

微生物转化雄甾-4-烯-3,17-双酮的菌种筛选 和转化条件的初步研究*

魏琦¹ 熊志刚² 冀志霞¹ 陈守文^{1**} 胡先明²

(农业微生物学国家重点实验室 华中农业大学 武汉 430070) (武汉大学药学院 武汉大学 武汉 430072)

摘要 雄甾-4-烯-3,17-双酮(简称4AD)是甾体药物的重要中间产物,其11 α 羟化产物可制成治疗心血管疾病的药物。通过对30株不同种属真菌转化4AD能力的筛选,获得球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) QY₂A对4AD有高效C11 α 羟化能力,得到目标产物C11 α -羟基雄甾-3,17-双酮(简称11 α -OH-4AD)。另对该菌株的转化条件进行优化,结果表明:初始pH值6.0,温度28℃,转速180r/min,转化时间60h,助溶剂甲醇终浓度和底物浓度分别为2.5%和2.5g/L时,11 α -OH-4AD的转化率为65%,比未优化的转化率提高了51.2%。

关键词 微生物羟化 雄甾-4-烯-3,17-双酮 筛选 球孢白僵菌 转化条件优化

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1134-04

Microbial Hydroxylation of Androst-4-ene-3,17-dione I Screening of Strains and Study of the Transformation Conditions*

WEI Qi¹ XIONG Zhi-Gang² JI Zhi-Xia¹ CHEN Shou-Wen^{1**} HU Xian-Ming²

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: Microbial hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione(4AD) was investigated in this study. The hydroxylated product of 4AD, 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione(11 α -OH-4AD) is valuable intermediate in the synthesis of pharmaceuticals. 30 different species and strains of fungi were screened for their biotransformation ability. It was found that *Beauveria bassiana* QY₂A strain significantly showed the high 11 α -hydroxyalate efficiency and transformate 4AD to the target product 11 α -OH-4AD which had been purified and identified. The hydroxylation condition of 4AD by *B. bassiana* QY₂A was studied. The optimum transformation conditions were obtained: the initial pH value of 6.0, temperature 28℃, 180r/min, the transformation time 60h, the concentration of solution and substrate were 2.5% and 2.5g/L respectively. Then the conversion yield of 11 α -OH-4AD was 65%, increased by 51.2%.

Key words: Microbial hydroxylation, Androst-4-ene-3,17-dione, Screening, *Beauveria bassiana*, Optimum conditions

甾体化合物雄甾-4-烯-3,17-双酮(androst-4-ene-3,17-dione,简称4AD)是制造甾体激素类药物合成的关键中间物质之一^[1]。4AD的微生物羟化是当前热门研究,其产物可应用于临床作为利尿剂、避孕药、抗炎症和心血管药物^[2]。

目前国外对4AD的研究主要在利用不同微生物对其转化反应的研究,其中真菌转化甾体化合物的能力很强。据文献报道,4AD能被红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[3],新月弯孢霉(*Curvularia*

lunata)^[4],大刀镰孢(*Fusarium culmorum*)^[5]和点青霉(*Penicillium notatum*)^[6]转化,产物有C6 β -、C9 α -、C14 α -、C11-、C14 α -、C15 α -羟化衍生物和17 β -双羟化衍生物。而国内生物催化法生产11 α -OH-4AD的研究未见公开报道,大部分研究工作都集中在利用微生物降解植物甾醇制备4AD^[1]。

本研究从实验室保存的真菌中筛选出一株球孢白僵菌QY₂A对4AD有高效专一的C11 α 位羟化能力,产物结构已鉴定^[7]。进一步对该菌株定向羟化

* 湖北省科技攻关重点课题(2006AA201B33)资助

** Tel:13317184391, E-mail: chenshouwen@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2007-04-02,修回日期:2007-06-26

条件进行优化,为微生物转化制备 11 α -OH-4AD 的工业化生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种与试剂

球孢白僵菌 16 株,黑曲霉(*Aspergillus niger*) 棒曲霉(*Aspergillus clavatus*) 8 株,烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) 1 株,米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 2 株,木霉(*Trichoderma aureoviride*),杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*),黄曲霉(*Aspergillus flavus*)各 1 株,均为本实验室保存,共计 30 株。

PDA 培养基:1000mL 培养基,土豆 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,pH 自然。

将菌种接入斜面,28℃~30℃培养箱中培养 7~9d,待孢子长出置 4℃冷藏。

雄甾-4-烯-3,17-双酮(androster-4-ene-3,17-dione)为武汉大学药学院提供,纯度大于 99%;其他化学试剂均为市售分析纯。

1.2 转化条件

取斜面霉菌孢子,接到液体转化培养基中,160r/min,28℃~30℃,振荡 24h,再以 10%(V/V)的接种量转入新鲜液体转化培养基,待菌丝生长好后(约 38h~48h),投加用无水乙醇预处理过的底物,溶剂和底物终浓度分别为 2.0%(V/V)和 2.5g/L,160r/min,28℃转化 72h。选溶剂乙酸乙酯,按发酵液体积 1:1 加入离心后的发酵上清液(8000r/min,10min)抽提,取抽提液进行分析实验。

转化培养基:葡萄糖 3%,玉米浆 2%,K₂HPO₄·3H₂O 0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·2H₂O 0.002%,pH 6.5,1×10⁵Pa 灭菌 20min。

菌丝体干重测定:转化培养后的发酵液离心(8000r/min,10min),菌丝体用清水洗涤 3 次,80℃烘箱烘干至恒重。空白转化培养基作对照,以(样品干重-空白干重)为菌丝体干重。

1.3 转化产物的分析方法

1.3.1 TLC:青岛海洋化工的硅胶薄层层析板 GF254,薄板在 105℃活化备用。展开液为氯仿:甲醇(12:1,V/V)。显色液为硫酸:乙醇(1:10,V/V),105℃加热 3min 后,观察斑点。

1.3.2 分析型 HPLC 色谱条件:色谱柱:十八烷基硅烷键合反相色谱柱(ODS A.6mm×250mm,大连依

利特科学仪器有限公司);流动相:甲醇:水(40:60,V/V);进样量 5 μ L;流速:1mL/min;柱温 25℃;检测波长 240nm。转化率(%) $\frac{m_p}{m_s} = \frac{A_p}{A_s} \times \lambda$, λ 为产物和底物的峰面积校正因子的比值,计算得到校正因子

$\lambda = 1.04$ 。 m_p :转化产物浓度(g/L); m_s :投加底物浓度(g/L); A_p :转化产物峰面积; A_s :投加底物峰面积。

1.3.3 结构鉴定方法:将处理后的上清液用乙酸乙酯萃取 3 次,再置旋转蒸发器减压浓缩除去溶剂,经乙醇重结晶后经过熔点,红外,紫外,NMR 和质谱分析结构^[7]。

1.4 培养基初始 pH 值对转化率的影响

转化条件除初始 pH 值不同外,其他同 1.2。分别将转化培养基的初始 pH 值用 1mol/L 的 NaOH 调至 5.5、6.0、6.5、7.0 或 7.5,考察初始 pH 值对转化率的影响。

1.5 转化温度对转化率的影响

转化条件除转化温度不同外,其他同 1.2。转化反应分别在 25℃、28℃、30℃和 37℃进行,考察转化温度对转化率的影响。

1.6 转速对转化率的影响

转化条件除转化转速不同外,其他同 1.2。转化反应分别在 140r/min、160r/min、180r/min 或 200r/min 完成,考察转速对转化率的影响。

1.7 转化时间对转化率的影响

转化条件同 1.2,在投加底物 4AD 转化后,分别在 36h、48h、60h、72h 以及 84h 取样 5mL 分析,考察转化时间对转化率的影响。

1.8 底物溶解程度对转化率的影响

包括助溶剂种类和助溶剂浓度的选择。其他转化条件同 1.2,以 Tween80 处理底物为对照,考察助溶剂分别为甲醇、乙醇、丙酮、DMSO 时处理底物(溶剂终浓度 2.0%,底物终浓度 2.5g/L)对转化率的影响。选择优化之后的助溶剂,将其终浓度调为 2.0%、2.5%、3.0%、4.0%,考察助溶剂浓度对转化率的影响。然后在选择的助溶剂浓度条件下,考察底物终浓度为 1.5g/L、2.5g/L、5.0g/L 时的转化率。

1.9 对转化工艺的优化确证

按照由单因素实验确定的初始 pH 值、温度、转速、转化时间、助溶剂类型及助溶剂浓度和底物浓度等工艺条件,确证转化工艺的优化。

以上实验的转化率均为 3 次实验的平均值。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

以 4AD 为外源底物,用待筛微生物进行转化反应,处理的抽提液用 TLC 进行初筛。初筛模型是以出现除底物 4AD 以外的斑点,则视作对 4AD 有转化能力。结果显示,待筛的真菌中有 8 株球孢白僵菌和 1 株烟曲霉对 4AD 有转化能力。将转化后的发酵液分离提取得到白色结晶物质,产物之一经鉴定为 $11\alpha\text{-OH-4AD}$ ^[7]。

将初筛选出的真菌进行复筛实验,以目标产物 $11\alpha\text{-OH-4AD}$ 的转化率为复筛模型,结果见表 1。筛选得到球孢白僵菌 QY₂A 转化 4AD 为 $11\alpha\text{-OH-4AD}$ 的转化率相对最高。

表 1 待筛菌株转化 4AD 的转化率^a

编号	转化率(%)
<i>B. bassiana</i> SC-2	13.56
<i>B. bassiana</i> SC-4	4.08
<i>B. bassiana</i> SC-9	12.27
<i>B. bassiana</i> CDX94	14.32
<i>B. bassiana</i> CB	18.26
<i>B. bassiana</i> DYT	7.68
<i>B. bassiana</i> DX	12.39
<i>B. bassiana</i> QY ₂ A	43.05
<i>A. fumigatu</i> M98	2.37

a. 其他菌株的转化产物中没有 $11\alpha\text{-OH-4AD}$,表中未列出。

2.2 球孢白僵菌 QY₂A 的微生物转化条件的研究

通过对转化条件的控制来提高转化产物的专一性和转化率,本实验进一步对该菌株定向羟化条件进行研究优化。

2.2.1 初始 pH 值对转化率的影响 转化培养基在 pH 值为 5.5 ~ 7.5 的范围内,我们观察到转化率呈现波动性的变化,结果见图 1。培养及转化过程初期,由于细胞的代谢产生酸性物质,使得培养基 pH 下降,pH5.0 ~ 6.0 即酸性环境对生长有利,但过酸的环境也可能对羟化反应不利。实验证明培养基的初始 pH 在 6.0 左右变动时利于球孢白僵菌 QY₂A 生长,测得的菌丝体干重量最大(见图 1),而且催化羟化反应的 C11 α 位羟化酶的催化活力最高,对底物的羟化反应速率大,转化率相应最大。

2.2.2 温度对转化率的影响 温度对转化率的影响

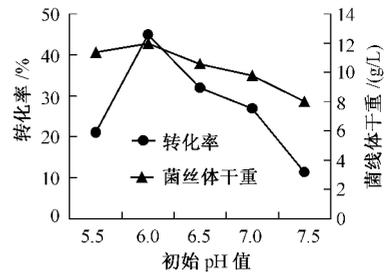


图 1 初始 pH 值对 $11\alpha\text{-OH-4AD}$ 转化率的影响

如图 2 所示。在对不同温度培养的菌体形态观察中发现,在 25℃ 时菌体生长缓慢,镜检观察菌丝体小,转化率低,在 28℃ ~ 30℃ 时菌体生长正常,转化率较高,而 37℃ 时菌体不生长,也检测不到转化反应。推测不同温度培养菌体,对菌体生长状况,菌丝体形态大小有影响,进而影响转化反应,并且实验表明转化反应的温度在 28℃ 时最适宜。

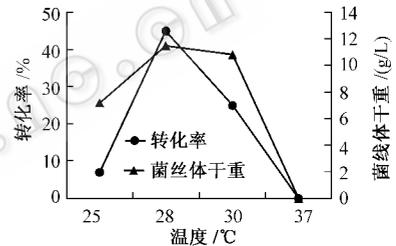
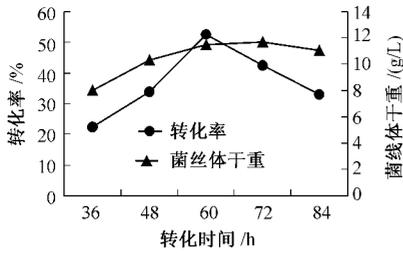


图 2 温度对 $11\alpha\text{-OH-4AD}$ 转化率的影响

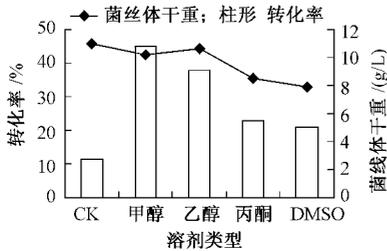
2.2.3 转速对转化率的影响 催化反应的研究表明,反应的溶氧非常重要^[9],实验通过转速来研究溶氧对转化率的影响,结果显示当转速为 140r/min 或 200r/min 都不利于转化反应的发生,转化产物检测不到,当转化反应的转速为 160r/min 和 180 r/min 时,转化率分别为 32% 和 42%,所以当转速为 180r/min,最适宜转化反应。

2.2.4 转化时间对转化率的影响 在投加底物 4AD 转化后,分别在不同时间间隔测定转化率(结果见图 3)。通过不同取样时间的考察过程中,发现随着培养时间的延长, $11\alpha\text{-OH-4AD}$ 的得率以培养 60h 取样最高,而 60h 以后,反而降低。不同转化时间取样测菌丝干重时发现,36 ~ 60h 菌体生长加快,转化率提高,而在 60 ~ 84h,菌体增长幅度减小,长势减弱,而转化率也降低。

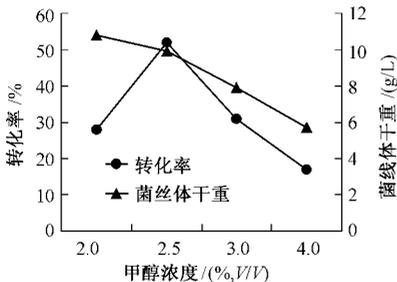
2.2.5 底物溶解程度对转化率的影响 本实验从助溶剂种类、浓度和底物终浓度三方面考察底物溶解性对转化率的影响。对菌体微生物转化工艺的研究中,指出了菌体化合物是亲脂性的,催化反应在水相

图3 转化时间对 11 α -OH-4AD 转化率的影响

中进行,底物溶解对转化率的影响很大,运用了超声处理,磁化水处理等方法,改善底物的溶解性有利于转化率的提高,但实际生产多以有机溶剂为主^[9]。从图4看出,以甲醇配制底物溶液加入,产物的转化率相对最高,而且对菌体生长影响较小。

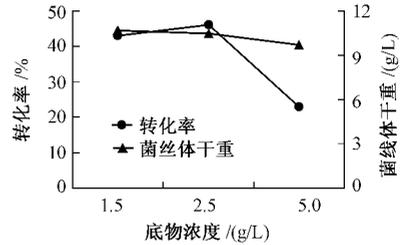
图4 溶剂类型对 11 α -OH-4AD 转化率的影响

将助溶剂甲醇调至不同终浓度,转化60h后终止反应,用HPLC检测对转化率的影响,结果见图5。结果表明在溶剂浓度为2.5%时,转化率最大,而提高溶剂浓度反而转化率降低。这种现象可以解释为:甾体化合物的羟化反应效率与底物的水相溶解度有关,有机溶剂有助于底物在水相的溶解,但对菌体生长有毒害,溶剂浓度的过量增加不利菌体生长,对转化反应也有一定抑制作用。

图5 甲醇浓度对 11 α -OH-4AD 转化率的影响

研究底物浓度的影响要考虑到底物在助溶剂中的溶解性,我们选用毒害量较小的溶剂浓度2.5%,通过溶解实验发现当底物浓度超过5.0g/L,底物的溶解度很小,转化率也很低。可能底物浓度过高抑制了羟化反应。因此结合底物溶解性,选用底物浓

度为1.5g/L,2.5g/L,5.0g/L进行考察(见图6)。结果显示当底物浓度为1.5g/L,2.5g/L时转化率差别不大,而5.0g/L时转化率最低,底物浓度变化对菌体生长影响不大。

图6 底物浓度对 11 α -OH-4AD 转化率的影响

2.2.6 转化工艺优化的确证:在以上单因子工艺优化试验基础上,确定微生物转化的工艺条件。选用甲醇做助溶剂,且甲醇终浓度和底物浓度分别为2.5%和2.5g/L,初始pH值为6.0,温度为28℃,转速180r/min,转化时间为60h时,得到产物11 α -OH-4AD的转化率为65%,比未优化工艺条件的转化率提高了51.2%。

3 结论

本实验筛选出的球孢白僵菌 QY₂A 对甾体化合物4AD有高效专一的C11 α 催化能力,有作为全细胞催化剂改造药物结构和药物微生物转化生产研究的重要价值。本实验通过工艺优化提高了转化率,为4AD羟化衍生物的工业化生产奠定了基础。有关球孢白僵菌 QY₂A 对4AD羟化反应中的底物溶解性的改善提高和机理问题还在进一步研究中。

参考文献

- [1] 杨英,姜绍通.微生物学通报,2006,33(6):142~145.
- [2] 叶丽,史济平.工业微生物,2001,31(4):40~47.
- [3] Mutafov S, Angelova B, Avramora T, et al. Process Biochemistry, 1997, 32(7):585~589.
- [4] Shuvalova S D, Gabiuskays K N, Popova E V, et al. Phar Chem Journal 2001, 35(5):279~281.
- [5] Teresa Kolek, Alina Sawizdor. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1998, 67(1):63~69.
- [6] Agnieszka Bartmanska, Jadwigwa Dmochowska-Gladysz, Ewa Huszozza. Steroids 2005, 70:193~198.
- [7] Xiong Z G, Wei Q, Chen H M, et al. Steroids 2006, 71:979~983.
- [8] Grogan G L, Holland H L. J Mol Catal B: Enzym 2000, 9:1~32.
- [9] 阳葵,李晓静,冯霞,等.微生物学通报,2001,28(6):68~71.