

文章编号: 1673-1689(2006)05-0077-04

金龟子绿僵菌对甾体底物 11- α 羟化反应的工艺

刘玲玲, 杜大庆, 张星元, 赵允麟

(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:研究了金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)对甾体底物 16 α 、17 α -环氧黄体酮(16 α 、17 α -epoxy-4-pregnene-3,20-dione)的羟化反应工艺,考察了培养基组成、接种量、投料时间、转化时间、溶料方式、发酵级数等因素,探索了稀释发酵液以提高转化效率的新工艺。

关键词:甾体 羟化 金龟子绿僵菌 生物转化

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

11- α -hydroxylation Process of Steroids with *Metarhizium anisopliae*

LIU Ling-ling, DU Da-qing, ZHANG Xing-yuan, ZHAO Yun-lin

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southen Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of nutritional and environmental conditions on the conversion of 11- α -hydroxylation by *Metarhizium anisopliae* were investigated in this manuscript. Then, a novel dilution process was also determined.

Key words: steroids; hydroxylation; *Metarhizium anisopliae*; bioconversions

皮质激素药物对机体起着非常重要的调节作用,具有很强的抗感染、抗过敏、抗病毒和抗休克等药理作用^[1]。我国是皮质激素原料药的出口大国,其中乙酸强的松占总产量的60%,而利用霉菌将底物16 α 、17 α -环氧黄体酮引入羟基是最重要的一步,反应式为:



(R为甾体底物),其产物还可作为许多其他高效抗炎药的中间体。我国自20世纪50年代至今一直采用黑根霉转化工艺,2%的投料量转化率为40%~50%,与国外生产水平80%~90%^[3]差距较大,因此开发新的高产菌种将有望从整体水平提高原料的利用率,产生巨大的社会效益和经济效益。金龟子绿僵菌对甾体羟化反应的转化率较高,但存在转化周期长、易产孢子、菌体细导致抽滤、离心困难等

不足,因此未实现生产。作者从摇床水平对反应工艺进行了研究,旨在为进一步放大提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)由河南利华制药有限公司提供。

1.2 斜面培养基

葡萄糖 1.5 g/dL,蛋白胨 0.7 g/dL,牛肉膏 0.3 g/dL,酵母膏 0.2 g/dL,NaCl 0.3 g/dL,KH₂PO₄ 0.1 g/dL,K₂HPO₄ 0.1 g/dL。

1.3 摇瓶发酵培养基

培养基 A:葡萄糖 3 g/dL,玉米浆 2 g/dL,蛋白胨 0.5 g/dL,MgSO₄·7H₂O 0.05 g/dL,pH 4.5。

培养基 B:葡萄糖 3 g/dL,玉米浆 2.5 g/dL,硫

收稿日期: 2005-09-14; 修回日期: 2005-10-31。

作者简介: 刘玲玲(1981-),女,黑龙江大连池人,发酵工程硕士研究生。

酸铵 0.15 g/dL, 蚕蛹粉 0.2 g/dL, pH4.5。

1.4 培养与转化条件

将 26 ~ 28 °C 培养 5 ~ 7 d 的斜面菌种加入无菌水(0.5%吐温 80), 用棉签扫下, 制成浓度约 1.2×10^8 个/mL 的孢子液。吸取 0.5 mL 于摇瓶发酵培养基中(500 mL 三角瓶装液量 100 mL), 26 ~ 28 °C 228 r/min 培养 40 h 左右, 投入乙醇水^[4]溶好的甾体底物 8 mL(底物:乙醇:水为 2 g:1.5 mL:4.5 mL), 继续转化 72 h, 发酵液抽滤后于 90 °C 烘干, 待提取测定转化率。

1.5 甾体底物

16 α 、17 α -环氧黄体酮, 河南利华制药有限公司提供。

1.6 提取及转化率分析方法

用丙酮回流提取滤饼中甾体化合物, 浓缩回收丙酮后加入 4% NaOH 皂化, 抽滤并用去离子水冲洗 3 遍至中性, 90 °C 烘干后经 HPLC 测定转化率。色谱条件: Alltech 高效液相色谱仪, 250 mm \times 4.6 mm 硅胶柱, 体积比为 250:9 的氯仿:甲醇-水(25:1.5)混合液为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 240 nm 紫外检测器, 温度 25 °C, 相对湿度 60%。

1.7 pH 值及菌丝干重测定

用标定好的数字 pH 计测定发酵液 pH 值, 发酵液经抽滤后置于 90 °C 烘箱干燥至恒重称重, 未接种的空白摇瓶做同样处理, 以扣除发酵液中少量不溶蚕蛹粉残渣的影响。

2 结果与讨论

2.1 碳源的选择

甾体的转化需要辅酶 NADPH^[5], 因此维持一定量的糖利于提供足够的辅酶, 考虑在转化期配以缓慢利用的碳源^[6], 观察是否利于转化。初步考察 3 种配方: A 葡萄糖 3 g/dL, B 葡萄糖 2 g/dL, 蔗糖 1 g/dL, C 葡萄糖 2 g/dL, 糊精 1 g/dL(1 g 淀粉加 30 U/g 的液化淀粉酶液化所得, 液化浓度 50%), 其余成分为玉米浆 2 g/dL, 蛋白胨 0.5 g/dL, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/dL, 结果见表 1。

发现投料后 25 h 转化率基本相同, 但 50 h 以后 B、C 的转化率均略差于 A, 可能蔗糖和糊精的缓慢利用不利于转化, 因此仍选择葡萄糖为惟一碳源。

2.2 培养基配比正交组合实验

对配方 A 进行三因素三水平正交组合实验^[7], 各因素水平为葡萄糖(2.5、3、3.5 g/dL), 玉米浆(1.5、2、2.5 g/dL), 蛋白胨(0.3、0.5、0.7 g/dL),

MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/dL, 组合方案及结果见表 2。

表 1 不同碳源下氧化不同时间的转化率

Tab. 1 Effect of carbon sources on conversion yield

氧化时间/h	A	B	C
25	17.22	17.34	17.95
50	39.29	36.34	37.15
71	60.31	57.27	58.02
79	64.41	62.11	63.12

表 2 培养基配比正交组合实验

Tab. 2 Results of orthoynal experiment

编号	葡萄糖	玉米浆	蛋白胨	转化率/%
1	0	-1	-1	55.35
2	0	1	-1	56.28
3	0	-1	1	53.46
4	0	1	1	53.85
5	-1	-1	0	51.01
6	-1	1	0	51.70
7	1	-1	0	55.42
8	1	1	0	56.23
9	-1	0	-1	54.36
10	-1	0	1	53.39
11	1	0	-1	58.21
12	1	0	1	57.10
13	0	0	0	55.81
14	0	0	0	55.56
15	0	0	0	-

经 SAS 软件分析结果, 葡萄糖、蛋白胨及玉米浆的平方项对转化率影响显著, 在实验水平内转化率与葡萄糖质量浓度成正比, 与蛋白胨质量浓度成反比, 玉米浆在 2 g/dL 最佳, 但不加蛋白胨菌丝会衰老导致发酵液变暗, 因此仍添加 0.3 g/dL 蛋白胨防止菌丝过快衰老。最终确定最佳配方 C 为: 葡萄糖 3.5 g/dL, 玉米浆 2 g/dL, 蛋白胨 0.3 g/dL, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/dL。即第 11 号组合, 转化率为 58.21 g/dL。

对于 B 配方, 安排葡萄糖(2.5、3.0、3.5 g/dL)、玉米浆(2.0、2.5、3.0 g/dL)、硫酸铵(0.12、0.15、0.18 g/dL)、蚕蛹粉(0.2、0.4、0.6 g/dL)四因素三水平的初步正交实验见表 3。

表 3 四因素三水平正交表

Tab. 3 The orthogonal tab of four factors at three level

项目	葡萄糖	玉米浆	硫酸铵	蚕蛹粉	转化率/%
1	1	1	1	1	45.13
2	1	2	2	2	49.36
3	1	3	3	3	46.20
4	2	1	2	3	52.72
5	2	2	3	1	57.02
6	2	3	1	2	51.31
7	3	1	3	2	55.52
8	3	2	1	3	52.43
9	3	3	2	1	56.40
1 水平之和	140.69	153.37	148.87	158.55	
2 水平之和	161.05	158.81	158.48	156.19	
3 水平之和	164.35	153.91	158.74	151.35	
极差	23.66	5.44	9.87	7.2	

表 3 中最佳组合为 2231, 转化率 57.02%。得出葡萄糖为主要因素, 其次为硫酸铵, 观察到最优的四因素的水平组合依次为 3221。安排最优配比和表中最佳方案比较实验, 最优配比转化率 58.6%, 略好于最佳配比 55.8%。因此最终确定配方 D 为: 葡萄糖 3.5 g/dL, 玉米浆 2.5 g/dL, 硫酸铵 0.15 g/dL, 蚕蛹粉 0.2 g/dL。

2.3 接种量、投料时间、转化时间正交组合实验

因接种量(0.4、0.8、1.2 mL)、投料时间(37、39、41 h)和转化时间(68、70、72 h)之间有相互制约的关系^[8], 因此仍采取表 2 的组合方案, 以 C 配方为培养基, 转化率结果见表 4。

表 4 接种量、投料时间、转化时间正交组合实验

Tab. 4 The orthogonal combination design on inoculum size, hypha age and conversion time

编号	接种量	投料时间	转化时间	转化率/%
1	0	-1	-1	55.69
2	0	1	-1	54.54
3	0	-1	1	61.55
4	0	1	1	55.64
5	-1	-1	0	56.36
6	-1	1	0	57.85
7	1	-1	0	54.21
8	上方数据	1	0	58.63

续表 1

编号	接种量	投料时间	转化时间	转化率/%
9	-1	0	-1	55.40
10	-1	0	1	57.63
11	1	0	-1	52.45
12	1	0	1	57.79
13	0	0	0	55.45
14	0	0	0	54.36
15	0	0	0	-

经 SAS 软件分析, 三者影响均不显著。确定最佳方案为接种量 0.8 mL(孢子浓度 1.2×10^8 个/mL) 37 h 投料, 转化 72 h。

2.4 溶剂方式的确定

由于甾体为脂溶性化合物难溶于水, 因此底物在发酵液中的溶解和分散对转化的影响至关重要^[9], 考察了几种常用溶剂的处理方式, 结果见表 5。

表 5 不同底物处理方式对转化率的影响

Tab. 5 Effects of substrate dissolution method on conversion yield

处理方式	质量浓度/(g/dL)	转化率/%
乙醇	1.5	54.01
乙醇	2	48.37
吐温 80	0.03 (配以少许甘油聚醚)	66.41
二甲亚砜(DMSO)	1.5	55.69
二甲基甲酰胺(DMF)	1.5	40.09
丙二醇	1.5	35.07
甲醇	2	43.10

可见吐温水溶液更利于该菌的转化, 且溶剂成本最低, 而乙醇及其他有机溶剂不利于该菌转化, 尤其当投料浓度更高时, 有机溶剂的副作用将更明显, 以下实验均采用吐温水溶剂并添加少量甘油聚醚以防止产生过多泡沫。

2.5 C、D 配方的考察和投料时间的单因素确定

考察了两种培养基下菌体的生长状况, 生长曲线见图 1, 并分别于 40、42、44 h 投料, 结果见表 6。

从图 1 看, D 中菌体因速效氮源较多而生长快些, 菌丝量略高于 C, 且菌丝从外观上看更分散和细腻, 但抽滤相对困难。二者 pH 值差别较大, C 配方 pH 值较平缓, D 中 pH 值持续下降, 但从结果上看这对转化似乎并未有不利影响。C、D 的投料时间略有差别, C 在 pH 值刚刚升起时较好, D 则在 pH

值即将降到最低点时为好,但最佳投料时间都是在对数生长后期。两配方整体转化水平相当。

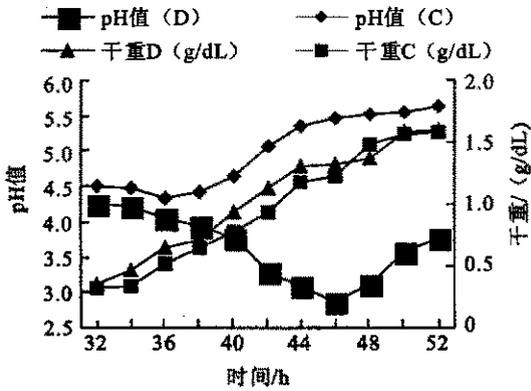


图1 不同培养基下金龟子绿僵菌生长曲线

Fig.1 The growth course of *Metarhizium anisopliae* under different culture medium

表6 不同培养基的投料时间确定

项目	不同投料时间转化率/%		
	40 h	42 h	44 h
C	71.22	69.47	64.40
D	66.59	70.95	69.71

2.6 二级摇瓶发酵工艺的确定

由于绿僵菌孢子萌发缓慢,导致生长期较长,为缩短发酵周期、提高设备利用率,可采取二级发酵。一级发酵采用B培养基,二级采用D培养基,一级培养36、38、40 h的菌体以15%的接种量接种二级,并分别于14、16、18 h投料,转化72 h,根据转化结果确定出一级种龄40 h,二级发酵16 h投料的转化率最高,达73.2%,而种龄越小,二级发酵时间就要相应延长。

2.7 新工艺的探讨

对于菌体转化, Hayano等实验证明羟基上的氧来自空气而不是水,氧是除底物以外的第二个重要因素^[10]。绿僵菌菌丝较细且分散,使得发酵液非常粘稠,而溶氧不足不仅使反应减慢,而且菌体易衰老而产生大量孢子,发酵液中会产生某种色素而变绿变黑,这种色素在提取和精制时无法除去,会影响成品质量。因此考察了稀释发酵液的转化工艺^[11],这不仅可以缩短转化周期,还可减少副产物的生成。将菌体经一级(B)培养36 h后移种15%至二级培养基(D),分别于17、19、21 h将发酵液取出30%和50%,再补以等量无菌水之后投料,同时以未经稀释的为对照,二级生长曲线见图2,65 h转化结果见表7数据。

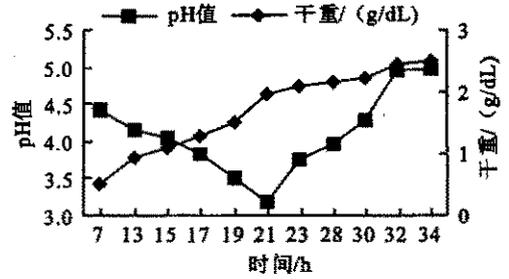


图2 二级生长曲线

Fig.2 Growth course of second step

表7 不同时间稀释发酵液转化结果

Tab.7 Conversion yield of diluted culture medium at different time

项目	转化率/%		
	17 h (pH 3.83, 干重 1.29 g/dL)	19 h (pH 3.51, 干重 1.53 g/dL)	21 h (pH 3.20, 干重 1.96 g/dL)
对照	67.91	66.31	62.17
稀释30%	69.43	71.42	68.42
稀释50%	67.20	68.92	70.83

结合生长曲线和转化率结果,可看出转化率和菌丝量有关,同时也和菌体的生理状态有关。19 h稀释30%最佳,比对照高近4%,而21 h稀释50%也好于对照3%,考虑到实际生产可以将一罐的菌丝平分两罐,易于操作且较经济,因此决定采用稀释50%的工艺。稀释后的发酵液颜色浅,易于抽滤,且发酵周期大大缩短,具有较大的应用前景。

3 总结

通过研究,最终确定了金龟子绿僵菌对16 α 、17 α -环氧黄体酮的摇瓶羟化反应工艺:浓度为1~1.2 $\times 10^8$ 个/mL的孢子液,接种量为0.8 mL。培养基配比分别如下:一级:葡萄糖3.0 g/dL,玉米浆2.5 g/dL,硫酸铵0.15 g/dL,蚕蛹粉0.2 g/dL,培养温度26~28 $^{\circ}\text{C}$,228 r/min,培养36 h,15%接种量,接种二级,二级葡萄糖调整为3.5 g/dL,其余同一级,继续培养至pH值降到最低点以前(20 h左右)将发酵液稀释一倍之后投料,投料浓度2 g/dL(吐温水溶料),转化65 h可达70%以上。

工艺的转化周期、营养的调整及添加因子等因素还有待研究,工艺的放大条件还有待确定和优化。

(下转第87页)

4 结 论

本研究以白首乌提取液的总抗氧化能力为量化指标,在单因素实验的基础上探索了用响应面法确定白首乌中抗氧化物质提取的最优工艺参数的可行性。取得了比较满意的结果,并最终确定白首

乌中抗氧化物质提取的最佳工艺条件为:提取温度 $70.1\text{ }^{\circ}\text{C}$,乙醇体积分数 75% ,提取时间 1.78 h ,提取次数为两次。在此条件下白首乌提取液的总抗氧化能力值为 158.68 U/g 。取此最佳条件进行验证实验,最终试验值与理论值相差 3.40% 。

参考文献:

- [1] 徐凌川,公华,许昌盛.白首乌化学成分与药理现代研究述评[J].中医药学刊,2003,21(11):1993.
- [2] 宋俊梅,丁霄霖.响应面白首乌中 C_{21} 甾苷及甾苷元清除羟自由基的功能[J].无锡轻工大学学报,1998,17(2):43-46.
- [3] 宋俊梅,王元秀,丁霄霖.白首乌 C_{21} 甾苷抗氧化作用的研究[J].食品科学,2001,22(12):22-26.
- [4] 吴有炜.试验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002,135-142.
- [5] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. *Technometrics*, 1960, 2: 456-475.
- [6] Fabio M, Antonio M M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1996, 31: 419-426.
- [7] Chandrika L P, Fereidoon S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology [J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(1): 47-56.
- [8] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版),2005,14(3):236-239.
- [9] 庞战军,周玫,陈瑗.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000,23-115.

(责任编辑 杨萌)

(上接第80页)

参考文献:

- [1] 王普,陈希杨,虞炳钧,等.新技术在甾体药物微生物转化中的应用[J].化工进展,2002,21(11):805-808.
- [2] 叶丽,史济平.甾体微生物转化在制药工业中的应用[J].工业微生物,2002,31(4):40-48.
- [3] Fernandes P, Cruz A, Angelova B et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003(32): 688-705.
- [4] Yang Kui, Li Xiao jing, Wang Ji-fen et al. Relationship between growth and morphology of *Metarhizium anisopliae* in biotransformation of steroid[J]. *Transactions of Tianjin University* 2001, 7(1): 1-6.
- [5] Revital Rapoport, David Sklan, Israel Hanukoglu. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{sec} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence[J]. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 17(2): 412-416.
- [6] 茅燕勇,沈珈琦,范伟平.葡枝根霉 NG0305 酶催化甾体 C11- α 羟基化的研究[J].生物加工过程,2004,2(2):46-51.
- [7] 吴有炜.实验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002.
- [8] 史济平,叶丽,深国祥,等.金龟子绿僵菌对甾族化合物的 11- α 羟化[J].上海医科大学学报,1997,24(4):265-268.
- [9] Blaga Angelova, Hans-Peter Schmauder. Lipophilic compounds in biotechnology—interactions with cells and technological problems[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999(67): 13-32.
- [10] 郭一平,郑璞.甾体微生物 C11- α 羟化反应的研究进展[J].浙江工业大学学报,2004,32(4):437-441.
- [11] 王敏,王春霞,路福平,等.甾体 11- β 羟基转化新工艺的研究[J].天津轻工业学院学报,2000(2):1-5.

(责任编辑 李春丽)