

油水双相体系中分枝杆菌降解植物甾醇产9-羟基雄烯二酮的工艺*

周龙飞¹ 李会^{1**} 许桢楠¹ 张晓梅¹ 史劲松¹ 许正宏^{2,3}

¹江南大学药学院 无锡 214122

²工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院 无锡 214122

³江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 无锡 214122

摘要 9 α -羟基雄烯-4-烯-3,17-二酮(9-羟基-雄烯二酮, 9 α -OH-AD)是一种重要的甾体药物中间体,主要用于糖皮质激素类和性激素类药物的生产,可由微生物转化法降解植物甾醇而得。植物甾醇在水中的溶解度极低,生物可利用度不高,严重制约了微生物对植物甾醇底物的利用效率。为进一步提高目的产物9 α -OH-AD的摩尔得率,以前期诱变筛选的*Mycobacterium* sp. LY-1作为出发菌株,考察不同HLB值的表面活性剂对9 α -OH-AD摩尔得率的影响,筛选得到最适表面活性剂,并建立高效的油水转化体系(油水体系的HLB = 7.3)。结果表明,HLB值为15的表面活性剂Tween-80有利于提高9 α -OH-AD的摩尔得率,当添加4.0 g/L Tween-80时,9 α -OH-AD的摩尔得率达到38.5%。在该工作基础上,发现添加促溶剂100.0 g/L的大豆油对分枝杆菌转化植物甾醇生成9 α -OH-AD具有促进作用。同时,添加4.0 g/L Tween-80和100.0 g/L大豆油时,当植物甾醇质量浓度为30 g/L时,9 α -OH-AD摩尔得率为36.9%,9 α -OH-AD质量浓度达到8.17 g/L,较对照提高了324.1%。本研究建立的油水转化工艺体系在一定程度上增加了底物质量浓度,提高了菌体的转化能力,结果可为甾醇生物转化体系的研究提供重要的参考信息。(图3 表2 参17)

关键词 分枝杆菌LY-1; 植物甾醇; 9 α -羟基雄烯-4-烯-3,17-二酮; 吐温-80; 大豆油

CLC TQ929

Biotransformation of phytosterols to 9 α -hydroxyandrostenedione by *Mycobacterium* sp. LY-1 in an oil-water two-phase system*

ZHOU Longfei¹, LI Hui^{1**}, XU Yanan¹, ZHANG Xiaomei¹, SHI Jinsong¹ & XU Zhenghong^{2,3}

¹School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

³National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract 9 α -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (9 α -OH-AD), via the microbial conversion of phytosterols, is an important precursor in the manufacture of numbers of modern glucocorticoid and sex hormone drugs. The solubility of phytosterols was extremely low in water, and the bioavailability was not high, which seriously restricts the utilization efficiency of microorganisms on phytosterols. To increase the molar yield of 9 α -OH-AD further, *Mycobacterium* sp. LY-1 was used as a starting strain by the previous mutagenesis, and the effects of the surfactants with different hydrophilic-lipophilic balance (HLB) values on the biotransformation efficacy of phytosterols to 9 α -OH-AD were investigated. The most suitable surfactant was chosen and a highly efficient conversion system of oil-water (HLB = 7.3) was established. The results showed that the surfactant Tween-80 with an HLB value of 15 increased the molar yield of 9 α -OH-AD. When 4.0 g/L Tween-80 was added, the molar yield of 9 α -OH-AD reached 38.5%. Then, it was found that the addition of the solubilizing agent 100.0 g/L soybean oil promoted the transformation of phytosterol to 9 α -OH-AD by *Mycobacterium* sp. LY-1. When 4.0 g/L Tween-80 and 100.0 g/L soybean oil were added, the molar yield of 9 α -OH-AD reached 36.9%, and the quality concentration of 9 α -OH-AD was 8.17 g/L; this was 324.1% higher than the control treatment at a higher phytosterols concentration of 30 g/L. The results indicated that the oil-water conversion process system established in this study could increase the substrate concentration and improved the transformation ability of the *Mycobacterium*. This might provide a basis for industrial application.

Keywords *Mycobacterium* sp. LY-1; phytosterol; 9 α -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione; Tween-80; soybean oil

收稿日期 Received: 2019-01-30 接受日期 Accepted: 2019-03-07

*国家863计划重大项目(2011AA02A211)、中国博士后科学基金面上项目(2018M640452)和江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目(SJCX17_0502)资助 Supported by the National 863 High Tech Program of China (2011AA02A211), the China Postdoctoral Science Foundation Project (2018M640452) and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX17_0502)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn)

甾体药物是仅次于抗生素的第二大药物,主要包括性激素、肾上腺皮质激素和蛋白同化激素三大类^[1-2]。9 α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9 α -OH-AD)是一类重要的甾药前体,其结构中特殊的 α -构型羟基,是获得卤代皮质类激素的重要前体,如地塞米松、倍他米松、及糠酸莫米松等,具有重要的商业价值^[3-5]。然而甾醇水溶性差、传质效率低、底物毒害、产物抑制等问题均制约着微生物菌株转化能力的提高,也是影响工业化应用的重要瓶颈^[6-7]。

国内外研究者们采取了多种措施来促进甾醇的生物转化:如添加表面活性剂、环糊精和植物油等助溶剂来解决目前的问题^[7-9]。Donova等通过化学及紫外诱变获得一株产9 α -OH-AD的菌株*Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D,利用5.0 g/L谷甾醇可获得50.0%摩尔产率的9 α -OH-AD^[10];申雁冰等研究了羟丙基- β -环糊精对植物甾醇侧链生物转化反应的影响,在添加羟丙基- β -环糊精与植物甾醇摩尔比为2:1,底物质量浓度为10.0 g/L时,底物转化率达到85.0%以上^[11]。虽然前期研究能够提高分枝杆菌转化甾醇的能力,但其底物质量浓度仍然偏低,摩尔得率仍然不高。因此,有必要对分枝杆菌降解植物甾醇产9 α -羟基雄烯二酮的工艺进行研究。

本课题组前期通过诱变筛选得到一株分枝杆菌 LY-1,它可以转化植物甾醇得到9 α -OH-AD,但其产物9 α -OH-AD的摩尔得率仍然不高,主要原因是由于底物植物甾醇的溶解性较低,进而影响了底物的转化效率^[12-13]。因此,为了提高目的产物9 α -OH-AD的摩尔得率,本研究以*Mycobacterium* sp. LY-1为出发菌株,通过考察不同HLB (Hydrophile lipophile balance) 值的表面活性剂对9 α -OH-AD的摩尔得率的影响,筛选确定最适表面活性剂。考察了助溶剂植物油对分枝杆菌转化植物甾醇生成9 α -OH-AD的影响,建立了高效的油水转化体系,该研究可为甾醇生物转化体系的研究提供重要的参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 分枝杆菌LY-1由本实验室筛选保藏。植物甾醇(β -谷甾醇47.0%,菜油甾醇24.6%,豆甾醇15.5%,菜籽甾醇3.4%)购自于湖北巨胜科技有限公司;9 α -OH-AD购自上海瀚香生物科技,纯度为98.0%以上;玉米浆购自安徽华恒生物科技股份有限公司;酵母粉购自美国Oxoid公司;其他常规试剂均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基 PDA 斜面培养基(g/L):马铃薯200.0,葡萄糖20.0,琼脂20.0;种子培养基(g/L):NaNO₃ 5.4,酵母粉15.0,甘油2.0,(NH₄)₂HPO₄ 0.6;发酵培养基(g/L):NaNO₃ 5.4,玉米浆20.0,(NH₄)₂HPO₄ 0.6,植物甾醇15.0,pH 8.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 将PDA斜面保存的分枝杆菌菌体接种于无菌种子培养基,120 r/min、30℃摇床培养72 h。

1.2.2 发酵培养基的制备 准确称取0.75 g植物甾醇和0.5 g表面活性剂至发酵培养基(50 mL/250 mL)中,灭菌121℃,20℃。超声50 W,30 min。接种量为2%(V/V),放置于摇床上发酵周期为7 d,培养条件为30℃、120 r/min。

1.2.3 油水转化体系的制备 准确称取0.75 g植物甾醇和优化后表面活性剂至发酵培养基(50 mL/250 mL)中,再添加180.0 g/L的植物油。灭菌121℃,20℃。超声50 W,30 min。接种量为2%(V/V),放置于摇床上发酵周期为7 d,培养条件为30℃、120 r/min。

1.2.4 油水转化体系HLB值的计算 根据Griffin理论,非离子型混合表面活性剂的HLB值具有加和性^[14]。

混合HLB值的计算:

$$HLB_{ab} = (HLB_a \times A\% + HLB_b \times B\%) / (A\% + B\%)$$

式中:HLB_{ab}、HLB_a、HLB_b分别为混合表面活性剂、表面活性剂A及B的HLB值;A%、B%分别为表面活性剂A、B的百分含量。

1.2.5 菌体生物量的测定 以菌体干重的形式表示分枝杆菌LY-1的生物量。提前称量2.0 mL离心管(已烘干至恒重)的空管质量为 m_0 ,加入1 mL发酵液,12 000 r/min离心10 min后弃上清,收集的菌体用乙酸乙酯洗涤3遍,烘干至恒重。将装有烘干至恒重的菌体的离心管进行准确称量,记为 m_1 ,菌体干重为 $m = m_1 - m_0$ 。

1.2.6 产物提取 取0.5 mL发酵液于2.0 mL烘干至恒重的离心管中,加入1.0 mL乙酸乙酯萃取,重复上一步操作4遍,收集并合并上层乙酸乙酯,氮吹仪吹干,用8倍体积的色谱级乙腈复溶,有机滤膜(0.22 μ m)过滤除杂后用于HPLC。

1.2.7 分析方法 HPLC:以外标法进行产物定量,选取Agilent TC-C18,4.6 $\times$ 250 mmol/L,5 μ m色谱柱;流动相为乙腈和水(7:3,V/V);柱温:30℃;紫外检测波长:254 nm;流速:0.5 mL/min;进样量:10.0 μ L。

$$C_p = (P_p \times C_0 \times D) / P_0$$

$$\text{产物摩尔得率} = (C_p \times M_s) / (C_s \times M_p) \times 100\%$$

C_0 , 标样质量浓度(g/L); C_s , 底物质量浓度(g/L); C_p , 产物质量浓度(g/L); P_0 , 标样HPLC检测图谱峰面积; P_p , 产物HPLC检测图谱峰面积; D , 样品的稀释倍数; M_p , 产物摩尔质量; M_s , 底物摩尔质量。

2 结果与讨论

2.1 不同HLB值表面活性剂对菌株转化植物甾醇的影响

“亲水亲油平衡值”(HLB)表示不同表面活性剂的乳化能力。表面活性剂是指含有极性和非极性亲脂基团的物质,具有显著降低溶剂或界面张力的性质^[15]。当HLB值<8时,表面活性剂为亲油性;当HLB值>8,表面活性剂为亲水性。为了提高底物植物甾醇的溶解性,根据相似相溶原则,在植物甾醇的质量浓度为15.0 g/L,表面活性剂的质量浓度为10.0 g/L时,考察了不同HLB值的表面活性剂对植物甾醇转化生成9 α -OH-AD的影响(表1)。结果表明,与其他表面活性剂相比,当添加10.0 g/L的Tween-80(HLB=15)时,其目的产物9 α -OH-AD的摩尔得率较高,为35.8%。因此,筛选确定了最适表面活性剂为Tween-80。

2.2 不同质量浓度Tween-80对菌株转化植物甾醇的影响

将筛选的表面活性剂Tween-80分别按质量浓度为1.0、4.0、7.0、10.0、13.0 g/L,研究不同质量浓度的Tween-80对分枝

表1 不同HLB值的表面活性剂的筛选
Table 1 Screening of surfactants with different HLB values

化学成分/规格 Chemical component/standard		亲水亲油 平衡值 HLB	表面活性剂添加质量浓度 (10.0 g/L) Surfactant added quality concentrations (10.0 g/L)	
			摩尔得率 Molar yield (r/%)	生物量 Biomass (ρ/g L ⁻¹)
Control	对照	—	13.4 ± 0.5	1.9 ± 0.2
Triethanolamine monooleate ester (FM)	三乙醇胺单油酸酯	4	30.6 ± 0.66	4.5 ± 0.31
Span-80	斯潘-80	4.3	3.95 ± 0.45	0.6 ± 0.21
Span-60	斯潘-60	4.7	4.35 ± 0.21	2.6 ± 0.35
Glycerol monolaurate (GML)	甘油单月桂酸酯	5	4.4 ± 0.35	1.1 ± 0.11
Fatty alcohol ether (MOA-3B)	脂肪醇醚	6	3.9 ± 0.40	1.4 ± 0.15
Oleic acid polyoxyethylene ester (A-103)	油酸聚氧乙烯酯	6.5	4.5 ± 0.13	1.6 ± 0.10
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (MOA-3)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	6.5	5.09 ± 0.12	1.1 ± 0.28
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (O-3)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	6.5	4.1 ± 0.41	0.6 ± 0.38
Castor oil/hydrogenated castor oil and ethylene oxide condensate (EL-12)	蓖麻油/氢化蓖麻油与环氧乙烷缩合物	7	4.2 ± 0.12	1.7 ± 0.15
Alkylphenol ethoxylate (SOPE-4)	烷基酚聚氧乙烯醚	8.5	7.0 ± 0.33	1.6 ± 0.15
Span-20	斯潘-20	8.6	7.7 ± 0.50	1.5 ± 0.15
Fatty alcohol polyoxyethylene ether (S-185)	脂肪醇聚氧乙烯醚	9	0.7 ± 0.10	1.5 ± 0.17
Polyoxyethylene laurate (LAE-4)	聚氧乙烯月桂酸酯	9.5	5.5 ± 0.54	1.9 ± 0.25
Tween-65	吐温-65	10.5	5.5 ± 0.50	1.5 ± 0.32
Isoform alcohol and ethylene oxide condensate (E-1306)	异构醇与环氧乙烷缩合物	11.5	9.3 ± 0.79	1.1 ± 0.20
Fatty alcohol polyoxyethylene ether	脂肪醇聚氧乙烯醚 (乳白灵)	11.5	4.4 ± 0.26	1.0 ± 0.13
Alkylphenol polyoxyethylene polyoxypropylene ether (NPE-105)	烷基酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚	11.5	17.9 ± 0.43	1.1 ± 0.28
Fatty alcohol polyoxyethylene ether (JFC)	脂肪醇聚氧乙烯醚	12	24.9 ± 0.60	2.5 ± 0.29
Oleic acid polyoxyethylene ester (A-110)	油酸聚氧乙烯酯	12.5	5.2 ± 0.13	1.7 ± 0.13
Polyoxyethylene stearate (SG-12)	聚氧乙烯硬脂酸酯	12.5-13.5	19.2 ± 0.36	2.8 ± 0.40
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (MOA-9)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	13.5	8.8 ± 0.10	1.5 ± 0.29
Castor oil/hydrogenated castor oil and ethylene oxide condensate (HEL-40)	蓖麻油/氢化蓖麻油与环氧乙烷缩合物	13.5	3.7 ± 0.21	1.2 ± 0.30
Alkylphenol ethoxylate (SOPE-10)	烷基酚聚氧乙烯醚	13.5	2.4 ± 0.21	1.1 ± 0.12
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (O-15)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	14.5	30.5 ± 0.42	3.4 ± 0.15
Tween-60	吐温-60	14.5	18.7 ± 0.87	1.9 ± 0.40
Tween-80	吐温-80	15	36.9 ± 0.91	3.8 ± 0.83
Fatty alcohol polyoxyethylene ether (OS-15)	脂肪醇聚氧乙烯醚	15	9.7 ± 0.14	1.7 ± 0.26
Tween-40	吐温-40	15.5	16.2 ± 0.67	2.8 ± 0.93
Tween-20	吐温-20	16.5	1.4 ± 0.29	3.8 ± 0.44
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (O-20)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	16.5	3.7 ± 0.44	0.7 ± 0.26
Fatty alcohol and ethylene oxide condensate (O-30)	脂肪醇与环氧乙烷缩合物	16.5	33.6 ± 0.35	4.0 ± 0.15
Alkylphenol ethoxylate (SOPE-20)	烷基酚聚氧乙烯醚	16.5	33.1 ± 0.57	3.5 ± 0.53
Castor oil/hydrogenated castor oil and ethylene oxide condensate (EL-90)	蓖麻油/氢化蓖麻油与环氧乙烷缩合物	17	30.6 ± 0.44	3.3 ± 0.31
Polyoxyethylene stearate (SG-50)	聚氧乙烯硬脂酸酯	18	16.7 ± 0.68	2.6 ± 0.21
Polyoxyethylene stearate (SG-100)	聚氧乙烯硬脂酸酯	18.5	23.4 ± 0.47	2.2 ± 0.26

杆菌转化植物甾醇的影响 (图1)。结果表明,随着Tween-80质量浓度升高至4.0 g/L, 9α-OH-AD的摩尔得率在增加,菌体的生物量也在增加;但当Tween-80质量浓度超过4.0 g/L时,目的产物9α-OH-AD的摩尔得率开始下降,而此时菌体的生物量也逐渐减少,这说明高质量浓度的Tween-80会抑制菌体的生长,进而影响9α-OH-AD的合成。因此,最终确定了Tween-80的最适质量浓度为4.0 g/L。但此时,目的产物9α-OH-AD摩尔得率仅为38.5%,仍然有待进一步提高。高兴强等在使用分枝杆菌转化植物甾醇生成甾体药物中间体9α-OH-AD的过程中,使用植物油如大豆油和葵花籽油等既能促进底物的溶解,对甾体有一定的增溶效果,还有利于底物转化的进行^[16]。因此,在添加4.0 g/L Tween-80的基础上,本文考察了不同种类的植物油对分枝杆菌转化植物甾醇的影响。

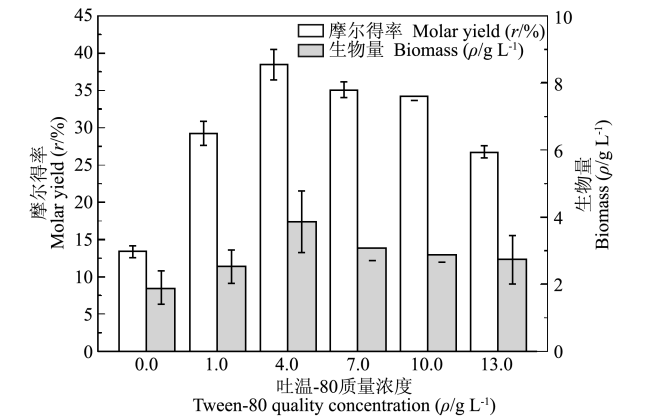


图1 不同质量浓度Tween-80对菌体转化植物甾醇的影响。
Fig. 1 Effects of Tween-80 of different quality concentrations on biotransformation of phytosterol by *Mycobacterium* sp. LY-1.

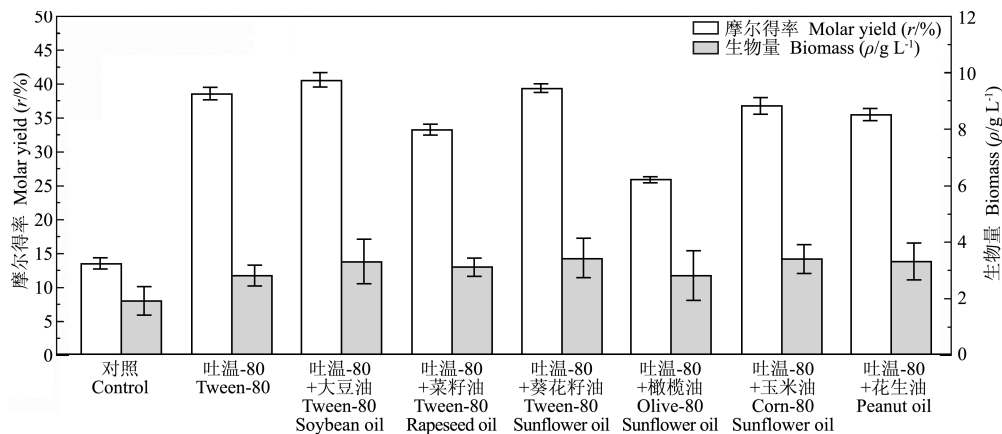


图2 不同种类的植物油对菌株转化植物甾醇的影响。
Fig. 2 Effects of different kinds of vegetable oil on biotransformation of phytosterol by *Mycobacterium* sp. LY-1.

2.3 不同种类植物油对菌株转化植物甾醇的影响

为了进一步提高分枝杆菌转化植物甾醇生成9 α -OH-AD的效率,当底物植物甾醇质量浓度为15.0 g/L, Tween-80质量浓度为4.0 g/L时,本研究考察了6种不同的植物油(质量浓度180.0 g/L)如大豆油、菜籽油、葵花籽油、橄榄油、玉米油和花生油对分枝杆菌转化植物甾醇的影响(图2)。在植物油为大豆油和葵花籽油时,分枝杆菌转化植物甾醇产9 α -OH-AD的效果最好;相比较而言由于大豆油的成本较低,而且大豆油中植物甾醇溶解度较高,廉价易得,故选取大豆油作为分枝杆菌转化植物甾醇的反应体系。

2.4 不同质量浓度的大豆油对菌株转化植物甾醇的影响

在Tween-80的质量浓度为4.0 g/L时,大豆油的质量浓度分别为0.0、10.0、50.0、100.0、150.0、200.0 g/L,考察不同质量浓度大豆油对植物甾醇转化的影响(图3)。在一定范围内,9 α -OH-AD的摩尔得率随着大豆油质量浓度增加(至100.0 g/L)而增多,菌体的生物量也在增加;但当大豆油质量浓度过高(超过100.0 g/L)时,目的产物9 α -OH-AD的摩尔得率并没有进一步提高。可能的原因是植物油由甘油和不饱和脂

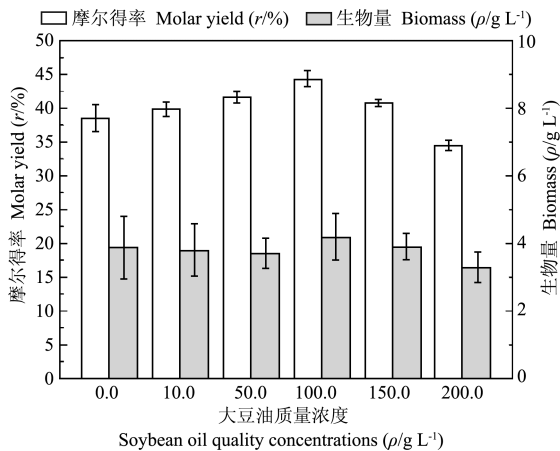


图3 不同质量浓度大豆油对菌株转化植物甾醇的影响。
Fig. 3 Effects of different quality concentrations of soybean oil on biotransformation of phytosterol by *Mycobacterium* sp. LY-1.

肪酸组成,而甾醇侧链的降解过程与脂肪酸的 β -氧化相似,较高的脂肪酸的浓度与甾醇生物降解酶系的底物竞争性抑制^[10-17]。因此,在Tween-80的质量浓度为4.0 g/L,大豆油最适质量浓度为100.0 g/L时,9 α -OH-AD摩尔得率为45.3%,质量浓度达到5.02 g/L。根据Griffin理论,非离子型混合表面活性剂的HLB值具有加和性,此时油水转化体系的HLB值为7.3。

2.5 不同底物质量浓度对分枝杆菌转化植物甾醇的影响

在Tween-80的质量浓度为4.0 g/L,大豆油的质量浓度为100.0 g/L时,分别考察了不同底物质量浓度15.0、20.0、25.0、30.0 g/L对植物甾醇转化的影响(表2)。结果显示,在不同底物质量浓度下,对照实验(不添加任何溶剂)中,植物甾醇质量浓度从15.0 g/L增加至30.0 g/L时,9 α -OH-AD摩尔得率从13.4%下降到8.7%,在油水转化体系中9 α -OH-AD摩尔得率从45.3%下降到36.9%。但当植物甾醇质量浓度为30 g/L时,底物摩尔得率达到36.9%,质量浓度可达8.17 g/L,较对照提高了324.1%。

表2 不同底物质量浓度对菌株转化植物甾醇的影响
Table 2 Effects of different substrate quality concentration on biotransformation of phytosterol by *Mycobacterium* sp. LY-1

溶剂 Solvent	底物质量浓度 (ρ/g L ⁻¹) Substrate quality concentration			
	15	20	25	30
对照Control	13.4 ± 0.4	11.6 ± 0.5	10.8 ± 0.3	8.7 ± 0.5
吐温-80 + 大豆油 Tween-80 + Soybean oil	45.3 ± 0.9	40.4 ± 0.7	38.8 ± 0.5	36.9 ± 0.8

3 结论

为了提高分枝杆菌LY-1转化植物甾醇生产9 α -OH-AD的转化效率,本研究建立了油水双相转化体系,并根据Griffin理论,非离子型混合表面活性剂的HLB值具有加和性,此时油水转化体系的HLB值为7.3。通过对表面活性剂和植物油的筛选并对各成分进行质量浓度优化,确定最适质量浓度分别为Tween-80 4.0 g/L、大豆油100.0 g/L。在此基础上,植物甾醇质量浓度为15 g/L,分枝杆菌LY-1转化植物甾醇生产9 α -OH-

AD的摩尔得率为45.3%, 质量浓度为5.03 g/L; 当底物质量浓度达到30 g/L时, 9 α -OH-AD的摩尔得率达到36.9%, 9 α -OH-AD质量浓度可达8.17 g/L, 较对照提高了324.1%。本文建立的油水转化工艺体系, 在一定程度上增加了底物质量浓度, 提高了菌体的转化能力, 从而为后续水微溶性底物的转化放大生产的研究和工业化应用奠定了良好的基础。

参考文献 [References]

- Nassiri KN, Faramarzi MA. Recent developments in the fungal transformation of steroids [J]. *Biocatal Biotransfor*, 2015, **33** (1): 1-28
- Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **94** (6): 1423-1447
- Bolt HM, Stewart JD. Highlight report: the bisphenol a controversy [J]. *Arch Toxicol*, 2011, **85** (12): 1491-1492
- 郭倩, 张铁雨, 冯进辉, 王玉, 陈曦, 路富平, 吴洽庆, 朱敦明. 高效转化胆固醇菌株的筛选、鉴定及转化条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (1): 101-106 [Guo Q, Zhang TY, Feng JH, Wang Y, Chen X, Lu FP, Wu QQ, Zhu DM. Screening, identification and condition optimization of a bacterial strain efficient in biotransforming cholesterol [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (1): 101-106]
- 姚抗. 分枝杆菌甾醇转化机制的解析及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014 [Yao K. Investigation into the molecular mechanism of microbial sterol degradation and its metabolic engineering for the production of steroid pharmaceutical precursors [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2014]
- Savinova TS, Nguyen T, Diep NE, Voishvillo VA, Andryushina NV, Karpova IP, Beletskaya LD. Extraction of a mixture of phytosterols from soybean processing by-product and its use in the manufacture of 9 α -hydroxyandrost-4-en-3, 17-dione [J]. *Pharm Chem J*, 2012, **46** (3): 183-186
- Zhang XJ, Liu YY, Li H, Su LL, Zhou LF, Peng J, Shen R, Zhang Y, Shi JS, Xu ZH. Microemulsion system for *Colletotrichum lini* ST-1 biotransformation of dehydroepiandrosterone to 7 α , 15 α -diOH-DHEA [J]. *Biochem Eng J*, 2018, **131**: 77-83
- 杨亚力, 杨顺楷, 吴中柳. 偶发分枝杆菌发酵甾醇侧链积累9 α -羟基雄烯二酮[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (2): 256-262 [Yang YL, Yang SK, Wu ZL. Development of 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione (9 α -OH-AD) through cleaving sterol sidechain by fermentation of *Mycobacterium fortuitum* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (2): 256-262]
- Saraphanchotiwitthaya A, Sripalakit P. Production of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione from rice germ and wheat germ extracts by *Mycobacterium* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, **38** (9): 1595-1602
- Dovbnya DV, Khomutov SM, Fokina VV, Dovbnya MV. Transformation of wood industry waste into key intermediates for pharmaceutical substances: biotechnological study [J]. *Russ J Phys Chem B*, 2015, **9** (3): 436-444
- 申雁冰, 王敏, 王永乐, 骆健美. 羟丙基- β -环糊精对植物甾醇侧链生物转化反应的影响[J]. 高校化学工程学报, 2009, **23** (3): 440-444 [Shen YB, Wang M, Wang YL, Luo JM. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the side-chain bioconversion of phytosterols by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 [J]. *J Chem Eng Chin Univ*, 2009, **23** (3): 440-444]
- 宋宇迪, 董玉秀, 马新宇, 张晓娟, 陈志蔚, 蔡兆培, 李会, 史劲松, 许正宏. 降解植物甾醇为甾体9 α -OH-AD菌株的筛选与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23** (6): 1022-1027 [Song YD, Dong YX, Ma XY, Zhang XJ, Chen ZW, Cai ZP, Li H, Shi JS, Xu ZH. Screening and identification of a strain degrading phytosterols to 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3, 17-dione [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23** (6): 1022-1027]
- 马洋, 王向栋, 王萌慧, 李会, 史劲松, 许正宏. 高效转化植物甾醇为9 α -OH-AD的分枝杆菌诱变选育及工艺优化[J]. 生物工程学报, 2017, **33** (7): 1198-1206 [Ma Y, Wang XD, Wang MH, Li H, Shi JS, Xu ZH. Mutation breeding of high 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione transforming strains from phytosterols and their conversion process optimization [J]. *J Biotechnol*, 2017, **33** (7): 1198-1206]
- 徐传豪, 安崇伟, 王晶禹, 叶宝云, 宋长坤, 冀威. 表面活性剂的HLB值对HMX/聚氨酯基炸药油墨流变性能的影响[J]. 含能材料, 2017, **25** (9): 745-749 [Xu CH, An CW, Wang JY, Ye BY, Song CK, Ji W. Effect of HLB numbers on the rheological property of HMX/polyurethane based explosive ink [J]. *J Energ Mater*, 2017, **25** (9): 745-749]
- Egan RW. Hydrophile lipophile balance and critical micelle concentration as key factors influencing surfactant disruption of mitochondrial membranes [J]. *J Biol Chem*, 1976, **251** (14): 4442-4447
- 高兴强, 花强, 王学东, 冯建勋. 油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产9 α -羟基雄烯二酮工艺研究[J]. 华东理工大学学报, 2014, **40** (4): 433-437 [Gao XQ, Hua Q, Wang XD, Feng JS. Biotransformation of phytosterols to 9 α -hydroxyandrostenedione by *Mycobacterium* sp. in oil-water emulsion system [J]. *J East Chin Univ Sci Technol*, 2014, **40** (4): 433-437]
- Stefanov S, Yankov D, Beschkov V. Biotransformation of phytosterols to androstenedione in two phase water-oil systems [J]. *Chem Biochem Eng Q*, 2006, **20** (4): 421-427