

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1161 - 1170; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.008

胆固醇转化菌株的筛选及发酵条件优化

范丹, 熊冰剑, 庞翠萍, 朱向东*

江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

摘要: 【目的】从土壤中筛选及鉴定具有转化胆固醇能力的菌株 SE-1, 对转化产物进行结构鉴定, 并通过一定的工艺条件优化提高转化产率。【方法】利用胆固醇为唯一碳源筛选能转化胆固醇的菌株 SE-1, 对菌株进行形态、生理生化特征试验及 16S rRNA 基因序列同源性分析确定该菌株的系统发育学地位。发酵转化产物经氯仿萃取, 对转化产物进行硅胶板薄层层析法分析, 用硅胶柱层析法、Sephadex LH20 分离产物, 通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析确定转化产物的化学结构。对菌株转化胆固醇的发酵培养基的碳源、氮源、底物添加方式及发酵条件进行优化。【结果】菌株 SE-1 为革兰氏阴性菌, 生理生化特征与洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) 相似, 16S rRNA 序列与洋葱伯克霍尔德氏菌 (GenBank No. U96927) 相似性为 99%。硅胶薄层层析显示转化产物为两种产物。发酵转化时, 在胆固醇-吐温乳化液的添加量为 1 g/L, 碳源糖蜜 5%, 氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, 接种量 4%, 发酵液 pH7.5, 36°C 发酵的条件下, 7 β -羟基胆固醇的产率最高, 达到 34.4%。【结论】分离得到的菌株 SE-1 鉴定为 *Burkholderia cepacia*。菌株 SE-1 转化胆固醇的主产物为 7 β -羟基胆固醇, 次产物为 7-酮基胆固醇, 胆固醇 7 β -羟基化转化率在最适的转化条件下比优化前提高了 20.8%。

关键词: 胆固醇, 生物转化, 洋葱伯克霍尔德氏菌, 7 β -羟基胆固醇

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1161-10

甾体药物在医药上占有重要地位, 除了薯蓣皂苷元天然化合物在甾体药物的广泛应用外, 一些甾醇如胆固醇、谷甾醇和菜籽甾醇等现在也被认为是具有巨大潜能的甾体激素类药物的起始原料^[1]。近几年, 利用胆固醇生产类固醇药物的方法及应用研究受到了人们的重视。自从发现黑根霉能够将黄体酮转化成羟基黄体酮之后, 人们又发现银样链霉菌能将孕酮转化成 11- α 羟基孕酮, 随后又相继发现细菌、酵母、霉菌和放线菌的某些种类都能够使甾体化合物的特定位置发生有价值的转化反应。利用生

物转化能够得到前体所不具有的新特性化合物^[2]。W-H Liu 等^[3]利用分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.) 仅用一步就可将胆固醇转化为睾酮 (TS), Chung-Yi Lee^[4]通过两步使胆固醇转化为雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 (ADD)。相比于化学法, 微生物转化法制备甾体药物具有以下几个优势: 它的反应温和, 环境污染小, 而且其转化底物基本上都是工业下脚料的回收利用, 成本大大低于化学法, 可谓既经济又环保^[5]。

微生物几乎对甾体每个位置都能进行转化^[6]。

基金项目: 国家自然科学基金 (21366012); 江西省自然科学基金 (20122BAB204023)

* 通信作者。Tel: +86-15979170780; E-mail: zhuxdau@qq.com

作者简介: 范丹 (1988 -), 女, 广西柳州人, 硕士研究生, 从事微生物转化研究。E-mail: sxybh8899_fan@163.com

收稿日期: 2014-01-09; **修回日期:** 2014-04-10

目前各类有生理活性的甾体药物的母核都是通过将从动植物中提取的甾体化合物进行选择性的边链降解而获得的,早在1937年 Mamoli 和 Rcellone 报道通过酵母转化将 17-酮-类固醇还原成 17 β -羟类固醇;由 Sih^[7-9] 等首先发现有些微生物可以选择性降解切除甾醇的饱和侧链而得到 AD 和 ADD,20 世纪 70 年代初,有人利用微生物降解胆甾醇生产 ADD 获得成功时,为此受到许多制药公司的高度重视。

要想利用微生物转化胆固醇来生产其他重要甾体药物,例如 AD、ADD 或胆甾酮等,首先需要筛选得到能够高效转化胆固醇的微生物菌株。面对丰富的微生物资源,目前仍然缺乏能够转化重要甾体药物的菌株^[10]。本研究目的是以胆固醇为唯一碳源来筛选微生物转化菌株,获得具有特定转化功能的微生物,对其产物进行结构鉴定,并通过一定工艺条件的优化提高转化率,为工业化生产的研究提供一定依据。本文所筛选到的菌株 SE-1 经分类鉴定确定为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*),筛选得到菌株具有将胆固醇转化为 7 β -羟基胆固醇(7 β -HC)的能力目前尚未有文献报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:筛选自江西农业大学林地以及试验田土样。

1.1.2 培养基:①富集培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,酵母膏 3,pH 自然;②筛选培养基(g/L):胆固醇 1 + SDS, MgSO₄ 0.25, K₂HPO₄ 0.25, FeSO₄·7H₂O 0.001, NaCl 0.05, CaCl₂ 0.001, 琼脂 15, pH7.0;③斜面培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10, NaCl 10, 琼脂 15;④发酵培养基(g/L):酵母膏 5, MgSO₄ 0.25, K₂HPO₄ 0.25, FeSO₄·7H₂O 0.001, NaCl 0.05, CaCl₂ 0.001。

1.1.3 主要试剂和仪器:胆固醇为台州市海盛化工有限公司产品;氯仿、石油醚、丙酮均为国产分析纯试剂;硅胶及硅胶层析板购自青岛海洋化工有限公司;Sephadex LH20 为 Pharmacia 公司。Avance400 核磁共振仪购自 Bruker 公司;PCR 反应扩增仪购自加拿大 BBI 公司;美国 waters 公司的高效液相色谱仪,色谱柱为 Waters Symmetry[®] C18 (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μ m)。

1.2 硅胶薄层层析(TLC)法

0.25 mm 的 GF254 的硅胶层析板用于 TLC 分析,硅胶板在使用之前在 105 $^{\circ}$ C 活化 1 h。石油醚:丙酮 = 3:1 (V/V) 作展开剂,10% H₂SO₄ 无水乙醇显色。样品用以上展开剂展开,吹干后显色喷雾,电炉上加热显色。

1.3 菌种的分离与筛选

取 1 g 土壤置于已灭菌的试管中,加 10 mL 无菌水后,置于摇床振荡摇匀,静置后,取上清液 1 mL 于富集培养基中 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 震荡培养 24 h,从中取 100 μ l 的富集培养液加入到 50 mL 液体的筛选培养基中 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 震荡培养 36 h,为避免微生物原环境中的碳源干扰,共 3 次转移培养,3 次培养后,取 100 μ L 适当的稀释度的菌液涂布于以胆固醇为唯一碳源的固体筛选培养基上,30 $^{\circ}$ C 倒置培养。菌落长出后根据形态判断,将纯的菌株转移至斜面上培养,编号并保藏。将胆固醇底物进行发酵培养转化(详见 1.4),发酵液离心后用氯仿萃取后,用硅胶板薄层层析法(TLC)检测,根据检测结果,筛选出具有转化胆固醇能力的菌株。

1.4 胆固醇转化试验

取斜面菌种 1 支,在超净工作台中接种于已经灭菌的盛有 50 mL 发酵液的 250 mL 锥形瓶中,30 $^{\circ}$ C, 220 r/min 震荡培养 24 h,投入一定量的胆固醇与 SDS 乳化液,相同条件下继续发酵培养 4 d。

1.5 胆固醇转化产物的分离与鉴定

将发酵液离心去菌体后,用氯仿反复萃取 5 次,最后用真空旋转蒸发仪浓缩,用少量硅胶拌样,干燥。用 200 克 300-400 目硅胶装柱,用石油醚:丙酮 = 9:1 洗脱,收集各流份。根据 TLC 检测纯度结果选择 Sephadex LH20 用甲醇:氯仿 = 1:1 进行继续洗脱收集,TLC 检测纯度。纯化得到的产物通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 进行分析鉴定。纯化的产物经核磁共振波谱仪正相宽带探头分析。采用标准脉冲程序,溶剂为氘代氯仿,TMS 内标。

1.6 菌种的鉴定

1.6.1 形态及生理生化测定:通过形态学观察菌株在斜面培养基及筛选培养基上的菌落形态,并用挑取的菌落在显微镜下观察菌株形态。同时对菌株按照常规方法进行生理生化指标测定^[11]。

1.6.2 16S rRNA 的扩增和序列分析:(1)基因组的提取:菌株的基因使用上海生工 UNIQ-10 柱式细

菌基因组 DNA 试剂盒进行提取。(2) 以 primer A (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') primer B (5'-AGGAGGTGATCCAGCCCA-3') 为上下游引物扩增菌株的 16S rRNA。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 35 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 2℃ 延伸 8 min。扩增的 16S rRNA 纯化后由上海生工有限公司直接测序。

1.7 系统发育学分析

从 GenBank 中调取伯克氏菌属 (*Burkholderia*) 11 个标准菌株的 16S rRNA 序列用于系统发育学分析。16S rRNA 全序列用 MEGA (5.0) 软件包排序, 用 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发生树, 计算自引导值 (Bootstrap, 1000 次重复) 以评估系统发生树的置信度。

1.8 7 β -羟基胆固醇产率的计算

TLC 粗测: 方法同 1.2。HPLC 精确测定: HPLC 条件: 甲醇流动相, 0.5 mL/min 的流速, 进样量 10 μ L。样品以氯仿提取发酵液。将有机相浓缩干, 后加入 2 mL 甲醇溶解, 取 10 μ l 进样, 平均进样 3 次。7 β -羟基胆固醇产率的计算公式如下 (95% 为胆固醇纯度; 104% 为 7 β -羟基胆固醇与胆固醇摩尔质量比): 7 β -羟基胆固醇产率 (%) = (7 β -羟基胆固醇的量) / (胆固醇投料量 * 95% * 104%) * 100%

2 结果

2.1 菌种筛选结果

初筛得到的一株菌株, 经过发酵培养, 离心后用

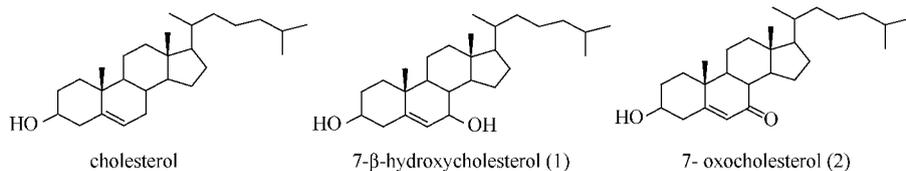


图 2. 胆固醇, 7- β -羟基胆固醇, 7-酮基胆固醇的结构式

Figure 2. Structural of cholesterol, 7- β -hydroxycholesterol and 7-oxocholesterol.

2.2.1 7 β -羟基胆固醇 (7- β -hydroxycholesterol)

(1) 结构鉴定: 从 COM 图谱可见化合物 (1) 有 27 个碳信号, δ 143.5 和 δ 125.5 是 sp² 杂化碳信号, 所以应归于 C-5 和 C-6。在 DEPT 图谱中, 有 14 个 d 峰和 q 峰, 其中 5 个 q 峰在高场部分, 扣除四重峰, 余下的是 d 峰。10 个 t 峰。COM 谱扣除 DEPT 谱, δ 143.5, δ 42.9 和 δ 36.4 均是单峰, 与其相对应的应当是 C-5, C-13 和 C-10。 δ 11.8、 δ 19.2、 δ 18.7、

氯仿萃取, 并用硅胶板薄层层析法 (TLC) 检测, 结果发现该菌株能够将胆固醇转化成主要的一种产物, 结果如图 1。

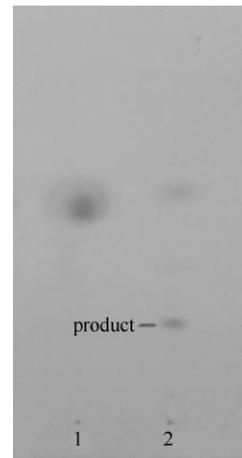


图 1. 菌株发酵产物 TLC 检测

Figure 1. TLC of strain of transformation. Lane 1 is the bioconversion medium without inoculated strain; lane 2 is the bioconversion medium with inoculated strain.

2.2 转化产物的鉴定

由图 1 可以看出, 菌株能够将胆固醇主要转化为一种产物, 产物经分离, 得到一主产物和一次要成分, 纯化到的产物通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR 进行分析鉴定后, 主产物经结构鉴定为 7 β -羟基胆固醇, 次要成分结构鉴定为 7-酮基胆固醇。结构式如图 2。

δ 22.6、 δ 22.8 是 5 个四重峰, 与 5 个甲基峰相对应。这 5 个甲基分别为 C-18, C-19, C-21, C-26 和 C-27, 其中 C-19 比胆甾烷 C-19 移向低场的原因是胆甾醇中 Δ^5 影响的结果。 δ 73.4、 δ 71.4、 δ 55.5、 δ 54.9、 δ 48.3 处于 DEPT 谱的低磁场部分, 其中 δ 71.4 位于低场、显然是 C-3 信号 (羟基的 α -效应), 而 δ 73.4 是 C-7 信号, 见表 1。

在化合物 1 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 600MHz) 中: 5

表 1. 化合物 1 和化合物 2 的¹³C-NMR 数据Table 1. ¹³C-NMR (150MHz) data for compound 1 and 2

C	7-β-hydroxycholesterol (1)	7-oxocholesterol (2)	Cholesterol
1	36.9	36.4	37.3
2	31.6	31.3	31.6
3	71.4	70.6	71.6
4	41.7	41.8	42.2
5	143.5	165.0	140.8
6	125.5	126.2	121.6
7	73.4	202.2	31.9
8	40.9	45.5	31.9
9	48.3	50.0	50.2
10	36.4	38.3	36.5
11	21.1	21.3	21.1
12	28.6	28.6	28.3
13	42.9	43.1	42.3
14	55.5	54.9	56.8
15	26.4	26.3	24.3
16	39.6	38.8	39.8
17	54.9	54.9	56.8
18	11.8	12.0	11.9
19	19.2	18.9	19.4
20	35.7	35.8	35.8
21	18.7	18.7	18.7
22	36.2	36.2	36.2
23	23.9	23.9	23.9
24	39.5	39.5	39.5
25	28.0	28.0	28.0
26	22.6	22.6	22.6
27	22.8	22.8	22.8

个甲基氢信号 $\delta 0.69$ (s, 3H), $\delta 0.86$ (d, 3H, $J = 2.4$), $\delta 0.87$ (d, 3H, $J = 3.0$), $\delta 0.93$ (d, 3H, $J = 6.6$), $\delta 1.05$ (s, 3H) 分别是甾核上对应的 18-CH₃、26-CH₃、27-CH₃、21-CH₃ 与 19-CH₃; 1 个烯氢信号 $\delta 5.28$ (1H, s, C-6), 这是甾醇类化合物的特征信号, 此外, 2 个连氧碳上的氢信号 $\delta 3.54$ (m, 1H, 3-βOH), $\delta 3.84$ (d, 1H, 7-βOH)。此与赵晓欧文献中的报道基本一致^[12]。由此, 可判断该化合物 1 为 7β-羟基胆甾醇。

2.2.2 7-酮基胆固醇(7-oxocholesterol) (2) 结构鉴定: 从 COM 谱图谱可见化合物 (2) 有 27 个碳信号, $\delta 165.0$ 和 $\delta 126.2$ 是 sp² 杂化碳信号, $\delta 165.0$ 与 $\delta 202.2$ 共轭, 所以应归于 C-5 和 C-6。在 DEPT

图谱中, 有 13 个 d 峰和 q 峰, 其中 5 个 q 峰在高场部分, 扣除四重峰, 余下的是 d 峰。10 个 t 峰。COM 谱扣除 DEPT 谱, $\delta 202.2$, $\delta 165.0$, $\delta 43.1$ 和 $\delta 38.3$ 均是单峰, 与其相对应的应当是 C-7, C-5, C-13 和 C-10。 $\delta 12.0$ 、 $\delta 18.9$ 、 $\delta 17.3$ 、 $\delta 22.6$ 、 $\delta 22.8$ 是 5 个四重峰, 与 5 个甲基峰相对应。这 5 个甲基分别为 C-18, C-19, C-21, C-26 和 C-27, 其中 C-19 比胆甾烷 C-19 移向低场的原因是胆甾醇中 Δ^5 影响的结果。 $\delta 70.6$ 、 $\delta 54.9$ 、 $\delta 50.0$ 处于 DEPT 谱的低磁场部分, 其中 $\delta 70.6$ 位于最低场、显然是 C-3 信号, 见表 1。

在化合物 2 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 600MHz) 谱: 5 个甲基氢信号 $\delta 0.68$ (s, 3H), $\delta 0.86$ (d, 3H, $J = 2.4$), $\delta 0.87$ (d, 3H, $J = 3.0$), $\delta 0.92$ (d, 3H, $J = 6.6$), $\delta 1.12$ (s, 3H) 分别是甾核上对应的 18-CH₃、26-CH₃、27-CH₃、21-CH₃ 与 19-CH₃; 1 个烯氢信号 $\delta 5.69$ (1H, s, C-6), 这是甾醇类化合物的特征信号; 此外, 还有 1 个连氧碳上的氢信号 $\delta 3.67$ (1H, m)。此与赵晓欧文献中的报道基本一致^[12]。综上, 可判断该化合物 2 为 7-酮基胆甾醇。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态与菌落特征: 菌株 SE-1 为杆状, 大小为 (0.8 - 1.0) μm × (1.6 - 3.2) μm, 为革兰氏阴性菌, 有极生鞭毛, 在平板上 36℃ 培养 24 h, 菌落呈圆形光滑状、湿润、不透明、边缘整齐、淡黄色、易挑取, 在液体培养基中呈混浊, 不形成菌膜, 在筛选平板上呈白色的不透明菌落, 筛选菌株电镜图片如图 3。

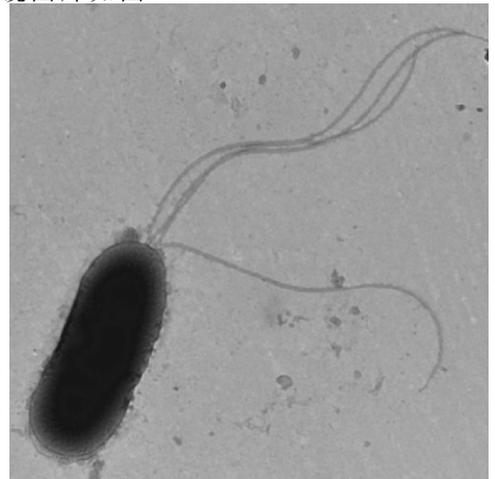


图 3. 菌株 SE-1 的电镜图片 (32000 ×)

Figure 3. Photo of electron microscope of strain SE-1 (32000 ×).

2.3.2 生理生化特征: 通过部分的生理生化试验(表2), 结果显示菌株 SE-1 与洋葱伯克霍尔德氏菌极为相似。

2.3.3 构建系统发育树: 测得菌株 SE-1 的 16S rRNA 序列有 1525 个碱基, 此序列在 GenBank 登录号为 KF681774, 将菌株 SE-1 的 16S rRNA 序列进行对比分析, 图 4 显示了基于 16S rRNA 序列相似性而构建的系统发育树。SE-1 菌株与伯克氏菌属有较高的同源性, 与洋葱伯克霍尔德氏菌同源性达到 99%。

表 2. 菌株 SE-1 的生理生化特征

Table 2. Physiological and biochemical features of strain SE-1

Characteristic	Result	Characteristic	Result
Oxidase activity	-	Citrate utilization	+
Catalase activity	+	Amyolysis	-
Acid from Glucose	+	Gelatin liquefaction	+
Acid from maltose	-	Lecithinase	+
Acid from mannose	+	2% NaCl	+
Acid from lactose	+	5% NaCl	-
Nitrate reduction	-	V-P test	-
M. R test	-	4°C growth	-
Indole test	-	41°C growth	+

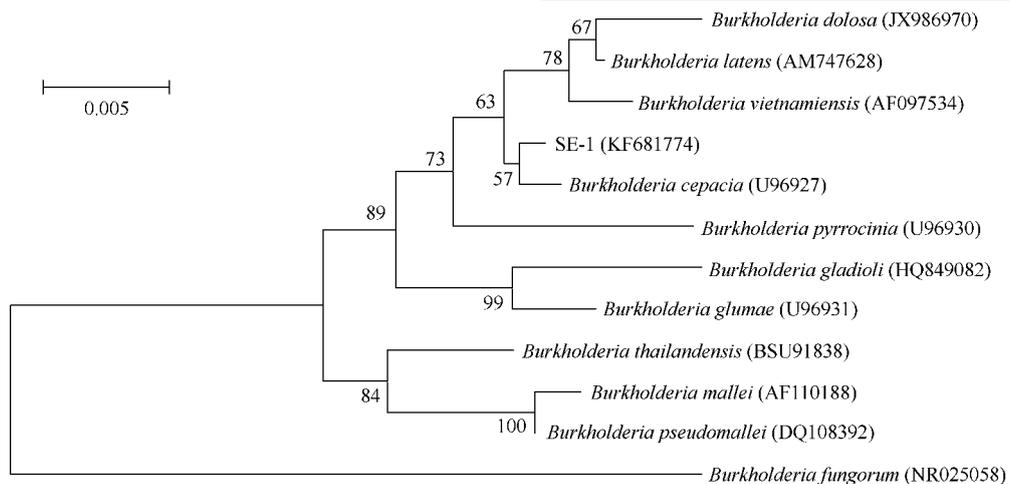


图 4. 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of selected strains. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by boot strap. Bar, 0.5% sequence divergence.

2.4 胆固醇微生物转化 7 β -羟基胆固醇的工艺优化

2.4.1 不同碳源及碳源浓度对 7 β -羟基胆固醇产率的影响

碳源为微生物提供细胞生长以及作为合成某些必要物质提供所需能量, 构成细胞结构或代谢产物中的碳骨架。不同的碳源对微生物的生长有着不同的影响, 本实验选择蔗糖、甘露糖、甘油、可溶性淀粉、柠檬酸、葡萄糖、糖蜜、玉米粉分别作为碳源, 同时选择不添加碳源, 只以胆固醇为碳源的培养基作为对照, 其他条件不变的情况下, 考察不同碳源对胆固醇的转化的影响。

由图 5 可知, 蔗糖、糖蜜, 玉米粉作为碳源, 转化产物的量均高于其他碳源, 其中糖蜜作为碳源时, 7 β -羟基胆固醇的产量达到了 210 mg/L, 产率为 21%。虽然胆固醇经 7 β -羟基化酶转化需要葡萄糖提供 NADPH, 但是也存在葡萄糖分解代谢物的阻遏效应, 导致 7 β -羟基胆固醇的产量并不高。而糖蜜

则是缓慢使用的非阻遏性碳源, 除含有主要糖分外还含有维生素、矿物质、表面活性物及促生长因子等成分, 并且是微生物工业物美价廉的原料, 更适用于胆固醇的转化。

选择利于转化的糖蜜作为碳源, 考察糖蜜浓度为 1%、3%、5%、7%、9%, 其他条件不变的情况下, 对胆固醇转化的影响。由图 6 可知, 糖蜜作为碳源时, 一定的浓度范围对胆固醇的转化是有利的, 当糖蜜的浓度低于 5% 时随着糖蜜浓度的增大, 7 β -羟基胆固醇的产量增加, 但糖蜜的浓度继续增加时, 7 β -羟基胆固醇的产量反而下降。当糖蜜浓度较低时难以维持菌体的正常生长代谢; 浓度较高时, 菌体过盛繁殖, 菌体的耗氧量也增加, 中间代谢产物的积累, pH 下降, 这些因素均不利于菌体的生存。实验结果表明, 糖蜜浓度为 5% 时利于胆固醇的转化, 此时 7 β -羟基胆固醇产率达到了 24.2%。以下实验均以

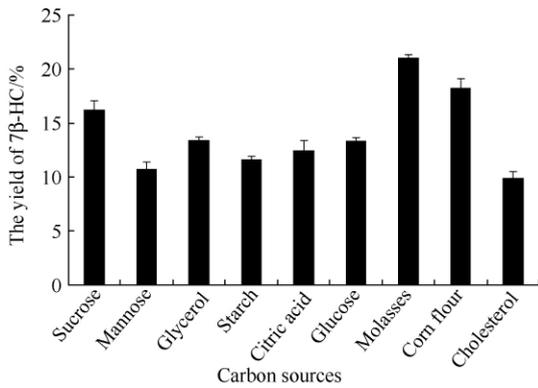


图 5. 不同碳源对 7β-羟基胆固醇产率的影响

Figure 5. Effect of different carbon sources on transformation of 7β-hydroxycholesterol.

5% 的糖蜜作为碳源。

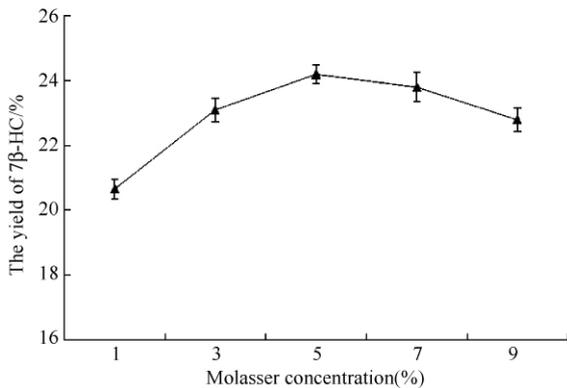


图 6. 糖蜜浓度对 7β-羟基胆固醇产率的影响

Figure 6. Effect of molasses concentration on transformation of 7β-hydroxycholesterol.

2.4.2 不同氮源及氮源浓度对 7β-羟基胆固醇产率的影响:微生物细胞中大约含氮 5% - 13%，它是微生物细胞蛋白蛋和核酸的主要成分。氮源对微生物的生长发育有着重要的意义。本实验考察牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、尿素、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源,其他不变的情况下,对 7β-羟基胆固醇产率的影响。

由图 7 可以看出,洋葱伯克霍尔德氏菌对无机氮源利用效率比较高, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源时,以 7β-羟基胆固醇产率来说,相比于其他氮源较好,7β-羟基胆固醇产量能够达到 248 mg/L,产率达到 24.8%。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源更利于胆固醇的转化,因此选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L 考察对 7β-羟基胆固醇转化的影响

(图 8)。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度较低时,不能满足菌体正常生长代谢所需,但是过高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 也会导致菌体旺盛生长,不能满足溶氧的需求,同样发酵液中 pH 降低,使得超出了反应稳定所需的范围。实验数据表明,最适宜的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 3 g/L,7β-羟基胆固醇产量为 250 mg/L,产率 25%。

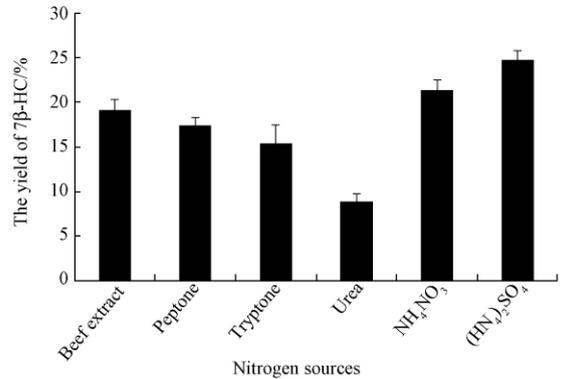


图 7. 不同氮源对 7β-羟基胆固醇产率的影响

Figure 7. Effect of different nitrogen sources transformation of 7β-hydroxycholesterol.

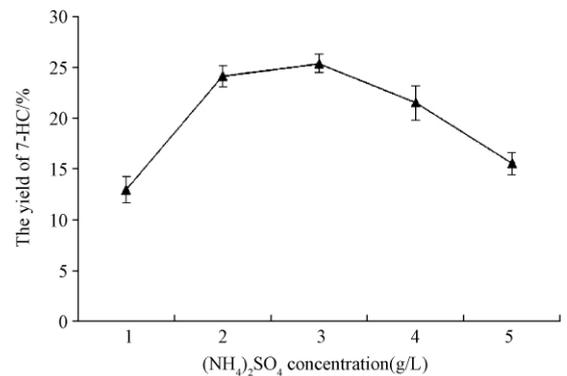


图 8. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 7β-羟基胆固醇产率的影响

Figure 8. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on transformation of 7β-hydroxycholesterol.

2.4.3 底物添加方式对 7β-羟基胆固醇产率的影响:一般甾体类化合物具有较强的疏水性,较难溶于水中。在甾体生物转化工业中,其中影响转化较大的因素就是底物的溶解度。微生物转化甾体的酶属于胞内酶,底物只有进入细胞内才能与酶接触并进行转化反应。目前对甾体的添加方式主要有 3 种:一是直接添加甾体-水悬浮液或者是直接磨成粉末添加;二是使用对细胞伤害较小的表面活性剂来增加甾体的分散性,此方法应用得较广泛;三是添加一定的有机溶剂增加甾体的溶解度,但是有机溶剂多

少都会对微生物产生一定毒害作用^[13]。本实验考察了 Tween-80、SDS、丙酮、乙醇及未加任何助溶剂对 7 β -羟基胆固醇产率的影响, 其中文献中报道利用超声波对甾体-水悬浮液进行处理, 可有效的提高转化率^[14], 因此本实验将考虑使用超声波处理。结

果显示(表 3), 胆固醇直接超声乳化的效果较差, 不利于胆固醇的转化, 7 β -羟基胆固醇产率最低, 使用表面活性剂和有机溶剂对胆固醇进行处理均有利于产量的提高, 而使用 0.2% 的 Tween-80 超声加热乳化, 产量达到 253 mg/L, 产率 25.3%。

表 3. 添加方式对 7 β -羟基胆固醇产率的影响

Table 3. Effect of additive mode on transformation of 7 β -hydroxycholesterol

Way of cholesterol addition	Cholesterol dissolved state	Yield/%	
(1) Tween-80 emulsion (2%)	Ultrasonic heating and emulsify cholesterol, add it after 24 h fermentation	A uniform emulsion dispersed in Tween 80 solution	25.3 \pm 0.6
(2) SDS emulsion (2%)	Ultrasonic heating and emulsify cholesterol, add it after 24 h fermentation	A uniform emulsion dispersed in SDS solution	14.8 \pm 1
(3) Acetone dissolution (4%)	Ultrasonic heating and emulsify cholesterol, add it after 24 h fermentation	Have the adherent phenomenon in the process of transforming, containing partial crystallization	22.8 \pm 1
(4) Ethanol dissolution (4%)	Ultrasonic heating and emulsify cholesterol, add it after 24 h fermentation	The wall phenomenon is more serious while transforming, contains a lot of crystallization	16.3 \pm 1.4
(5) Directly add	Ultrasonic heating and emulsify cholesterol, add it after 24 h fermentation	The hanging wall is serious in the process of transformation, cholesterol is almost insoluble	7.8 \pm 0.7

2.4.4 转化条件的优化: 微生物的生长及底物的转化均需要在合适的条件中进行, 从培养到转化过程的条件对胆固醇的转化有着重要的影响。本实验从胆固醇的添加量、接种量、发酵液初始 pH、发酵温度 4 因素来设计正交试验, 采用正交表 L₁₆(4⁵) 考察 4 种因素对 7 β -羟基胆固醇产率的影响。结果如见正交设计表 4, 方差分析见表 5。

通过正交试验设计及方差分析结果(表 4、5), 可以得出四因素对发酵产 7 β -羟基胆固醇的显著性水平: 胆固醇的量影响高度显著, 接种量影响显著, 发酵液初始 pH 影响显著。因素主次顺序为 ACBD, 最佳水平组合为 A₂B₂C₃D₄, 即胆固醇 1 g/L, 接种量 4%, 发酵液初始 pH7.5, 发酵温度 36 $^{\circ}$ C。

表 4. 正交设计结果(L₁₆(4⁵))

Table 4. Result of the orthogonal test

Experiment number	c(cholesterol) / (g/L) A	c(inoculums) / % B	Initial pH of fermentation C	Termentation temperature / $^{\circ}$ C D	Blank E	Yield / %
1	1(0.5)	1(2)	1(6.5)	1(28)	1	26
2	1	2(4)	2(7)	2(30)	2	32.7
3	1	3(6)	3(7.5)	3(32)	3	30.9
4	1	4(8)	4(8)	4(36)	4	30.1
5	2(1)	1	2	3	4	32.8
6	2	2	1	4	3	31.1
7	2	3	4	1	2	28.1
8	2	4	3	2	1	28.9
9	3(1.5)	1	3	4	2	28.8
10	3	2	4	3	1	28.9
11	3	3	1	2	4	21.9
12	3	4	2	1	3	25.5
13	4(2)	1	4	2	3	21.1
14	4	2	3	1	4	25.9
15	4	3	2	4	1	21.8
16	4	4	1	3	2	18.1
K1	119.7	108.7	97.1	105.5	105.6	T = 432.6
K2	120.9	118.6	112.8	104.6	107.7	CT = 11696.4
K3	105.1	102.7	114.5	110.7	108.6	S _T = 290.9
K4	86.9	102.6	108.2	111.8	110.7	
S	189.2	42.5	46.0	9.9	3.4	

表 5. 方差分析表

Table 5. Analysis of variance

Sources of variance	S	f	V	F	Significant	F _a
A	189.2	3	63.1	56.4	* *	F _{0.01} (3,3) = 29.46
B	42.5	3	14.2	12.7	*	F _{0.05} (3,3) = 9.28
C	46.0	3	15.3	13.7	*	F _{0.05} (3,3) = 9.28
D	9.9	3	3.3	2.9		
e	3.4	3	1.1			
T	290.9	15				

按照优化后的培养条件 (g/L): 糖蜜 5%, (NH₄)₂SO₄ 0.25, MgSO₄ 0.25, K₂HPO₄ 0.25, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, NaCl 0.05, CaCl₂ 0.001, 0.2% Tween-80 + 胆固醇添加量 1 g/L, 接种量 4%, 发酵液初始 pH7.5, 发酵温度 36℃, 220 r/min 与原培养条件 (g/L): 酵

母膏 5, MgSO₄ 0.25, K₂HPO₄ 0.25, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, NaCl 0.05, CaCl₂ 0.001, 0.2% SDS + 胆固醇添加量 1 g/L, 接种量 2%, 发酵液初始 pH7, 发酵温度 36℃, 220 r/min 进行对比试验, 优化后比优化前提高了 20.8% (表 6)。

表 6. 验证实验结果

Table 6. Results of validating experiment

Experiment program	Yield of 7β-hydroxycholesterol / %			Average yield / %
	Experiment times			
	1	2	3	
after optimization	34.2	33.8	35.1	34.4
before optimization	13.6	14.3	12.9	13.6

3 讨论

微生物转化技术在甾体药物合成中的应用日益扩大, 特别是对于某些化学法难以完成的反应更是一种有效的手段^[15]。因此筛选高效的转化菌株成为了研究的热点。我们从土壤中筛选到一株具有转化胆固醇能力的菌株 SE-1。

SE-1 菌株可将胆固醇转化为 2 种产物, 经过波谱解析分别确定为 7β-羟基胆固醇和 7-酮基胆固醇, 其中 7β-羟基胆固醇为转化的主产物。试验结果表明, SE-1 菌株的形态和生理生化特征与伯克霍尔氏菌属基本一致^[11]。构建 SE-1 菌株的 16S rRNA 序列分析系统发育树中, 菌株 SE-1 与洋葱伯克霍尔氏菌聚成一个类群, 序列同源率为 99%。综合各项试验结果, 将 SE-1 菌株鉴定为洋葱伯克霍尔氏菌 (*Burkholderia cepacia*), 命名为洋葱伯克霍尔氏菌 SE-1。在 Doukyu 和 Aono^[16] 也筛选到同种的菌株 (后改名为 *Burkholderia cepacia* strain ST-200^[17]), 但其主要是将 3β-羟基甾醇转化为酮甾醇。本文筛选的 SE-1 菌株转化胆固醇获得的主产物 7β-羟基胆固醇, 其对体外培养增殖分化的细胞及肿瘤细胞

具有细胞毒性作用, 诱导细胞凋亡; 而对非增殖的、缓慢分裂的神经元和星形胶质细胞没有毒性作用^[18]。而这对微生物转化生产 7β-羟基胆固醇及其工业化研究具有重要意义。在胆固醇的 7β-羟基化的工艺优化研究中, 当在胆固醇-吐温乳化液的添加量为 1 g/L, 碳源糖蜜 5%, 氮源 (NH₄)₂SO₄ 0.3%, 接种量 4%, 发酵液 pH7.5, 36℃ 发酵的条件下, 7β-羟基胆固醇的产率最高, 达到 34.4%, 比优化前提高了 20.8%。本研究中底物浓度对转化率有较大影响, 由于底物及产物对反应的抑制, 胆固醇的最大添加量有限, 高浓度的底物将严重阻碍该菌体生长及的转化, 因此欲提高转化率, 需要增加底物的溶解度, 促进底物的细胞的接触。其中双液相体系虽可克服这个问题, 但是有机溶剂仍对微生物具有一定的毒性^[15]。Jin-feng Zhang 等尝试利用海藻酸盐-壳聚糖-海藻酸盐 (ACA) 组成膜液芯微胶囊的固定化技术来减少传质阻力和增加细胞对毒性物质的耐受能力, 且取得了一定的成功^[19]。Guang Li^[20] 运用环糊精包合技术增加了底物的溶解度, 大大提高了抗肿瘤药物依西美坦的转化产率。或者从工业育种方面解决菌株转化率低的根本问题。这些技术对 7β-羟基胆固醇产量有很大的提高空间, 也有待于进一

步工业化的研究。

参考文献

- [1] Kieslic K. Microbial side-chain degradation of sterols. *Journal of Basic Microbiology*, 1985, 25 (7) : 461-474.
- [2] de Padua RM, Meitinger N, de Souza FJ, Waibel R, Gmeiner P, Braga FC, Kreis W. Biotransformation of 21-O-acetyl-deoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W. 1. 4). *Steroids*, 2012, 77 (13) : 1373-1380.
- [3] Liu WH, Lo CK. Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, 19 (4) : 269-272.
- [4] Lee CY, Chen CD, Liu WH. Production of androsta-1, 4-diene-3, 17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation (1). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 38: 447-452.
- [5] Wettstein A. Conversion of steroids by microorganisms. *Experientia*, 1955, 11 (12) : 465-504.
- [6] Zhang L. Application of microbial transformation in drugs synthesis of steroid. *Pharmaceutical Industry*, 1985, 16 (1) : 37-41. (in Chinese)
张丽青. 微生物转化在甾体药物合成中的应用. 医药工业, 1985, 16 (1) : 37-41.
- [7] Sih CJ, Whitlock Jr HW. Biochemistry of steroids. *Annual Review of Biochemistry*, 1968, 37 (1) : 661-694.
- [8] Sih CJ. Process for preparing steroids. U. S. Patent: 4, 444, 884. 1984, 4, 24.
- [9] Marscheck WJ, Kraychy S, Muir RD. Microbial degradation of steroids. *Applied Microbiology*, 1972, 23: 72-76.
- [10] Yang B, Wang Y, Chen X, Feng J, Wu Q, Zhu D, Ma Y. Biotransformations of steroids to testololactone by a multifunctional strain *Penicillium simplicissimum* WY134-2. *Tetrahedron*, 2014, 70 (1) : 41-46.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 349-370.
- [12] 赵晓欧. 7-酮基胆甾醇和 7 β -羟基胆甾醇的合成研究. 吉林大学硕士学位论文, 2010.
- [13] 茅燕勇. 微生物转化法制备 11 α -羟基化坎利酮. 南京工业大学硕士学位论文, 2005.
- [14] Yang K, Wang F, Feng X, Duan S, Zhang L. The effects of strain treatment by magnetized water on microbial transformation of steroid. *Microbiology China*, 1999, 2 (5) : 336-338. (in Chinese)
阳葵, 王福东, 冯霞, 段世铎, 张鏊. 磁化水处理菌种在甾体微生物转化过程中的效应. 微生物学通报, 1999, 2 (5) : 336-338.
- [15] 林彦良. 甾体化合物微生物转化的研究. 山东大学博士学位论文, 2009.
- [16] Doukyu N, Aono R. Purification of extracellular cholesterol oxidase with high activity in the presence of organic solvents from *Pseudomonas* sp. strain ST-200. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (5) : 1929-1932.
- [17] Doukyu N, Aono R. Cloning, sequence analysis and expression of a gene encoding an organic solvent-and detergent-tolerant cholesterol oxidase of *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57 (1-2) : 146-152.
- [18] Kupferberg A, Cremel GR, Behr P, Van DA, Luu B. Differential sensitivity of astrocyte primary cultures and derived spontaneous transformed cell lines to 7 β -hydroxycholesterol effect on plasma membrane lipid composition and fluidity, and on cell surface protein expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1991, 101: 11-22.
- [19] Zhang JF, Liu ZQ, Zhang XH, Zheng YG. Biotransformation of iminodiacetonitrile to iminodiacetic acid by *Alcaligenes faecalis* cells immobilized in ACA-membrane liquid-core capsules. *Chemical Papers*, 2014, 68 (1) : 53-64.
- [20] Li G, Li F, Deng L, Feng XL, Zou H, Xu KP, Li T, Tan GS. Increased yield of biotransformation of exemestane with β -cyclodextrin complexation technique. *Steroids*. 2013, 78 (11) : 1148-1151.

Screening and optimization of cholesterol conversion strain

Dan Fan, Bingjian Xiong, Cuiping Pang, Xiangdong Zhu*

College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China

Abstract: [Objective] Bacterial strain SE-1 capable of transforming cholesterol was isolated from soil and characterized. The transformation products were identified. Fermentation conditions were optimized for conversion. [Methods] Cholesterol was used as sole carbon source to isolate strain SE-1. Morphology, physiological and biochemical characteristics of strain SE-1 were studied. 16S rRNA gene was sequenced and subjected to phylogenetic analysis. Fermentation supernatants were extracted with chloroform, the transformation products were analyzed by silica gel thin layer chromatography and Sephadex LH20. Their structures were identified by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Fermentation medium including carbon and nitrogen, methods of adding substrates and fermentation conditions for Strain SE-1 were optimized. [Results] Strain SE-1 was a Gram-negative bacterium, exhibiting the highest homologs to *Burkholderia cepacia* based on the physiological analysis. The sequence analysis of 16S rRNA gene of SE-1 strain and comparison with related *Burkholderia* show that SE-1 strain was very close to *B. cepacia* (Genbank No. U96927). The similarity was 99%. The result of silica gel thin layer chromatography shows that strain SE-1 transformed cholesterol to two products, 7β-hydroxycholesterol and the minor product was 7-oxocholesterol. The optimum culture conditions were: molasses 5%, (NH₄)₂SO₄ 0.3%, 4% of inoculation, pH 7.5 and 36°C. Under the optimum culture condition, the conversion rate reached 34.4% when concentration of cholesterol-Tween 80 was 1 g/L. Cholesterol 7β-hydroxylation conversion rate under optimal conditions was improved by 20.8%. [Conclusion] Strain SE-1 isolated from soil is capable of converting cholesterol at lab-scale.

Keywords: cholesterol, biotransformation, *Burkholderia cepacia*, 7β-hydroxycholesterol

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21366012) and by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20122BAB204023)

* Corresponding author. Tel: +86-15979170780; E-mail: zhuxdau@qq.com

Received: 9 January 2014/ Revised: 10 April 2014