化具有促进作用,分别比对照转化率提高了8%和6%.

参考文献:

- [1] 王普,陈希杨,虞炳钧. 新技术在甾体药物微生物转化中的应用[J]. 化工进展,2002,21(11):805-808.
- [2] Peterson D H, Murray H C. Microbiological oxygenation of steroids at carbon11[J]. Am Chem Soc,1952,74:1871-1872.
- [3] 李福,王普,李荣贵. 有机溶剂/水两液相体系中甾体激素的生物转化[J]. 生物技术,14(3):76-78.
- [4] 周英俊,郑璞. 甾体微生物羟基化的耐温菌选育及转化条件研究[J]. 中国医药工业杂志,2006,37(12):811-814.
- [5] 李荣贵. 有机溶剂/水两相体系中甾体微生物C_{1,2}脱氢研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2003.
- [6] 吴兆亮,胡滨,郑辉杰,等. 两液相培养中有机溶剂对细胞毒性的研究进展[J]. 生物技术,2000,10(2):37-40.
- [7] 李元广,曹竹安. 双液相发酵体系氧传递过程分析[J]. 生物工程进展,1994,14(4):31-36.
- [8] 沈珈琦. 应用霉菌单加氧酶羟基化齐墩果酸的研究[D]. 南京:南京工业大学,2006.