

微乳体系中 11 β -羟基甲羟孕酮的 C_{1,2} 生物脱氢

杨玉芬, 王普, 何军邀, 谢松霖

浙江工业大学药学院, 杭州 310032

摘要: 为改善过程传质, 提高甾类药物中间体 11 β -羟基甲羟孕酮 C_{1,2} 生物脱氢转化率, 采用简单节杆菌 *Arthrobacter simplex* UR016 菌株在 Tween-80/乙醇/食油/水构成的微乳体系中进行生物脱氢, 并考察了微乳体系组成、转化温度、投料浓度对脱氢反应的影响。结果表明: 以菌体培养液作为水相, 食油作为油相构建微乳体系, 食油最适加量为 10 g/L, 表面活性剂 Tween-80 加量为 4 g/L; 底物经醇溶后水析投料, 乙醇最适加量为发酵液体积的 7% (V/V); 最适转化温度为 33°C; 当底物浓度为 4 g/L 时, 在构建的微乳体系中转转化 46 h, 脱氢转化率达 88.6%, 与水相转化工艺相比提高了 66.2%。在该体系中疏水性 11 β -羟基甲羟孕酮底物得到了有效的增溶和扩散, 生物脱氢转化率明显提高。

关键词: 简单节杆菌, 微乳体系, 11 β -羟基甲羟孕酮, 生物脱氢

Biodehydrogenation of 11 β -hydroxyl medroxyprogesterone by *Arthrobacter simplex* UR016 in microemulsion system

Yufen Yang, Pu Wang, Junyao He, and Songlin Xie

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: To improve mass transfer and enhance the yield for C_{1,2} biodehydrogenation of steroid 11 β -hydroxyl medroxyprogesterone, we carried out the dehydrogenation reaction of 11 β -hydroxyl medroxyprogesterone in an oil-in-water (O/W) microemulsion by *Arthrobacter simplex* UR016. We studied the effects of system composition, dehydrogenation temperature and substrate concentration on microbial transformation. We formulated a suitable O/W microemulsion system with *Arthrobacter simplex* UR016 culture broth as aqueous phase, 10 g/L of edible oil as oil phase, 4 g/L of Tween-80 and 7% (V/V) alcohol as surfactant and cosurfactant. The optimal dehydrogenation temperature was 33°C. The results showed that in Tween-80/alcohol/edible oil/water microemulsion system, the hydrophobic steroid was solubilised and diffused effectively, with the maximum conversion rate of 88.6% at 46 h under 4 g/L substrate concentration, an increase of 66.2% compared to that in aqueous system. The C_{1,2} biodehydrogenation of 11 β -hydroxyl medroxyprogesterone is more efficient in water-edible oil microemulsion system than in aqueous system.

Keywords: *Arthrobacter simplex*, microemulsion, 11 β -hydroxyl medroxyprogesterone, biodehydrogenation

甾类药物 A 环的 $\Delta^{1,2}$ 脱氢可有效提高和改进甾类药物的药理活性, 微生物脱氢已成为甾类药物生产中的关键反应之一^[1]。徐诗伟等^[2]在研究节杆菌

(*Arthrobacter* sp.)AX86 和绿僵菌 (*Metarhizium* sp.)M88 两种微生物混合转化 16 α -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯制备地塞美松重要

Received: March 31, 2009; Accepted: May 4, 2009

Supported by: Zhejiang Province Natural Science Foundation of China (No. Y407289).

Corresponding author: Pu Wang. Tel: +86-571-88320389; E-mail: wangpu@zjut.edu.cn

浙江省自然科学基金项目(No. Y407289)资助。

前体 16 α -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20 二酮时,通过节杆菌的生物脱氢作用可使 A 环同时引入 C_{1,2} 和 C_{4,5} 两个双键(含 C₃ 羟基氧化)。水相介质中利用简单节杆菌催化甾类化合物 C_{1,2} 位生物脱氢工艺条件和动力学研究已有一些文献报道^[3-5]。

甾类药物微生物脱氢反应中遇到的主要问题是疏水性甾类底物在水相中的低溶解性,以及存在的产物(或底物)的抑制作用。为有效解决上述问题,有机溶剂/水两相体系^[6]和双水相体系^[7]等新型生物反应体系被应用于甾类药物的 C_{1,2} 位脱氢过程,并获得了优于水相转化的结果。

微乳是由表面活性剂、助表面活性剂、油相和水相在适当比例条件下形成的澄清透明体系。微乳从结构上可分为水包油型(O/W)、油包水型(W/O)及双连续型。微乳体系作为酶促反应介质具有一些独特的特性^[8,9]:微乳相界面张力低、液滴小、比表面积大、传质速率快、可有效提高反应速率;采用油包水型(W/O)微乳体系可使酶溶解在微乳内的水核中,从而有效避免酶在有机溶剂中的失活;水包油型(O/W)微乳体系对底物的增溶不仅是表面活性剂的作用,也有其内核油相的作用。微乳体系应用于生物转化反应具有放大容易、对细胞损伤小等优点,尤其适用于不溶性底物的生物转化或存在产物抑制的转化过程。已有采用 W/O 型微乳体系进行脂肪酶催化反应的研究报道^[10]。Smolders 等^[11]在由磷脂、苯和少量水组成的微乳体系中进行高浓度 16-甲基-莱氏化合物 S-21-醋酸酯的 C_{1,2} 位脱氢研究,反应 14~16 h 后转化率可达 98%,显示出该体系用于甾类化合物生物脱氢的优势。国内对微乳体系的研究多集中在微乳制剂方面^[12],特别是 O/W 型微乳作为药用载体的研究^[13]。有关 O/W 型微乳体系中的生物转化研究鲜见报道。本研究针对构建的由 Tween-80/乙醇/食油/发酵液组成的 O/W 型微乳体系,考察了该体系中影响 *Arthrobacter simplex* UR016 细胞催化底物 11 β -羟基甲羟孕酮 C_{1,2} 位生物脱氢反应的有关因素,得到了适宜的生物脱氢工艺条件,转化率优于水相转化结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

简单节杆菌 *Arthrobacter simplex* UR016 为本实

验室保藏菌株。

1.2 试剂

Tween-80 为日本进口分装;食用油为市售“金龙鱼”牌大豆油;乙醇为分析纯 95%乙醇;色谱纯四氢呋喃由天津科密欧化学试剂厂生产;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基及培养方法

1.3.1 斜面培养基

葡萄糖 1.3%, 酵母膏 1.3%, 琼脂 2.0%, pH 7.0~7.2。30°C 培养 2~3 d。

1.3.2 种子培养基

葡萄糖 0.6%, 蛋白胨 0.3%, 玉米浆 0.8%, KH₂PO₄ 0.15%, pH 7.0~7.2。将斜面菌种接到 250 mL 三角瓶,装液量 20%, 30°C、200 r/min 培养约 12 h。

1.3.3 转化培养基

葡萄糖 0.6%, 蛋白胨 0.3%, 玉米浆 0.8%, KH₂PO₄ 0.15%, pH 7.0~7.2。用 250 mL 三角瓶,装液量 20%, 接种量 10%, 30°C、200 r/min 培养约 16 h。

1.4 底物投料方式

由于甾体化合物在水中的溶解度很小,本研究采用醇溶后水析投料。即先将底物溶解在乙醇中,70°C 水浴 1 h,冷却后缓慢滴加到发酵液中,底物 11 β -羟基甲羟孕酮投料量为 4 g/L。乙醇溶解的底物遇到水后,便很快沉淀析出,形成细小的结晶以增加相界面积。

1.5 O/W 微乳体系的构建

直接用培养成熟的菌体培养液作为水相,依次加入 Tween-80 和食油,混匀,将溶有底物 11 β -羟基甲羟孕酮的乙醇溶液置 70°C 水浴 1 h,取出冷却,缓慢滴加到体系中,33°C、200 r/min 摇床转化 46 h 后取出,将转化液沸水浴 10 min 左右,冷却后加等量乙酸乙酯萃取。

1.6 底物和产物的测定

样品制备:取转化后的萃取液 1 mL 蒸干,取 5 mL 甲醇复溶后用微孔滤膜过滤,高效液相色谱法(HPLC)分析,采用 C₁₈ 柱,紫外检测器检测,波长 254 nm,流动相为四氢呋喃:水=4:6,流速:0.8 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 投料时间对转化的影响

处于不同生长阶段的菌体,其甾体脱氢酶活力

有所不同。试验中将底物 11 β -羟基甲羟孕酮加入到培养不同时间的发酵液中进行生物转化,并测定投料时发酵液稀释 5 倍后的 OD_{620} 值,不同培养时间的发酵液 OD_{620} 值以及其对底物的转化能力见图 1。结果表明,培养至不同生长阶段的菌体均可在一定程度上实现对底物的脱氢转化,当菌体培养 16 h, $OD_{620}(n=5)$ 达到 0.528 时,菌体的脱氢能力最强。

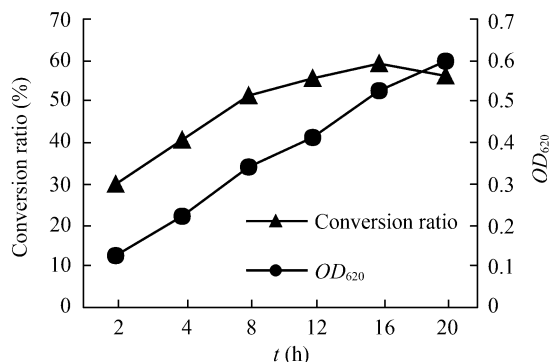


图 1 投料时间对转化的影响

Fig. 1 Effects of substrate addition time on conversion ratio.

2.2 乙醇加量对转化的影响

乙醇加量不仅影响到底物的投料浓度,同时也影响底物在水相中结晶析出的尺寸大小。加入适量的乙醇可提高底物的溶解度,增加反应相界面积,但加量过多也会对微生物细胞产生一定的毒害。为此,试验中考察了不同乙醇加量对底物脱氢转化的影响(图 2)。结果表明,当乙醇加量为发酵液体积的 7% 时,转化率相对最高。

2.3 Tween-80 加量对转化的影响

表面活性剂 Tween-80 具有较高的 HLB 值 (HLB=15), 乳化能力强, 能与醇形成混合膜, 增加甾类底物在水相中的溶解度和分散性。一定浓度的表面活性剂还可改善细胞膜的通透性, 提高菌体代谢产物的分泌。试验中以培养至 OD_{620} ($n=5$) 为 0.5 左右的菌体培养液为水相, 以 7% 乙醇溶解底物投料, 水相中添加不同浓度的 Tween-80, 结果见图 3。Tween-80 的较适加量为 4 g/L, 转化率较对照提高了 8.4%。继续提高 Tween-80 的加量, 转化率不再提高。

2.4 食油加量对转化的影响

食油的主要成分是一些长链脂肪酸, 类似于生物膜结构, 与菌体有较好的相容性和细胞亲和性, 水相中加入一定量的食油利于甾类化合物进出菌体细胞。试验中以培养至 OD_{620} 为 0.5 左右的菌体培

养液为水相, 7% 乙醇溶解底物后投料, Tween-80 加量 4 g/L, 考察不同食油加量对转化率的影响, 结果见图 4。加入 10 g/L 的食油对转化结果的影响已非常明显, 表明构建的微乳体系适宜于该底物的生物脱氢。

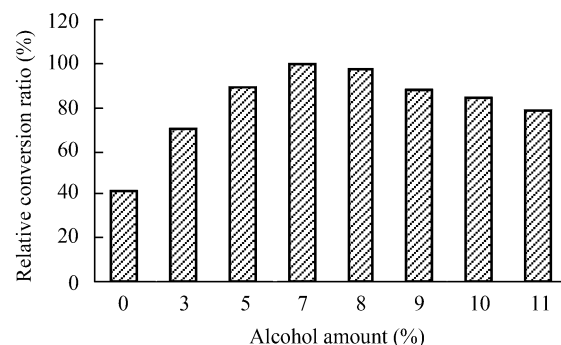


图 2 乙醇用量对转化的影响

Fig. 2 Effects of alcohol amount on bioconversion.

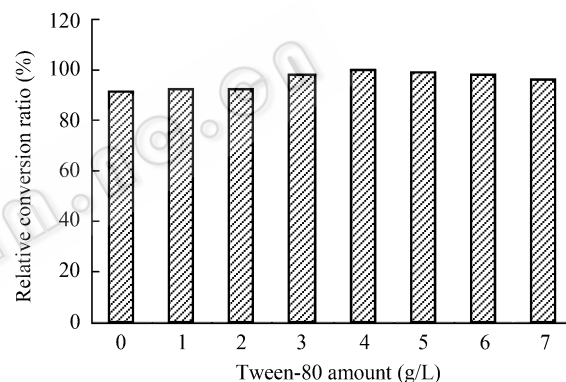


图 3 Tween-80 加量对转化的影响

Fig. 3 Effects of Tween-80 amount on bioconversion.

2.5 温度对底物脱氢的影响

升高温度利于微乳的形成^[13], 但温度过高影响菌体产酶。试验中考察了所构建的微乳体系在不同温度下对简单节杆菌催化底物脱氢的影响, 结果显示(图 5), 当转化温度 $<30^{\circ}\text{C}$ 时, 转化结果不太理想, 转化温度在 $30^{\circ}\text{C}\sim 33^{\circ}\text{C}$ 之间, 所构建的微乳体系能明显提高底物脱氢转化率。进一步升高转化温度, 由于菌体内酶的失活, 转化率明显下降。

2.6 投料浓度对底物脱氢的影响

针对水相和含 10 g/L 食油的微乳体系, 分别考察了不同投料浓度对脱氢转化的影响, 如图 6 所示。微乳体系中的生物转化结果明显优于水相直接投料转化, 当底物浓度小于 3 g/L 时, 微乳体系中的脱氢转化率几近 100%。继续增加底物浓度, 产物(或底物)

对脱氢酶产生抑制作用,引起转化率下降。当底物浓度为 4 g/L 时,微乳体系中的脱氢转化率为 88.6%,较水相直接投料转化提高了 66.2%。

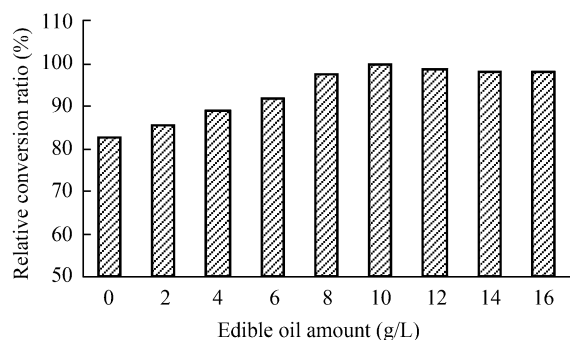


图 4 食油用量对转化的影响

Fig. 4 Effects of edible oil amount on bioconversion.

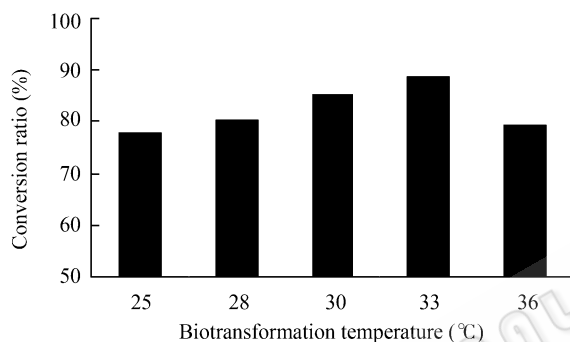


图 5 温度对体系中底物脱氢转化的影响

Fig. 5 Effects of temperature on biotransformation in microemulsion system.

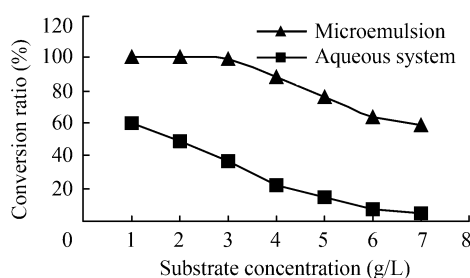


图 6 投料浓度对转化的影响

Fig. 6 Effects of substrate concentration on conversion ratio.

3 结语

作为一种新型的生物催化反应介质,微乳体系可用于简单节杆菌细胞催化的甾类化合物的生物脱氢反应。本研究首先构建了由 Tween-80/乙醇/食油/

发酵液组成的 O/W 型微乳体系,并对该体系中 *Arthrobacter simplex* UR016 细胞催化底物 11 β -羟基甲羟孕酮的 C_{1,2} 位脱氢反应条件进行了研究。结果表明:以菌体培养液作为水相,食油作为油相,最佳投料时间为菌体培养 16 h 左右;助表面活性剂乙醇最适加量为水相体积的 7%;表面活性剂 Tween-80 的最适加量为 4 g/L;较佳脱氢反应温度为 33°C;加入少量的食油可有效提高底物转化率,最适加量为 10 g/L。在优化的条件下,当底物浓度为 4 g/L 时,微乳体系中脱氢转化率可达 88.6%,明显高于水相转化结果,表明所构建的微乳体系利于疏水性甾类底物 11 β -羟基甲羟孕酮的生物脱氢反应。究其原因,可能在于在该体系中疏水性底物得到了有效的增溶和扩散,从而促进了脱氢反应过程。

所构建的 O/W 型微乳体系应用于 11 β -羟基甲羟孕酮 C_{1,2} 位生物脱氢反应具有操作简单、原料易得、生物相容性好以及转化率高等优点,具有较好的实际应用前景。

REFERENCES

- [1] Wang P, Cen PL, Chen XY, *et al.* Optimization of producing conditions for Δ^1 -dehydrogenase of 17 α -hydroxy-16 β -methyl-pregna-4,9(11)-diene-3,20-dione by *Arthrobacter simplex*. *Chin JMAP*, 2005, **22**(3): 194–198.
王普, 岑沛霖, 陈希杨, 等. 简单节杆菌 17 α -羟基-16 β -甲基-孕甾-4, 9(11)二烯-3, 20-二酮脱氢酶产酶条件研究. *中国现代应用药学杂志*, 2005, **22**(3): 194–198.
- [2] Xu SW, Xu Q, Cao GF, *et al.* Preparation of 16 α -methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregndiene-3,20-dione by mixed microbial conversion of C_{1,4} dehydrogenation and 11 α -hydroxylation. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(6): 763–765.
徐诗伟, 徐清, 曹桂芳, 等. 地塞美松中间体的 C_{1,4} 脱氢和 11 α -羟基化. *生物工程学报*, 2000, **16**(6): 763–765.
- [3] Ge X, Gong WB, Wang HQ, *et al.* Study on reaction conditions for C_{1,2} dehydrogenation of 6 α -methylcortisone by *Arthrobacter simplex*. *Chem React Eng Technol*, 2006, **22**(4): 344–349.
葛翔, 龚万本, 王海清, 等. 6 α -甲基可的松 C_{1,2} 微生物脱氢反应的研究. *化学反应工程与工艺*, 2006, **22**(4): 344–349.
- [4] Wang P, Lin JP, Chen XY, *et al.* Kinetic study on the Δ^1 -dehydrogenation of 17 α -hydroxy-16 β -methyl-pregna-4, 9(11)-diene-3,20-dione by *Arthrobacter simplex*. *J Zhejiang Univ(Eng Sci)*, 2004, **38**(8): 1035–1038.
王普, 林建平, 陈希杨, 等. 简单节杆菌催化 17 α -羟基

- 16 β -甲基-孕甾-4, 9(11)二烯-3, 20-二酮脱氢动力学研究. 浙江大学学报(工学版), 2004, **38**(8): 1035-1038.
- [5] Gong WB, Guan YX, Wang HQ, *et al.* Kinetics on the 1-en-dehydrogenation of 6 α -methyl cortisone by *Arthrobacter simplex*. *J Chem Eng Chin Univ*, 2007, **21**(6): 983-988.
龚万本, 关怡新, 王海清, 等. 简单节杆菌催化 6 α -甲基醋酸可的松 C₁₂脱氢动力学. 高校化学工程学报, 2007, **21**(6): 983-988.
- [6] Bie ST, Du LX, Zhang LM, *et al.* Bioconversion of methyl-testosterone in a biphasic system. *Process Biochem*, 2005, **40**: 3309-3313.
- [7] Sun XY, Wang P, He JY, *et al.* Study on biotransformation of 6-methylhydrocortisone in aqueous two-phase systems. *J Zhejiang Univ Technol*, 2007, **35**(6): 617-621.
孙新宇, 王普, 何军邀, 等. 双水相体系中甾类化合物 6-甲基氢化可的松的生物转化研究. 浙江工业大学学报, 2007, **35**(6): 617-621.
- [8] Prichanont S, Leak DJ, Stuckey DC. The solubilisation of mycobacterium in a water in oil microemulsion for biotransformations: System selection and characterisation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2000, **166**: 177-186.
- [9] Warisnoicharoen W, Lansley AB, Lawrence MJ. Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour. *Int J Pharm*, 2000, **198**(1): 7-27.
- [10] Stamatis H, Xenakis A., Kolisis FN. Bioorganic reactions in microemulsions: The case of lipases. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**: 293-318.
- [11] Smolders A JJ, Pinheiro HM, Noronha P, *et al.* Steroid bioconversion in a microemulsion system. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38**: 1210-1217.
- [12] Wang XL, Jiang XT. Microemulsion application to pharmacy. *Pharm J Chin PLA*, 2000, **16** (2): 88-91.
王晓黎, 蒋雪涛. 微乳在药剂学上的应用. 解放军药学报, 2000, **16**(2): 88-91.
- [13] Wu SQ, Li SM, Lang YY, *et al.* Investigation on the influential factors of forming oil-in-water microemulsion. *J Shenyang Pharm Univ*, 2005, **22**(2): 96-100.
吴顺芹, 李三鸣, 郎轶咏, 等. 水包油型微乳形成因素的考察. 沈阳药科大学学报, 2005, **22**(2): 96-100.

我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。