

文章编号:1009-038X(2001)05-0485-04

利用胆固醇氧化酶转化胆固醇制备胆甾-4-烯-3-酮

吕陈峰, 陈毅力, 王龙刚, 杨胜利, 王武

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 用酶法催化氧化胆固醇制备胆甾-4-烯-3-酮相对于化学法合成具有反应简单、成本较低等优点。作者探讨了在正辛烷作为有机相的两相反应体系中, 以胆固醇氧化酶催化氧化胆固醇制备胆甾-4-烯-3-酮的方法。在胆固醇质量浓度为 40 g/L, 反应时间 40 min、反应温度 40 ℃、磷酸缓冲液-正辛烷体积比 3:2、通氧 40 L/h 及搅拌转速 300 r/min 下, 胆固醇转化率达到 92%, 经薄板层析及紫外扫描, 发现转化产物为单一的胆甾-4-烯-3-酮。

关键词: 胆甾-4-烯-3-酮; 两相体系; 胆固醇; 胆固醇氧化酶; 生物转化

中图分类号: Q 548.1

文献标识码: A

Bioconversion of Cholesterol by Cholesterol Oxidase from *Brevibacterium* sp.

LU Chen-feng, CHEN Yi-li, WANG Long-gang, YANG Sheng-li, WANG Wu

(Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Bioconversion of cholesterol in organic/aqueous two phase system by cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp. was investigated in this paper. Choles-4-en-3-one, an important intermediate of several medicines, can be used as medicine itself owing to its blood lipids lowering and anti-obesity effect. Under the cholesterol concentration of 40 g/L, aqueous volume: organic volume of 3:2, O₂ flow rate of 40 L/min and 300 r/min, maximum conversion rate of 92% was reached at 40 ℃ in 40 mins.

Key words: Cholest-4-en-3-one; two phase system; cholesterol; cholesterol oxidase; bioconversion

胆固醇氧化酶可以专一性地把胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮。胆甾-4-烯-3-酮是胆固醇代谢过程中的第一个产物, 原来位于 3 位的羟基变成了羰基, 虽其它部分与胆固醇相同, 但化学性质和生理作用发生了变化。由于胆甾-4-烯-3-酮是一系列固醇类激素药物的前体, 其本身也可以直接作为药物。有关文献曾先后报导了制备胆甾-4-烯-3-酮的方法及其抗肥胖的疗效^[1,2]。利用小鼠肝病模型还证明胆甾-4-烯-3-酮具有治疗肝病的效果^[3]。此外还有

研究表明胆甾-4-烯-3-酮具有防止皮肤角质化的功能。

关于胆甾-4-烯-3-酮的酶法制备, 主要有两种方法: 微乳法和水-有机两相反应法。微乳法主要采用反相微胶束(reverse micelles)作为胆固醇氧化酶催化反应的介质, 一般以 Winsor III 和 IV 系统^[5]或者 AOT-异辛烷-水系统^[6]。该系统虽能取得较高的转化率, 但大多用于对胆固醇酶催化反应的机理研究。而采用简单的水-有机两相反应的方法, 更适合

收稿日期: 2001-06-26; 修订日期: 2001-09-11。

作者简介: 吕陈峰(1978-), 男, 江苏无锡人, 生物化学工程硕士研究生。

于大量制备胆甾-4-烯-3-酮,所以作者采用水-有机两相反应法进行胆甾-4-烯-3-酮的制备。

1 材料与方法

1.1 材料

胆固醇氧化酶 由本实验室保藏菌种 *Brevibacterium sp.* DGC-007 产生;磷脂酶 C 购自 SIGMA 公司。

培养基组成(g/L):胆固醇 1.5,葡萄糖 20,酵母膏 7.5,氯化钠 1,醋酸铵 2,磷酸氢二钾 0.2,七水硫酸镁 0.05,七水硫酸亚铁 0.01,氯化钙 0.1, pH 7.5。

1.2 方法

1.2.1 胆甾-4-烯-3-酮的制备

制备胆甾-4-烯-3-酮的反应装置见图 1。

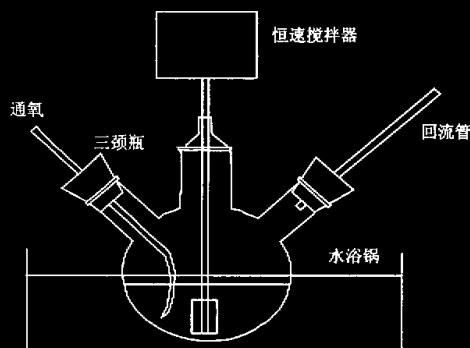


图 1 反应装置图

Fig. 1 Flow chart of the aqueous/organic two phase system

取磷酸缓冲液(pH 7.5, 0.075 mol/L)作水相,正辛烷作有机相,总反应体积 50 mL,加入胆固醇 2 g,于 250 mL 三颈瓶中水浴加热,同时通入氧气,并用搅拌器搅拌。

1.2.2 转化率测定 取反应液 0.1 mL,加入 10 mL 环己烷震荡后静置萃取 10 min。取萃取液稀释 20 倍后在 240 nm 处测定吸光度。

1.2.3 胆甾-4-烯-3-酮的纯化 取 2 mL 反应液加入 20 mL 无水乙醚,静置萃取过夜。取上层萃取液,在硅胶薄板上作条状点样,室温下展开。展开自然干燥后,于 254 nm 的紫外灯下观察,把黑色无荧光条带部分硅胶刮下,溶于无水乙醚,离心,上清液常温下抽真空干燥。

1.2.4 产物鉴定 反应产物用上述方法分离,二次纯化所得产物作紫外光谱扫描鉴定。

1.2.5 薄板层析

硅胶板制备 用硅胶 GF₂₅₄ 与水按 1:3 制成硅胶板,105 ℃ 活化 40 min。

展开剂 $V_{(\text{苯})} : V_{(\text{乙酸乙酯})} = 2:1$

显色剂 A 0.3% 2,4-二硝基苯肼(0.3 g 2,4-二硝基苯肼溶于 92 mL 无水乙醇和 8 mL 浓盐酸中);B 30% 浓硫酸-乙醇溶液。

2 结果与讨论

2.1 两相反应有机溶剂的选择

有文献报导在研究胆固醇的生物转化时发现用长链烷烃作有机溶剂可以得到较高的转化率。但考虑到底物与产物的分配系数以及烷烃易燃的特点,在进一步的研究时采用了四氯化碳作为有机溶剂^[7]。由于作者制备胆甾酮的目的是为了在医药领域的应用,而四氯化碳具有一定的毒性,且残留四氯化碳会对制备的产物产生污染,所以采用正辛烷作为反应的有机溶剂。

2.2 两相反应条件优化

实验中首先考察了转化率随反应时间的变化。在反应体积 50 mL,水相与有机相体积比 1:1,温度 37 ℃,搅拌速度 200 r/min,通氧量 40 L/h,加酶量 15 U 的反应条件下转化率随反应时间的变化如图 2。

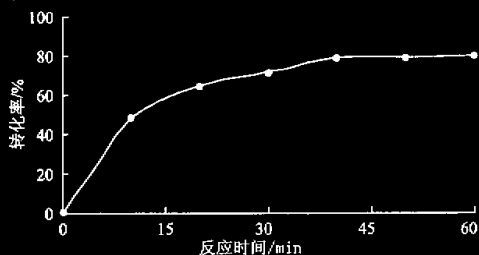


图 2 转化率随反应时间的变化

Fig. 2 Time course of the conversion

在图 2 上可看到当反应时间达到 40 min 后,由于产物的抑制作用,反应基本停止,转化率不再提高。因此选取反应时间为 40 min。

两相比对转化率有重要的影响,当水相有机相体积比为 1:5 时,转化率最高^[7]。所以接着研究了本实验中两相比对反应转化率的影响。在反应体积 50 mL,反应时间 40 min,温度 37 ℃,搅拌速度 200 r/min,通氧量 40 L/h,加酶量为 15 U 的条件下,两相比对转化率的影响如图 3。

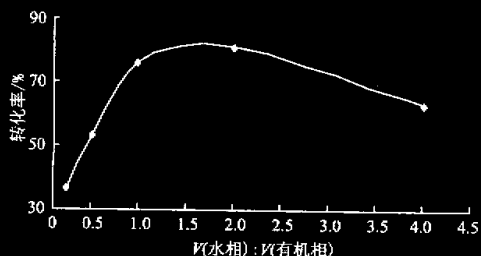


图3 水相/有机相混合比对转化率影响

Fig.3 Effect of aqueous/octane ratio on conversion rate

在实验中发现转化率最高的两相比与文献中报道有所不同^[7],从上面的图中可以看到最优的水相与有机相之比为1.5,这可能与反应液中氧的扩散问题有关,正辛烷浓度较高时反应液比较粘稠,造成氧扩散困难。在文献[7]中由于采用专用的反应器,氧扩散问题得到较好的解决,所以其有机相比例较高。而本实验采用的装置较为简单,氧的扩散性相对差一些,有机相比例偏高时氧扩散性反而下降,所以在本实验中,确定最适合的 $V(\text{磷酸缓冲液}):V(\text{正辛烷})=3:2$ 。

为了确定比较经济的用酶量,考察了在温度 37°C ,搅拌速度 200 r/min ,通氧量 40 L/h ,反应时间 40 min , $V(\text{水相}):V(\text{有机相})=3:2$ 的条件下加酶量对转化率的影响:

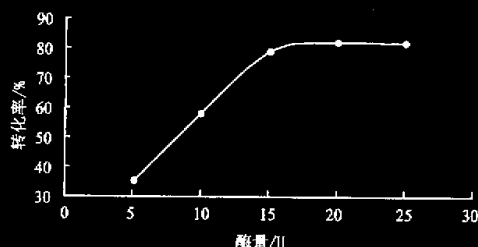


图4 加酶量与转化率关系

Fig.4 Effect of enzyme concentration on conversion rate

从图4可以看到,当添加酶量达到 16 U 后,随着添加酶量的增加,产物的抑制使得转化率变化很小,所以,确定最经济的加酶量为 16 U 。

据研究在水溶液中该胆固醇氧化酶的最适反应温度为 40°C ^[8],在水-有机两相系统中酶最适温度有可能发生变化,因此测定了各反应温度下的转化率。

由图5可以看到,催化反应最适反应温度为 40°C ,与酶最适温度一致。

由胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮是一个氧化反应, O_2 也是重要的底物,所以反应介质中溶解氧浓度非

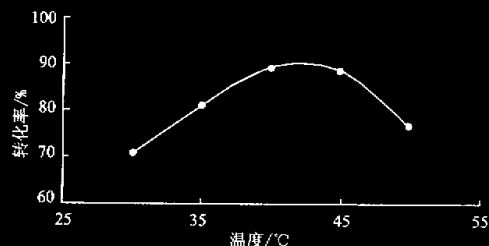


图5 温度对转化率影响

Fig.5 Effect of temperature on conversion rate

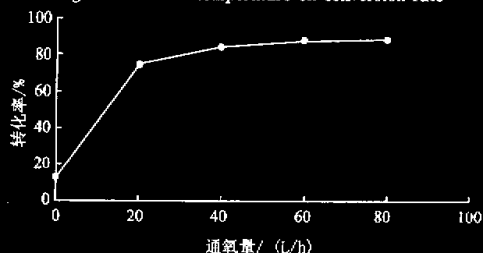


图6 通氧量对转化率的影响

Fig.6 Effect of air flow rate on conversion rate

常重要。实际反应时,通过不断通入氧气来保证反应过程中有足够的氧气供应。由图6可以看到当通氧量达到 20 L/h 时,转化率已达到 75% 。当通氧量提高到 40 L/h 时,转化率达到 84% ,而后转化率随通氧量的增加变化很小,这主要由于当通氧量达到一定程度后,溶氧基本已达饱和状态,继续提高通氧量已经意义不大。

两相反应之所以能极大地提高转化率主要是因为增加了反应体系中底物的有效浓度,并提供了一个足够的界面反应区域。在反应过程中,适当的搅拌不仅能大大地增加体系中的溶氧,而且能提高两相的混合度,对反应起着重要的作用。实验中考察了搅拌速度对转化率的影响,结果如图7。

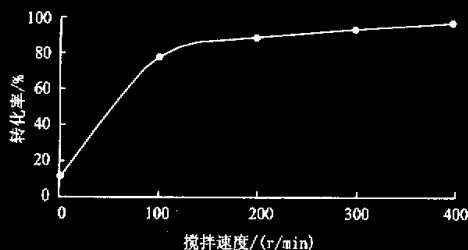


图7 搅拌速度对转化率影响

Fig.7 Effect of revolution speed on conversion rate

可以发现,当搅拌速度小于 100 r/min 时转化率随搅拌速度的增大而明显提高;当搅拌速度大于 100 r/min 后,转化率的提高并不十分显著。当搅拌

速度达到 300 r/min 时,转化率已到 92%,但随着提高搅拌速度还能继续有所提高.由于反应装置的影响,继续提高搅拌速度会造成搅拌时装置的不稳定,因此选择搅拌速度为 300 r/min.

通过实验最终确定反应条件:磷酸缓冲液 30 mL,正辛烷 20 mL,加酶量为 16 U,胆固醇添加量为 2 g,反应时间 40 min,反应温度 40 ℃,V(磷酸缓冲液):V(正辛烷) 3:2,通氧量 40 L/h,搅拌速度 300 r/min.

此反应条件下,胆固醇转化率可以达到 92%.

2.3 转化产物的鉴定

2.3.1 薄板层析法 胆甾-4-烯-3-酮遇显色剂 A 呈橘黄色,胆固醇遇显色剂 A 呈淡黄色.显色剂 B 属万能显色剂,喷洒后置于 105 ℃ 烘箱约 5 min,条

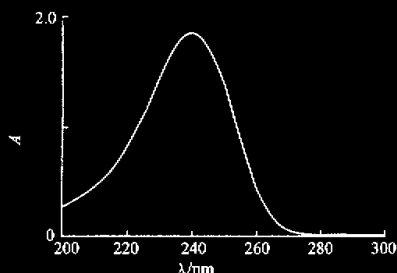


图8 胆甾酮标样紫外扫描

Fig.8 Ultraviolet scanning of authorized cholestenone

2.4 胆甾-4-烯-3-酮的应用前景

胆甾-4-烯-3-酮是一种制药原料,可以用它作为前体合成多种激素类药物.用生物转化法生产胆甾-4-烯-3-酮具有转化率高,产物单一明确,反应条件简单等优点,利用合适的反应器可以尝试较大规模的制备.

带均呈棕褐色.本实验中喷洒显色剂 B 后可看到薄板上只有两条谱带,而且明显分离.喷洒显色剂 A 后可鉴别出前面那条为胆甾-4-烯-3-酮.在 254 nm 紫外灯下观察,可看到黑色无荧光部分即为胆甾-4-烯-3-酮的谱带.

2.3.2 紫外扫描图谱

虽然反应用的是直接由发酵上清液盐析所得粗酶,但由于该菌株在发酵液中只积累胆固醇氧化酶,所以可以用粗酶作为转化反应应用酶.为了证明转化所得产物就是胆甾-4-烯-3-酮,对产物作了性质鉴定.图 8 和图 9 是胆甾-4-烯-3-酮标准样品和转化产物的紫外扫描图谱.

可以看到,纯化产物与标样的紫外吸收图谱几乎相同.

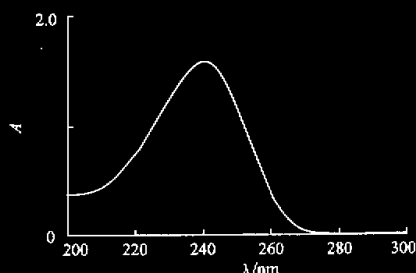


图9 制备产物紫外扫描

Fig.9 Ultraviolet scanning of prepared cholestenone

蛋黄在食品工业中应用广泛,但其高含量的胆固醇却使许多人望而却步.利用胆固醇氧化酶处理后不仅降低了其中的胆固醇含量,而且其生成产物胆甾-4-烯-3-酮具有抗肥胖、降血脂和保肝等功能,因此可以用来生产系列保健食品.

参考文献:

- [1] Suzuki Kunio. 4-Cholesten-3-one- for the Control of Obesity[P]. 世界专利:WO 93 12 798.
- [2] Myamoto Itaru Toyoda Kengo. Cholestenone Manufacture with Cholesterol Oxidase of Rhodococcus[P]. 日本专利:JP 94, 157, 858.
- [3] Kashima Minoru, Kinoshita Tosha, Inaoka Yasunori, *et al.* Cholestanones for Treatment of Liver Diseases[P]. 日本专利:JP 95 69, 898.
- [4] Iwabuchi Hisao, Hirose Taku. Anti-keratinization effect of Cholestanones[P]. 日本专利:JP 95, 109, 216.
- [5] BACKLUND S, RANTALA M. Lecithin/Propanol-based microemulsions used as media for a cholesterol oxidase-catalyzed reaction[J]. *Colloid Polym Sci*, 1995, 273: 293~297.
- [6] Gun Hedstrom J. Peter Slotte. Enzyme-Catalyzed Oxidation of Cholesterol in Physically Characterized Water-in-Oil Microemulsions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39: 218~224.
- [7] Wen-Hsiung Liu, *et al.* Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 184~189.