



## 反应介质对植物甾醇侧链生物降解的影响

申雁冰, 王 敏, 王永乐

(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:** 分析考察了有机溶剂、表面活性剂和超分子等反应介质对分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.NRRL B-3683) 降解植物甾醇生成雄甾烯酮 AD (D) 的生物转化反应的影响. 结果表明, 采用有机溶剂和吐温 80 等表面活性剂作为反应介质的转化反应的转化率较低, 而在含有环糊精的超分子反应介质中植物甾醇的转化率和转化速率均大幅度提高. 采用直接添加的方式加入羟丙基- $\beta$ -环糊精 (HP- $\beta$ -CD), 反应 168 h, 植物甾醇转化率达 89.8%, 比对照提高了 2.9 倍. 转化 48 h 时加入与植物甾醇摩尔比为 2 : 1 的 HP- $\beta$ -CD, 72 h 时转化率达到 87.5%, 此时同期对照转化率为 27.6%, 缩短了反应周期.

**关键词:** 植物甾醇; 环糊精; 生物转化; 反应介质; 分枝杆菌

中图分类号: TQ467.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0027-04

## Effects of Reaction Medium on the Side Chain Degradation of Phytosterols by *Mycobacterium* sp.NRRL B-3683

SHEN Yan-bing, WANG Min, WANG Yong-le

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

**Abstract:** The effect of organic solvent, surfactant and cyclodextrin reaction medium on the degradation of phytosterols (PS) into androstenone by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 was studied. A new supramolecular conversion system by adding cyclodextrin (CD) to the fermentation liquid was developed, where the reaction rate and its conversion were found to be significantly increased. The conversion reached to 89.8% when hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) was added to the fermentation liquid, which was about 2.9 times compared with the control experiment. It was found that the conversion of phytosterols was 87.5% after 72 h conversion under the following conditions: the molar ratio of HP- $\beta$ -CD to PS was 2 : 1, the adding time was 48 h.

**Keywords:** phytosterols; cyclodextrin; bioconversion; reaction medium; *Mycobacterium* sp.

植物甾醇经微生物转化可形成医药中间体雄甾-4-烯-3, 17-二酮 (Androst-4-ene-3, 17-dione, 4-AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (Androst-1, 4-diene-3, 17-dione, ADD), AD (D) 是合成甾体药物的重要中间体. 甾体化合物的低溶解性是目前限制其微生物转化反应速率和收率的主要问题之一. 植物甾醇是一种疏水性化合物, 在水中溶解度低于 2 mg/L<sup>[1]</sup>, 这就导致底物与微生物细胞不能很好接触, 使转化率偏低

及发酵时间延长. 为了提高生产效率, 微生物转化经常在远远高于底物溶解度的浓度下进行, 在这种固体底物与溶解底物共存的多相体系中, 转化率不仅受酶活性的影响, 而且受到底物溶解速度的影响<sup>[2]</sup>. 为了提高植物甾醇转化率, 较为有效的方法之一就是提高其在水中的溶解度. 介质工程<sup>[3]</sup>是在水溶液中加入具有生物相容性而本身不被降解的组分, 达到增加底物溶解度、提高生物催化剂催化效率的目的. 这种组分

收稿日期: 2008-01-21; 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20776111); 天津市应用基础研究重点项目 (043802511)

作者简介: 申雁冰 (1983—), 男, 河南人, 硕士研究生.

主要有有机溶剂、多醇类添加剂、环糊精、冠醚等表面活性剂等<sup>[4]</sup>。本文以分枝杆菌降解植物甾醇生成AD(D)为研究对象,考察了有机溶剂<sup>[5]</sup>、表面活性剂<sup>[6]</sup>和超分子环糊精<sup>[7,8]</sup>三种转化介质对植物甾醇转化反应的影响,为解决甾醇等疏水性化合物在生物转化中的低溶解性问题提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent1100型高效液相色谱仪。

雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD),雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)均为色谱纯,SIGMA公司;植物甾醇(主要成分的质量分数分别为菜籽甾醇17.10%,菜油甾醇27.85%,豆甾醇5.37%和 $\beta$ -谷甾醇48.12%),武汉凯迪精细化工有限公司;羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD),西安德立生物化工有限公司;磺丁基- $\beta$ -环糊精(SBE- $\beta$ -CD),山东新大精细化工有限公司;甲基- $\beta$ -环糊精(M- $\beta$ -CD),广州泰龙国际贸易有限公司,其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 菌种与培养基

菌种:分枝杆菌 *Mycobacterium* sp.NRRL B-3683。

斜面培养基(g/L):磷酸氢二钾0.5,硫酸镁0.5,柠檬酸铁铵0.05,柠檬酸2,硝酸铵2,碳酸钙10,甘油20,葡萄糖5,琼脂20。

种子培养基(g/L):磷酸氢二钾0.5,硫酸镁0.5,柠檬酸铁铵0.05,柠檬酸2,硝酸铵2,碳酸钙10,甘油20,葡萄糖5。

发酵培养基(g/L):葡萄糖10,柠檬酸2,柠檬酸亚铁铵0.05,硫酸镁0.5,磷酸氢二钾0.5,磷酸氢二铵3.5,植物甾醇5,pH7.2。

### 1.3 植物甾醇侧链的生物降解反应

采用0.5%的吐温80无菌水溶液洗下斜面种子,使菌体吸光度值控制在 $1.0\pm 0.2$ ,以体积分数为2%的接种量接种到一级种子,于29℃,110 r/min培养40 h,此时菌体吸光度值在 $1.0\pm 0.2$ ,pH为6.6~6.8。按7%的接种量转接于含有植物甾醇的发酵培养基中,于29℃,110 r/min转化168 h。

### 1.4 植物甾醇转化率的分析

采用高效液相色谱法。取2 mL发酵液加入4 mL乙酸乙酯进行萃取,离心,精确取上清液1 mL于1.5 mL的小离心管中,自然风干后加1 mL的流动相,12 000 r/min离心10 min。然后用高效液相色谱

仪检测,色谱柱为Phenomenex C18(5  $\mu$ m,250 mm $\times$ 4.6 mm);流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=80:20$ ;流速1 mL/min;检测波长254 nm;柱温30℃;进样量20  $\mu$ L;外标法检测。植物甾醇转化率计算公式:

$$\text{转化率} = \frac{X_{\text{产物}} \times d \times V \times M_{\text{底物}}}{m_{\text{底物}} \times M_{\text{产物}}} \times 100\%$$

式中: $X_{\text{产物}}$ 为液相测得的产物质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; $d$ 为稀释倍数; $V$ 为发酵液的体积,L; $m_{\text{底物}}$ 为 $V$ 体积内底物的质量,mg; $M_{\text{底物}}$ 与 $M_{\text{产物}}$ 分别为底物与产物的摩尔质量,g/mol。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机溶剂介质的影响

分别选用甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺(DMF)和二甲基亚砜(DMSO)4种能与水互溶的有机溶剂作为溶媒来溶解植物甾醇,均以4%的添加量在转化反应进行24 h时加入发酵液中,考察有机溶剂对植物甾醇生物降解反应的影响,结果见图1。

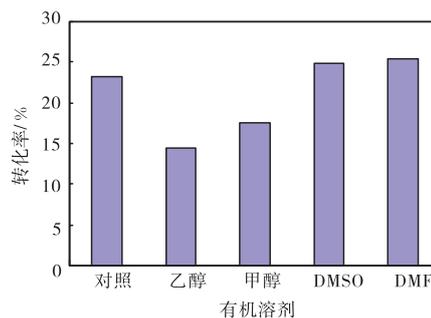


图1 有机溶剂介质对植物甾醇侧链生物降解反应的影响

Fig. 1 Effect of solvent medium on the degradation of phytosterols

由图1可见,添加DMF和DMSO的转化效果较好,转化率分别为25.4%、24.9%,略高于对照实验的转化率,而添加乙醇和甲醇的效果较差。本实验中采用乙醇作为反应介质的转化率较低,推测其原因:一是植物甾醇侧链降解反应为多酶催化,较其他单酶催化的转化反应更易受有机溶剂的毒害作用<sup>[9]</sup>;另一方面还与菌体对有机溶剂的耐受性有关<sup>[10]</sup>。

### 2.2 表面活性剂的影响

表面活性剂在水溶液中对疏水性物质具有增溶作用,增加了其在水溶液中的生物利用率。在临界胶束浓度以下,表面活性剂对疏水性物质的增溶作用比较小,而在临界胶束浓度以上,增溶作用显著增大<sup>[11]</sup>。但因表面活性剂本身对菌体有毒害作用,浓度

过高会影响菌体的正常代谢.吐温80(聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯)为一种非离子型表面活性剂,它的亲水亲油平衡值较大,具有较大的亲水性和化学上的水解离性.王风清的研究表明<sup>[12]</sup>,使用0.5%~1%的吐温80转化效果较好.本实验中分别选用浓度为0.7%的吐温80、0.2%的SDS和0.1%的消泡剂进行植物甾醇的生物转化反应,实验结果见图2.

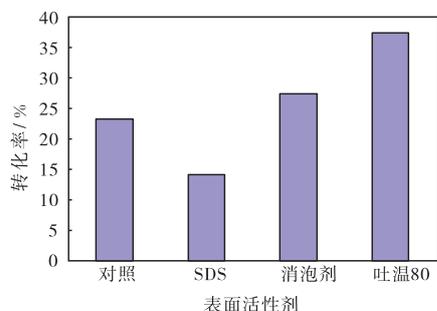


图2 表面活性剂对植物甾醇侧链生物降解反应的影响

Fig. 2 Effect of surfactant on the degradation of phytosterols

由图2可知,在所选用的三种表面活性剂中,吐温80乳化法的转化效果较好,转化率为37.3%,这与张丽青等<sup>[6]</sup>人的结论一致.SDS虽然乳化效果较好,但它对菌体毒性较大,菌体量较少,转化率低于对照.

### 2.3 环糊精的影响

利用环糊精的包埋作用可有效提高甾体底物的溶解性,进而提高产物的收率.本文分别选用 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)、磺丁基- $\beta$ -环糊精(SBE- $\beta$ -CD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD)和甲基- $\beta$ -环糊精(M- $\beta$ -CD)作为反应介质进行植物甾醇侧链生物降解反应(环糊精添加量:除 $\beta$ -CD按与植物甾醇摩尔比为0.5:1添加外,其他均为2:1摩尔比添加),实验结果见图3.

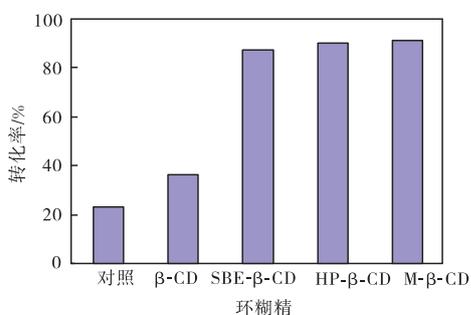


图3 环糊精转化介质对植物甾醇侧链生物降解反应的影响

Fig. 3 Effect of cyclodextrin on the degradation of phytosterols

由图3可知,在含有环糊精介质体系中植物甾醇的转化效果较好,添加有 $\beta$ -CD、SBE- $\beta$ -CD、HP- $\beta$ -CD和M- $\beta$ -CD的植物甾醇转化反应的转化率达到36.2%、87.1%、89.8%和91.0%,分别较对照实验提高了55.4%、276.3%、285.4%和290.6%.加入HP- $\beta$ -CD的转化效果与M- $\beta$ -CD基本一致,考虑到M- $\beta$ -CD的价格较高,确定选用HP- $\beta$ -CD作为转化介质.

#### 2.3.1 HP- $\beta$ -CD添加比例对植物甾醇侧链生物降解反应的影响

环糊精能显著增加植物甾醇等疏水化合物的水溶性,在一定范围内其溶解度的增加与环糊精添加量的增加呈线性关系<sup>[13]</sup>.实验在转化过程进行至72h时添加与底物PS不同摩尔比的HP- $\beta$ -CD,29℃,110r/min反应168h.由图4可以看出,在以与PS的摩尔比为(0.25:1)~(2:1)加入HP- $\beta$ -CD时,底物转化率随着HP- $\beta$ -CD摩尔比的增加而增加,继续增加HP- $\beta$ -CD量,转化率略有下降,但下降幅度不大.在加入摩尔比为2:1的HP- $\beta$ -CD时,转化率最高,为89.8%,是对照实验的2.9倍.

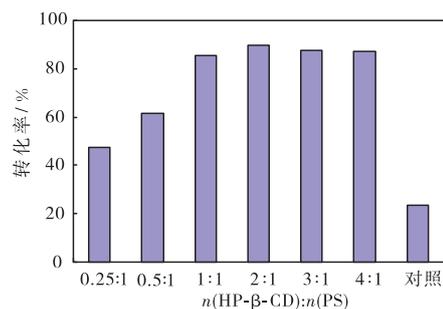


图4 不同摩尔比HP- $\beta$ -CD直接添加对PS生物转化的影响

Fig. 4 Effect of adding different molar ratio of HP- $\beta$ -CD on the degradation of PS

#### 2.3.2 HP- $\beta$ -CD添加时间对植物甾醇生物转化反应的影响

图5是不同时间加入与底物摩尔比为2:1的HP- $\beta$ -CD,反应168h,植物甾醇的转化情况.表明在转化过程中加入HP- $\beta$ -CD、AD(D)生成率均高于空白对照,HP- $\beta$ -CD的添加时间对转化率的影响不明显.

将环糊精应用于甾体药物的生物转化技术中,提高了产物得率的成功例子已有许多报道,但由于体系的复杂性等原因,对其机理的研究较少.推测环糊精在植物甾醇转化中作为一种超分子的主体物质,通过与客体(植物甾醇)的分子识别作用,形成一种超分子物质进入水相,作为底物和细胞结合的载体,在另一超分子主体(细胞)的竞争作用下,超分子发生

解离,释放出的客体分子(植物甾醇)进而与细胞结合,完成催化反应.即环糊精作为甾体底物和细胞结合的载体,提高甾体在水溶液的反应体系中的溶解度,进而提高微生物对甾体底物的生物转化效率.

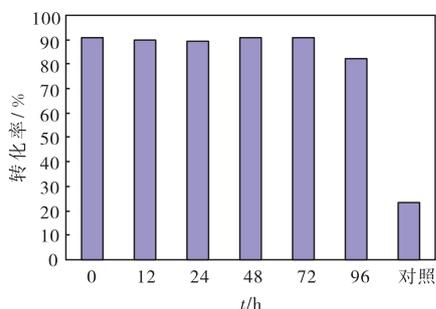


图5 HP-β-CD加入时间对植物甾醇侧链降解反应的影响

Fig. 5 Effect of HP-β-CD adding time on the degradation of phytosterols

### 2.3.3 HP-β-CD对转化反应过程的影响

图6是转化反应48h时加入与植物甾醇摩尔比为2:1的HP-β-CD时的转化反应过程曲线.加入环糊精后的24h,转化率由17.7%迅速上升到87.5%,明显高于同期对照的转化率27.6%,即在含有HP-β-CD的转化介质中,显著加快了植物甾醇生物转化反应的反应过程,缩短了反应周期.

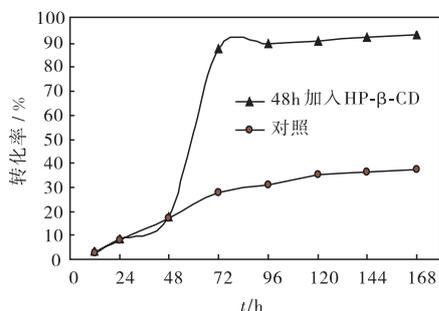


图6 48h时添加HP-β-CD的转化反应过程

Fig. 6 Conversion process of PS when adding HP-β-CD at 48 h

## 3 结论

(1) 采用有机溶剂和吐温80等表面活性剂作为转化介质,其转化率较低;在含有环糊精的超分子介质体系中植物甾醇的转化效果较好.采用直接添加的方式加入HP-β-CD,植物甾醇转化率达89.8%,较对照提高了285.4%.

(2) 在反应进行至48h时加入与植物甾醇摩尔比为2:1的HP-β-CD时,转化72h,转化率达到87.5%,此时对照的转化率为27.6%,显著缩短了植物甾醇侧链降解转化反应的反应周期.

## 参考文献:

- [1] Charney W, Herzog H L. Microbial transformation of steroids [M]. New York: Academic Press, 1967.
- [2] Chen K C, Wey H C. Dissolution-enzyme kinetics of 11β-hydroxylation of cortisone by *Curvularia lunata* [J]. Enzyme Microb Technol, 1990, 12: 616—621.
- [3] 王志龙. 深度科学交叉和高度过程集成的非水相生物催化 [J]. 化工学报, 2005, 56 (4): 563—569.
- [4] Lee M Y, Dordick J S. Enzyme activation for nonaqueous media [J]. Cur Opin Biotechnol, 2002, 13: 376—384.
- [5] Ahmad S, Johri B N. Microbial transformation of sterol in organic media [J]. Indian Jour Chem, 1993, 32: 67—69.
- [6] 张丽青, 卞恩培, 王 又. 分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.M12) 降解甾醇侧链的研究 [J]. 药学学报, 1992, 27 (12): 903—907.
- [7] Hesselink P G M, Vliet S V, Vries H O, et al. Optimization of steroid side chain cleavage by cyclodextrins [J]. Enzyme Microb Technol, 1989, 11: 398—404.
- [8] Jadoun J, Bar R. Microbial transformation in a cyclodextrin medium. Part 3. Cholesterol oxidation by *Rhodococcus erythropolis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 40: 230—240.
- [9] Buckland BC, Dunnill P, Lilly MD. The enzymatic transformation of water-insoluble reactants in nonaqueous solvents: conversion of cholesterol to cholest-4-ene-3-one by a *Nocardia* sp [J]. Biotechnol Bioeng, 1975, 17: 815—826.
- [10] Cruz A, Fernandes P, Cabral JMS, et al. Whole-cell bioconversion of β-sitosterol in aqueous-organic two-phase systems [J]. J Mol Catal B, 2001, 11: 579—585.
- [11] 吴顺年, 苑会梅, 王连生. 表面活性剂及助溶剂对环境污染物意的增溶作用 [J]. 环境科学与技术, 1996, 4: 1—3.
- [12] 王凤清. 利用分枝杆菌降解植物甾醇生产雄甾烯酮的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2003.
- [13] Brewster M E, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59: 645—666.