

# 磁化水处理菌种在甾体微生物转化过程中的效应\*

阳葵 王福东 冯霞 段世铎 张 臻\*\*

(天津大学化学系 天津 300072)

**摘要:** 考察了磁化水处理菌种在甾体微生物羟化转化反应中的效应。磁化处理条件为: 磁场强度 0.24~0.25T, 静置式磁化、作用时间 30min。研究表明经磁化水处理的绿僵菌菌种, 完成 11 $\alpha$ 羟化转化甾体底物 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -环氧黄体酮的能力有明显改善, 其效应与添加适量生长调节剂时相当, 两者配合使用、提前投入底物时效果加强。这有利于发酵周期的缩短。磁化处理后菌种的优良特性可在传代中保持至第 3 代。

**关键词:** 磁化, 甾体化合物, 微生物转化, 效应

**中图分类号:** Q505 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0336-03

## THE EFFECTS OF STRAIN TREATMENT BY MAGNETIZED WATER ON MICROBIAL TRANSFORMATION OF STEROID\*

YANG Kui, WANG Fudong, FENG Xia, DUAN Shiduo, ZHANG Liu\*\*

(Department of Chemistry, Institute of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

**Abstract:** The effects of strain treatment by magnetized water on the microbial hydroxylation transformation of steroid substrate were investigated. The operation conditions for the treatment were established as follows: the magnetic field intensity range of 0.24~0.25T, the static magnetization treatment method, the treating time 30min. The conversion of substrate was improved by using magnetized water for slant strain (*Metarhizium sp.*) cultivation, and the improvement was nearly the same as the addition of growth regulator with proper concentration. The cooperative effect of the above two factors improved the biotransformation process as a whole. The strains treated by magnetized water maintained the biotransformation activity at high level until the third generation.

**Key words:** Magnetization, Steroid, Microbial transformation, Effect

甾体激素类药物是临床上不可缺少的重要药物之一。其工业生产中用化学方法难以完成的关键反应, 一般通过甾体底物的微生物转化法来实现<sup>[1]</sup>。生物转化效率的提高依赖于发酵工艺的优化, 但只靠常规方法, 效果有限, 还要有新的措施, 例如引入新的作用因子(如化学因子和物理因子)<sup>[2]</sup>。对于生物来说, 磁场是一种物理刺激因素, 与超声、X射线、放射性辐射等有若干相似的地方。磁场的生物效应多种多样, 在生物的浸种、发芽、发育和生长的某一过

程或几个过程中施加磁场处理操作, 在许多情况下呈现出值得注意的现象和效应<sup>[3~6]</sup>。关于

\* 国家自然科学基金(No. 29606008)

Project of Chinese National Natural Science Fund for Young Researchers (No. 29606008)

天津市21世纪青年科学基金资助项目(No. 953709211)

Project of the 21<sup>st</sup> Century Natural Science Fund of Tianjin for Young Researchers (No. 953709211)

\*\* 天津大学化工学院 天津 300072

收稿日期: 1998-09-10, 修回日期: 1998-12-31

磁化水处理种子的生物学效应,文献报道以处理植物种子者为多。将磁化水处理菌种的技术应用于甾体微生物转化过程,是一次新的尝试,本文着重报道了磁场因子、磁化水与生长调节剂的配合使用、以及磁化水处理菌种后的遗传变异等。

1 材料与方法

1.1 发酵菌种及培养与转化条件

1.1.1 菌株、反应物及产物:霉菌菌株(绿僵菌 *Metarhizium* sp.),反应底物 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -环氧黄体酮(16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -epoxy-4-pregnene-3,20-dione),羟化产物 11 $\alpha$ -羟基-16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -环氧黄体酮。由东北制药总厂提供。

1.1.2 斜面与发酵培养基:蔗糖 6g,酵母膏 0.25g, NaNO<sub>3</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub> 等无机盐适量,部分实验中适量添加生长调节剂(自行研制的 WSTJ-I 型,主配方为硝基酚钠类复合物)<sup>[7]</sup>,浓度为 0.025%( $\phi$ ),定容至 100mL 水中。摇瓶发酵培养基调至 pH6.5,斜面培养基 pH5.6。

1.1.3 斜面菌种培养条件:无菌水经磁场处理后制得磁化水。挑取少量菌种分别加入无菌水(空白对照)和磁化水中制成菌悬液,室温(约 25℃)下放置 6~8h。以菌悬液传种至斜面培养基,25℃ 恒温培养 4~6d,至长成成熟菌种斜面。

1.1.4 摇瓶培养与转化条件:取适量斜面菌种接种至摇瓶培养基中,25℃ 恒温培养 42~48h,投入反应底物(投料量 2g/1000mL 发酵液),30℃ 恒温转化 48h,取样分析转化率,以评价菌种性能。

1.1.5 转化率分析方法:采用硅胶 GF-254 薄板层析法。用三氯甲烷用量 3.0mL(10mL 发酵液中)萃取发酵液中的甾体物(包括底物与产物)。取 15 $\mu$ L 萃取液点板、层析(层析液为苯、丙酮混合液,体积比 8:2),晾干后置于 254nm 紫外线分析仪中与标准样板对照分析底物转化率。标准样板的制备与上述操作相同,其甾体物用量比例为:产物量(g)/[底物量(g)+产物量(g)]=5%, 10%, …… , 95%。

1.2 磁化处理条件

对生物起作用与有效应的磁场因子有磁场类型、磁强、方向、作用时间等。以下为实验选定的磁化条件。

1.2.1 磁化处理实验装置:磁天平经改装后,采用磁极部直径约 10cm 的水平型电磁体产生磁场。其空气隙长度在一定范围内可调,且磁极端部作成特殊的锥形型,以使在空气隙中形成具一定磁强和磁强梯度分布的磁场。

1.2.2 磁场强度:0.24~0.25T。

1.2.3 磁化时间:30min

1.2.4 磁化方式:有连续流动磁化(使无菌水以一定流速垂直切割磁力线流动)和静置磁化(将无菌水置于扁式茄氏瓶中垂直静置磁场空气隙中、间歇振荡)两种方式。本文实验采用静置式磁化方式。

2 结果

2.1 磁化水处理菌种的效应

在进行菌种斜面培养时斜面菌层上孢子的营养和生长发育状况,在很大程度上决定了菌种生长成熟后性能的优劣。观察经磁化水处理后菌种的长势与形貌发现,与对照菌种相比,经处理后斜面上菌层生长密实、丰厚饱满、色泽碧绿,生长成熟期缩短 28~32h。摇瓶转化实验则表明,其转化甾体底物的能力优于对照(表 1),菌种性能明显改善。这表明经磁化水处理的菌种细胞生长代谢状况可能有所改变。

表1 磁化水处理菌种的效应

| 菌种类型     | 甾体底物转化率(%)    | 甾体底物转化率(%)  |
|----------|---------------|-------------|
|          | (摇瓶培养时间(48h)) | (摇瓶培养时间42h) |
| A(空白对照)  | 55            | 56          |
| B(磁化水处理) | 86            | 87          |

2.2 磁化水处理与生长调节剂配合使用时的效应

生长调节剂是加入少量即能调控生物生长发育的化合物的统称,简称生物激素。人工合成的生物激素以一种外加的活性因子,被机体吸收后,参与细胞生长代谢<sup>[8]</sup>。将菌种传种至添

加了适量生长调节剂的斜面培养基上, 观察发现, 不仅菌种生长成熟期缩短, 而且斜面孢子层的电镜图片显示, 成熟孢子的个体丰满、挺拔(阳葵, 天津大学博士学位论文, 1996)。同时摇瓶转化实验(表 2)显示, 当缩短菌体培养时间、提前投入底物进行转化时, 菌种性能明显改善。表明生长调节剂有促进菌种细胞旺盛生长、发育的作用。

对比表 1、表 2 中的 B 与 C 行可以看出, 单独使用调节剂与单独进行磁化水处理菌种, 改善菌种性能的效果相当, 表明磁化水处理与生长调节剂的效应相似, 有促进菌种细胞生长的作用; 当两者配合使用、投料时间相应提前时, 效果最为显著, 表明了磁化水与调节剂配合使用时的相互促进作用。这在实际应用时可以缩短发酵周期, 对于发酵控制是有利的。

表 2 磁化水与生长调节剂配合使用处理菌种的效应

| 菌种类型           | 菌体底物转化率(%)    |               |
|----------------|---------------|---------------|
|                | (摇瓶培养时间(48h)) | (摇瓶培养时间(42h)) |
| C(单独使用调节剂)     | 57            | 86            |
| D(磁化水与调节剂配合使用) | 70            | 95            |

### 2.3 磁化水处理菌种的遗传性

表 3 所示为实验菌株经磁化水处理后的效应在传代菌种中的表现:

(1) 原始菌种经磁化水处理后得到的第 1 代优良菌种, 传种至第 2 代, 可基本保持变异产生

的优良性能, 仅略有衰退。

(2) 传种至第 3 代时, 菌种性能衰减较大, 基本减至与原始菌种性能接近。表明磁场作用引发的生物效应基本消失。

从原始菌种逐代传种至第 3 代, 历时约 5~6 个月。因此经磁化水处理后的菌种, 使用 4~

表 3 传代菌种转化性能的变化

| 菌种菌龄  | 菌体底物转化率(%) |           |
|-------|------------|-----------|
|       | (空白对照菌种)   | (磁化水处理菌种) |
| 原始菌种  | 82         | —         |
| 第 1 代 | 80         | 92        |
| 第 2 代 | 72         | 88        |
| 第 3 代 | 56         | 80        |

5 个月后, 应重新分离、纯化、筛选出新的菌种用于下一次处理。但这相对于未经处理的对照菌种的分离筛选周期(一般 1~2 个月)已有所延长。

### 参 考 文 献

- [1] 俞俊堂等. 生物工艺学(下册). 上海: 华东化工学院出版社, 1991, 279.
- [2] 冯若. 生物化学与生物物理进展, 1994, 6: 500.
- [3] 聂延富. 自然杂志, 1987, 11(2): 889.
- [4] Ghole V S. Bioscience, 1986 41(3): 355.
- [5] 王德培, 高大维, 彭志英等. 微生物学通报, 1998, 25(1): 17.
- [6] 李国栋. 生物化学与生物物理进展, 1987, 3: 31.
- [7] 程发, 韩顺路, 张立宪等. 天津大学学报, 1994, 27(5): 661.
- [8] 倪德祥. 自然杂志, 1987, 10(1): 35.

### 《微生物学通报》告读者

据中国科技论文统计与分析数据库(CSTPC)提供的数据, 本刊 1997 年被引次数为 219, 影响因子为 0.182, 地区分布数为 21.4。

本刊被国际六大检索系统中的 CA, 苏联文摘杂志(PJK)收录。

以上数据由国家科委中国科技信息所信息分析中心 1998 年 10 月提供。

另据中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库统计, 本刊在被引频次最高的中国科技期刊 500 名排行表中名列第 184 位。