

根霉转化坎利酮的培养基优化

黄达明, 崔鹏景, 张志才, 管国强, 崔凤杰, 李聪

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 以坎利酮转化率为指标, 优化了根霉转化坎利酮的营养需求。通过摇瓶培养和高效液相色谱分析等技术研究了不同碳源、氮源、无机盐以及一些重要因素的浓度对转化率的影响。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验对培养基组合进行优化, 优化后的培养条件为: 葡萄糖 30 g/L, 玉米浆 25 g/L, 酵母膏 12 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L。在优化后的条件下, 坎利酮的转化率为 87.68%, 较优化前提高 9.06%。

关键词: 坎利酮; 11- α -羟基坎利酮; 根霉; 生物转化

文章编号: 1673-9078(2013)2-345-348

The Medium Optimization of *Rhizopus* sp. for Bioconversion of Canrenone

HUANG Da-ming, CUI Peng-jing, ZHANG Zhi-cai, GUAN Guo-qiang, CUI Feng-jie, LI Cong

(College of Food and Biology Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: With the conversion of canrenone for index, the nutritional requirements of the *Rhizopus* sp. UJS-0602 were evaluated to optimize the biotransformation of canrenone. Different carbon source, nitrogen source, inorganic salt and some important factors of concentration on the influence of the conversion were evaluated through the shake flask culture and High Performance Liquid Chromatography. The $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design was adopted to confirm the optimum cultivating conditions: glucose concentration 30 g/L, corn steep liquor 25 g/L, yeast extract paste 12 g/L and KH_2PO_4 concentration 1.5 g/L. Under the optimized conditions, the conversion of canrenone was 87.68%, being 9.06% higher than that before optimization.

Key words: canrenone; 11- α -Hydroxy canrenone; *Rhizopus* sp.; bioconversion

坎利酮 (Canrenone) 是一种甾体激素类心血管药物, 临床上用作醛固酮拮抗剂来治疗心衰、高血压、水肿、肝腹水等心血管疾病^[1-2]。虽然其效果明显, 但危险性也比较大, 在心脏病治疗中有可能引起用药过量而致死的危险后果^[3]。治疗心血管疾病药物依普利酮 (Eplerenone) 的副作用比起坎利酮明显减小^[4]。坎利酮的羟基化产物 11- α -羟基坎利酮是合成依普利酮的关键医药中间体。

羟基化衍生主要采用的化学法有酮基还原法、上脱卤素法和硼烷双氧水法等^[5]。但其步骤复杂、副产物多、产品收率低等。微生物转化是利用微生物代谢过程中产生的酶对底物进行某种有机修饰化学反应^[6]。它具有很强的专一性^[7], 同时具有反应条件温和、产率高等特点, 能克服化学合成法的不足^[8-9]。微生物羟基化反应包括细菌和真菌的羟基化, 而真菌更广泛地应用于甾体药物领域的合成^[10]。

本实验利用分离纯化的根霉 (*Rhizopus* sp. UJS-0602) 进行坎利酮的特异性转化生成 11- α -羟基坎利酮, 对其转化所需的营养条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

坎利酮 (纯度 97%) 购自太原瑞和丰科贸有限公司; 其他试剂均为分析纯。LC-20AT 高效液相色谱仪为日本 SHIMADZU 公司生产。

1.2 菌种及其培养

根霉 (*Rhizopus* sp. UJS-0602), 由镇江玉带河附近土壤分离, 4 °C 冰箱保藏。

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 22.0, 酵母膏 20.0, 大豆蛋白胨 20.0, 琼脂 30.0, 用 10% 磷酸调节 pH 5.0。

转化培养基 (g/L): 葡萄糖 22.0, 酵母膏 16.5, 玉米浆 33.0。

菌种培养: 将菌种接于斜面培养基, 28 °C 培养 5~7 d, 待表面布满金黄色孢子后, 备用。

1.3 转化方法

按文献^[11]稍作修改, 采用一步发酵法转化 11- α -

收稿日期: 2012-10-19

基金项目: 镇江市科技支撑计划项目 (GY2011009)

作者简介: 崔鹏景 (1987-), 男, 在读研究生, 农产品加工及贮藏工程

通讯作者: 黄达明 (1962-), 男, 博士, 教授, 农产品生物转化及综合利用

羟基坎利酮。用二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解 36 g 坎利酮, 定容到 100 mL 配制 36 g/L 的坎利酮溶液, 4 °C 保存备用。将培养 5-7 d 布满金黄色孢子的斜面用 10 mL 无菌水洗下, 用无菌水调节孢子浓度为 2×10^7 个/mL, 得孢子悬浮液。将 2 mL 孢子液加入装有 100 mL 新鲜无菌培养基的 500 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r/min 条件培养 33 h 后, 加入坎利酮溶液, 继续转化 84 h 后停止转化。

1.4 提取、检测方法

转化后的菌液减压过滤, 滤液加等体积乙酸乙酯萃取 20 min, 静置分层, 弃去水相; 菌体加入 5 倍体积乙酸乙酯浸泡 3 h, 合并有机相, 40 °C 减压蒸干, 甲醇复溶后定容至 100 mL, 用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 供测定分析用。

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 测定条件: 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱 40 min; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL^[12]。采用外标法计算公式计算坎利酮和 11-α-羟基坎利酮。转化率计算方法:

$$I = \frac{m}{m_0 \times C} \times 100\%$$

注: I: 转化率 (%), m: 产物测定量; m₀: 底物投入量; C: 底物浓度

1.5 数据处理

所有试验数据均重复测定 3 次, 实验结果以平均值±标准误差 (X±SD) 表示, 实验数据采用 SPSS 统计分析软件进行处理。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对转化率的影响

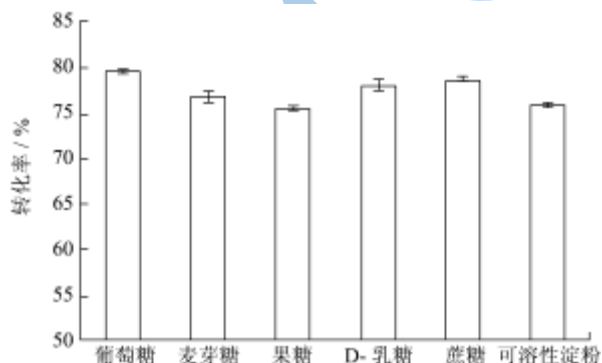


图 1 不同碳源对转化率的影响

Fig.1 Effect of different carbon sources on the transformation

以浓度为 22 g/L 分别添加葡萄糖、麦芽糖、果糖、D-乳糖、蔗糖、可溶性淀粉等碳源, 其他条件不变, 研究不同碳源对转化率的影响。结果 (图 1) 显示以葡萄糖作为碳源, 坎利酮转化率较高, 这是由于菌体

易吸收利用葡萄糖, 通过戊糖代谢途径 (HMP 途径) 合成 NADPH, NADPH 作为还原力参与 11-α-羟基化酶转化甾体羟基化的过程。因此实验选择葡萄糖作为培养基的碳源。

2.2 葡萄糖浓度对转化率的影响

分别添加 15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L 等浓度的葡萄糖, 考察不同浓度葡萄糖对转化率的影响。结果如图 2 所示。可以看出在 25 g/L 时转化率最大。这可能是随着葡萄糖浓度增加, 提供的能量充足, 而超过 25 g/L 后过高的葡萄糖影响菌体的渗透压, 从而影响菌体对坎利酮的转化。

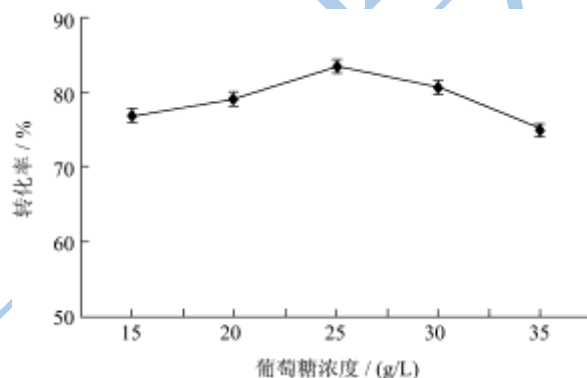


图 2 不同浓度葡萄糖对转化率的影响

Fig.2 Effect of different glucose concentration on the transformation

2.3 不同氮源对转化率影响

以 33 g/L 浓度分别添加玉米浆、牛肉膏、蛋白胨、尿素、酵母膏等氮源, 其他条件不变, 研究不同氮源对转化率的影响。结果 (图 3) 显示尿素转化率只有 5.05%, 氮源为玉米浆、蛋白胨和酵母膏时转化率相当, 出于经济考虑, 玉米浆和酵母膏成本较低, 所以选择玉米浆和酵母膏共同作为氮源。

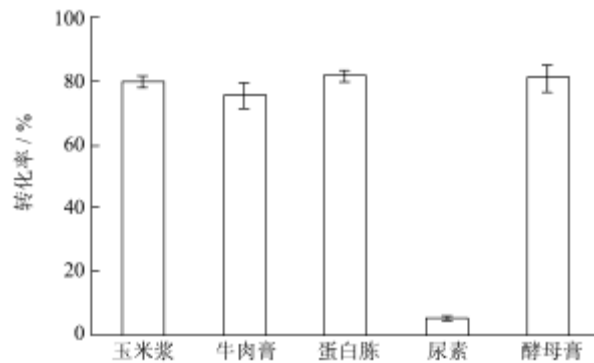


图 3 不同氮源对转化率的影响

Fig.3 Effect of different nitrogen sources on the transformation

2.4 不同浓度酵母膏对转化率的影响

分别添加 0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L 浓度的酵母膏研究不同浓度的酵母膏对转化率的影响。结果 (图 4) 说明酵母膏对转化有重

要作用,当培养基中无酵母膏时,转化率较低为61.09%,当浓度为15 g/L时,转化率最高为81.93%,继续增加酵母膏浓度,转化率略有下降,选择15 g/L为酵母膏最佳浓度。

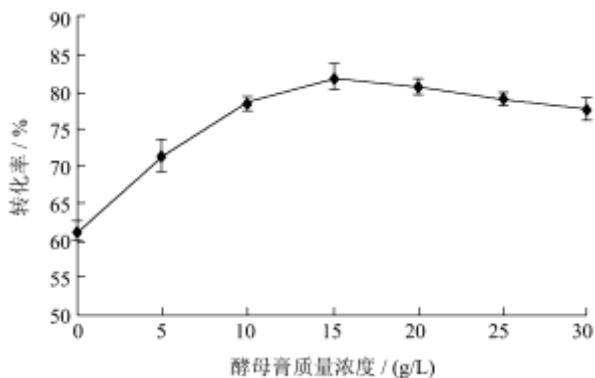


图4 不同浓度酵母膏对转化率的影响

Fig.4 Effect of different corn syrup concentration on the transformation

2.5 不同浓度玉米浆对转化率的影响

分别添加15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L不同浓度的玉米浆,其他条件不变,研究玉米浆浓度的作用,结果如图5所示。可以看出,随着玉米浆浓度增大,转化率升高,在浓度为30 g/L时达到最大,为84.44%,而继续增加玉米浆浓度,转化率略有降低。

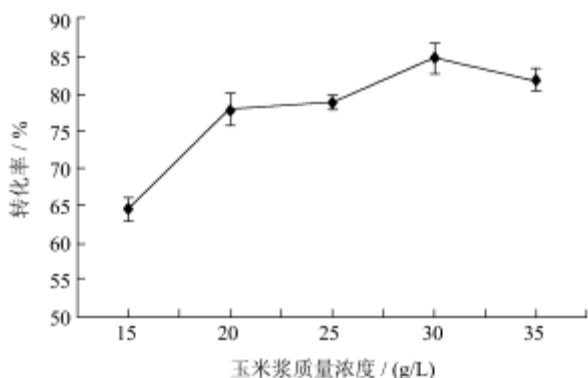


图5 不同浓度玉米浆对转化率的影响

Fig.5 Effect of different yeast extract concentration on the transformation

2.6 不同无机盐对转化率的影响

分别添加0 g/L、0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L、2.5 g/L、2.5 g/L、3 g/L的磷酸二氢铵、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锌研究不同无机盐对转化的作用,结果如图6所示。可以看出在0~3 g/L硫酸铝对转化率基本无影响。磷酸二氢钾对转化率影响最大,在0~1.5 g/L时随浓度的增加转化率增大,在1.5 g/L时达到最大,为85.92%,大于1.5 g/L时随浓度的升高转化率下降。所以选择磷酸二氢钾为所用无机盐,浓度为1.5 g/L。

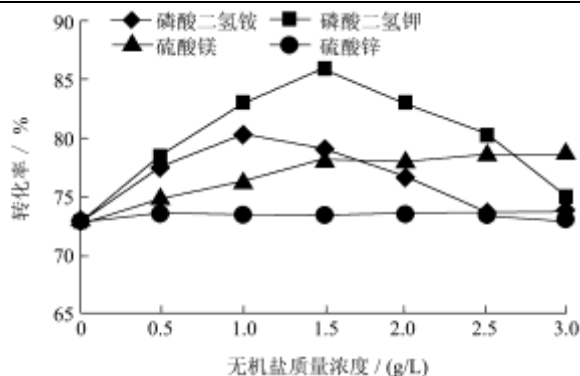


图6 不同无机盐对转化率的影响

Fig.6 Effect of different inorganic salt and its concentration on the transformation

2.7 利用正交试验优化培养基组成

结合单因素结果,以转化率为指标,选取葡萄糖、玉米浆、酵母膏和磷酸二氢钾进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,观察这四个因素之间的相互作用。正交试验因素水平如表1所示。结果如表2所示。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 The arrangement of factors and levels

水平	因素/(g/L)			
	A(葡萄糖)	B(玉米浆)	C(酵母膏)	D(磷酸二氢钾)
1	20	25	12	1.3
2	25	30	15	1.5
3	30	35	18	1.7

表2 正交试验结果及分析

Table 2 Design and analysis of results of $L_9(3^4)$ The orthogonal experiment design and analysis of results

试验号	因素				转化率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	78.52
2	1	2	2	2	79.67
3	1	3	3	3	74.47
4	2	1	2	3	82.07
5	2	2	3	1	78.52
6	2	3	1	2	83.16
7	3	1	3	2	85.99
8	3	2	1	3	85.13
9	3	3	2	1	81.43
k_1	77.55	82.19	82.27	79.49	
k_2	81.25	81.11	81.06	82.94	
k_3	84.18	79.69	79.66	80.56	
R	6.63	2.51	2.61	3.45	

实验结果表明:葡萄糖和磷酸二氢钾的添加量对转化的影响比较大,影响程度依次为A>D>C>B,从

表 2 可看出, 在 $A_3B_1C_3D_2$ 的条件下转化率最高可达 85.99% ; 对数据进行极差分析得最优条件为 $A_3B_1C_1D_2$ 。经验证实验发现, 在 $A_3B_1C_1D_2$ 条件下其转化率为 87.68%, 高于 $A_3B_1C_3D_2$ 的条件下的实验结果, 即葡萄糖浓度为 30 g/L, 玉米浆浓度为 25 g/L, 酵母膏浓度为 12 g/L, 磷酸二氢钾浓度为 1.5 g/L 的条件下转化率最高。

3 结论

本实验以获得较高的 11- α -羟基坎利酮转化率为目的, 对根霉转化坎利酮工艺进行优化。选择不同碳源、氮源、无机盐进行单因素实验。筛选出对转化作用影响最大的四个因素: 葡萄糖, 酵母膏和玉米浆, 磷酸二氢钾。最后通过正交试验对其浓度和交互作用进行考察。在葡萄糖浓度为 30 g/L, 玉米浆浓度为 25 g/L, 酵母膏浓度为 12 g/L, 磷酸二氢钾浓度为 1.5 g/L 的条件下转化率最高, 通过验证实验, 最高转化率为 87.68%, 较优化前提高 9.06%。

参考文献

- [1] Ellen G McMahon. Recent studies with eplerenone, a novel selective aldosterone receptor antagonist [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001, 1: 190-196.
- [2] Ariel J. Reyesa T, William P, et al. The aldosterone antagonist and facultative diuretic eplerenone: a critical review [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2005, 16: 3-11
- [3] Werner Steimer, Christine Muller, Barbara Eber, et al. Intoxication due to negative canrenone interference in digoxin drug monitoring [J]. *THE LANCET*, 1999, 354: 1176-1177
- [4] Kelli L Davis, Jean M.Nappi. New drugs: The cardiovascular effects of eplerenone, a selective aldosterone-receptor antagonist [J]. *Clinical Therapeutics*. 2003, 25(11): 2647-2668
- [5] 王金东.甾体化合物 11-羟基的化学引入法[J].*中国医药工业杂志*,2004,35(7):442-445
- [6] 肖苏尧,彭维,李赟,等.虎杖中白藜芦醇生物转化菌的筛选及鉴定[J].*现代食品科技*,2012,28(7):749-752
- [7] 欧巧明,丁兰.酿酒酵母悬浮培养体系的建立及其对香豆素的微生物转化研究[J].*现代食品科技*,2007,23(6):4-7
- [8] 谌蓉,李光,张娟,等.两相体系中微生物转化法制备依西美坦[J].*湖南师范大学自然科学学报*,2010,33(2): 112-117
- [9] 卢文玉.新月弯孢霉甾体 11 β -羟基化与细胞色素 P450 酶的研究[D].天津:天津科技大学.2003
- [10] Holland H L. The mechanism of the microbial hydroxylation of steroids [J]. *Chemical society Review*, 1982,2: 371-395
- [11] 崔凤杰,张天真,黄达明,等.从生物转化液中分离提取 11- α -羟基-坎利酮的工艺研究[J].*安徽农业科学*,2012,40(9): 5102-5104
- [12] Da-Ming Huang, Tian-Zhen Zhang, Feng-Jie Cui, et al. Simultaneous Identification and Quantification of Canrenone and 11- α -Hydroxy-Canrenone by LC-MS and HPLC-UV [J]. *Biomedicine and Biotechnology*, 2011, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/582591>