

甾体化合物 RSA 的 11 β -羟基化反应

王 敏* 路福平 王凤清 蒋 岳 杜连祥

(天津轻工业学院食品工程系,天津 300222)

关键词 11 β -羟基化, 新月弯孢霉, 原生质体, 化合物 RSA

中图分类号 Q591 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)06-0710-03

原生质体在甾体中的应用起始于 Dlugonski 在 1984 年采用 *Cunninghamella elegans* 转化可的松龙(17 α ,21-二羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮)和 *Hyphoderma roseum* 转化 6 α -氟-可的松龙-16,17-醋酸酯(6 α -Flu-17 α ,21-二羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮-16,17-醋酸酯),发现原生质体具有甾体转化能力^[1,2]。Sedlaczek 进一步采用等重的原生质体和菌丝体进行比较,原生质体的羟基化能力较后者提高了 3 倍,表现出很高的转化能力^[3],从而引起人们的关注。随后展开了有关原生质体转化甾体的条件、固定化技术的应用等研究工作^[4,5,6],不断提高原生质体的稳定性,为甾体的生物转化提供了一种新的方式。本文报道了新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)的原生质体转化化合物 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)的转化条件;以及真菌细胞壁抑制剂多氧菌素(Polyoxins)对菌丝体转化 RSA 的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种:新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)CL114,由本院应用微生物研究室保存^[7]。

1.1.2 培养基:(1)菌丝培养基^[7];(2)发酵培养基^[8]。

1.1.3 试剂 酶:溶壁酶和纤维素酶^[7]。甾体:化合物 RSA,

氢化可的松(简称 11 β -OH),表氢化可的松(11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮,简称 11 α -OH)和 14 α -OH(14 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮),均由天津市津津制药厂提供。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备方法:参见文献[7]。

1.2.2 菌丝体的甾体转化:取 1mL 浓度为 3×10^6 /mL 孢子悬液加入装有 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶内,28 $^{\circ}$ C,180r/min 振荡培养 24h。取 5mL 菌丝体培养液于 50mL 三角瓶内,投入 0.05% (W/V)的化合物 RSA,28 $^{\circ}$ C,150r/min 转化 36h。

1.2.3 原生质体的甾体转化:取制备的原生质体溶液,离心(3000r/min,10min),去除上清液,然后重新悬浮于 0.8mol/L 甘露醇溶液中,调整原生质体浓度为 $2 \sim 3 \times 10^6$ /mL,取 5mL 置于 50mL 三角瓶内,投入 0.05% (W/V)的化合物 RSA,28 $^{\circ}$ C,150r/min 转化 36h。

1.2.4 甾体转化产物的分析:参见文献[8]。

2 结果

2.1 原生质体的形成

在确定的原生质体制备条件下^[7],酶解 4h 后,原生质体的形成量最高,达 6.0×10^6 /mL。通过显微镜观察,原生质体的释放方式有两种,即顶端释放(图 1a)和原位释放(图 1b),这与李明春观察深黄被孢霉的结果一致^[9]。

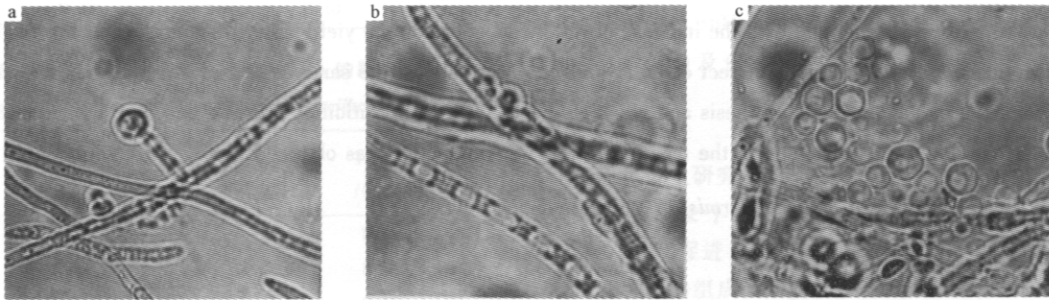


图 1 新月弯孢霉原生质体的释放方式

Fig.1 Release way of *C. lunata* protoplasts

a. Release way in acrosin; b. Release way in situ; c. Protoplast of *C. lunata*

收稿日期:2001-03-26,修回日期:2001-06-27。

* 通讯作者。Tel:86-22-28193580;E-mail:minwtj@263.net

2.2 原生质体的稳定性

2.2.1 渗透压稳定剂的影响:图 2 比较了原生质体在 4 种渗透剂中的保持情况。0.8mol/L $MgSO_4$ 稳定效果最好,0.8mol/L 甘露醇次之。由于 Mg^{2+} 对羟化酶有一定的抑制作用^[1],而有机化合物对甾体转化有促进作用^[6],因此选择 0.8mol/L 甘露醇作为保存和进行甾体转化时的渗透剂。在酶解时最佳的渗透剂是 0.6mol/L KCl,这种不一致的可能原因是渗透剂的性质和浓度不仅是维持和控制原生质体数量的主要因素,而且对裂解酶的活性有一定影响^[10]。

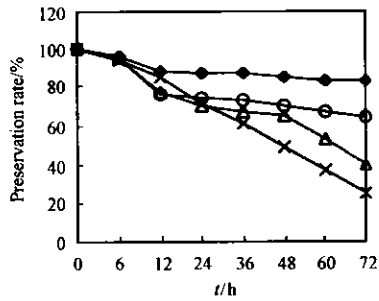


图 2 保存液稳定剂对原生质体的影响

Fig.2 Effect on protoplasts of osmotic stabilizer

◆ 0.8mol/L $MgSO_4$; ○ 0.8mol/L mannitol;
△ 0.8mol/L NH_4Cl ; × 0.6mol/L KCl

2.2.2 乙醇对原生质体的影响:化合物 RSA 在水中的溶解度很低,为提高其水溶性,一般将 RSA 预先溶解在乙醇溶液中,再投入到转化体系中。图 3 的实验结果表明乙醇对原生质体的影响很大,易造成原生质体破裂。为保证原生质体的稳定性,同时减少乙醇对羟化酶的抑制,必须严格控制乙醇用量^[11,12]。以乙醇浓度 9 μ L/mL,底物浓度 0.05% (W/V)为佳。

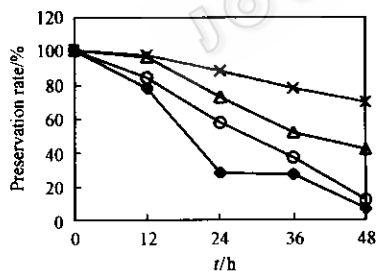


图 3 乙醇对原生质稳定性的影响

Fig.3 Effect on protoplasts of ethanol

◆ 27 μ L/mL; ○ 18 μ L/mL; △ 14.4 μ L/mL; × 9 μ L/mL

2.3 原生质体的甾体转化

表 1 的实验结果说明原生质体具有甾体转化能力,与同等条件下的菌丝体转化相比较有以下特点:①转化产物在结构和数量上没有变化,主要产物为 11 β -OH、14 α -OH 和 11 α -OH;②转化产物的百分含量变化较大,14 α -OH 含量明显升高,提高了 3.03 倍,11 β -OH 提高了 1.29 倍,11 α -OH 与菌丝体转化相比下降 40%;这种变化,尤其是 14 α -OH 的明显增多,对于目的产物的生成是有利的。因为通过更换底物,如 17 α , 21-二醋酸酯-RS,即在甾体 C14 位附近的 α 面引入较大的取代基 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,易于提高 11 β -OH 的收率^[13]。③转化速度增快,原生质体转化 11 β -OH 的速度是菌丝体转化的 1.88 倍。

由此可推测外源甾体的 11 β -羟基化、14 α -羟基化和 11 α -OH 存在着独特的调控机制。Dlugonski 在研究 *C. elegans* 原生质体的 11-羟基化作用时也发现同一现象^[6]。

表 1 原生质体与菌丝体的转化结果比较

Table 1 Results of conversion in protoplasts or mycelium

Conversion t/h	Conversion rate/%					
	Protoplasts			Mycelium		
	11 β -OH	14 α -OH	11 α -OH	11 β -OH	14 α -OH	11 α -OH
12	21.4	11.3	4.4	11.4	5.6	10.2
36	41.5	29.3	5.8	32.2	9.5	14.3

注:转化率的计算是以该物质的峰面积与所有物质峰面积总和的百分比(归一化法)。

2.4 多氧菌素的应用

多氧菌素是一种真菌细胞壁抑制剂,在菌体生长期加入可抑制其细胞壁的合成。在新月弯孢霉培养至对数生长期时加入一定浓度的多氧菌素,可造成其细胞壁合成的不完整或渗漏,改变细胞壁的通透性,从而有利于甾体底物与胞内羟化酶的有效接触,提高转化速度。

2.4.1 加入时间对转化结果的影响:从新月弯孢霉培养至对数生长期(12h)开始,每间隔 2h 取样,加入 2mg/mL 的多氧菌素,分别继续培养至 24h,投入底物,转化 36h,结果见表 2。以培养时间为 16~18h 时添加最佳。

表 2 多氧菌素加入时间对菌丝体转化的影响

Table 2 Effect of add time of polyoxins on conversion in mycelium

t/h	Conversion rate/%		
	11 β -OH	14 α -OH	11 α -OH
Control	33.5	9.9	14.3
12	28.7	12.4	12.0
14	34.4	14.5	13.4
16	39.6	18.3	11.7
18	40.3	17.6	9.6
20	37.5	15.6	12.3

2.4.2 加入浓度对转化的影响:多氧菌素的添加影响菌丝体对化合物 RSA 的羟基化产物的百分比(见表 3),在 1~3mg/mL 浓度范围内变化程度相近。

表 3 多氧菌素加入浓度对菌丝体转化浓度的影响

Table 3 Effect of concentration of polyoxin on conversion in mycelium

Concentration /(mg·mL ⁻¹)	Conversion rate/%		
	11 β -OH	14 α -OH	11 α -OH
Control	31.8	9.6	15.2
1	36.6	15.3	10.6
2	38.5	16.7	8.7
3	39.2	15.3	9.1

3 讨论

原生质体不仅保持了甾体的羟化能力,而且比对应的菌丝体羟化速度快、羟化能力强。可能原因是羟化酶位于细胞

内的细胞膜上,甾体底物在进入细胞时,细胞壁是一个重要障碍,并影响底物大分子与羟化酶嵌合时的空间构型;原生质体细胞由于失去了细胞壁,消除了其对底物扩散的影响,从而可加强底物与酶反应中心的接触,提高酶反应速率,同时使底物分子更易于在 11 β -位进行羟化,提高目的产物的生成。

原生质体较低的稳定性一直阻碍着它的应用。其不稳定性主要表现在两个方面,一是对外界环境敏感,易于破裂,在数量上减少较快;二是易于再生形成菌丝体。Dlugonski-deng 等人研究发现将 *C. elegans* 的原生质体分散在富含 10mg/mL 葡萄糖的有机渗透压稳定剂中,可保持较高活性^[5];采用凝胶或藻酸钙包埋原生质体进行固定化也可以提高其稳定性,但会减低原生质体的甾体羟化能力^[4]。防止原生质体再生的措施可以在转化体系中添加 2-脱氧-D-葡萄糖和多氧菌素,联合作用来抑制细胞壁的再生。

原生质体具有高甾体羟化能力,但是难以获得。本文的实验结果表明,在菌丝体转化过程中,加入细胞壁合成抑制剂和多氧菌素提高其通透性来改善底物与羟化酶的接触,可有效提高转化能力。并且可以推测选育新月弯孢霉细胞壁合成渗漏突变株,如 2-脱氧葡萄糖敏感菌株,可从基因水平改变其遗传性状,有望提高甾体转化能力并有利于工业化生产。我们正在进行相关研究并做进一步报道。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dlugonski J, Sedlacek L and Jaworski A. Protoplasts release from fungi capable of steroid transformation, *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30:57 ~ 62
- [2] SUN L(孙黎), FA Y H(法幼华). Development and appliance of protoplasts in steroid transformation, *Microbiology* (微生物学通报), 1991, 18(5):299 ~ 301
- [3] Sedlacek L, Dlugonski J and Jaworski A. Transformation of steroids by fungal protoplasts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 20: 166 ~ 169
- [4] Dlugonski J and Sedlacek L. Immobilization of fungal protoplasts for steroid bioconversion, *Acta Microbiologica Polonia*, 1988, 37(1):53 ~ 60
- [5] Dlugonski J, Bartnicka K, Chojecka V, et al. Stabilization of steroid 11-hydroxylation activity of *Cunninghamella elegans* protoplasts in organic osmotic stabilizers. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 1992, 8:500 ~ 504
- [6] Dlugonski J, Paraszkiewicz and Sedlacek L. Maintenance of steroid 11 β -hydroxylation activity in immobilized *Cunninghamella elegans* protoplasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13, 469 ~ 473
- [7] WANG M(王敏), WANG C X(王春霞), LU F P(路福平), et al. Study on bioconversion technology of 11 β -hydroxylation of steroids. *Journal of Tianjin Institute of Light Industry* (天津轻工业学院学报), 2000, 2:1 ~ 5
- [8] WANG G(王庚), WANG M(王敏), DU L X(杜连祥). Screening and identification of *Curvularia lunata* with 11 β -Hydroxylation of steroids. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 1998, 18(1):23 ~ 26
- [9] LI M C(李明春), XING L J(邢来君). Formation and regeneration of protoplasts of *Mortierella isabellina*. *Mycosystema* (菌物系统), 1997, 16(1):24 ~ 29
- [10] Hamlyn P F, Bradshaw R W, Mellon F M, et al. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microbiology Technology*, 1981, 3(4):321 ~ 325
- [11] XU S W(徐诗伟), XU Q(徐清), FA Y H(法幼华). Study 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 Biotechnology* (生物工程学报), 2000, 16(4):482 ~ 484
- [12] Santhanam H K, Shreve G S. Solvent selection and productivity in multiphase biotransformation systems. *Biotechnology Progress*. 1994, 10(2):187 ~ 192
- [13] Deffline J. *Fermentation Advances*. Periman D. ed. London & New York: Academic press, 1969, pp. 385 ~ 390

Compound RSA 11 β -Hydroxylation with *Curvularia lunata*

WANG Min LU Fu-Ping WANG Feng-Qing JIANG Yue DU Lian-Xiang
(Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222, China)

Abstract Compound RSA 11 β -Hydroxylation of *Curvularia lunata* was studied. The composition of hydroxylation products was analyzed. It was found that the conversion rate with protoplasts was increased conspicuously, the construction and quantity of hydroxylation products was not alteration, but the percentage was changed greatly. The 14 α -OH percentage of protoplasts was 3.03-fold than that of mycelia, the 11 α -OH percentage was decreased 60%, and the conversion ratio of 11 β -OH was more 1.29-fold than that of the mycelia. It affected the percentage of hydroxylation products when 2 mg/mL polyoxins were added into the mycelia conversion system.

Key words protoplasts, 11 β -Hydroxylation, *Curvularia lunata*, compound RSA

Received: March 26, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-22-28193580; E-mail: minwtj@263.net