



雷斯青霉转化左旋乙基甾烯双酮 15 α -羟基化 反应工艺研究

段少军, 杜连祥, 别松涛, 毛淑红

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 对雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) 微生物转化左旋乙基甾烯双酮 15 α -羟基化反应的培养基组成和转化条件进行优化. 结果表明: 优化后最佳培养基组分为葡萄糖 30 g/L, 玉米浆 20 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ 0.02 g/L, KCl 0.5 g/L; 最适转化条件为接种量 10%, 初始 pH7.5, 摇瓶装量 50 mL, 转化温度 28 °C, 投料量 0.2%, 投料时间 30 h, 转化时间 60 h, 底物添加方式为底物超声粉碎后加 4% 甲醇和 1.5% 吐温 80 溶解. 在此条件下, 摇瓶转化率可达 70% 以上.

关键词: 雷斯青霉; 15 α -羟基化; 左旋乙基甾烯双酮

中图分类号: TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 02-0034-05

Optimization Studies on Fermentation Condition of Steroid

15 α -Hydroxylation by *Penicillium raistrickii*

DUAN Shao-jun, DU Lian-xiang, BIE Song-tao, MAO Shu-hong

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

Abstract: The biotransformation medium ingredient and conversion condition for 15 α -hydroxylazation of 13-methyl-estr-4-ene-3,17-dione by *Penicillium raistrickii* were optimized. The optimum medium ingredient includes (g/L) glucose 30, corn steep liquor 20, NaNO₃ 2, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄ 2, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.02, KCl 0.5. When the *Penicillium raistrickii* is cultured at 30 h under the inoculum concentration 10% (v/v), initial pH7.5, ventilation volume 50 ml, conversion temperature 28 °C, inventory rating 0.2%, the substrate dissolved in 4% methanol and 1.5% tween80 by ultrasonic dispersion is fed in the fermentation medium and continued culture 60 h. The conversion rate in shaking flask can be up to 70%.

Keywords: *Penicillium raistrickii*; 15 α -Hydroxylation; 13-methyl-estr-4-ene-3,17-dione

羟化反应是微生物转化甾体反应中最重要和广泛被应用的反应之一, 羟基化能够为进一步的化学合成提供中间体, 羟基化后的甾体化合物增加了抗炎活性^[1,2].

孕二烯酮 (Gestodene) 是近 10 年来国际上推出的、迄今为止激素含量最低而活性最强的新型口服合成避孕药^[3]. 其孕激素活性是左旋甲基炔诺酮的 2 倍, 并且几乎没有雄激素和雌激素活性, 口服吸收快速完全, 有良好的避孕效果和较少的副作用. 在孕二

烯酮的合成过程中, 左旋乙基甾烯双酮 (13-methyl-estr-4-ene-3,17-dione) 的 15 α 位羟基化是最为关键的一步, 目前主要通过有机合成来完成^[4]. 然而有机合成法得率低, 专一性不强, 步骤烦琐. 生物转化具有化学合成无可比拟的优点: 反应条件比较温和, 产物比较单一, 具有很高的立体选择性、区域选择性和化学选择性, 易于纯化, 且不污染环境, 并且能完成一些化学合成难以进行的反应^[5].

雷斯青霉具有对甾体 15 α 位特异性羟基化的作

用,本文通过微生物转化技术,利用雷斯青霉对左旋乙基甾烯双酮进行15 α 位羟基化,生物合成了15 α -羟基左旋乙基甾烯双酮,并对其发酵工艺进行了优化。

1 材料与方法

1.1 菌种

Penicillium raistrickii (ATCC 10490) 购自美国标准菌种保藏中心。

1.2 试剂与药品

左旋乙基甾烯双酮、15 α -羟基左旋乙基甾烯双酮标准品均购自北京紫竹药业有限公司。

薄层层析硅胶, 甲醇、乙酸乙酯、石油醚(均为色谱纯)等。

1.3 培养基

斜面培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 麦芽提取物 20, 葡萄糖 20, 蛋白胨 1, 琼脂 20, 121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌备用。

发酵培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 30, 玉米浆 20, NaNO_3 2, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 2, MgSO_4 0.5, FeSO_4 0.02, KCl 0.5, 121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌备用。

1.4 方法

1.4.1 培养及转化方法

(1) 孢子悬液制备

挑取一环雷斯青霉孢子接种于斜面培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d. 用无菌水洗下成熟的孢子, 过滤除去菌丝体, 制备成一定浓度孢子悬液. -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 7 d 之内使用。

(2) 摇瓶培养

孢子悬液接种于摇瓶发酵培养基中, 使其孢子浓度为 5×10^6 个/mL, 28 $^{\circ}\text{C}$, 210 r/min, 培养 24 h。

(3) 转化方法

向培养得到成熟的菌丝体中加入预处理好的底物 0.2%, 继续培养转化 48 h。

1.4.2 分析方法

(1) 生物量测定

采用干重法: 将发酵液抽滤取得菌丝体, 以无菌水冲洗 3 次, 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重。

(2) 薄层层析^[6]

取 1 mL 发酵液, 加入等体积乙酸乙酯抽提发酵液 30 min, 取抽提液点样于薄层层析硅胶板, 标准品作对照, 展层剂 $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:2$, 薄层层析分离得到 15 α 羟化物, 在紫外灯下检测。

(3) 高效液相色谱法 (HPLC)

取一定量发酵液, 用等体积甲醇进行抽提, 稀释

10 倍, 采用高效液相色谱 (HPLC) 进行测定. 对照标准曲线计算含量. 测定条件: C_{18} 柱, 流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=4:1$, 检测波长 241 nm, 流速 1 mL/min, 柱温: 室温, 进样量 25 μL 。

2 结果与讨论

2.1 碳源对转化的影响

2.1.1 碳源的确定

以发酵培养基为基础, 分别加入 3% 的可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖, 考察其对菌体生长和转化的影响, 结果见表 1。

表 1 碳源的选择

Tab. 1 Choice of carbon source

碳源	pH	菌体干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	转化率/%
可溶性淀粉	7.03	8.64	52.03
蔗糖	7.20	10.23	51.15
麦芽糖	7.57	12.06	59.41
葡萄糖	7.12	14.64	61.06

由表 1 可知, 以葡萄糖为唯一碳源时转化率最高, 达 61.06%。蔗糖和可溶性淀粉对菌体生长不利, 细胞干重较少, 而转化酶的合成与细胞干重有很大相关性, 较高的细胞干重是获得较高酶活的必要条件, 所以导致转化率较低; 另一方面可能是这 2 种碳源发酵结束时的 pH 偏低, 不利于转化的缘故。所以, 选择葡萄糖为碳源。

2.1.2 葡萄糖浓度对转化的影响

以葡萄糖为唯一碳源的发酵培养基为基础, 比较了不同葡萄糖浓度对转化的影响, 结果见图 1。

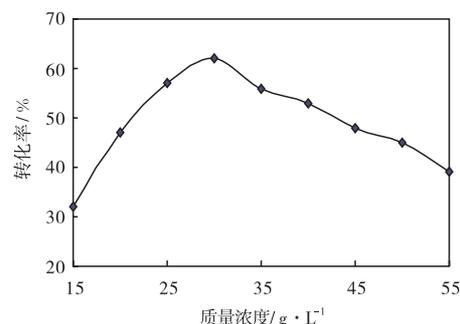


图 1 葡萄糖浓度对转化的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of glucose

由图 1 可以看出, 随着葡萄糖浓度的增加, 转化率也不断增加, 当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时, 转化率达到最大值 61.52%。浓度继续增大时, 转化率反而

下降. 可能该转化酶受高葡萄糖浓度的抑制.

2.2 有机氮源对转化的影响

2.2.1 有机氮源的确定

以 3%葡萄糖为碳源的发酵培养基为基础, 分别加入 1%的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、玉米浆为氮源, 考察其对生物量及转化率的影响, 结果如表 2.

表 2 有机氮源的选择

Tab. 2 Choice of organic nitrogen source

有机氮源	pH	菌体干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	转化率/%
酵母膏	6.12	11.23	53.74
牛肉膏	7.14	13.07	60.42
蛋白胨	6.19	10.66	54.33
玉米浆	7.09	14.73	62.08

由表 2 可知, 玉米浆作氮源转化率较高, 为 62.08%, 其次是牛肉膏、蛋白胨. 这可能是玉米浆更易于被菌体在细胞代谢中利用, 形成氨基酸、嘌呤、嘧啶等的基本元素, 促进转化进行, 所以选择玉米浆作为有机氮源.

2.2.2 玉米浆浓度对转化的影响

在葡萄糖为单一碳源的发酵基础培养基上分别添加不同浓度的玉米浆, 转化结果如图 2.

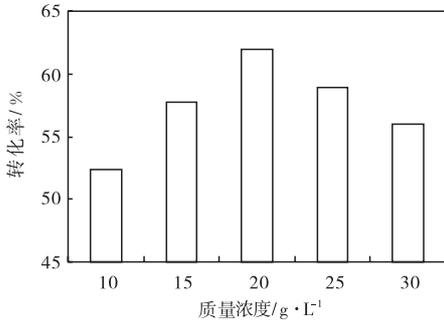


图 2 玉米浆浓度对转化的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of corn steep liquor

结果表明: 随着玉米浆浓度的增加, 其转化率逐渐增加, 当其浓度为 20 g/L 时, 转化率达到最高值 62.50%, 此后有所下降.

2.3 无机氮源对转化的影响

2.3.1 无机氮源的确定

在 3%葡萄糖为碳源, 2%玉米浆为有机氮源的发酵培养基基础上, 选取 5 种无机氮源进行对比实验, 测定其对转化率的影响. 结果如表 3 所示.

硝酸钠作为无机氮源转化率较高, 为 63.57%. 这可能是 NaNO_3 对 pH 影响较小, 更利于菌体生长, 因此更利于转化的原故. 所以选择硝酸钠为培养基的无机氮源.

表 3 无机氮源的选择

Tab. 3 Choice of abio-nitrogen source

无机氮源	pH	菌体干重/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	转化率/%
NaNO_3	7.52	14.23	63.57
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.03	14.76	61.04
NH_4NO_3	6.16	11.06	54.07
NH_4Cl	6.07	13.35	58.86
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6.32	12.44	56.22

2.3.2 硝酸钠浓度对转化的影响

分别将不同浓度的硝酸钠加入到以 3%葡萄糖为碳源, 2%玉米浆为有机氮源的发酵培养基中, 转化结果如图 3.

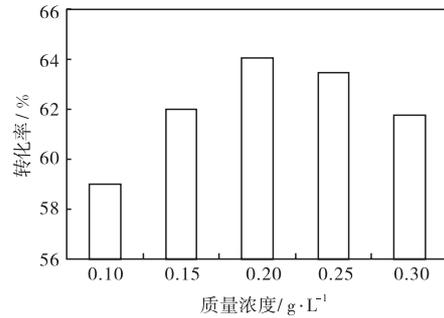


图 3 硝酸钠浓度对转化的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of NaNO_3

结果显示: 硝酸钠质量浓度为 2 g/L 时转化率相对较高, 达到 63.77%, 之后, 随着其浓度增大转化率降低.

综上, 以优化后培养基进行转化实验, 重复 2 次转化率分别为 64.87%, 64.92%, 转化率比优化前提高了 5%左右. 由此得出最佳培养基组分 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 30, 玉米浆 20, NaNO_3 2, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 2, MgSO_4 0.5, FeSO_4 0.02, KCl 0.5.

2.4 转化条件的选择

2.4.1 接种量

配制浓度为 10^6 个/mL 的孢子悬浮液, 以不同体积比接种量接种, 按方法 1.4.1 进行培养转化, 结果如图 4.

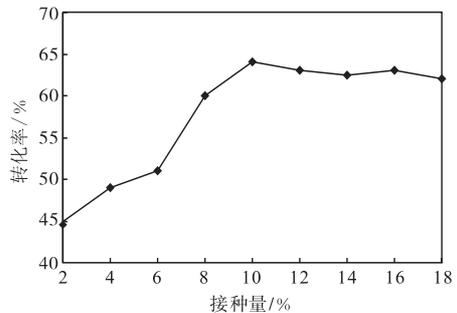


图 4 接种量的选择

Fig. 4 Choice of inoculum concentration

结果表明:孢子悬浮液接种量在2%~10%时,转化率随着接种量的增加而增大;当孢子悬浮液接种量大于10%时,转化率变化不大.由此得出10%孢子悬浮液接种量为佳.接种量适宜的时候,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,但接种量过大,容易造成菌体生长过快,后期转化时营养供给不足,从而影响转化率.

2.4.2 初始 pH

设置不同的初始 pH,按10%接种量接种,按方法1.4.1进行培养转化,结果如图5所示.

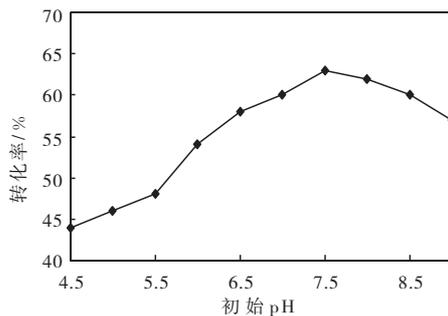


图5 初始 pH的选择
Fig. 5 Choice of initial pH

经比较可得出:转化在弱碱性条件下进行更利于产物的生成,最适合的初始 pH 为 7.5.可能弱碱的环境更利于羟化酶的表达生成和羟化反应的进行.

2.4.3 转化温度

按以上优化条件接种后,分别置于24℃、26℃、28℃、30℃、32℃摇床中培养转化,测定其转化率.结果显示:28℃时转化率最高.已有文献报道,羟化反应与温度有密切关系^[7].这可能与CytP450单加氧酶本身活性中心的氨基酸残基对热敏感有关.

2.4.4 摇瓶装液量

于250 mL摇瓶中分别装入20、30、40、50、60、70、80、90 mL培养基,接种后以210 r/min的转速进行转化,测定转化率.结果表明:装液量为50 mL时转化率较高,达到65.79%.摇瓶装液量直接影响溶氧效果,而溶氧制约着反应的进行^[8].

2.4.5 投料量及时间

底物过量添加对于菌体有毒害作用,投料量过低影响转化率,综合考虑选择0.2%为投料量,分别在不同时间投料,转化结果如图6.

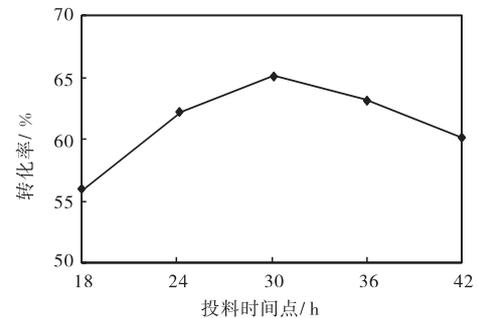


图6 投料时间点选择
Fig. 6 Choice of feeding point

由图6可知:投料时间为30h时转化率最高.30h左右菌体生长代谢旺盛,羟化酶的表达量较大.过早投料容易对菌体造成伤害;过晚,菌体逐渐衰老,所以选30h为最佳投料时间.

2.4.6 转化时间

根据以上优化条件转化底物,分别在底物投料后以不同转化时间取样检测转化率.测定结果表明:转化60h后,底物转化率达到最大值,继续延长转化时间,转化率反而有所降低,这是由于产物的反馈抑制和菌体对产物的降解所致,所以选转化时间为60h.

2.4.7 底物添加方式优化

由于左旋乙基甾烯双酮在水中的溶解度很低,所以,如何帮助其在发酵液中均匀扩散,以更利于底物与菌体接触,是提高底物转化率的一个重要方面.

据文献报道^[9],用于助溶的有机溶剂的量应相当于水溶液总体积的1.5%~5%.因此,选择3%作为有机溶剂的工作浓度,分别溶解等量底物于3%的不同有机溶剂中,再添加到发酵液中(底物终浓度2 g/L),与直接加入底物的转化进行对比,结果见表4.

表4 不同有机溶剂综合处理对转化率的影响
Tab. 4 Effect of disposal of different organic impregnant

底物的处理方式	丙酮	DEMO	甲醇	乙醇	无有机溶剂
无超声处理	56.02	64.33	64.76	55.69	53.33
超声粉碎	62.47	66.24	67.06	63.52	57.34
超声粉碎+吐温80	63.33	66.35	68.37	65.46	58.62

由表4可知,选择甲醇助溶转化率较高,可能是甲醇对菌体的毒性和羟化酶的钝化作用较小.另外,采用超声粉碎的物理处理方法相结合,使得底物颗

粒变小,与有机溶剂接触面积增大,更易溶解,从而使转化率得到了提高.

确定吐温80为1%条件下考察甲醇用量和甲醇

为3%的情况下考察吐温80用量,进一步对甲醇和吐温80对转化的影响进行选择,结果见表5、表6。

表5 有机溶剂用量的选择

Tab. 5 Choice of the concentration of organic impregnant

甲醇/%	1	2	3	4	5	6
转化率/%	62.43	67.92	68.33	69.19	64.38	62.72

表6 分散剂用量的选择

Tab. 6 Choice of the concentration of dispersant

吐温80/%	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
转化率/%	68.29	69.17	70.37	69.06	67.34

由表5、表6可知:4%的甲醇对菌体的毒害较小或者对羟化酶的钝化作用较小,1.5%的吐温80避免了发酵液过度黏稠,保证了氧气的溶解和菌体的生长,从而得到较高的转化率。

3 结论

左旋乙基甾烯双酮15 α -羟基化反应的最佳培养基组分(g·L⁻¹):葡萄糖30,玉米浆20,NaNO₃2,KH₂PO₄1,K₂HPO₄2,MgSO₄0.5,FeSO₄0.02,KCl0.5。最适转化条件:接种量10%、初始pH7.5、摇瓶装液量50mL、转化温度28℃、投料量0.2%、投料时间点30h、转化时间60h、底物添加方式为底物超声粉碎后加4%甲醇和1.5%吐温80溶解。在以上优化条件下通过摇瓶培养,底物左旋乙基甾烯双酮的转化率可达70%以上,为进一步工业化生产、大规模发酵转化打下了一定的基础。实验过程中发现,菌体的羟化酶酶活和底物的溶解度是制约转化率大小的关键所在,因此,如何标定精确的羟化酶表达过程以及提高酶活,进一步提高底物的溶解度有待继续探讨。

参 考 文 献:

- [1] Mahato S B, Banerjee S, Podder S. Steroid transformation by microorganisms-III [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 7.
- [2] Hogg J A. Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation [J]. *Steroids*, 1992, 257: 593.
- [3] Lemus A E, Zaga V, Garcia G A, et al. The oestrogenic effects gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites [J]. *J Endocrinol*, 2000, 165 (3): 693—702.
- [4] 陈绍怡, 杨秀. 手性药物合成中的生物转化 [J]. *生物工程进展*, 2000, 20 (4): 60—63.
- [5] 杨柳青, 何南, 张玉彬. 手性药物的生物转化 [J]. *中国新药杂志*, 2000, 9 (12): 817—820.
- [6] 史济平, 叶丽, 沈国祥. 金龟子绿僵菌对甾族化合物的11 α -羟化 [J]. *上海医科大学学报*, 1997, 24 (4): 265—269.
- [7] 杨灿宇, 杜连祥. 甾体C11 α -羟化菌株AF9612发酵条件的研究 [J]. *天津轻工业学院学报*, 1999 (1): 10—14.
- [8] Holand H L. The mechanisms of the microbial hydroxylation of steroids [J]. *Chem Soc Rev*, 1982 (2): 371—374.
- [9] Lee D C, Park J H, Kim G J, et al. Modeling, simulation, and kinetic analysis of a heterogeneous reaction system for the enzymatic conversion of poorly soluble substrate [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64 (3): 272—283.