

侯懿娜, 李会, 何鹏, 何于琳, 史劲松, 许正宏. 维生素D₃羟化菌株的筛选及工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (6): 1452-1458

Hou YN, Li H, He P, He YL, Shi JS, Xu ZH. Screening and transformation optimization of vitamin D₃ hydroxylation strain [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2023, 29 (6): 1452-1458

维生素D₃羟化菌株的筛选及工艺优化

侯懿娜¹ 李会¹✉ 何鹏¹ 何于琳¹ 史劲松¹ 许正宏²

¹江南大学生命科学与健康工程学院 无锡 214122

²江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122

摘要 25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃在临床上具有广泛的应用, 其合成方法包括化学合成法与生物转化法. 生物转化法相比化学合成法具有反应条件温和、反应专一性强、成本低等优点. 为获取具有生物羟基化维生素D₃功能的微生物, 通过唯一碳源平板法从土壤中分离得到一株具有转化维生素D₃生成25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃能力的菌株1-18. 经16S rDNA测序鉴定, 菌株1-18为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 命名为巨大芽孢杆菌H-1. 通过单因素法优化发酵工艺, 确定最佳发酵条件为初始pH值7.5, 添加6% (V/V) 的甘油助溶底物, 发酵6 h时投入底物维生素D₃, 接种量为2% (V/V). 优化后25(OH)VD₃的浓度在发酵36 h时达到1 433.90 μ g/L, 1 α ,25(OH)₂VD₃的浓度在发酵60 h时达到811.05 μ g/L. 本研究成功筛选到新的羟基化维生素D₃的菌株, 并通过优化发酵条件缩短了发酵周期和提高了羟化产物的浓度. (图9 参31)

关键词 维生素D₃; 生物转化; 巨大芽孢杆菌; 25(OH)VD₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃

Screening and transformation optimization of vitamin D₃ hydroxylation strain

HOU Yina¹, LI Hui¹✉, HE Peng¹, HE Yulin¹, SHI Jinsong¹ & XU Zhenghong²

¹ College of Life Science and Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Bio-Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Both 25(OH)VD₃ and 1 α ,25(OH)₂VD₃ are widely used in clinics, and the synthesis methods include chemical synthesis and biotransformation. Compared to chemical synthesis, biotransformation has the advantages of mild reaction conditions, strong reaction specificity, and low cost. To obtain microorganisms with relevant functions, strains 1–18 with the ability to transform vitamin D₃ were screened from the soil by the sole carbon source plate method, which can hydroxylate vitamin D₃ to produce 25(OH)VD₃ and 1 α ,25(OH)₂VD₃. Based on 16S rDNA gene sequence homology analysis, strains 1–18 were identified as *Bacillus megaterium* and named *Bacillus megaterium* H-1. By optimizing the fermentation process through a single-factor method, the optimal fermentation conditions were determined as follows: the initial fermentation medium pH was 7.5, 6% glycerol was added as the substrate co-solvent, 0.25 g/L vitamin D₃ was added at 6 h, and the inoculation amount was 2% (V/V). After optimization, the 25(OH)VD₃ concentration reached 1433.90 μ g/L at 36 h, and the 1 α ,25(OH)₂VD₃ concentration reached 811.05 μ g/L at 60 h. In this study, a new strain with vitamin D₃ hydroxylation ability was successfully screened. The fermentation cycle was shortened, and the concentration of hydroxylated products was increased by optimizing the fermentation conditions.

Keywords vitamin D₃; biotransformation; *Bacillus megaterium*; 25(OH)VD₃; 1 α ,25(OH)₂VD₃

25(OH)VD₃ (骨化二醇) 和1 α ,25(OH)₂VD₃ (骨化三醇) 是维生素D₃在人体内经肝、肾细胞中细胞色素P450酶的羟化作用形成的活性形式^[1], 可促进人体的钙磷吸收, 调节机体免疫及调控细胞的增殖与分化, 药用价值极高^[2-3]. 25(OH)VD₃在临床上用于佝偻病、骨软化症等代谢性骨病的治疗, 是判断人体

维生素D₃营养情况的最佳指标^[2]. 1 α ,25(OH)₂VD₃可用于治疗甲状腺功能减退、慢性肾衰竭和钙代谢紊乱综合征^[3].

25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃的传统制备方法是从动物组织中提取获得, 但该过程存在产物分离困难、生产成本高昂且回收率极低等问题, 严重制约其临床应用^[4]. 目前25(OH)

收稿日期 Received: 2022-12-01 接受日期 Accepted: 2023-03-27

国家重点研发计划项目 (2019YFA0905300)、天津市合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-KJGG-001-14)、国家自然科学基金项目 (22078126)、江苏省青蓝工程和中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP221025) 资助 Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFA0905300), Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-001-14), National Natural Science Foundation of China (22078126), Qing Lan Project in Jiangsu Province, and Fundamental Research Funds for Central Universities of China (JUSRP221025)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn)

VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃的生产方法包括化学合成法和生物转化法。化学合成法以胆固醇及其相关衍生物为原料,通过多步化学反应获得羟基化维生素D₃,但是该过程存在反应步骤多、环境污染大,且目标产物的分离纯化过程操作复杂等问题,严重限制了25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃的广泛应用^[5-6]。相较于化学合成法,生物催化法具有成本低、反应特异性高等优势^[7]。近年来,生物催化法合成25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃逐渐成为研究热点。目前,文献报道可羟化维生素D₃的微生物主要有链霉菌属、诺卡氏菌属、芽孢杆菌属等^[8-14]。其中,Sasaki团队报道玫瑰链霉菌在200 L发酵罐中转化120 h,获得8.3 mg/L 25(OH)VD₃和0.17 mg/L 1 α ,25(OH)₂VD₃^[8-11]。Kang团队在75 L发酵罐中通过假诺卡氏菌发酵168 h获得356 mg/L 25(OH)VD₃和10.4 mg/L 1 α ,25(OH)₂VD₃^[12-13]。Tang团队利用蜡状芽孢杆菌zju 4-2转化维生素D₃生成830 mg/L 25(OH)VD₃,是目前微生物生产25(OH)VD₃的最高产量,但在发酵过程中需添加200 g/L羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)助溶底物,成本太高不利于工业化^[14]。基于25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃良好的临床应用和市场前景,筛选维生素D₃高效羟化菌株,实现C-1 α 或C-25位羟化十分必要。

本研究通过以维生素D₃为唯一碳源的无机盐平板筛选获得潜在目标菌株,并分别对其转化维生素D₃的产物进行结构鉴定,确定潜在目标菌株的反应类型及反应位点。选取具有C-1 α 、C-25位羟化功能的菌株作为目标菌株,根据目标菌株的系统发育学分析结果确定其种属。通过底物助溶、优化培养条件等方法,提高了25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃的浓度,从而为后续目标菌株高效羟化维生素D₃奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 巨大芽孢杆菌H-1,自江南大学林地土样中筛选获得,已保藏至中国普通微生物菌种保藏管理中心(No. CGMCC20362)。

1.1.2 培养基 富集培养基(g/L):葡萄糖10; (NH₄)₂SO₄ 0.1; 蛋白胨5; MgSO₄·7H₂O 0.2; K₂HPO₄ 0.1; CaSO₄ 0.05; FeSO₄·7H₂O 0.002; pH 7.0^[14]。

筛选培养基(g/L):维生素D₃ 8 × 10⁻⁴; K₂HPO₄ 0.75; (NH₄)₂SO₄ 0.8; MgSO₄·7H₂O 0.1; 琼脂20; pH 7.0^[14]。

发酵培养基(g/L):酵母粉5; 蛋白胨10; NaCl 10, 自然pH。

1.1.3 主要试剂和仪器 维生素D₃购自上海生工有限公司; 维生素D₃、25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品购自上海源叶生物有限公司; 乙醇、乙二醇、正丙醇、丙二醇、丙三醇(甘油)、正丁醇、正戊醇、正己醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正己醇均为国药分析纯试剂,甲醇、乙腈为国药色谱纯试剂; 硅胶层析板购自青岛海洋化工有限公司; Avance 400核磁共振仪购自Bruker公司; PCR反应扩增仪购自加拿大BBI公司; HPLC高效液相色谱仪购自Agilent公司,色谱柱为Waters Symmetry C18 (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μ m)。

1.2 薄层层析法(TLC)

采用GF 254硅胶薄层层析板用于TLC分析,点样前将硅胶板在60 °C烘箱活化1 h,乙酸乙酯-正己烷(V/V = 2:1)作展开剂,香草醛-浓硫酸溶液作显色剂。

1.3 菌种的分离与筛选

称取2 g土壤置于100 mL烧杯中,加入20 mL无菌水搅拌

静置,吸取上清液1 mL于富集培养基,在30 °C, 220 r/min摇床培养12 h。吸取50 μ L富集培养液涂布于以维生素D₃为唯一碳源的固体培养基筛选平板上,置于30 °C培养箱倒置培养36 h。观察筛选平板上菌落的形态,挑取单菌落在新鲜的LB固体培养基平板上三区划线,划线平板在30 °C培养箱倒置培养16 h,获得潜在目标菌株。分别挑取潜在目标菌株进行维生素D₃转化试验(详见1.4),待发酵结束后取样采用硅胶薄层层析法(详见1.2)检测,筛选获得具有转化维生素D₃能力的目标菌株。

1.4 维生素D₃转化试验

在新鲜划线的平板上挑取单菌落于装有10 mL LB液体培养基的50 mL锥形瓶中, 30 °C, 220 r/min 摇床培养24 h,按总体积2%的接种量转接至LB液体培养基(50 mL/250 mL)中,投入底物维生素D₃,投料终浓度为0.25 g/L。发酵培养基在30 °C, 220 r/min 摇床培养72 h,即获得转化发酵液。

1.5 转化产物的高效液相色谱(HPLC)分析条件

吸取1 mL发酵液用二氯甲烷等体积反复萃取2次,合并有机层。有机溶剂置于通风橱内挥干,加入1 mL甲醇复溶,过0.22 μ m有机滤膜即获得发酵液样品。发酵液样品在Sunfire™ C18色谱柱(5 mm, 4.6 × 160 mm Agilent)中通过乙腈:水的线性梯度洗脱办法进行检测: 0-10 min, 50%乙腈; 10-15 min, 50%-100%乙腈; 15-25 min, 100%乙腈; 25-30 min, 100%-50%乙腈; 30-35 min, 50%乙腈。单次进样体积为20 μ L,检测波长为265 nm,流速为1.0 mL/min,柱温40 °C。

1.6 转化产物的分离与结构鉴定

量取500 mL发酵液用二氯甲烷等体积反复萃取2次,合并有机相。有机溶剂用真空旋转蒸发仪浓缩,浓缩样用10 mL甲醇复溶,过0.22 μ m有机滤膜,备用。用岛津半制备液相LC-20A收集出峰时刻的流份。通过薄层层析法(TLC)(详见1.2)检测流分纯度。纯化后的产物分别通过LC-MS、¹H-NMR进行分析鉴定其结构。

采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)对发酵液样品及维生素D₃羟化物标准品进行分析。分析采用Agilent 1260 Infinity LC系统和Agilent 6520精确质量Q-TOF(四极杆飞行时间)质谱仪,采用双电喷雾电离(ESI)源。采用Agilent Zorbax SB-C18色谱柱(2.1 × 150 mm, 3.5 μ mol/L),流速为0.5 mL/min。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。

1.7 菌种的鉴定

1.7.1 形态与菌落特征 观察菌株在LB固体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。

1.7.2 16S rDNA的扩增和序列分析 采用上海生工UNIQ-10柱式细菌基因组DNA试剂盒进行基因组的提取。以primer A (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')、primer B (5'-AGGAGGTGATCCAGCCCA-3')为上下游引物扩增菌株的16S rDNA。PCR反应条件为95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 1 min; 72 °C 5 min, 34个循环。扩增的菌株16S rDNA由上海生工有限公司进行测序。

1.8 系统发育学分析

目标菌株的16S rDNA序列通过与NCBI数据库做对比,筛选出14个高亲缘性的菌株并从数据库调取该14个菌株的16S rDNA序列用于系统发育学分析。16S rDNA序列用MEGA (11.0)软件对齐、排序,采用Neighbor-Joining法构建系统进化树,计算自引导值(Bootstrap, 1 000次重复)评估系统发生

树的置信度。

1.9 25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃产物浓度的计算

分别精密称取维生素D₃、25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品,并采用甲醇作为溶剂配置成浓度为1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L的溶液,根据高效液相色谱(HPLC)分析条件(详见1.5)绘制峰面积-浓度标准曲线,根据标准曲线计算产物产量。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

通过唯一碳源平板法^[14]初筛获得34个潜在目标菌株,进一步对潜在目标菌株进行转化维生素D₃的发酵试验。通过薄层层析法(TLC)检测各个菌株转化维生素D₃的情况。由TLC检测结果(图1)可知,菌株1-18能够将维生素D₃转化为两种主要产物Product 1和Product 2(简称P1和P2)。P1和P2在TLC板上分别和25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品位置相同,初步判断产物P1为25(OH)VD₃,P2为1 α ,25(OH)₂VD₃。

2.2 转化产物的结构鉴定

发酵产物通过HPLC、LC-MS检测证实P1和P2存在,且出峰时间分别与25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品相对应(图2A)。菌株1-18对维生素D₃的转化液质谱检测结果如图2B所示。通过分析可得到结果:P1在 m/z 401[M+H]⁺处存在一个分子离子,在383[M-H₂O]⁺和365[M-2H₂O]⁺处存在碎片离子,与25(OH)VD₃(C₂₇H₄₄O₂)的MS图谱一致。P2在 m/z 417[M+H]⁺处存在一个分子离子,在399[M-H₂O]⁺和383[M-2H₂O]⁺处存在碎片离子,与1 α ,25(OH)₂VD₃(C₂₇H₄₄O₃)的MS图谱一致。推测菌株1-18具有特异性羟化维生素D₃的C-1 α 和C-25位点的能力。

通过批量发酵、产物提取、分离纯化分别获得P1和P2的单一成分,分别进行¹H-NMR结构分析,¹H-NMR图谱见图2C。产物P1的¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 6.05-6.57(d, J = 11.3 Hz, 2H), δ 5.04(s, 3H), δ 4.82(d, J = 2.0 Hz, 1H), δ 2.84(m, 1H), δ 2.23(m, 1H), δ 0.93(d, J = 6.1 Hz, 3H), δ 0.88(d, J = 6.6 Hz, 6H), δ 0.54(s, 3H), 与文

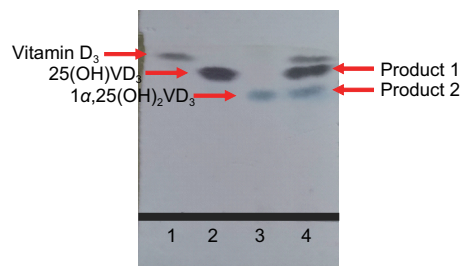


图1 菌株1-18发酵产物TLC检测。1: 维生素D₃标准品; 2: 25(OH)VD₃标准品; 3: 1 α ,25(OH)₂VD₃标准品; 4: 菌株1-18转化维生素D₃发酵液样品。

Fig. 1 TLC detection of strain 1-18 fermentation products. 1: Vitamin D₃ standard; 2: 25(OH)VD₃ standard; 3: 1 α ,25(OH)₂VD₃ standard; 4: Fermentation broth sample of strain 1-18 transformed vitamin D₃.

献[15-16]中报道一致,由此判断P1为25(OH)VD₃。产物P2的¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 6.44-6.23(d, J = 11.3 Hz, 2H), δ 5.33(s, 1H), δ 5.00(s, 1H), δ 4.43(m, 1H), δ 4.23(m, 1H), δ 2.83(d, J = 12.5 Hz, 1H), δ 2.60(d, J = 9.9 Hz, 1H), δ 2.30(m, 1H), δ 1.21(m, 6H), δ 0.92(d, J = 6.2 Hz, 3H), δ 0.54(s, 3H)。与文献[17]中报道一致,由此判断P2为1 α ,25(OH)₂VD₃。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态与菌落特征 菌株1-18平板划线后30 °C倒置培养16 h,菌落呈乳白色,边缘整齐(图3A)。菌株1-18在LB液体培养基中呈白色混浊状,不形成菌膜。普通光学显微镜下观察到菌株1-18呈杆状,末端圆,长4.0-10.0 μ m,单个或短链状排列,为革兰氏阳性菌(图3B)。

2.3.2 系统进化树 通过测序获得菌株1-18的16S rDNA部分序列,包括1 393个碱基。选择15个高亲缘性菌株的16S rDNA与菌株1-18的16S rDNA序列比对,并构建系统进化树(图4)。结果表明,菌株1-18与巨大芽孢杆菌的同源性达到99%以上。菌株1-18命名为巨大芽孢杆菌H-1,保藏至中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC No. 20362)。由于巨大芽孢杆菌发酵周期短、易于培养、适应性强等优势,广泛应用于维生素B12、聚羟基丁酸酯(PHB)等医药原料的生物合成中^[18],但关于其在羟化维生素D₃方面的研究鲜见报道。

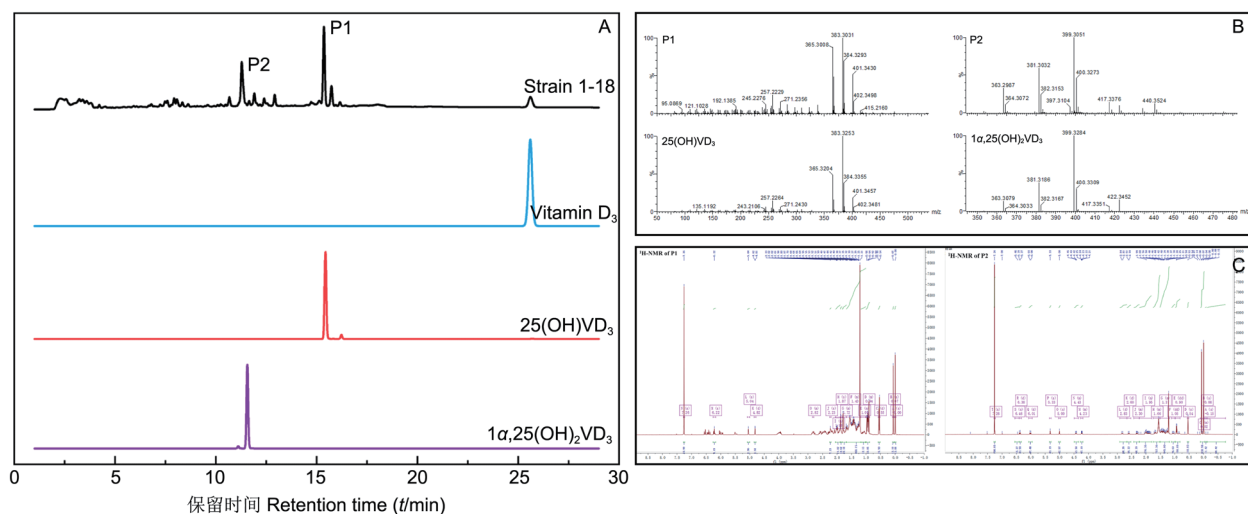


图2 菌株1-18发酵产物结构鉴定。A: 菌株1-18发酵产物的高效液相色谱图; B: 菌株1-18发酵产物的MS图谱; C: 菌株1-18发酵产物的¹H-NMR图谱。

Fig. 2 Structural identification of strain 1-18 fermentation products. A: HPLC results of strain 1-18 fermentation products; B: LC-MS results of strain 1-18 fermentation products; C: ¹H-NMR results of strain 1-18 fermentation products.

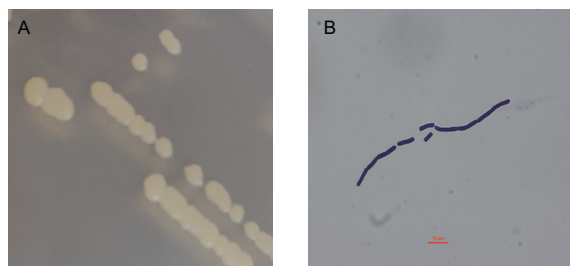


图3 菌株1-18的形态特征。A: 菌落形态；B: 显微特征。

Fig. 3 Morphological characteristics of strain 1-18. A: Colony morphology; B: Microscopic features.

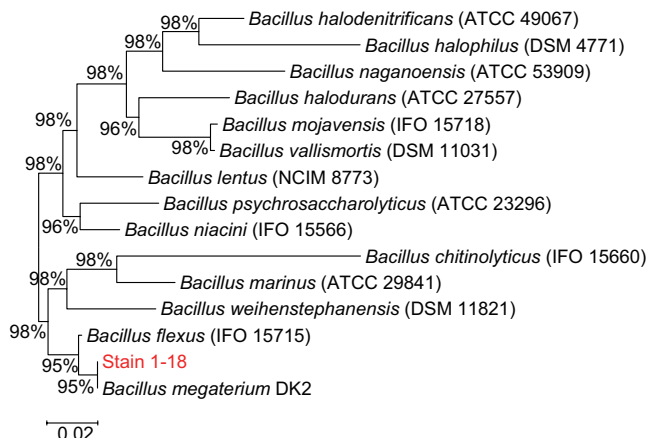


图4 菌株1-18的进化树分析。

Fig. 4 Evolutionary tree analysis of strain 1-18.

2.4 巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的工艺优化

2.4.1 培养基初始pH对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响 培养基初始pH对于菌体的生长极其重要，影响着微生物对营养物质的代谢。培养基的初始pH一方面通过改变菌体的细胞膜电荷、膜渗透性及营养物质离子化程度，影响菌体对养分的吸收；另一方面，对催化反应相关酶的活性也具有一定程度的影响^[19]。维生素D₃羟化酶属于胞内酶，因此考察pH对巨大芽孢杆菌转化维生素D₃的影响。通过NaOH和HCl调节培养基初始pH值，考察不同初始pH值的条件下，培养基对巨大芽孢杆菌H-1的生长及菌体转化维生素D₃的影响。结果（图5）表明，培养基初始pH在7.0-8.0范围内利于巨大芽孢杆菌H-1的生长，转化72 h时产物25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃浓度较

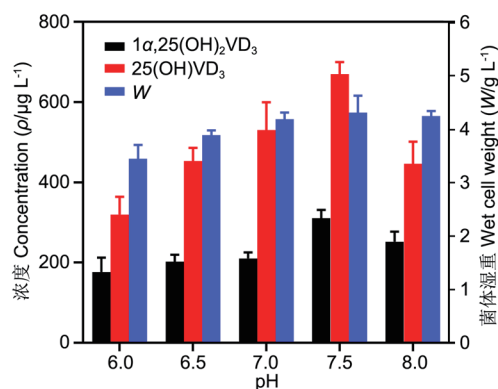


图5 初始转化pH对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响

Fig. 5 Effect of initial transformation pH on the transformation of vitamin D₃ by *Bacillus megaterium* H-1.

高，其中菌株生长最适初始pH为7.5。在最适初始pH条件下巨大芽孢杆菌H-1转化底物72 h时产物浓度最高，25(OH)VD₃浓度为670.19 μ g/L，1 α ,25(OH)₂VD₃浓度为310.25 μ g/L。已有研究表明，巨大芽孢杆菌来源P450羟化酶BM3的最适pH在7.0-8.0范围内^[20]，枯草芽孢杆菌来源羟化酶CYP109B1的最适pH在7.5左右^[21]，该结果与文献报道芽孢杆菌胞内羟化酶的最适pH值一致。

2.4.2 底物助溶剂对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响

由于维生素D₃属于脂溶性底物，其在水相中被微生物摄取进入细胞内的浓度有限^[14]。因此，需要在体系中加入底物助溶剂以促进微生物细胞对底物的摄取速率。有机溶剂在生物法催化合成医药原料、生物柴油、香料等精细化工领域应用广泛，如Panaya等人通过添加丁醇作为助溶剂，提高枯草芽孢杆菌GRSW1-B1 (*B. subtilis* GRSW1-B1) 生产香兰素的产量^[22]。本研究以有机溶剂对底物的溶解性以及其对菌体的毒性为依据，选择9种常用的有机助溶剂，包括乙醇、乙二醇、丙二醇等来提高底物维生素D₃在发酵培养基中的浓度和分散度。有机助溶剂对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响如图6A所示，乙二醇与甘油均具有较好的效果。通过对转化结果进行显著性差异分析，虽然添加乙二醇与甘油均可显著提高产物25(OH)VD₃的浓度，但是利用乙二醇作为底物助溶剂存在生长抑制现象。另外，在实际应用中甘油常常作为碳源使用，从而促进微生物的生长，属于助溶型碳源^[23]。相较于生物毒性较强的工业有机溶剂，碳源型有机溶剂在发酵过程中可

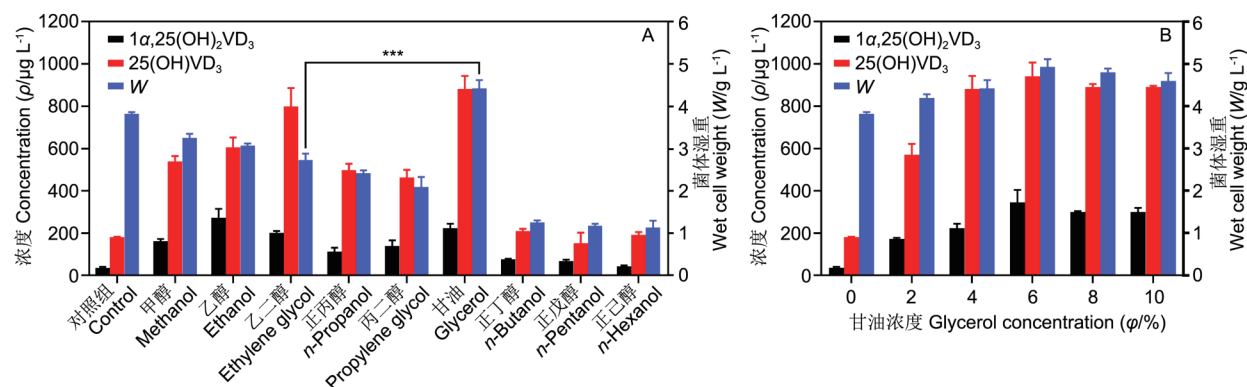


图6 有机助溶剂对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。A: 有机溶剂种类对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响；B: 甘油浓度对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。

Fig. 6 Effects of organic co-solvents on the conversion of vitamin D₃ by *Bacillus megaterium* H-1. A: Effects of organic solvents on the conversion of vitamin D₃ by *B. megaterium* H-1; B: Effect of the concentration of glycerol on the conversion of vitamin D₃ by *B. megaterium* H-1. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

以起到一举多得的效果,因此本研究确定以甘油作为底物维生素D₃的助溶剂。

据文献报道,Tang等人以蜡状芽孢杆菌zju 4-2 (*Bacillus cereus* zju 4-2)为羟化菌株,通过添加200 g/L羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)助溶底物,使25(OH)VD₃的浓度达到830 mg/L^[14]。放线菌*Kutzneria albida*在含1% (m/V) 甲基- β -环糊精(M- β -CD)的优化培养基中可产生70.4 mg/L的25(OH)VD₃和2.0 mg/L的1 α ,25(OH)₂VD₃^[24]。与环糊精相比,甘油更容易获取且成本低廉,所以本研究采用甘油替代环糊精作为助溶剂也为今后其他维生素D₃生物转化体系的构建提供了指导和借鉴。

在微生物转化脂溶性底物过程中,添加适量有机溶剂能够提高底物溶解度,促进转化,但添加过量有机溶剂会对微生物产生毒害作用^[25]。因此考察了不同浓度的甘油对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。由图6B可知,添加不同浓度的甘油均可促进菌株生长,培养基中甘油的浓度在一定范围内时,产物25(OH)VD₃的浓度随有机溶剂浓度的增加而提高。当甘油添加浓度为6% (V/V) 时,产物25(OH)VD₃浓度最高。随着甘油的浓度继续增加,25(OH)VD₃的浓度呈下降趋势。因此,选择6% (V/V) 甘油作为最适底物助溶剂进行维生素D₃的转化。

2.4.3 底物投料时间对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响

维生素D₃为脂溶性维生素,对微生物细胞具有毒害作用,较高浓度的维生素D₃会抑制微生物细胞的生长^[26-27]。因此,考察了不同的底物投料时间对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。结果表明,发酵过程中,0.25 g/L的底物投料浓度对巨大芽孢杆菌H-1产生底物抑制效应(图7A),当菌体生长0 h时添加底物对菌体生长抑制作用最大;当菌体生长24 h时投底物可以解除底物对菌体生长的抑制作用。检测发酵72 h时各组的产物浓度,发现菌体生长6 h投底物组的产物浓度最高,其中25(OH)VD₃浓度为1 001.45 μ g/L,1 α ,25(OH)₂VD₃浓度474.31 μ g/L(图7B)。综上所述,虽然菌体生长24 h投底物组可解除底物抑制作用,但在发酵72 h时产物浓度低于菌体生长6 h投底物组,从缩短发酵周期、提高转化效率角度考虑,选择菌体生长6 h时投底物进行维生素D₃的转化。

2.4.4 摇瓶接种量对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响

在发酵过程中,不同的接种量会直接影响到菌体在培养基中生长繁殖的速度。当接种小于1%时,菌体生长缓慢,发酵周期增长;当接种量大于4%时,菌体过快生长,会造成溶氧不足,影响菌体的转化效率^[28]。因此,在50 mL摇瓶培养中,考察不同接种量(1%-4%, V/V)对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响,结果如图8所示。接种量对巨大芽孢杆菌H-1的生物量无显著影响,当接种量为2%时,产物25(OH)VD₃浓度较高。随着接种量的增加,25(OH)VD₃的浓度并没有明显提高。接种量过高时,可能会增加工业化生产的工序负担;当接种量过少时,会导致发酵培养时菌株生长缓慢^[29]。综合考虑,选取2% (V/V) 的接种量作为最适接种量。

2.4.5 最适条件下巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的转化过程

图9为最适条件下巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的转化过程曲线。结果表明,发酵优化后单羟产物25(OH)VD₃的浓度在转化初期迅速上升,在36 h时达到最高1 433.90 μ g/L;双羟产物1 α ,25(OH)₂VD₃的浓度在转化过程中呈持续增长的趋势,在转化60 h时浓度达到最高811.05 μ g/L。相较于优化前,25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃达到最高浓度的时间均提前

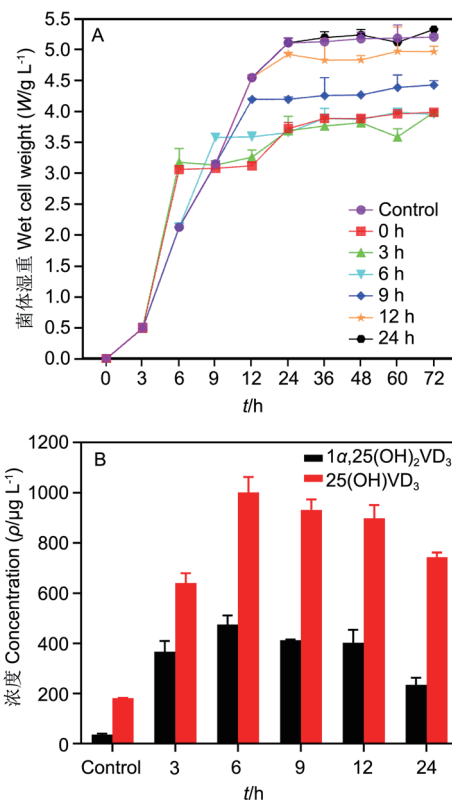


图7 底物投料时间对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。A: 维生素D₃投料时间对生物量的影响; B: 维生素D₃投料时间对产量的影响。

Fig. 7 Effects of substrate addition time on the conversion of vitamin D₃ by *Bacillus megaterium* H-1. A: Effect of vitamin D₃ addition time on biomass; B: Effect of vitamin D₃ addition time on concentration.

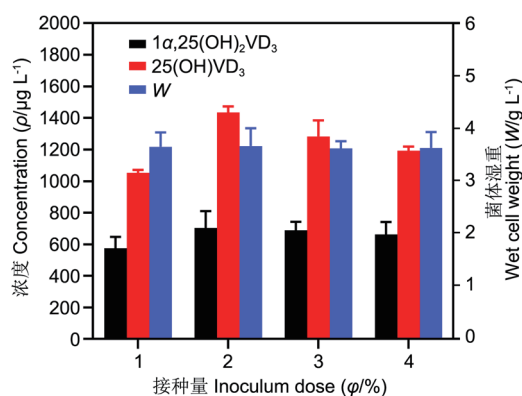


图8 接种量对巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的影响。

Fig. 8 Effect of inoculum size on the conversion of vitamin D₃ by *Bacillus megaterium* H-1.

12 h, 发酵周期大大缩短。此外,单羟产物25(OH)VD₃的浓度是优化前的6.2倍,双羟产物1 α ,25(OH)₂VD₃的浓度是优化前的4.1倍。

近年来,研究者从环境中分离筛选获得了不同种类羟化维生素D₃的菌株,包括自养无枝酸菌*P. autotrophica* FERM BP-1573和假放线菌*Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP等^[30-31],但其发酵周期普遍较长。*P. autotrophica* FERM BP-1573在200 L发酵罐中发酵168 h,25(OH)VD₃和的1 α ,25(OH)₂VD₃的浓度分别达到8.3 mg/L和0.17 mg/L;*Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP生产1 α ,25(OH)₂VD₃的发酵时间为9 d;*Pseudonocardia autotrophica* CGMCC

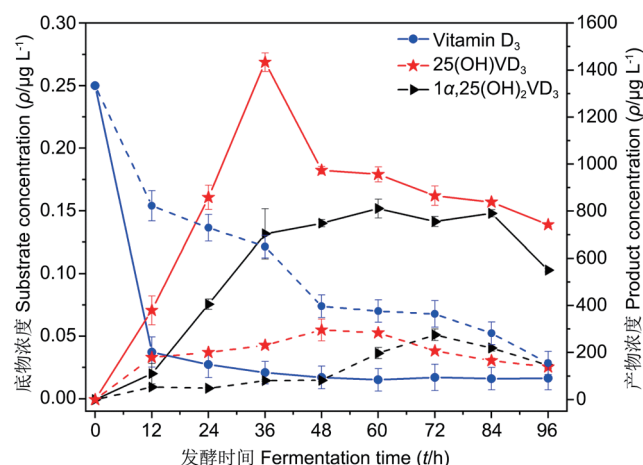


图9 巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的转化过程研究. 实线: 最优条件下巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的各组分浓度变化; 虚线: 优化前巨大芽孢杆菌H-1转化维生素D₃的各组分浓度变化.

Fig. 9 The conversion process of vitamin D₃ by *Bacillus megaterium* H-1 under optimal conditions. Solid line: Changes in the concentration of each component of vitamin D₃ converted by *B. megaterium* H-1 under optimal conditions; Dashed line: Changes in the concentration of each element of vitamin D₃ transformed by *B. megaterium* H-1 before optimization.

5098生产25(OH)VD₃的发酵周期是120 h^[6]. 与文献报道相比, 本研究筛选获得的羟化维生素D₃生成25(OH)VD₃和1α,25(OH)₂VD₃的巨大芽孢杆菌H-1具有发酵周期短的特点.

3 结论

本研究通过唯一碳源平板法成功筛选到一株能利用维生素D₃的菌株1-18, 发酵液经硅胶薄层层析法检测存在两种发酵产物, 进一步经结构鉴定为25(OH)VD₃和1α,25(OH)₂VD₃. 通过16S rDNA测序和构建系统进化树, 将菌株1-18鉴定为巨大芽孢杆菌, 将其命名为巨大芽孢杆菌H-1. 以LB为基础培养基, 当发酵液初始pH = 7.5, 添加6%丙三醇作底物助溶剂, 二级种子液培养6 h时投入0.25 g/L的底物维生素D₃, 接种量为2% (V/V) 时, 单羟产物25(OH)VD₃的浓度在转化36 h时达到1 433.90 μg/L、双羟产物1α,25(OH)₂VD₃的浓度在转化60 h时浓度达到811.05 μg/L. 综上所述, 巨大芽孢杆菌H-1是一株新的用于生产25(OH)VD₃和1α,25(OH)₂VD₃的菌株, 具有发酵周期短、生产成本低的特点和优势. 本研究采用甘油作底物助溶剂, 为维生素D₃的高效生物转化奠定了基础. 对于影响巨大芽孢杆菌H-1羟化维生素D₃的其他因素如培养基组分、放大工艺等还有待进一步确定和优化.

参考文献 [References]

- Pludowski P, Holick MF, Grant WB, Konstantynowicz J, Mascarenhas MR, Haq A, Povoroznyuk V, Balatska N, Barbosa AP, Karanova T, Rudenka E, Misiorowski W, Zakharova I, Rudenka A, Lukaszewicz J, Marciniowska SE, Laszcz N, Abramowicz P, Bhattoa HP, Wimalawansa SJ. Vitamin D supplementation guidelines [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, **175**: 125-135
- Gronborg IM, Tetens I, Ege M, Christensen T, Andersen EW, Andersen R. Modelling of adequate and safe vitamin D intake in Danish women using different fortification and supplementation scenarios to inform fortification policies [J]. *Eur J Nutr*, 2018, **58**: 227-232
- Isakova T, Nickolas TL, Denburg M, Yarlagadda S, Weiner DE, Gutierrez OM, Bansal V, Rosas SE, Nigwekar S, Yee J, Kramer H. KDOQI US commentary on the 2017 KDIGO clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease—mineral and bone disorder (CKD-MBD) [J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, **70** (6): 737-751
- Kattner L, Bernardi D. An efficient synthesis of 1α,25-dihydroxy vitamin D₃ LC-biotin [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, **173**: 89-92
- Kametani T, Furuyama H. Synthesis of vitamin D₃ and related compounds [J]. *Med Res Rev*, 1987, **7** (2): 147-171
- Luo J, Jiang F, Fang W, Lu Q. Optimization of bioconversion conditions for vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D using *Pseudonocardia autotrophica* CGMCC5098 [J]. *Biocatal Biotransform*, 2017, **35** (1): 11-18.
- Sasaki J, Mikami A, Mizoue K, Omura S. Transformation of 25-and 1 α-hydroxyvitamin D₃ to 1 α, 25-dihydroxy vitamin D₃ by using *Streptomyces* sp. strains [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2841-2846
- Sakaki T, Sugimoto H, Hayashi K, Yasuda K, Munetsuna E, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y. Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1814** (1): 249-256
- Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyo, R, Ohta M, Inouye K. Conversion of vitamin D₃ to 1α,25-dihydroxy vitamin D₃ by *Streptomyces griseus* cytochrome P450SU-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **320** (1): 156-164
- Fujii Y, Kabumoto H, Nishimura K, Fujii T, Yanai S, Takeda K, Tamura N, Arisawa A, Tamura T. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D₃ hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **385** (2): 170-175
- Kawauchi H, Sasaki J, Adachi T, Hanada K, Beppu T, Horinouchi S. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome P-450VD25 gene encoding vitamin D₃ 25-hydroxylase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1219** (1): 179-183
- Kang DJ, Im JH, Kang JH, Kim KH. Bioconversion of vitamin D₃ to calcifediol by using resting cells of *Pseudonocardia* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, **37** (9): 1-10
- Kang DJ, Lee HS, Park JT, Bang JS, Hong SK, Kim TY. Optimization of culture conditions for the bioconversion of vitamin D₃ to 1α, 25-dihydroxy vitamin D₃ using *Pseudonocardia autotrophica* ID 9302 [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2006, **11** (5): 408-413
- Tang D, Liu W, Huang L, Cheng L, Xu Z. Efficient biotransformation of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ by a newly isolated *Bacillus cereus* strain [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**: 765-774
- Ehrhardt M, Gerber A, Hannemann F, Bernhardt R. Expression of human CYP27A1 in *B. megaterium* for the efficient hydroxylation of cholesterol, vitamin D₃, and 7-dehydrocholesterol [J]. *J Biotechnol*, 2016, **218**: 34-40
- Hayashi K, Yasuda K, Sugimoto H, Ikushiro S, Kamakura M, Kittaka A, Horst RL, Chen TC. Three-step hydroxylation of vitamin

- D3 by a genetically engineered CYP105A1: enzymes and catalysis [J]. *FEBS J*, 2010, **277** (19): 3999-4009
- 17 Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inoue K, Ozono K, Kubodera N, Reddy GS, Okano T. C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers: 25-hydroxyvitamin D3 is metabolized to 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and subsequently metabolized through C-1 α or C-24 hydroxylation [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (16): 15897-15907
- 18 Song W, Zhang MJ, Li XJ, Zhang YJ, Zheng JY. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis* and its application in glycosyl rutin production [J]. *3 Biotech*, 2023, **13** (84): 1-10
- 19 杨南南, 李会, 吴燕, 张晓梅, 许正宏, 史劲松. *Gibberella intermedia* WX12产特异性糖苷酶的发酵工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2016, **35** (10): 1028-1034 [Yang NN, Li H, Wu Y, Zhang XM, Xu ZH, Shi JS. Optimization of culture conditions for specific production of glycosidase from *Gibberella intermedia* WX12 [J]. *J. Food Sci Biotechnol*, 2016, **35** (10): 1028-1034]
- 20 Zong L, Zhang Y, Shao ZK, Wang YW, Guo Z, Gao RJ, Bekir EE. Optimization and engineering of a self-sufficient CYP102 enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* towards synthesis of in-chain hydroxy fatty acids [J]. *Catalysts*, 2021, **11** (665): 1-15
- 21 Zhang AL, Zhang T, Hall EA, Hutchinson S, Cryle MJ, Wong LL, Zhou WH, Bell SG. The crystal structure of the versatile cytochrome P450 enzyme CYP109B1 from *Bacillus subtilis* [J]. *Mol BioSyst*, 2015, **11**: 869-881
- 22 Panaya K, Jedsadakorn N, Gumpanat M, Alisa SV. Involvement of cytochrome P450 in organic-solvent tolerant *Bacillus subtilis* GRSW1-B1 in vanillin production via ferulic acid metabolism [J]. *Fermentation*, 2022, **8** (508): 1-15
- 23 Tremouli A, Vlassis T, Antonopoulou G, Lyberatos G. Anaerobic degradation of pure glycerol for electricity generation using a MFC: the effect of substrate concentration [J]. *Waste Biomass Valor*, 2016, **7**: 1339-1347
- 24 Schmitz LM, Kinner A, Althoff K, Rosenthal K, Lütz S. Investigation of vitamin D2 and vitamin D3 hydroxylation by *Kutzneria albida* [J]. *ChemBioChem*, 2021, **22** (13): 2266-2274
- 25 马抒晗, 张玮佳, 吴茜, 姜腾飞, 乔代蓉, 曹毅. 高产脂肪酶菌株的筛选鉴定及酶学、转酯特性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (4): 602-608 [Ma SH, Zhang WJ, Wu Q, Jiang TF, Qiao DR, Cao Y. Lipase-producing strain: isolation, identification, enzymology, and transesterification [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (4): 602-608]
- 26 陈海琴, 许庆炎, 叶强, 陈卫, 张灏. 植物乳杆菌ZS2058生物转化共轭亚油酸的反应动力学[J]. 微生物学报, 2009, **49** (2): 174-179 [Chen HQ, Xu QY, Ye Q, Chen W, Zhang H. Bioconversion kinetics of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* ZS2058 [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49** (2): 174-179]
- 27 Wang Z, Zeng Y, Jia H, Yang N, Liu M, Jiang M, Zheng Y. Bioconversion of vitamin D3 to bioactive calcifediol and calcitriol as high-value compounds [J]. *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2022, **15** (1): 109-111
- 28 王向栋, 李会, 陈志蔚, 蔡兆培, 史劲松, 许正宏. 分枝杆菌LY-1转化植物甾醇产9 α 羟基雄烯二酮的发酵工艺优化[J]. 生物加工过程, 2019, **17** (2): 65-71 [Wang XD, Li H, Chen ZW, Cai ZP, Shi JS, Xu ZH. Fermentation process of *Mycobacterium* sp. LY-1 for the transformation of phytosterol to 9 α -hydroxy-4-androstenedione [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, **17** (2): 65-71]
- 29 Li H, Fu Z, Li H, Zhang X, Shi J, Xu Z. Enhanced biotransformation of dehydroepiandrosterone to 3 β ,7 α ,15 α -trihydroxy-5-androstane-17-one with *Gibberella intermedia* CA3-1 by natural oils addition [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, **41** (2014): 1497-1504
- 30 Sasaki J, Miyazaki A, Saito M, Adachi T, Mizoue K, Hanada K, Omura S. Transformation of vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 via 25-hydroxyvitamin D3 using *Amycolata* sp. strains [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **38** (2): 152-157
- 31 Kang DJ, Im JH, Kang JH, Kim KH. Whole cell bioconversion of vitamin D3 to calcitriol using *Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, **38** (7): 1281-1290