

基于微生物法甾体羟基化反应

黄娟, 朱惠萱, 田怀香, 于海燕, 陈臣, 荣绍丰*

上海应用技术大学香料香精化妆品学部, 上海 201418

摘要: 甾体化合物又称类固醇, 是重要的药物活性成分和药物合成中间体, 因其具有环戊烷多氢菲的基本骨架, 反应类型丰富, 其中羟基化反应因产品具有广阔的市场应用前景而受到广泛关注。羟基化反应有化学法和生物法两种, 生物法具有区域和立体专一性、对映体专一性等特点而成为目前主要的生产方法。首先从反应原理、类型及机制3个方面介绍了甾体微生物羟基化过程; 其次, 基于文献及自身研究工作, 从甾体羟基化反应的发酵条件、底物溶解性、跨膜运输及反应器内流体力学特性4个角度对羟基化过程的影响进行了综述; 最后, 基于甾体羟基化反应特性及当前研究进展, 对该反应过程后续研究提出展望, 旨在为后期甾体羟基化反应的相关研究提供一定参考依据。

关键词: 甾体; 羟基化; 底物溶解性; 跨膜运输; 流体力学特性

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0001

中图分类号: O629 文献标志码: A

Steroidal Hydroxylation Based on Microbial Method

HUANG Juan, ZHU Huixuan, TIAN Huaixiang, YU Haiyan, CHEN Chen, RONG Shaofeng*

School of Perfume and Aroma, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China

Abstract: Steroids are important active components of drugs and intermediates in drug synthesis. There existed various transformations of steroids because of the basic skeleton of cyclopentane dihydrophenanthrene. Hydroxylation has attracted extensive attention on account of its broad market application prospect. There are two methods to accomplish hydroxylation: chemical method and biological method. Biological method has become the main production method due to its regio specificity, stereospecificity and enantiomeric specificity. In this article, firstly, the microbial hydroxylation process of steroids was introduced from three aspects: reaction principle, reaction type and reaction mechanism; secondly, the effect of fermentation conditions, substrate solubility, transmembrane transport and hydrodynamics in the reactor on the hydroxylation process were reviewed based on the research results of the literature and our own work; finally, the prospect was put forward based on the characteristics of the hydroxylation process and the present progress, aiming to provide some reference for the related research on the steroid hydroxylation in the future.

Key words: steroids; hydroxylation; substrate solubility; cell permeability; hydrodynamic characteristics

甾体药物诞生于20世纪40年代, 是仅次于抗生素的第二大类化学药。常见的甾体药物包含雄烯二酮及其衍生产品系列、雄二烯二酮及其衍生产品系列、9-羟基雄烯二酮及其衍生产品系列。甾体药物除了具有免疫抑制、抗炎、抗风湿、促孕、利尿、镇静、合成代谢和避孕剂等作用外, 其还能治疗癌症、骨质疏松症、艾滋病毒感染等疾病^[1]。甾体药物或其中间体的制备可分为化学法和生物

法。与化学法相比, 生物转化常在温和条件下进行, 具有区域和立体专一性、对映体专一性的特点^[2], 是目前甾体药物生产主要采用的方法。

甾体微生物转化是利用微生物的多个酶系或单一酶, 对甾体母核的某一或多个特定部位进行反应, 从而产生一种或多种结构类似且高价值化合物的过程。不同转化位点涉及反应如图1所示, 包括加氢、水解与羟化等反应。

收稿日期: 2022-01-05; 接受日期: 2022-01-28

联系方式: 黄娟 E-mail: hjhuanjuan@126.com; * 通信作者 荣绍丰 E-mail: rongshaofeng@163.com

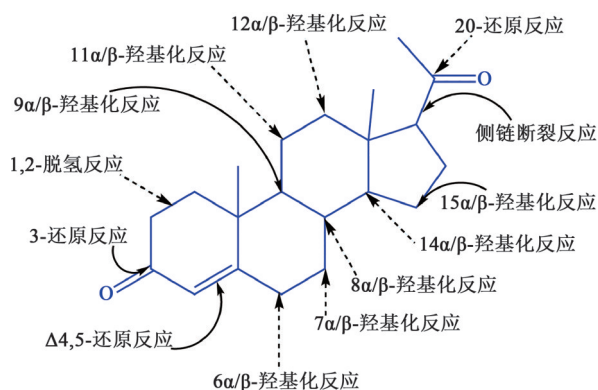


图1 甾体化合物生物转化位点

Fig.1 Biotransformation sites of steroid compounds

羟基化反应(hydroxylation)是甾体化合物功能化重要的反应之一,该反应是指在有机化合物各个基团上引入羟基。孕酮11- α 羟基化是第一个被发现的羟基化反应^[3]。羟基化一方面能够为化学合成提供中间体;另一方面,利用微生物进行羟基化反应可以到达一般化学反应达不到的部位,在不同位置或不同空间经羟基化形成具有不同药效的甾体药物。此外,羟基化可以增加甾醇类化合物的极性,影响其细胞分泌、毒性及跨细胞膜的外排作用,增强化合物的生物活性。与极性较低的非羟基化甾体相比,羟基化甾体通常表现出更高的生物活性,如羟基化产物泼尼松龙的活性是母体化合物的3~5倍^[4]。脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)的7 α -羟基衍生物表现出高免疫保护和免疫调节特性^[5]。真核生物中,羟基化主要发挥对外源底物解毒的作用,如一

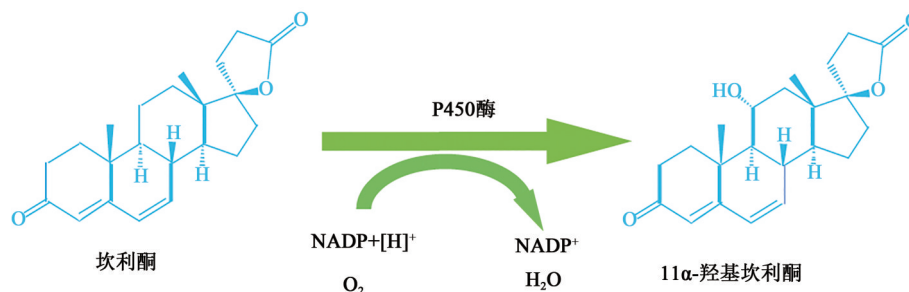
些乙甾酮的羟基化衍生物表现出酪氨酸酶抑制作用^[6];一些新的羟基衍生物,如20-羟甲基孕甾-1,4-二烯-3-酮[(20S)-20-hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one],与非羟基化底物不同,对HeLa癌细胞系表现出细胞毒性^[7]。细菌中,羟基化则表现为结构改造过程。羟基化的甾体具有消炎等方面的活性,如Restaino等^[8]采用玫瑰产色链霉菌对氢化可的松进行了C-16位的 α -羟基化,获得生产抗炎药物丙缩羟强龙的重要中间体16 α -羟基氢化可的松。

甾体微生物转化是甾体药物生产的必然趋势。目前国外上市的甾体药物已有400多种,我国现有品种仅为其1/3,且多为中低档产品,我国在甾体药物方面的研究,与世界先进国家相比尚存在较大差距。甾体药物新资源的开发是医药行业重点发展的方向之一。基于此,本文从反应原理、反应类型、影响因素等方面,对甾体微生物羟基化反应的最新研究进展做一简要综述,以期为未来开展相关研究提供依据。

1 甾体羟基化反应

1.1 反应原理

一般来说,甾体羟基化反应由底物、溶解于水中的分子氧、用于底物结合和氧化催化的P450酶、起电子转移穿梭作用的氧化还原和提供还原等价物的辅因子醌氧化还原酶1[quinone oxidoreductase, NAD(P)H]共同作用完成,以坎利酮11 α -羟基化反应为例,其化学反应如图2所示。

图2 坎利酮11 α -羟基化反应方程式Fig.2 Equation for 11 α -hydroxylation of canrenone

根据同位素¹⁸O追踪试验的结果,羟基化反应的原理为羟基直接取代甾体碳骨架上的氢,取代过程中未产生立体构型的变化,也不是通过

形成烯的中间体来完成的。羟基取代的立体构型(α 或 β 型)是由氢原子原来所占空间位置决定的^[9]。

1.2 反应类型

甾体化合物中常见的羟基化反应有9- α 、11- α 、11- β 、16- α 、17- α 、19-角甲基上的羟基化反应等^[9]。

工业上重要的甾体微生物羟基化反应类型及常利用的微生物和底物详见表1。

表1 工业中重要的甾体微生物转化羟基化反应^[10-14]
Table 1 Important microbial hydroxylation of steroids in industry^[10-14]

羟基化反应类型	微生物	底物
1- α	斜卧青霉	4-雄甾烯-3,17-二酮
5- α	尖孢镰刀菌、甘蔗凤梨病菌、甄氏外瓶霉	孕烯醇酮、睾酮、孕酮、可的松、泼尼松
9- α	红平红球菌、分枝杆菌、山扁豆生棒孢	4-雄甾烯-3,17-二酮
11- α	赭曲霉	坎利酮、孕酮
14- α	<i>Absidia regnieri</i> 菌、毛壳菌	黄体酮、雄烯二酮、孕烯
15- α	黄色镰刀菌、雷斯特里克(氏)青霉菌	孕甾酮、左旋乙基甾烯二酮
16- α	玫瑰产色链霉菌、黑根霉、赭曲霉	9 α -氟氢可的松、黄体酮
17- α	绿色木霉、黑根霉、赭曲霉	孕甾酮、环氧黄体酮
2- β	白腐核盘霉	11-脱氢皮甾醇、黄体酮、17a-羟基孕酮
6- β	毛壳菌、赭曲霉	雄烯二酮、睾酮、孕酮、孕烯醇酮、脱氢表雄甾酮
11- β	短刺小克银汉霉、蓝色犁头霉、新月弯孢霉、赭曲霉、新月弯孢霉	环氧黄体酮、化合物S、皮质酮
15- β	巨大芽孢杆菌、白腐核盘霉	氯苯丙氨酸、黄体酮、17a-羟基孕酮
17- β	粗糙链孢霉	4-雄甾烯-3,17-二酮
19-角甲基	球墨孢霉、芝麻丝核菌	11-脱氢皮甾醇

1.3 催化机制

甾体微生物羟基化的实质是酶的催化反应,研究表明,羟化酶均为细胞色素P450酶,与来源无关^[15]。该类型的酶广泛分布于生物体内,在天然产物生物合成、外源物质降解、甾体化合物生物合成和药物代谢中起着至关重要的作用。目前已知的甾体羟化酶,主要来自于哺乳动物、巨大芽孢杆菌及霉菌,如黑根霉、少根根霉、黑曲霉、赭曲霉、弯孢霉和小克银汉霉等^[9]。真菌细胞色素P450羟化酶通常位于内质网内膜上,主要由外源甾体化合物诱导,羟化酶负责解毒^[16]。

P450作为末端氧化酶,利用分子氧且需要一个与还原型辅酶Ⅱ(triphosphopyridine nucleotide, NADPH)依赖的脱氢酶相连接电子转移系统完成催化反应。基于氧化还原伴侣蛋白不同,P450酶可分为5大类,在甾体微生物羟基化过程中所需要的P450酶属于如图3所示的种类。

细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)属于含血红素酶,通常作为单加氧酶,催化分子氧的还原断裂,将1个氧原子引入底物,而第2个氧原子被还原成水^[17]。P450酶催化过程如图4所

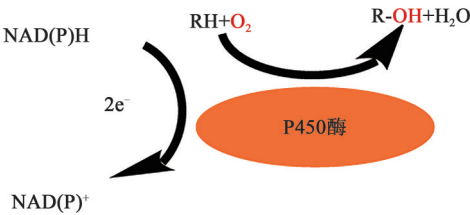


图3 P450酶的种类
Fig.3 Categories of P450 enzymes

示。具体催化过程可分为以下过程:①P450细胞酶中的血红素Fe^Ⅲ六配位的静息态(A)与底物的结合,失去1个配位的水分子,形成中间体B;②在NAD(P)H辅酶参与电子传递反应下,五配位的Fe^Ⅲ被还原为Fe^Ⅱ,形成中间体C;③与分子氧结合形成铁超氧化物络合物D[Cys-Fe^Ⅱ-O₂];④催化中心获得第2个电子形成铁过氧中间体E[Cys-Fe^Ⅲ-O-O]⁻;⑤被迅速质子化形成铁氢过氧化物F[Cys-Fe^Ⅲ-O-OH]⁻;⑥第2个质子化和O-O键的断裂伴随着失去1个水分子获得高铁氧中间体G[Cys-Fe^Ⅳ=O]⁺;⑦这个具有极高反应活性的中间体能够夺取底物中临近C-H键的氢原子,产生底物自由基和中间体H[Cys-

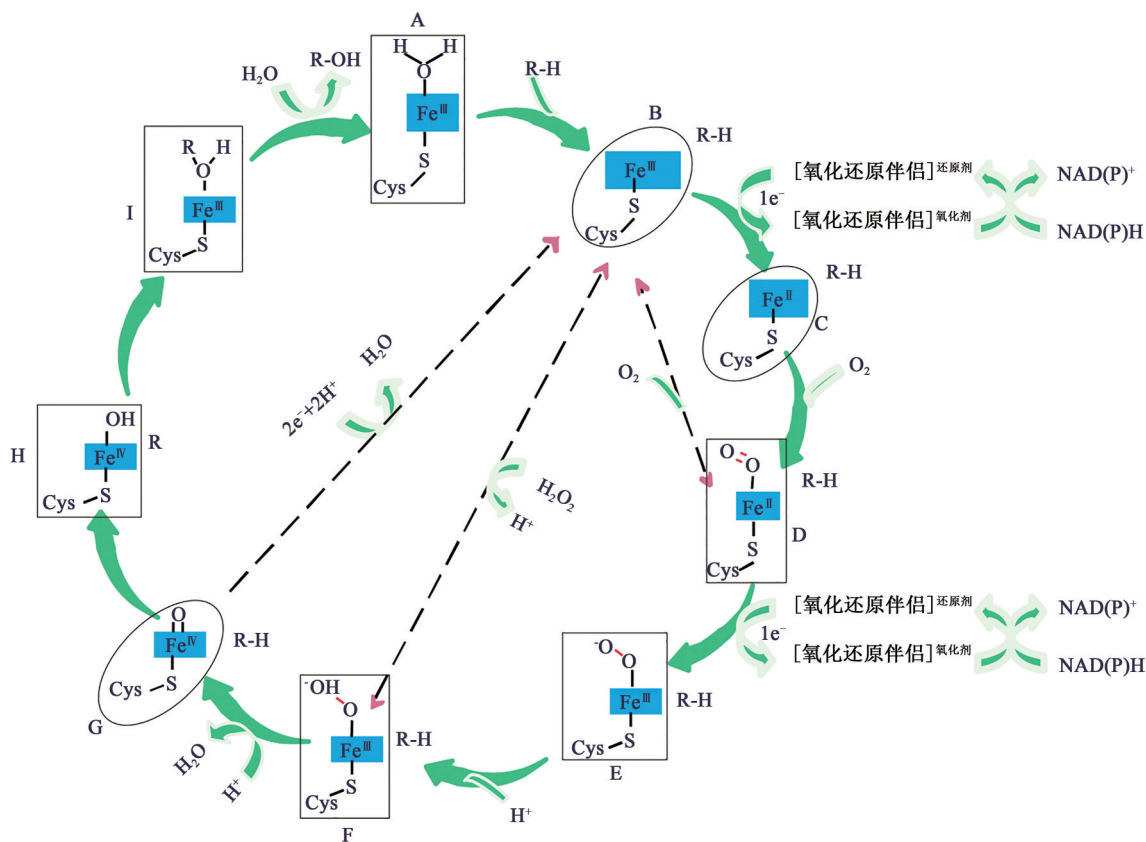


图4 P450酶的催化机制

Fig.4 Catalytic mechanism of P450 enzyme

Fe^{IV}-OH];⑧羟基与底物自由基结合后形成中间体I;⑨羟化产物(R-OH)在水分子的参与下从活性位点释放,P450酶重新恢复至起始静息态^[18-20]。

2 甾体羟基化反应影响因素

2.1 培养基组成

碳源是培养基的主要成分之一,可为细胞生长繁殖以及合成某些必需物质提供能量和碳成分。常用的碳源有葡萄糖、蔗糖、果糖、可溶性淀粉、玉米糖浆、甲壳素、甘油等。茅燕勇^[21]研究表明,转化培养基的最佳碳源为葡萄糖。Jones等^[22]将甘油、葡萄糖进行比较发现,20℃下,底物转化率无明显差异,但随着温度的升高,在30℃和37℃时,选用甘油为碳源的转化率较葡萄糖高15%左右。

氮源的主要作用是构成菌体的细胞物质(如氨基酸、蛋白质、核酸等)和含氮目的产物,且酶的合成也需要氮源,一般涉及到酶的生物过程(如生物转化)需要足量的、合适的氮源。氮源包括有机氮源和无机氮源两种。微生物在有机氮源中常表

现出生长旺盛、菌丝浓度增长迅速的特点。常用的碳源有蛋白胨、豆粉、牛肉膏、蚕蛹粉、硫酸铵、豆粕水解液、酵母膏、玉米粉、L-天冬氨酸等。甾体羟基化过程中,茅燕勇^[21]认为玉米浆为最佳氮源,杜卓蓉等^[23]认为硫酸铵为最佳氮源。

碳源和氮源不适当的比例均不利于细胞生长和外源蛋白的表达和积累,过低的碳氮比会使菌体提早自溶,导致菌体丧失生理活性,过高的碳氮比会使菌体的代谢不平衡。李迎光^[24]在17 α -羟基黄体酮的转化研究中发现,转化培养基中碳氮比值为2时底物的转化率更高。

无机盐和微量元素在微生物生长繁殖和合成目的产物的过程中,可作为其生理活性物质的组成或合成生理活性物质的调节物;无机盐作为构成微生物结构的要素,还与能量传递、代谢调节等生理活动相关。常用的无机盐包含七水硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)和磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]等。

有研究表明,在羟基化的转化体系中加入金属离子可以有效地刺激底物转化。可能是由于金

属离子激发了电子的传递,促进或抑制了分子酶间的相互作用,从而影响酶对底物的催化。一般在低浓度时对微生物生长和目的产物合成有促进作用,在高浓度时常表现出明显的抑制作用^[25],如泼尼松龙的转化过程中,添加 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 金属离子的泼尼松龙转化率显著提高 10%~15%; Co^{2+} 和 Cu^{2+} 组的产量显著降低,其中 Cu^{2+} 的加入使转化率降低到 10%^[26]。简单节杆菌转化胆固醇时,加入 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 等金属离子可以抑制胆固醇的母核降解,而使雄甾烯双酮作为产物积累下来^[27]。此外,培养基中还可加入营养因子,如维生素、甘氨酸、3,5-二硝基水杨酸等,调节菌体细胞对碳源、氮源等的代谢。培养基成分对甾体微生物转化的影响程度不同,如 Li 等^[28] 研究表明,影响 7α 、 15α -二羟基-DHEA 产量的显著因子顺序为:硫酸亚铁>酵母抽提物>葡萄糖>玉米浆。

2.2 底物溶解性

2.2.1 有机溶剂 甾体化合物是脂溶性化合物,其在水中溶解度较低,而甾体羟基化反应主要在水中进行。因此,很多学者在实验过程中通常先将底物用少量的有机溶剂溶解,然后再将溶液加至培养基中。由于不同的有机溶剂对菌体生长的抑制程度不同,甚至一些毒性大的溶剂有时会直接导致菌体死亡,因此选用合适的有机溶剂溶解底物至关重要。最常用的有机溶剂包含甲醇、乙醇、丙酮、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等。赵沙沙^[29] 分别用适量的氯仿、甲醇、乙酸乙酯、乙醇、丙酮、二甲基亚砜溶解 0.1 g 的底物 4-雄甾烯-3,17-二酮(4-androsten-3, 17-dione, 4-AD),探究不同有机溶剂对转化率的影响。结果表明,氯仿对底物的溶解性最好,对目的产物的转化率最高(约 84%),因此确定溶解底物 4-AD 的最佳助溶剂为氯仿。荣绍丰等^[30-31] 在采用赭曲霉催化 17α -羟基黄体酮进行 11α -羟基化反应时发现,在发酵培养基中添加 1% 二甲基甲酰胺,转化率可提升至 93.3%,较未添加时高 8.4%;在制备 9α -羟基-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的过程中,向发酵培养基中添加由乙醇和聚乙二醇组成的复合促溶剂,转化率可达 84.3%。

2.2.2 离子液体 虽然有机溶剂可提高底物溶解性,但常用的有机溶剂具有高易燃性、挥发性和毒性。近年来,采用的离子液体因其独特的性质,如可忽略的蒸汽压、偶极性质、高溶解度、可调性、化

学和热稳定性,被认为是有机溶剂的绿色替代品^[32-33]。离子液体又称熔融盐,是指在 100 °C 以下熔化的阳离子和阴离子的混合物。咪唑类离子液体仍是大多数研究的核心,但研究焦点也正在转向其他阳离子基团(如季磷离子液体),但也有研究者曾对其高成本、毒性和生物降解性提出质疑^[34]。

Petkovic 团队^[35] 研究了氯化烷基三丁基磷对丝状真菌构巢曲霉分生孢子的毒性机理,其通过荧光显微镜来评估离子液体对质膜完整性的影响,结果表明,带有长烷基取代基的磷离子液体的毒性较高的原因可能是它们与分生孢子细胞边界的强相互作用,虽然离子液体在一定程度可以提高细胞通透性,但也会对质膜完整性造成损伤。

2.2.3 深共晶溶剂 深共晶溶剂(deep eutectic solvents, DESs)是铵键和氢键供体如氯化胆碱和尿素的共晶混合物,与离子液体有一些相似的溶剂性质,且前者更容易制备、价格更低、生物相容性和生物降解性更高,被认为是一种更有前途的溶剂体系^[36]。

Mao 等^[37] 在研究 DESs 对单纯节杆菌 1,2-脱氢生成醋酸可的松和醋酸泼尼松的影响中,分别将氯化胆碱(choline chloride, ChCl)和尿素(urea, U)、乙二醇(ethylene glycol, Eg)及甘油(glycerol, Gly)形成的 3 种深共晶溶剂添加入转化体系中,并对固定化简单节杆菌细胞膜完整性、底物溶解度以及醋酸可的松生物转化能力进行了考察。结果表明,与传统的乙醇($0.032\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,底物在 4% ChCl:U ($0.046\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 中的溶解度有明显地提升,并且 ChCl:U 作为共溶剂对甾体生物脱氢最有效,当底物浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生物转化率提高至 93% 以上,并将 DESs 和固定化细胞回收进行重复使用性评价,5 次循环利用后,最终转化率超过 80%。

DESs 也可以提高酶的催化作用,从而提高生物物的转化效率,如 Cao 等^[38] 利用 DESs-DMSO 体系作为反应介质,首次成功固定化黑曲霉脂肪酶,用于催化二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)的酶促酰化反应,最终得到 DMY 转化率为 91.6%,较之前有明显提升。但目前关于离子液体和深共晶溶剂在甾体羟基化过程中的研究较少,有待进一步探索。

2.2.4 包埋材料 环糊精(cyclodextrin, CD)是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移

酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称。由于环糊精外缘亲水而内腔疏水,因而其能够像酶一样提供一个疏水的结合部位,作为主体包络各种适当的客体,如有机分子、无机离子及气体分子等。环糊精能有效增加一些水溶性不良的药物在水中的溶解度和溶解速度,改善化学稳定性和生物利用度^[39-40]。

不同类型的环糊精均显示出增强甾体化合物溶解性的效应。环糊精已被证明与分枝杆菌细胞表面相互作用,破坏最外层的脂质细胞包膜的双层,引起蛋白质从细胞中渗透,并增加甾体化合物和营养物质的细胞壁渗透性,从而有助于促进细胞生长和甾醇生物转化^[41-42]。 β -CD在胆固醇、植物甾醇或富含植物甾醇等工业底物中促进3-酮甾类如雄甾-4-烯-3,17-二酮、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮和9 α -羟基-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的形成^[43-44]。

Shtratnikova等^[45-46]分析了甲基化- β -环糊精(methylated- β -cyclodextrin, M- β -CD)存在的情况下,3-酮-4-烯甾体化合物积累和植物甾醇消耗的特定速率的时间过程曲线,结果表明,甲基化- β -CD可促进甾醇转化酶活性的诱导。含甲基化- β -CD的甾体转化过程中,增强的机制有多种,包括甾体化合物的溶解、细胞壁组成的改变、甾体化合物和可溶性营养物的细胞壁渗透性的增加、脂双层的解体以及与细胞表面弱相关的甾体化合物转化酶的释放^[47]。此外,反应过程中即使存在甲基化- β -CD,也不涉及参与特定生物途径的蛋白质或具有特定分子功能或作用于特定细胞位置蛋白质的表达变化,即其不会影响基因水平的甾体分解代谢,但甲基化- β -CD介导的必需甾体中间体细胞内含量的改变是可能的。有研究表明,已知的甾体化合物分解代谢基因簇中不存在这些调节基因的同源物,即它们不参与甾体化合物分解代谢^[46]。此外,类固醇生物转化过程中, β -环糊精衍生物会影响细菌的生长速度和细胞形态,如转化醋酸可的松过程中,随机甲基化衍生物抑制单纯节杆菌的细胞生长,而磺丁醚衍生物则促进其生长^[48]。环糊精对放线菌甾体化合物生物转化的影响存在剂量依赖性,即在高浓度下可能导致细胞活力的丧失以及结构和生理变化^[46],如分枝杆菌。因此,在进行甾体微生物转化时,应考虑这些因素。

有机二氧化硅空心球(organic silica hollow spheres, OSHS)吸附性能较好,荣绍丰等^[49]在以 β -

谷甾醇为底物制备-11 α -羟基-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的过程中,向体系内添加 OSHS 进行混合培养,首次证明添加 OSHS 有助于细胞的生物转化。原因在于 β -谷甾醇和 OSHS 两层之间形成了吸附络合物,这种吸附显著增加了 β -谷甾醇在水中的溶解性,从而改善了底物生物转化效率。

2.2.5 表面活性剂 羟基化过程中,表面活性剂的加入能显著促进底物的分散和溶解。张晓丽等^[50]考察了不同乳化剂(sp-60、sp-80、Tween-60、Tween-80)及其复配对坎利酮羟基化的影响,发现乳化剂对底物坎利酮有增溶作用,且 Tween-80、复合乳化剂 Tween80-sp60 对坎利酮微生物转化有促进作用,其中单组分乳化剂 Tween-80 的最佳质量分数为 0.18%,底物转化率为 90.32%;复合乳化剂 Tween80-sp60 最佳质量分数为 0.09%,转化率为 92.22%。

Avramova 等^[51]研究发现,非离子表面活性剂 Tween-80 在红球菌生物转化 4 雄烯-3,17-二酮的过程中能加速 9 α -甾体羟基化反应。Li 等^[28,52]和 Lobastova 等^[53]在脱氢表雄酮的生物转化过程中,研究非离子表面活性剂(Tween-40、Tween-60、Tween-80、Triton X-100、Triton X-114)在 1% 质量浓度下对 DHEA 产二羟基化的影响。发现添加 1% Tween-80 作为助溶剂,5 g·L⁻¹底物 DHEA 的 7 α ,15 α -二醇-DHEA 摩尔转化率为 77.4%,比原始生物转化过程的摩尔转化率提高了 10.1%。添加 2% Tween-80,底物溶解度为 0.477 g·L⁻¹,是对照(0.054 g·L⁻¹)的 7.8 倍,7 α ,15 α -二氢-DHEA 和 DHEA 摩尔转化率分别提高了 87% 和 34.6%。此外,研究表明,Tween-80 存在时,培养的菌丝体更大且具有更光滑的表面,菌体不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸的比例显著增加,不饱和脂肪酸的增加在一定程度上可增强膜的渗透性^[51],即 Tween-80 引起的 7 α ,15 α -二氢-DHEA 产率的显著提高可能与其提高跨细胞膜转运活性的能力有关^[54]。

2.3 底物跨膜运输

由于甾体转化酶属于胞内酶,甾体分子必须穿过细胞壁和细胞膜才能与酶反应,所以细胞壁和细胞膜的通透性对甾体转化成功与否非常重要^[55]。在保持生物活性的前提下,消除或降低细胞外膜的阻碍作用可促进生物转化,即通过生物或化学手段均可改变细胞外膜渗透性。

2.3.1 化学法 化学法最早在1982年由Sedlacek等^[56]发现,研究者在去氢可的松的11 β 羟化中添加适量的稀KOH溶液、解旋酶、乙二胺四乙酸处理秀丽隐杆线虫,结果发现,孢子膨胀、外源化学物质更易穿透进入细胞,经化学试剂处理后的羟化产量可以提高2~4倍。

相转移催化剂(phase transfer catalyst, PTC)是可以帮助反应物从一相转移到能够发生反应的另一相中,从而加快异相系统反应速率的一类催化剂,目前主要应用于有机化学反应^[57]。PTC不仅能增加疏水性底物的溶解度,同时还能改变细胞外膜的通透性和流动性^[58]。

唐晓庆^[59]、荣绍丰等^[60]针对甾体底物的高度疏水性以及反应过程需要跨膜运输的特征,将PTC应用到坎利酮微生物转化中。在转化体系中添加四丁基溴化铵(tetrabutylammonium bromide, TBABr)和1-丁基-3-甲基-咪唑六氟磷酸盐(1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [BMIM]PF₆)两种PTC。结果表明,两种PTC均能提高菌体对坎利酮的转化能力。冷模条件下,TBABr及[BMIM]PF₆均能提高底物坎利酮在水相中的溶解度,且PTC加入浓度越高,底物溶出越快,最终体系中底物的浓度越高;当体系中添加5 g·L⁻¹ [BMIM]PF₆时,坎利酮溶解度较对照组高34.44%,添加10 g·L⁻¹ [BMIM]PF₆坎利酮溶解度较对照组高64.83%。相同PTC浓度下,TBABr的促溶作用高于[BMIM]PF₆,如添加浓度为2 g·L⁻¹时,前者体系中坎利酮的溶解度较后者体系中高2.69%。从两种PTC的结构可知,PTC疏水性烷基链可以携带疏水性底物坎利酮进入水相,提高水相中底物坎利酮的浓度。

唐晓庆^[59]、荣绍丰等^[60]对两种PTC处理的菌体进行核酸和渗漏蛋白测定,并将其作为衡量菌体细胞通透性的指标。研究表明,在加入不同PTC种类及浓度下,蛋白质渗漏量从高到低依次为5 g·L⁻¹ [BMIM]PF₆组>10 g·L⁻¹ TBABr组>2 g·L⁻¹ [BMIM]PF₆组>2 g·L⁻¹ TBABr组>对照组。菌体核酸的渗漏量趋势与蛋白质渗漏量一致。结果表明,处理组的细胞通透性高于对照组,且[BMIM]PF₆的作用更显著。表明TBABr、[BMIM]PF₆的加入能提高细胞通透性,从而加速底物坎利酮向胞内的转运速率,提高转化率,且在投料浓度为30 g·L⁻¹的条件下,底物的质量转化率

达到95.0%,转化时间低于60 h。除一些化学试剂以外,羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)也可以通过改变细胞膜的大小、清晰度和表面结构,从而增强简单节杆菌对甾体1-脱氢的生物转化。研究表明,用HP- β -CD处理后的细胞通透性较高,可提取脂质的比例降低,饱和脂肪酸和长链脂肪酸含量降低、蛋白质水平的总泄漏增加,在细胞外观察到属于 α -TP结合超家族和主要促进者超家族的蛋白质,这些变化可以从分子水平上解释HP- β -CD处理下渗透率的变化,羟丙基- β -环糊精有助于提高细胞通透性^[61]。荣绍丰等^[62]在制备11 α , 17 α -羟基黄体酮时,通过在培养基中添加磁性纳米四氧化三铁粉,在高投料浓度为30 g·L⁻¹时,摩尔转化率仍可达到91.9%。

2.3.2 物理法 常用的物理方法包含超声波技术和磁场技术,当超声波在介质中传播时,由于超声波与介质的相互作用,使介质发生物理的和化学的变化,从而产生一系列力学、热学、电磁学和化学的超声效应。近年来,超声波因具有波长短、穿透力强、操作简单、成本低廉等物理特性,在医疗和化工领域得到了广泛的应用。

适当强度的超声处理可以通过改变细胞膜的通透性来促进空化和改善传质来提高转化效率。较早时,李晓静^[63]、阳葵等^[64-65]考察了超声因子、方式、时间与生长调节剂的配合使用等因素对甾体羟基化过程的影响。结果发现,超声处理可以提高转化率,且超声波与表面活性剂配合使用时可以降低表面活性剂用量,减少表面活性剂对微生物菌体酶活性的影响,更有效地实现甾体底物转化。进一步分析实验数据,推测超声生物效应对甾体转化可能有两方面的作用:一是使甾体反应物颗粒细化、增大固液界面、加速底物溶解和底物分子的传递从而提高转化反应效率;二是适当空化所产生的冲击力会造成对细胞膜通透性的改变,促进胞内酶的释放及反应物向胞内的扩散。

电磁场可使细胞形态、脱氧核糖核酸(deoxyribo nucleic acid, DNA)、核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)、蛋白质合成、跨膜转运、酶活性及生物遗传等产生显著变化。磁化水具有与普通水不同的独特物理化学性质,如提高物质溶解能力、调节膜渗透性等功能。阳葵等^[66]在16, 17 α -环氧孕酮11 α -羟基化反应研究中发现,经磁化水处理后的菌种斜面上菌层生长密实、丰厚饱满、色泽碧绿,生长

成熟期缩短 28~32 h,且摇瓶转化实验表明,其转化甾体底物的能力优于对照,菌种性能明显改善。

2.3.3 原生质体转化技术 制备原生质体用于甾体转化是另一种有效解除细胞壁阻碍作用的方法,如王敏等^[67]研究了氢化可的松生产菌蓝色犁头霉原生质体的形成与再生,结果表明以 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4Cl 做为稳定剂、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶壁酶和 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维素酶组成的混合酶液溶解菌丝,4 h 后原生质体量高,再生率为 15.6%,其 11β 羟化酶活性明显高于完整菌丝体羟化酶的活性,在底物浓度相等的情况下可将转化周期由 48 h 缩短至 36 h。原生质体转化技术虽然有效改善了底物的传质阻力,但仍存在稳定性差、再生迅速等问题,限制了其在工业上的应用。

2.3.4 分子工程方法 研究表明,膜工程在减少渗透性障碍方面比外源性透化剂更有效,如 Ni 等^[68]使用分子工程方法通过降低膜通透性屏障来加速全细胞生物催化,选取具有遗传改变的外膜结构的大肠杆菌细胞,使用脂多糖突变体 SM10 和布朗氏脂蛋白突变体 E609L 与两种大小和疏水性显著不同的模型底物硝基头孢菌素和四肽 N-琥珀酰拉-Ala-Pro-Phe-p-硝基苯胺进行研究。通过遗传方法降低外膜渗透性导致全细胞催化反应的反应速率显著增加(高达 380%)。引入的突变对膜通透性屏障的影响与多粘菌素 B 九肽的影响进行了比较,结果表明,通过基因修饰可以减少类脂 A 的合成,进而影响疏水性脂多糖的合成,故细胞对亲水性底物四肽的通透性增加。

2.4 反应器内流体力学特性

生物反应器内流体的流动状态,影响反应器内的流体速度、溶氧(dissolved oxygen, DO)、剪切速率等流体力学性质,进而对微生物的生理特性产生影响,最终影响反应效果。反应器内流体力学特性是生物转化过程不可忽略且极其重要的研究内容,对于甾体的微生物羟基化也是如此。Rong 等^[69]进行甾体微生物转化反应器流体力学方面的研究,在 1 L 反应器考察了具有不同结构参数透平桨流体力学特性,并采用热模实验考察了转化率等参数。结果表明,大直径(60 mm)六叶 Rushton 桨叶对气体分散更有效,流体的轴向速度最高。增大叶片数和叶轮直径均能提高叶轮的剪切和功率,且叶轮直径的影响比叶片数的影响更明显,即适度增加叶片数目和叶轮直径,可以改善

搅拌槽内流体的混合,提高发酵液中溶氧值,对微生物的生长和坎利酮的 11α -羟基化有促进作用,获得了较高的底物转化率。张晓丽等^[70]在摇瓶水平上考察了坎利酮羟基化的转速效应,研究发现,一定范围内增加转速,溶氧水平相应增加,转化率提高,在 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,转化率较高,但继续增加转速,转化率反而下降。转速过大,菌体受到较强的剪切作用,不利于菌体的生长;转速较低,培养基中溶氧下降,不利于菌体对底物的转化。

3 展望

甾体微生物羟基化反应的工艺过程复杂,影响因素较多,甾体羟基化反应过程的研究,目前主要集中于摇瓶水平发酵工艺的优化,并取得了较多成果,也有很多学者开始从菌株的遗传修饰、酶的固定化方面进行研究,但生物反应器水平研究较少,如流体力学方面的研究,需给予足够重视。丝状真菌发酵生物反应器是目前的研究热点之一,目前仅有的研究中主要以冷模实验为主,包括搅拌桨的类型、组合形式、转速、通气量等对发酵过程中的流变特性、混合特性、传质性能、气液分散特性、颗粒悬浮特性、菌丝体形态等方面的影响,以及放大方法的研究。热模实验由于成本较高,研究较少,主要集中于 1 L 和 5 L 发酵罐,研究的主要内容是搅拌桨类型、转速、通气量、发酵工艺对转化率、酶活、菌丝体形态等参数的影响。不同规模生物反应器内流体力学特性、耦合微生物生理特性,即反应工程特性与工艺特性结合,是实现工业放大的必经之路。此外,在搅拌桨型研究中,目前提出了柔性桨的概念,国外研究中将其应用于米曲霉产糖过程,可有效提高转化率和酶活,改善粘壁现象,但在甾体羟基化过程中的研究仍有待进一步的探索;同时因甾体羟基化衍生物的具有重要的生物活性,市场需求量较大,未来仍需持续重点从工程与工艺两个方面对甾体化合物羟基化进行研究。

参 考 文 献

- [1] SULTANA N. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation[J]. Steroids, 2018, 136: 76-92.
- [2] HANSON J R. Microbiological hydroxylations with Cephalosporium aphidicola[J]. J. Chem. Res., 2018, 42(10): 498-503.

- [3] MURRAY H C, PETERSON D H. Oxygenation of steroids by mucorales fungi[P]. US: US2602769 A, 1952-08-07.
- [4] MOHAMED S S, EL-HADI A A, ABO-ZIED K M. Biotransformation of prednisolone to hydroxy derivatives by *Penicillium aurantiacum*[J]. *Biocatal. Biotransfor.*, 2017, 35(3): 215-222.
- [5] JANEZKO T, DMOCHOWAKA-GLADYSZ J, KOSTRZEWA-SUSOW E, *et al.* Biotransformations of steroid compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651[J]. *Steroids*, 2009, 74(8): 657-661.
- [6] NASSIRI-KOOPAEI N, FARAMARZI M A. Recent developments in the fungal transformation of steroids[J]. *Biocatal. Biotransfor.*, 2015, 33(1): 1-28.
- [7] CHOUDHARY M I, ERUM S, ATIF M, *et al.* Biotransformation of (20S)-20-hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by four filamentous fungi[J]. *Steroids*, 2011, 76(12): 1288-1296.
- [8] RESTAINO O F, MARSEGLIA M, DE CASTRO C, *et al.* Biotechnological transformation of hydrocortisone to 16 α -hydroxy hydrocortisone by *Streptomyces roseochromogenes*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(3): 1291-1299.
- [9] 周维善,庄治平. 甾体化学进展[M]. (第1版). 北京:科学出版社,2002:346-347.
- [10] NASSIRI-KOOPAEI N, FARAMARZI M A. Recent developments in the fungal transformation of steroids[J]. *Biocatal. Biotransfor.*, 2015, 33(1): 1-28.
- [11] AN X, GAO P, ZHAO S, *et al.* Biotransformation of androst-4-ene-3, 17-dione by three fungal species *Fusarium solani* BH1031, *Aspergillus awamori* MH18 and *Mucor circinelloides* W12[J]. *Nat. Prod. Res.*, 2021, 35(3): 428-435.
- [12] HEIDARY M, GHASEMI S, HABIBI Z, *et al.* Biotransformation of androst-4-ene-3, 17-dione and nandrolone decanoate by genera of *Aspergillus* and *Fusarium*[J]. *Biotechnol. lett.*, 2020, 42(9): 1767-1775.
- [13] 林本凤,职亚飞,路福平等. 黑曲霉 ATCC1015 催化 16 α ,17 α -环氧黄体酮 11 α -羟基化及相关 *P450* 基因诱导表达[J]. 天津科技大学学报,2017,32(6):8-14.
- [14] MAO S, ZHANG L, GE Z, *et al.* Microbial hydroxylation of steroids by *Penicillium decumbens*[J]. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2016, 133: S346-S351.
- [15] NICKAVAR B, VAHIDI H, ESLAMI M. An efficient biotransformation of progesterone into 11 α -hydroxyprogesterone by *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*[J]. *Z Naturforsch. C J Biosci.*, 2019, 74(1-2): 9-15.
- [16] URLACHER V B, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology[J]. *Trends Biotechnol.*, 2019, 37(8): 882-897.
- [17] GIORGI V, MENENDEZ P, GARCIA-CAMELLI C. Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects—an update[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 35(9): 1-15.
- [18] URLACHER V B, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application[J]. *Trends Biotechnol.*, 2012, 30(1): 26-36.
- [19] LI Z, JIANG Y, GUENGERICH F P, *et al.* Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications[J]. *J. Biological Chem.*, 2020, 295(3): 833-849.
- [20] ZHANG X, LI S. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions[J]. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, 34(9): 1061-1089.
- [21] 茅燕勇. 微生物转化法制备 11 α -羟基化坎利酮[D]. 南京:南京工业大学,2005.
- [22] JONES J A, COLLINS S M, VERNACCHIO V R, *et al.* Optimization of naringenin and p-coumaric acid hydroxylation using the native *E. coli* hydroxylase complex, HpaBC[J]. *Biotechnol. Prog.*, 2016, 32(1): 21-25.
- [23] 杜卓蓉. 根霉固态发酵转化坎利酮及发酵残渣综合利用的研究[D]. 江苏:江苏大学,2018.
- [24] 李迎光. 赭曲霉 MF04 生物催化 17 α -羟基黄体酮 11 α 羟基化的工艺研究[D]. 上海:上海应用技术大学,2016.
- [25] CONTENTE M L, GUIDI B, SERRA I, *et al.* Development of a high-yielding bioprocess for 11- α hydroxylation of canrenone under conditions of oxygen-enriched air supply[J]. *Steroids*, 2016, 116: 1-4.
- [26] ZHANG W, CUI L, WU M, *et al.* Transformation of prednisolone to a 20 β -hydroxy prednisolone compound by *Streptomyces roseochromogenes* TS79[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 92(4): 727-735.
- [27] 李安华. 绿僵菌转化 16 α ,17 α -环氧黄体酮的工艺研究[D]. 郑州:河南农业大学,2007.
- [28] LI H, FU Z, ZHANG X, *et al.* The efficient production of 3 β , 7 α , 15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one from dehydroepiandrosterone by *Gibberella intermedia*[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 174(8): 2960-2971.
- [29] 赵沙沙. 微生物转化法制备雄甾-4-烯-3, 17-二酮羟化产物的研究[D]. 郑州:郑州大学,2018.
- [30] 荣绍丰,李迎光,张硕,等. 赭曲霉生物催化 17 α -羟基黄体酮 11 α -羟基化的工艺优化[J]. 中国医药工业杂志,2017,48(8): 1125-1130.
- [31] 荣绍丰,管世敏,王敬文等. 一种制备 9 α -羟基-雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮的方法[P]. 中国:CN105219829B,2019-03-05.
- [32] MAO S, WANG X, ZHANG Z, *et al.* 15 α -hydroxylation of D-ethylgonendione by *Penicillium raistrickii* in deep eutectic solvents DESs containing system[J/OL]. *Biochem. Eng. J.*, 2020, 164: 107781[2022-04-26]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107781>.
- [33] GONCALVES A R P, PAREDES X, CRISTINO A F, *et al.* Ionic liquids—a review of their toxicity to living organisms[J/OL]. *Int. J. Cell Sci. Mol. Biol.*, 2021, 22(11): 5612[2022-04-26]. <https://doi.org/10.3390/ijms22115612>.
- [34] MBOUS Y P, HAYYAN M, HAYYAN A, *et al.* Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—promises and challenges[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2017, 35(2): 105-134.
- [35] PETKOVIC M, HARTMANN D O, ADAMOVA G, *et al.* Unravelling the mechanism of toxicity of alkyltributylphosphonium chlorides in *Aspergillus nidulans* conidia[J]. *New J. Chem.*, 2012, 36(1): 56-63.
- [36] XU P, ZHENG G W, ZONG M H, *et al.* Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis[J]. *Bioresour. Bioprocess.*, 2017, 4(1): 1-18.
- [37] MAO S, YU L, JI S, *et al.* Evaluation of deep eutectic solvents as co-solvent for steroids 1-en-dehydrogenation biotransforma-

- tion by *Arthrobacter simplex*[J]. J. Chem. Tech. Biotechnol., 2016, 91(4): 1099-1104.
- [38] CAO S L, DENG X, XU P, *et al.* Highly efficient enzymatic acylation of dihydromyricetin by the immobilized lipase with deep eutectic solvents as cosolvent[J]. J. Agric. Food Chem., 2017, 65(10): 2084-2088.
- [39] SCHWARZ D H, ENGELKE A, WENZ G. Solubilizing steroidal drugs by β -cyclodextrin derivatives[J]. Int. J. Pharm., 2017, 531(2): 559-567.
- [40] FENYVESI É, PUSKAS I, SZENTE L. Applications of steroid drugs entrapped in cyclodextrins[J]. Envir. Chem. Lett., 2019, 17(1): 375-391.
- [41] RUGOR A, TATARUCH M, STARON J, *et al.* Regioselective hydroxylation of cholecalciferol, cholesterol and other sterol derivatives by steroid C25 dehydrogenase[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2017, 101(3): 1163-1174.
- [42] PUTKARADZE N, LITZENBURGER M, HUTTER M C, *et al.* CYP109E1 from *Bacillus megaterium* acts as a 24- and 25-hydroxylase for cholesterol[J]. ChemBioChem, 2019, 20(5): 655-658.
- [43] SHEN Y B, WANG M, LI H N, *et al.* Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on phytosterol biotransformation by different strains of *Mycobacterium neoaurum*[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012, 39(9): 1253-1259.
- [44] CAIRA M R, BOURNE S A, SAMSODIEN H, *et al.* Inclusion complexes of 2-methoxyestradiol with dimethylated and permethylated β -cyclodextrins: models for cyclodextrin-steroid interaction[J]. Beilstein J. Org. Chem., 2015, 11(1): 2616-2630.
- [45] SHTRATNIKOVA V Y, SCHELKUNOV M I, FOKINA V V, *et al.* Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D[J]. Curr. Genet., 2016, 62(3): 643-656.
- [46] SHTRATNIKOVA V Y, SCHELKUNOV M I, DOVBNYA D V, *et al.* Effect of methyl- β -cyclodextrin on gene expression in microbial conversion of phytosterol[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2017, 101(11): 4659-4667.
- [47] HORINOUCHE M, HAYASHI T, KUDO T. Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*[J]. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2012, 129(1-2): 4-14.
- [48] LIU J, WANG L, SHEN Y, *et al.* Effect of β -cyclodextrins derivatives on steroids biotransformation by *arthrobacter simplex*[J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2018, 185(4): 1004-1013.
- [49] RONG S, WANG J, LI Q, *et al.* The enhanced production of 11 α -hydroxyandrost-1, 4-diene-3, 17-dione based on the application of organic silica hollow spheres in the biotransformation of β -sitosterol[J]. J. Chem. Tech. Biotechnol., 2017, 92(1): 69-75.
- [50] 张晓丽, 张莉, 丁保妹, 等. 乳化剂对坎利酮增溶及生物转化的影响[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2012, 12(2): 134-136.
- [51] AVRAMOVA T, SPASSOVA D, MUTAFOV S, *et al.* Effect of Tween 80 on 9 α -steroid hydroxylating activity and ultrastructural characteristics of *Rhodococcus* sp. cells[J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 26(6): 1009-1014.
- [52] LI H, YIN S, ZHANG X, *et al.* Enhanced 3 β , 7 α , 15 α -trihydroxy-5-androsten-17-one production from dehydroepiandrosterone by *Colletotrichum lini* ST-1 resting cells with Tween-80[J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2016, 178(1): 91-100.
- [53] LOBASTOVA T G, GULEVSKAYA S A, SUKHODOLSKAYA G V, *et al.* Dihydroxylation of dehydroepiandrosterone in positions 7 α and 15 α by mycelial fungi[J]. Appl. Biochem. Microbiol., 2009, 45(6): 617-622.
- [54] SHENG L, ZHU G, TONG Q. Mechanism study of Tween 80 enhancing the pullulan production by *Aureobasidium pullulans*[J]. Carbohydr. Polym., 2013, 97(1): 121-123.
- [55] 吴杰群, 徐顺清, 王鸿等. 生物转化菌醇制备甾体药物中间体研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(7): 801-814.
- [56] SEDLACZEK L, JAWORSKI A, WILMANSKA D. Transformation of steroids by fungal spores[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1981, 13(3): 155-160.
- [57] BORKOWSKI A, GUTOWSKI Ł, SYCZEWSKI M, *et al.* Adaptation of bacteria *Escherichia coli* in presence of quaternary ammonium ionic liquids[J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2018, 164: 370-378.
- [58] TIAN T, HU X, GUAN P, *et al.* Research on solubility and bio-solubility of amino acids ionic liquids[J]. J. Mol. Liquids, 2017, 225: 224-230.
- [59] 唐晓庆. 赭曲霉催化坎利酮 11- α -羟基化工艺及叶轮参数的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2021.
- [60] 荣绍丰, 唐晓庆, 管世敏, 等. 一种在相转移催化剂体系中微生物转化 11 α -羟基坎利酮的方法[P]. 中国: CN112980910A, 2021-06-18.
- [61] SHEN Y, LIANG J, LI H, *et al.* Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-mediated alterations in cell permeability, lipid and protein profiles of steroid-transforming *Arthrobacter simplex*[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015, 99(1): 387-397.
- [62] 荣绍丰, 李迎光, 管世敏, 等. 一种制备 11 α , 17 α -羟基黄体酮的方法[P]. 中国: CN106319016B, 2020-02-18.
- [63] LI X J, JI Y Z, WANG X J. Applications of physical factors in steroid bioconversion[J]. Adv. Materials Res., 2014, 314: 1073-1076.
- [64] 李晓静, 冯霞, 阳葵. 底物的溶解对甾体微生物羟化反应的影响[J]. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2004, 37(11): 941-944.
- [65] 阳葵, 王福东. 超声处理在甾体微生物转化过程中的效应[J]. 化工学报, 1999, 50(3): 417-420.
- [66] 阳葵, 王福东, 冯霞, 等. 磁化水处理菌种在甾体微生物转化过程中的效应[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 336-338.
- [67] 王敏, 王春霞, 路福平, 等. 蓝色犁头霉原生质体的制备与再生[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 20-22.
- [68] NI Y, CHEN R R. Accelerating whole-cell biocatalysis by reducing outer membrane permeability barrier[J]. Biotechnol. Bioeng., 2004, 87(6): 804-811.
- [69] RONG S, TANG X, GUAN S, *et al.* Effects of impeller geometry on the 11 α -hydroxylation of canrenone in rushton turbine stirred tanks[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2021, 31(6): 890-901.
- [70] 张晓丽, 荣绍丰, 丁保妹. 11 α -羟基坎利酮生物转化中副产物的影响因素[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(1): 17-20.