

文章编号: 1000-5862(2016)03-0239-06

雄烯二酮生产菌耐底物突变株 MN4 生物转化培养基优化

万明, 徐玲霞, 张菊, 施文杰, 王筱兰*

(江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 雄烯二酮的生物转化过程受到较多因素的制约. 通过响应面优化耐底物突变株 MN4 培养基的主要成分以提高转化过程中 AD 的产量. 在摇瓶培养条件下, 通过 Plackett-Burman 实验设计发现玉米浆、 NaH_2PO_4 、豆油是菌株 MN4 降解植物甾醇产生雄烯二酮的主要因素. 采用最陡爬路径逼近最大响应面区域, 然后利用响应面法进行回归分析, 对分支杆菌转化成植物甾醇生成雄烯二酮的培养基进行优化, 确定最佳培养基组成. 实验分析表明, 转化培养基的最佳组成为: 玉米浆 2%、 NaH_2PO_4 0.07%、豆油 14.49%. 利用该培养基进行发酵转化验证实验, 雄烯二酮平均生产量达到 $6.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生物转化率为 55.3%, 比原始生成水平 ($4.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 提高 34%.

关键词: 新金分支杆菌; 雄烯二酮; 耐底物; 培养基优化; 响应面

中图分类号: TQ 929 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2016.03.05

0 引言

雄烯二酮(AD)是合成类固醇激素的原材料和关键中间体,在临床上是不可或缺的药物^[1].目前,可通过多步化学合成和微生物转化途径来制备雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)和雄甾-4,4-二烯-3,17-二酮(ADD)^[2-4].

由于其反应条件温和,生成周期短和高选择性,微生物转化途径已经被广泛应用于类固醇的生成^[5].目前,多数具有药物活性的类固醇都来源于选择性降解植物固醇的侧链.众所周知,由于植物甾醇容易获得,成本低,已经被广泛应用微生物降解生成 C-17 的甾体激素的原材料^[6].然而微生物对甾体化合物的转化过程还是存在很多的限制因素:菌株转化能力普遍较低,高浓度底物投加量对转化过程的抑制,甾体化合物疏水性强,在水中溶解度低^[7-9].本课题组曾以一株能够降解植物甾醇侧链生成 AD 的新金分支杆菌 MN2 菌株为出发菌株,经过紫外与硫酸二乙酯复合诱变技术筛选出了耐底物高产突变株 MN4.在获得耐底物突变株的基础上,对分支杆菌 MN4 转化植物甾醇生成雄烯二酮的培

养基进行优化,确定最佳的培养基成分.

不同于一般的抗生素和氨基酸的转换过程,产物 AD 并不是这个过程中微生物的初级或者次级代谢产物.它是在多酶体系的作用下降解植物甾醇侧链而产生的^[10-11],因此,合适的生物转化介质对微生物的生长和酶的生成有着重要影响.

单因素实验、正交实验通常用于发酵培养基的优化.然而,由于不同因素之间的相互作用被忽视,所以用这些传统的方法来优化培养基成分常常无法确定生物转化过程的最优条件,并且这些方法的实验时间周期也很长^[12-13].为了克服上述缺点,优化变量的参数进行了利用响应面(RSM)^[14].RSM 是一种优化实验条件的教学方法,以多元二次回归方法作为函数估计的工具,通过最少的实验次数,将多因子实验中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合之后,并对函数的响应面进行分析,研究因子与因子之间、因子与响应面之间的相互关系,获得科学的实验结论^[15-16].

本研究的重点是通过利用 Plackett-Burman 设计实验、最陡爬坡实验和响应面法进行优化培养基从而提高 AD 的产率,提高突变株 MN4 代谢过程中 AD 的量.

收稿日期: 2015-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(31360217) 科技部农业科技成果转化项目和江西省科技支撑计划(2014BBC70016) 资助项目.

通信作者: 王筱兰(1965-),女,江西景德镇人,教授,博士,主要从事生物工艺原理、生物工程设备方面的研究.

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验菌种 新金分支杆菌 MN4 20% 甘油, 在 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存于江西师范大学生命科学学院实验室。

1.1.2 培养基 斜面培养基/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 酵母提取物 3, 蛋白胨 5, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 值 6.8~7.2. 液体种子培养基/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蛋白胨 6, 葡萄糖 8, 玉米浆 10, K_2HPO_4 0.5, pH 值 8.0. 未优化的培养基/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 玉米浆 30, 葡萄糖 3, NaNO_3 5.4, NaH_2PO_4 0.6, 植物甾醇 20, 豆油 160, pH 值 8.0~8.5. 灭菌条件: $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 min.

1.1.3 实验试剂 葡萄糖, 玉米浆, 蛋白胨, 磷酸二氢钾, 磷酸二氢钠, 豆油, 植物甾醇(纯度 95%), 雄烯二酮(AD), 雄二烯二酮(ADD), 乙酸乙酯, 甲醇(色谱纯), 甘油。

1.2 培养条件

发酵的 2 个阶段: 菌体的生长和产物的生成. 将保存的雄烯二酮生成菌株活化后, 接种于液体培养基, 于 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm 条件下培养 48 h; 以体积分数为 12% 的接种量转接到未优化的转化培养基上, 于 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm 摇瓶中培养 144 h.

1.3 分析方法

当发酵完成后, 取出 3 mL 的发酵液加入等体积的乙酸乙酯进行萃取 2 次, 漩涡振荡 10 min 至充分溶解, 6 000 rpm 离心 10 min, 收集上清液进行分析测定 AD 含量。

高效液相色谱条件: Waters 2996 高效液相色谱仪; 色谱柱: RC-MC 18($5\text{ }\mu\text{m}$ $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$); 流动相: $v(\text{甲醇}):v(\text{水})=80:20$; 检测波长: 245 nm; 流速: $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ [17]。

1.4 实验设计与统计分析

培养基成分的优化由单因素实验和统计实验设计. 通过对碳源、氮源、豆油、无机盐以及培养基的其他组分进行初步的单因素筛选实验, 结果表明: 玉米浆、葡萄糖、 NaH_2PO_4 、 NaNO_3 对 AD 的产量有重大影响, 这些组分需要进一步地优化. 然后采用 3 步实验设计进行优化培养基中的关键成分 [18-19]. 第 1 步筛选出影响菌株降解植物甾醇产生雄烯二酮的主要因素, 第 2 步通过采用最陡爬坡路径实验逼近最大响应区域, 第 3 步利用 Box-Behnken 试验设计对分枝杆菌转化植物甾醇生成雄烯二酮的培养基进行优

化, 确定最佳的培养基成分。

1.4.1 Plackett-Burman(PB)设计 PB 设计是通用的一种筛选实验设计, 能通过最少的实验次数估计出因素中的主效应, 通过筛选实验来确定单因素的影响, 每个因素设置 2 个水平进行实验, 高水平 and 低水平分别用 +1 和 -1 表示 [20], 根据 PB 设计原理, 选取 6 因素、12 次试验次数的 Plackett-Burman 设计进行生物转化实验, 另外设置 2 个虚拟序列, 用以考察误差, 测定 AD 浓度. PB 试验的设计及结果分别列在表 1 和表 2 中, 因素的可信度高于 90% 的被认为对 AD 产量有重大影响, 并进行进一步的优化。

1.4.2 最陡爬坡实验 最陡爬坡实验使用线性效应的大小和符号来确定方向进行预测最大响应区域 [21], 通过 Plackett-Burman 最初估计的实验最优值并不是真正的最优值附近. 采用最陡爬坡实验逼近最大响应区域, 根据 PB 实验筛选出来的主要影响因素的正负和大小设计爬坡实验, 确定响应面实验的中心点。

1.4.3 响应面设计优化 BBD 设计主要采用响应面方法的进一步优化, 根据初步结果, 3 个因素, 每个水平进行重复 3 次实验 [22], 进行回归分析得到一个符合二次多项模型的响应方程

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2,$$

其中 Y 是响应变量, X_1 , X_2 和 X_3 是输入变量影响响应变量 Y 的值, b_0 是一个常数, b_1 , b_2 , b_3 是线性系数, b_{23} 是叉乘系数, b_{11} , b_{22} , b_{33} 是二次项系数. 以玉米浆、 NaH_2PO_4 和豆油这 3 个显著因素为自变量进行实验的各因素编码水平见表 4, 3 因素 3 水平的中心组合设计及结果见表 5。

1.5 数据分析

每组实验做 3 个平行, 结果取平均值, 研究中的实验设计、数据分析及模型建立皆由 Minitab16.0 软件辅助完成。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计结果与分析

Plackett-Burman 对分支杆菌降解植物甾醇合成雄烯二酮的 8 个因素进行了实验(其中 2 个为虚拟变量, 表 2 中的 C、F2 列), 用于考察实验误差, 实验设计及 AD 的产量见表 1 与表 2, 实验结果采用方程分析, 检验判断实验因素显著与否. 根据统计分析

的结果分析得到 ,豆油、 NaH_2PO_4 、玉米浆这 3 个因素对 AD 的产量有显著影响(见表 1) ,其它变量因素对 AD 产量无明显影响 ,可以忽略. $R\text{-}Sq = 97.09\%$, $R\text{-}Sw(\text{调整}) = 89.33\%$,表明该模型拟合度较好.

表 1 Plackett-Burman 实验设计筛选关键变量

编码	因素	水平		估计值	<i>t</i> 统计量	$Pr > t $	重要性
		-1	1				
A	玉米浆	2.000	2.500	0.679 0	2.95	0.060	3
B	葡萄糖	0.300	0.375	-0.034 3	-0.15	0.891	6
D	NaNO_3	0.580	0.725	-0.309 1	-1.34	0.273	5
E	NaH_2PO_4	0.080	0.100	-0.831 7	-3.61	0.037	2
G	植物甾醇	2.000	2.500	-0.668 7	-2.90	0.067	4
H	豆油	16.000	20.000	0.913 9	3.96	0.029	1

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	AD 含量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	2.63
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	5.83
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.53
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1.58
5	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5.06
6	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3.02
7	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3.43
8	1	1	1	-1	1	1	-1	1	3.01
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	2.27
10	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	3.18
11	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	2.46
12	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	3.06

2.2 最陡爬坡实验结果

PBD 试验中的结果表明 ,对生物转化影响显著的 3 个因素: 玉米浆、豆油和 NaH_2PO_4 ,其中 ,玉米浆和豆油有显著正效应 ,应增加 ,而 NaH_2PO_4 具有显著负效应 ,应减少. 根据这 3 个因素效应值的大小确定变化步长和爬坡方向 ,进行转化实验 ,由表 3 可知 ,在第 2 组实验条件下 ,AD 的浓度最高 ,即豆油 16%、 NaH_2PO_4 0.1%、玉米浆 2.5% ,故以第 2 组的培养组成作为响应面设计因素的中心点.

表 3 最陡爬坡实验结果

实验号	豆油/%	NaH_2PO_4 /%	玉米浆/%	AD 含量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	14	0.12	2.0	4.19
2	16	0.10	2.5	5.76
3	18	0.08	3.0	5.08
4	20	0.06	3.5	3.98
5	22	0.04	4.0	3.46

2.3 响应面法优化转化培养基

以玉米浆、 NaH_2PO_4 和豆油这 3 个因素为自变量进行的 Box-Behnken 实验设计 ,各因素的编码水平如表 4 所示 ,3 因素 3 水平的中心组合设计结果

见表 5. 通过 *P* 值 ,以及 *t* 检验来分析结果(见表 6) ,*P* 值小于 0.05 证明该因素对 AD 的浓度有显著影响. 通过实验发现豆油和 NaH_2PO_4 对 AD 浓度有显著影响 ,而 NaH_2PO_4 与玉米浆直接的交互作用影响并不明显. 回归模型相关系数 $R\text{-}Sq = 91.13\%$, $R\text{-}Sq(\text{调整}) = 75.17\%$,一个回归模型 $R\text{-}Sq$ 高于 90% 被证明具有较高的相关性^[23] . 因此 ,目前的 $R\text{-}Sq$ 反应了较好的观察和预测之间的反应 ,故该模型可用于分析和预测分支杆菌降解植物甾醇生成 AD 的浓度. 回归模型为

$$Y = 6.168\ 7 - 0.595\ 8X_1 + 0.027\ 8X_2 + 0.149X_3 + 0.761\ 5X_1X_2 + 0.282X_1X_3 + 0.963X_2X_3 - 0.499\ 6X_1^2 - 1.024\ 6X_2^2 - 0.545\ 1X_3^2$$

其中 *Y* 是豆油产量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ,*X*₁ 是豆油浓度 ,*X*₂ 是 NaH_2PO_4 浓度 ,*X*₃ 是玉米浆浓度.

表 4 Box-Behnken 试验因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
<i>X</i> ₁ 玉米浆/%	2.00	2.50	3.00
<i>X</i> ₂ NaH_2PO_4 /%	0.06	0.10	0.14
<i>X</i> ₃ 豆油/%	14.00	16.00	18.00

表 5 Box-Behnken 实验设计与结果

实验号	X_1	X_2	X_3	AD 含量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	-1	-1	0	5.49
2	1	-1	0	2.93
3	-1	1	0	4.83
4	1	1	0	5.32
5	-1	0	-1	5.97
6	1	0	-1	4.06
7	-1	0	1	5.62
8	1	0	1	4.84
9	0	-1	-1	5.75
10	0	1	-1	3.07
11	0	-1	1	4.20
12	0	1	1	5.38
13	0	0	0	6.28
14	0	0	0	5.96
15	0	0	0	6.27

表 6 回归模型及系数评估

项	系数	系数标准误	t	P
常量	6.168 67	0.307 9	20.033	0.000
A	-0.595 75	0.188 6	-3.159	0.025
B	0.027 75	0.188 6	0.147	0.889
C	0.149 00	0.188 6	0.790	0.465
A* A	-0.499 58	0.277 6	-1.800	0.132
B* B	-1.024 58	0.277 6	-3.691	0.014
C* C	-0.545 08	0.277 6	-1.964	0.107
A* B	0.761 50	0.266 7	2.856	0.036
A* C	0.282 00	0.266 7	1.057	0.339
B* C	0.963 00	0.266 7	3.611	0.015

此外,该模型的方差分析表如表 7 所示,该模型高度显著($P < 0.000\ 1$) 在 95% 的置信水平区间内^[24] 失拟值的 $P = 0.067$ 表明该模型在变量的范围内可以预测 AD 的产量.

表 7 回归模型的方差分析

来源	自由度	平方和	Adj SS	均方	F	P
回归	9	14.614 3	14.614 3	1.623 81	5.71	0.035
线性	3	3.023 1	3.023 1	1.007 70	3.54	0.104
平方	3	5.244 1	5.244 1	1.748 02	6.14	0.039
交互作用	3	6.347 1	6.347 1	2.115 70	7.44	0.027
残差误差	5	1.422 3	1.422 3	0.284 47		
失拟	3	1.358 2	1.358 2	0.452 73	14.12	0.067
纯误差	2	0.064 1	0.064 1	0.032 07		
总变异	14	16.036 6				

$R-Sq = 91.13\%$ $R-Sq(\text{调整}) = 75.17\%$

为了更好地理解变量对 AD 浓度的影响,预测模型提出了 3 维响应面模型,响应面形状和等高线图表示相应的交互作用^[25]. 图 1 表示的是玉米浆、 NaH_2PO_4 豆和豆油对 AD 浓度影响的响应回归模型图,每个图形表示的是当第 3 个因素保持最优水平时另外 2 个因素对 AD 产量的影响,3D 图形的形状表示 2 个因素之间交互作用显著与否,圆形表示 2 个因素直接的交互作用不显著,椭圆形表示 2 个因素之间交互作用显著.

用优化设计方法确定 AD 浓度 Y 的最优值及 X 的最优组合,产 AD 最优培养基组分为 2% 的玉米浆、14.49% 的豆油和 0.07% 的 NaH_2PO_4 ,AD 最优浓度 Y 的最优预测值为 $6.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

通过对实验所获得的最优培养基浓度进行了发酵转化实验,重复 3 次.在最优培养基条件下,AD 平均浓度达到 $6.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,AD 生成率为 52.6%,可见该模型能够较好地预测实际菌株的发酵情况.

在以前的研究中,许多的方法被用来改善固醇类

生物转化.卡布尔等^[26]报道,在有机相中,当底物初始浓度为 5.28% 时, *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 产 AD 的产率最大为 89%. Zhang Xiaoyan 等^[27]报道,采用 FFD 和 RSM 进行优化培养基后,当植物甾醇浓度为 $8.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,AD 最大浓度为 $5.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 在植物甾醇降解为 AD 和 ADD 浊点系统中,分支杆菌菌株 NRRL B-3683 开始底物浓度为 $14.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的时候获得的转化率为 93%^[28]. A. Malaviya 等^[29]将 *Mycobacterium* sp. 在谷甾醇浓度不断提高的液体培养基中驯化,结果显示在谷甾醇浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的转化体系中,驯化培养的 *Mycobacterium* sp. 的菌株转化率达到 23.8%. 在本文中,当底物浓度的初始是 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,AD 的转化率为 56.3%,文献中报道的 AD 产量的不同可能与菌株的类型、转化培养基成底物浓度、种子液的培养条件有关.与之前研究的早其微生物相比,生成 AD 的菌株 MN4 还具有几个优点,如菌株耐受高底物浓度、高转化率以及反应条件温和.

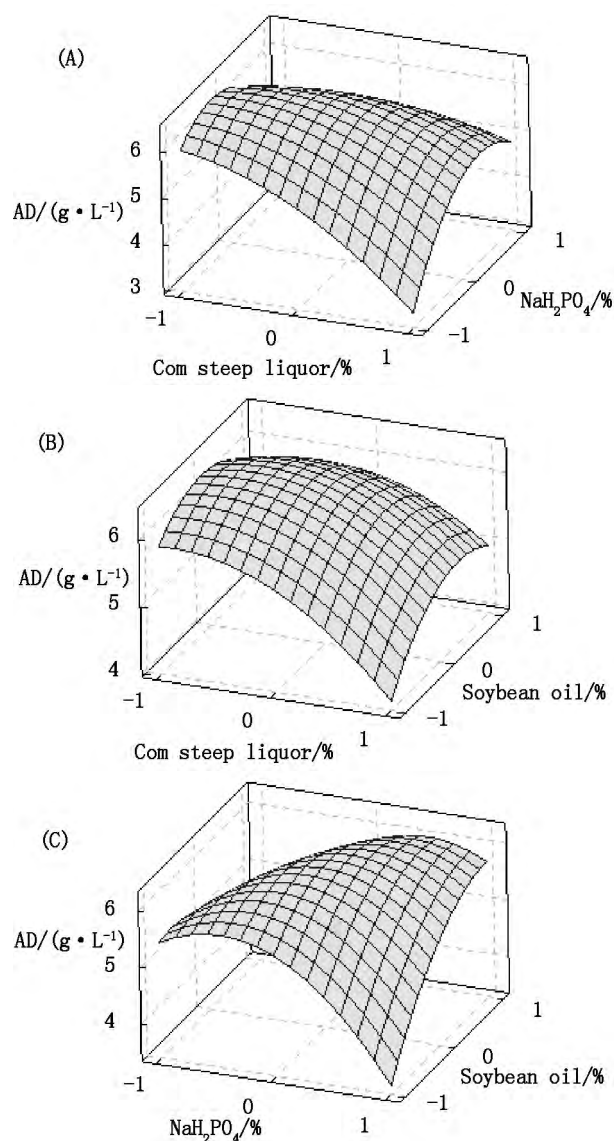


图1 AD产量的响应面分析图

3 结论

本研究表明 响应面提供了一个有效可行的优化AD发酵培养基产率的方法. 通过响应面方法进行优化后的转化培养基, MN4降解植物甾醇产生AD的产量为 $6.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 转化率为55.3% 相比原始生成水平($4.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 提高了34%. 本文通过响应面详细地研究了MN4菌株降解植物甾醇生产AD转培养基的最佳配方, 还需要试验确定该组分浓度大规模生产发酵AD的有效性.

4 参考文献

[1] Zhang Y Q, Wang D Q. Advances in microbial transformation of phytosterol into steroid medicine intermediates [J].

Microbiol 2006, 33(2): 142-46.

- [2] Egorova O V, Nikolayeva V M, Sukhodolskaya G V, et al. Transformation of C 19-steroids and testosterone production by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* spp. [J]. J Mol Catal B-Enzym 2009, 57(1/2/3/4): 198-203.
- [3] Huang C L, Chen Y R, Liu W H. Production of androstenediones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp. [J]. Enzyme Microb Technol 2006, 39(2): 296-300.
- [4] Wang Z F, Huang Y L, Rathman J F, et al. Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione [J]. J Chem Technol Biotechnol 2002, 77(12): 1349-1357.
- [5] 王志龙. 甾醇侧链切除的微生物转化技术 [J]. 工业微生物 2006, 36(3): 49-54.
- [6] Fernandes P, Cabral J M S. Phytosterols: applications and recovery methods [J]. Bioresour Technol 2006, 98(12): 2335-2350.
- [7] Vidal M, Mondaca J B, Silva M. Selection of *Mycobacterium* sp. strains with capacity to biotransform high concentration of β -sitosterol [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2001, 57(3): 385-389.
- [8] Malaviya A, Gomes J. Rapid screening and isolation of fungus for sitosterol to androstenedione biotransformation [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2009, 158(2): 374-386.
- [9] 李莹, 戈梅, 陈代杰. 雄甾烯二酮转化菌株的诱变育种 [J]. 中国医药工业杂志 2003, 34(7): 322-324.
- [10] Yang Ying, Jiang Shaotong, Hu Jinyan, et al. Mutation breeding of strain highly producing Androst-4-ene-3,17-dione from rapeseed sterols [J]. Food Science 2009, 30(5): 145-148.
- [11] 杨英, 姜绍通, 刘模. 响应面法优化雄烯二酮生物转化法工艺 [J]. 食品科学 2010, 31(24): 78-82.
- [12] Yasser R Fattah A, Saeed H M, Gohar Y M, et al. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* by optimization of process parameters through statistical experimental designs [J]. Process Biochem 2005, 40(5): 1707-1714.
- [13] Elibol M. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor*A3(2) with response surface methodology [J]. Process Biochem 2004, 39(9): 1057-1062.
- [14] Gao Hong, Liu Mei, Liu Jintao, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology [J]. Bioresour Technol 2009, 100(17): 4012-4016.
- [15] 刘松, 李祝, 周礼红. 响应面法优化黑曲霉产纤维素酶的发酵条件 [J]. 食品科学 2013, 34(17): 225-229.
- [16] 陈志杰, 韩永斌, 沈昌, 等. Plackett-Burman 设计在灵芝生长及胞外多糖主要影响因子筛选中的应用 [J]. 食品科学 2005, 26(12): 115-229.

- [17] Sharma P ,Slathia P S ,Somal P ,et al. Biotransformation of cholesterol to 1 β -androstadiene-3 β ,17-dione(ADD) by *Neocardia* species [J]. *Ann Microbiol* ,2012 ,62 (4) : 1651–1659.
- [18] Wang Zhiwen ,Liu Xunli. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology [J]. *Bioresour Technol* 2008 99(17) : 8245–8251.
- [19] 张丽铃. 耐底物脲水合酶高产菌选育及其产酶条件优化[D]. 南昌: 江西师范大学 2012.
- [20] Patil S A ,Surwase S N ,Jadhav S B ,et al. Optimization of medium using response surface methodology for L-DOPA production by *Pseudomonas* sp. SSA [J]. *Bio Chem Eng J* , 2013 74: 36–45.
- [21] Chen Q H ,He G Q ,Mokhtar A M A. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology [J]. *Enzyme Microb Technol* 2002 30(5) : 667–672.
- [22] Anderson M J ,Whitcomb P J. RSM simplified: Optimizing process using response surface methods for design of experiments [M]. New York: Productivity Press 2005.
- [23] Chen Xiaochun ,Bai Jianxi ,Cao Jiaming ,et al. Medium optimization for the production of cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate by *Mycobacterium* sp. no. 205 using response surface methodology [J]. *Bioresour Technol* ,2009 ,100 (2) : 919–924.
- [24] Chen J ,Wu S J ,Pan S. Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of *Auerobasidium pullulans* isolated from sea mud through response surface methodology [J]. *Carbohydrate Polymers* 2012 87(1) : 771–774.
- [25] Muralidhar R V ,Chirumamila R R ,Marchant R ,et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. *Bio Chem Eng J* 2001 9(1) : 17–23.
- [26] Cabral J M S ,Aires-Barros M R ,Pinheiro H ,et al. Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells [J]. *J Biotechnol* ,1997 59(1/2) : 133–143.
- [27] Zhang Xiaoyan ,Peng Yong ,Su Zhongrui ,et al. Optimization of biotransformation from phytosterol to androstenedione by a mutant *Mycobacterium neoaurum* ZJUVN-08 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013 14(2) : 132–143.
- [28] Wang Zhilong ,Zhao Fengsheng ,Hao Xueqin ,et al. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system [J]. *J Mol Catal B: Enzym* ,2004 ,27 (4–6) : 147–153.
- [29] Malaviya A K ,Nayak R ,Kumar S ,et al. Staged protocol for acclimatization of *Mycobacterium* sp. DSMZ-2966 to β -sitosterol for improving biotransformation efficiency [M]. Goa , India 2007: 26.

The Optimization of Biotransformation from Phytosterol to Androstenedione by a Substrate-Tolerant mutant Strain MN4

WAN Ming ,XU Lingxia ,ZHANG Ju ,SHI Wenjie ,WANG Xiaolan*

(College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: Biotransformation processing of androstenedione is affected by many factors. Response surface methodology was applied to optimize the medium composition for enhancing the androstenedione production by substrate resistance mutant strains MN4. Corn steep liquor ,NaH₂PO₄ and soybean were found to have significant effects on androstenedione production by the Plackett-Burman design in shaker flask cultivation. The steepest ascent method was used to access the optimal region of the medium composition followed by an application of response surface. The analysis revealed that the optimum values of the tested variables were 2% corn steep liquor 0.07% NaH₂PO₄ and 14.49% soybean oil. Under optimized medium ,the average androstenedione production reached 6.23 g • L⁻¹ and the bioconversion rate was 55.3% ,which was in agreement with the prediction. In comparison to the production of original level (4.65 g • L⁻¹) , 1.34-fold increase had been obtained.

Key words: *mycobacterium neoaurum* MN4; 4-androstene-3 β ,17-dione; substrate-tolerant; medium optimization; response surface methodology

(责任编辑: 刘显亮)