

杨顺楷. 甾体微生物转化: 糖皮质激素氢化可的松生物转化的鲁棒性及其研究应用[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (1): 230-238

Yang SK. Microbial transformation of steroids: biological robustness of bioconversion for the production of glucocorticoid hydrocortisone and its research application [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (1): 230-238

甾体微生物转化: 糖皮质激素氢化可的松生物转化的鲁棒性及其研究应用

杨顺楷✉

中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要 结合作者所在实验室半个世纪从事的甾体微生物转化研究, 聚焦国内外仅次于抗生素制药的甾体激素药物中的糖皮质激素药物氢化可的松 (hydrocortisone, HC) 生物转化研发过程, 应用工业微生物鲁棒性理论, 结合国内外HC半合成路线, 评述工业生物转化产生HC的研究进展, 特别是该过程所使用的2株具有较高鲁棒性、可以直接实现向甾体底物Reichstein's化合物S (RS/RSA) 引入C11 β -羟基的丝状真菌, 新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) AS 3.4381和蓝色犁头霉 (*Absidia orchidis*) AS 3.65的研究情况. 本实验室近20年的研究重现了新月弯孢霉60%的HC得率的国外报道水平, 具有在国内替换低效率蓝色犁头霉AS3.65工艺路线的可行性; 8个研发案例充分说明提高我国糖皮质激素HC工业生产水平, 无论是改良菌株, 还是改进生物转化工艺的开发应用, 实现微生物甾体转化工业的经济性鲁棒性是可行的. (表3 参39)

关键词 生物鲁棒性; 甾体微生物转化; 新月弯孢霉AS 3.4381; 蓝色犁头霉AS 3.65; Reichstein's化合物S (RS/RSA); C11 β -羟基化; 糖皮质激素氢化可的松

Microbial transformation of steroids: biological robustness of bioconversion for the production of glucocorticoid hydrocortisone and its research application

YANG Shunkai✉

Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract In this review, the author, who has a professional experience in the field of microbial transformation of steroids in the laboratory for semi-era, focused on the glucocorticoid drugs, locus below antibiotics, and hydrocortisone for research and development progress and tried to use the theory of biological robustness in industrial microbiology for investigating two strains from mycelial fungi, *Absidia coerulea* AS 3.65 and *Curvularia lunata* AS 3.4381, possessing high robustness in the biotransformation of steroids. The organisms were able to introduce a C11 β -hydroxyl group into the substrate Reichstein's S (RS/RSA) directly for the production of hydrocortisone. In addition, the experimental results in this laboratory have shown that for the past 20 years and more, a high yield of hydrocortisone-bioconverted RS was reproduced with 60% (g/L, m/V) by *C. lunata* AS 3.4381. This balances the low efficiency of hydrocortisone-conversion process at home by using *A. coerulea* AS 3.65 with 45% of RSA (g/L, m/V). Until date, eight research cases have been summarized in the review, which demonstrate that either breeding of strains or improving the biotransformation process to lift a level of industrial production of glucocorticoid hydrocortisone at home, can be used for performance of the robustness in industrial economy in the field of microbial transformation of steroids.

Keywords biological robustness; microbial transformation of steroids; *Curvularia lunata* AS 3.4381; *Absidia coerulea* AS 3.65; Reichstein's S (RS/RSA); C11 β -hydroxylation; glucocorticoid hydrocortisone

生物鲁棒性 (biological robustness) 是指生物系统在受到环境变化、随机事件 (或细胞内噪声) 和遗传变异等不确定干扰时保持表型稳定性的一种特性, 是生物进化系统进化出来的固有特性. 该理论主要论题有: (1) 适应性, 表示系统对环境变化的能力; (2) 参数的不敏感性, 表征系统对特定动力学参数的相对不敏感性; (3) 缓慢 (graceful) 退化性, 表

示系统在损伤 (非灾难性失效) 条件下, 系统功能特性的缓慢衰减.

开发和改进工业微生物的鲁棒性和适配性, 比如高生产率、高收得率和胁迫抗性, 是发展生物产业的基础. 然而这些性状由多层次多尺度的复杂性调控网络所控制, 仅仅基于对模式生物菌种和非工业环境所开展的研究尚不能全面解析相

收稿日期 Received: 2021-03-01 接受日期 Accepted: 2021-07-14

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: yangsk@cib.ac.cn)

关的遗传调控生理生化代谢机理，故着眼于多层次多尺度的工业微生物鲁棒性基础研究是很有必要的^[1-3]。

早期发现的肾上腺皮质天然甾体激素成分之一，即皮质醇或氢化可的松 (cortisol = hydrocortisone, HC)，作为基础的糖皮质激素 (glucocorticoids)，有着极其广泛的抗炎抗过敏临床用途。因此，伴随着甾体激素药物化学的发展，借助化学合成-生物转化手段的半合成技术路线，创制出了很多更加安全、疗效高而毒副作用小的系列糖皮质激素药物。其中包括以HC为代表的半合成路线，即化学合成Reichstein's化合物S (RS/RSA)，以此为底物，经由生物转化生产HC产品。该糖皮质激素一方面用于临床，另一方面随着糖皮质激素受体理论的发展，逐步经由HC分子1,2-位脱氢，可用棒状杆菌科 (Corynebacteriaceae) 的简单节杆菌 (*Arthobacter simplex*) 或化学法制得去氢氢化可的松 (波尼松)，抗炎活性提高数倍；后续发展就是以波尼松为基础，对该甾体化合物D-环结构修饰，相继发现了许多优秀的糖皮质激素药物，如地塞米松、倍他米松、布地奈德、丙酸氟地卡松等。如今这些药物早已经被广泛用于临床治疗抗炎抗过敏及免疫调节等众多疾病，成了医院药房的必备药品之一。此外，不得不提及另一个基础糖皮质激素药物——可的松 (含C11,2位-脱氢的波尼松或强的松)，由于该药物分子结构C11-位以酮羰基形式存在，作为配体与受体相互作用低下，结果可的松类药物的生物活性不是很好，而HC正好与之相反，成为糖皮质激素药物“大树”主干^[4-6]。

1952年普强制药公司首次报道筛选出弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 和刺孢小克银汉霉 (*Cunninghamella blakesleeana*) 具有生物转化甾体底物RS产生氢化可的松 (HC) 的能力，前者产率不详，后者35%^[7]。次年辉瑞公司应用筛选获得的丝孢真菌新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 工业发酵转化RS成为HC产品获得成功 (产率40%)^[8]。我国也在20世纪60年代初筛选出毛霉目一株本土真菌蓝色犁头霉 (*Absidia coerulea*, 同物异名 = *Tieghemella orchidis*) AS3.65, 利用国内的薯蓣皂素-双烯半合成路线，成功实现化学合成甾体底物RSA (C21-Ac)，经由工业发酵蓝色犁头霉转化生产出HC产品；该菌株一直沿用至今，收得率45%^[9]；同期苏联学者也报道了类似的工作^[10-11]。国际上新月弯孢霉长期稳定在转化RS生产HC得率55%-60%的高水平。显然，这两株工业微生物生产菌，新月弯孢霉具有较优良的生物鲁棒性，而蓝色犁头霉AS 3.65在菌株的品质鲁棒性方面存在差距，具有工业经济性生产低效率的缺点。

过去数十年来，围绕这两株工业丝状真菌的生物鲁棒性进行了许多实验研究^[12]。该生物转化制造HC的本质就是实现直接向甾体底物RS引入C11 β -羟基。通常认为该步转化反应是最难于实现的微生物转化过程。实验研究的复杂性在于进行C11 β -羟基化，受制于多种因素的制约，即相对少量的微生物能够直接催化该过程反应；羟化酶系统的不稳定性，底物分子多个位点触发反应，生成副产物；一直到如今对该工业微生物鲁棒性催化机理研究较少，文献资料综述C11 β -羟基化研究的结论往往是相互矛盾的，故造成至今HC生物发酵制造产业C11 β -羟基化低效率的特征。

受限于甾体底物RS在发酵生理水相极低的溶解度 (0.06 g/L)，工业制造均处在克量级水平；使用较高的甾体底物浓度，又受限于加入较大的有机溶剂，造成对生物催化剂的“毒害”作用，导致转化率降低^[13]。本文针对HC生物转化过程

中菌种C11 β -羟基化生物遗传鲁棒性及生物加工过程“环境”鲁棒性进行论述，以期促进实现生物转化系统状态的稳定鲁棒性和品质鲁棒性，提高国产HC产品的生产效率，实现资源的充分合理利用，降低能耗和环境友好。

1 工业甾体微生物遗传鲁棒性菌种筛选与生物转化法生产氢化可的松的发展历程

从表1可见，HC生物转化首先筛选具有直接引入C11 β -羟基的微生物鲁棒性菌株，涵盖细菌和丝状真菌。筛选方法有两种：其一，直接从天然源采样，应用富集培养技术 (enrichment culture) 分离选择目的菌株，即“野生型”菌株。通常该法筛选获得的菌株活力较低，须在实验室通过较长期的人工驯化和理化诱变选育，得到具有工业应用价值的菌种；其二，经文献调查，直接从国内外有关菌种保藏机构搜集所需要的菌种。两种方法涉及“定向筛选”，获得具有转化RS生成HC产物的能力，事先建立起对生物转化产物灵敏可靠的发酵化学定性定量分析方法^[14]。筛选获得的天然“野生型”菌株具有的优势可以较好地用于基因组学育种，因为它缺少工业菌株经由长期人工诱变积累的鲁棒性退化，而易通过基因工程构建起活力高、长势佳 (酶活/酶量) 的新菌种。

表1 能采用Reichstein's化合物S直接生物法引入C11 β -OH生产氢化可的松 (HC) 的微生物名录

Table 1 List of the microorganism strains with capacity of introducing directly C11 β -hydroxyl group of Reichstein's compound S for production of hydrocortisone (HC)

菌株 Organism	底物 Substrate	氢化可的松收得率 Net yield of HC (r/%)	参考文献 Reference
<i>Streptomyces fradiae</i>	RS	—	[7]
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	RS	35	[7]
<i>Curvularia lunata</i>	RS	40	[8]
<i>Tieghmella orchidis</i>	RSA	49.5	[10-11]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS	62 ^a	[15]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS, RSA	60 ^a	[13]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS	56 ^a	[16]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	17 α , 21-di-AcRSA	87 ^a	[17]
<i>Absidia coerulea</i> AS3.65	RSA	45	[9]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	45	[9]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	16 α -methyl-RSA	55.5	[18]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS	68 ^a	[19]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS- β -CD	70-75 ^a	[20]
<i>C. lunata</i> CL-366/102	RS	65.0	[21]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS-methyl- β -CD	55-58 ^a	[22]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	61.9	[23]
<i>Absidia coerulea</i>	RSA	44.7	[23]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	57.6	[24]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	59.3	[25]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	56.0	[26]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	55.0	[27]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS	58	[22]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RS- β -CD	57.8	[20]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	Substrate I *	30 (Rimexolone)	[19]
<i>C. lunata</i> AS3.4381	RSA	53.3	[28]
<i>A. coerulea</i> AS3.65 + <i>C. lunata</i> AS3.4381	RSA	52	[29-30]

* 16,17-二甲基-17-(1-氧丙基) 雄甾-1,4-二烯-3-酮; ^a 分析数据。

* 16,17-dimethyl-17-(1-oxopropyl) androsta-1,4-dien-3-one; * analytical data.

从历史沿革看, 早期陆续报道原核微生物细菌可转化产生HC, 但是最终能够用于工业生产的菌种, 仍然是真核微生物的丝状真菌新月弯孢霉和蓝色犁头霉^[5, 9]。同期, Modilnitsky等还报道了蓝色犁头霉发酵转化研磨微粒化底物RSA, 成为11 α -和11 β -羟基化甾体产物(表皮醇和HC)的过程特征。利用RSA研磨微细颗粒后, 提高了转化期间生成羟基甾体的活性, 同时抑制初始甾体底物的去乙酰化反应。但当增高底物RSA浓度到4 g/L时, 既加速了11 α -和11 β -羟基化过程, 又加速了甾体化合物解构化作用^[10-11]。

这两株工业菌种可以被认为是当代HC生产用的模式菌株, 显然丝状真菌的遗传鲁棒性强于原核微生物的细菌^[2]。前者具有高收得率(60%), 后者是我国独有的工业生产菌(AS 3.65), 长期(50年)用于对RSA“一步转化法”生产HS(收率45%), 副产物11 α -OH-RS(表皮醇, 25%), 作为中间体化学法产醋酸可的松等效率低下的“综合利用”。按照薯蓣皂素-双烯醇酮-RSA-HC半合成路线, 我国HC总收得率(19%)与国际水平(27%)相比, 收得率低8个百分点^[31]。即使近年国内采用植物甾醇 \rightarrow 4AD \rightarrow 17 α -OH-孕酮 \rightarrow RSA \rightarrow HC, 已经有了较大进展, 但如果仍然采用蓝色犁头霉AS 3.65发酵转化RSA的旧工艺, 将仍然落后于国外的新月弯孢霉生物转化工艺。实际上近年AS 3.65工业收率实际低于45%, 很不经济。目前国内HC产能已经达到100吨/年, 大部分外销, 少量国内使用。可见, 这两株菌就是当下国内外生物转化制HC具有较好工业微生物鲁棒性的经典菌种。

此外, 筛选具有C11 β -羟基化生物遗传鲁棒性菌种, 除了首次报道的刺孢小克银汉霉属(*Cunninghamella blakeslinna*) 35%产率外, 各国微生物学家相继对小克银汉霉属(*Cunninghamella*)的菌种进行了广泛筛选。苏联学者搜集了44株小克银汉霉菌株、6株弯孢霉属(*Curvularia*)菌株进行筛选。结果表明能够直接在RS引进C11 β -OH、活力较佳的菌株仍然是新月弯孢霉VKM F-644, 转化产物HC积累浓度高, 副产物14 α -OH-RS较少, 二者比例为3:1。筛选所用的全部44株小克银汉霉, 转化产物积累浓度最高的并非是C11 β -OH化产物HC, 反而是表皮醇(C11 α -OH-RS), 主产物反转, 表明至少这44株小克银汉霉菌株, 呈现出C11 β -OH化遗传性能鲁棒性退化或逆反的状态, 不适合工业开发用^[32]。其后, 他们对新月弯孢霉VKM F-644菌株菌丝生长和发酵活性在游离和固定化模式条件下进行了比较研究, 发现固定化条件下C11 β -OH化活性低于游离菌丝, 而副产物产生速率低于游离条件下的状况^[15]; 进而对该菌株11 β -羟基化的生理生化特征、羟基化酶的合成, 及底物RS对酶的诱导和转化特征等进行了较为详尽的研究^[13, 16]。

20世纪60年代初, 法幼华等对转化RS(A)成为HC、具有基本鲁棒性的148株菌进行定向筛选, 分别属于3属微生物菌株——小克银汉霉属、犁头霉属(*Absidia*)和弯孢霉属。结果表明97株小克银汉霉(*Cunninghamella*)均有转化RSA生成产物HC的能力, 但是转化活力较弱, 具有初步的C11 β -OH鲁棒性, 多数菌株呈现出转化产物HC较纯、副产物少的特点^[9]。对33株犁头霉的转化测试, 仅有73%的菌株具有转化活力, 多数犁头霉的转化产物以HC为主, 副产物为表皮醇, 其中优选出蓝色犁头霉菌AS 3.65, 开发成为工业生产HC的菌种, 收得率45%, 加上表皮醇(25%)可回收再利用, 总羟基化收率70%。对18株弯孢霉属的测试结果为多数菌株具有转化RSA成为HC产物的能力, 其中较为突出的一株是新月

弯孢霉AS 3.4381, 转化能力强, 产物HC收得率45%, 副产物主要是C14 α -OH-RS。故筛选得到的本土菌株蓝色犁头霉AS3.65, 自从20世纪70年代初投入工业应用, 建立起“一步转化法”工艺, 利用RSA发酵生产HC产品一直持续到今。发酵罐生产规模容量从5 m³起, 逐渐扩大到20 m³、30 m³, 直到50-60 m³, 菌株和工艺基本上没有任何改变。我国目前糖皮质激素HC产能世界第一(100吨/年), 大部分出口, 少量供临床药用。

近年Manosroi再度筛选出刺孢小克银汉霉ATCC 8688a、短刺小克银汉霉(*Cunninghamella echinulata*) F1307943等9株甾体C11 β -羟基化菌种。对其转化RSA产HC-Ac(醋酸氢化可的松)的性能进行测试, 结果表明在低底物浓度(0.15 g/L)下, C11 β -羟基化产物(HC-Ac)产率分别为85.6%和69.4%(24 h)。表明小克银汉霉属(*Cunninghamella*)的菌种具有易变或较弱C11 β -OH的鲁棒性, 但由于具有转化RSA时间短, 产物HC-Ac可作为中间体, 在传统的祛炎舒松合成中, 将3步工艺减少到一步完成, 具有一定降低成本、耗时少、对环境友好的特征。该研究的新意在于转化产物是C21-OAc, 即醋酸氢化可的松, 乙酰基未被酶法水解^[33]。但是当ATCC 8688a转化RSA底物浓度增加到1.0 g/L时, HC-Ac产率剧烈下降到30%的水平。如果考虑到工业应用, 则由于时间/体积效率低下, 工业经济效益不明显。尽管国内的蓝色犁头霉AS 3.65“一步法”发酵转化RSA生产HC, 各个企业一直存在添加RSA高和低底物浓度的“争议”, 不过一般均没有超过3 g/L水平。可见工业微生物甾体转化菌种选择以及工艺过程的经济性, 成为生物转化HC等产品综合考量的重要因素。

Sedlaczek等对新月弯孢霉转化RS生产HC的丝状真菌菌种IM28.1, 进行了细胞原生质体-NTG化学诱变处理; 又从原生质体细胞群体中, 选择出单核原生质体样本, 予以再生菌落; 分离筛选出直接转化RS成为HC的稳定型生物鲁棒性突变菌株; TLC分析表明, 该突变株显著降低14 α -OH-RS副产物量。作者使用该突变株新月弯孢霉CL366/302和亲本野生株, 分别在60 L发酵罐作了转化试验。加入底物RS 60 g进行转化, 分别收获HC精制达药典标准样品39.0 g和17.1 g, 突变株和野生株的收得率分别为65%和28.5%。这一制备比较实验表明, 转化RS生产HC的精制收得率可达65%。这也是迄今70年来, 半合成路线制HC报道的最高水平^[21]。由此可见, 迄今对于甾体C11 β -羟基化丝状真菌的定向选育, 仍然聚焦于高立体特异性高区域选择性工业微生物新月弯孢霉菌种的改良进化, 无论是新月弯孢霉AS 3.4381(= ATCC12017), 还是新月弯孢霉VKM F-644均如此。

波兰学者由新月弯孢霉IM2901亲株出发, 借助NTG诱变处理原生质体单核细胞, 获得相对高的突变频率, 筛选到所需求的突变株。选育得到的突变株CL102/3系列, 证明新月弯孢霉是遗传鲁棒性较好的HC生物制造菌。其中用突变株在60 L发酵罐转化RS的制备实验, 获得HC收得率65%的高水平; 在后续的3年期间, 未见该菌株的转化体系生产HC的能力有任何可检测到的变化。表明采用实验室进化手段, 改良菌种仍然有效。对常规的工业微生物菌种改良, 采用传统的理化诱变选育, 简单地对分生孢子和营养菌丝作诱变处理, 已经被证明是失败的操作。因为使用多核的丝状真菌细胞培养物, 在混合培养条件下, 绝对不适合筛选生物遗传鲁棒性优良的稳定性突变株。同样, 为了达到破坏样本DNA, 借助“挽救”修复手段, 就可能丢失有潜力的突变株, 从而难以筛选出所需要的

专一性生物催化活性菌株^[34]。

Dlugonski报道借助新月弯孢霉的原生质体诱变,结合酮康唑抗性平板选择的研究手段,进行了C11 β -羟基化RS生成HC的实验研究^[17]。结果表明稳定的突变株较之野生株具有更高的C11 β -羟基化活性;加之源于原生质体单核细胞NTG处理诱变选育获得的稳定突变体基本不存在14 α -OH-RS副产物,因此酮康唑作为细胞色素P450抑制剂的抗性选择平板,确实能够提高突变株耐受抑制剂的浓度,造成C11 β -羟基化酶合成调节基因突变,促成生物转化RS产HC产能提高。近年若干类似研究结果表明,真菌原生质体诱变可有效获得C11 β -羟基化菌种,高效率转化RSA及其衍生物生产HC及HC-乙酰化物,例如新月弯孢霉CL-114^[17]、新月弯孢霉KA-91^[35]和来自新月弯孢霉VKM F-644的稳定突变株M4, C11 β -羟基化产率分析数据近90%的高水平^[36]。

Kollerov等使用新月弯孢霉VKM F-644菌株,以C19-雄甾烷系列(4AD, ADD, 9 α -OH-AD)以及C21-孕甾烷系列(RS, RSA, C17, 21-二OAc-RS)作为底物,考察了该微生物羟基化的区域及立体专一性。结果表明对4AD、ADD和9 α -OH-AD的转化反应呈现多个位点羟基化的特点,以14 α -OH产物为主;对于RS(A)仍以C11 β -OH产物为主,重现了VKM F-644菌株生成HC高产率的特征(分别为60%和58%)^[13]。作者采用化学诱变剂NTG处理原生质体,用酮康唑抗性平板筛选,获得稳定突变株M4。以17 α ,21-双乙酰-RS为底物进行生物转化实验,引人注目的遗传鲁棒性在于1 g/L低底物浓度下转化, C11 β -羟基化产物产率可以高达90%;提高底物浓度到2 g/L, C11 β -羟基化产物产率剧烈下降到45%。应用该M4稳定突变株在实验发酵罐优化条件下,转化底物17 α ,21-双乙酰-RS,在底物浓度升高到2 g/L和3 g/L时, C11 β -OH-总产物(HC和17 α -OAc-HC产物)产率可分别高达85%和76%(其中分别含16%HC),对提高HC总产率有利;不过对于比例高达69%和60%的17 α -OAc-HC产物,须得一步化学法甲醇解制得到HC^[36]。早年德国先令公司采用将化合物S乙酰化得3 β ,17 α ,21-三乙酰酯-RS,经由细菌转化得17 α -OAc-RS,再利用新月弯孢霉转化得C11 β -羟基化RS-17 α -OAc产物,最后一步化学法甲醇解得到HC,产率也可高达70%,且14 α -OH副产物可降低到很低水平,归因于17 α -OAc-RS的立体阻碍阻止14 α -OH副产物的生成^[6]。

国内王敏等利用从天然源采样|分离鉴定筛选的新月弯孢霉CL-114菌株作为出发菌株,借助原生质体的UV-诱变,得到酮康唑抗性平板选育突变株KA-91,对RSA转化生成HC的收得率34.2%;采用这种方式获得具有C11 β -羟基化能力的野生型菌株,具有天然遗传鲁棒性,即遗传背景单纯,对诱变剂敏感,成为基因组学分子改造的优良素材^[35]。

鉴于国内制药企业生产HC长期低效率的现实情况,曾本秀等也开展了提高甾体微生物C11 β -羟基化的酶活性研究:利用工业生产菌蓝色犁头霉AS3.65进行UV-诱变筛选得突变株UV-84;通过细胞稀释,添加硫酸镁、青霉素、Tween-80等,在优化的条件下,作了5 L发酵罐转化RSA的对比试验,HC产率提高分别为12.1%、13.4%^[37]。与之相对应,苏联学者早在20世纪70年代,就已经对采用*Tieghemella orchidis*(*Absidia orchidis*,与我国工业生产菌同物异名的蓝色犁头霉AS3.65),在300 L发酵罐装量110 L发酵液体培养物,转化55 g RSA(底物浓度0.5 g/L)的研究。主要数据如下:主产物HC产率55-60%,表皮醇25%,二者总羟基化(11C β -

OH+C11 α -OH)产率达到82.5%。结果获得达到药典标准的HC产品收得率49.5%,副产物表皮醇经由化学合成得醋酸可的松,收率13.6%。两种产品总收率计为63.1%^[9]。该工作做得完整,但是太低的底物浓度,导致工业经济性差。总之,我国的HC发酵生产,无论从菌种到工艺,基本上雷同于苏联同工的研发模式,即采用“一步转化法”:事先将RSA热回流溶解在80%乙醇中,将丝状真菌蓝色犁头霉AS 3.65液体深沉培养到一定阶段后,按照既定程序,添加底物到液体发酵培养反应混合物中(乙醇量3.8%, V/V)进行生物转化, RSA底物浓度可达2.5 g/L或更高, HC收得率45%,副产表皮醇25%。显然,我国HC产出水平一直低下,至于该转化过程中丝状真菌菌丝体吸附RSA,以及“破坏酶”对HC产物的解构降解等相关内容,作者已发表综述^[12]。

国内也曾经数次多点引进国外发酵生产HC高水平(60%,底物RS)菌种,即新月弯孢霉AS 3.4381(ATCC12017/NRRL2380)。数十年来“攻关”未果,均未能达到国际先进水平。自从1953年辉瑞公司报道用新月弯孢霉工业生产HC以来,经过对该菌种和转化工艺条件不断改进优化,现在对底物RS转化率已达90%, HC产品收得率稳定在55%-60%范围。该菌株突出的优势是副产物少,转化率高,产物易分离。经过作者团队近年努力,采用两阶段培养-转化工艺分开进行,废弃“一步转化法”工艺,通过采用活性菌丝缓冲液介质,发酵罐转化底物, HC收得率已经接近60%的水平(表2)。对这种新月弯孢霉生物制造HC“橘生淮南则为橘,橘生淮北则

表2 新月弯孢霉AS 3.4381菌丝-缓冲液介质转化Reichstein's化合物S克量制备氢化可的松

Table 2 Results of preparative experiments on the level of gramme amounts for the biotransformation of Reichstein's compound S into hydrocortisone in the mycelia & buffer media of *Curvularia lunata* AS 3.4381

批次 Batch number	实验发酵罐型及 转化方式 Type of fermenter and bioconversion media	氢化可的松 收得率 HC net yield (r/%)	菌名 Organism
1-1	A	44.7	<i>Absidia coerulea</i> AS 3.65
1-2	B	61.9	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
2	B	59.3	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
3	C	57.6	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
4	C	56.0	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
5	C	55.5	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
6	D	57.8	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
7	E	58.8	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
8	F	56.4	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
9	G	61.0	<i>C. lunata</i> AS 3.4381
统计分析 Statistical analysis	AV = 58.25, SD=2.21, N = 9		

A: 2 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系转化RSA; B: 2 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系批式转化RS; C: 2 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系双轮序列转化RS; D: 2 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系批式转化RS-b-CD; E: 10 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系双轮序列转化RS; F: 10 L玻璃罐, 菌丝缓冲液介质体系批式转化RS; G: 5 L玻璃自控罐, 菌丝缓冲液介质体系批式转化RS。

A: 2 L glass fermenter, with bioconversion of RSA in a buffer media with mycelia; B: 2 L glass fermenter, with bioconversion of RS in a buffer media with mycelia in batch; C: 2 L glass fermenter, with two-run sequence bioconversion of RS in a buffer media with mycelia; D: 2 L glass fermenter, with bioconversion of RS- β -CD in a buffer media with mycelia in batch; E: 10 L glass fermenter, with two-run sequence bioconversion of RS in a buffer media with mycelia; F: 10 L glass fermenter, with bioconversion of RS in a buffer media with mycelia in batch; G: 5 L auto-control glass fermenter, with bioconversion of RS in a buffer media with mycelia in batch.

为积”的生物鲁棒性(不确定性?)的确值得深入研究. 究竟是遗传鲁棒性, 或还是“环境”鲁棒性起决定作用, 尚未有较好确切答案. 由此可见, 解析工业微生物鲁棒性状和适配性的遗传调控规律, 是建立高性能工业微生物菌株转化, 以满足现代菌株药业生物制造, 发展现代菌株药物产业需求的基础.

2 工业菌株微生物环境鲁棒性与氢化可的松发酵转化的C11 β 羟基化

工业微生物的鲁棒性状体现在能够应对复杂多样的恶劣工业环境条件, 并且具有与正常环境可比拟的生产性能与使用性能. 这一论题以Sukhoolskaya等借助新月弯孢霉VKM F-644活性菌株对菌株底物RS(A)的C11 β -羟基化酶的合成和转化环境条件研究结果^[6, 13, 15-16]予以论述.

通常丝状真菌菌株羟基化酶是以由微粒体定位的单加氧酶形式存在. 细胞色素P450终端氧化酶结合底物, 并经由黄素蛋白NADP(H)-P450-还原酶, 由还原性辅酶提供电子转移到细胞色素P450, 完成如下式的C21菌株RS的C11 β -羟基化:



式中, S为底物; P为产物; E为酶; ES为酶与底物形成的中间复合物.

鉴于低等真核生物, 如此处的丝状真菌, 已经用体内实验证明其羟基化酶具有宽泛的底物专一性^[17], 由此表明在HC生物转化的酶学水平完成C11 β -羟基化, 因为“宽泛的底物专一性”导致“不确定性”的生物鲁棒性存在. 但是为了追求工业微生物环境鲁棒性, 实现HC的C11 β -羟基化工艺的鲁棒性, 即指系统对外界环境, 或系统本身的改变所保持状态稳定能力的特性, 认为:

(1) 新月弯孢霉VKM F-644菌株合成羟基化酶具有可诱导的特点, 诱导剂就是RS; 在诱导剂存在的生长培养基中, 菌株细胞可以活跃地合成羟基化酶, 而在“饥饿”介质体系内(缺乏外源性营养)没有放线菌酮(酶蛋白合成抑制剂)存在, 也能够转化RS生成HC(产率50%); 在培养转化介质体系存在有放线菌酮(阻碍80S核蛋白体上形成肽键)条件下, 在对RS的24 h转化期间也能够积累HC产物(产率25%), 这就充分证明新月弯孢霉VKM F-644菌株的C11 β -菌株羟基化酶的诱导蛋白性质.

(2) 该菌株在液体培养生长条件下, 在对数生长期末、静止期初, 收获洗涤菌株作为生物催化剂具有最高的发酵转化活力.

(3) 新月弯孢霉VKM F-644活性菌株序列3轮转化RS(底物浓度2 g/L)产生HC试验, 首轮转化24 h积累HC产率40%; 第2轮转化产出HC产率15%; 第3轮转化催化活性降低, HC产物量少, 表明该新月弯孢霉C11 β 羟基化酶的不稳定性.

(4) RS(2 g/L)转化过程考察: 活性真菌菌株转化30 min后, 在菌株反应混合物的液相谱图中, 底物量少(2.5%-5.0%), 大部分底物被菌株所吸附, 而在其后的48 h转化期间, 主要的转化产物HC逐渐在液相累积, 达到50%-60%, 同时菌株体内含有22.4%的HC产物, 及少量底物RS(该部分菌株物质可利用0.05 mol/L、pH 6.0的KH₂PO₄-NaOH缓冲液淘析回收). 由此测定转化羟基化产物总产率为72%-82.4%, 副产物是C14 α -OH-RS(10%-15%).

(5) 转化过程持续到72 h, 产物HC浓度降低, 当底物浓度利用完毕时, 所积累的主要产物HC被快速降解, 出现“菌株破坏酶”解构HC, 代谢为二氧化碳和水.

(7) 转化体系以底物RS添加浓度在4-10 g/L范围, 转化产物HC产率顺次降低, 转化时间顺次延长, RS在10 g/L, 190 h完成转化, HC产物产率仅有35%(液相5%, 30%留存在菌株体内). 该转化过程就是菌株化合物被菌株吸附-催化转化-解吸附的生物催化作用过程.

(8) 新月弯孢霉VKM F-644菌株菌株分别转化底物RS和RSA, 其C11 β -菌株羟基化酶比活性分别为21 $\mu\text{m g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 和7.1 $\mu\text{m g}^{-1} \text{h}^{-1}$. 显然以RS作为底物的转化反应速度较之RSA快得多^[13], 可见选择RS作为转化底物生产HC是合理的.

新月弯孢霉对底物RSA存在C21乙酰基团的水解活力, 较之蓝色犁头霉AS 3.65弱得多. RS极性高于RSA, 有利于与活性菌株“触发”酶促反应, 提高转化产物HC的产率, 工业发酵装置的时间/体积效率也得以改进, 工程上对缩短生产周期节能降耗有利.

纵观我国数十年来, 一直采用薯蓣皂素-双烯-RSA半合成法, 经由蓝色犁头霉菌AS3.65的“一步转化法”生产HC. 业界片面强调对RSA的生物水解活性高, 易于完成RSA \rightarrow RS \rightarrow HC的转化过程. 但产出HC的绝对质量收得率仅有45%, 加上回收的副产物表皮固醇(C11 α -OH-RS, 25%), 利用化学法再加工成为醋酸可的松、强的松等低档糖皮质激素产品, 与国外同业HC生产水平(60%)相比, 工业经济性水平低下是不争的事实. 这与新世纪医药化工制造产业的绿色工艺, 即提高资源利用率, 降低单耗, 环保节能的目标相距甚远.

鉴于此, 作者依据国内外近70年半合成的化学-生物结合的技术途径, 分析研发生产重要的基础糖皮质激素HC产品历程, 积累了大量数据资料, 特别是生物转化部分, 包括菌种选育、生物转化工艺及生物加工过程的生物鲁棒性, 都值得进一步深入研究. 作者团队选定工业应用的新月弯孢霉AS 3.4381、ATCC 12017和国内的蓝色犁头霉AS 3.65, 以RS(A)为底物, 进行了生物转化引入C11 β -羟基化产生HC产物的生物鲁棒性相关比较实验研究(表2).

基于对菌株转化微生物的众多文献综合分析, 采用微生物生长培养和生物转化分两阶段进行的方案, 遵循下列5点操作原则:

(1) 将微生物营养生长和生物催化剂转化阶段分开进行, 以有利于去除生长阶段可能导致对底物和/或产物有害的影响因素; (2) 能够直观地选择优化状态的丝状真菌细胞物质, 对应于转化介质(酶活/酶量)合适的转化反应速率, 因为微生物生长培养阶段菌株细胞物质密度是不变常量; (3) 无需无菌操作条件, 因为缺乏微生物生长的营养条件; (4) 方便后处理操作, 从简单的纯水或缓冲液反应混合物介质分离回收转化产物, 较从“一步转化法”发酵转化复杂反应混合物体系的产物分离操作容易得多; (5) 对发酵-转化参数的优化调节, 比如pH、通气量、温度等可以在没有微生物生长, 或影响微生物生长的操作条件下进行^[38].

如前所述, 菌株化合物羟基化酶是以细胞色素P450氧化酶和黄素蛋白, 从还原性辅酶到P450转移电子而起作用. 真菌羟基化酶主要是由底物诱导性. 此处的两株丝状真菌属于低等真核微生物, 已经有实验证明菌株羟基化酶对菌株底物存在宽泛的底物专一性. 从工业发酵转化RS或RSA生产HC产品

而言,生物催化本质是追求专一性地在质和量上对底物实现C11 β -甾体羟基化的生物鲁棒性,即生物转化系统的鲁棒稳定性和C11 β -羟基化的品质鲁棒性.糖皮质激素HC分子结构C11 β -羟基的存在,是该药物起抗炎功能活性的关键所在^[6].

依据上述长期文献调查分析,作者所在团队近年采用两株工业微生物丝状真菌转化RS制备HC产物,从环境鲁棒性角度,较为完整地再现了国外工业生产重要的糖皮质激素HC产品所达到的较高水平,即新月弯孢霉AS 3.4381羟基化转化率高于80%,HC收得率55%-60%.反观国内长期低水平的现实,蓝色犁头霉转化率70%,HC收得率低于45%(表2),表明我国HC产业部门很有必要进行菌种及生物转化工艺的变革,将糖皮质激素产业提高到新水平.

对作者实验室和国内同工研究的8个实施案例开展讨论如下:

(1) 直接从中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)购买蓝色犁头霉AS3.65和新月弯孢霉ATCC 12017为出发供试菌株.收到冻干菌种管后,首先进行摇瓶活化培养,平板分离;转接斜面200支,生长培养好后,冰箱保存备用.然后对这200株斜面菌种,采用二级发酵生物转化的程序,进行摇瓶的初筛和复筛实验.选出蓝色犁头霉AS 3.65的菌株L3和新月弯孢霉AS 3.4381的菌株S17两株优势菌株,在2 L玻璃罐各自进行菌丝缓冲液介质体系转化RSA,以及RS的批式转化制HC的比较试验^[37].结果见表2的批号1和2,再现了长期以来国内外工业应用2株菌种,前者在发酵转化RSA制HC收得率接近45%,以及后者转化RS制HC收得率60%的水平.可见这2株工业微生物丝状真菌,在分别转化底物RSA和RS时,HC收得率为44.7%和61.9%^[25],表明该2株菌转化积累HC产物较为强劲的生物鲁棒性.

(2) 新月弯孢霉AS 3.4381菌丝在2 L和10 L-玻璃罐的缓冲液介质体系实现双轮序列转化RS制HC^[23].收获II级培养16-18 h的菌丝作为生物催化剂,在2 L玻璃发酵罐作了3批次以及10 L玻璃发酵罐1次,共计4次的双轮序列转化RS制备HC实验.每轮转化反应RS底物浓度2 g/L;结合菌丝回收,转化产物和回收甾体物质粗品收率90%-95%,精制样品HC收得率在2 L发酵罐分别为55.0%、56.0%和57.6%;在10 L发酵罐为58.8%.结果再次表明该活性菌丝在优化的RS底物浓度水平2 g/L,双轮序列缓冲液生物转化体系,是有效的转化方式.过程分析表明对底物实现C11 β -OH反应为主,避开或减少了可能的副反应C14 α -OH等,且将作为生物催化剂的活菌丝利用效率成倍提高,相比较于“一步转化法”优势显著,有利于提高工业经济性^[26].

(3) *b*-环糊精(*b*-CD)、甲基*b*-环糊精(*Mb*-CD)一直在甾体微生物转化中得到应用.它与甾体底物形成的包结物,有利于增高甾体物质的溶解度,从而提高转化效率.易奎星等报道了*b*-CD包合技术在微生物转化生产HC中的应用.采用新月弯孢霉AS 4381为实验菌,经由两级发酵培养后,收获II级生长培养18 h的活菌丝,放置于溶有RS-*b*-CD包合物的磷酸缓冲液介质体系,生物转化制备HC.结果表明该方法将底物浓度由2 g/L提高到3 g/L,2 L玻璃发酵罐制备实验收得率57.8%^[24].

早期,Chincholkar等报道新月弯孢霉VKMF-644的菌丝体存在*b*-CD转化RS的C11 β -OH反应特征.在RS与*b*-CD比率为1.0:0.1到1.0:1.0形成复合物条件下,增加了反应速率,同时减低了菌丝对底物和产物的吸附作用;在RS-*b*-CD包合物比

率为1.0:0.6,底物浓度4 g/L,HC产率为70%-75%;无*b*-CD存在时,仅为40%-45%.该菌丝被固定在海藻酸钙凝胶,没有观察到对工艺过程的刺激效应^[27].

近年也报道了使用新月弯孢霉菌丝体,利用*Mb*-CD包合技术,进行转化RS-*Mb*-CD的C11 β -甾体羟基化研究.结果表明*Mb*-CD作为甾体底物增溶的高效性,有助于基础糖皮质激素HC的高效生产.当其引入C11 β -羟基于底物浓度RS-*Mb*-CD复合物(优化比率1:1, mol/mol)小于20 g/L,在48 h转化期间,尚未见到甾体产物HC的去结构化,且未发现*C.lunata*菌丝体内吸附有甾体产物.有利于直接从发酵液水相提取HC产物,结晶收率均在55.0%-58.0%的高水平,生产效率较常规提高数倍^[20].由此可见,*b*-CD及其衍生物*Mb*-CD能够同甾体化合物形成镶嵌复合物,有效地提高甾体发酵底物的溶解度,加快底物向新月弯孢霉菌丝细胞转移的过程,从而显著加速微生物转化过程,有效地提高HC的生产效能.这一案例充分说明工业甾体微生物所处外在环境的生物鲁棒性.

(4) 新月弯孢霉AS 3.4381菌丝在5 L-玻璃发酵罐的缓冲液介质体系,批式转化RS制HC,收得率61.0%^[22].这一转化案例提供了一种简易可行的物理观察指标,观察II级生长培养物在5 L玻璃罐中颜色变化过程,即从液体种子培养物转入玻璃发酵罐的前5 h,液体培养物颜色是黄色,然后逐渐从黄色变浅,成为灰白色;再逐渐变成为浅绿,到了16-18 h期间,液体培养物成为墨绿色,此时就是收获液体培养物高活性菌丝体的最佳时机;适时转入缓冲液介质体系批式转化RS,导致较高浓度积累HC产物,同时副反应C14 α -OH产物也降低到较低水平;其后,菌丝体变成为黑色,继续搅拌转化^[22, 26].同期,Yaderets等也报道了关于新月弯孢霉菌丝体甾体羟基化活性研究涉及的黑色素问题.收获对数生长期末的菌丝,置于底物RS浓度4-6 g/L的微晶状态的磷酸缓冲液介质体系转化,呈现出了最大的C11-羟基化酶活性,真菌生长晚期则是呈现升高C14-羟基化活性.作者对底物不同的添加方式、菌丝龄和菌丝浓度以及重金属盐(0.35%-0.5%)的耐受性进行了研究,目的是为了去除副反应导致的14 α -OH副产物.伴随着RS的转化进程,真菌营养生长菌丝耐受Co²⁺和Cu²⁺出现羟化活性减弱,或全缺失,同时黑色素的量升高.该黑色素的生物合成在这些不利条件下得以强化,结果提示新月弯孢霉的转化作用就是一个对外生化合物的“解毒”过程;这也许是新月弯孢霉菌丝体黑色素形成在“饥饿介质”体系,而不是生长培养基中,强化了C11 β 羟基化酶诱导生成的诱因^[39].

(5) 新月弯孢霉AS 3.4381对新型甾体底物C11*b*-羟基化.利美索龙(Rimexolone),又名瑞美松龙,是一类新型甾体眼科糖皮质激素药物,具有较强的抗炎抗过敏功能.用化学方法合成前体化合物16,17-二甲基-17-(1-氧丙基)雄甾-1,4-二烯-3-酮后,若想在甾体化合物的C11 β -位用化学法引入羟基,是十分困难的.但是在这关键合成步骤,作者采用新月弯孢霉AS 3.4381的II级发酵工艺,适时收获新月弯孢霉菌丝体作为生物催化剂,在磷酸缓冲液介质体系中,对前述新甾体化合物的C11 β -位实现了羟基化.结果表明,甾体生物转化产物经由TLC、MS、IR以及¹HNMR谱学数据测试,与利美索龙(Rimexolone)完全一致,达到预期目标^[19].

(6) 蓝色犁头霉AS3.65和新月弯孢霉AS 3.4381双菌组合协同转化RSA制HC新工艺^[29].在摇瓶培养条件下,分别应用蓝色犁头霉AS3.65和新月弯孢霉AS3.4381的II级培养活性菌丝体,构建起协同多轮批式生物转化技术体系,较传统的单

一批式转化(“一步转化法”)不仅有效抑制副产物的产生,而且省去从RSA到RS的化学法水解步骤.已经建立起来的双菌组合协同转化工艺,已被充分证明实现对甾体底物RSA引入C11 β -OH的生物鲁棒性,即RSA \rightarrow RS \rightarrow HC生物加工过程质和量的鲁棒性.该转化体系对RSA的C11 β -羟基化产率达80%.

在摇瓶双菌组合协同转化RSA实验研究基础上,进行了5 L玻璃发酵罐克量制备HC实验.结果表明借助Tween-80/丙三醇溶剂体系助溶底物,初始添加底物RSA质量浓度3 g/L,该双菌组合协同生物转化缓冲液介质体系,实现3批次克量制备试验,产物HC收得率达52%.试验结果重现性好,工艺操作稳定,具有工业微生物鲁棒性特征^[28, 30].

(7)新月弯孢霉AS3.4381活性菌丝体直接转化RSA制备HC^[28].通常报道新月弯孢霉生物转化底物是RS,而不是RSA.其原因在于该菌株对RSA酶法水解能力较本土菌株蓝色犁头霉AS3.65弱,为证实新月弯孢霉AS3.4381可以直接转化RSA,直接引入C11 β -OH,生成HC产物,作者实验室经由新月弯孢霉AS3.4381菌株的定向诱导富集筛选,选择出合适菌株,经由II级发酵培养后,制得活性菌丝体,借助底物RSA助溶底物的Tween-80/丙三醇的磷酸缓冲液转化系统,在5 L玻璃发酵罐进行了3批次的直接转化RSA的克量制备试验.产物HC收得率分别为52.1%、52.5%和55.2%^[28].可见,该新工艺具有工业开发价值,较国内传统的工业菌种蓝色犁头霉AS3.65的“一步转化法”转化RSA产出HC仅有45%的收得率高8%以上.这一案例表明,应用筛选出来的具有一定鲁棒性的新月弯孢霉菌株可水解RSA能力,并且可以在该活性菌丝助溶底物的Tween-80/丙三醇的磷酸缓冲液介质体系,顺利完成转化RSA \rightarrow RS \rightarrow HC的反应进程,这是否与甾体底物C21-乙酰化,导致甾体底物的可控性水解释放,降低副产物C14 α -OH的产生有关,值得深入研究.

(8)黄淑惠等使用新月弯孢霉AS3.4381菌株也同样实现了对法幼华报道的C11 β -OH的引入.该转化产物是16 α -甲基氢化可的松,收得率还高达55.5%;其经由磺酯化脱酯一步反应即可C环-9(11)不饱和化,且收率比较C11 α -羟基衍生物高,这对进一步合成地塞米松有利;可见底物的化学结构修饰对甾体羟基化过程影响显著,具有生物转化底物外在环境鲁棒性的特点^[18].

3 微生物转化甾体C11 β -羟基化鲁棒性能力比较

过去数十年来,围绕甾体微生物转化,实现以RS及结构类似物作为底物,有效地引入C11 β -功能基羟基,技术经济可行地工业制造HC等产品,从生物鲁棒性观点评估,主要聚集在丝状真菌(表3).可见,较优者是属于弯孢霉属的新月弯孢霉;其次是蓝色犁头霉,较弱的C11 β -羟基化能力,C11 α -OH(表皮醇)产物比例也高;小克银汉霉属的数个菌种也具有基本的C11 β -羟基化能力,且C11 β -羟基化产物较纯,但是转化力较弱,其立体及区域选择性具有飘忽不定的特征.

4 结论

新月弯孢霉AS3.4381和蓝色犁头霉AS3.65是国内外过去数十年来,甾体工业微生物经由半合成路线,生物转化RS或RSA直接引入C11 β -羟基,生产基础糖皮质激素HC产品的菌种,量产超百吨级水平.可见这2株丝状真菌具有工业微生物典型的生物鲁棒性.

这2株菌属于低等丝状真菌,具有宽泛的底物专一性;但是采用定向筛选,却能够选择出具有适应工业甾体微生物遗传稳定性,以及适应环境条件改变的高度生物鲁棒性菌株.基于文献调查分析,设计出将微生物生长培养和生物转化阶段分开进行的工艺过程.结果再现了国内蓝色犁头霉AS3.65菌丝缓冲液转化RSA,产HC克量制备收得率45%水平,同时采用新月弯孢霉AS3.4381菌丝缓冲液转化RS,产HC的收得率达60%的结果.

在此批次转化RS制HC实验研究基础上,基于对该新月弯孢霉菌丝体C11 β -羟基化酶系在“饥饿培养”条件下可诱导的特点,在实验发酵罐上实施了菌丝缓冲液介质体系5次批次,4次双轮序列(菌丝复用)转化RS,共计9批克量制备HC样品,获得均值58.25%,标准差2.21(N=9)的统计分析结果.

此外,基于2株丝状真菌C11 β -OH转化RS(A)生成HC生物鲁棒性特征,尝试进行双菌菌丝组合协同转化RSA生成HC,获得52%的高收得率(国内45%);还借助工业微生物定向筛选,获得可酶法水解RSA的新月弯孢霉AS3.4381菌株,实现在菌丝磷酸缓冲液介质中直接转化RSA成为HC产物,制

表3 真菌微生物转化甾体C11 β -羟基化鲁棒性能力比较

Table 3 Comparative capacity of microbial C11 β -hydroxylation of steroid by fungi for biological robustness

菌名 Organism	甾体底物名称 Steroid substrate	C11 β -OH产物和产率 Products and yield (r/%)	副产物 By-products C11 α -OH/C14 α -OH	文献 Reference	
<i>Curvularia lunata</i> CL102/3	RS	HC	65.0	极少量副产物 Minima	[21]
<i>C. lunata</i> AS 3.4381	RS	HC	61.9	少量副产物 Trace	[25]
<i>C. lunata</i> AS 3.4381	RS	HC	61.0	少量副产物 Trace	[26]
<i>C. lunata</i> AS 3.4381	Substrate I *	Rimexolone	40.0		[19]
<i>C. lunata</i> AS 3.4381	16 α -methyl-RSA	16 α -methyl-HC	55.5	少量副产物 Trace	[18]
<i>C. lunata</i> VKPM F-988	RS	HC	55-65 ^a	少量副产物 Trace	[28]
<i>C. lunata</i> VKM F-644	RS, RSA	HC	58-60 ^a	少量副产物 Trace	[13]
<i>C. lunata</i> VKM F-644 (M4)	17, 21-Ac-RS	HC+17Ac-HC	90.0 ^a	少量副产物 Trace	[17]
<i>Tieghemella orchidis</i>	RSA	HC	49.5	表皮质醇 Epicortisol (30%)	[11]
<i>Absidia coerulea</i> AS 3.65	RSA	HC	45.0	表皮质醇 Epicortisol (25%)	[9]
<i>Cunninghamella blakesleena</i>	RS	HC	35.0	不详 Unknown	[7]
<i>C. blakesleena</i> ATCC 8688a	RSA	HC-21Ac	85.6	不详 Unknown	[33]
<i>Cunninghamella echinulata</i> F 1307943	RSA	HC-21Ac	69.4	不详 Unknown	[33]
<i>Cunninghamella</i>	RSA	HC	少量 Trace	表皮醇为优势产物 Epicortisol (mainly)	[32]

* 16, 17-二甲基-17-(1-氧丙基)雄甾-1,4-二烯-3-酮;^a 分析数据.

* 16, 17-dimethyl-17-(1-oxopropyl) androsta-1,4-dien-3-one; * analytical data.

备实验获得53%的高收得率, 较之国内长期工业用蓝色犁头霉AS 3.65产HC工业收率高8%。

前述工作和分析表明, 合理采用具有工业微生物菌株转

化经典生物鲁棒性菌种的定向筛选, 借助优化的两阶段工艺操作, 可以实现HC工业生产高效低耗, 对环境友好的生物制造目标。

参考文献 [References]

- 1 朱炳, 包家立, 应磊. 生物鲁棒性的研究进展[J]. 生物物理学报, 2007, **23** (5): 357-362 [Zhu B, Bao JL, Ying L. Progress of biological robustness [J]. *Acta Biophys Sin*, 2007, **23** (5): 357-362]
- 2 刘夺, 张莹, 周晓, 元英进. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望[J]. 生命科学, 2013, **25** (10): 958-965 [Liu D, Zhang Y, Zhou X, Yuan YJ. Research prospects of synthetic biotechnology in steroid hormone intermediate production. *Chin Bull Life Sci*, 2013, **25** (10): 958-965]
- 3 Chakrabarty S, Wang Y, Perkins JC, Narayan ARH. Scalable biocatalytic C-H oxyfunctionalization reactions [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, **49** (22): 8137-8155
- 4 杨冰. 糖皮质激素D环结构改造研究[D]. 成都: 四川大学, 2006 [Yang B. Research about modified on D-ring of glucocorticoids [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006]
- 5 Karl PZ, Klaus AN, Henry LR. Process for the preparation of 11 beta hydroxyl steroids: Germany, DE3063875 [P]. 1980-06-21
- 6 Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **94** (6): 1423-1447
- 7 Hogg JA. Steroids, steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation [J]. *Steroids*, 1992, **57** (12): 593-616
- 8 王敏. 新月弯孢霉的甾体11 β -羟基化作用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2002 [Wang M. Study on the 11 β -hydroxylation with *Curvularia lunata* [D]. Tianjin: Tianjin Institute of Light Industry, 2002]
- 9 法幼华. 甾体化合物的微生物转化与合成[M]. 北京: 科学出版社, 1988 [Fa YH. Microbiological transformations and syntheses of the Steroids [M]. Beijing: Science Press, 1988]
- 10 Modilnitsky GM, koshcheyenko KA. Transformation of 21-acetate of the S Reichstein substance by the fungus *Tiechemella orchidis* upon the use of a fine ground substrate [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1973, **9** (3): 380-384
- 11 Modilnitsky GM, Krasnova GA, Skrabin QK. Transformation of 21-acetate of the S Reichstein substance into hydrocortisone and cortisone acetate by means of the fungus *Tiechemella orchidis* [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1973, **9** (2): 240-245
- 12 杨顺楷, 易奎星, 杨亚力, 张天智. 甾体微生物转化C11 β -羟基化的研究进展[J]. 生物加工过程, 2006, **4** (2): 7-14 [Yang SK, Yi KX, Yang YL, Zhang TZ. Progress of Study on C11 β -hydroxylation of steroid by microbial transformation [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2006, **4** (2): 7-14]
- 13 Sukhodolskaya GV, Angilova BA, Koshchenko KA. Physiological and biochemical peculiarities of 11 β -hydroxylation of steroid substrates [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1986, **22** (2): 226-237
- 14 杨顺楷, 曾本秀, 章壮游. 高效液相色谱法分析白僵菌培养物中甾体化合物的研究[J]. 色谱, 1988, **6** (4): 217-220 [Yang SK, Zeng BX, Zhang ZY. Determination of steroid compounds in fungi extracts by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 1988, **6** (4): 217-220]
- 15 Angilova BA, Sukhodolskaya GV, Koshchenko KA. Comparative study of growth and fermentative activity patterns of free and immobilized *Curvularia lunata* VKM F-644 mycelium [J]. *Mikrobiol*, 1986, **55** (5): 753-761
- 16 Sukhodolskaya GV, Angilova BA, Koshchenko KA, Skryabin GK. Synthesis of steroid-11 β -hydroxylase and peculiarities of the transformation of crystalline reichstein's substrate S by free and immobilized mycelium of *Curvularia lunata* VKM F-644 mycelium [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1991, **27** (5): 701-710
- 17 Kellerev VV, Shutov AA, Fokina AA, Sukhodol'skaya GV, Gulevskaya SA, Donova MV. Bioconversion of C19- and C21-steroids with parent and mutant strains of *Curvularia lunata* [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2010, **46** (2): 198-205
- 18 黄淑惠, 徐诗伟, 法幼华. 用新月弯孢霉11 β -羟基化16 α -甲基化合物RS-21醋酸酯[J]. 微生物学报, 1989, **29** (1): 68-71 [Huang SH, Xu SW, Fa YH. 11 β -hydroxylation of 16 α -methyl-Reichstein's compound S 21-acetate by *Curvularia lunata* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 1989, **29** (1): 68-71]
- 19 张天智, 杨炯, 杨顺楷, 杨亚力, 肖勇. 新月弯孢霉AS 3.4381对新型甾体底物C11 β -羟基化[J]. 生物加工过程, 2006, **4** (3): 22-27 [Zhang TZ, Yang J, Yang SK, Yang YL, Xiao Y. Study on the biotransformation of a new steroid substrate into C11 β -hydroxylated product by *Curvularia lunata* AS 3. 4381 [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2006, **4** (3): 22-27]
- 20 Andrushina VA, Druzhinina AV, Yaderets VV. Hydroxylation of steroids by *Curvularia lunata* mycelium in the presence of methyl-beta-cyclodextrine [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2011, **47** (1): 42-48
- 21 Wilmanska D, Milczarek K, Rumijowska A, Bartnicka K, Sedlaczek L. Elimination of by-products in 11 beta-hydroxylation of substance S using *Curvularia lunata* clones regenerated from NTG-treated protoplasts [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **37** (5): 626-630
- 22 中国科学院成都生物所, 成都地奥制药集团有限公司. 薯蓣甾体激素药物合成中的微生物转化研究[M]. 北京: 科学出版社, 2006 [Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, and Chengdu Diao Pharmaceutical Group Ltd. [M]. Beijing: Science Press, 2006]
- 23 易奎星, 杨亚力, 杨顺楷. 静息细胞连续两批次生物催化生产氢化可的松[J]. 生物加工过程, 2005, **3** (4): 40-44 [Yi KX, Yang YL, Yang SK. Bioconversion of compound S into hydrocortisone using a novel process of two-run sequence bioconversion by the mycelium of *Curvularia lunata* AS 3. 4381 [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2005, **3** (4): 40-44]
- 24 易奎星, 杨亚力, 杨顺楷. β -环糊精包合技术在微生物转化生产氢化可的松中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2006, **37** (5): 311-314 [Yi KX, Yang YL, Yang SK. Application β -cyclodextrin inclusion technique in the biotransformation of hydrocortisone [J]. *Chin J Pharm*, 2006, **37** (5): 311-314]
- 25 杨顺楷, 肖勇, 赖涛. 微生物甾体转化生产氢化可的松加工过程研究的新进展[EB/OL]. 中国科技网通讯, 2003 [Yang SK, Xiao Y, Lai T. Advances in the process of hydrocortisone production by

- microbial steroids transformation [EB/OL]. China Science and Technology Network, 2003]
- 26 易奎星. 新月弯孢霉生物转化生产氢化可的松新工艺的研究[D]. 成都: 四川大学, 2006 [Yi KX. The study of hydrocortisone fermentation by *Curvularia lunata* [D]. Chengdu: Sichuan University, 2006]
- 27 Chincholkar SB, Sukhodolskaya GV, Baklashova TG. Peculiarities of the 11β -hydroxylation of steroid compounds by the mycelium of *Curvularia lunata* VKM F-644 in the presence of β -cyclodextrin [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1992, **28** (5): 685-693
- 28 范林萍. 双菌转化RSA制氢化可的松新工艺的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2010 [Fan LP. Study of hydrocortisone from RSA by a cooperative-mycelia system of twin strain of *Absidia coerulea* AS 3. 65 and *Curvularia lunata* AS 3. 4381 [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010]
- 29 范林萍, 杨顺楷, 吴中柳, 杨亚力, 李小刚. 双菌多轮序列协同转化甾体制氢化可的松[J]. 生物加工过程, 2009, **7** (6): 16-20 [Fan LP, Yang SK, Wu ZL, Yang YL, Li XG. A novel process of multi-run sequence bioconversion of RSA for production of hydrocortisone with *Absidia coerulea* AS 3. 65 and *Curvularia lunata* AS 3. 4381 [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2009, **7** (6): 16-20]
- 30 范林萍, 杨顺楷, 吴中柳, 杨亚力, 李小刚. 改进底物添加体系制备氢化可的松[J]. 生物加工过程, 2010, **8** (6): 15-21 [Fan LP, Yang SK, Wu ZL, Yang YL, Li XG. Biotransformation RSA to hydrocortisone: improvement of adding substrate [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2010, **8** (6): 15-21]
- 31 夏鹏. 甾体激素药物[M]. 北京: 中国物资出版社, 1987: 593-630 [Xia P. Pharmaceuticals of steroid hormone [M]. Beijing: China Material Press, 1987: 593-630]
- 32 Angilova BA, Sukhodolskaya GV, Koshchenko KA. Microbiological 11β -hydroxylation of steroid compounds by the fungi *Cunninghamella* and *Curvularia* [J]. *Mikrobiol*, 1985, **54** (5): 704-710
- 33 Manosroi J, Saowakhon S, Manosroi A. A novel one-step biotransformation of cortexolone-21-acetate to hydrocortisone acetate using *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688a [J]. *Enzym Microb Technol*, 2007, **41** (3): 380-384
- 34 Paraszkievicz K, Dlugonski J. Cortexolone 11β -hydroxylation in protoplasts of *Curvularia lunata* [J]. *J Biotechnol*, 1998, **65** (2): 217-224
- 35 王敏, 郭亚文, 卢文玉, 包慧珂, 杜连祥. 氢化可的松高转化菌株的选育及其发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10** (5): 663-666 [Wang M, Guo YW, Lu WY, Bao HK, Du LX. Breeding of high hydrocortisone transforming strains and their optimal fermentation conditions [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10** (5): 663-666]
- 36 曾本秀, 陈树群, 陈柏林. 提高甾体微生物 11β -羟化的酶活性[J]. 中国医药工业杂志, 1993, **24** (12): 529-532 [Zeng BX, Chen SQ, Chen BL. Improvement of enzyme activity in microbial 11β -hydroxylation of steroids [J]. *Chin J Pharm*, 1993, **24** (12): 529-532]
- 37 李沛霖. 微生物 11β -羟基化优良菌种选育及可能的应用研究[D]. 成都: 四川大学, 2003 [Li PL. Microbial hydroxylation and their application with *Absidia orchidis* AS 3. 65 and *Curvularia lunata* AS 3. 4381 [D]. Chengdu: Sichuan University, 2003]
- 38 Davis PJ. Microbial models of mammalian drug metabolism [J]. *Dev Ind Microbiol*, 1988, **29** (3): 197-219
- 39 Yaderets VV, Andryushina VA, Bartoshevich YE, Domracheva AG, Novak MI, Stytsenko TS, Voishvillo NE. A study of steroid hydroxylation activity of *Curvularia lunata* mycelium [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2007, **43** (6): 695-700