

研究报告

离子液体-水双相体系中 *Gibberella intermedia* C1 双羟化去氢表雄酮(DHEA)姚韧辉¹ 董卓¹ 李会^{2*} 许正宏²

(1. 唐山职业技术学院 河北 唐山 063000)

(2. 江南大学药学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】考察离子液体-水双相体系中赤霉菌(*Gibberella intermedia* C1)双羟化甾体类底物去氢表雄酮(DHEA)生成三羟基雄甾烯酮(7 α ,15 α -diOH-DHEA)的生物转化过程。【方法】比较 5 种不同种类的离子液体([Hmim][PF₆]、[Bmim][PF₆]、[Bmim][BF₄]、[Bmim][NTF₂]、[Emim][EtSO₄])对底物转化率和产物得率的影响。优化该双相体系中离子液体的浓度、底物的投料浓度及投料时间等。【结果】选择[Emim][EtSO₄]作为构建该体系的离子液体。摇瓶中最适双相体系转化条件为:菌体生长 12 h 后,向转化培养基中加入 0.8% (体积比)的[Emim][EtSO₄],同时投加 6 g/L 底物 DHEA。在 5 L 发酵罐上,当转化至 60 h 时,产物浓度高达 5.03 \pm 0.21 g/L,7 α ,15 α -diOH-DHEA 产物摩尔得率达到最高 75.5%。【结论】确定了离子液体-水双相转化体系的最适转化条件,并在 5 L 发酵罐中进行了实验,为该体系的工业化应用奠定了基础。

关键词: DHEA, 7 α ,15 α -diOH-DHEA, *Gibberella intermedia* C1, 离子液体, 双相体系

Dihydroxylation of dehydroepiandro sterone (DHEA) by *Gibberella intermedia* C1 in an ionic liquid-water biphasic systemYAO Ren-Hui¹ DONG Zhuo¹ LI Hui^{2*} XU Zheng-Hong²

(1. Tangshan Vocational & Technical College, Tangshan, Hebei 063000, China)

(2. Jiangnan University, School of Pharmaceutical Science, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This paper studied the biotransformation of the catalytic substrate dehydroepiandrosterone (DHEA) generated 7 α ,15 α -diOH-DHEA by *Gibberella intermedia* C1 in the ionic liquid-water biphasic system. [Methods] The comparison of substrate conversion rates and product yields in five different ILs/water two-phase systems was carried out. And then, the optimization of bioconversion process in ionic liquid-water biphasic system was investigated to establish a suitable biphasic system with *G. intermedia* C1. [Results] The optimal conversion condition in ionic liquid-water biphasic system was as follows: 6 g/L DHEA and [Emim][EtSO₄]

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A211)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85326883; E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn

Received: November 18, 2016; **Accepted:** January 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 19, 2017

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (No. 2011AA02A211)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85326883; E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-18; **接受日期:** 2017-01-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-01-19

(VILs: Vwater=0.8) were simultaneously added after 12 h fermentation of *G. intermedia* C1. In addition, the amplification experiments were carried out in 5 L fermentor. At 60 h fermentation of *G. intermedia* C1, the concentration of 7 α ,15 α -diOH-DHEA increased to 5.03 \pm 0.21 g/L and the product molar yield reached 75.5%. **[Conclusion]** The optimal conversion condition in ionic liquid-water biphasic system was determined and the amplification experiments were carried out on the 5 L fermentor, which laid a solid foundation for industrial application further.

Keywords: DHEA, 7 α ,15 α -diOH-DHEA, *Gibberella intermedia* C1, Ionic liquids, Biphasic system

近年来甾体药物的应用领域不断扩大,在消炎、利尿、避孕、抗病毒以及抗肿瘤等方面有较好的疗效^[1-2]。甾体药物是全球市场占有率第二大类药物,产业发展态势良好^[3]。三羟基雄甾烯酮(7 α ,15 α -diOH-DHEA)是一种重要的医药中间体,可用于合成全球销量较大的口服避孕药“Yasmin”的活性成分屈螺酮^[4]。利用 *Gibberella intermedia* C1 能够将去氢表雄酮(Dehydroepiandrosterone, DHEA)转化为 7 α ,15 α -diOH-DHEA^[5](图 1),但是 DHEA 在水中的低溶解度极大地限制其双羟化效率^[6]。目前,有机溶剂-水双相体系的应用有效解决了甾体底物水溶性差的问题,同时省去产物后续分离提取操作步骤^[7]。但有机溶剂会影响微生物细胞结构和代谢过程,导致许多杂质的产生^[8],并且有机溶剂的使用不仅污染环境,还会危害人体健康,无法满足绿色安全生产要求。

离子液体作为一种新型绿色化学溶剂,在生物催化领域中逐渐替代有机溶剂发挥较强的作用。2000 年, Cull 等首次将离子液体[Bmim][PF₆]应用于 *Rhodococcus* R312 全细胞生物转化过程,成功将 1,3-异苯二甲腈转化为 3-氰基苯甲酰胺和 3-氰基苯

甲酸^[9];2001 年,Howarth 等成功将[Bmim][PF₆]应用于固定化面包酵母还原酮类化合物的催化反应中^[10]。Pfruender 等实验证明 *Lactobacillus kefir*、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae* 三种细胞在[Bmim][PF₆]、[Bmim][NTF₂]、OMA[NTF₂]离子液体-缓冲液溶液的两相体系中均能够维持良好的细胞膜完整性和生物催化能力^[11-12]。Wu 等在[Bmim][PF₆]、[Bmim][NTF₂]两种离子液体-水双相体系中研究了 *Rhizopus nigricans* 羟化甾体类底物 16 α ,17-环氧黄体酮生成 11 α -16 α ,17-环氧黄体酮,发现[Bmim][PF₆]离子液体对真菌细胞无明显毒害作用,并大幅度提高了底物转化效率。与传统有机溶剂相比,离子液体具有不易挥发、不易燃等优点,在真菌全细胞生物转化中具有巨大的应用潜力^[13]。

基于以上分析,本文分别考察两种疏水性离子液体[Hmim][PF₆]、[Bmim][PF₆]和 3 种亲水性离子液体[Bmim][BF₄]、[Bmim][NTF₂]、[Emim][EtSO₄]对 *G. intermedia* C1 双羟化 DHEA 反应的影响,构建合适的离子液体-水双相体系;并在此基础上,优化双羟化反应条件,以期进一步提高产物摩尔得率。

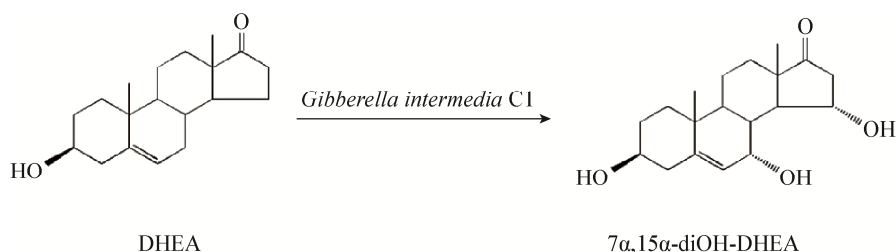


图 1 *G. intermedia* C1 转化 DHEA 的反应式
Figure 1 Biotransformation of DHEA by *G. intermedia* C1

1 材料与方法

1.1 菌株

G. intermedia C1, 本实验室筛选并保藏。

1.2 主要试剂和仪器

DHEA 和 7 α ,15 α -diOH-DHEA 均为化学纯, 浙江省台州市兴业化工有限公司; 离子液体 1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([Bmim][PF₆])、1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([Hmim][PF₆])、1-乙基-3-甲基咪唑硫酸乙酯盐([Emim][EtSO₄])、1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Bmim][BF₄])和 1-丁基-3-甲基咪唑双三氟甲基磺酰亚胺盐([Bmim][NTF₂])均为实验纯, 上海成捷化学有限公司; 乙腈(色谱纯), 国药集团化学试剂公司; 其他试剂均为市售分析纯。

UltiMate 3000 型液相色谱仪, 美国戴安有限公司; Agilent TC-C₁₈ 高效液相色谱柱, 北京京科瑞达科技有限公司; HYL-C 组合式摇床, 太仓强乐实验设备有限公司; SPX-250B-Z 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司; 梅特勒 AL104 电子天平, 梅特勒-托利多公司。

1.3 培养基

固体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0、酵母粉 7.5、NaCl 1.5、KH₂PO₄ 2.5、琼脂 20.0, pH 7.0。种子培养基(g/L): 葡萄糖 10.0、酵母粉 7.5、NaCl 1.5、KH₂PO₄ 2.5, pH 7.0。转化培养基(g/L): 葡萄糖 10.0、酵母粉 20.0、玉米浆 9.0、FeSO₄ 0.1, pH 7.0。以上培养基灭菌条件均为 0.1 MPa、15 min。

1.4 培养和转化方法

1.4.1 菌种活化: 将保藏于-80 °C 的 *G. intermedia* C1 接种至斜面固体培养基中, 于 28 °C 培养 48 h, 待斜面表面长出均匀白色菌丝体后置于 4 °C 保存备用。

1.4.2 种子培养: 从斜面固体培养基挑取 2-3 环菌丝体接种于装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h。

1.4.3 菌体培养: 将种子液以 4%接种量接种至装有 30 mL 转化培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h。

1.4.4 生物转化: 在上述培养了 24 h 的菌悬液中加入适量不同种类的离子液体和一定浓度的底物 DHEA, 随后将摇瓶 30 °C、220 r/min 转化 72 h。同时以不添加离子液体的转化实验为对照组。

1.4.5 5 L 发酵罐转化: 在选取最适离子液体基础上, 对其在摇瓶中筛选好的最佳转化条件进行 5 L 发酵罐放大实验。温度为 30 °C, 搅拌转速为 400 r/min, 通气量为 0.18 m³/h。通过自动流加 40%的醋酸或 10%的氢氧化钠来调控转化过程的 pH 为 7.0。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量的测定: 将离心管洗净并称管重, 得到空离心管重, 即为 P₀。在发酵过程中, 取一定体积(1 mL)的菌液加入离心管中, 离心弃去上清, 再用无菌水将菌体洗涤 3 次。将菌体置于 75 °C 烘箱中烘干至恒重。称量得到菌体加离心管的重量之和, 为 P₁。P₁ 与 P₀ 重量之差为菌体的生物量。

1.5.2 HPLC 分析: 取 500 μ L 发酵液, 加入等体积乙酸乙酯振荡萃取, 离心收集有机相, 萃取 7 次合并萃取得到的有机相后烘干, 得到白色固体粉末, 用 5 倍体积的乙腈复溶, 0.22 μ m 有机滤膜过滤。采用 UltiMate 3000 型液相色谱仪进行测定, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 柱温 30 °C, 紫外检测器, 检测波长为 216 nm。流动相为乙腈:水为 7:3 (体积比), 流速为 0.5 mL/min, 进样量 10 μ L。产物摩尔得率计算方法:

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

$$\text{底物转化率} = (C_s - C_0) / C_s \times 100\%$$

式中: C_0 、 C_s , 初始及检测点的底物 DHEA 的质量浓度(g/L); C_p , 待测转化液中产物的质量浓度(g/L); M_s , 底物摩尔质量(g/mol); M_p , 产物摩尔质量(g/mol)。

2 结果与讨论

2.1 离子液体种类筛选

考察了 2 种疏水性离子液体[Hmim][PF₆]、[Bmim][PF₆]和 3 种亲水性离子液体[Bmim][BF₄]、[Bmim][NTF₂]、[Emim][EtSO₄]对 *G. intermedia* C1 双羟化 DHEA 反应的影响。此时, 底物 DHEA 的投料浓度为 4 g/L, 离子液体添加浓度分别为低浓度 0.8% (体积比)和高浓度 1.5% (体积比) 结果见表 1。

表 1 不同种类离子液体对 DHEA 双羟化反应的影响
Table 1 The effects of the ionic liquids types on the dihydroxylation of DHEA

离子液体种类 The types of ionic liquids	离子液体添加浓度 The adding concentration of ionic liquids (%)	生物量 Biomass (g/L)	底物转化率 The conversion rate (%)	产物得率 Product yield (%)
对照组 Control	0	24.1±1.0	73.0±1.5	43.4±0.7
[Hmim][PF ₆]	0.8	20.3±1.2	58.1±0.7	24.4±1.0
	1.5	15.5±0.8	37.7±0.5	13.0±0.2
[Bmim][PF ₆]	0.8	18.3±0.7	41.7±1.0	19.7±0.9
	1.5	15.5±0.5	30.1±1.4	10.1±0.4
[Bmim][BF ₄]	0.8	18.8±0.8	61.8±1.8	36.3±1.8
	1.5	14.2±1.1	64.2±1.4	38.2±1.6
[Bmim][NTF ₂]	0.8	19.2±1.4	48.6±0.7	16.7±0.6
	1.5	13.3±0.4	41.8±0.8	15.6±0.3
[Emim][EtSO ₄]	0.8	24.2±1.4	85.6±1.8	51.0±1.2
	1.5	22.3±1.2	65.6±1.3	42.5±0.4

由表 1 可知:[Emim][EtSO₄]离子液体-水双相体系中双羟化反应效果明显好于其他实验组。低浓度(0.8%, 体积比)的[Emim][EtSO₄]-水体系中产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 得率最高, 达到 51.0%±1.2%, 与对照相比提高了 17.5%; 离子液体[Hmim][PF₆]、[Bmim][PF₆]、[Bmim][BF₄]和[Bmim][NTF₂]对菌体毒害作用明显, 菌体的生物量较对照有所降低; 同时, 即使在低浓度条件下, 底物 DHEA 转化率、7 α ,15 α -diOH-DHEA 产物得率也明显低于对照组。据 Couling 等^[14]的研究结果报道, 离子液体对于生物转化反应的影响与离子液体结构相关; 随着阳离子母体咪唑环上碳链的延长, 离子液体亲脂性增强, 从而增大了离子液体对细胞膜的损害, 对菌体细胞毒害作用增强。本研究用到的其他离子液体如 [Hmim][PF₆]、[Bmim][PF₆]、[Bmim][NTF₂] 和 [Bmim][BF₄]阳离子咪唑环上的碳链较长, 对赤霉菌及其酶系统具有一定的毒性。因此选取的最适离子液体为[Emim][EtSO₄]。

2.2 [Emim][EtSO₄]浓度对 DHEA 双羟化反应的影响

双相体系中, 离子液体的添加浓度对菌体的生物转化反应至关重要, 因此进一步考察了最适离子

液体[Emim][EtSO₄]的浓度对赤霉菌双羟化底物 DHEA 的影响(图 2)。结果表明, 随着离子液体浓度的提高, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的摩尔得率先增后减。当[Emim][EtSO₄]离子液体添加浓度为 0.8% (体积比)时, 底物转化率和产物得率均达到最高。因此, [Emim][EtSO₄]的最适添加浓度为 0.8%。

2.3 底物投料浓度对 DHEA 双羟化反应的影响

为了进一步提高目的产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的得率, 本文进一步提高了底物 DHEA 的投料浓度, 考察了其浓度对[Emim][EtSO₄]离子液体-水双相体系中转化反应的影响, 结果如图 3 所示。随着 DHEA 投料浓度的增大, 7 α ,15 α -diOH-DHEA 产物得率先上升后下降。当 DHEA 浓度为 6 g/L 时, 底物的转化率及产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的得率均达到最大, 分别为 90.0%±0.8%和 62.0%±0.3%。当底物浓度进一步提高时, 产物得率下降趋势比较显著。分析其原因可能是在[Emim][EtSO₄]离子液体-水双相体系中底物 DHEA 传质阻力相对较小, 增大 DHEA 投料浓度加重了对菌体的伤害, 从而导致菌体羟化活力下降(图 4)^[15]。因此, 在[Emim][EtSO₄]离子液体-水双相体系中, 底物 DHEA 的最适投料浓度为 6 g/L。

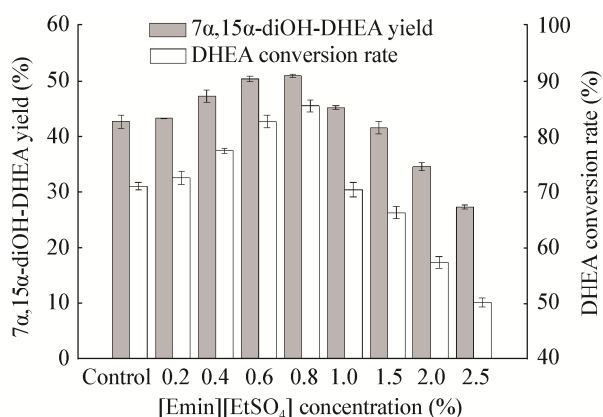


图2 [Emim][EtSO₄]离子液体浓度对DHEA双羟化反应的影响

Figure 2 The effects of the [Emim][EtSO₄] concentrations on the dihydroxylation of DHEA

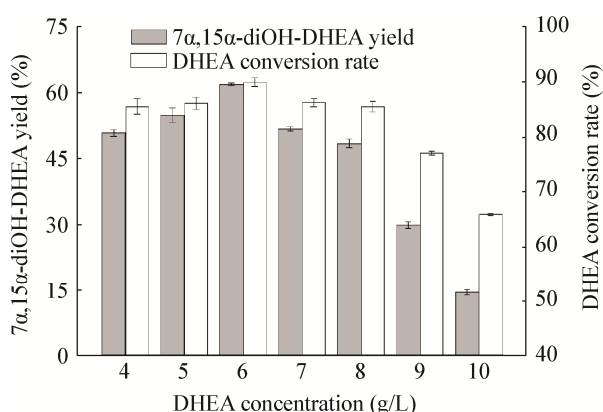


图3 不同底物DHEA投料的浓度对DHEA双羟化反应的影响

Figure 3 The effects of the substrate DHEA concentrations on the dihydroxylation of DHEA

2.4 底物投料时间对DHEA双羟化反应的影响

由于DHEA的双羟化反应主要由微生物细胞内的P450羟化酶发挥作用^[3]。此类生物转化所采用的转化方式均是当菌体生长到一定阶段,即细胞中的P450羟化酶活性较高时,再进行底物DHEA的投加。因此,本研究在*G. intermedia* C1生长的不同时间(0、6、12、18、24和30 h)加入0.8% (体积比)的[Emim][EtSO₄]和6 g/L的DHEA至转化培养基,考察了底物投料时间对DHEA双羟化反应的影响(图5)。结果表明,在菌体生长后12 h投加

底物转化时,底物DHEA转化率和7α,15α-diOH-DHEA得率均较高,分别达到95.2%±0.3%和70.3%±1.0%。投料时间的提前或延后,底物DHEA转化率和7α,15α-diOH-DHEA得率均有所降低。可能的原因是,菌体生长早期细胞的生长量与活力均不足,羟化酶活性较低。然而在菌体生长后期进行底物投料,菌体生长停滞,代谢缓慢,底物DHEA对羟化酶的诱导效果不显著,从而影响了菌株对底物DHEA的转化效率。在菌体生长12 h时,菌体代谢旺盛,羟化酶活性较高,因此有利于DHEA的双羟化反应。

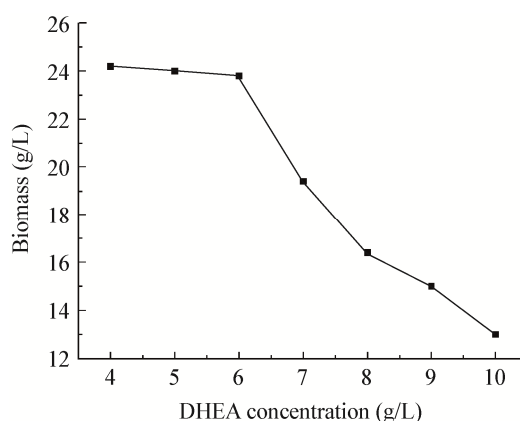


图4 不同底物DHEA投料浓度对生物量的影响

Figure 4 The effects of the substrate DHEA adding concentrations on the biomass

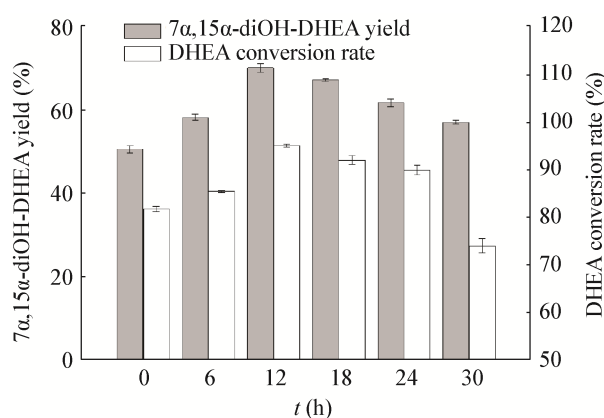


图5 底物DHEA投料时间对DHEA双羟化反应的影响

Figure 5 The effects of the substrate DHEA adding times on the dihydroxylation of DHEA

2.5 5 L 发酵罐放大实验

根据以上研究结果,最终确定了摇瓶中离子液体-水双相体系的最适转化条件为:菌体生长 12 h 后,向转化培养基中加入 0.8% (体积比) [Emim][EtSO₄] 和 6 g/L 底物 DHEA。在以上最适条件下,对体系进行了 5 L 发酵罐的放大实验,考察了在离子液体-水双相体系中 *G. intermedia* C1 双羟化 DHEA 的转化过程,如图 6 所示。结果表明,在转化 60 h 时,产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的浓度最高,达到 5.03 \pm 0.21 g/L,其摩尔得率为 75.5%。从而有效证明了构建的离子液体-水双相体系应用于 *G. intermedia* C1 双羟化反应具有操作简单、转化率高等优点。

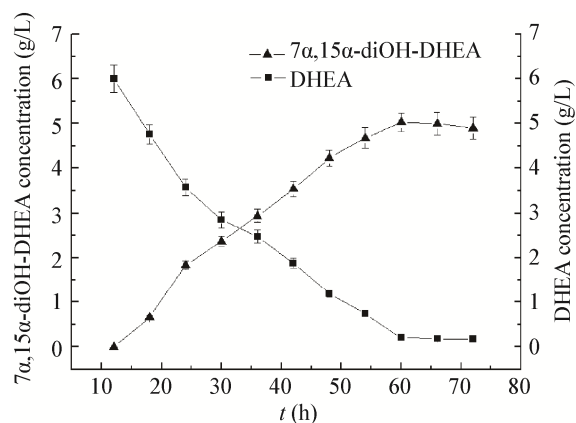


图 6 5L 发酵罐中赤霉菌转化底物 DHEA 的过程曲线
Figure 6 The bioconversion curve of *Gibberella intermedia* C1 from DHEA in 5 L fermentor

3 结论

离子液体具有良好的热稳定性和化学稳定性、毒性低且能够回收利用,是对环境友好的新型绿色溶剂,已逐渐取代挥发性有机溶剂应用于催化合成、分离分析等众多领域^[16]。本文通过构建离子液体-水双相体系用于 *G. intermedia* C1 双羟化 DHEA 的反应中,有效改善了底物 DHEA 溶解度低的问题,提高产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的得率。在摇瓶发酵时,当菌体生长 12 h 后,加入 0.8% (体积比) 的 [Emim][EtSO₄] 和 6 g/L 底物 DHEA,产物得率达到 62.0%。此外,进一步在 5 L 发酵罐中进行了放大实验,产物 7 α ,15 α -diOH-DHEA 的得率达到最高,提高至 75.5%,转化时间也由摇瓶的 72 h 缩短至 60 h。

实验结果表明本文构建的离子液体-水双相转化体系具有操作简单、生物相容性好、有效提高转化率等优点,可成功应用于 *G. intermedia* C1 双羟化 DHEA 的转化体系中,为其规模化生产奠定一定的基础。

参考文献

- [1] Pollard DJ, Woodley MJ. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: The future is now[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 25(2): 66-73
- [2] Mahato SB, Garai S. Advances in microbial steroid biotransformation[J]. Steroids, 1997, 62(4): 332-345
- [3] Tong WY, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2009, 3(2): 141-153
- [4] Romano A, Romano D, Ragg E, et al. Steroid hydroxylations with *Botryodiplodia malorum* and *Colletotrichum lini*[J]. Steroids, 2006, 71(6): 429-434
- [5] Li H, Fu ZZ, Zhang XM, et al. The Efficient Production of 3 β ,7 α ,15 α -Trihydroxy-5-Androsten-17-One from Dehydroepiandrosterone by *Gibberella intermedia*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(8): 2960-2971
- [6] Yang K, Li XJ, Feng X, et al. Effects of substrate dispersion and dissolution on microbial enzymatic conversion of steroid[J]. Microbiology China, 2001, 28(6): 68-71 (in Chinese)
阳葵, 李晓静, 冯霞, 等. 底物的分散和溶解对甾体微生物酶反应的影响[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 68-71
- [7] Fu ZZ. Studies on screening of *Gibberella intermedia* and its bioconversion conditions for the preparation of 3 β ,7 α ,15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one[D]. Jiangsu: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
付珍珍. 生物转化制备三羟基雄甾烯酮赤霉菌的筛选及工艺优化[D]. 江苏: 江南大学硕士学位论文, 2014
- [8] Zhang YQ, Wang DQ. Advances in microbial transformation of phytosterol into steroid medicine intermediates[J]. Microbiology China, 2006, 33(2): 142-146 (in Chinese)
张裕卿, 王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 142-146
- [9] Cull S, Holbrey J, Vargas M, et al. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(2): 227-233
- [10] Howarth J, James P, Dai JF. Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [Bmim]PF₆ and water mix[J]. Tetrahedron Letters, 2001, 42(42): 7517-7519
- [11] Pfruender H, Amidjojo M, Kragl U, et al. Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43(34): 4529-4531
- [12] Pfruender H, Jones R, Weuster BD, et al. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(1): 182-190
- [13] Wu DX, Guan YX, HQ, et al. 11 α -Hydroxylation of 16 α ,17-epoxyprogesterone by *Rhizopus nigricans* in a biphasic ionic liquid aqueous system[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(20): 9368-9373
- [14] Couling DJ, Bernot RJ, Docherty KM, et al. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling[J]. Green Chemistry, 2006, 8(18): 82-90
- [15] Li H, Fu ZZ, Li H, et al. Improvement of the steroid dihydroxylation efficiency from dehydroepiandrosterone using a substrate pre-induction biotransformation process[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(3): 486-490
- [16] Rogers RD, Seddon KR. Ionic liquids-solvents of the future?[J]. Science, 2003, 302(5646): 792-793