

文章编号: 1673-1689(2010)01-0150-05

雄甾烯酮转化菌的诱变育种和发酵条件优化

赵有玺*, 龚平

(北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要: 采用紫外线照射和 NTG 对实验室保存的| 株对植物甾醇有降解能力的 *Mycobacterium* sp. SH5 进行诱变处理, 得到| 株雄甾-4 烯-3, 17-二酮(Androst-4-en-3, 17-dione, AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮(Androst-1, 4-en-3, 17-dione, ADD) 分解酶(9 α -羟化酶) 缺陷型菌株 *Mycobacterium* sp. SH5-52。对 *Mycobacterium* sp. SH5-52 降解植物甾醇侧链得到 AD (D) 的培养基组成、接种量、温度、pH 值和溶氧等发酵条件进行了研究。在最佳的发酵条件下, 投料质量浓度为 0.6 g/dL 时, AD (D) 的转化率由原来的 37.2% 提高到 47.6% 左右。

关键词: 4 烯-雄甾-3, 17-二酮; 1, 4-二烯-雄甾-3, 17-二酮; 植物甾醇; 生物转化

中图分类号: TQ 92

文献标识码: A

Mutant and Optimization of Androsthenone Translation Strain *Mycobacterium* sp. SH5

ZHAO You-xi*, GONG Ping

(College of Biochemistry and Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: *Mycobacterium* sp. SH5 was a potential strain for degrading phytosterol. After mutation by UV and NTG, a mutant with 9 α -hydroxylase defective was selected and named as *Mycobacterium* sp. SH5-52. On the basis of mutation, the nutritional and environmental conditions of *Mycobacterium* sp. SH5-52 were investigated and optimized. With the optimum conditions, *Mycobacterium* sp. SH5-52 could degrade 0.6% substance phytosterol to Androst-4-en-3, 17-dione (AD) and Androst-1, 4-en-3, 17-dione (ADD) with the average conversion ratio significantly improved from 37.2% to 47.6%.

Key words: AD, ADD, phytosterol, biotransformation

雄甾-4 烯-3, 17-二酮(Androst-4-en-3, 17-dione, AD) 和雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮(Androst-1, 4-en-3, 17-dione, ADD) 是制备甾醇类激素药物的重要中间体, 对机体起着重要的调节作用^[1]。目前我国主要是从野生中药材“穿地龙”等植物中提取

薯蓣皂素经化学合成而成, 工艺十分复杂, 消耗成本很高, 而且污染环境^[2-3]。60 年代, A rima 和 Sih 等就发现某些微生物可以切除胆甾醇的饱和侧链而得到 ADD。诺卡氏菌、分枝杆菌、节杆菌和假单胞菌等微生物都能将甾醇类化合物作为碳源利用,

收稿日期: 2008-12-10

基金项目: 北京联合大学重点学科建设项目(51102630517)。

作者简介: 赵有玺(1979-), 男, 山东日照人, 讲师, 工学硕士, 主要从事工业微生物方面的研究。

Email: wuxizyx@163.com

使甾醇降解。张辉等^[3]发现,大豆甾醇直接用微生物处理,所得产物主要是 CO_2 和 H_2O 。在微生物降解甾醇过程中,由于存在母核的降解而导致无法得到AD(D)。目前,一般采用3种方法来抑制微生物的对甾醇母核的降解。通过对甾醇进行结构改造来阻止酶对母核的降解,加入酶的抑制剂抑制母核降解关键酶如 $\text{C}_{1,2}$ 脱氢酶和 9α -羟化酶和对菌种进行诱变产生仅能降解甾醇侧链的突变株^[5-8]。随着基因工程技术的发展,利用基因工程技术构建高效降解甾醇侧链已成为可能。微生物选择性切除甾醇侧链生产AD(D)具有产品纯度高,生产成本低,生产周期短等优点^[9-10]。采用微生物法生产AD(D),再用化学方法将AD(D)进行结构改造生产甾醇类药物,已经成为甾醇类药物生产的发展方向。作者以实验室保存的一株降解植物甾醇的*Mycobacterium* SH5为出发菌株,采用紫外线照射和NTG等方法进行诱变处理,筛选能够将植物甾醇转化为AD(D)的分解酶(9α -羟化酶)缺陷型菌株,并对培养基成分及转化条件进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与主要试剂 作者所在实验室筛选得到的一株能够降解植物甾醇的分支杆菌,编号为SH5。经诱变后的得到的多株能够利用植物甾醇转化产生雄甾烯酮的突变株,编号为SH5-1, SH5-2, SH5-3等。

植物甾醇:武汉凯迪精细化工有限公司产品;4-AD:天津市津津药业有限公司产品;ADD, Sigma公司产品。

1.1.2 培养基

1) 完全培养基(组分 g/dL): 酵母粉 0.5, 氯化钠 0.5, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1; pH 6.8~7.0。

2) 基本培养基(组分 g/dL): 磷酸二氢钾 0.05, 磷酸氢二钾 0.2, 硫酸镁 0.05, 氯化钙 0.02, 硫酸锰 0.05, 硫酸钠 0.05, 硫酸亚铁 0.05; pH 6.8~7.0。

3) 斜面培养基(组分 g/dL): 葡萄糖 1, 甘油 2, 硫酸铵 0.2, 磷酸氢二钾 0.05, 琼脂 1.5; pH 6.8~7.0。

4) 液体种子培养基(组分 g/dL): 玉米淀粉 6, 硫酸铵 0.25, 磷酸氢二钾 0.12, 泡敌 0.007; pH 7.0。

5) 发酵培养基(组分 g/dL): 有机相为葵花油 16, 甾醇 0.6, 水相为玉米淀粉 6, 硫酸铵 0.2, 磷酸氢二钾 0.12, 泡敌 0.007; pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌种诱变

1) 紫外诱变: 用无菌水将培养成熟的菌体洗下分散均匀, 制成浓度为 10^7 个/mL的菌悬液。采用15 W紫外灭菌灯, 距离菌悬液为30 cm照射, 液体厚度约为0.1 cm左右, 照射时间分别为20、30、40、50、60、70、80 s。

2) 亚硝基胍诱变: 用无菌水将培养成熟的菌体洗下分散均匀, 制成浓度为 10^7 个/mL的菌悬液。亚硝基胍质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 诱变时间分别为10、20、30、40 min, 诱变结束后将菌悬液稀释1 000倍, 终止诱变。

3) 雄甾烯酮转化菌的筛选: 取1 mL诱变后的菌体接种到200 mL完全培养基中, 振荡培养20 h; 取10 mL培养液离心分离, 用无菌水洗涤3次; 取0.1 mL菌液涂在以植物甾醇为惟一碳源的基本培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d; 将生长旺盛的菌落取出, 用完全培养基摇瓶培养48 h, 取10 mL培养液离心分离, 用无菌水洗涤3次; 再加入到100 mL基本培养基振荡培养6 h, 将菌体加到含0.1 g/dL 4-AD的基本培养基中振荡培养6 h, 加入200 U/mL的青霉素, 继续培养24 h; 取0.1 mL菌液涂在以植物甾醇为惟一碳源的基本培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d; 将生长的菌落转接至4-AD为惟一碳源的基本培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d, 将在以4-AD为惟一碳源的基本培养基上不生长、在以植物甾醇为惟一碳源的培养基上生长的菌落挑出转接斜面, 并编号^[11-12]。

1.2.2 植物甾醇的转化

1) 斜面培养: 30~32 $^{\circ}\text{C}$ 培养5 d。

2) 液体种子培养: 取一环在斜面培养基上培养5 d的菌体, 接种至液体种子培养基中, 置于130 r/min旋转式摇床上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d。

3) 发酵转化培养: 液体种子培养3 d后, 以接种体积分数10%接入发酵培养基中, 置于250 r/min旋转式摇床上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养7 d。

1.2.3 4-AD和ADD的定量方法

1) 色谱条件: 日本岛津GCMS-QP 2010型气相色谱仪。色谱柱为AG-5 (30 m $\times$ 0.25 mm、0.25 μm); 载气为 N_2 , 载气流速1 mL/min, 柱温为280 $^{\circ}\text{C}$, 进样口温度280 $^{\circ}\text{C}$, FID检测器温度为300 $^{\circ}\text{C}$ 。

2) 样品处理: 以乙酸乙酯: 发酵液=1:1比例提取发酵液。振荡10 min, 至充分溶解后, 静置分层。5 000 r/min离心10 min, 取上层清液, 稀释100倍, 作为待测样品, 进样量为1 μL ^[13]。

1.2.4 遗传稳定性实验 将转化能力较高的几株菌株接种至完全培养基, 传代 10 次, 进行发酵实验, 检测 4-AD 和 AD(D) 的含量。

1.2.5 发酵条件优化 分别选取葡萄糖、果糖、麸皮、玉米淀粉、甘油为碳源进行发酵实验, 考察不同碳源对 AD (D) 产率的影响。分别选取硝酸铵、硫酸铵、尿素、蛋白胨、酵母粉为氮源, 考察氮源种类对 AD (D) 产率的影响。选择不同质量浓度的最优碳源和氮源, 考察碳源和氮源质量浓度对 AD (D) 产率的影响, 进而选择最合适质量浓度的碳氮源。

设计正交实验, 考察接种量、摇床转速、温度、发酵培养基初始 pH 值对积累 AD (D) 的影响, 进而选择最佳的培养条件。

2 结果与分析

2.1 诱变结果

用不同剂量诱变后, 取一定量的菌液涂布在完全培养基上进行培养, 计算不同剂量组致死率结果, 见表 1、表 2。

表 1 紫外线处理后菌株的致死率
Tab. 1 Effects of UV irradiation on strain *Mycobacterium* sp. SH5

诱变时间/s	致死率/ %
20	10
30	43
40	58
50	63
60	70
70	92
80	98

表 2 亚硝基胍处理后菌株的致死率
Tab. 2 Effects of NTG on strain *Mycobacterium* sp. SH5

诱变时间/ min	致死率/ %
10	62
20	83
30	90
40	96

致死率过低, 则不能产生足够的突变体; 致死率过高, 则存活的突变株较少。根据实验结果, 紫外诱变时, 选择诱变 70 s, 亚硝基胍诱变时, 选择诱变 30 min。经过多次诱变, 得到以植物甾醇为惟一碳源的基本培养基生长旺盛、而在以 4-AD 为惟一

碳源的基本培养基上不生长的菌株 121 株。

2.2 突变株转化能力

将突变株进行发酵实验后, 测定 4-AD 和 AD(D) 的含量。为了解决植物甾醇不易溶于水的难题, 作者以两液相培养系统作为微生物转化的发酵系统, 选择甾醇溶解度高、对微生物细胞毒性作用较低的葵花油为有机相溶剂, 121 株突变株中有 5 株的转化能力超过 30%, 见表 3。

表 3 亚硝基胍处理后菌株的致死率
Tab. 3 Effects of NTG on strain *Mycobacterium* sp. SH5

菌株编号	AD(D) 得率/ %
SH5-8	32.3
SH5-32	33.5
SH5-46	41.2
SH5-52	37.2
SH5-97	34.6

2.3 突变株的遗传稳定性

SH5-46、SH5-97 的转化能力下降很快, 到第 10 代时, 转化能力都已降到 25% 以下; SH5-8 和 SH5-32 的转化能力也下降到 30% 左右, 波动幅度在 3% 左右; SH5-52 的转化能力到第 10 代时, 转化能力为 35.4%, 波动范围小于 2%。这说明 SH5-52 是一株转化能力稳定的菌株。下面的实验均以 SH5-52 为试验菌。

2.4 不同碳源及碳源质量浓度对 AD (D) 产率的影响

分别选取葡萄糖、果糖、乳糖、玉米淀粉、甘油为碳源, 考察碳源种类对 AD 产率的影响, 结果见表 4。

表 4 不同碳源种类对发酵的影响
Tab. 4 Effects of different carbon sources on fermentation

碳源种类	AD(D) 得率/ %
葡萄糖	8
果糖	17
麸皮	18
玉米浆	37.1
可溶淀粉	31

从表 4 可以看出, 玉米浆和淀粉有利于提高 AD (D) 产率。当以小分子的糖类、葡萄糖和果糖为碳源时, AD (D) 产率较低。当以玉米浆为碳源时, AD (D) 的得率可达 37.1%。

分别配制玉米浆体积分数为 4%、6%、8%、

10%、12% 的发酵培养基, 考察不同碳源体积分数对 AD (D) 产率的影响, 结果见图 1。由图 1 可知, 玉米浆体积分数为 8% 时最有利于发酵的进行, AD (D) 的得率可达 39.3%。

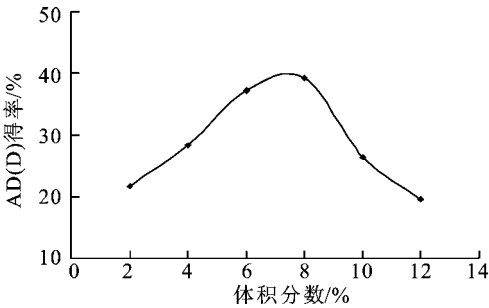


图 1 不同体积分数碳源对发酵的影响

Fig. 1 Effect of different concentration of carbon sources on fermentation

2 5 不同氮源及氮源质量浓度对 AD (D) 产率的影响

分别选取硫酸铵、尿素、蛋白胨、酵母粉为氮源, 考察氮源种类对 AD (D) 产率的影响, 结果见表 5。由表 5 可知, 硫酸铵有利于提高 AD (D) 产率。当以蛋白胨、酵母粉为氮源时, AD (D) 产率较低。当以硫酸铵为碳源时, AD (D) 的得率可达 39.3%。

表 5 不同氮源种类对发酵的影响

Tab. 5 Effect of different nitrogen sources on fermentation

氮源种类	AD (D) 得率/ %
硫酸铵	39.2
尿素	24.6
蛋白胨	12.3
酵母粉	21.4

分别配制硫酸铵质量浓度为 1、2、3、4、5 g/dL 的发酵培养基, 考察不同氮源质量浓度对 AD (D) 产率的影响, 结果见图 2。由图 2 可知, 硫酸铵质量浓度为 3 g/dL 时, 最有利于发酵的进行, AD (D) 的得率可达 41.2%。

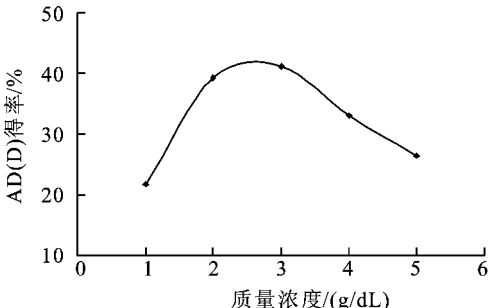


图 2 不同氮源质量浓度(NH₄)₂SO₄对发酵的影响

Fig. 2 Effect of different concentration of (NH₄)₂SO₄ on fermentation

2 6 转化条件的优化

选择上述最优碳氮培养基, 对转化过程中影响比较大的接种量、温度、发酵培养基初始 pH 值, 装液量进行正交实验。

表 6 正交因素水平表

Tab. 6 The levels of factors of perpendicular experiment design

水平	接种体积分数/ %	温度/ °C	初始 pH 值	装液量/ mL
1	8	29	6.5	60
2	10	30	7.0	80
3	12	31	7.5	100

由表 6 可知, 利用 *Mycobacterium* sp. SH5-52 转化植物甾醇的最佳转化条件为: 接种体积分数 12%, 发酵温度为 29 °C, 发酵培养基的初始 pH 值为 7.0, 摇床转速为 250 r/min 时, 250 mL 三角瓶的最佳装液量为 80 mL, 优化后的 AD (D) 的得率可达 47.6%。

3 结 语

以一株能够降解植物甾醇的分支杆菌 *Mycobacterium* sp. SH5 为出发菌株, 通过紫外诱变和亚硝基胍诱变的方法得到了 121 株能够转化积累 AD (D) 的突变株。甾醇的降解过程表明, 中间产物 AD (D) 在 9α-羟化酶的作用下进一步降解^[5]。只要破坏 9α-羟化酶的基因, AD (D) 就无法进一步降解, 从而能够在发酵液中得到累积。作者通过常规的诱变方法得到了 9α-羟化酶缺陷菌株, 它们都具有积累 AD (D) 的能力。其中 *Mycobacterium* sp. SH5-52 经过发酵, AD (D) 的得率可达 37.2%。

甾体化合物在水中的溶解度很低, 低于 2 mg/L, 使得底物无法与生物酶充分接触^[14]。目前常采用添加有机溶解等方法提高甾醇在发酵液中的浓度, 但效果并不十分理想。近年来, 采用双液相体系, 提高了甾醇的溶剂度, 从而增加了甾醇的投料量。在有机溶剂和水组成的两相系统中, 生物催化反应在水溶液相或两相界面进行, 而有机溶剂作为辅助相, 可以增加底物的溶解度, 并通过缓慢控制释放作用增大底物的溶解速率, 促进催化反应的快速进行。作者在研究中采用了姜绍通等采用的两液相培养系统作为微生物转化的发酵系统^[13]。

通过发酵条件优化发现 *Mycobacterium* sp. SH5-52 的最佳碳源为 8% 的玉米浆, 最佳氮源为 3 g/dL 的硫酸铵。最佳培养条件为 12% 的接种体积

分数, 发酵温度为 29 ℃, 发酵培养基的初始 pH 值为 7.0, 摇床转速为 250 r/min, 250 mL 三角瓶的最佳装液量为 80 mL。在上述条件下, AD (D) 的得率可达 47.6%, 比优化前的 37.2% 提高了 28.3%。

在 *Mycobacterium* sp. SH5-52 的转化产物中, 4AD 和 ADD 的比例约为 6:1。ADD 与 AD 在结

构上仅在 C_{1,2} 位存在一个双键的差别, 很难将两者分离。ADD 与 4AD 作为其它药物的前体物, 必须达到一定的纯度才能应用于生产。通过抑制或增强 C_{1,2} 脱氢酶的活性, 使转化产物中 AD 或 ADD 的产量占绝对的优势。

参考文献(References):

- [1] 廖伟宏, 饶志明, 沈微, 等. 菌株 *Bacillus* sp ST 06-95 转化植物甾醇为雄甾烯酮发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2008, 29 (8): 57–63.
- LIAO Wei-hong, RAO Zhi-ming, SHEN Wei, et al. Optimization of the fermentation parameters for transformation phytosterol into androstenone by strain *Bacillus* sp ST 06-95[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29 (8): 57–63. (in Chinese)
- [2] 杨英, 姜绍通. 微生物降解甾醇侧链转化雄甾-4 烯-3, 17 二酮的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33 (6): 142–145.
- YANG Ying, JIANG Shao-tong. Advance in degrading side chain of sterols of getting androst-4 ene-3, 17-dione by micro-organism[J]. **Microbiology**, 2006, 33 (6): 142–145. (in Chinese)
- [3] Huang Ch L, Chen Y R, Liu W H. Production of androstenones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39: 2996–3001.
- [4] 张辉, 姜文勇, 牟宏晶. 大豆街醇的微生物降解及酶抑制剂的选择[J]. 哈尔滨理工大学学报, 2000, 5 (4): 775–781.
- ZHANG Hui, JIANG Wen-yong, MU Hong-jing. Microbial transformation of soybean sterol and the selection of enzyme inhibitor[J]. **Journal Harbin Univ Sci & Tech**, 2000, 5 (4): 775–781. (in Chinese)
- [5] 叶丽, 史济平. 甾体微生物在制药工业中的应用[J]. 工业微生物, 2001, 31 (4): 40–48.
- YE Li, SHI Ji-ping. Application of microbial steroid transformation in pharmaceutical industry[J]. **Industrial Microbiology**, 2001, 31 (4): 40–48. (in Chinese)
- [6] Sih C J, Wang R C. A new route to estrone from sterols[J]. **J Amer Chem Soc**, 1965, 87: 1387–1388.
- [7] Van der waard W F, Doodewaard J, Flines J D, et al. Microbiological conversion of cholesterol into androst-1, 4 diene 3, 17-dione[J]. **Abh Deut Akad Wiss Berlin K I Med**, 1969, 2: 101–105.
- [8] Marscheck W J, Karychy, Muir R D. Microbial degradation of sterols[J]. **Appl Microbiol**, 1972, 23: 72–77.
- [9] 袁超东, 董艳苓, 杜连祥. 分枝杆菌降解大豆甾醇侧链的发酵研究[J]. 天津轻工业学报, 2003, 18 (4): 11–13.
- YUAN Chao-dong, DONG Yan-ling, DU Lian-xiang. Side chain degradation of BS by *Mycobacterium* sp[J]. **Journal of Tianjin University of Light Industry**, 2003, 18 (4): 11–13. (in Chinese)
- [10] 王志龙. 甾醇侧链切除的微生物转化技术[J]. 工业微生物, 2006, 36 (3): 49–54.
- WANG Zhi-long. Sterol side-chain cleavage by microbial transformation[J]. **Industrial Microbiology**, 2006, 36 (3): 49–54. (in Chinese)
- [11] 吴宝华, 李菁, 欧阳利华. 降解大豆甾醇微生物菌株的诱变研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2002, 18 (4): 88–92.
- WU Bao-hua, LI Jing, OUYANG Li-hua. Mutagenic treatment of microorganism capable to degrade soybean sterol[J]. **Natural Sciences Journal of Harbin Normal University**, 2002, 18 (4): 88–92. (in Chinese)
- [12] 袁超东. 降解大豆甾醇生产雄甾烯酮菌种选育和发酵条件的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.
- [13] 姜绍通, 胡锦艳, 杨英, 等. 分枝杆菌降解甾醇发酵生产雄甾二酮的两相系统培养基优化[J]. 食品科学, 2007, 28 (11): 386–389.
- JIANG Shao-tong, HU Jin-yan, YANG Ying, et al. Medium optimization of androst-4 ene-3, 17-dione fermentation from sterols by *Mycobacterium* sp. in two-phase systems[J]. **Food Science**, 2007, 28 (11): 386–389. (in Chinese)
- [14] Cruz A, Fernandes P, Carbral J M S. Whole-cell biotransformation of sitosterol in aqueous-organic two-phase systems [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11: 579–585.

(责任编辑: 李春丽)