

黑曲霉催化雄甾-4-烯-3,17-二酮 16 β -羟基化

葛枳江¹, 毛淑红², 李宴清³, 刘晓光², 路福平²

1 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457

3 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

葛枳江, 毛淑红, 李宴清, 等. 黑曲霉催化雄甾-4-烯-3,17-二酮 16 β -羟基化. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1481-1485.

Ge ZJ, Mao SH, Li YQ, et al. 16 β -hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione by *Aspergillus niger*. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1481-1485.

摘要: 为进一步确定黑曲霉菌株 TCCC41650 的生物转化能力, 以雄甾-4-烯-3,17-二酮 (Androstenedione) 为底物, 利用黑曲霉菌株 TCCC41650 进行催化, 产物经纯化、重结晶后, 通过单晶衍射鉴定为 16 β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。转化条件为: 培养液 pH 6.0, 乙醇添加量为 2%, 投料浓度为 1% 时, 72 h 转化率为 85.8%。目前甾体研究领域对于 C₁₆ β -羟基化的微生物转化未见报道, 研究结果为 C₁₆ β -羟基甾体药物的研发奠定了基础。

关键词: 黑曲霉, 16 β -羟基化, 雄甾-4-烯-3,17-二酮

16 β -hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione by *Aspergillus niger*

Zhijiang Ge¹, Shuhong Mao², Yanqing Li³, Xiaoguang Liu², and Fuping Lu²

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China

3 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: In order to discover the steroid biotransformation ability of filamentous fungus *Aspergillus niger* TCCC41650, we studied the fermentation of 4-androstene-3,17-dione with *A. niger* TCCC41650. The transformation product was purified, crystallized and determined as 16 β -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione by X-ray single crystal diffraction method. The best fermentation condition was found to be pH 6.0, ethanol amount 2% with a substrate concentration of 1%, the transformation rate is 85.81% after 72 h. Based on the best of our knowledge, 16 β -hydroxylation rarely occurs in microbial transformations of steroid.

Received: November 1, 2013; **Accepted:** January 23, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21206127).

Corresponding author: Fuping Lu. Tel: +86-22-60600160; Fax: +86-22-60600156; E-mail: lfp@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21206127) 资助。

This study laid the foundation for the research of 16 β -hydroxylation steroids.

Keywords: *Aspergillus niger*, 16 β -hydroxylation, 4-Androstene-3,17-dione

甾体药物广泛应用于抗炎、抗毒、抗过敏和抗休克等^[1],目前工业上甾体转化多采用化学合成方法,往往反应步骤多、收率低^[2],如某些 C₁₁ α -羟基化^[3],至少需要 9 步化学反应,而微生物转化仅需一步即可在 C₁₁ α 位上引入羟基。相比之下,利用微生物对甾体化合物进行修饰,具有转化率高、反应条件温和、能耗低等优点^[4]。因此,近年来甾体生物转化受到人们的广泛关注。

雄甾-4-烯-3,17-二酮(简称 4AD),是非常重要的甾体药物中间体^[5],通过在母核上引入羟基可大大增强其抗炎活性。至今已报道 4AD 微生物转化产物有:14 α -羟基雄甾-4,6-双烯-3-酮^[6-7]、17 β -羟基雄甾-4-烯-3-酮^[8-9]、6 β ,11 α -二羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮^[10]、11 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮^[11-13]、6 β ,14 α -二羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮^[14-15]、9 α -羟基-4-雄甾烯-3,17-二酮^[16-17]等。其中 11 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮可用于制备高血压和心力衰竭等疾病的特效药^[18];9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮可以合成高效抗炎活性药物^[16]。

如今国内外对于甾体微生物催化的研究不断深入。至今已报道的具有甾体生物催化活性的微生物多达 1 500 多种^[19],然而能成功应用工业生产的菌株不多。因此,新型菌株的筛选对于现有甾体生物催化效率的提高和对具有药理学活性的新型甾体药物或中间体的发掘至关重要。本论文用黑曲霉转化 4AD 得到一种新型羟基化产物 16 β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。目前甾体研究领域对于 C₁₆ β -羟基化的生物转化反应还未见报道。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌种:黑曲霉 (*Aspergillus niger* TCCC41650)

由天津科技大学工业微生物菌种保藏中心保藏。

菌株以土豆汁琼脂斜面保存。液体培养基组成为 (g/L):葡萄糖 20,酵母膏 20,蛋白胨 20,pH 6.0,250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基,121 °C 湿热灭菌 20 min。

1.2 培养与转化

取土豆汁斜面上生长好的黑曲霉用无菌水洗下其孢子,然后接到盛有培养基的三角瓶中,28 °C、180 r/min 培养 12 h,以 8% (V/V) 接种量移入新鲜培养基,培养 12 h 后投加预先用乙醇溶解的底物(最终投料浓度为 1%,乙醇添加量为 2%),继续在相同培养条件下生物转化 72 h。

1.3 分析方法

产物转化率的测定采用 HPLC 法。取 0.6 mL 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取,取 200 μ L 有机相挥干,加入 1 mL 乙腈溶解后经 0.22 μ m 膜过滤。色谱条件:C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈:水为 70:30 (V/V),流速 0.8 mL/min,柱温 25 °C;UV 240 nm 检测。

1.4 产物提取及分离纯化

投料 72 h 后底物基本转化完全,菌体与发酵液抽滤分离,滤饼用适量乙酸乙酯萃取 3 次,滤液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,有机相使用旋转蒸发仪浓缩,再通过硅胶柱层析,洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯 (V/V=1),从而得到比较纯的产物,最后通过重结晶得到单晶。

2 结果与讨论

2.1 16 β -羟基-4-雄甾烯-3,17-二酮的鉴定

在上述条件下进行 2 L 发酵,底物总投加量 2 g,转化 72 h 后合并所有发酵液,HPLC 检测转

化率达到 81.4%。发酵液经萃取旋蒸浓缩后共得到 2.73 g 提取物,提取物的质量大于底物质量,可能萃取过程中同时萃取出了一些色素等杂质。经硅胶柱层析分离得到 1.47 g 产物,产品收率为 72.5%。产物重结晶后,通过单晶衍射得知该羟基化产物为 16 β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮,单晶数据已经提交至剑桥晶体数据库 (<http://www.ccdc.cam.ac.uk>) 中,晶体编号为 CCDC 967635,晶体结构见图 1,该晶体在国内外均未有文献报道。

晶体数据如下: $C_{19}H_{26}O_3$, 分子质量为 302.40, 晶体尺寸为 $0.18 \text{ mm} \times 0.17 \text{ mm} \times 0.16 \text{ mm}$, 属正交系, 空间群为 $P2(1)2(1)2$, 晶胞参数 $a=0.98 \text{ nm}$, $b=2.12 \text{ nm}$, $c=0.78 \text{ nm}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma=90^\circ$,

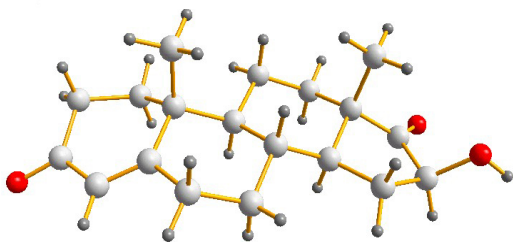


图 1 16 β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的晶体结构
Fig. 1 X-ray crystal structure of 16 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione.

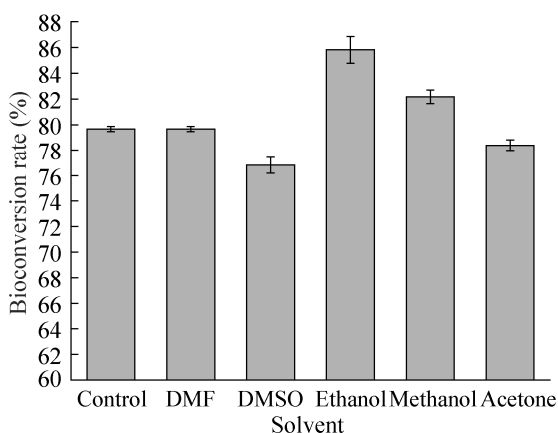


图 2 不同促溶剂对底物转化率的影响
Fig. 2 Effect of different solvent on the bioconversion rate of the substrate.

晶胞内分子数 $V=1.63 \text{ nm}^3$, 晶胞体积 $Z=4$, 晶体计算密度 $D_{\text{calcd}}=1.250 \text{ mg/m}^3$, 晶体测量温度为 $173(2)\text{K}$, 吸收系数为 0.084 mm^{-1} , 共收集到独立衍射点 8 397 个, 结构偏离因子 $R_1=0.045 4$, $wR_2=0.093 0$, $R_1=0.063 7$, $wR_2=0.101 0$ 。

2.2 转化条件对底物转化率的影响

2.2.1 初始 pH 值对底物转化率的影响

微生物生长发育以及酶催化反应过程中,随着营养物质的消耗和代谢产物的产生,培养基的 pH 值也会发生一定的变化,从而影响菌体生长以及酶催化能力。用不同的初始 pH 条件进行实验,观察到 pH 值为 6 时转化率最高,达到 79.7%。初始 pH 值低于或高于 6 时转化率都低于 75%。由此确定 pH 6 为最佳初始 pH 条件。

2.2.2 不同促溶剂对底物转化率的影响

甾体化合物在水溶液中的溶解度一般很低,很大程度上降低了生物转化催化效率。为增加甾体底物的溶解性,选取常见的几种与水互溶的有机溶剂作为促溶剂,二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO)、丙酮、甲醇和乙醇,添加量均为 2%,由图 2 可知, DMSO 和丙酮会抑制酶催化作用,而添加乙醇 (转化率达到 85.8%) 和甲醇 (转化率达到 82.2%) 能够促进转化,考虑到乙醇价格便宜且毒性较低,选择乙醇作为促溶剂。

2.2.3 乙醇添加量对底物转化率的影响

在确定乙醇为促溶剂后,再次确定其添加量。向培养基中添加不同浓度梯度的乙醇时发现:添加量为 2% 时转化率最高,达到 85.8%;乙醇浓度 1% 时转化率提高不明显,而乙醇浓度高于 2% 时转化率明显降低 (低于 85%)。过多的有机溶剂会对菌体产生毒性,影响酶催化活性。

2.2.4 投料浓度对底物转化率的影响

甾体化合物对菌体的毒性是制约投料浓度的另一个重要原因,投料浓度过大会抑制菌体生长,导致转化效率低下造成原料浪费。如图 3 所示,

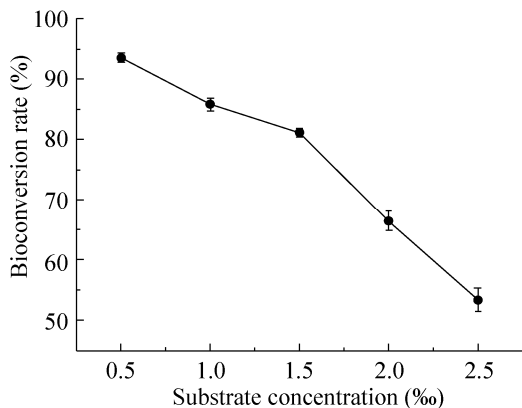


图3 投料浓度对底物转化率的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration on the bioconversion rate of the substrate.

随着底物浓度的增加, 转化率呈现下降趋势, 特别当投料浓度大于1.5%后, 转化率降低更加明显。综合考虑转化率和转化效率, 确定1% (转化率85.8%) 为最佳投料浓度。

微生物对甾体的 $C_{16}\alpha$ -羟基化作用是皮质甾体类药物合成中一个非常重要的反应^[20]。在甾体母核上导入 $C_{16}\alpha$ 羟基后, 可以减少电解质的影响, 而抗炎及糖代谢作用仍保持不变^[21]。但是利用黑曲霉 $C_{16}\beta$ 位的羟基化至今还没有相关报道。

在目前的条件下, 该黑曲霉的转化效率还比较低, 还需继续优化该羟基化反应的最适发酵条件及转化工艺。此外, 对于 16β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的药理活性也需进一步研究。

3 结语

本实验发现黑曲霉对4AD具有特异性 $C_{16}\beta$ -羟基化生物催化活性, 并初步优化该黑曲霉进行 $C_{16}\beta$ -羟基化的最佳转化条件。所获得的转化产物 16β -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮, 在国内、外还未见文献报道。本论文研究为甾体 $C_{16}\beta$ 位羟基相关药物的研发奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] Fan SY, Wei W, Wang FQ, et al. Cloning, heterologous expression and purification of a 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase (KSH) from *Mycobacterium* sp. NwIB-01. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 2014–2021 (in Chinese).
范书玥, 魏巍, 王凤清, 等. 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因的克隆、异源表达及分离纯化. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 2014–2021.
- [2] Hu XY, Cui L, Feng K. Optimization of fermentation medium for 11 α -hydroxylation of steroid catalyzed by *Rhizopus nigricans* RN-M246. *Chem Bioeng*, 2012, 29(6): 77–79 (in Chinese).
胡曦予, 崔励, 冯魁. 黑根霉 RN-M246 催化甾体的 11 α -羟基化培养基研究. *化学与生物工程*, 2012, 29(6): 77–79.
- [3] Farooq A, Hanson JR, Iqbal Z. Hydroxylation of progesterone by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 1994, 37(3): 723–726.
- [4] Wang J, Guan YX, Wang HQ, et al. Hydroxylation of 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnen-3,20-dione by *Absidia coerulea* with Pseudo-crystallo Feed. *Chin J Biotech*, 2006, 22(4): 662–666 (in Chinese).
王嘉, 关怡新, 王海清, 等. 拟结晶投料环氧黄体酮犁头霉羟化过程研究. *生物工程学报*, 2006, 22(4): 662–666.
- [5] Zhang XY, Ruan H, He GQ. Advances in microbial transformation of phytosterols to androstenedione. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2012, 12(7): 162–170 (in Chinese).
张小燕, 阮晖, 何国庆. 微生物降解植物甾醇侧链生产雄甾烯二酮的研究进展. *中国食品学报*, 2012, 12(7): 162–170.
- [6] Hu SH, Genain G, Azerad R. Microbial transformation of steroids: contribution to 14 α -hydroxylations. *Steroids*, 1995, 60(4): 337–352.
- [7] Tomasz J, Jadwiga DG, Edyta KS, et al. Biotransformations of steroid compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651. *Steroids*, 2009, 74(8): 657–661.

- [8] Fernandes M, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32(6): 688–705.
- [9] Faramarzi MA, Badiie M, Yazdi MT. Formation of hydroxysteroid derivatives from androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 50(1): 7–12.
- [10] Xiong Z, Wei Q, Chen H, et al. Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. *Steroids*, 2006, 71(11): 979–983.
- [11] Ahmed F, Williams RAD, Smith KE. Microbial transformations of steroids—X. Cytochromes P-450 11 α -hydroxylase and C17–C20 lyase and a 1-ene dehydrogenase transform steroids in *Nectria haematococca*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996, 58(3): 337–349.
- [12] Choudhary MI, Sultanl S, Khan MTH, et al. Biotransformation of (+)-androst-4-ene-3,17-dione. *Nat Prod Res*, 2004, 18(6): 529–535.
- [13] Koshimura M, Utsukihara T, Hara A, et al. Hydroxylation of steroid compounds by *Gelasinospora retispora*. *J Mol Catal B-Enzym*, 2010, 67(1): 72–77.
- [14] Hanson JR, Nasir H, Pervez A. The hydroxylation of testosterone and some derivatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 411–415.
- [15] Schaaaf O, Dettner K. Transformation of steroids by *Bacillus* strains isolated from the foregut of water beetles (Coleoptera: Dytiscidae): I. Metabolism of androst-4-en-3,17-dione (AD). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998, 67(5): 451–465.
- [16] Donova MV, Gulevskaya SA, Dovbnaya DV, et al. *Mycobaeterium* sp. mutant strain producing 9 α -hydroxylandrostenedione from sitosterol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(5): 671–678.
- [17] Faramarzi MA, Aghelnejad M, Yazdi MT, et al. Metabolism of androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Steroids*, 2008, 73(1): 13–18.
- [18] Davis KL, Nappi JM. The cardiovascular effects of eplerenone, a selective aldosterone-receptor antagonist. *Clin Ther*, 2003, 25(11): 2647–2668.
- [19] Bhatti HN, Khera RA. Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids*, 2012, 77(12): 1267–1290.
- [20] Zhang WQ, Cui L, Zheng GL, et al. Transformation condition optimization of 16 α -hydroxylation of prednisolone by *Streptomyces roseochromogenes*. *Biotechnology*, 2012, 22(3): 81–86 (in Chinese). 张文权, 崔励, 郑桂兰, 等. 生物转化法合成 16 α -羟基泼尼松龙的发酵工艺研究. *生物技术*, 2012, 22(3): 81–86.
- [21] Joseph JG, Leland LS. 16 α -hydroxy steroids XI.2 β - and 16 α -hydroxylation of 9 α -fluorohydrocortisone by strains of *streptomyces roseochromogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1961, 9(5): 372–375.

(本文责编 陈宏宇)