

赭曲霉转化甾体过程中色素的分析和控制

路福平 王 敏 杨灿宇 王昌禄 杜连祥

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

摘要: 通过对甾体 $C_{11}\alpha$ 羟基化菌株赭曲霉发酵液中色素的分离纯化, 得到一种砖红色的色素。经紫外-可见分光光度法、红外光谱法和核磁共振谱图分析, 证明该色素为苯醌类色素, 与初级代谢过程中的芳香族氨基酸有相同的代谢途径, 利用芳香族氨基酸的代谢模式, 在加有 2% 沃氏氧化物的发酵体系中添加 5mmol/L 的色氨酸, 或 5mmol/L 等体积的苯丙氨酸和酪氨酸混合液, 均能明显抑制发酵过程中色素的产生, 提高产物的收率。同时通过诱变选育的莽草酸缺陷型菌株发酵后, 甾体转化力均有所下降, 但发酵液不再产生砖红色色素, 进一步选育的抗碘乙酸突变株使甾体的转化率又恢复到原有水平。

关键词: $C_{11}\alpha$ 羟基化, 赭曲霉, 色素, 沃氏氧化物 (16 α , 17 α -环氧-4-孕烯-3, 20 二酮), 莽草酸缺陷

中图分类号: Q93-936 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-417-04

THE ANALYSIS AND CONTROL OF PIGMENT PRODUCED IN STEROID BIOCONVERSION BY *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

LU Fuping, WANG Min, YANG Canyu, WANG Changlu, DU Lianxiang

(Food Engineering Department, Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

Abstract: One orange-red pigment was purified from fermentation solution of steroid $C_{11}\alpha$ -hydroxylation by *Aspergillus ochraceus*. The spectrum of UV-VIS, IR and NMR show that the pigment belongs to the kind of benzquinone compound. The metabolic pathway of the pigment is the same as aromatic amino acids. According to the metabolic model of aromatic acids, tryptophan of 5mmol/L or the mixed phenylalanine and tyrosine (at same volume) of 5mmol/L was added in fermentation solution containing 2% 16 α , 17 α -epoxy-4-pregene-3, 20-dione, the production of pigment could be inhibited in the process of steroid conversion obviously. The shikimic acid auxotrophs derived by mutating original *Aspergillus ochraceus* were used to convert steroid, $C_{11}\alpha$ -hydroxylation activity of mutants decrease, but fermentation solution have not orange-red pigment. Then the auxotroph was mutated by UV-ray, one Acl-resistance strain with original conversion ratio was obtained.

Key words: $C_{11}\alpha$ -hydroxylation, *Aspergillus ochraceus*, Pigment, 16 α , 17 α -epoxy-4-pregene-3, 20-dione, Shikimic acid auxotroph.

甾体激素是仅次于抗生素的药物。生产过程中, 甾体母核的多个基团需要经过化学法和微生物来修饰, 其中利用微生物修饰的反应包括: $C_{11}\alpha$ 位脱氢、 C_{11}

位 α 羟基化和 C_{11} 位 β 羟基化等。 C_{11} 位 α 羟基化所用的

收稿日期: 1998-10-15, 修回日期: 1998-12-28

微生物主要有赭曲霉和黑根霉两种。但采用赭曲霉在发酵过程中往往会产生砖红色素而影响产物的分离提纯。因此分析色素的产生,并通过发酵优化菌种改良加以控制,有助于我国采用赭曲霉进行甾体激素 C_{11} 位 α 羟基化的生产。

1 材料与方法

1.1 菌种

赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*)

1.2 培养基

斜面培养基采用 PDA 培养基、霉菌基本培养基和完全培养基(PDA)见文献 [1]。

发酵培养基:葡萄糖 30g,玉米浆 25g,蚕蛹粉 3g,硫酸铵 1.6g,蒸馏水 1L, pH4.6。

1.3 色素的分离和纯化

发酵液煮沸,过滤取滤饼,加入 10 倍体积的丙酮,微火加热 20min,过滤收集滤液,加热浓缩 1 倍,经硅胶柱层析梯度洗脱分离并纯化,洗出的组分用硅胶 GF₂₅₄ 薄板层析检测,收集单一组分的砖红色素溶液,用旋转薄膜蒸发器浓缩,制得色素晶体。

1.4 色素的鉴定

1.4.1 紫外-可见光吸收图谱分析:色素样品用丙酮溶解,在 UV-VIS756MC 紫外-可见光谱仪测定其在 200nm~800nm 的图谱。

1.4.2 红外光谱分析^[2]:色素样品用氯仿溶解,涂于 KBr 盐片上,用 IR 435 型红外光谱仪检测待测样品的图谱。

1.4.3 核磁共振谱图分析^[2]:将砖红色素用 $CDCl_3$ 溶解,利用 JEOL JNM-PMX60SI 核磁共振谱仪测定样品,记录图谱并分析特征谱带。(工作参数: H_1 电平,1; 滤波 20Hz; 扫描宽度 0~600Hz; 扫描时间 250s; 参比 TMS)。

1.5 发酵液中色素含量的测定

用色素在最大吸收波长时的吸光度来表示。

2 结果与讨论

2.1 砖红色素的分离纯化

2.1.1 丙酮提取液中组分的分析:赭曲霉对甾体母核进行生物修饰的同时,所产生的色素和甾体化合物都为脂溶性物质,不易分离和提纯。因此,在试验过程中,直接取不加有底物的发酵液,用丙酮提取其中的色素,浓缩后,用于薄层层析。展开剂选用二氯甲烷-乙醚

(10:1)、氯仿-丙酮(9:1)和二氯甲烷-乙醇(10:1)3种溶媒,由于层析所用吸附剂为硅胶 CF_{254} ,因此分布于薄板上的物质可在紫外光下观察,以荧光斑点的面积表示被分离组分之间的含量之比。薄层层析结果如表 1 所示。

表1 不同洗脱系统分离色素的结果

洗脱系统	组分数	R_f / R_{f2}	组分1浓度/ 组分2浓度
二氯甲烷-乙醚(10:1)	2	0.48/0.25	80/20
氯仿-丙酮(9:1)	2	0.65/0.35	80/20
二氯甲烷-乙醇(10:1)	2	0.70/0.45	80/20

由表 1 可知,不同展开剂薄层层析后的结果说明丙酮提取液中含有两种组分,两者含量近似于 80/20。三种展开系统中,氯仿-丙酮(9:1)展开后两种物质的 R_f 值相差最大,分布也较为合理,适用于硅胶柱层析中洗脱组分的分析。

2.1.2 硅胶柱层析:硅胶柱层析采用四种洗脱液分段洗脱,四种溶液依次为 60mL 氯仿、30mL 氯仿-丙酮(9:1)、30mL 丙酮-氯仿(5:1)和 50mL 丙酮。洗脱过程中两种组分的分离效果用上述的薄层层析检测。结果发现洗脱液从 50mL 至 105mL 只含有组分 1(即砖红色素),收集该部分洗脱液,蒸干有机溶剂,得砖红色素。

2.2 砖红色素的结构分析

2.2.1 砖红色素的紫外可见光吸收谱图:砖红色素的紫外可见光吸收曲线如图 1 所示。

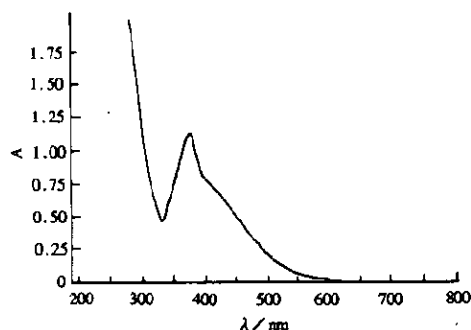


图1 色素的紫外可见光谱图

图 1 中所显示待测物最大吸收峰的波长是 395nm,红移现象明显,可能是由于分子结构中存在多个共轭双键或其它可以引起红移的取代基团而造成的,因此可初步认为该物质中含有上述这两种结构。

2.2.2 砖红色素的红外谱图: 红外谱图如图 2 所示, 光谱解析如下: $\sim 2962\text{cm}^{-1}$ 为 C-H 的不对称伸缩振动; $\sim 2872\text{cm}^{-1}$ 为 C-H 的对称伸缩振动; $\sim 1720\text{cm}^{-1}$ 为苯醌相应的谱带频率; $\sim 1680\text{--}1610\text{cm}^{-1}$ 强度较弱, 为不对称取代的 C = C 双键; $\sim 1460\text{cm}^{-1}$ 为 CH_3 的不对称变形振动; $\sim 1380\text{cm}^{-1}$ 为 CH_3 的对称变形振动。红外光谱结果表明, 色素为苯醌类有机物质, 环上存在甲基或亚甲基的取代。

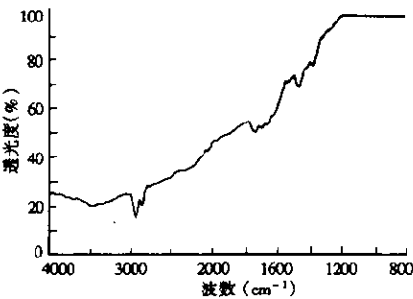


图2 色素的红外谱图

2.2.3 砖红色素的 ^1H 核磁共振谱图: 样品的 $60\text{MHz } ^1\text{H}$ 核磁共振谱图如图 3 所示。

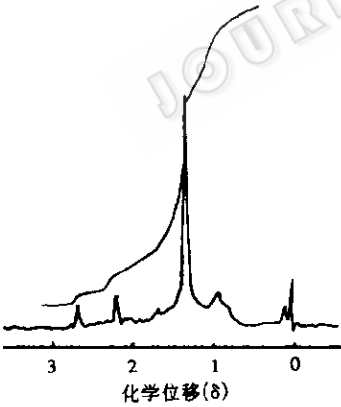


图3 色素的核磁共振谱图

解析其核磁共振图谱, 表明色素结构中存在三种氢原子, 第一种是 $(\text{CH}_3)_3\text{CY}$ 中的氢, 化学位移为 1.32; 第二种是苯环上甲基的氢, 化学位移为 2.23; 第三种是苯环上亚甲基中的氢, 化学位移为 2.66。积分面积分别为 18, 6, 4。根据每种基团中所含的氢原子数目, 可以推测分子中 $(\text{CH}_3)_3\text{CY}$ 、 CH_3 和 CH_2 所占的比例为 2:1:1。

由三种图谱可以初步推测该色素的分子结构可能是一类苯醌类物质。

2.3 发酵过程中色素的控制

精曲霉在液体摇瓶培养过程中所产色素是一类苯醌类物质, 其合成与初级代谢产物芳香族氨基酸的合成有着共同的途径, 代谢途径中的第一个调节酶 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合成酶 (DAHP 合成酶) 为整个代谢过程的关键酶, 它受苯丙氨酸和酪氨酸的协同反馈抑制, 受色氨酸的顺序反馈抑制^[3,4]。若抑制这一关键酶的活性, 可减少芳香族氨基酸的合成, 同时也会降低苯醌类色素的形成。因此试验中采用在发酵液中添加三种芳香族氨基酸来抑制 DAHP 酶活力。

2.3.1 三种芳香族氨基酸对发酵过程中色素产生的影响: 为使实验数据能指导生产试验, 采用二级摇瓶发酵, 种子培养 18h, 按 3% 接种量转入 100mL 发酵培养基中, 继续培养 24h, 添加 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mmol/L 五个水平的氨基酸 (色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸) 溶液, 同时加入 2% 的沃氏氧化物, 继续培养 48h 后, 用紫外分光光度法测定色素在波长 395nm 时的吸光度, 以判断色素的产生情况。并检测 C_{11} 位 α 羟基化合物的转化率。结果随着氨基酸浓度的增加, 色素的形成量减少, 当浓度达到 5mmol/L 时, 对色素形成抑制作用较明显 (如表 2 所示)。其中尤以色氨酸的抑制作用最明显, 证明色氨酸能顺序反馈抑制 DAHP 合成酶, 此时 C_{11} 位 α 羟基化合物的转化率为 51%, 产物回收率 48.8%, 底物回收率 47.6%。而酪氨酸和苯丙氨酸作为芳香族氨基酸的终产物, 单独作用时, 仅部分抑制 DAHP 合成酶的活力, 色素仍产生, 转化率约 50%, 但产物和底物的回收率分别下降到 25.6% 和 24.9%。

2.3.2 苯丙氨酸和酪氨酸协同作用对色素产生的影响: 将等分子量的苯丙氨酸和酪氨酸混合, 添加到已培养 24h 的发酵液中, 使终浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mmol/L, 同时加入 2% 沃氏氧化物, 继续培养 48h, 观

表2 添加不同氨基酸后发酵的结果
(氨基酸浓度为5mmol/L)

氨基酸种类	Try	Tyr	Phe	Tyr+Phe
转化率 (%)	51	50	49	51
产物的得率 (%)	48.8	25.6	25.1	48.2
$A_{395\text{nm}}$	0.023	0.412	0.498	0.083

察发酵液中色素的形成和产物的收率。结果同样随着氨基酸浓度的增加,色素的形成量减少,当添加苯丙氨酸与酪氨酸的混合溶液浓度达到5mmol/L时,可以大幅度抑制色素的形成,从而增加产物的收率(如表2所示)。

2.4 赭曲霉菌株莽草酸缺陷型的筛选

以上结果说明芳香族氨基酸和色素的形成确实存在着共同的代谢途径,它们有共同的中间体——莽草酸,如果莽草酸合成受阻,则色素和三种芳香族氨基酸的合成也必然中断。因此,本实验通过物理和化学诱变方法选育莽草酸缺陷株。

取赭曲霉的分生孢子,用磷酸缓冲液充分悬浮,使孢子浓度为 $10^7/\text{mL}$,加入硫酸二乙酯2%(V/V),30℃振荡60min,然后用硫代硫酸钠终止反应。诱变液经过离心后,菌体用生理盐水洗涤并悬浮,进一步用30W紫外灯距离15cm照射5min,诱变后,菌液经过适

C_{11} 位 α 羟基化率最高,达到47%。

2.5 高转化率菌株的选育

由于甾体羟基化过程需要丰富的还原型辅酶II^[5,6],也就是说需要强化菌株的HMP途径,而抑制EMP途径。碘乙酸是EMP途径的强烈抑制剂,如果在培养基中加入大剂量的碘乙酸,阻断EMP途径,只有HMP途径活力较强的菌株才能生长迅速。实验以莽草酸缺陷株3#为出发菌,利用紫外线诱变后,孢子悬浮液涂布于含有碘乙酸的浓度梯度平板上,30℃培养72h后,在高碘乙酸浓度处挑取50株,进行甾体的 C_{11} 位 α 羟基化反应,其中有27株菌发酵液的颜色加深;21株菌发酵液中虽不产砖红色素,但转化率小于或等于47%,只有两支突变株的转化率高于47%,而且发酵液不含砖红色素,其中一株 C_{11} 位 α 羟基化转化率恢复到51%。

参 考 文 献

- [1] 杜连祥等编.《工业微生物实验技术》.天津:天津科技出版社,1992.
- [2] Shriner R I, Fuson R C, Curtin D Y *et al* 编著,丁新腾、陈国斌、周安寰等译,有机化合物系统鉴定法,上海:复旦大学出版社,1987.
- [3] Atkins P W, Holer J S E, Holliday A K. Second Metabolism, The Oxford University Press, 1978.
- [4] 张克旭.氨基酸工艺学.北京:轻工业出版社,1995.
- [5] Sedlacek L, Jaworski A, Wilmanska D. European J Appl Microbiol Biotechnol, 1981, 13:155~160.
- [6] Jaworski A, Sedlacek L, Wilmanska D *et al*. Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie, 1982, 22(5):327~333.

表3 莽草酸缺陷菌株的 C_{11} 位 α 羟基化能力和色素的分泌情况

突变株号	1#	2#	3#	4#
转化率(%)	40	38	47	43
$A_{395\text{nm}}$	0.018	0.015	0.020	0.019

当稀释,涂布于土豆葡萄糖培养基上,30℃培养96h后,将平板上的所有孢子洗入无菌生理盐水中,充分稀释后,涂布于霉菌基本培养基上,30℃培养48h,利用夹层平板法筛选莽草酸缺陷株,最终获得4株稳定的莽草酸缺陷株,其对甾体沃氏氧化物11 α -羟基化能力和色素的分泌情况如表3所示。结果表明4株菌均不再产生色素,但是甾体的转化能力都有所下降,其中3号菌的