

三羟基雄甾烯酮高转化菌株的选育及工艺优化

李会, 张明杰, 张晓梅, 李恒, 史劲松, 许正宏

江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

李会, 张明杰, 张晓梅, 等. 三羟基雄甾烯酮高转化菌株的选育及工艺优化. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1687-1691.

Li H, Zhang MJ, Zhang XM, et al. Breeding of high 3 β ,7 α ,15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one transforming strains and their conversion process optimization. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1687-1691.

摘要: 以能将去氢表雄酮 (DHEA) 转化为三羟基雄甾烯酮 (7 α ,15 α -diOH-DHEA) 的赤霉菌 *Gibberella intermedia* CA3-1 为出发菌株, 对其进行了诱变选育及工艺优化, 以期提高转化效率。采用 0.12 mg/mL 亚硝基胍诱变处理赤霉菌孢子悬液 30 min, 以 350 μ mol/L 酮康唑为最低抑制浓度进行抗性平板筛选, 最终获得一株遗传稳定性较好的高产菌株 M-10, 其产物摩尔得率达到 70.2%, 为出发菌株的 1.2 倍。通过摇瓶转化工艺的优化, 确定了突变菌株的最适转化工艺。在优化的转化工艺下, 当底物 DHEA 投料浓度为 5 g/L 时, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 摩尔得率提高到 75.6%, 较原始菌株提高了 31.3%。

关键词: 赤霉菌, 7 α ,15 α -diOH-DHEA, 亚硝基胍, 化学诱变, 条件优化

Breeding of high 3 β ,7 α ,15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one transforming strains and their conversion process optimization

Hui Li, Mingjie Zhang, Xiaomei Zhang, Heng Li, Jinsong Shi, and Zhenghong Xu

School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: In order to improve transformation efficiency of dehydroepiandrosterone (DHEA) into 3 β ,7 α ,15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one (7 α ,15 α -diOH-DHEA) by *Gibberella intermedia* CA3-1, we investigated the strains breeding and their

Received: June 28, 2013; **Accepted:** August 9, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A211), National Natural Science Foundation of China (No. 21206055), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012127).

Corresponding author: Jinsong Shi. Tel: +86-510-85328177; Fax: +86-510-85918206; E-mail: shijs@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A211), 国家自然科学基金 (No. 21206055), 江苏省自然科学基金 (No. BK2012127) 资助。

网络出版时间: 2013-10-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131017.1241.002.html>

conversion process optimization. *G. intermedia* CA3-1 strains were treated with 0.12 mg/mL 1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin (NTG) for 30 min and chosen by 350 $\mu\text{mol/L}$ minimum inhibitory concentration ketoconazole resistance marker. The high production strain named M-10 with a good genetic stability was selected and the product molar yield achieved to 70.2%, which was 20% higher than that of original strain. Under the improved conversion process with the DHEA concentration of 5 g/L, the product molar yield of the mutant M-10 reached 75.6%, which was improved by 31.3% than that of original strain.

Keywords: *Gibberella intermedia*, 7 α ,15 α -diOH-DHEA, nitrosoguanidine, chemical mutagenesis, conditions optimization

三羟基雄甾烯酮 (7 α ,15 α -diOH-DHEA) 是合成口服避孕药 Yasmin 活性成分屈螺酮的重要中间体^[1]。Yasmin 是最早由先灵公司开发成功的口服避孕药。生物转化被认为是解决甾体非活性碳原子特异性氧化的最有效方法^[2-3]。微生物能在甾体母核或侧链基团上特异性地加入一个或两个羟基, 甾体的羟基化是合成具有生物活性甾体衍生物的最重要方法之一^[4-6]。利用微生物的 P450 羟化酶系统能将去氢表雄酮 (DHEA) 双羟基化合成 7 α ,15 α -diOH-DHEA。

据文献报道, 丝状真菌具有将 DHEA 转化为 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的能力, 例如尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* VKM F-1600^[7]和亚麻刺盘孢 *Colletotrichum lini*^[8]。当 DHEA 的浓度为 2 g/L 时, 尖孢镰刀菌的 7 α ,15 α -diOH-DHEA 摩尔得率达到 63%。虽然 Romano 等发现亚麻刺盘孢的 DHEA 浓度为 2.5 g/L 时, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的摩尔得率提高到 69.8%。但仍然存在底物投料浓度低、产物得率不高的问题, 必将限制着 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的工业化应用。因此有必要对转化菌株进行选育和工艺优化, 从而进一步提高甾体 DHEA 的转化效率。

目前在高效菌株的选育中, 诱变育种是普遍应用并十分有效的方法, 但由于甾体类转化的微生物大多数为霉菌, 采用传统的菌丝体诱变方法较难达到预定的诱变效果^[9-10]。因此, 在了解菌株细胞结构特征的基础上, 采用单孢子或原生质体诱变并结合特定的筛选方法选择效果最佳。本实

验室前期筛选得到一株将 DHEA 转化为 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的赤霉菌 *Gibberella intermedia* CA3-1^[11], 但其 DHEA 的转化能力仍然不高。本文采用亚硝基胍 (NTG) 化学诱变结合酮康唑筛选方法对赤霉菌孢子进行诱变, 提高筛选效率, 并对高效突变菌进行转化工艺优化, 从而进一步提高突变菌的转化效率。

1 材料与方法

1.1 菌株

赤霉菌 (*G. intermedia* CA3-1), 由本实验室筛选保藏。

1.2 培养基

斜面固体培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 7.5, NaCl 1.16, KH₂PO₄ 2.72, 琼脂 2%, 自然 pH。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 7.5, NaCl 1.16, KH₂PO₄ 2.72, 自然 pH。

原始转化培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 15, 玉米浆 6, 初始 pH 7.0。

1.3 转化条件

将种子液按 6%接种量转接到转化培养基中, 组合式摇床 220 r/min、28 °C 培养 24 h。向已培养 24 h 转化液中投入 5 g/L DHEA, 继续转化 72 h。

1.4 诱变选育

1.4.1 孢子悬液的制备

按照参考文献^[12]制备孢子悬液, 最终孢子悬

液的浓度为 1×10^6 个/mL 左右。

1.4.2 诱变筛选模型的建立

按照卢文玉等报道的方法确定酮康唑对赤霉菌的最小抑制浓度^[13]。

1.4.3 亚硝基胍诱变

将 NTG 分别用孢子悬液稀释到浓度 0.12 mg/mL, 混合均匀并处理 30 min 时间后, 用生理盐水稀释 10^{-5} 倍。分别吸取 100 μ L 稀释液并涂布在酮康唑抗性筛选平板上, 定时观察并计数。

1.4.4 菌株筛选

挑取筛选平板中长势较好的单菌落, 转接到平板中分离活化, 进行平板初筛; 继而接种于摇瓶初始转化培养基中, 进行复筛。对转化能力较强菌株进行反复筛选, 筛选得到稳定的高效突变菌株。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量的测定

将转化液离心去上清得菌丝体, 用去离子水重复洗涤 2~3 次, 105 $^{\circ}$ C 烘箱烘干至恒重。

1.5.2 高效液相色谱法

按照参考文献[14]制备高效液相色谱样品。HPLC 条件采用 Agilent TC-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈/水 (7:3, V/V); 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 检测波长: 206 nm, 流速: 0.5 mL/min, 进样量 10 μ L。

1.6 转化工艺优化

培养基组分的优化: 以转化培养基为基本培养基, 采用单因素优化方法, 保持其他成分浓度不变, 仅改变碳源、氮源的浓度及添加适宜浓度的无机盐, 考察其对产物浓度的影响, 获得最佳培养基。

pH 的优化: 分别调配不同初始 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 的培养基, 考察初始 pH 对产物合成的影响, 以确定最适初始 pH 值。

2 结果与分析

2.1 酮康唑最低抑制浓度的测定

酮康唑为一种细胞色素 P450 抑制剂, 是血红素的配体, 能与 P450 竞争分子氧或底物抑制 P450 酶活。能耐受酮康唑最低抑制浓度的菌株, 即可能是 P450 羟化酶活性提高的突变菌株^[15]。表 1 显示, 在酮康唑浓度为 350~360 μ mol/L 之间对菌体的抑制作用较明显, 因此酮康唑最低抑制浓度为 350 μ mol/L。

2.2 诱变筛选

根据上述条件, 对赤霉菌孢子进行 NTG 诱变处理。在酮康唑筛选平板分离到 102 株抗性菌株, 通过摇瓶转化实验分别检测其 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的浓度, 其中有 10 株产物得率高于出发菌株, 结果如表 2 所示。结果表明, 突变菌株 M-10 转化能力高于出发菌株, 产物摩尔得率从 57.6% 分别提高到 70.2%, 为出发菌株的 1.2 倍。选取 M-10 进行遗传稳定性实验, 在斜面培养基连续转接 5 代, 其 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的得率均未发生明显变化, 说明该突变菌株遗传特性稳定。

表 1 酮康唑最低抑制浓度的测定

Table 1 Minimum inhibitory concentration of Ketoconazole

Concentration of ketoconazole (μ mol/L)	0	320	330	340	350	360	370
Colony growth	+	+	+	\pm	-	-	-

+: grow well; \pm : grow weak; -: don't grow.

表 2 酮康唑抗性突变菌株转化结果

Table 2 Conversion results of ketoconazole resistance mutants

Strains	Product yield (%)	Strains	Product yield (%)
CA3-1	57.6 \pm 1.5	M-45	63.8 \pm 1.6
M-1	60.5 \pm 1.9	M-60	69.4 \pm 1.9
M-10	70.2 \pm 2.1	M-78	68.3 \pm 1.7
M-12	65.2 \pm 2.0	M-94	66.4 \pm 2.0
M-18	64.9 \pm 1.8	M-96	58.7 \pm 1.7
M-25	66.9 \pm 2.3		

2.3 碳源对突变株 M-10 转化 DHEA 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响

以葡萄糖为碳源,研究不同葡萄糖浓度(5、10、15、20、25和30 g/L)对产物合成的影响,结果如图1所示。当葡萄糖浓度在15 g/L的时候,产物得率最高为72.2%。因此碳源选择15 g/L的葡萄糖。

2.4 氮源对突变株 M-10 转化 DHEA 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响

以酵母粉和玉米浆为复合氮源,探讨不同复合氮源酵母粉和玉米浆组合浓度对 M-10 菌株转化 DHEA 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响,结果如表3所示。当复合氮源酵母粉浓度在16 g/L,玉米浆浓度为8 g/L时,产物得率最高。

2.5 无机盐对突变株 M-10 转化 DHEA 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响

无机盐是微生物细胞的结构成分,参与并维

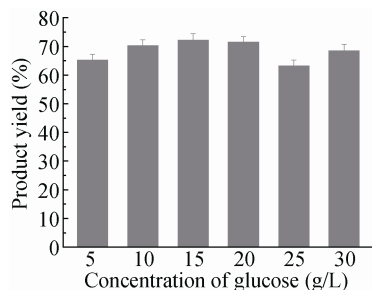


图1 不同葡萄糖浓度对产物得率的影响

Fig. 1 Effects of different glucose concentrations on product yield.

表3 不同复合氮源组合浓度对产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 合成的影响

Table 3 Effects of different concentrations of compound nitrogen source on product yield

Nitrogen source (g/L)		Product yield (%)
Yeast	Corn steep liquor	
14	4	68.5 \pm 1.9
15	6	70.2 \pm 2.1
16	8	73.5 \pm 2.4
17	10	72.3 \pm 2.2

持生物体的代谢活动、维持生物体内的酸碱平衡和维持细胞的渗透压等。考察了不同种类的无机盐对突变菌株 M-10 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响(图2)。结果表明当添加 0.1 g/L 的 MgSO₄ 时, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 得率有所提高。

2.6 pH 对突变株 M-10 转化 DHEA 生成 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的影响

研究了不同初始 pH 对突变株 M-10 转化产物的影响(图3),结果表明当初始 pH 为 6.5 时, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 产物得率最高。

2.7 最适转化条件下 DHEA 的分批转化动力学曲线

在已确定的最适转化条件下:葡萄糖 15 g/L,酵母粉 16 g/L,玉米浆 8 g/L, MgSO₄ 0.1 g/L,初始 pH 6.5,突变菌株 M-10 的转化动力学曲线如图4所示。采用最优转化培养基培养 24 h 之后投

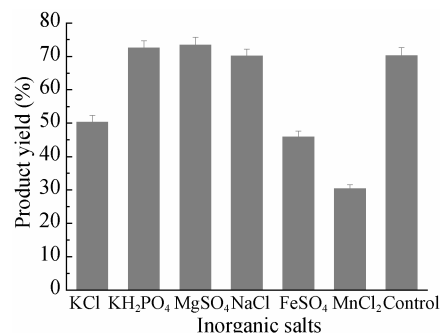


图2 不同无机盐种类对产物得率的影响

Fig. 2 Effects of different inorganic salts on product yield.

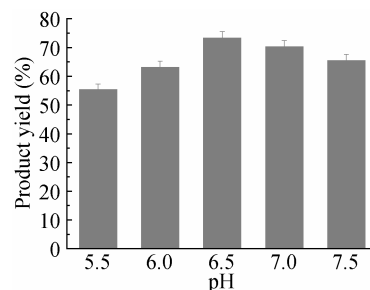


图3 不同 pH 对产物得率的影响

Fig. 3 Effects of different pH on product yield.

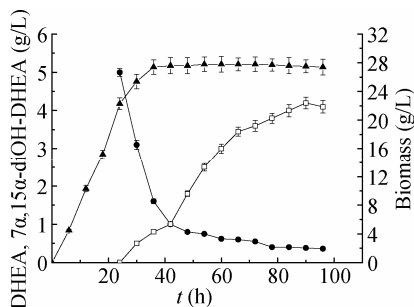


图4 突变菌株 M-10 的分批转化动力学曲线

Fig. 4 Time course of batch conversion process with *G. intermedia* M-10. (▲) Biomass, (●) DHEA, (□) $7\alpha,15\alpha$ -diOH-DHEA.

入 5 g/L 底物 DHEA, 转化至 96 h 时产物浓度达到 (4.2 ± 0.15) g/L, 摩尔产物得率提高到 75.6%, 较原始菌株提高了 31.3%。

3 结论

以 *G. intermedia* CA3-1 为出发菌株, 经 NTG 诱变结合酮康唑抗性平板筛选, 获得一株高效转化 DHEA 的突变菌株 M-10。突变株生产 $7\alpha,15\alpha$ -diOH-DHEA 的能力得到明显提高, 当底物初始投料浓度为 5 g/L 时, 产物摩尔得率由原来的 57.6% 提高到 70.2%。经过条件优化, 确定了最适的转化工艺, 使产物质量浓度提高到 (4.2 ± 0.15) g/L, 产物摩尔得率达到 75.6%, 较原始菌株提高了 31.3%。

REFERENCES

- [1] Kolek T, Milecka N, Swizdor A, et al. Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7α as well as 7β -hydroxylations of 5-ene substrates. *Org Biomol Chem*, 2011, 9(15): 5414–5422.
- [2] Andryushina VA, Druzhinina AV, Yaderets VV, et al. Hydroxylation of steroids by *Curvularia lunata* mycelium in the presence of methyl- β -cyclodextrine. *Appl Biochem Microbiol*, 2011, 47(1): 42–48.
- [3] Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(6): 1423–1447.
- [4] Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol*, 2006, 25(2): 66–73.
- [5] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Tech*, 2003, 32(6): 688–705.
- [6] Marques MPC, Carvalho F, de Carvalho CCCR, et al. Steroid bioconversion: towards green processes. *Food Bioprod Process*, 2010, 88(1): 12–20.
- [7] Lobastova TG, Gulevskaya SA, Sukhodolskaya GV, et al. Dihydroxylation of dehydroepiandrosterone in positions 7α and 15α by mycelial fungi. *Appl Biochem Microbiol*, 2009, 45(6): 617–622.
- [8] Romano A, Romano D, Ragg E, et al. Steroid hydroxylations with *Botryodiplodia malorum* and *Colletotrichum lini*. *Steroids*, 2006, 71(6): 429–434.
- [9] Chen FL, Fang GZ, Xu SY. Composition of method of *Aspergillus* mutant. *Food Res Dev*, 2009, 30(6): 24–16 (in Chinese).
陈凤莲, 方桂珍, 许世玉. 黑曲霉诱变方法比较研究. *食品研究与开发*, 2009, 30(6): 24–26.
- [10] Donova MV, Gulevskaya SA, Dovbnaya DV. *Mycobacterium* sp. mutant strain producing 9α -hydroxyandrostenedione from sitosterol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(5): 671–678.
- [11] Ma Y, Xu Q, Duan R, et al. Effect of surfactants on dihydroxylation efficiency from dehydroepiandrosterone by *Gibberella intermedia* CA3-1. *J Jiangnan Univ: Natl Sci Ed*, 2013, 12(6): 706–710 (in Chinese).
马洋, 徐起, 段然, 等. 表面活性剂对赤霉菌双羟化去氢表雄酮的影响. *江南大学学报: 自然科学版*, 2013, 12(6): 706–710.
- [12] Egorova OV, Gulevskaya SA, Puntus IF, et al. Production of androstenedione using mutants of *Mycobacterium* sp.. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, 77(2): 141–147.
- [13] Lu WY, Chen BC, Guo YW, et al. Ketoconazole resistance mutation—a study on the breeding of steroids 11β -hydroxylation strain-*Curvularia lunata*. *Microbiol China*, 2003, 30(6): 26–29 (in Chinese).
卢文玉, 陈伴成, 郭亚文, 等. 氢化可的松高产菌株新月弯孢霉的选育. *微生物学通报*, 2003, 30(6): 26–29.
- [14] Shang K, Hu HF, Zhu BQ. Synthesis of $7\alpha,15\alpha$ -dihydroxyandrostenolone by microbial transformation. *Chin Acad Med Mag Org*, 2004 (2): 30–34 (in Chinese).
尚珂, 胡海峰, 朱宝泉. 微生物转化法合成 $7\alpha,15\alpha$ -二羟基雄烯醇酮. *中国医学生物技术应用杂志*, 2004 (2): 30–34.
- [15] Wang M, Guo YW, Lu WY, et al. Breeding of high hydrocortisone transforming strains and their optimal fermentation conditions. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, 10(5): 663–666 (in Chinese).
王敏, 郭亚文, 卢文玉, 等. 氢化可的松高转化菌株的选育及其发酵条件. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(5): 663–666.

(本文责编 陈宏宇)