

拟结晶投料环氧黄体酮犁头霉羟化过程研究

Hydroxylation of 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnenene-3,20-dione by *Absidia coerulea* with Pseudo-crystallo Feed

王 嘉,关怡新*,王海清,姚善泾

WANG Jia, GUAN Yi-Xin*, WANG Hai-Qing and YAO Shan-Jing

浙江大学 化学工程与生物工程学系 杭州 310027

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

摘 要 环氧黄体酮羟化产物是多种甾体激素药物的中间体,其 11-羟化过程利用犁头霉(*Absidia coerulea*)所得转化率远高于其他菌株。采用拟结晶投料方式,将环氧黄体酮颗粒细化后加一定量水、 β -环糊精、吐温-80 超声波乳化后投入发酵液中。这种投料方式可避免传统投料中使用有机溶剂毒害细胞的缺点,更利于底物转化。采用多层前神经网络建立培养基和投料成分分配比与转化率关系模型,并将具有全局寻优性能的粒子群优化算法(PSO)应用于培养基和投料成分分配比的优化,收敛速度快,效果好。在优化的操作条件下,摇瓶中投料浓度为 10g/L 时底物转化率达到 87.5%,在 3.7L 发酵罐中投料浓度提高到 20g/L 时底物转化率仍高达 86.6%。

关键词 犁头霉,环氧黄体酮,拟结晶投料,羟化反应,粒子群优化算法

中图分类号 TQ467.8 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0662-05

Abstract The 11-hydroxylation of 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnenene-3,20-dione as a useful intermediate for the preparation of hormones can be achieved by the mycelium of *Absidia coerulea* at higher conversion rate than using other strains. In this paper 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnenene-3,20-dione mixed with a little water, β -cyclodextrin, Tween-80 was introduced into the fermentation broth after ultrasonication to increase pseudo-water-solubility of the hydrophobic substrate. This pseudo-crystallo feed could avoid the toxicity of organic solvents and was more available for the microbial transformation. The multi layer feed-forward neural network was used to setup a model which indicated the relationship between medium and feed components and the conversion rate. Particle swarm optimization (PSO), which was a stochastic global optimization algorithm and of which the convergence speed was high, was applied to obtain the optimal concentration of the medium and feed components. At optimum conditions with the pseudo-crystallo feed, the conversion rate of 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnenene-3,20-dione at an initial concentration of 10g/L was 87.5% in shaking flasks. The conversion rate of the substrate was up to 86.6% at higher concentration of 20g/L feed in a 3.7L fermentor.

Key words *Absidia coerulea*, 16 α ,17 α -epoxy-4-pregnenene-3,20-dione, pseudo-crystallo feed, hydroxylation, particle swarm optimizer algorithm

Received: December 6, 2005; Accepted: January 20, 2006.

This work was supported by the grants from the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2005C31028) and Hangzhou (No. 200433124).

* Corresponding author. Tel: 86-571-87951982; Fax: 86-571-87951015; E-mail: guanyx@zju.edu.cn

浙江省科技计划(No. 2005C31028)和杭州市科技计划(No. 200433124)资助项目 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

环氧黄体酮即 $16\alpha, 17\alpha$ -环氧-孕甾-4-烯-3, 20-二酮, 俗称沃氏氧化物, 它的 11-羟化产物是肾上腺皮质激素生产中的关键中间体, 因而其转化率的提高将大大降低双丙酸倍氯米松等多种甾体药物的生产成本。微生物羟化菌种主要有赭曲霉、黑根霉、新月弯孢霉和犁头霉等。目前, 国内环氧黄体酮羟化过程主要采用黑根霉来完成, 5g/L 投料浓度下转化率仅为 50% 左右^[1], 相比之下犁头霉具有转化率高, 反应条件温和和能耗低等优点。

甾体微生物催化存在的主要问题是底物在水溶液培养基中的溶解度偏低。环氧黄体酮是一种疏水性化合物, 在水中溶解度极低, 使得底物与微生物细胞不能很好接触, 导致转化率偏低和发酵时间延长。传统的解决方法是使用有机溶剂如丙二醇、乙醇等增加溶解度, 但这些溶剂对微生物具有毒害作用, 用量必须控制在一定范围内, 底物浓度的提高也因此受到限制^[2]。此外, 国际石油价格日渐上涨, 有机溶剂成本也随之升高, 所以有必要尽量减少有机溶剂的使用。近年来, 人们对此进行了大量的研究。国外有报道^[3, 4]添加 β -环糊精增强甾体在水溶液中的溶解度, 国内有学者^[5]使用表面活性剂处理底物等, 但基本上都是采用单因素法对实验条件进行优化。

单调非线性隐层活化函数的多层前神经网络 (Multi layer feed-forward neural network, MFNN) 由于其强大的拟合功能, 被广泛应用于化学化工过程的建模^[6]。粒子群优化算法 (Particle swarm optimization, PSO) 源自鸟群或鱼群行动时, 能透过个体间特别的讯息传达方式, 使整个团体朝同一方向、目标而去, 是模仿此类生物行为反应来寻求完成群体最大利益的方法, 近年来开始被广泛应用到复杂系统优化问题的求解^[7]。

本文综合考察了添加 β -环糊精、吐温-80 和超声波等处理方法对环氧黄体酮 11-羟化过程的影响。建立由误差反传算法训练的单隐层前传人工神经网络模型, 拟合各成分浓度与底物转化率关系的函数, 并采用具有全局寻优性能的粒子群算法来寻找最佳浓度配方, 以提高底物的投料浓度和转化率, 降低甾体药物的生产成本。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

环氧黄体酮, 市售工业品, 熔点 $\geq 202^\circ\text{C}$, 含量 $\geq 98\%$; 其他生化试剂均为进口或国产分析纯。发酵罐 KLF2000 为瑞士 Bioengineering 公司产品; 高效液

相色谱仪 1100 为美国 Aglient 公司产品; 超声波清洗器 DL-360A 为上海之信仪器有限公司生产。

1.2 菌株

蓝色犁头霉 (*Absidia coerulea*) AB04-12 菌株, 浙江大学生物工程研究所筛选保藏。

1.3 培养基成分

斜面培养基: 土豆汁 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 1.0%, pH6.8。基本发酵培养基: 葡萄糖 1%, 玉米浆 1.2% ~ 1.5%, 酵母膏 0.2%, pH6.8。

1.4 实验方法

1.4.1 环氧黄体酮在水中溶解度: 测定环氧黄体酮在乙醇中浓度对吸光度的标准曲线。取足量环氧黄体酮常温下溶于水中, 离心取上清液蒸干, 用乙醇溶解后测吸光度, 与标准曲线对照。

1.4.2 拟结晶投料方式: 取环氧黄体酮粉末加入水中, 再加入一定量 β -环糊精, 吐温-80, 超声波振荡成乳液后, 加入少量青霉素粉末, 配制成拟结晶投料液。

1.4.3 确定最佳培养基组成及投料配比: 在摇瓶中按表 1 加入培养基各组分, 制成 50mL 发酵液 10 个样品。并按表 1 中不同添加量配制投料添加物, 以 10g/L 发酵液的浓度拟结晶方式投入对应摇瓶中。采用 Matlab 神经网络工具箱建立培养基和投料组成与底物转化率的模型, 根据模型使用粒子群优化算法确定最佳培养基和投料组成。

1.4.4 环氧黄体酮的羟化反应: 发酵液中接入孢子, 在 27°C 下发酵 24h, 加入少量环氧黄体酮诱导, 2 ~ 3h 后投料, 继续转化 48h, 测转化率。考察底物投料浓度与转化率的关系。

1.4.5 发酵罐放大实验: 按最佳培养基配比配制 2.5L 发酵液, 诱导后按最佳投料添加物组成拟结晶投料, 投料浓度提高到 20g/L。每隔 4h 取样, 分别测定菌丝干重和底物转化率, 并记录 pH 值。

1.5 分析方法

转化率测定采用高效液相色谱法, ODS, $5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$ C_{18} 柱, 检测波长 240nm, 流动相为甲醇: 水 = 8: 2 (V/V)。由面积归一法, 用羟化后的霉菌氧化物色谱峰面积与所有物质 (包括残留底物和产物) 的峰面积总和的百分比来表示转化率。

2 结果与讨论

2.1 拟结晶投料效果

测得常温下, 环氧黄体酮在水中的溶解度仅为 $6.5 \times 10^{-3}\text{g}$ 。犁头霉产生的羟化酶为胞内酶, 底物必须扩散在发酵液中并且进入细胞内部才能与酶接

触进行有效转化,因此底物的溶解是产物生成过程中的控制步骤。本实验将环氧黄体酮机械粉碎成有

机溶剂水析所得同样数量级粒径,添加少量乳化剂和增溶剂来促进底物在水中的分散。

表 1 培养基及拟结晶投料添加物组成
Table 1 Components of medium and feed with pseudo-crystallo mode

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucose(g/L)	4	6	8	10	2	12	14	16	18	2
Corn steep(g/L)	6	9	12	15	3	18	21	24	27	3
Yeast extract(g/L)	1	1.5	2	0.5	2.5	3	3.5	4	0.5	4.5
MgSO ₄ (g/L)	0.1	0	0.2	0.2	0.4	0.5	0	0.6	0.7	0.8
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	6	9	12	3	15	18	21	24	3	27
16 α ,17 α -epoxy-4-pregnen-3,20-dione(g/L)	0	0.2	0.4	0.4	0.8	0	1	1.2	1.4	1.6
β -Cyclodextrin(g/L)	2	4	0	4	8	10	12	0	14	16
Tween-80(g/L)	0.1	0.2	0	0.2	0.4	0.5	0.6	0	0.7	0.8
Penicillin(g/L)	0.02	0	0.04	0.04	0.08	0.1	0	0.12	0.14	0.16
Conversion rate/%	26.8	28.2	22.0	41.0	40.8	58.6	64.8	68.6	63.6	42.1

在实验过程中,发现采用本文的拟结晶投料方式效果远好于单种因素作用,结果如图 1 所示。在 10g/L 投料浓度下,只用超声波处理底物时,转化率仅为 30.1%;只加入吐温-80,底物转化率为 49.6%;仅加入 β -环糊精,底物转化率提高为 58.5%,与丙二醇投料方式相当;而拟结晶投料可将底物转化率提高到 70% 左右。采用拟结晶投料时,将添加了环氧黄体酮细末、 β -环糊精和吐温-80 的水溶液在超声波中处理 5min~8min,整个混悬液呈乳白色牛奶状,形成拟均相体系,底物分散效果很好。

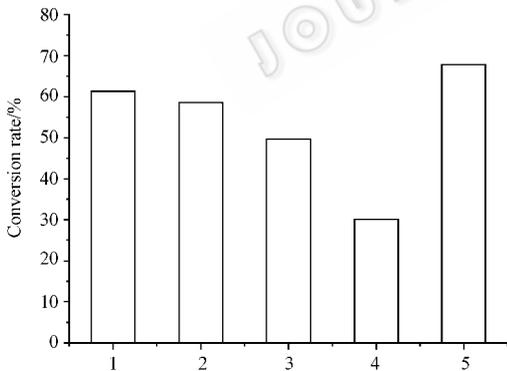


图 1 不同底物处理方式下的转化率
(投料浓度 10g/L)

Fig.1 Substrate conversion rate under different feed mode (feed concentration 10g/L)

1: propanediol; 2: β -Cyclodextrin; 3: Tween-80;
4: ultrasonication; 5: pseudo-crystallo.

β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)分子中间形成一个空腔,环氧黄体酮分子嵌入其中形成超微囊状包结物,增强了溶解度和分散性,但不影响生物催化本身。吐温-80 在水溶液中形成内憎水的胶团,环氧黄

体酮分子扩散进入胶团内部,呈单分子或多分子聚集状态高度分散在水中。此外,吐温-80 可增加细胞壁和细胞质膜的通透性,改变细胞表面结构^[8,9],促进底物进入细胞的传质过程。超声波起到细化颗粒,增大固液界面,加速溶解的作用,比常规的研磨和搅拌更有效地降低水悬液中颗粒的尺寸^[10]。

2.2 最佳培养基组成及投料配比

在每个样品的平行样中选取转化率较高的作为该组分的转化率,以减少操作带来的误差。本文采用单隐层的多层前传神经网络,其结构图见图 2。网络结构为 9-2-1,9 为输入维数,取为自变量数;2 为隐单元数;1 为输出单元数,取为因变量数。其中输入 $x = [x_1, x_2, \dots, x_9]$ 输出 y ,而且输入层至隐层连接权矩阵为 w_{ih} ,隐层阈值为 $b_i = [b_{i1}, b_{i2}]$,隐层至输出层连接权矩阵为 w_{ho} ,输出层阈值向量为 b_o ,则神经网络函数为: $y = \text{tansig}(h \cdot w_{ho}) + b_o$ 。其中 $h = x \cdot w_{ih} + b_i$, $\text{tansig}(x) = \frac{e^{-x} - e^x}{e^{-x} + e^x}$ 为隐层活化函数。

粒子群算法所用的参数为:粒子数目 20 个,最大迭代次数 100 次,局部加速因子 2,全局加速因子 2,惯性权值从初始的 0.9 线性下降至 0.4。对转化过程进行全局搜索寻优,最后得到的仿真误差为 5.3850×10^{-13} 。由图 3 可知,经过 16 代迭代之后,最佳适应度值趋于稳定,为增加可信度,我们进行 100 代的全局寻优,最终获得的最佳培养基组成及投料配比为葡萄糖 15.58g/L,玉米浆 27.02g/L,酵母膏 3.47g/L,硫酸铵 10.72g/L,硫酸镁 0.62g/L,诱导物(环氧黄体酮)1.48g/L,吐温-80 0.68g/L, β -环糊精 10.00g/L,青霉素 0.04g/L。

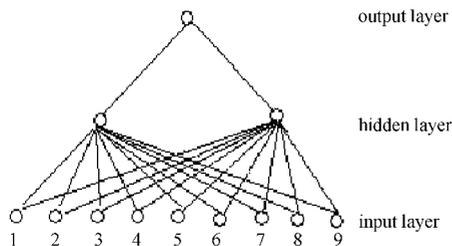


图2 神经网络模型结构图

Fig. 2 Structure of neural network model

1 : glucose ; 2 : corn steep ; 3 : yeast extract ; 4 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
5 : MgSO_4 ; 6 : 16 α , 17 α -epoxy-4-pregnen-3, 20-dione ; 7 :
Tween-80 ; 8 : β -CD ; 9 : penicillin .

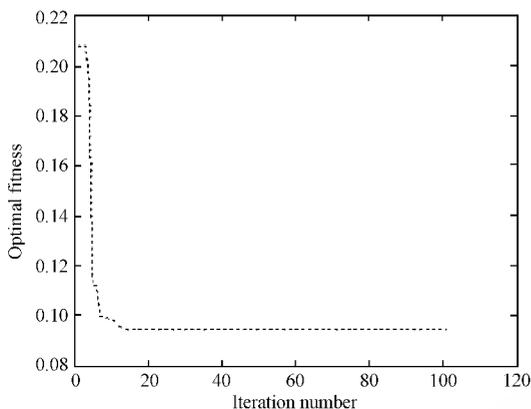


图3 最佳适应度随迭代次数趋势图

Fig. 3 Variation of optimal fitness with iteration number

和酵母膏为氮源,添加镁离子和青霉素均可促进产物形成。实验过程中发现,投料前 2h 在发酵液中添加少量环氧黄体酮有利于羟化反应的进行,因此将其用作该生物催化过程的诱导剂。虽然随着 β -环糊精和吐温-80 浓度的增加,底物在水中溶解度增大,但过多的 β -环糊精会阻碍菌丝体吸附底物并造成底物与酶活性位点的结合障碍。而吐温-80 浓度过高将使初始反应速度加快,从而产物生成过快,对可逆的羟化反应造成反馈抑制,并且细胞表面结构改变过多对细胞生长不利,最终导致转化率降低。

各种物质在水溶液中相互作用并互相影响,用粒子群优化算法对各种添加物的组成进行优化,免去了正交法的繁复实验过程。经过验证性实验,在 10g/L 的投料浓度时,底物转化率由优化前的 67.8% 提高到 87.5% ,说明粒子群优化算法是一种全局优化的方法,寻优速度快,实验结果可靠,具有良好的预测性能。

2.3 不同投料浓度对转化率的影响

一般而言,对于甾体药物的微生物转化,人们希望在不影响转化率的同时尽量提高底物投料浓度,

以降低生产成本。将 2.1 和 2.2 节优化的结果应用到摇瓶培养中,本文考察了不同投料浓度下底物转化率的变化,结果如图 4 所示。由图可见,在低底物浓度时,转化率变化不大,基本在 80% 以上。进一步随着底物浓度增加,转化率剧烈降低。当投料浓度为 20g/L 时转化率仍可达 68.6% ,可见采用拟结晶投料可大大提高底物的投料浓度。

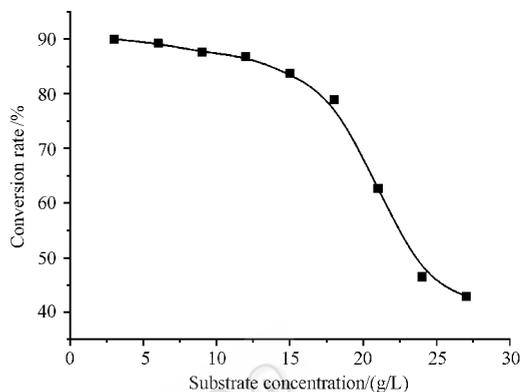


图4 摇瓶中底物浓度与转化率的关系

Fig. 4 Effects of substrate concentration on conversion rate in shaking flasks culture

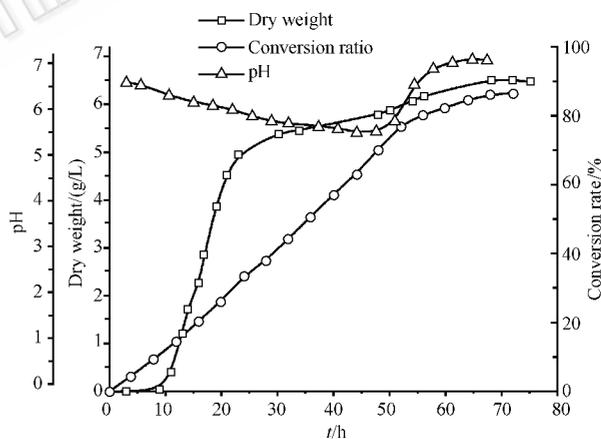


图5 细胞干重、pH、转化率变化曲线(投料浓度 20g/L)

Fig. 5 Time-courses of dry weight, pH and substrate conversion rate in the fermentor (feed concentration 20g/L)

2.4 发酵罐放大实验

采用拟结晶投料和最佳培养基及投料配比,本文进一步考察了犁头霉在发酵罐中 20g/L 投料浓度下羟化过程各参数的变化,结果如图 5 所示。由菌体生长曲线可知,在 24h 左右菌体对数生长期结束,可以进行诱导和投料。由环氧黄体酮转化曲线可见,随着反应不断进行,底物转化率不断升高,在 72h 附近达到最高值 86.6% 且趋于稳定,表明微生物转化基本完成可以放罐。发酵过程 pH 变化曲线表明 pH 在霉菌培养初期逐渐下降,因为发酵初始

阶段菌丝生长消耗养料,葡萄糖分解产酸。投料后 pH 逐渐上升,此时羟化反应开始进行,生成 OH^- , 培养基碱性增强。在实际发酵过程中,为确保甾体化合物转化在合适的环境下进行,应使 pH 保持在 5.8 左右,因而需加稀盐酸调节 pH。

摇瓶培养和发酵罐发酵存在着一定的差异,主要表现在溶解氧水平、剪切力和混合效果不同。对比图 4 和图 5 结果,表明在相同的培养基组成和投料配比、同样的投料方式下 20g/L 投料浓度时,发酵罐中的最终底物转化率达到 86.6%,比摇瓶中高出 18.0%。

3 结论

犁头霉对环氧黄体酮具有良好的 11-羟化作用。投料过程采用 β -环糊精、吐温-80 和超声波技术相结合的拟结晶投料方法,在优化的培养基组成和投料配比下,效果大大优于 β -环糊精、吐温-80 或超声波单种因素作用,对微生物细胞及转化过程毒害小,转化率高,能有效代替传统的有机溶剂投料法。粒子群优化算法所需参数少,收敛速度快,优化结果十分有效。在优化的操作条件下,10g/L 投料浓度下摇瓶中底物转化率达到 87.5%,比优化前提高了 19.7%。在发酵罐中,20g/L 投料浓度下环氧黄体酮的转化率仍高达 86.6%,大大高于黑根霉羟化过程的转化率。

REFERENCES (参考文献)

[1] Yu DK(郁定坤), Zhou P(周璟), Niu JJ(钮君健) *et al.*. Immobilized cells of *Rhizopus nigricans* and their application in steroid transformation. *Acta Academiae Medicinae Primae Shanghai*

(上海第一医学院学报), 1984, 11(4): 267 - 273

- [2] Xu SW(徐诗伟), Xu Q(徐清), Fa YH(法幼华) *et al.*. Studies on the production of 16 β -methyl-11 α , 17 α , 21-trihydroxy-1, 4-pregnadiene-3, 20-dione from 16 β -methyl-17 α , 21-dihydroxy-1, 4-pregnadiene-3 20-dione-21-acetate by *Absidia*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, 16(4): 482 - 484
- [3] Mahato SB, Garai S. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*, 1997, 62: 332 - 345.
- [4] Chincholkar SB, Sukhodol'skaya GV, Baklashova TG *et al.*. Peculiarities of the 11 β -hydroxylation of steroid compounds by the mycelium of *Gurularia lunata* VKMF 644 in the presence of β -cyclodextrin. *Pril. Biokhim. Microbia*, 1992, 28: 685 - 693
- [5] Qi XL(齐秀兰), Yan HL(阎浩林), Guo XM(郭信梅) *et al.*. Sulfoxide and Tween 80 to lysine production in *Corynebacterium crenatum*. *Biotechnology*(生物技术), 1997, 7(5): 21 - 25.
- [6] Yu F(于飞), Liu XM(刘喜梅), Wu QH(鄂齐斌). Application of neural network to process modelling. *Journal of Qingdao Institute of Chemical Technology*(青岛化工学院学报), 1996, 17(4): 387 - 391
- [7] Zhang LH(张利彪), Zhou CG(周春光), Liu XH(刘小华) *et al.*. Application of particle swarm optimization for solving optimization problems. *Journal of Jilin University*(吉林大学学报), 2005, 23(4): 385 - 389.
- [8] Jing DH(靖德兵), Li PJ(李培军), Sun TH(孙铁珩) *et al.*. Study on the optimization of solid fermentation for the production of cellulase from *Aspergillus niger*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture* (中国生态农业学报) 2004, 12(3): 172 - 174
- [9] Wang J(王俊), Chen CZ(陈长治), Li BA(李保安) *et al.*. Conversion of RSA into hydrocortisone by immobilized *Absidia orchidis* in a propanediol-containing system. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1996, 12(增刊): 273 - 275
- [10] Yang K(阳葵), Li X(李晓静), Feng X(冯霞) *et al.*. Effects of substrate dispersion and dissolution on microbial enzymatic conversion of steroid. *Microbiology*(微生物学通报), 2001, 28(6): 68 - 71