



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103382445 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 06

(21) 申请号 201310181803. 7

(22) 申请日 2013. 05. 16

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M2012522 2012. 12. 11

(71) 申请人 湖北共同生物科技有限公司

地址 441002 湖北省襄樊市长虹路 47 号世
纪新城 7-1602

(72) 发明人 系组斌 卢蕾 卢方欣

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12P 33/16(2006. 01)

C12R 1/32(2006. 01)

权利要求书3页 说明书8页

(54) 发明名称

用于制备雄烯二酮的微生物菌株及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于制备雄烯二酮的微生物菌株,其保藏号为 CCTCC NO:M2012522。利用上述菌株制备雄烯二酮的步骤包括:A、一级种子罐发酵,菌株的接种量为 0.5-1.5%,在 27-35℃, 160-200rpm, 0.03-0.07MPa 条件下培养 30-42h; B、二级种子罐发酵,菌株的接种量为 8-12%,同条件下培养 20-30h; C、发酵罐发酵转化生成雄烯二酮,菌株的接种量为 10-14%;在 27-35℃, 0.03-0.07MPa 条件下培养; D、停止转化:甾醇低于 0.5%, PH8.9-9.0,放罐,升温到 90-100℃维持 30-50min,然后冷却到 30-50℃,停止搅拌,静置 4-6 小时。本发明提供了一种分枝杆菌的高效发酵菌株,同时利用表面活性剂、豆油与发酵液形成双向系统,改进发酵工艺,极大的提升了原料的投料量和微生物的转化率。

1. 用于制备雄烯二酮的微生物菌株,其名称为 *Mycobacterium* sp. GTF-69,属于分枝杆菌 *Mycobacterium*,保藏日期 2012 年 12 月 11 日,保藏号 CCTCC NO:M2012522;其主要特征如下:其主要特征如下:革兰氏染色阳性 G+, 细胞为杆状,过氧化氢酶阳性,V. P. 反应阴性,甲基红试验阴性,吡啶试验阴性,发酵植物甾醇生成 4AD 雄烯二酮和少量 ADD 雄二烯二酮。

2. 利用权利要求 1 的菌株制备雄烯二酮的方法,其特征在于:该方法包括如下步骤:

A、一级种子罐发酵:按照下表进行培养基的配制:

成分	浓度, g/L	有效体积为 400L 的量, Kg
玉米浆	50.0	20.00
葡萄糖 / 红糖	6.0	2.40
NaNO ₃	5.4	2.16
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6	0.24
泡敌	1.0	0.40

菌株的接种量为 0.5-1.5%, 在 27-35 °C, 160-200rpm, 0.03-0.07MPa 条件下培养 30-42h;

B、二级种子罐发酵:按照下表进行培养基的配制:

成分	浓度, g/L	有效体积为 2.5M ³ , Kg
玉米浆	50.0	125.0
葡萄糖 / 红糖 r	6.0	15.0
NaNO ₃	5.4	13.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6	1.5
泡敌	1.0	2.5

菌株的接种量为 8-12%, 在 27-35 °C, 160-200rpm, 0.03-0.07MPa 条件下培养 20-30h;

C、发酵罐发酵转化生成雄烯二酮:按照下表进行培养基的配制:

成分	浓度, g/L	有效体积为 21m ³ 的量, Kg
玉米浆	50.0	1050.0
NaNO ₃	5.4	113.4
(NH ₄) ₂ PO ₄	0.6	12.6
豆饼油	160.0	3360.0

甾醇	40	735
----	----	-----

菌株的接种量为 10-14% ;在 27-35℃,0.03-0.07MPa 条件下培养 ;

D、停止转化 :要求甾醇低于 0.5%,为重量 / 体积比, TLC 薄层色谱无斑点, PH8.9-9.0, 放罐,升温到 90-100℃维持 30-50min,然后冷却到 30-50℃, 停止搅拌,静置 4-6 小时。

3. 根据权利要求 2 所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于 :步骤 A 中培养基的配料方法为 :按照所述配方准确称取各成分,并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐,并定容到 360L ;定容后培养基的 PH 在 3.5-4.3 之间,用 NaOH 调 PH 至 8.3-8.5 之间,然后加入泡敌,并在 124 度下灭菌 30 分钟。

4. 根据权利要求 2 所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于 :步骤 B 中培养基的配料方法为 :按照所述配方准确称取各成分,并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐,并定容到 2000L ;定容后培养基的 PH 在 3.5-4.3 之间,用 NaOH 调 PH 至 8.3-8.5 之间,然后加入泡敌,并在 124 度下灭菌 30 分钟。

5. 根据权利要求 2 所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于 :步骤 C 中培养基的配料方法为 :首先准确称取培养基各成分,将油和甾醇放入发酵罐升温至 80-90℃,并开动搅拌浆维持 20 分钟,然后再将其他成分加入并使用工业用水定容到 16.5m³ ;此时培养基 pH 在 3.5-4.0 之间,使用 NaOH 调节 PH 至 8.3-8.5,按照以下步骤灭菌 :首先在 100℃保温 40min,然后在灭菌温度 125℃下保温 30min。

6. 根据权利要求 2 所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于 :步骤 D 之后还包括如下后续工艺 :

E、雄烯二酮的提取 :

E-1、发酵液静止分水 :步骤 D 中的发酵液趁热打入油相储罐,静置 4 小时分水,将水相打入水相储罐,之后放入废水池 ;留在油相储罐中的为油相 ;

E-2、油相加热除水 :油相储罐中的油相打入萃取罐中加热除水,将萃取罐中的油相加热到 85 度,加热过程中调节变频器使萃取罐搅拌速度为 50 转 / 分,在 85 度静止保温 1 小时,之后将盘管中热水换为工业水,使发酵液冷却至 50 度。放掉萃取罐中下层水相 ;

E-3、油相真空加热除水 :维持油相温度为 53 度,抽真空为 -0.08 兆帕,搅拌速度为 70 转 / 分,当温度上升至 60 度时停止抽真空 ;

E-4、添加甲醇 :将盘管中热水换为工业水,使油相冷却至室温 ;萃取罐中留 0.7 吨油相,将剩余的油相放入卧室气泡中 ;开启甲醇储罐的管道泵,通过甲醇计量灌,在萃取罐中加入 1.05 吨甲醇 ;

E-5、提取 :搅拌速度为 110 转 / 分,搅拌时间为 30 分钟 ;

E-6、分离 :提取后将提取液空压入缓冲灌 ;打开螺杆泵,使缓冲灌中的提取液回流混合 ;检查碟式分离机是否已经进行清洁 ;检查无误后开始使用碟式分离机分离提取液 ;碟式分离机分离出的重相进入重相缓冲灌,轻相进入轻相缓冲灌 ;同时用螺杆泵将重相缓冲灌中的重相打入重相储罐,用空压将轻相缓冲灌中的轻相压入轻相储罐 ;

E-7、再次提取与分离 :将重相罐中的重相用螺杆泵打入萃取罐按照第 E-4、E-5 和 E-6 步骤的方法添加甲醇、提取和分离 ;按同样方法再提取三次 ;

E-8、浓缩 :将轻相用空压压入 3 吨浓缩罐进行浓缩 ;浓缩条件是 :温度为 60 度,常压,

上一个冷凝器用工业水冷凝,下一个冷凝器用冷冻水冷凝;当3吨浓缩罐中的甲醇相剩有1吨左右时用空压将其压入2吨的浓缩罐中继续浓缩;

E-9、2吨浓缩罐的浓缩条件为:温度为60度,常压,上一个冷凝器用工业水冷凝,下一个冷凝器用冷冻水冷凝,同时搅拌,搅拌速度为60转/分;

E-10、当2吨浓缩罐中的浓缩液为1吨时,停止浓缩;冷却,使温度为40度,搅拌2小时,继续冷却至室温,再搅拌4小时;

E-11、过滤:将2吨浓缩罐中的浓稠液打入抽滤缸中抽滤;母液打入母液储罐中;抽滤缸滤袋中的粗品继续抽干;得到粗品;称重。

7. 根据权利要求6所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于:步骤E之后还包括如下后续工艺:

F、雄烯二酮的精制:

F-1、洗涤:称取200公斤粗品,按重量:体积=1:5加入乙酸乙酯,搅拌,加热至60度溶解粗品;按粗品:自来水=1:2加入自来水;60度搅拌洗涤30分钟,静止分层,分掉下层水相,降温至不回流,趁热抽滤,母液打入母液储罐;

F-2、脱色:滤饼打入脱色罐,按粗品重量:体积=1:10加入甲醇,按粗品重量的5%加入活性炭;加热至62度,搅拌、回流30分钟;

F-3、过滤:在袋式过滤器中过滤活性炭,回流反复过滤,直至从视盅观察的滤液澄清为止;反复过滤完后用少量甲醇溶液洗涤脱色罐,之后通过过滤器过滤;滤液打入结晶罐中浓缩;

F-4、浓缩:常压,温度为60度,浓缩至体积的一半时,停止浓缩;

F-5、结晶:通过用工业水换掉夹套中热水的形式将温度降至40度,维持2小时,再将夹套中的水全部换为工业水,冷却至室温,维持2小时;之后将夹套中工业水换掉一半使其冷却,维持2小时,再将夹套中的水全部换为冷冻水,维持4小时;整个过程同时缓慢搅拌结晶;冷冻水要求回流至盐水池;

F-6、过滤:将结晶罐中的结晶及溶液打入抽滤缸,母液滤干后用少量甲醇洗涤滤饼,使母液无色为止;母液打入母液储罐;取结晶样品烘干,送样检测;对检测结果进行详细的记录;如果检测结果合格,则直接进入第F-8步;如果检验不合格,则进入第F-7步;

F-7、二次结晶:不合格样品称重,按重量:体积=1:5加入甲醇,加热至60度使其完全溶解;按F-5步进行结晶,按F-6步进行过滤;

F-8、烘干:经检验产品合格后,将产品倒入托盘中,推入热循环烘箱中,调节蒸汽,观察温度计,使温度为55度进行烘干,每隔1个小时翻盘一次;共烘8小时;

F-9、包装:产品过筛后按照要求进行包装。

8. 根据权利要求2所述的制备雄烯二酮的方法,其特征在于:步骤D之后采用HPLC法或HPTLC法对的雄烯二酮含量进行检测。

用于制备雄烯二酮的微生物菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物发酵技术领域。

背景技术

[0002] 目前甾体类药物中间体雄烯二酮（雄甾 4-烯-3, 20-二酮，AD）的制备存在两条主要的途径，一是薯蓣皂苷元途径，二是微生物转化途径。薯蓣皂苷元一般是从野生中药材“穿地龙”等植物中提取，再经化学合成制备雄烯二酮，其工艺复杂，成本高，对环境污染严重。微生物降解甾醇的工作开始于 20 世纪 60 年代，已发现有多种微生物能够降解甾醇，其产物雄烯二酮（AD）和雄甾 1, 4-二烯-3, 17-二酮（ADD）可以作为合成睾丸酮、甲基睾丸酮、雌甾酚酮和肾上腺皮质激素等许多甾体激素药物的中间体。20 世纪 70 年代初，日本的马君应用微生物降解胆甾醇生产 ADD 获得成功。此后，自然界的动、植物甾醇为原料生产甾体药物的研究工作发展迅速，其中多数是以 AD、ADD 作为甾体药物合成的中间体。

[0003] 对甾醇降解过程的研究表明，AD(D) 只是降解途径中的中间产物，在 9-羟化酶的作用下能够进一步降解成 CO₂ 和 H₂O。如果破坏 9-羟化酶的基因，AD(D) 就无法进一步降解，从而能够在发酵液中得到累积。本发明通过复合诱变方法得到了 9-羟化酶缺陷菌株，具有积累 AD(D) 的能力，而且该突变株还具有高浓度底物耐受性。

[0004] 此外，底物甾醇在水中溶解度低是生物转化生产雄烯二酮的瓶颈。在单水相发酵过程中添加少量有机溶剂或表面活性剂来提高底物浓度，效果并不理想；高聚物 / 高聚物双水相系统对底物的增溶能力有限且价格较贵，不适合大规模工业生产。有机溶剂 / 水两液相系统增溶能力有所提高，但缺点是有机溶剂对细胞的毒性以及有机溶剂的挥发性，增加了环境、安全的复杂性等。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是针对现有 4AD 发酵菌种不稳定、发酵过程中投料浓度低、转化率低等问题，提供一种分枝杆菌的高效发酵菌株，同时利用表面活性剂、豆油与发酵液形成双向系统，改进发酵工艺，极大的提升了原料的投料量和微生物的转化率。

[0006] 为解决上述技术问题，本发明所采取的技术方案如下。

[0007] 用于制备雄烯二酮的微生物菌株，归类于放线菌中的分枝杆菌属分枝杆菌种，拉丁名为 *Mycobacterium* sp，命名为 *Mycobacterium* sp. GTF-69，保藏单位为中国典型培养物保藏中心，保藏地址：中国武汉武汉大学，保藏日期 2012 年 12 月 11 日，保藏号 CCTCCNO：M2012522；其主要特征如下：革兰氏染色阳性 G⁺，细胞为杆状，过氧化氢酶阳性，V.P. 反应阴性，甲基红试验阴性，吲哚试验阴性，发酵植物甾醇生成 4AD 雄烯二酮和少量 ADD 雄二烯二酮。

[0008] 利用上述菌株制备雄烯二酮的方法，该方法包括如下步骤：

[0009] A、一级种子罐发酵：按照下表进行培养基的配制：

[0010]

成分	浓度, g/L	有效体积为 400L 的量, Kg
玉米浆	50.0	20.00
葡萄糖 / 红糖	6.0	2.40
NaNO ₃	5.4	2.16
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6	0.24
泡敌	1.0	0.40

[0011]

[0012] 菌株的接种量为 0.5–1.5%，在 27–35℃, 160–200rpm, 0.03–0.07MPa 条件下培养 30–42h；

[0013] B、二级种子罐发酵：按照下表进行培养基的配制：

[0014]

成分	浓度, g/L	有效体积为 2.5M ³ , Kg
玉米浆	50.0	125.0
葡萄糖 / 红糖 r	6.0	15.0
NaNO ₃	5.4	13.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6	1.5
泡敌	1.0	2.5

[0015] 菌株的接种量为 8–12%，在 27–35℃, 160–200rpm, 0.03–0.07MPa 条件下培养 20–30h；

[0016] C、发酵罐发酵转化生成雄烯二酮：按照下表进行培养基的配制：

[0017]

成分	浓度, g/L	有效体积为 21m ³ 的量, Kg
玉米浆	50.0	1050.0
NaNO ₃	5.4	113.4
(NH ₄) ₂ PO ₄	0.6	12.6
豆饼油	160.0	3360.0
甾醇	40	735

[0018] 菌株的接种量为 10–14%；在 27–35℃, 0.03–0.07MPa 条件下培养；

[0019] D、停止转化：要求甾醇低于 0.5%，为重量 / 体积比，TLC 薄层 色谱无斑点，PH 8.9–9.0，放罐，升温到 90–100℃ 维持 30–50min，然后冷却到 30–50℃，停止搅拌，静置 4–6 小时。

[0020] 作为本发明的一种优选技术方案，步骤 A 中培养基的配料方法为：按照所述配方准确称取各成分，并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐，并定容到 360L；定容后培养基的 PH 在 3.5–4.3 之间，用 NaOH 调 PH 至 8.3–8.5 之间，然后加入泡敌，并在 124 度下灭菌 30 分钟。

[0021] 作为本发明的一种优选技术方案，步骤 B 中培养基的配料方法为：按照所述配方准确称取各成分，并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐，并定容到 2000L；定容后培养基的 PH 在 3.5–4.3 之间，用 NaOH 调 PH 至 8.3–8.5 之间，然后加入泡敌，并在 124 度下灭菌 30 分钟。

[0022] 作为本发明的一种优选技术方案，步骤 C 中培养基的配料方法为：首先准确称取培养基各成分，将油和甾醇放入发酵罐升温至 80–90℃，并开动搅拌浆维持 20 分钟，然后再将其他成分加入并使用工业用水定容到 16.5m³；此时培养基 pH 在 3.5–4.0 之间，使用 NaOH 调节 PH 至 8.3–8.5，按照以下步骤灭菌：首先在 100℃ 保温 40min，然后在灭菌温度 125℃ 下

保温 30min。

[0023] 作为本发明的一种优选技术方案,步骤 D 之后还包括如下后续工艺:

[0024] E、雄烯二酮的提取:

[0025] E-1、发酵液静止分水:步骤 D 中的发酵液趁热打入油相储罐,静置 4 小时分水,将水相打入水相储罐,之后放入废水池;留在油相储罐中的为油相;

[0026] E-2、油相加热除水:油相储罐中的油相打入萃取罐中加热除水,将萃取罐中的油相加热到 85 度,加热过程中调节变频器使萃取罐搅拌速度为 50 转/分,在 85 度静止保温 1 小时,之后将盘管中热水换为工业水,使发酵液冷却至 50 度。放掉萃取罐中下层水相;

[0027] E-3、油相真空加热除水:维持油相温度为 53 度,抽真空为 -0.08 兆帕,搅拌速度为 70 转/分,当温度上升至 60 度时停止抽真空;

[0028] E-4、添加甲醇:将盘管中热水换为工业水,使油相冷却至室温;萃取罐中留 0.7 吨油相,将剩余的油相放入卧室气泡中;开启甲醇储罐的管道泵,通过甲醇计量灌,在萃取罐中加入 1.05 吨甲醇;

[0029] E-5、提取:搅拌速度为 110 转/分,搅拌时间为 30 分钟;

[0030] E-6、分离:提取后将提取液空压入缓冲灌;打开螺杆泵,使缓冲灌中的提取液回流混合;检查碟式分离机是否已经进行清洁;检查无误后开始使用碟式分离机分离提取液;碟式分离机分离出的重相进入重相缓冲灌,轻相进入轻相缓冲灌;同时用螺杆泵将重相缓冲灌中的重相打入重相储罐,用空压将轻相缓冲灌中的轻相压入轻相储罐;

[0031] E-7、再次提取与分离:将重相罐中的重相用螺杆泵打入萃取罐按照第 E-4、E-5 和 E-6 步骤的方法添加甲醇、提取和分离;按同样方法再提取三次;

[0032] E-8、浓缩:将轻相用空压压入 3 吨浓缩罐进行浓缩;浓缩条件是:温度为 60 度,常压,上一个冷凝器用工业水冷凝,下一个冷凝器用冷冻水冷凝;当 3 吨浓缩罐中的甲醇相剩有 1 吨左右时用空压将其压入 2 吨的浓缩罐中继续浓缩;

[0033] E-9、2 吨浓缩罐的浓缩条件为:温度为 60 度,常压,上一个冷凝器用工业水冷凝,下一个冷凝器用冷冻水冷凝,同时搅拌,搅拌速度为 60 转/分;

[0034] E-10、当 2 吨浓缩罐中的浓缩液为 1 吨时,停止浓缩;冷却,使温度为 40 度,搅拌 2 小时,继续冷却至室温,再搅拌 4 小时;

[0035] E-11、过滤:将 2 吨浓缩罐中的浓稠液打入抽滤缸中抽滤;母液打入母液储罐中;抽滤缸滤袋中的粗品继续抽干;得到粗品;称重。

[0036] 作为本发明的一种优选技术方案,步骤 E 之后还包括如下后续工艺:

[0037] F、雄烯二酮的精制:

[0038] F-1、洗涤:称取 200 公斤粗品,按重量:体积 = 1:5 加入乙酸乙酯,搅拌,加热至 60 度溶解粗品;按粗品:自来水 = 1:2 加入自来水;60 度搅拌洗涤 30 分钟,静止分层,分掉下层水相,降温至不回流,趁热抽滤,母液打入母液储罐;

[0039] F-2、脱色:滤饼打入脱色罐,按粗品重量:体积 = 1:10 加入甲醇,按粗品重量的 5% 加入活性炭;加热至 62 度,搅拌、回流 30 分钟;

[0040] F-3、过滤:在袋式过滤器中过滤活性炭,回流反复过滤,直至从视盅观察的滤液澄清为止;反复过滤完后用少量甲醇溶液洗涤脱色罐,之后通过过滤器过滤;滤液打入结晶罐中浓缩;

[0041] F-4、浓缩：常压，温度为 60 度，浓缩至体积的一半时，停止浓缩；

[0042] F-5、结晶：通过用工业水换掉夹套中热水的形式将温度降至 40 度，维持 2 小时，再将夹套中的水全部换为工业水，冷却至室温，维持 2 小时；之后将夹套中工业水换掉一半使其冷却，维持 2 小时，再将夹套中的水全部换为冷冻水，维持 4 小时；整个过程同时缓慢搅拌结晶；冷冻水要求回流至盐水池；

[0043] F-6、过滤：将结晶罐中的结晶及溶液打入抽滤缸，母液滤干后用少量甲醇洗涤滤饼，使母液无色为止；母液打入母液储罐；取结晶样品烘干，送样检测；对检测结果进行详细的记录；如果检测结果合格，则直接进入第 F-8 步；如果检验不合格，则进入第 F-7 步；

[0044] F-7、二次结晶：不合格样品称重，按重量：体积 = 1：5 加入甲醇，加热至 60 度使其完全溶解；按 F-5 步进行结晶，按 F-6 步进行过滤；

[0045] F-8、烘干：经检验产品合格后，将产品倒入托盘中，推入热循环烘箱中，调节蒸汽，观察温度计，使温度为 55 度进行烘干，每隔 1 个小时翻盘一次；共烘 8 小时；

[0046] F-9、包装：产品过筛后按照要求进行包装。

[0047] 作为本发明的一种优选技术方案，步骤 D 之后采用 HPLC 法或 HPTLC 法对雄烯二酮含量进行检测。

[0048] 采用上述技术方案所产生的有益效果在于：

[0049] 本发明得到的 9- 羟化酶缺陷菌株具有积累 AD(D) 的能力，而且 该菌株还具有高浓度底物耐受性。

[0050] 本发明实验了多种溶剂与发酵液组成两相系统的转化效果，最后确定资源丰富、价格低廉的豆饼油与表面活性剂配合，共同与发酵液形成双向系统；由于豆油具有较好的乳化能力，可以促进甾醇与微生物细胞的接触，因此转化效果最好，最适合大规模工业化生产，本发明微生物转化率可以达到 95.5% 以上，投料浓度达到 40g/l 以上。

[0051] 本发明还在中试规模的基础上建立了一整套微生物转化植物甾醇制备雄烯二酮的发酵调控工艺，检测方法，提取工艺和精制工艺，便于将雄烯二酮的制备工艺放大到大规模工业生产中。

[0052] 保藏说明

[0053] 保藏菌种归类于放线菌中的分枝杆菌属分枝杆菌种，拉丁名为 *Mycobacterium* sp, 命名为 *Mycobacterium* sp. GTF-69, 保藏单位为中国典型培养物保藏中心，保藏地址：中国，武汉，武汉大学；保藏日期 2012 年 12 月 11 日，保藏号 CCTCCNO：M2012522。

具体实施方式

[0054] 以下实施例详细说明了本发明。本发明所使用的各种原料及各项设备均为常规市售产品，均能够通过市场购买直接获得。

[0055] 实施例 1. 复合诱变获得 9- 羟化酶缺陷型突变株

[0056] 1.1 出发菌株：*Mycobacterium* sp. NRRLB-3683

[0057] 1.2 筛选路线：原始菌株 → 分离纯化 → 出发菌 (*Mycobacterium* sp. NRRLB-3683) → 新鲜斜面菌种 → 孢子悬液 → UV 照射 → ⁶⁰Co 照射 → 亚硝基胍处理 → YAG 倍频脉冲激光 → 平板分离 → 单菌落 → 初筛、复筛 → 正突变变异株

[0058] 1.3 孢子悬液的制备：将出发菌株 (*Mycobacterium* sp. NRRL B-3683) 新鲜斜面用

无菌水洗下,并转移到灭菌的、装有玻璃珠的三角瓶中,在 28℃、200r/min 的旋转摇床上振荡 30min,制成浓度约为 10^7 个 /ml 的菌悬液。

[0059] 1.4UV 照射:将菌悬液放于 15W 紫外灯下(距离 30cm),分别照射 1、2、3、4、5min,随后避光保存。

[0060] 1.5 γ 射线 (^{60}Co) 诱变处理:避光保存的悬液 5ml 于直径 1.3cm,长 10cm 的透明玻璃试管中进行 γ 射线 (^{60}Co) 照射。照射剂量分别为 300GY、600GY、900GY、1200GY、1500kGY。

[0061] 1.6 亚硝基胍诱变:亚硝基胍质量浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$,诱变时间分别为 10、20、30、40min,诱变结束后将菌悬液稀释 1000 倍,终止诱变。

[0062] 1.7YAG 倍频脉冲激光:将菌悬液用 YAG 倍频脉冲激光照射,波长 532nm,能量密度为 50mJ/脉冲,脉冲频率为 1 次/s,辐照次数分别为 200、600、900。

[0063] 1.8 色谱分析条件:十八烷基硅烷键合反相色谱柱(ODS, 4.6mm \times 250mm, 5 μm , 大连依利特科学仪器有限公司);流动相甲醇-水(80 : 20);进样量 5 μL ;流速 0.8ml/min;柱温 50℃;检测波长 242nm。发酵液 1ml,用 4 倍体积甲醇浸泡 1h 以上,吸取上清液用 HPLC 测定转化产物生成的量。

[0064] 实施例 2. 微生物在双相系统中转化植物甾醇制备雄烯二酮的发酵调控工艺

[0065] 2.1 一级种子罐(700L)发酵

[0066] 2.1.1 培养基成分

[0067]

成分	浓度, g/L	有效体积为 400L 的量, Kg
玉米浆	50.0	20.00
葡萄糖 / 红糖	6.0	2.40
NaNO_3	5.4	2.16
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.6	0.24
泡敌	1.0	0.40

[0068] 2.1.2 配料:按照上述配方准确称取各成分,并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐,并定容到 360L。定容后培养基的 PH 大约在 3.5-4.3 之间,用 NaOH(40%)调至 8.3-8.5 之间,然后加入泡敌,并在 124 度下灭菌 30 分钟。

[0069] 2.1.3 培养条件:接种量 1%, 31℃, 180rpm, 0.05MPa, 30-42h

[0070] 2.2 二级种子罐(4000L)发酵

[0071] 2.2.1 培养基成分

[0072]

成分	浓度, g/L	有效体积为 2.5M3, Kg
玉米浆	50.0	125.0
葡萄糖 / 红糖 r	6.0	15.0
NaNO_3	5.4	13.5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.6	1.5
泡敌	1.0	2.5

[0073] 2.2.2 配料:按照上述配方准确称取各成分,并将除泡敌以外的其他培养基成分全部投入发酵罐,并定容到 2000L。定容后培养基的 PH 大约在 3.5-4.3 之间,用 NaOH(40%)调至 8.3-8.5 之间,然后加入泡敌,并在 124 度下灭菌 30 分钟。

[0074] 2.2.3 培养条件:接种量 10%, 31℃, 180rpm, 0.05MPa, 20-30h

[0075] 2.3 发酵罐发酵及转化生成雄烯二酮

[0076] 2.3.1 培养基成分

[0077]

成分	浓度, g/L	有效体积为 21m ³ 的量, Kg
玉米浆	50.0	1050.0
NaNO ₃	5.4	113.4
(NH ₄) ₂ PO ₄	0.6	12.6
豆饼油	160.0	3360.0
甾醇	40	735

[0078] 2.3.2 培养基的配置

[0079] 首先准确称取培养基各成分,将油和甾醇放入发酵罐升温至 80-90℃,并开动搅拌浆维持 20 分钟,然后再将其他成分加入并使用工业用水定容到 16.5m³。此时培养基 pH 大约在 3.5-4.0。使用 40%NaOH 调节 PH 至 8.3-8.5。按照以下步骤灭菌:首先在 100℃保温 40min,然后在真正灭菌温度下 125℃保温 30min。

[0080] 2.3.3 微生物转化的各项参数

[0081] 接种量 12%;31℃,0.05MPa,通气量:按照以下步骤调节:起始—t₀28-30thh—1:1.2VVM(最大.)29-33thh—结束:根据 PH 将通气量逐步降低到最低(1:0.5VVM)。转速:按照以下步骤调节起始—28-30thh—200rpm(Max.)29-33thh—结束:根据 PH 需要将转速逐步调至最低(150rpm)。D₀:维持其在 20%以上。PH:在转化过程中 PH 是变化的,但在 PH 为 8.2-8.6 之间转化最佳。

[0082] 2.3.4 停止转化

[0083] 要求甾醇低于 0.5%,为重量/体积比,TLC 无斑点。此时 PH8.9-9.0,放罐。升温到 90-100℃维持 40min。然后冷却到 40℃,停止搅拌,静置 5 小时。(也可以磷酸调 PH6.4-6.5 加快分层)。

[0084] 实施例 3. 微生物在双相系统中转化植物甾醇制备雄烯二酮的检测方法

[0085] 3.1HPLC 检测方法:

[0086] 3.1.1 检测条件:液相色谱泵;紫外可见检测器;水:蒸馏水,再经过 0.45 μm 滤膜过滤;甲醇:HPLC 试剂。

[0087] 3.1.2 色谱条件:色谱柱:C18(4.6*1505um);流动相:甲醇:水=65:35;流速:1ml/min;溶剂:甲醇;检测波长:240nm。

[0088] 3.1.3 步骤:

[0089] ①精密称量 20mg 工作标准品,置于 100ml 容量瓶中,用少量甲醇溶解后,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

[0090] ②取一定体积发酵液油相(称其重量 W₁),加等体积三氯甲烷(称其重量 W₂)。混匀,离心 15min,称得其上层水重量 W_水,再吸一定克数下层液 W_{下层液}(油+三氯甲烷相)于烧杯中,在 65℃下烘 15min 加 2ml 乙酸乙酯超声溶解到 25ml 容量瓶中,甲醇定容、过滤。

[0091] ③在上述条件下,待仪器基线稳定后,分别取标准品溶液和待测品溶液各 20μl 进样,并记录峰值响应。

[0092] ④含量的计算:

$$[0093] \quad \frac{A_2 \times M_1 \times C_1 \times 25 \times (W_1 - W + W_2)}{A_2 \times (W_1 - W) \times W \times 100 \times 1000} \times 100\%$$

[0094] A_1 —标准品的峰面积 ; A_2 —样品的峰积 ; M_1 —标准品的称量 ; C_1 —对照品的含量 % ;

[0095] 3. 2HPTLC 检测方法 :

[0096] 3. 2. 1 检测条件 :薄层色谱扫描仪 , 薄层电动点样仪 , 紫外分析仪。

[0097] 3. 2. 2 色谱条件 :硅胶 GF254 板 : 规格 (100×100mm) 厚度 (0. 20-0. 25mm) ; 展开剂 : 乙酸乙酯 : 石油醚 =3:7 ; 检测波长 :240nm。

[0098] 3. 2. 3 步骤 :

[0099] ①精密称量 25mg 工作标准品, 置于 50ml 容量瓶中, 用三氯甲烷相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

[0100] ②取一定体积发酵液油相(称其重量 W_1), 加等体积三氯甲烷(称其重量 W_2)。混匀, 离心 15min, 称得上层水重量 $W_{\text{水}}$, 再吸一定体积下层液 $W_{\text{下层液}}$ (油 + 三氯甲烷相) 至 10ml 容量瓶, 用三氯甲烷稀释, 定容。

[0101] ③在上述条件下, 待仪器稳定后, 分别取对照溶液 2ul 和 4ul 及待测品溶液进样, 并记录峰值响应。

[0102] ④含量的计算 :

$$[0103] \quad \frac{N \times 10 \times (W_1 - W + W_2)}{(W_1 - W) \times W} \times 100\%$$

[0104] N—样品检测浓度

[0105] 实施例 4. 微生物在双相系统中转化植物甾醇制备雄烯二酮的提取工艺

[0106] 4. 1 发酵液静止分水 : 发酵液趁热打入油相储罐, 静置 4 小时分水, 将水相打入水相储罐, 之后放入废水池。留在油相储罐中的为油相。

[0107] 4. 2 油相加热除水 : 油相储罐中的油相打入萃取罐中加热除水。将萃取罐中的油相加热到 85 度, 加热过程中调节变频器使萃取罐搅拌速度为 50 转 / 分, 在 85 度静止保温 1 小时, 之后将盘中热水换为工业水, 使发酵液冷却至 50 度。放掉萃取罐中下层水相。

[0108] 4. 3 油相真空加热除水 : 维持油相温度为 53 度, 抽真空为 -0. 08 兆帕, 搅拌速度为 70 转 / 分。当温度上升至 60 度时停止抽真空。

[0109] 4. 4 添加甲醇 : 将盘中热水换为工业水, 使油相冷却至室温。萃取灌中留 0. 7 吨油相, 将剩余的油相放入卧室气泡中。开启甲醇储罐的管道泵, 通过甲醇计量灌, 在萃取灌中加入 1. 05 吨甲醇。

[0110] 4. 5 提取 : 搅拌速度为 110 转 / 分, 搅拌时间为 30 分钟。

[0111] 4. 6 分离 : 提取后将提取液空压入缓冲灌。打开螺杆泵, 使缓冲灌中的提取液回流混合。检查碟式分离机是否已经按照《碟式分离机操作和使用规程》进行清洁。检查无误后开始按照《碟式分离机操作和使用规程》使用碟式分离机分离提取液。碟式分离机分离出的重相进入重相缓冲灌, 轻相进入轻相缓冲灌。同时用螺杆泵将重相缓冲灌中的重相打入重相储罐, 用空压将轻相缓冲灌中的轻相压入轻相储罐。

[0112] 4. 7 再次提取与分离 : 将重相罐中的重相用螺杆泵打入萃取罐按照第 4. 4、4. 5 和 4. 6 步的方法添加甲醇、提取和分离。按同样方法再提取三次。

[0113] 4. 8 浓缩 : 将轻相用空压压入 3 吨浓缩罐进行浓缩。浓缩条件是 : 温度为 60 度, 常压, 上一个冷凝器用工业水冷凝, 下一个冷凝器用冷冻水冷凝。当 3 吨浓缩罐中的甲醇相剩有 1 吨左右时用空压将其压入 2 吨的浓缩罐中继续浓缩。

[0114] 4.92 吨浓缩罐的浓缩条件为 : 温度为 60 度, 常压, 上一个冷凝器用工业水冷凝, 下一个冷凝器用冷冻水冷凝, 同时搅拌, 搅拌速度为 60 转 / 分。

[0115] 4.10 当 2 吨浓缩罐中的浓缩液为 1 吨时, 停止浓缩。冷却, 使温度为 40 度, 搅拌 2 小时, 继续冷却至室温, 再搅拌 4 小时。

[0116] 4.2.11 过滤 : 将 2 吨浓缩罐中的浓稠液打入抽滤缸中抽滤。母液打入母液储罐中。抽滤缸滤袋中的粗品继续抽干。得到粗品。称重。

[0117] 实施例 5. 微生物在双相系统中转化植物甾醇制备雄烯二酮的精制工艺

[0118] 5.1 洗涤 : 称取 200 公斤粗品, 按重量 : 体积 = 1 : 5 加入乙酸乙酯, 搅拌, 加热至 60 度溶解粗品。按粗品 : 自来水 = 1 : 2 加入自来水。60 度搅拌洗涤 30 分钟, 静止分层, 分掉下层水相, 降温至不回流, 趁热抽滤, 母液打入母液储罐。

[0119] 5.2 脱色 : 滤饼打入脱色罐, 按粗品重量 : 体积 = 1 : 10 加入甲 醇, 按粗品重量的 5% 加入活性炭。加热至 62 度, 搅拌、回流 30 分钟。

[0120] 5.3 过滤 : 在袋式过滤器中过滤活性炭, 回流反复过滤, 直至从视盅观察的滤液澄清为止。反复过滤完后用少量甲醇溶液洗涤脱色罐, 之后通过过滤器过滤。滤液打入结晶罐中浓缩。

[0121] 5.4 浓缩 : 常压, 温度为 60 度, 浓缩至体积的一半时, 停止浓缩。

[0122] 5.5 结晶 : 通过用工业水换掉夹套中热水的形式将温度降至 40 度, 维持 2 小时, 再将夹套中的水全部换为工业水, 冷却至室温, 维持 2 小时。之后将夹套中工业水换掉一半使其冷却, 维持 2 小时, 再将夹套中的水全部换为冷冻水, 维持 4 小时。整个过程同时缓慢搅拌结晶。冷冻水要求回流至盐水池。

[0123] 5.6 过滤 : 将结晶罐中的结晶及溶液打入抽滤缸, 母液滤干后用少量甲醇洗涤滤饼, 使母液无色为止。母液打入母液储罐。取结晶样品烘干, 送样检测。对检测结果进行详细的记录。如果检测结果合格, 则直接进入第 5.8 步 ; 如果检验不合格, 则进入第 5.7 步。

[0124] 5.7 二次结晶 : 不合格样品称重, 按重量 : 体积 = 1 : 5 加入甲醇, 加热至 60 度使其完全溶解。按 5.5 步进行结晶, 按 5.6 步进行过滤。

[0125] 5.8 烘干 : 经检验产品合格后, 将产品倒入托盘中, 推入热循环烘箱中, 调节蒸汽, 观察温度计, 使温度为 55 度进行烘干, 每隔 1 个小时翻盘一次。共烘 8 小时。

[0126] 5.9 包装 : 产品过筛后按照要求进行包装。

[0127] 上述描述仅作为本发明可实施的技术方案提出, 不作为对其技术方案本身的单一限制条件。