

• 生物育种与工艺优化 •

高效转化植物甾醇为 9 α -OH-AD 的分枝杆菌诱变选育及工艺优化

马洋¹, 王向栋¹, 王萌慧¹, 李会¹, 史劲松¹, 许正宏²

1 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

马洋, 王向栋, 王萌慧, 等. 高效转化植物甾醇为 9 α -OH-AD 的分枝杆菌诱变选育及工艺优化. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1198–1206.

Ma Y, Wang XD, Wang MH, et al. Mutation breeding of high 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione transforming strains from phytosterols and their conversion process optimization. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1198–1206.

摘要: 以实验室前期筛选得到的分枝杆菌(*Mycobacterium* sp. LY-1)为出发菌株, 采用等离子诱变(ARTP)技术选育出能高效转化植物甾醇为重要甾体药物中间体 9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9 α -OH-AD)的菌株, 并对其转化工艺进行优化。经过 ARTP 诱变选育得到遗传稳定性较好的分枝杆菌突变株 *Mycobacterium* sp. C33, 当底物植物甾醇投料浓度为 15 g/L 时, 转化生成 9 α -OH-AD 的摩尔得率达到 15.5%, 较原始菌株提高 34.8%。继而采用正交实验设计方法, 对突变菌的发酵培养基组分进行优化, 并建立了油水双相转化体系, 进一步提高了突变菌株 C33 的产物摩尔得率, 最高达到 47.0%, 较优化前(15.5%)提高了 2 倍。

关键词: 分枝杆菌, 植物甾醇, 9 α -OH-AD, 等离子诱变, 生物转化

Received: January 13, 2017; **Accepted:** March 29, 2017

Supported by: National High Technology Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A211), Jiangsu College and University Academic Degree Graduate Research and Innovation Program (No. KYLX16_0826).

Corresponding author: Hui Li. Tel: +86-510-85326883; Fax: +86-510-85328177; E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A211), 江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目(No. KYLX16_0826) 资助。

网络出版时间: 2017-04-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170411.1701.001.html>

Mutation breeding of high 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione transforming strains from phytosterols and their conversion process optimization

Yang Ma¹, Xiangdong Wang¹, Menghui Wang¹, Hui Li¹, Jinsong Shi¹, and Zhenghong Xu²

¹ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: In order to improve transformation efficiency of phytosterols into 9 α -hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione (9 α -OH-AD) by *Mycobacterium* sp. LY-1, we studied the strains breeding using atmospheric and room temperature plasma (ARTP) technology and optimized their conversion process. A high production strain named C33 with a good genetic stability was selected and the product molar yield reached to 15.5%, 34.8% higher than that of original strain with 15 g/L phytosterols. Furthermore, the fermentation medium was optimized through the design of orthogonal experiment. Besides, oil-water bidirectional transformation system was set up to improve the 9 α -OH-AD molar yield of mutant strain C33. With adding 12 mL soybean oil to each 1 g phytosterols, the molar yield of 9 α -OH-AD reached 47.0%, which increased twice than that of control (15.5%).

Keywords: *Mycobacterium* sp., phytosterol, 9 α -OH-AD, atmospheric and room temperature plasma, biotransformation

甾体激素类药物主要包括性激素、肾上腺皮质激素和蛋白同化激素三大类^[1]。甾体激素药物最首要的药效体现在对人类生育能力的改善^[2-4]，其次还具有显著的抗肿瘤、抗炎抗敏、抗菌抗病毒、抗痉挛等效果^[5-7]。由于甾体激素药物对人体机体发挥着十分重要的调节作用，因此该类药物现已成为仅次于抗生素的第二大品种。由于传统化学合成法带来严重的工业污染，并且存在收率低、成本高等问题，极大地限制了甾体激素在药物领域的发展，故近年来利用微生物转化逐渐成为主要发展趋势^[8]。

植物甾醇是大豆榨油后的下脚料，作为新的甾体资源，由于其来源丰富、价格低廉，使得产品价格大幅度下降，为甾体激素药物产品带来了新的市场。植物甾醇是一类疏水性化合物，它的

低溶解性导致的传质限制是其转化的瓶颈问题之一^[9]。双相转化体系一定程度上为解决这个问题提供了有力的技术保障，采用天然油脂能够增加甾醇溶解度，且对微生物的伤害较低^[10-13]。

9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮 (9 α -OH-AD) 是一种重要的甾体药物中间体^[14]，其 9 α 位作为被羟基化的位点，在进行简单的卤化反应后便可引入 F 或 Cl 等卤素取代基，从而有效提升某些皮质类激素 (如地塞米松、倍他米松、糠酸莫米松及氯地米松等药物) 的药效^[15]，因此研究由植物甾醇转化生成 9 α -OH-AD 具有广阔的市场前景。但利用微生物转化植物甾醇生成 9 α -OH-AD 仍存在转化率低、产物得率低及产物纯度不高等诸多问题。要切实提高转化率，可行的措施主要包括：一是通过诱变筛选方法获得优势菌株，二

是通过基因工程技术进行菌株改造,三是通过优化调整转化工艺。由于在分子操作方面尚存在一定难度,我们尝试以实验室 1 株可转化植物甾醇生成 9 α -OH-AD 的分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1 作为出发菌株,采用诱变结合工艺调整和优化的方法提升转化效率,以提高目的产物 9 α -OH-AD 的浓度。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1,由本实验室保藏。

1.1.2 试剂

植物甾醇(β -谷甾醇 47.0%,菜油甾醇 24.6%,豆甾醇 15.5%,菜籽甾醇 3.4%)购自湖北巨胜科技有限公司;9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9 α -OH-AD)购自上海瀚香生物科技,纯度为 98.0%以上。

1.1.3 培养基

PDA 斜面培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,琼脂 20。

种子培养基(g/L):NaNO₃ 5.4,酵母粉 15,甘油 2,(NH₄)₂HPO₄ 0.6。

发酵培养基(g/L):NaNO₃ 5.4,玉米浆 20,(NH₄)₂HPO₄ 0.6,植物甾醇 15,pH 8.0。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的培养

将 PDA 斜面保存的分枝杆菌菌体接种于无菌种子培养基,120 r/min、30 °C 摇床培养 72 h。

1.2.2 菌株诱变时间的选择

将斜面上挑取的分枝杆菌移至 100 mL 种子

培养基中,30 °C、120 r/min 摇床培养 72 h 至菌体的对数生长期,取 0.01 mL 菌液均匀地涂在金属载片上。把装有样品的金属载片平板放到 ARTP 诱变系统操作室里,逐渐增加诱变时间(15–210 s)进行诱变。诱变结束后,用镊子把金属载片移至装有 1 mL 培养基的 EP 管里,制成新的菌悬液。对新的菌悬液进行后培养 7 d,培养结束后记录下各平板的菌落数,计算诱变致死率,如下式,确定最佳诱变时间。

诱变致死率 =

$$\frac{\text{对照平板菌落数} - \text{诱变平板菌落数}}{\text{对照平板菌落数}} \times 100\%$$

1.2.3 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1 的 ARTP 诱变及发酵选育

在最佳诱变处理时间下,对分枝杆菌进行 ARTP 诱变操作。挑取 PDA 平板上的全部突变子于 10 mL/50 mL 的种子培养基中培养,然后进行发酵培养转化植物甾醇,测定 9 α -OH-AD 得率,筛选优势突变株并保种。

1.2.4 突变株的遗传稳定性评价

将筛选出的优势突变株分别进行转化培养,测定其 9 α -OH-AD 的生成能力,将保种管中的突变菌株分区划线于 PDA 固体培养基上培养 7 d,挑取单菌落于种子培养基中,120 r/min、30 °C 摇床培养 72 h 转接发酵培养基 7 d 后测定 9 α -OH-AD 得率,再将该种子液重新划线于 PDA 固体培养基上培养 7 d,挑取单菌落于种子培养基,按上述步骤重复 5 次,比较每次 9 α -OH-AD 得率,以考察突变菌株的遗传稳定性。

1.2.5 菌体生物量测定

菌体生物量以每升转化液中的菌体干重来表示。取洁净的离心管 75 °C 烘干至恒重,称重

记为 W_1 。准确量取 1 mL 的待测菌液置于离心管中, 12 000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 用乙酸乙酯清洗菌体 3 遍。将含菌体的离心管再次烘干至恒重, 称量得到菌体与离心管的重量之和, 记为 W_2 。 W_2 与 W_1 之差即为 1 mL 的待测菌液中的菌体干重。

1.2.6 产物提取

准确量取 0.5 mL 待测发酵液, 用等体积乙酸乙酯反复萃取 6 遍, 合并萃取后的上清液, 将上清液烘干得到底物、副产物、产物的混合物, 用 8 倍体积的乙腈复溶稀释后, 0.22 μ m 有机滤膜过滤除杂, HPLC 分析转化液中底物、副产物、产物含量。

1.2.7 分析方法

采用高效液相色谱法(HPLC)检测产物, 配制 0.5 g/L 的 9 α -OH-AD 标准品, 利用外标法计算目的产物的浓度。色谱柱, Agilent TC-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相, 乙腈/水(7:3, 体积比); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm; 流速 0.5 mL/min; 进样 10 μ L。

产物摩尔得率计算方法:

$$\text{产物摩尔得率} = (C_p \times M_s) / (C_s \times M_p) \times 100\%$$

$$\text{底物转化率} = (C_s - C) / C_s \times 100\%$$

式中, C_s 为底物 DHEA 的质量浓度(g/L); C 为待测转化液中产物的质量浓度(g/L); M_s 为底物摩尔质量(g/mol); M_p 为产物摩尔质量(g/mol)。

1.2.8 正交实验设计筛选最佳培养基组分

根据原始培养基组分设计 3 因素 3 水平正交试验(表 1)。按照实验设计分别配制发酵培养基。以 1.0% 的接种量将种子液转接到发酵培养液中, 30 $^{\circ}$ C、120 r/min 摇床培养 7 d。采用统计学方法分析实验结果, 确定最优培养基配方。

表 1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal test design

Levels	NaNO ₃	Corn steep liquor	(NH) ₂ HPO ₄
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
	A	B	C
1	4	15	0.4
2	5	20	0.6
3	6	25	0.8

1.2.9 油水双相转化体系的建立

按照每投加 1 g 底物, 加入 16 mL 的油量向发酵培养基中加入大豆油、菜籽油、葵花籽油、橄榄油, 并与无油转化进行对比, 比较 5 种条件下 9 α -OH-AD 的积累量。

选择最佳的油水转化方式后, 对油的添加浓度进行梯度优化, 当投加每 1 g 底物时, 分别加入 4、8、12、16、20 mL 油量进行转化, 30 $^{\circ}$ C, 120 r/min 培养 7 d 后, 乙酸乙酯萃取发酵液进行 HPLC 检测, 根据 9 α -OH-AD 得率, 确定最优的油添加浓度。

2 结果与分析

2.1 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1 的 ARTP 诱变

2.1.1 最佳诱变时间的确定

将分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1 经 ARTP 诱变照射不同时间后进行再生培养, 根据再生单菌落数计算其致死率, 结果如图 1 所示。随着 ARTP 诱变时间的延长, 菌体致死率迅速增加。当照射时间为 150 s 时, 菌体致死率达到 98.0% 左右, 当达到 180 s 时, 平板无菌体生长, 由于等离子诱变在致死率较高时比较易发生正向突变, 故选择 150 s 作为原生质体的处理时间。

2.1.2 突变菌株的选育及转化能力验证

在 ARTP 诱变系统操作室对菌体照射 150 s 后,涂布于 PDA 平板上培养 7 d,从单菌落中挑取 150 株突变株,测定各突变株的 9α -OH-AD 得率。如图 2、3 所示,通过摇瓶转化实验验证,最终筛选得到 8 株正向突变菌株 C3、C12、C21、C25、C27、C33、C39、C49,其中 C33 产物得率较野生菌提高最多, 9α -OH-AD 摩尔得率达到 15.5%。

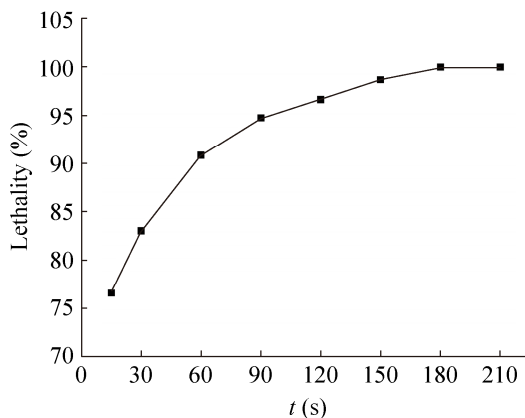


图 1 不同诱变时间菌体的致死率

Fig. 1 The lethality of the cells in different mutagenic time.

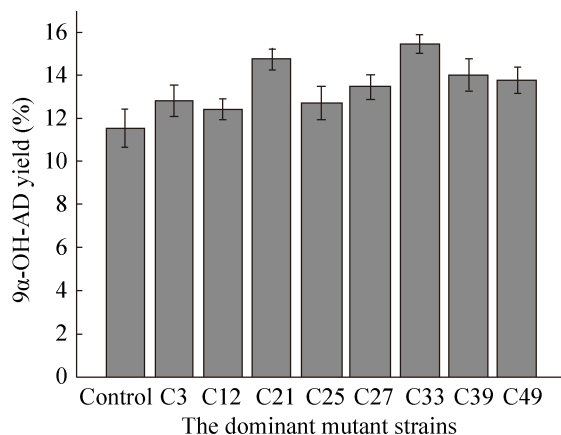


图 2 优势突变菌株的筛选

Fig. 2 Screening of dominant mutant strains.

2.1.3 最佳诱变时间的确定

将突变株 C33 进行传代培养,以考察其遗传稳定性。如图 4 所示,经过连续 5 代的培养,确定其为 1 株稳定性好且转化率高的菌株。

2.2 突变菌株的转化工艺优化

2.2.1 培养基组分的优化

培养基的组分、配比、缓冲能力都对微生物的生长和产物形成有重要的影响。本试验采用正交实验设计方法,在摇瓶中对分枝杆菌转化植物甾醇的培养基组分(NaNO_3 、玉米浆和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)进行优化,进一步研究各组分对菌种转化能力的影响。设计了三因素三水平的正交试验,以 9α -OH-AD 的浓度为指标,选用 $L_9(3^3)$ 正交表进行培养基的进一步优化,并进行极差分析。正交试验结果见表 2。

由极差 R 值可知, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 浓度对转化产物的形成影响最为显著,然后依次是玉米浆、 NaNO_3 。正交实验得到的理论最佳培养基配方为 $A_2B_3C_2$,即 NaNO_3 5 g/L,玉米浆 25 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.6 g/L,此条件下 9α -OH-AD 得率最高。

2.2.2 油水双相转化体系的构建及优化

油水双相转化体系的建立:构建油水双相体系可以很大程度地提高 9α -OH-AD 的积累量,两相体系中用到的大豆油脂,能够有效增加甾醇溶解度,且相比有机溶剂对微生物的伤害性更低。在转化过程中,加入油脂可以提高甾醇的投料量和菌体的活力^[16-17],因此采用该体系,利用突变菌株 C33 转化植物甾醇,从图 5 可以看出,大豆油-水双相体系下 9α -OH-AD 的得率最高,并且大豆油的价格相对也较低,故采用大豆油进行后续实验。从图 6 可以看出, 9α -OH-AD 浓度在转化 7 d 左右的时间达到最高,摩尔得率达到 43.0%以上。

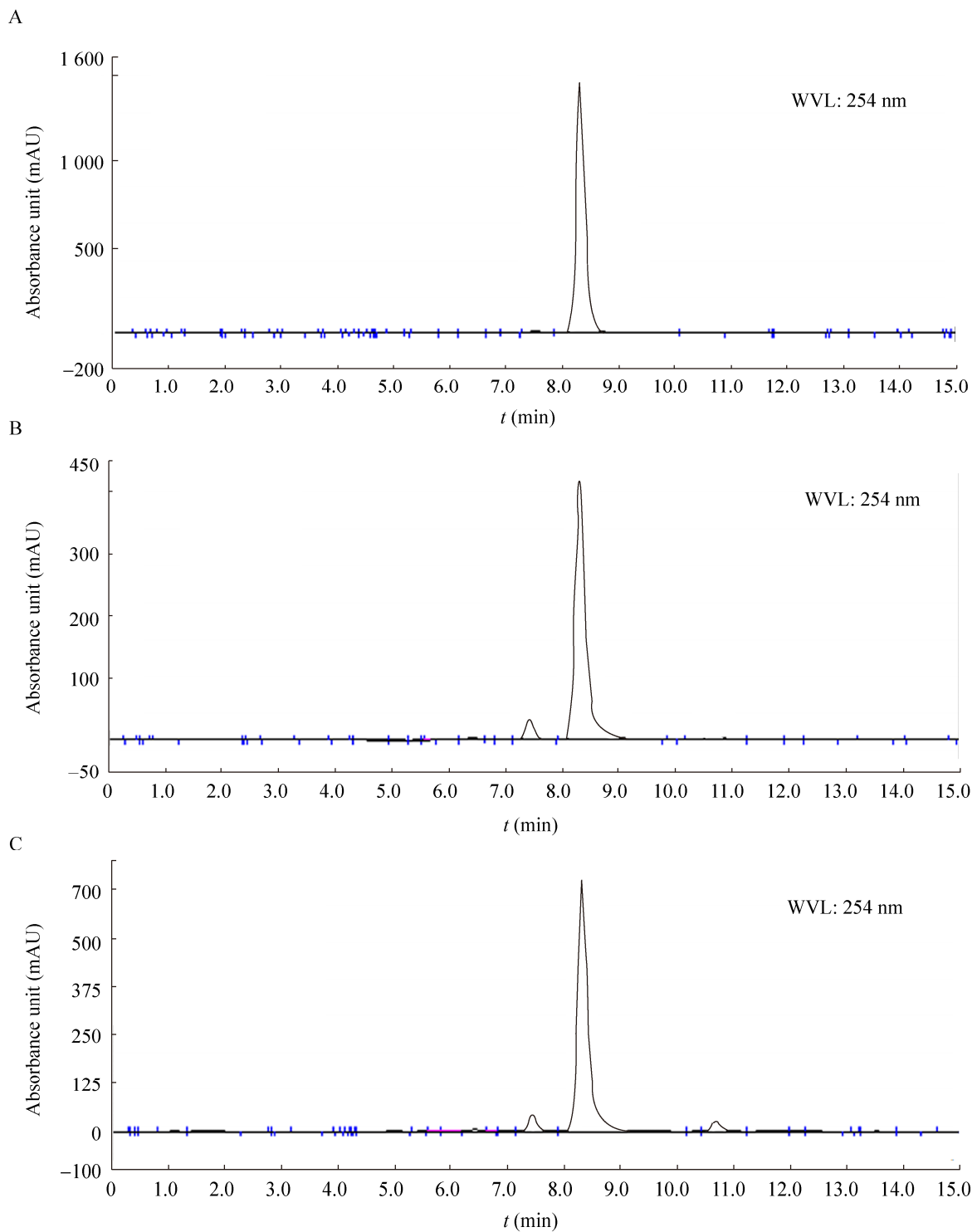


图3 产物 HPLC 检测图谱 (A: 9α -OH-AD 标样, B: 出发菌株 LY-1, C: 诱变菌株 C33)

Fig. 3 Detection of the product by HPLC (A: 9α -OH-AD standard, B: original strain LY-1, C: mutagenic strain C33).

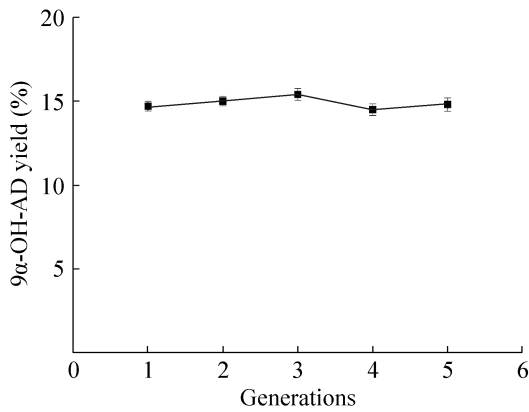


图4 突变菌株 C33 的遗传稳定性

Fig. 4 Genetic stability of mutant strain C33.

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

Group	A	B	C	9α-OH-AD yield (%)
1	1	1	1	13.71
2	1	2	2	13.88
3	1	3	3	12.44
4	2	1	2	15.42
5	2	2	3	11.81
6	2	3	1	14.61
7	3	1	3	12.89
8	3	2	1	9.56
9	3	3	2	15.06
Average 1	1.48	1.55	1.40	
Average 2	1.55	1.30	1.64	
Average 3	1.39	1.56	1.37	
Mean square (R)	0.16	0.26	0.27	

大豆油添加浓度的优化：在建立油水双相体系并大大提高 9α-OH-AD 得率后，本实验对大豆油进行了进一步的浓度优化，结果如图 7 所示。当大豆油的添加量为每 1 g 植物甾醇添加 12 mL 时，9α-OH-AD 的摩尔得率最高，达到 47.0% 以上。

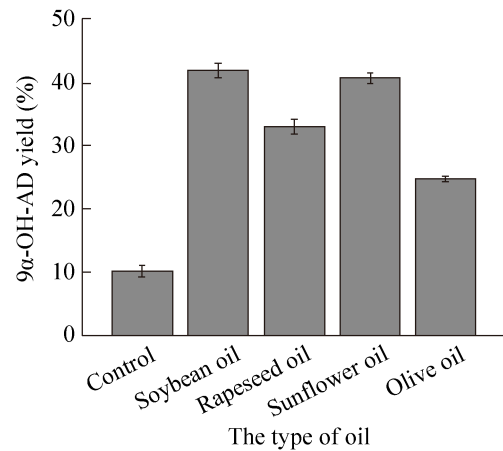


图5 油水双相体系中油类的筛选

Fig. 5 Screening of oil in biphasic system.

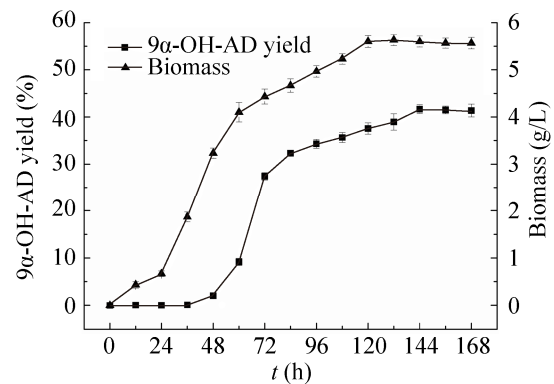


图6 突变菌株 C33 油水双相体系转化参数

Fig. 6 Batch conversion process of oil-water biphasic system with C33.

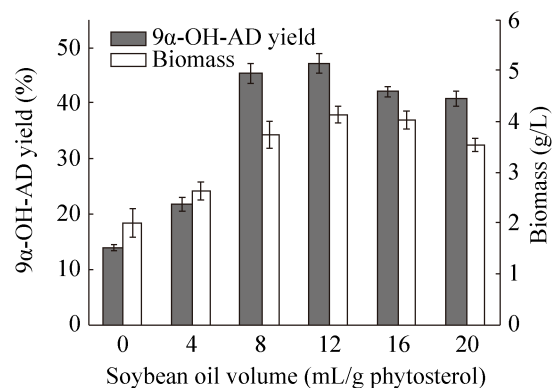


图7 不同油梯度的转化效果

Fig. 7 Effects of different soybean oil concentrations on product yield.

3 结论

本实验以实验室保存的分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. LY-1 为出发菌株,采用等离子诱变技术(ARTP)对菌株进行诱变选育。通过筛选,成功获得了 1 株遗传稳定性良好,且能高效转化植物甾醇产 9 α -OH-AD 的突变菌株 C33,并对诱变菌的发酵培养基进行了正交实验优化,确定了最适培养基组分为:NaNO₃ 5 g/L,玉米浆 25 g/L,(NH₄)₂HPO₄ 0.6 g/L。此外,建立了油水双相转化体系,优化后得到当每 1 g 植物甾醇添加 12 mL 大豆油时 9 α -OH-AD 得率最高,投加 15 g/L 底物时,9 α -OH-AD 摩尔得率可达到 47.0%以上。

目前利用微生物转化植物甾醇的产物多为 AD 与 ADD 或以 AD 为底物转化生成 9 α -OH-AD,直接由植物甾醇生成 9 α -OH-AD 的报道相对较少,后续研究希望通过提高底物投料量,为工业化生产创造更大的价值。本实验中大豆油的作用机制尚不明确,仅了解到其对底物起到助溶作用,但对菌体细胞膜结构是否存在影响从而增强了底物传质效率,仍需要进一步实验探究。本文的研究结果可作为大豆油作用机制的研究基础,对于其他微溶于水底物的生物转化研究也具有一定的参考价值。

REFERENCES

- [1] Wang M. Study on the 11 β -hydroxylation of steroids by *Curvularia lunata*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2001 (in Chinese).
王敏. 新月弯孢霉的甾体 11 β -羟基化作用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2001.
- [2] AsselinLabat ML, Vaillant F, Sheridan JM, et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, 2010, 465(7299): 798–802.
- [3] Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(2): 89–95.
- [4] Rubtsov AV, Rubtsova K, Kappler JW, et al. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(7): 494–498.
- [5] Bäckström T, Haage D, Löfgren M, et al. Paradoxical effects of GABA-A modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. *Neuroscience*, 2011, 191(Special issue): 46–54.
- [6] Douglas M. Neurology of endocrine disease. *Clin Med*, 2010, 10(4): 387–390.
- [7] Garcia-Segura LM, Balthazart J. Steroids and neuroprotection: new advances. *Front Neuroendocrinol*, 2009, 30(2): 5–9.
- [8] Chen DJ, Zhu BQ. Application of microbial transformation in modern pharmaceutical industry. *Chin J Antibiot*, 2006, 31(2): 112–118 (in Chinese).
陈代杰, 朱宝泉. 微生物转化技术在现代医药工业中的应用. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(2): 112–118.
- [9] Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(6): 1423–1447.
- [10] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 30(1): 81–87.
- [11] Yang Y. Research on study on bioconversion of phytosterols into steroid medicine intermediates by *Mycobacterium* sp. [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009 (in Chinese).
杨英. 微生物转化植物甾醇制备甾体药物关键中间体研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [12] Xu YG. Side-chain cleavage of phytosterols by *Mycobacterium* sp. MB 3683 [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
徐阳光. 分枝杆菌降解植物甾醇侧链过程基础研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

- [13] Gao XQ, Feng JX, Hua Q, et al. Biotransformation of phytosterols to 9 α -hydroxyandrostenedione by *Mycobacterium* sp. in oil-water emulsion system. J East China Univ Sci Technol: Nat Sci Ed, 2014, 40(4): 433–437 (in Chinese).
高兴强, 冯建勋, 花强, 等. 油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产 9 α -羟基雄甾烯酮工艺研究. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2014, 40(4): 433–437.
- [14] Rheenen VV, Shephard KP. ChemInform abstract: new synthesis of cortico steroids from 17-keto steroids: application and stereochemical study of the unsaturated sulfoxide-sulfenate rearrangement. J Org Chem, 1979, 44(9): 1582–1584.
- [15] Yang YL, Yang SK, Wu ZL. Development of 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (9 α -OH-AD) through cleaving sterol sidechain by fermentation of *Mycobacterium fortuitum*. Chin J Appl Environ Biol, 2015, 21(2): 256–262 (in Chinese).
杨亚力, 杨顺楷, 吴中柳. 偶发分枝杆菌发酵断甾醇侧链积累 9 α -羟基雄烯二酮. 应用与环境物学报, 2015, 21(2): 256–262.
- [16] Ceen EG, Herrmann JPR, Dunnill P. Solvent damage during immobilised cell catalysis and its avoidance: studies of 11 α -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 9(6): 365–368.
- [17] Phase N, Patil S. Natural oils are better than organic solvents for the conversion of the conversion of soybean sterols to 17-ketosteroids by *Mycobacterium fortuitum*. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10(2): 228–229.

(本文责编 郝丽芳)