

转化 RSA 为氢化可的松的新月弯胞霉筛选

杜连祥 王敏 王庚 孙烨

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

摘要:从土样中筛选到 1 株能转化甾体化合物 RSA(17 α -羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮-21-醋酸酯)生成氢化可的松(11 β ,17 α ,21-三羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮)的 C4 菌株,经菌落形态与个体形态观察,初步鉴定为新月弯胞霉(*curvularia lunata*)。正交实验确定该菌株的最适培养基为:葡萄糖 10g,黄豆粉 10g,自来水 1000mL, pH6.5。经硅胶层析和高交液相色谱测定,氢化可的松转化率为 34%。同时还测定了转化过程中 RSA、氢化可的松及其它副产物的百分含量的变化。

关键词:生物转化,新月弯胞霉,氢化可的松

中图分类号:Q93.331 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-044-05

SCREENING OF *CURVULARIA LNATA* WITH THE ABILITY OF BIOCONVERTING RSA TO HYDROCORTISONE

DU Lian-Xiang WANG Min WANG Geng SUN Ye

(Depart. of Food Eng., Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

Abstract:A strain C4 with ability of bioconversion from steroid RSA to hydrocortisone was selected from the soil sample. It was identified as *Curvularia lunata* according its morphological characters of clump and individuals. The optimum culture medium was established by orthogonal experiments: glucose 10g, soybean powder 10g, water 1000mL, pH6.5. Determined by silica gel chromatography and high-performance liquid chromatography, the bioconversion ratio of hydrocortisone was 34%. At the same time, the percentage change of RSA, hydrocortisone and other byproducts were measured during the course of bioconversion.

Key words:Bioconversion, *Curvularia lunata*, Hydrocortisone

甾体的生物转化是利用微生物的酶对甾体化合物某一特定部位进行化学修饰,包括脱氢、羟基化、酯化等,其产物并不是微生物的代谢产物。

氢化可的松(Hydrocortisone)是重要的甾体激素类药物^[1]。除作为生产许多皮质激素类药物的前体外,其本身也具有临床应用价值,有影响糖代谢、抗炎、抗过敏、抗毒等作用,主要用于肾上腺皮质功能减退症的替代性治疗,并可治疗葡萄糖、血糖过多症等疾病^[2]。我国氢化可的松生产一直以 RSA 为底物,由蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*)在 C11- β 位引入羟基而得。由于副产物多,分离困难,因此氢化可的松对 RSA 的收率仅为 45%,对薯蓣皂素的总收率约为 18%。国际上自 1953 年 Pfizer 公司报道以新月弯胞霉生产氢化可的松以来,其转化率已高达 90%,对底物的收率为 60% 以上^[3,4]。该菌株最大的特点是副产物少、转化率高、易分离、工艺简单。本文介绍自土壤中分离的新

新月弯孢霉菌株的鉴定和它对RSA转化为氢化可的松能力的测定。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 富集培养基:见参考文献[5]。

1.1.2 分离培养基:见参考文献[5]。

1.1.3 斜面培养基:见参考文献[5]。

1.1.4 发酵培养基:见参考文献[5]。

1.2 菌种分离筛选

取1g土样于富集培养基中,28℃,150r/min振荡培养24h。将培养液适当稀释后涂布于分离培养基上,28℃恒温培养3~5d。待平板上长出菌落后,根据其菌落形态以及在显微镜下观察的个体形态特征,将初步判断为新月弯孢霉的菌株转接于斜面培养基上,28℃培养3~5d。分离纯化后,挑选纯种进行鉴定、保藏。

1.3 转化实验

取斜面菌种1支,加入5mL无菌水,洗下孢子,制备成 1×10^6 个/mL的孢子悬浮液。取1mL接种于液体发酵培养基内,30℃,180r/min振荡培养22h,投入0.1(w/v)的底物RSA,继续培养(28℃,200r/min)48h。取一定量的发酵液,用氯仿萃取后,取有机相进行分析。

1.4 分析方法

1.4.1 氧化级别测定:见参考文献[6]。

1.4.2 硅胶薄层层析(TLC)法:见参考文献[5]。

1.4.3 高胶液相色谱(HPLC)法:见参考文献[5]。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离筛选

新月弯孢霉在自然界广泛存在,可引起水稻谷粒变色、苗枯、叶斑以及高粱产生红色叶斑;还可寄生于蕃茄和辣椒的果实^[7]。根据其可能存在的环境,分别从稻田、菜园、塑料大棚、高粱地和造纸厂稻草料库等地点采集土样进行分离筛选。从中得到几株菌种,其中C4菌株的菌落形态和个体形态特征与资料报道的新月弯孢霉典型特征最为相近。

2.2 菌种的鉴定

2.2.1 菌落形态特征:C4菌株在马铃薯-葡萄糖琼脂平板上形成的菌落向四周蔓延,初期菌丝为白色,逐渐变为褐绿色。菌落呈同心圆状,中央近似绒毛状及粉末状,菌落表面呈黑绿色,背面为蓝黑色。菌丝有隔膜、有分枝,直径 $3\mu\text{m} \sim 3.6\mu\text{m}$

2.2.2 个体形态特征:(1)分生孢子形态特征:分生孢子呈深褐色,弯月状。每个分生孢子中有3个隔膜,从基部向上数第3个细胞特别大,弯曲,颜色也特深,两端细胞颜色较浅,孢子大小为 $19 \sim 30\mu\text{m} \times 9 \sim 15\mu\text{m}$,如图1a所示。分生孢子在葡萄糖-土豆汁固体培养基平板中,28℃培养6~8h可萌发,两端出芽发育为菌丝。(2)分生孢子梗形态特征:分生孢子梗呈深褐色,有隔膜,不分枝,直立,分生孢子脱落后,分生孢子梗顶端多弯曲,长 $70\mu\text{m} \sim 270\mu\text{m}$,直径 $2\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$,如图1b所示。(3)分生孢子头的形态特征:小室培养2~3d即可观察到分生孢子头及分生孢子的着生状态。分生孢子着生于分生孢子梗的顶端,每个分生孢子梗顶端着生有3~6个分生孢子,呈轮状排列,近似花瓣

状,如图1c所示。

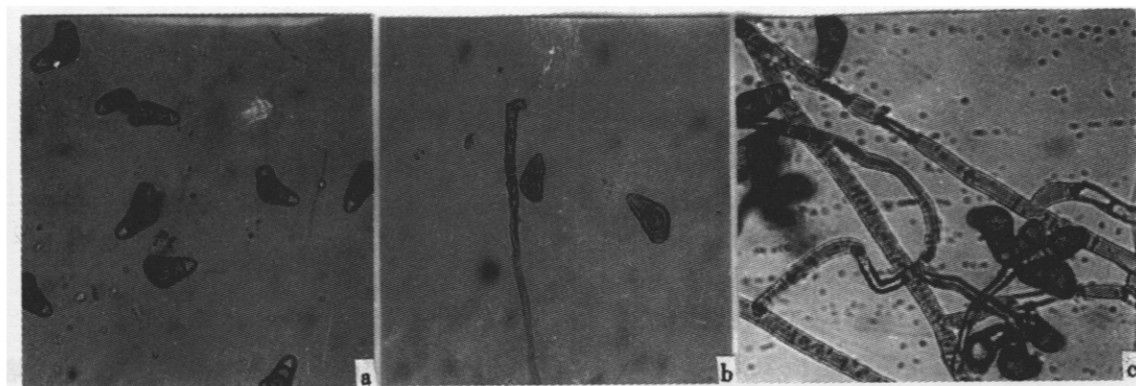


图1 C4菌株细胞形态

a 分生孢子形态, b 分生孢子梗形态, c 分生孢子头形态

综上所述,观察的结果与“真菌鉴定手册”^[7]、“常见常用真菌”^[8]所列新月弯胞霉菌落形态及个体形态特征基本相符。所以,从土壤中分离的C4菌株定名为新月弯胞霉(*Curvularia lunata*)。

2.3 C4菌株最适培养基与培养条件

以葡萄糖作为碳源,为考察氮源包括黄豆饼粉、酵母膏、 $(NH_4)_2SO_4$ 和玉米浆对底物转化的影响,经过 $L_3(4)$ 正交实验,确定的最适发酵培养基组成为:葡萄糖10g,黄豆饼粉10g,自来水1000mL,pH6.5。培养条件为:摇床转速200r/min,28℃培养22~24h后,投料(RSA浓度0.1%)继续培养48h。

2.4 转化产物及转化率

2.4.1 氧化级别的判定:底物RSA与浓硫酸反应生成红色的肾上腺酮,红色越深,未转化RSA残留量越多,氧化级别也越高。根据硫酸显色判定,C4菌株在最适发酵条件下,对RSA的氧化级别为2级以上,说明还有少量RSA未转化,残存在发酵液中。

2.4.2 硅胶薄层层析:发酵液的氯仿萃取物经硅胶GF₂₅₄薄层层析,呈现6个斑点,如图2所示。与标准 α -体(表氢化可的松)、 β -体(氢化可的松)、RSA和RS(RSA的C21脱醋酸酯产物)的 R_f 值相对照,可初步判定转化产物中含有氢化可的松,其含量大约为30%。

2.4.3 高效液相色谱(HPLC)分析:C4菌株发酵液的氯仿萃取物和标样 α -体、 β -体、RSA及RS经HPLC分析的各物质的保留时间如图3、图4所示。

从图3、图4可以看出,C4菌株发酵液样

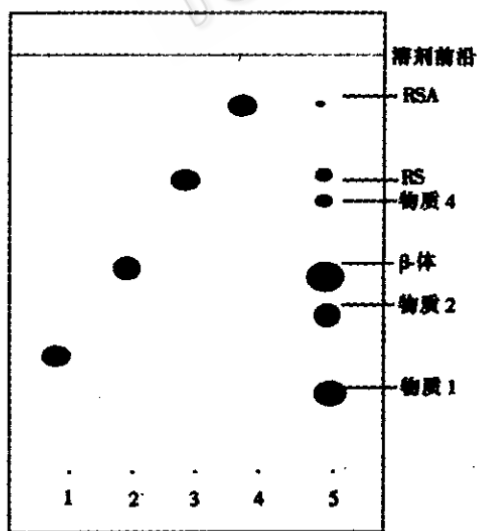


图2 转化产物的TLC层析图谱

1 标准品 α -体,2 标准品 β -体,3 标准品RS,
4 标准品RSA,5 发酵样品

品中第3个色谱峰的保留时间与标样 β 体的基本一致,可以认为该菌株的转化产物中存在有氧化可的松,其含量为34%。

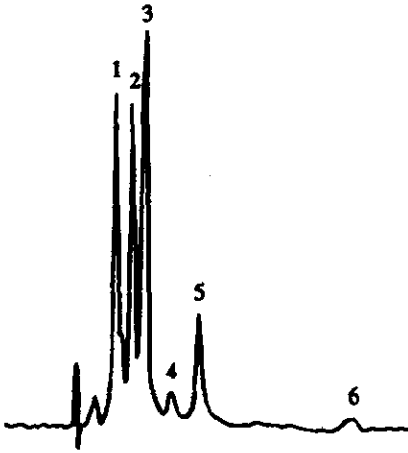


图3 C4菌株转化产物的HPLC图谱

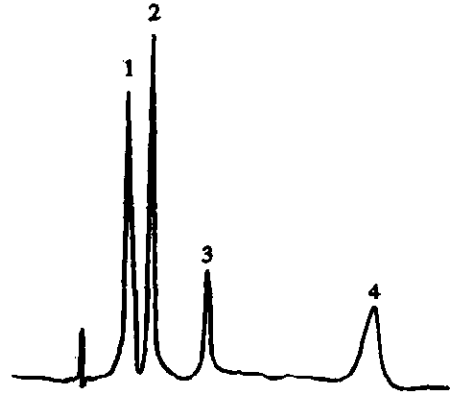


图4 标准样品的HPLC图谱

1 标准品 α -体, 2 标准品 β 体,
3 标准品RS, 4 标准品RSA

将标样 β 体加入到C4菌株发酵液样品中进行HPLC分析,从谱图可以看出,第3个色谱峰的波峰增高了。因此可以认为该物质就是氢化可的松,其对底物RSA的转化率为34%。

2.5 转化过程中各物质百分含量的变化

C4菌株在发酵培养基中经22~24h培养后,投入0.1% RSA使其转化,于不同时间取样,以HPLC法分析转化过程中各种物质百分含量(用归一化法计算的各物质的相对含量)的变化结果,如图5所示。

从图5可以看出:(1)在转化过程中RS的百分含量先增后减。说明RSA的转化顺序是RSA \rightarrow RS \rightarrow β 体和其它副产物。同时也说明C4菌株分泌酯酶,先将RSA的C21位的醋酸酯脱去生成RS后,再进行甾体其它部位的转化。(2)RSA随时间的增加而减少,58h后转化完全。氢化可的松的量随转化时间而增加,但副产物也随之增多,物质2的增加速度比氢化可的松的增加更快。(3)RS是RSA转化过程的中间产物,其转化速率决定氢化可的松的生成速率。因此,提高RS的转化速率是改造菌种的理论依据。(4)在以RS-17 α , 21-二醋酸酯为底物代替RSA的转化实验中,物质2的生成量明显减少。由此推测物质2是底物C14位被羟基化了RS-14 α -OH化合物。这是因为

在甾体分子C14-位附近的 α 面当引入较大的取代基,如17 α 醋酸酯,可造成14 α -位的立体障碍,抑制14 α -羟基化活性,从而提高11 β -羟基化物的收率^[9]。

荷兰Gist公司采用化合物RS-17 α -醋酸酯为底物,获得高收率的氢化可的松及氢化可的松

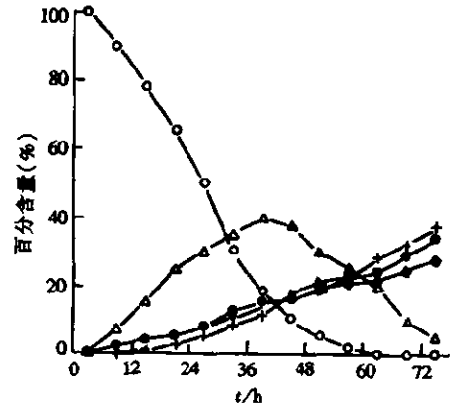


图5 C4菌株发酵过程中各产物组分随时间的变化曲线

—◇—物质1, —+—物质2, —●— β -体, —△—RS, —○—底物RSA

17 α -醋酸酯的混合物,后者易水解为氢化可的松^[10]。

通过对 C4 菌株 RSA 生成的各产物组分分析认为,野生株 C4 菌株具有 C11 β -羟基化能力,氢化可的松的转化率还不高,但与现行生产中使用的蓝色犁头霉相比,最突出的优点就是副产物少。可通过菌种选育、改变底物结构和发酵条件来提高氢化可的松的转化率。因此认为 C4 菌株是 1 株具有生产潜力的优良菌株。

参 考 文 献

- [1] 黄天守. 化学化工药理学大辞典. 台北: 大学图书公司, 1982, 542.
- [2] Soveshchorg T D. Kristallokhim. Ist, 1974(pub1975):157.
- [3] 黄淑惠, 徐诗伟, 法幼华. 微生物学报, 1989, 29(1):68~71.
- [4] Akira K, Yukio I. Jap. Kokai Tokkyo Koho. JP62118898, 1987.
- [5] 王庚, 王敏, 杜连祥. 微生物学杂志, 1998, 18(1)23~26.
- [6] 林新国, 周才斌. 化学反应工程与工艺, 1995, 11(2):213~216.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科技出版社, 1979, 556~561.
- [8] 中国科学院微生物研究所. 常见常用真菌. 北京: 科学出版社, 1973, 223~224,
- [9] Defline J. Fermentation Advances. Perlman D. ed. London & New York: Academic prees, 1969, 385~390.
- [10] Flines J, Waard W F. Netherlands Patent. 1966, 6605514.