

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.10.009

表达 KstD 重组大肠杆菌 转化甾体化合物的条件优化^①

任 尧, 牛 杨, 王薇伊, 葛方兰,
李 江, 杨 欣, 李 维, 陈贵英

四川师范大学 生命科学学院, 成都 610100

摘要: 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶是胆固醇降解的关键酶之一, 能脱去甾酮 C_{1,2} 位上的氢原子, 形成双键, 在甾体药物的合成过程中具有重要的作用. 以异源表达 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶的重组大肠杆菌为材料, 对其培养条件以及黄体酮转化条件进行了优化, 实现了甾体化合物的高效转化. 首先, 对表达 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶基因的重组大肠杆菌的培养条件对黄体酮脱氢的影响进行了研究, 结果表明, IPTG 浓度为 0.05 mmol/L, 在 28 °C, pH 值为 7 的条件下诱导培养 5 h, 获得最高转化活性的细胞; 其次, 以优化条件下获得的菌体为催化剂, 研究了各种转化条件对底物转化的影响, 结果表明, 以甲基- β -环糊精为助溶剂, 转化温度为 37 °C, 底物质量浓度为 6 g/L, 菌体量为 100 g/L, pH 为 7.0, 黄体酮的转化率达到 99% 以上, 比优化前的产量提高了 2 倍, 转化率提高近 1 倍.

关键词: 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶; 重组大肠杆菌; 诱导; 转化; 黄体酮

中图分类号: Q81

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)10-0043-08

甾体化合物是一类广泛存在于动、植物体内以环戊烷多氢菲为基础的衍生脂质. 自 20 世纪 50 年代以来, 甾体化合物的生物转化一直备受关注^[1]. 一方面, 它是众多微生物的碳源及能源物质^[2]; 另一方面, 它在转化过程中产生多种重要的药物中间体^[3], 如: 雄甾-4-烯-3, 17-二酮(androst-4-ene-3, 17-dione, 简称 AD), 具有雄性激素的作用, 被广泛应用于治疗男性器官疾病、风湿性关节炎和各类感染性炎症等. 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶(KstD)为黄素蛋白酶类^[4], 它既属于胞内酶, 也属于诱导酶, 是甾醇类化合物降解过程的关键酶之一^[5], 它能脱去甾体化合物母核 A 环上 C_{1,2} 位上的氢原子, 形成双键, 从而使甾体类药物的抗炎活性成倍增加.

KstD 存在于多种放线菌中, 例如分枝杆菌、红球菌、假单胞菌以及节细菌中, 而来源不同的 KstD 表现出了不同的底物偏好性^[6-10]. 本试验 KstD 来源于具有甾体化合物高效降解力的戈登氏菌(*Gordonia neofelifaecis*)NRRL B-59395, 该菌株由本实验室在云豹的粪便中分离得到^[11]. 通过对该菌株基因组测序, 我们找出了 5 个可能编码的 *KstD* 基因并进一步进行了底物专一性试验, 筛选出了具有最广泛底物特异性的 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶 KstD3gor^[12-13]. 我们将 PCR 克隆得到的 KstD3gor 基因片段连接到 pET28a 表达载体上, 并转入大肠杆菌, 获得了 KstD3gor 活性表达. 该异源表达的大肠杆菌对胆甾双烯、雄烯二酮等

① 收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271332); 四川省教育厅资助项目(17ZAO323); 四川省高校重点实验室开放项目(SCYZ201401); 四川省大学生创新创业项目(201410636012).

作者简介: 任 尧(1990-), 女, 四川广元人, 硕士, 助理实验师, 主要从事微生物催化与生物转化的研究.

通信作者: 葛方兰, 副教授.

具有 90% 以上的转化率, 对黄体酮、环氧黄体酮具有 60% 左右的转化率。

为进一步提高重组菌的转化率和产物产量, 本研究以价格相对低廉的黄体酮为甾体化合物底物, 对 KstD 重组大肠杆菌的诱导条件及底物转化工艺进行优化。值得注意的是, 由于 KstD 即属于胞内酶, 也属于诱导酶, 只有当底物具有 C_{1,2} 位饱和键的 3-甾酮化合物时才能诱导表达^[14], 而甾醇类化合物水溶性差, 因此筛选助溶效果好、毒性小的助溶剂对表达条件的优化显得尤为重要^[15]。因此, 在优化条件的设置上, 除了浓度、温度、pH 等培养条件重组菌株转化活性的影响外, 还应考虑各种理化条件对甾醇化合物转化效率的影响。通过本研究, 我们分别获得到了活性细胞的最佳诱导条件以及底物的转化条件, 在此条件下, 产量增加了 2 倍, 转化率达到 99% 以上, 该结果为 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶应用于甾醇类药物的工业生产探寻了有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与培养基

表达 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶基因的重组大肠杆菌为本实验室构建。将来自戈登氏菌 *Gordonia neofelificae* NRRL B-59395 的 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶编码基因插入到 pET28a, 再导入 *Escherichia coli* BL21, 获得表达 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶基因的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET28a-kstD。

LB 培养基^[16]: 称取胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, NaCl 10 g, 加水溶解后定容至 1 L, 调节 pH 为 7.0, 121 °C 高温高压灭菌后使用。若需配置固体培养基则再加入 20 g 琼脂条。

基础培养基: 称取葡萄糖 1 g, NH₄NO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.25 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g, 酵母浸粉 5 g, 加水溶解; 称取 0.1 g FeSO₄ · 7H₂O 到 100 mL 水中, 混匀后加入 1 mL 于溶液中, 加水定容至 1 L, 调节 pH 为 7.2, 121 °C 高温高压灭菌后使用。

1.1.2 主要试剂

IPTG, Tris 均购自生工生物工程(上海)有限公司; 氨苄青霉素, 卡那霉素购买于 Amresco 公司; 黄体酮, PMS 购买于 Sigma 公司; 酵母提取物(Yeast extract), 胰蛋白胨(Tryptone)购自 OXOID; 羟丙基- β -环糊精, β -环糊精, 甲基- β -环糊精购于山东致远生物科技有限公司; 吐温-80(Tween-80)购于美国 Amresco 公司。其他如乙酸乙酯、环己烷、氯仿、异戊醇、醋酸钠等为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法

将 *E. coli* BL21/pET28a-kstD 接种至含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 振荡过夜培养, 然后按 3% 接种量转接至新鲜 250 mL TB 液体培养基, 培养 3 h 至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 向菌液中加入 IPTG 诱导 5 h。取诱导菌液, 4 °C, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。用 100 mL pH 为 7.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液重悬细胞, 用于甾体化合物的全细胞转化。

1.2.2 底物包埋处理

取 10 mL 80% 乙醇溶解黄体酮和环糊精(摩尔比约为 1:1)混合物, 超声波功率为 220 W, 超声助溶 30 min, 直至溶液澄清无颗粒物为止。然后置于旋转蒸发瓶内, 设置温度 50 °C, 旋转蒸干后用 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液重新溶解底物。

1.2.3 转化方法

向 Tris-HCl 缓冲液中投入 0.1% (w/v) 黄体酮 和 0.3% (w/v) 环糊精, 超声助溶 30 min, 加入培养好的重组细胞, 置于 37 °C 摇床中继续培养, 分 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h 及 12 h 这 6 个不同时间梯度取样, 取样后的转化液用等体积的乙酸乙酯进行萃取, 适当稀释, 进行 TLC 分析或将萃取样品真空干燥, 用色谱纯甲醇溶解产物, 进行功率 80%, 时间 2 min 超声助溶, 然后用 0.22 μ m 有机过滤膜过滤除杂质, 进行 HPLC 分析。

$$\text{黄体酮转化率} = (A - B) / A \times 100\%$$

A 为转化液中黄体酮的初始量(g), B 为转化液中黄体酮的残余量(g)。

1.2.4 检测方法

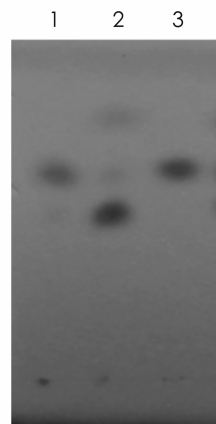
将上述准备的全细胞转化液样品, 按如下条件进行 TLC 分析和 HPLC 检测. TLC 板: GF25410 × 10 cm, TLC 展开剂为环己烷/乙酸乙酯(6 : 4), 展层时间约为 20 min. 黄体酮在 254 nm 下均有特有的吸收峰, 因此可以采用 HPLC 法对产物进行定量的分析. HPLC 条件: 色谱柱为岛津 WondaSil C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 流动相甲醇与水的比例为 70 : 30, 流速 1 mL/min, 进样量 20 μL.

2 试验结果

2.1 黄体酮的静息细胞转化与检测方法

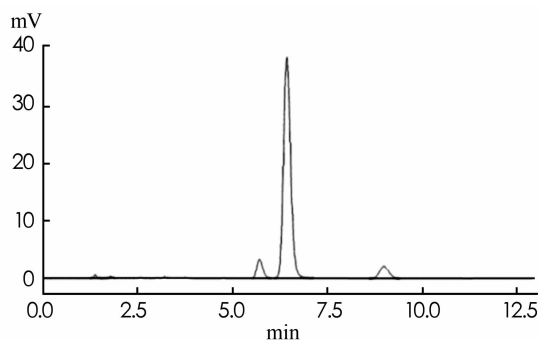
利用表达 3-甾酮-Δ¹ 脱氢酶基因的重组大肠杆菌静息细胞为催化剂, 对黄体酮进行转化, 具体转化方法详见试验方法 1.2.2. 萃取转化液, 进行薄层层析和 HPLC 分析, 结果如图 1 和图 2.

由图 1 可知, 第 2 道与第 1 道比较, 经过重组菌的转化, 与对照样品相对应位置的条带变淡变弱, 并产生了新的产物条带. 而仅含有 pET28a 载体的大肠杆菌对照组没有任何变化. 说明重组的 *E. coli* BL21/pET-28a-ksdd 具有转化底物的能力, 而对照 *E. coli* BL21/pET-28a 没有转化黄体酮的能力, 显示重组菌表达 KstD 并对黄体酮进行了生物催化和转化. 随着转化时间的延长, 黄体酮产量不断变低甚至消失, 转化产物条带变得更浓(结果未显示). 经 HPLC 检测, 如图 2 所示, 底物黄体酮的保留时间为 6.5 min, 转化液中检测到的保留时间为 6.5 min 化合物质量分数极低, 同时检测到保留时间为 9 min 的新产物, 说明绝大部分的底物都被重组细胞转化.

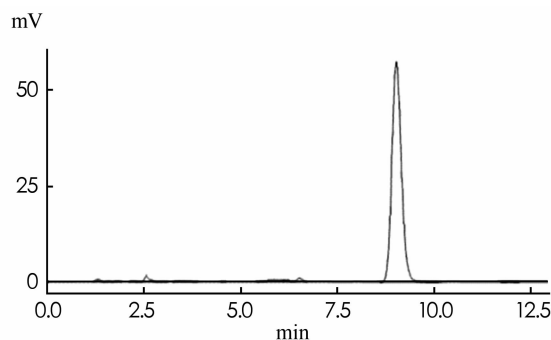


1: 黄体酮; 2: 重组菌转化产物;
3: 含空载的大肠杆菌转化产物

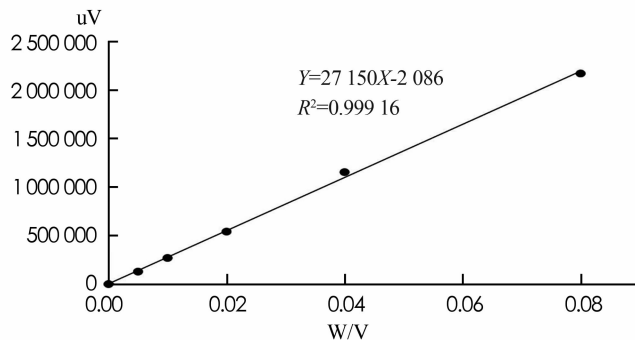
图 1 重组大肠杆菌转化产物 TLC 分析



(a) 黄体酮



(b) 转化产物



(c) 黄体酮标准曲线

图 2 重组菌转化产物的 HPLC 分析

利用 HPLC 测定黄体酮标准对照品的浓度, 通过外标法绘制黄体酮标准对照品的标准曲线, 曲线方程为: $Y=27\ 150X-2\ 086$, 并且 $R^2=0.999\ 16$. 从以上曲线方程的相关数据可知, 经外标法所建立的标准曲线方程在测定浓度范围内存在良好线性关系, 可进行转化产物中黄体酮质量分数的测定. 经计算底物黄体酮转化率为 98.47%.

2.2 重组菌株培养条件的优化

2.2.1 诱导剂浓度对重组细胞转化活性的影响

为探明不同浓度的诱导物对细胞转化活性的影响, 将 IPTG 设置 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15 mmol/L 等 6 个浓度梯度, 其他条件及方法按照试验方法 1.2 进行重组细胞的诱导和转化活性检测. 结果如图 3. 随着 IPTG 浓度的增加, 转化率不断增加, 当达到 0.05 mmol/L 时, 底物转化率达到最高值, 此后随着 IPTG 用量的增大, 底物转化率反而有所下降. 其可能的原因是诱导剂 IPTG 有一定毒性, 对菌体生长不利, 从而使细胞转化活性随着 IPTG 浓度的升高达到一定值后反而下降.

2.2.2 诱导温度对重组细胞转化活性的影响

诱导物 IPTG 浓度设置为 0.05 mmol/L, 分别在 24 °C, 26 °C, 28 °C, 30 °C 与 32 °C 的温度下进行诱导培养, 获得的细胞再进行转化试验. 结果如图 4. 随着温度的增加, 转化活性逐渐增强, 在 28 °C 时, 重组细胞转化活性达到最高, 高于该温度后, 转化活性开始明显下降.

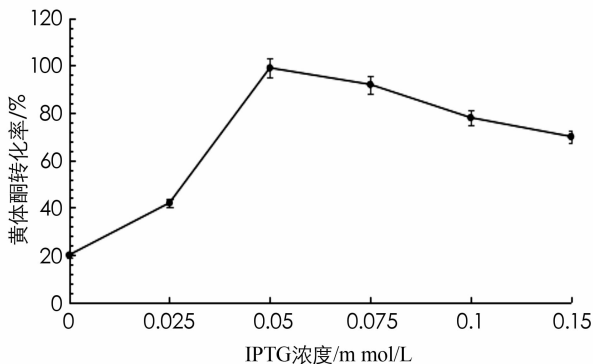


图 3 诱导剂对重组细胞转化活性的影响

2.2.3 诱导时间对重组细胞转化活性的影响

重组菌于 28 °C 条件下培养, 用 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导, 诱导时间分别设置为 2, 3, 4, 5, 6 和 7 h. 利用所获得的细胞方法进行转化试验. 结果如图 5. 随着诱导培养时间的延长, 细胞转化活性逐渐增强, 当诱导时间达到 5 h 后时, 获得的细胞具有最高的转化活性, 5 h 以后, 随着诱导时间的延长, 底物转化率反而下降. 原因可能是在诱导过程中, 发酵液里存在着一些使表达的重组蛋白发生降解的因素, 例如蛋白酶的降解, pH 变化的影响等, 从而产生酶活在诱导时间超过 5 h 后酶活反而下降的现象, 还有可能是随着外源蛋白的大量积累, 不能折叠成有活性的目的蛋白.

2.2.4 诱导 pH 对重组细胞转化活性的影响

pH 是菌体生长和产物合成非常重要的一个指标, 对于发酵过程是非常重要的. 不同种类的微生物对 pH 的要求是不同的. 为了确定有利于培养高转化活性细胞的最佳 pH 条件, 重组菌于 28 °C 条件下培养, 用 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导, 将初始 pH 值分别设定为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0. 其他培养条件不变,

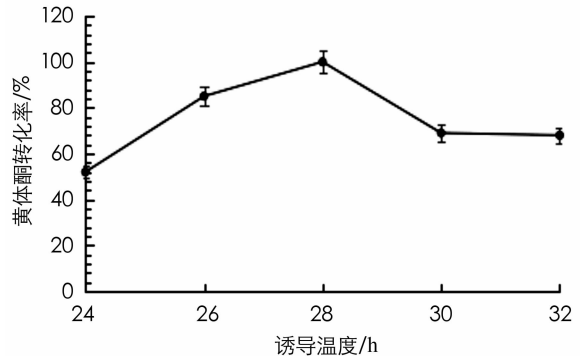


图 4 诱导温度对重组细胞转化活性的影响

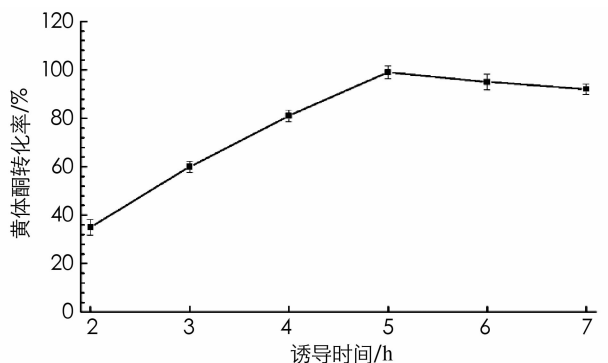


图 5 诱导时间对重组细胞转化活性的影响

进行生物转化试验. 由图 6 可知, 在 pH 值为 7.0 的条件下转化活性最高, 测得其转化率为 100%.

2.3 重组菌株底物转化条件的优化

2.3.1 底物助溶剂对黄体酮转化率的影响

甾醇化合物难溶于水, 因此底物黄体酮在水相中的有效溶解, 是甾醇微生物转化的制约因素. 黄体酮的溶解度很低, 而 KstD 是胞内酶, 底物必须溶解后才能扩散进入细胞内进行反应. 为增加黄体酮的溶解度, 本文采用 β -环糊精、甲基- β -环糊精及羟丙基- β -环糊精等作为助溶剂, 按照方法 2.1 所述, 包埋底物后进行黄体酮的转化, 结果如图 7. 分别以甲基- β -环糊精和羟丙基- β -环糊精助溶剂, 转化 12 h 时, 底物均能全部被转化, 虽然前者相对于羟丙基- β -环糊精在 2~10 h 的转化时间段内, 其黄体酮的转化率均高于后者, 但二者都可被视为该底物的最佳助溶剂.

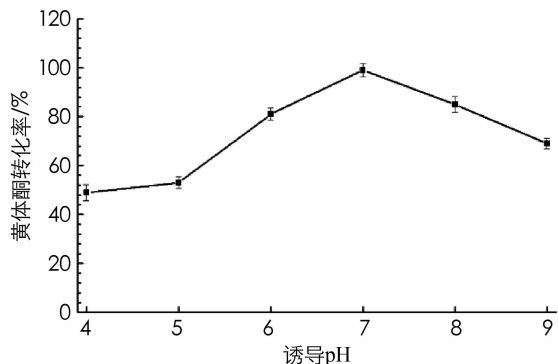


图 6 诱导 pH 对重组细胞转化活性的影响

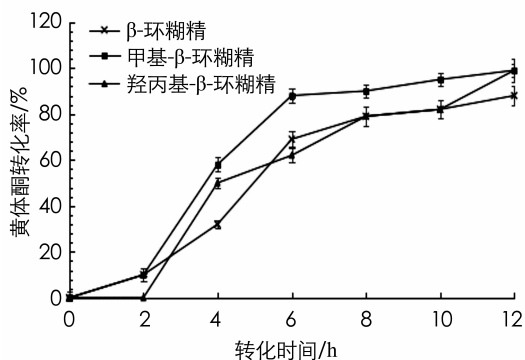


图 7 底物助溶剂对黄体酮转化率的影响

2.3.2 底物质量浓度对底物黄体酮转化率的影响

为了解底物质量浓度对转化率的影响, 将底物初始质量浓度设定为 2, 4, 6, 8 g/L, 利用重组细胞进行转化, 测定转化率, 如图 8. 由此可知转化 12 h 后, 在底物质量浓度为 6 g/L 的条件下, 黄体酮的转化率可接近 100%, 当底物质量浓度升高到 8 g/L, 转化效率降低为 72%. 由此可知当底物质量浓度为 6 g/L 及以下条件时, 转化率均可接近 100%. 过低过高均不能实现产量的最大化, 因此 6 g/L 为最佳的投料量.

2.3.3 细胞量对底物黄体酮转化率的影响

考察细胞量对底物转化的影响, 选用投底物质量浓度为 6 g/L 的条件下, 投入助溶剂甲基- β -环糊精 6 g/L, 如图 9. 随着反应体系中细胞量的增大, 底物黄体酮的转化率不断增加, 当细胞达到 100 g/L 时, 黄体酮的转化率达到 100%. 当体系中细胞量增大到 150 g/L, 底物转化率基本相同. 因此, 最优的细胞量为 100 g/L 将会被后续研究所用.

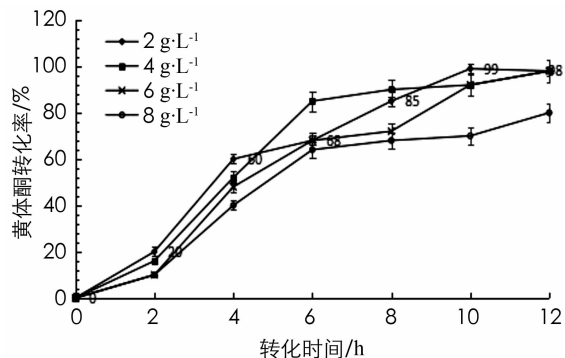


图 8 底物浓度对黄体酮转化率的影响

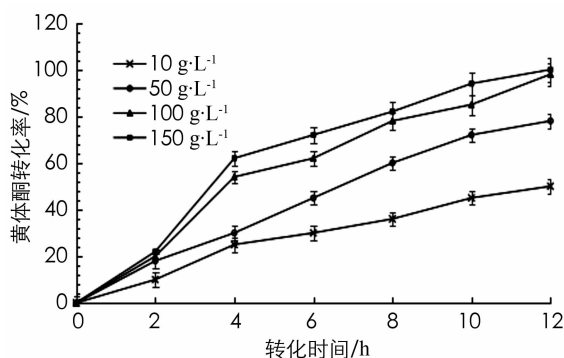


图 9 细胞量对黄体酮转化率的影响

2.3.4 转化 pH 对底物黄体酮转化率的影响

微生物的生长最适 pH 和底物转化的最适 pH 往往是不同的. 如果 pH 值不合适, 就会抑制产物的合

成。所以研究初始 pH 值对提高黄体酮转化率是非常有意义的。选取的初始 pH 值为 6.5, 7.0 及 7.5, 结果如图 10。当初始 pH 值为 7.0 时, 最有利于底物黄体酮的转化。

2.3.5 转化温度对黄体酮转化率的影响

分别在 27, 32, 37, 42 °C 等 4 个不同的温度条件下进行转化, 结果如图 11。在 37 °C 时表达的 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶转化率始终最高, 温度过低或过高均会导致底物转化率降低。分析原因, 酶的最适反应温度为 37 °C 左右, 高于 37 °C 时酶活力降低, 低于 37 °C 转化率急剧降低, 因此, 高于或低于 37 °C 均不适合底物的生物转化。

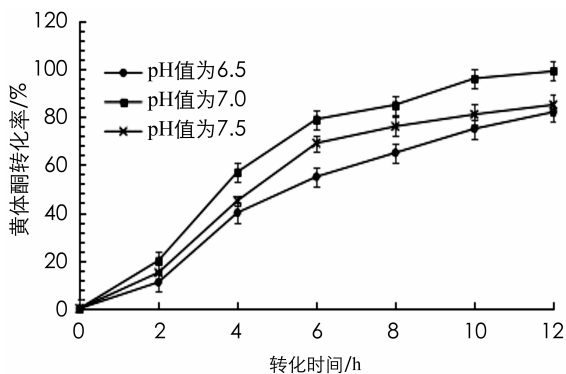


图 10 转化 pH 对黄体酮转化率的影响

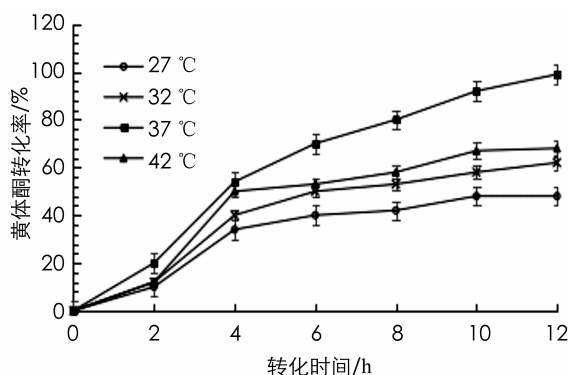


图 11 转化温度对黄体酮转化率的影响

3 讨 论

抗炎甾体激素药物 A 环 $C_{1,2}$ 位导入双键后, 抗炎作用能够成倍增加, 以醋酸可的松为例, A 环中 $C_{1,2}$ 位上脱氢形成双键, 转化成醋酸脱氢可的松, 其抗炎作用能够提高 4 倍左右, 同时由钠滞留而带来的副作用也大为减弱。因此, 甾醇化合物 $C_{1,2}$ 位脱氢反应是氢化泼尼松及其同系物的工业生产过程中关键的一类反应。采用化学方法进行 A 环 $C_{1,2}$ 位脱氢, 具有收率低、所使用化学试剂毒性大、环境污染严重等不利因素, 因此在工业生产中, 普遍使用微生物转化法。目前, 由于甾体化合物底物水溶性极低, 导致微生物转化法的转化率和产量不高, 成为甾体药物生产中的瓶颈。3-甾酮- Δ^1 脱氢酶广泛存在于微生物中, 能够催化甾酮 $C_{1,2}$ 位的脱氢反应从而形成双键, 在甾体药物的合成过程中具有重要的作用。在前期研究中, 我们分别从戈登氏菌、分枝杆菌中克隆了 5 个可能的 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶编码基因, 并在大肠杆菌中实现了异源表达, 对其中一个来自于 *Gordonia neofelifaecis* 的可溶性表达量高、底物适应性广、转化活性强的候选基因进行了进一步的研究, 发现该基因改造的重组大肠杆菌对胆甾双烯 (androst-4, 9(11)-dien-3, 17-dione) 和雄烯二酮都具有 90% 以上的转化率, 对黄体酮与环氧黄体酮具有 60% 左右的转化率。为进一步提高转化率和产物产量, 本研究以黄体酮为底物, 研究重组大肠杆菌培养和转化的最佳条件, 为该工程菌的工业应用奠定基础。

首先, 对表达 3-甾酮- Δ^1 脱氢酶基因的重组大肠杆菌的培养条件对黄体酮脱氢的影响进行了研究。研究表明, IPTG 浓度为 0.05 mmol/L, 在 28 °C, pH 值为 7.0 的条件下诱导培养 5 h, 获得最高转化活性的细胞; 其次, 以优化条件下获得的菌体为催化剂, 研究了各种转化条件对底物转化的影响, 结果表明, 以甲基- β -环糊精为助溶剂, 转化温度为 37 °C, 底物质量浓度为 6 g/L, 菌体量为 100 g/L, pH 值为 7.0, 黄体酮的转化率接近 100%, 比优化前的产量提高了 2 倍, 转化率提高近 1 倍。甾体化合物较低的水溶性是制约甾体生物转化效率的主要影响因素, 为了提高底物的水溶性, 研究者们做了不少的努力, 有的利用有机-水两相系统 (organic-aqueous biphasic systems), 有的研究了浊点系统 (cloud-point systems) 等进行转化, 由于有机试剂的使用, 一方面一定程度抑制了细胞的活性; 另一方面, 增加了最后产品的纯化步骤, 因此在生产应用上受到较大的局限。本研究在前人研究的基础上, 研究了 3 种助溶剂的助溶效果。结果表明,

甲基- β -环糊精在 2~12 h 的时间段效果更佳, 在转化 12 h 时, 均接近 100% 的转化, 由于羟丙基- β -环糊精比甲基- β -环糊精价格低廉近 1 倍, 在实际生产中, 可视情况进行选择。

参考文献:

- [1] 任 尧, 程世君, 马彩虹, 等. 耻垢分枝杆菌烯酰辅酶 A 水合酶编码基因表达分析及其敲除质粒的构建 [J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2015, 38(1): 126-133.
- [2] GARCIA J L, UHIA I, GALAN B. Catabolism and Biotechnological Applications of Cholesterol Degrading Bacteria [J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(6): 679-699.
- [3] WEI W, WANG F Q, FAN S Y, et al. Inactivation and Augmentation of the Primary 3-Ketosteroid- Δ 1-Dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwlB-01; Biotransformation of Soybean Phytosterols to 4-Androstene-3, 17-Dione or 1, 4-Androstadiene-3, 17-Dione [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4578-4582.
- [4] 袁家代, 陈贵英, 程世君, 等. 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因在分枝杆菌中的异源表达与 9 α -羟基雄烯二酮的制备 [J]. 生物工程学报, 2015, 31(4): 523-533.
- [5] 张乐乐, 张 显, 邵明龙, 等. 表达 3-甾酮- Δ 1-脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾-1, 4-二烯-3, 17-二酮 [J]. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1589-1600.
- [6] CHOI K P, MOLNAR I, MUROOKA Y. Secretory Overproduction of *Arthrobacter Simplex* 3-ketosteroid- Δ 1-Dehydrogenase by *Streptomyces Lividans* with a Multi-Copy Shuttle Vector [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43(6): 1044-1049.
- [7] MOLNAR I, CHOI K P, YAMASHITA M, et al. Molecular Cloning, Expression in *Streptomyces Lividans*, and Analysis of a Gene Cluster from *Arthrobacter Simplex* Encoding 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase, 3-ketosteroid- Δ 5-isomerase and a Hypothetical Regulatory Protein [J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(5): 895-905.
- [8] VAN DER GEIZE R, HESSELS G I, VAN GERWEN R, et al. Targeted Disruption of the *kstD* Gene Encoding 3-ketosteroid Δ 1-Dehydrogenase Isoenzyme of *Rhodococcus Erythropolis* SQ1 [J]. *Applied Environ Microbiology*, 2000, 66(5): 2029-2036.
- [9] BRZOSTEK A, SLIWINSKI T, RUMIJOWSKA-GALEWICZ A, et al. Identification and Targeted Disruption of the Gene Encoding the Main 3-ketosteroid Dehydrogenase in *Mycobacterium Smegmatis* [J]. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2393-2402.
- [10] KNNOL J, BODEWITS K, HESSELS G I, et al. 3-Keto-5 α -steroid Δ (1)-dehydrogenase from *Rhodococcus Erythropolis* SQ1 and its Orthologue in *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv are Highly Specific Enzymes that Function in Cholest-4-en-3-one Catabolism [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 410(2): 339-346.
- [11] LIU Y C, CHEN G Y, GE F L, et al. Efficient Biotransformation of Cholesterol to Androsta-1, 4-diene-3, 17-dione by a Newly Isolated Actinomycete *Gordonia Neofelifaecis* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(4): 759-765.
- [12] LI W J, GE F L, ZHANG Q Y, et al. Identification of Gene Expression Profiles in the Actinomycete *Gordonia Neofelifaecis* Grown with Different Steroids [J]. *Genome*, 2014, 57(6): 345-353.
- [13] ZHANG Q Y, REN Y, HE J Z, et al. Multiplicity of 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase Enzymes in *Gordonia Neofelifaecis* NRRL B-59395 with Preferences for Different Steroids [J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(4): 1961-1971.
- [14] 李 玉, 路福平, 李 斌, 等. 3-甾酮- Δ 1-脱氢酶的融合表达及纯化 [J]. 化学与生物工程, 2006, 23(9): 34-37.
- [15] 申雁冰, 王 敏, 王永乐, 等. 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.
- [16] J. 萨姆布鲁克 [美]. 分子克隆实验指南(上下) [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2009.

Optimization of Fermentation Process for Dehydrogenation of Steroid by Recombinant *Escherichia Coli* Expressing 3-sterone- Δ^1 Dehydrogenase Gene

REN Yao, NIU Yang, WANG Wei-yi, GE Fang-lan,
LI Jiang, YANG Xin, LI Wei, CHEN Gui-ying

College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610100, China

Abstract: 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase is one of the key enzymes for the degradation of cholesterol, and plays important role in the process of synthesis of steroidal drugs through catalyzing specifically the elimination hydrogen atoms of the C-1 and C-2 of 3-ketosteroids to form double bond. In our previous study, a recombinant *Escherichia coli* strain expressing 3-sterone- Δ^1 dehydrogenase has been constructed. In the present study, the effects of fermentation conditions on dehydrogenation of steroid by recombinant *Escherichia coli* expressing 3-sterone- Δ^1 dehydrogenase has been investigated. At first, the effects of pH value, concentration of IPTG, temperature on progesterone dehydrogenation activity of cells have been studied. The results indicate when IPTG concentration is 0.05 mM, the temperature is 28°C, and pH value is 7, induced for 5 h, cells with the highest transformation activity have been obtained; Secondly, using the bacterial cell as the catalyst, the effects of the various conditions on the transformation of the substrate were investigated. The results show that using the methyl-beta-cyclodextrin as cosolvent, transformation temperature is 37°C, the substrate concentration is 6 g/L, the biomass is 100 g/L, and pH value is 7.0, progesterone conversion rate reaches at 100%, yield is increased to three times as compared with that of before, and the conversion rate is increased nearly one fold of before.

Key words: 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase; recombinant *E. coli*; induction; transformation; progesterone

责任编辑 周仁惠