

摘要

微生物转化法是生产高附加值化合物的一种重要方法，通过构建化学-酶法途径修饰母核是热门的绿色制药手段之一。25-羟基维生素 D₃ (25(OH)VD₃) 作为人体中维生素 D₃ 的主要活性形式，可促进人体的钙磷吸收，控制多种细胞反应，具有极高的药用价值。25(OH)VD₃ 作为临床上应用广泛的原料药，其工业生产受限于复杂的化学合成过程和高昂的成本，从而限制其在医药领域的广泛应用。微生物转化维生素 D₃ 合成 25(OH)VD₃ 是一项绿色高效的创新技术，具有替代传统化学合成法的潜力。为了获取具有羟基化维生素 D₃ 功能的微生物，从自然界中筛选新微生物或构建基因工程菌均是有效的手段。本论文采用唯一碳源平板法从自然界分离具有羟化维生素 D₃ 生成目标产物 25(OH)VD₃ 能力的菌株，并对其发酵工艺优化提高转化效率。进一步通过转录组学技术挖掘获得目标菌株中的 C25 羟基化维生素 D₃ 的关键酶基因。在此基础上，通过构建异源表达 C25 位羟基化维生素 D₃ 关键酶的工程菌株，以验证关键酶的催化功能。主要研究结果如下：

(1) **C25 位维生素 D₃ 羟基化菌株的筛选及发酵工艺优化。**通过唯一碳源平板法，从林地土壤中分离获得一株具有羟基化维生素 D₃ 能力的菌株 1-18，可生成目标产物 25(OH)VD₃ 和副产物 1,25-羟基维生素 D₃ (1 α ,25(OH)₂VD₃)。经 16S rDNA 测序鉴定，目标菌株为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)，命名为 *B.megaterium* H-1。通过单因素法优化发酵工艺，确定 *B.megaterium* H-1 的最佳发酵条件为：初始 pH 值 7.5，甘油助溶底物浓度 6% (V/V)，发酵 6 h 时投入底物维生素 D₃，接种量 2% (V/V)。优化后目标产物 25(OH)VD₃ 的浓度在发酵 36 h 时达到 1.43 mg/L。

(2) **C25 羟基化维生素 D₃ 关键酶的挖掘及生物信息学分析。**采用转录组测序技术，对经维生素 D₃ 诱导 12 h 前后的 *B.megaterium* H-1 进行测序分析，共获得 4270 个转录本信息。进一步对含有细胞色素 P450 结构域 (PF00067) 的转录本进行筛选，发现 5 个细胞色素 P450 酶 (CYPs) 基因。结合 NCBI 数据库比对结果发现其中 4 个 CYPs 分别属于 CYP102、CYP106 和 CYP109 家族。其中，来自 CYP109 家族的 CYP-1、CYP-2 分别对应已知维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶 CYP109E1 和 CYP109A2，故将 CYP-1 和 CYP-2 分别命名为 CYP109E1-H 和 CYP109A2-H。通过克隆测序获得其基因序列 *cyp109e1-h* 和 *cyp109a2-h*，经生物信息学分析发现 CYP109E1-H 和 CYP109A2-H 分别为 CYP109E1 和 CYP109A2 的自然突变体，因此推测 CYP109E1-H 和 CYP109A2-H 可能是 *B.megaterium* H-1 中 C25 位羟基化维生素 D₃ 的关键酶。

(3) **C25 羟基化维生素 D₃ 关键酶的异源表达与功能验证。**基于上述结果，成功实现 CYP109E1-H 和 CYP109A2-H 在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 体系中的异源表达，并获得重组基因工程菌 WB600-pMA5-CYP109E1-H 和 WB600-pMA5-

CYP109A2-H。进一步通过重组基因工程菌全细胞转化维生素 D₃ 的研究表明：CYP109E1-H 是维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶，化学选择性高于 CYP109E1；CYP109A2-H 除了具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能外，同时具有 C1 α 位羟基化功能，其催化的反应是一个两步连续羟化维生素 D₃ 的过程。重组菌 WB600-pMA5-CYP109E1-H 在发酵 32 h 时 25(OH)VD₃ 浓度达到最高，为 2.32 mg/L。而重组菌 WB600-pMA5-CYP109A2-H 在发酵 24 h 时主产物 25(OH)VD₃ 浓度达到最高，为 2.50 mg/L；同时还检测到副产物 1 α ,25(OH)₂VD₃，当发酵 40 h 时副产物浓度达到最高，为 1.31 mg/L。

关键词：维生素 D₃，25(OH)VD₃，1 α ,25(OH)₂VD₃，巨大芽孢杆菌，细胞色素 P450 酶

Abstract

Microbial transformation is an important method for the production of high-value compounds, and modifying the precursor through the chemical-enzyme pathway is a popular green pharmaceutical approach. 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)VD₃), as the main active form of vitamin D₃ in the human body, can promote calcium and phosphorus absorption, control various cellular reactions, and has high medicinal value. The industrial production of 25(OH)VD₃ as a widely used raw material in clinical applications is limited by complex chemical synthesis processes and high costs, which restrict its extensive application in the pharmaceutical field. Microbial transformation of vitamin D₃ to synthesize 25(OH)VD₃ is a green and efficient innovative technology with the potential to replace traditional chemical synthesis methods. Screening new microbes from nature or constructing genetically engineered strains are effective means to obtain microbes with hydroxylation capability for vitamin D₃. In this paper, a unique carbon source plate method was used to isolate strains from nature that have the ability to generate the target product 25(OH)VD₃ through hydroxylation, and the fermentation process was optimized to improve the conversion efficiency. Furthermore, transcriptomics techniques were used to explore the key enzyme genes for C25 hydroxylation of vitamin D₃ in the target strain. Based on this, heterologous expression engineering strains of the key enzymes for C25 hydroxylation of vitamin D₃ were constructed to verify the catalytic function of the key enzymes. The main research results are as follows:

(1) Screening and fermentation process optimization of C25-hydroxylation strain for vitamin D₃. A strain capable of hydroxylating vitamin D₃ to produce the target product 25(OH)VD₃ and the byproduct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂VD₃) was isolated from forest soil using a unique carbon source plate method, and identified as *Bacillus megaterium*, named *B.megaterium* H-1, based on 16S rDNA sequencing. The fermentation process was optimized using a one-factor-at-a-time approach, and the optimal fermentation conditions for *B.megaterium* H-1 were determined as follows: initial pH 7.5, glycerol as co-solvent with a concentration of 6% (V/V), addition of substrate vitamin D₃ at 6 h of fermentation, and inoculum size of 2% (V/V). After optimization, the concentration of the target product 25(OH)VD₃ reached 1.43 mg/L at 36 h of fermentation.

(2) Discovery and bioinformatics analysis of key enzymes for C25-hydroxylation of vitamin D₃. Transcriptome sequencing was performed on *B.megaterium* H-1 before and after 12 hours of vitamin D₃ induction, resulting in a total of 4270 transcriptome information. Transcripts containing the cytochrome P450 domain (PF00067) were further screened, and 5

cytochrome P450 (CYPs) genes were identified. Based on the comparison with the NCBI database, four of these CYPs were found to belong to the CYP102, CYP106, and CYP109 families, respectively. Among them, CYP-1 and CYP-2 from the CYP109 family corresponded to known C25-hydroxylases of vitamin D₃, CYP109E1 and CYP109A2, respectively. Therefore, CYP-1 and CYP-2 were named CYP109E1-H and CYP109A2-H, respectively. The gene sequences *cyp109e1-h* and *cyp109a2-h* were obtained through cloning and sequencing, and bioinformatics analysis revealed that CYP109E1-H and CYP109A2-H were natural variants of CYP109E1 and CYP109A2 in *B.megaterium* H-1, suggesting that CYP109E1-H and CYP109A2-H might be the key enzymes for C25-hydroxylation of vitamin D₃ in *B.megaterium* H-1.

(3) Heterologous expression and functional validation of key enzymes for C25-hydroxylation of vitamin D₃. Based on the above results, successful heterologous expression of CYP109E1-H and CYP109A2-H was achieved in *Bacillus subtilis* WB600 system, resulting in recombinant gene engineered strains WB600-pMA5-CYP109E1-H and WB600-pMA5-CYP109A2-H. Further studies on whole-cell transformation of vitamin D₃ by recombinant gene engineered strains revealed that CYP109E1-H acted as a C25-hydroxylase of vitamin D₃ with higher stereoselectivity than CYP109E1. CYP109A2-H not only exhibited C25-hydroxylation activity towards vitamin D₃, but also possessed C1 α -hydroxylation activity, catalyzing a two-step consecutive hydroxylation process of vitamin D₃. The highest concentration of 25(OH)VD₃ produced by WB600-pMA5-CYP109E1-H was achieved at 32 hours of fermentation, reaching 2.32 mg/L. On the other hand, the highest concentration of 25(OH)VD₃ produced by WB600-pMA5-CYP109A2-H was obtained at 24 hours of fermentation, reaching 2.50 mg/L. Additionally, a byproduct, 1 α ,25(OH)₂VD₃, was detected, and its highest concentration was achieved at 40 hours of fermentation, reaching 1.31 mg/L.

Keywords: Vitamin D₃, 25(OH)VD₃, 1 α ,25(OH)₂VD₃, *Bacillus megaterium*, cytochrome P450 enzyme

目 录

| | |
|---|----|
| 第一章 绪论..... | 1 |
| 1.1 维生素 D ₃ 及其活性形式..... | 1 |
| 1.2 C ₂₅ 羟基化维生素 D ₃ 的合成研究..... | 1 |
| 1.2.1 化学合成法..... | 2 |
| 1.2.2 微生物转化法..... | 2 |
| 1.3 维生素 D ₃ 羟基化酶概述..... | 3 |
| 1.3.1 人体及哺乳动物来源的维生素 D ₃ 羟基化酶..... | 3 |
| 1.3.2 微生物来源的维生素 D ₃ 羟基化酶..... | 5 |
| 1.3.3 类固醇 C ₂₅ 位脱氢酶对维生素 D ₃ 的转化..... | 6 |
| 1.4 全细胞转化生产 C ₂₅ 羟基化维生素 D ₃ 的研究进展..... | 6 |
| 1.4.1 将维生素 D ₃ 转化为 C ₂₅ 羟基化维生素 D ₃ 的天然微生物..... | 6 |
| 1.4.2 将维生素 D ₃ 转化为 C ₂₅ 羟基化维生素 D ₃ 的基因工程菌..... | 8 |
| 1.5 本论文的研究意义与主要研究内容..... | 8 |
| 1.5.1 本论文的研究意义..... | 8 |
| 1.5.2 本论文的主要研究内容..... | 9 |
| 第二章 材料与方法..... | 10 |
| 2.1 研究材料..... | 10 |
| 2.1.1 试剂材料..... | 10 |
| 2.1.2 菌株..... | 10 |
| 2.1.3 质粒..... | 10 |
| 2.1.4 引物..... | 11 |
| 2.1.5 培养基..... | 11 |
| 2.1.6 实验试剂..... | 12 |
| 2.1.7 实验仪器..... | 12 |
| 2.2 研究方法..... | 12 |
| 2.2.1 菌种的分离与筛选..... | 12 |
| 2.2.2 菌种的鉴定与系统发育学分析..... | 13 |
| 2.2.3 维生素 D ₃ 的全细胞转化研究..... | 13 |
| 2.2.4 产物的分离与结构鉴定..... | 13 |
| 2.2.5 标准曲线绘制及产物浓度的计算..... | 14 |
| 2.2.6 目标菌株的转录组测序..... | 14 |
| 2.2.7 目的基因的扩增与回收..... | 14 |
| 2.2.8 重组质粒的构建..... | 15 |
| 2.2.9 大肠杆菌 JM109 感受态的制备和转化..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.2.10 <i>B.subtilis</i> 感受态的制备转化和重组基因工程菌的构建 | 16 |
| 2.2.11 P450 的 CO 特征光谱研究 | 16 |
| 2.2.12 分析方法 | 16 |
| 第三章 结果与讨论 | 18 |
| 3.1 C25 位羟基维生素 D ₃ 菌株的筛选及发酵优化 | 18 |
| 3.1.1 目标菌株筛选 | 18 |
| 3.1.2 转化产物的结构鉴定 | 18 |
| 3.1.3 菌株鉴定 | 20 |
| 3.1.4 <i>B.megaterium</i> H-1 转化维生素 D ₃ 的工艺优化 | 21 |
| 3.1.5 最适条件下 <i>B.megaterium</i> H-1 羟化维生素 D ₃ 的过程 | 25 |
| 3.2 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的挖掘及其生物信息学分析 | 26 |
| 3.2.1 <i>B.megaterium</i> H-1 的 RNA-seq 分析 | 26 |
| 3.2.2 候选 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的基因注释与分类 | 27 |
| 3.2.3 候选 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的序列扩增与命名 | 28 |
| 3.2.4 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的生物信息学分析 | 29 |
| 3.3 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的异源表达与功能验证 | 32 |
| 3.3.1 重组 <i>B.subtilis</i> 基因工程菌的构建与验证 | 32 |
| 3.3.2 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的异源表达及特征分析 | 33 |
| 3.3.3 C25 羟基化维生素 D ₃ 关键酶的功能验证 | 35 |
| 3.3.4 重组基因工程菌转化维生素 D ₃ 的过程曲线 | 38 |
| 主要结论与展望 | 39 |
| 主要结论 | 39 |
| 展望 | 40 |
| 参考文献 | 41 |
| 附录 2: 各转化产物的 ¹ H-NMR 谱图 | 48 |

第一章 绪论

1.1 维生素 D₃ 及其活性形式

维生素 D₃ (Vitamin D₃) 被称为“阳光维生素”，是一种脂溶性激素原，除了从食物中获取外，也可以在人体内以 7-脱氢胆固醇 (7-Dehydrocholesterol) 为前体，经紫外线照射合成^[1,2]。维生素 D₃ 在调节钙磷代谢、控制骨细胞的生长发育等方面具有重要作用^[3]。然而，与其活性形式 25-羟基维生素 D₃ (25(OH)VD₃) 和 1,25-羟基维生素 D₃ (1 α ,25(OH)₂VD₃) 相比，维生素 D₃ 的生物活性相对较低^[4]。在人体内，维生素 D₃ 的活化过程需要在细胞色素 P450 酶 (CYPs) 的催化下进行两步羟化反应，才能发挥其全部生物活性^[5]。如图 1-1 所示，维生素 D₃ 首先在肝细胞线粒体中经 CYP27A1 转化为 25(OH)VD₃，进一步在肾细胞中通过 CYP27B1 转化为 1 α ,25(OH)₂VD₃ 以获得其全部活性^[6]。

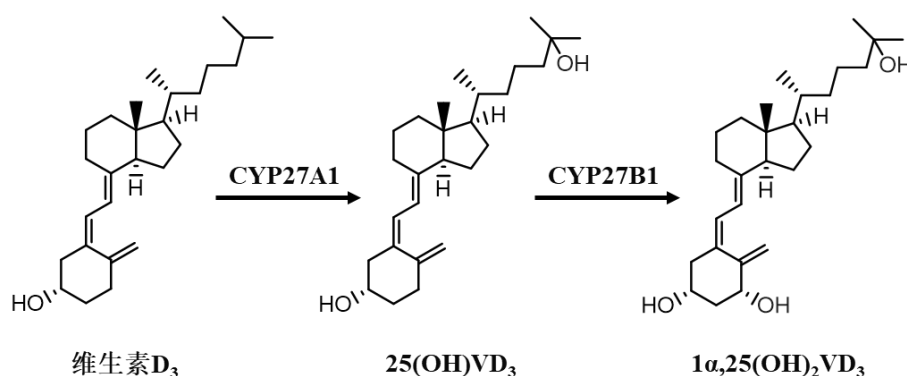


图 1-1 人体维生素 D₃ 转化成其活性形式的反应过程

Figure 1-1 Reaction process for the conversion of human vitamin D₃ to its active form

人体缺乏维生素 D₃ 会引起诸多代谢性疾病，如骨质疏松症、慢性肾功能障碍等^[7]。临床上应用维生素 D₃ 采用外源补充 25(OH)VD₃ 或 1 α ,25(OH)₂VD₃ 而非维生素 D₃ 本身，其目的是为了消除人体活化维生素 D₃ 的过程，这对于患有肝功能障碍或肾功能损伤的患者来讲至关重要^[8]。据报道，25(OH)VD₃ 是判断人体维生素 D₃ 营养情况的最佳指标，主要通过小肠上皮细胞吸收，具有促进人体钙、磷等重要离子的吸收，常用于治疗代谢性骨病，如佝偻病^[9]。此外，在畜禽养殖生产中通过人工外源补充 25(OH)VD₃ 可预防软骨病，提高蛋鸡的产蛋量和蛋品质，提高种猪的繁殖能力^[10-12]。综上所述，25(OH)VD₃ 是具有高附加值的天然产物，其在结构上属于 C25 羟基化维生素 D₃，因此，研究人员一直致力于开发更高效的 C25 羟基化维生素 D₃ 的生产方法。

1.2 C25 羟基化维生素 D₃ 的合成研究

C25 羟基化维生素 D₃ 最初通过从生物组织中提取获得，但该过程存在分离困难、

回收率低、成本高昂等缺陷，严重制约了 C25 羟基化维生素 D₃ 的广泛应用，目前工业上生产 C25 羟基化维生素 D₃ 采取化学合成法或微生物转化法^[13, 14]。

1.2.1 化学合成法

20 世纪末期，科研工作者发现 C25 羟基化维生素 D₃ 作为代谢过程中的活性物质，具有较高的生物活性与广泛的药用价值，自此在国际上掀起了一股化学合成 C25 羟基化维生素 D₃ 的热潮^[15, 16]。目前，25(OH)VD₃ 在工业上主要通过化学合成法来生产，但该过程需要复杂的保护和脱保护反应来实现区域选择性地引入羟基，尤其是 C25 位的羟基，这严重限制了 25(OH)VD₃ 的工业生产^[15, 17]。例如，Lyth-goe 等人通过从氢化茛苳醇开始，首先合成药物中间体 des-AB-胆甾烷-8 β ,25-二醇，进一步反应生成为 25(OH)VD₃^[18]。整个过程需要 60 多个步骤，操作复杂。此外，具有更高活性的 1 α ,25(OH)₂VD₃ 需要 1 α -羟基氧化磷与 25-羟基酮通过缩合反应获得，而合成这两种中间体的过程也非常复杂^[19]。化学合成法存在合成步骤繁多且复杂，涉及到多种化学试剂且成本高昂，且在合成过程中中间体热稳定性差，易分解，还存在分离纯化难度大、合成效率低（通过光化学开环的经典方法，甾体 Δ 5,7-二烯的产量低于 1%）、污染严重等诸多不利于工业化生产的问题^[15]。随着市场对 C25 羟基化维生素 D₃ 日益增长的需求，现急需寻找一种绿色高效的方法来替代化学合成法，实现 C25 羟基化维生素 D₃ 的工业化生产。

1.2.2 微生物转化法

相较于传统的化学合成法，微生物转化法通过微生物自身催化性能将维生素 D₃ 转化为 C25 羟基化维生素 D₃ 体现出得天独厚的优势。微生物转化法是利用微生物胞内相关酶对底物的某一位点进行特定的化学反应来获得相应的产物^[16, 20]。微生物转化法的生产成本低廉、对环境污染小、具有高度的化学选择性和底物特异性，能够大幅度缩减化学合成反应步骤，且反应所需条件温和，重复性好，更易于实现自动化生产，因此工业应用前景广泛^[21]。目前，已有研究表明通过微生物转化法可实现在甾体母核的 C11 α 、C11 β 和 C16 α 位点的羟基化，并已成功应用于类固醇工业化生产^[22, 23]。近年来，利用微生物转化法实现 C25 羟基化维生素 D₃ 生产的文献报道日益增多，其操作步骤简单、低成本低能耗的优势也变得日益突出，因此，以维生素 D₃ 为底物，通过微生物转化法生产 C25 羟基化维生素 D₃ 有广阔的工业化前景。

在过去的几十年里，科研工作者们已经开发出多种用于生产 C25 羟基化维生素 D₃ 的菌株，其中一个较为常见的策略是筛选具有利用维生素 D₃ 为碳源生长的微生物，然后通过发酵检验其是否具有生产 C25 羟基化维生素 D₃ 的能力。此外，不同来源的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶通过在不同宿主细胞中的异源表达构建重组基因工程菌也是该领域热门研究方向之一。维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶常见于哺乳动物和细菌来源的 CYPs，其中能够将维生素 D₃ 转化为 C25 羟基化维生素 D₃ 的细菌型 P450 酶常见于 CYP105/107/109 家族，目前已有多个团队对这些家族进行深入研究，并通过理性半理性设计构建高活性突变体^[24]。除 CYPs 以外，类固醇 C25 位脱氢酶 (S25DH) 也具有维生

素 D₃ 的 C25 位羟基化能力，但研究表明 S25DH 对氧气敏感度极高，在反应过程中易失活，不利于工业化生产^[25]。

1.3 维生素 D₃ 羟基化酶概述

对于复杂化合物的母核修饰，酶催化法相较于传统化学合成法中的保护和脱保护反应具有更高的化学选择性和底物特异性^[21]。在维生素 D₃ 生物转化为 C25 羟基化维生素 D₃ 的过程中，维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶发挥着核心作用，据报道大部分维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶属于 CYPs^[24]。CYPs 是一类结构中含有血红素亚铁结构域的蛋白，因为在其还原状态下与一氧化碳结合，于 450 nm 处显示特异性吸收峰而得名^[22]。P450 酶具有一些高度保守的区域，如 K 螺旋中的“ExxR”和血红素结合区域中的“FxxGxxxCxG”序列，可作为 CYPs 识别的特征结构^[26]。作为药物绿色制造领域中最受关注的酶系之一，CYPs 催化的反应类型广泛，主要以单加氧反应为主，并具有广泛的底物特异性，故 CYPs 被广泛应用于药物研发、生物降解、合成精细化学等^[27-29]。

1.3.1 人体及哺乳动物来源的维生素 D₃ 羟基化酶

目前，已有多种哺乳动物来源的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶被报道（表 1-1），例如 CYP27A1、CYP27B1、CYP2D25、CYP2J3 和 CYP2R1，这些 CYPs 均被证实具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化作用^[30-36]。其中，CYP27A1 是第一个被全面研究的维生素 D₃ 羟基化酶。Sakaki 等人将大鼠来源的 CYP27A1 与牛来源的氧化还原伴侣（RPs）肾上腺素铁氧还原蛋白（Adx）和肾上腺素铁氧还原蛋白还原酶（Adr）在酿酒酵母（*S.cerevisiae*）中实现共表达，重组 *S.cerevisiae* 可以将阿尔法骨化醇（1 α (OH)VD₃）转化为 1 α ,25(OH)₂VD₃^[30]。在另一项研究中，几种哺乳动物来源的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶通过大肠杆菌（*E.coli*）成功实现异源表达，经酶活检测发现，与其他几种哺乳动物来源的 CYPs 相比，人源 CYP27A1 对维生素 D₃ 的羟基化活性较低^[37]。与 CYP2R1 相比，CYP27A1 不仅可以转化维生素 D₃ 生产 25(OH)VD₃ 或将 1 α (OH)VD₃ 转化为 1 α ,25(OH)₂VD₃，转化产物还包括 26(OH)VD₃、24R,25(OH)₂VD₃、27(OH)VD₃、25,26(OH)₂VD₃ 和 25,27(OH)₂VD₃ 等其他维生素 D₃ 衍生物，这导致 25(OH)VD₃ 的分离与回收更加困难^[36]。此外，*S.cerevisiae* 细胞膜上存在的麦角甾醇也是 CYP27A1 的潜在底物之一，抑制了维生素 D₃ 的生物转化^[38]。

表 1-1 哺乳动物来源的维生素 D₃ P450 羟基化酶

Table 1-1 Vitamin D₃ P450 hydroxylases of mammalian origin

| 维生素 D ₃ 羟基化酶 | 来源 | 底物 | 产物 | 参考文献 |
|-------------------------|-------|--------------------------------|---|------|
| CYP27A1 | 人类 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [30] |
| | 大鼠 | 1 α (OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | |
| CYP27B1 | 人类、小鼠 | 维生素 D ₃ | 1 α (OH)VD ₃ | [31] |
| | | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | |

续表 1-1

| | | | | |
|---------|----|-----------------------|---|------|
| CYP2D25 | 猪 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [32] |
| | | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | [32] |
| CYP2J2 | 人类 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [33] |
| CYP2J3 | 大鼠 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [34] |
| CYP2C11 | 大鼠 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [35] |
| CYP2R1 | 人类 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [36] |

人类肝细胞线粒体中的 CYP27A1 是维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶，而 CYP27 家族的另一个成员 CYP27B1 还具有 C1 α 位的羟基化作用^[30]。Uchida 等人发现，通过在反应体系中加入纯化的 Adx 和 Adr，小鼠源 CYP27B1 可以同时和维生素 D₃ 进行 C25 位和 C1 α 位羟基化，该研究表明维生素 D₃ 的 C25 位和 C1 α 位的羟基化反应是密切相关的^[31]。通过上述结果合理推测：维生素 D₃ 在 CYP27B1 的底物结合口袋中呈反向排列。除此之外，还有研究表明敲入分子伴侣 GroEL/ES 能大大增强小鼠源 CYP27B1 在 *E.coli* 中的表达量，该项研究为未来 CYPs 的异源表达提供了丰富的借鉴意义^[39]。除小鼠源 CYP27B1 外，人源 CYP27B1 也具有 C1 α 位羟基化活性。在临床上，维生素 D 依赖性佝偻病 I 型患者由于体内 CYP27B1 发生 T409I 或 Q65H 突变导致失活，不能进一步对体内的 25(OH)VD₃ 进行 C1 α 位羟基化反应，造成人体 1 α ,25(OH)₂VD₃ 缺乏所致^[40]。因此为了实现 CYP27B1 的高效表达，Tuckey 等人通过在 *E.coli* 中共表达 GroEL/ES 和人源 Adx、Adr 实现在 30 min 内生产 6000 pmol/mg CYP27B1 蛋白^[41]。在同一项研究中，发现在重组 *E.coli* 体系中添加心磷脂会显著降低人源 CYP27B1 对 25(OH)VD₃ 的催化效率，该结果表明 CYP27 家族的活性可能会受磷脂的影响^[41]。

除 CYP27A1 和 CYP27B1 外，还发现其他哺乳动物来源的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶。人源 CYP2R1 与人源 CYP27A1 都可以催化维生素 D₃ 的 C25 位羟基化，但 CYP2R1 对维生素 D₃ 的羟基化活性是 CYP27A1 的 5 倍，且人体 CYP2R1 发生基因突变也会导致维生素 D 依赖性佝偻病 I 型^[42]。这项研究表明，CYP2R1 对 25(OH)VD₃ 的生物合成过程同样起至关重要的作用^[36]。Strushkevich 等人发现敲入 GroEL/ES 伴侣蛋白的方法有助于提高 *E.coli* 中人源 CYP2R1 的表达水平^[43]。Hosseinpour 和 Araya 等人在 *S.cerevisiae* 中异源表达了猪来源的 CYP2D25，通过维生素 D₃ 全细胞转化研究发现，CYP2D25 除了具有 C25 位羟基化功能外，还能将 25(OH)VD₃ 进一步羟基化为 1 α ,25(OH)₂VD₃、25,26(OH)₂VD₃ 和 25,27(OH)₂VD₃^[32,44]。大鼠来源的 CYP2J3 与 GroEL/ES 在 *E.coli* 中共表达时可实现维生素 D₃ 的 C25 位羟基化活性^[34]。Ohyama 等人通过删除 N 末端膜锚定区域并和 GroEL/ES 的共表达实现了人源 CYP2J2 在 *E.coli* 中的高效表达，研究还发现人源 CYP2J2 与大鼠源 CYP2J3 具有 73% 的同源性，在人体中 CYP2J2 不是主要的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶^[33,45]。CYP2C11 是一种雄性大鼠特有的微粒体维生

素 D₃ 的 C25 位羟基化酶，但其对维生素 D₂ 的底物选择性远超维生素 D₃，因此维生素 D₃ 不是 CYP2C11 的最适底物^[35]。

1.3.2 微生物来源的维生素 D₃ 羟基化酶

微生物中的 CYPs 参与多种化合物的生物合成过程，在其代谢过程中起至关重要的调控作用。如表 1-2 所示，自从最初发现自养假诺卡氏菌 (*P.autotrophica*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*) 具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能以来，放线菌来源的 CYPs 被广泛应用于维生素 D₃ 的生物转化过程^[46-48]。Kawauchi 等人通过在变铅青链霉菌 (*S.lividans*) 中异源表达来源于 *P.autotrophica* 的 CYP105A2，并成功验证其对维生素 D₃ 的 C25 位羟基化活性^[47]。来自灰色链霉菌 (*S.griseus*) 的维生素 D₃ 羟基化酶 P450SU-1 (CYP105A1) 通过构建 *E.coli* 重组基因工程菌可实现维生素 D₃ 转化为 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃^[46]。尽管 CYP105A1 和 CYP105A2 的氨基酸序列具有 55% 的同一性，但二者催化活性存在显著差异：CYP105A1 对维生素 D₃ 具有 C25 位、C1 α 位两步羟基化活性，且对维生素 D₂ 的底物选择性高于维生素 D₃^[48]。有趣的是，CYP105A2 并不是唯一从 *P.autotrophica* 中发现的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶，来源于自养诺卡氏菌 *P.autotrophica* NBRC 12743 的 P450 Vdh (CYP107BR1) 也具有将维生素 D₃ 转化为 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 的能力^[49]。

表 1-2 细菌来源的维生素 D₃ P450 羟基化酶

Table 1-2 Vitamin D₃ P450 hydroxylases of bacterial origin

| 维生素 D ₃ 羟基化酶 | 来源 | 底物 | 产物 | 参考文献 |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------|---|------|
| CYP105A1 | 灰色链霉菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [47] |
| | <i>Streptomyces griseolus</i> | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | |
| CYP105A2 | 自养假诺卡氏菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [46] |
| | <i>Pseudonocardia autotrophica</i> | | | |
| CYP107CB2 | 李氏芽孢杆菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [50] |
| | <i>Bacillus lehensis</i> | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | |
| CYP107BR1 | 自养假诺卡氏菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [49] |
| | <i>Pseudonocardia autotrophica</i> | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | |
| CYP109E1 | 巨大芽孢杆菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [51] |
| | <i>Bacillus megatherium</i> | | 24S,25(OH) ₂ VD ₃ | |
| CYP109A2 | 巨大芽孢杆菌 | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [52] |
| | <i>Bacillus megatherium</i> | | | |

除放线菌外，在芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 中也发现了维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶。Fatima 等人发现来源于李氏芽孢杆菌 *B.lehensis* G1 的 CYP107CB2 对维生素 D₃ 和 1 α (OH)VD₃ 具有 C25 位羟基化活性^[50]。Rita 等人发现来源于巨大芽孢杆菌 (*B.megatherium*) DSM319 的 CYP109A2 和 CYP109E1 也具有维生素 D₃ 羟基化能力，其中 CYP109A2 对维生素 D₃ 表现出高度 C25 位化学选择性，而 CYP109E1 对维生素 D₃ 具有 C24S 和 C25 位羟基化作用^[51, 52]。

1.3.3 类固醇 C25 位脱氢酶对维生素 D₃ 的转化

Rugor 等人报道，来自反硝化固氮杆菌 (*S.denitrificans*) Chol-1S 的类固醇 C25 位脱氢酶(S25DH)能够催化甾醇及其相关衍生物的区域选择性羟基化反应^[25]。在含有 S25DH 纯酶(催化剂)、维生素(底物)、羟丙基- β -环糊精(底物助溶剂)、2-甲氧基乙醇(有机助溶剂)和 K₃[Fe(CN)₆](电子受体)的反应体系培养 162 h 后，25(OH)VD₃ 浓度达到 1.4 g/L，产率高达 99%^[25]。与 CYPs 相比，S25DH 既有优点也有缺点：S25DH 的催化活性远高于目前报道的维生素 D₃ P450 羟基化酶，此外，S25DH 对维生素 D₃ 的 C25 位区域选择性也明显高于已报道的维生素 D₃ P450 羟基化酶；然而 Szaleniec 等人报道 S25DH 对氧气极度敏感，整个生物转化过程必须在厌氧条件下进行^[53, 54]。

1.4 全细胞转化生产 C25 羟基化维生素 D₃ 的研究进展

25(OH)VD₃ 作为最常见的 C25 羟基化维生素 D₃，是临床应用广泛的原料药。基于微生物转化法是创新药物绿色制造的有效手段，从自然界分离筛选或通过蛋白质工程构建具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能的微生物是绿色制造 25(OH)VD₃ 的基础^[24]。首先，研究人员尝试从自然界中分离出能够在将维生素 D₃ 转化为 25(OH)VD₃ 的天然微生物菌株(表 1-3)。随着基因测序技术的成熟和合成生物学的发展，通过构建维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶的基因工程菌建立全细胞催化体系逐渐成为研究热点^[16]。因为全细胞催化体系可以避免在生产过程中添加昂贵的辅助因子 NAD(P)H，且在解偶联反应过程中产生的 H₂O₂ 会被胞内过氧化氢酶代谢，不会造成 H₂O₂ 积累进而影响酶活而更具优势，因此通过理性半理性设计改造维生素 D₃ 羟基化酶并结合氧化还原伴侣工程构建基因工程菌，能够进一步提高全细胞转化维生素 D₃ 生产 25(OH)VD₃ 的效率^[55]。

1.4.1 将维生素 D₃ 转化为 C25 羟基化维生素 D₃ 的天然微生物

Sasaki 等人首次报道了微生物对维生素 D₃ 衍生物的生物转化，通过对约 300 株链霉菌的筛选，发现巩膜链霉菌 (*S.sclerotialis*) FERM BP-1370 可以在 25(OH)VD₃ 的 C1 α 位引入羟基，玫瑰链霉菌 (*S.roseosporus*) FERM BP-1574 能够转化 1 α (OH)VD₃ 生成 1 α ,25(OH)₂VD₃^[56]。尽管二者均不是以维生素 D₃ 本身作为底物，但这项工作表明微生物可用于生产维生素 D₃ 的羟基化衍生物。Sasaki 等人在上述基础上进一步筛选获得具有

两步羟基化功能的 *P.autotrophica* FERM BP-1573, 并通过全细胞转化在 200 L 发酵罐中获得 8.3 mg/L 的 25(OH)VD₃ 和 0.17 mg/L 的 1 α ,25(OH)₂VD₃^[57]。

随着新发现的维生素 D₃ 羟基化菌株的数量和种类不断增加, C25 羟基化维生素 D₃ 的产量也得到进一步提升。Schmitz 等人发现白色库茨涅尔氏菌 (*Kutzneria albida*) 在经发酵优化后可产生 63.7 mg/L 的 25(OH)VD₃^[58]。Kang 等人采用自养假诺卡氏菌 *Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP 为全细胞催化剂, 发酵获得 356 mg/L 的 25(OH)VD₃ 和 61.87 mg/L 的 1 α ,25(OH)₂VD₃, 转化率分别达到 59.4%和 30.94%, 产物浓度得到了显著提升^[59, 60]。最近, Tang 等人通过蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) zju 4-2 获得 830 mg/L 的 25(OH)VD₃, 该项研究也代表目前领域内的最高产量^[61]。表 1-3 列举了具有的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能的天然微生物^[56-61]。除了 25(OH)VD₃ 外, 微生物还会合成一些其他副产物, 如 1 α ,25(OH)₂VD₃、2 α ,25(OH)₂VD₃ 和 24S,25(OH)₂VD₃ 等。副产物的存在加大产物分离与回收的难度, 因此, 筛选具有高度区域选择性的微生物来减少副产物生成的研究具有重要意义。

表 1-3 将维生素 D₃ 转化为 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 的天然微生物

Table 1-3 Natural microorganisms that convert vitamin D₃ to osteodinol and osteotriol

| 菌株 | 底物 | 产物 | 参考文献 |
|---|--|---|----------|
| 巩膜链霉菌 FERM BP-1370 (<i>S. sclerotialis</i> FERM BP-1370) | 25(OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | [56] |
| 玫瑰链霉菌 FERM BP-1574 (<i>S. roseosporus</i> FERM BP-1574) | 1 α (OH)VD ₃ | 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | [56] |
| 自养假诺卡氏菌 FERM BP-1573 (<i>P.autotrophica</i> FERM BP-1573) | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ 、1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | [57] |
| 自养假诺卡氏菌 KCTC 1029BP (<i>Pseudonocardia</i> sp. KCTC 1029BP) | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ 、1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ | [59, 60] |
| 自养假诺卡氏菌 CGMCC 5098 (<i>P.autotrophica</i> CGMCC 5098) | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [62] |
| 白色库茨涅尔氏菌 (<i>Kutzneria albida</i>) | 维生素 D ₂ 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₂ 、1 α ,25(OH) ₂ VD ₂ 25(OH)VD ₃ | [58] |
| 蜡状芽孢杆菌 zju 4-2 (<i>Bacillus cereus</i> zju 4-2) | 维生素 D ₃ | 25(OH)VD ₃ | [61] |

除此之外, 研究者还通过优化一系列发酵参数, 如 pH 值 (pH)、溶解氧浓度 (DO)、发酵温度 (T) 等, 以进一步提高 C25 羟基化维生素 D₃ 的产量^[20]。还有研究表明, 不同种类的底物助溶剂对微生物转化维生素 D₃ 的过程有显著影响^[63]。

1.4.2 将维生素 D₃ 转化为 C25 羟基化维生素 D₃ 的基因工程菌

随着基因组学和合成生物学的发展,微生物细胞工程为提高 C25 羟基化维生素 D₃ 的产量提供了新策略:根据已被表征的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶的催化特点,以应用于工业化生产为目的,构建用于全细胞转化生产 C25 羟基化维生素 D₃ 的基因工程菌株^[24]。其中,放线菌底盘细胞如变铅青链霉菌(*S. lividans*)和山城红球菌(*R. erythropolis*)因具有较稳定的氧化还原环境,广泛应用于构建生产 25(OH)VD₃ 的基因工程菌^[64, 65]。Hayashi 等人通过在 *S. lividans* 中构建突变体 CYP105A1^{R73VR84A} 的基因工程菌,进而获得 7.7 mg/L 的 25(OH)VD₃^[65-67]。

R. erythropolis 是另一种工业上常见的放线菌,因其具有有机溶剂耐受性被广泛应用于脂溶性产物的生产,因此也作为宿主细胞应用于 25(OH)VD₃ 的生产^[68]。Tamura 等人通过在 *R. erythropolis* 中共表达 Vdh 和 ThcCD 并建立 NAD(P)H 再生系统,重组基因工程就经杆菌肽处理后获得 1176.5 μg/L 的 25(OH)VD₃。与 Vdh 来源的野生菌 *P. autotrophica* NBRC 12743 相比,重组 *R. erythropolis* 的 25(OH)VD₃ 产量有所提高^[64, 68]。

Ban 等人发现敲除迪茨氏野野村氏菌(*Sebekia benihana*)基因组中的 *cyp-sb3a* 会破坏其维生素 D₃ 羟基化功能,当在没有维生素 D₃ 羟基化能力的天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中异源表达 CYP-sb3a 时,从重组 *S. coelicolor* 转化维生素 D₃ 的发酵液中检测到 25(OH)VD₃ 和 1α,25(OH)₂VD₃,因此推断 *cyp-sb3a* 是维生素 D₃ 的 C25 位和 C1α 位羟基化酶基因^[69]。

B. megaterium 是著名自给自足型 P450 羟基化酶 BM3 (CYP102A1) 的来源菌株,Abdulmughni 等人将其作为宿主细胞实现 CYP27A1、CYP109E1 和 CYP109A2 的基因工程菌的构建^[70-72]。当在 *B. megaterium* DSM941 异源表达人源 CYP27A1 时,有 80.81 mg/L 维生素 D₃ 被转化为其生物活性形式^[73]。同样以 *B. megaterium* DSM941 为宿主细胞,构建 CYP109E1 的全细胞催化体系,通过发酵验证发现 CYP109E1 在 C24S 和 C25 位实现维生素 D₃ 的羟基化^[71]。此外,过表达突变体 CYP109A2^{T103A} 的重组 *B. megaterium* DSM941 在 48 h 内可生产 282.7 mg/L 的 25(OH)VD₃^[70]。

1.5 本论文的研究意义与主要研究内容

1.5.1 本论文的研究意义

作为最重要的 C25 羟基化维生素 D₃, 25(OH)VD₃ 在医药行业和家禽养殖等领域具有广泛的应用前景。相较于传统的化学合成法,将维生素 D₃ 生物转化成 25(OH)VD₃ 是一种成本低廉且绿色环保的方法^[24]。因此,筛选新的微生物或构建基因工程菌以获得具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能的微生物是生物法转化生产 25(OH)VD₃ 的基础。基于维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶在维生素 D₃ 向 25(OH)VD₃ 的生物转化过程中起决定性作

用, 挖掘维生素 D₃ 羟基化菌株中的关键酶基因具有重要意义^[24]。为了挖掘新维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶, 首先需要从自然界分离出具有 C25 位羟基化功能的菌株, 并进一步挖掘其中具有 C25 位羟基化功能的酶基因。因此, 本论文旨在分离出新的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化菌株, 并挖掘目标菌株的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶, 为后续构建高产 25(OH)VD₃ 的基因工程菌奠定基础。这项研究有助于推动向 C25 羟基化维生素 D₃ 的生产和应用, 对人类健康和可持续发展做出积极贡献。

1.5.2 本论文的主要研究内容

本论文通过从自然界筛选具有维生素 D₃ 的 C25 位羟基化功能的菌株, 并通过优化培养条件、添加底物助溶剂等方法提高微生物生产 C25 羟基化维生素 D₃ 的效率。为了进一步探究菌株的羟基化功能, 结合转录组测序技术挖掘维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶, 并通过构建重组基因工程菌验证酶的催化功能。具体内容如下:

(1) **C25 位维生素 D₃ 羟基化菌株的筛选及发酵工艺优化。**以维生素 D₃ 为唯一碳源的无机盐平板作为筛子, 从自然界分离出能够利用维生素 D₃ 生长的菌株, 再通过薄层层析法 (TLC) 法初筛选可以转化维生素 D₃ 生成 C25 羟基维生素 D₃ 的潜在目标菌株, 并结合高效液相色谱 (HPLC) 法、液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 法和核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 法对潜在目标菌株的发酵产物进行结构鉴定。选出具有 C25 位羟基化功能的微生物作为目标菌株, 根据系统发育学分析鉴定其种属并命名保藏。优化目标菌株的发酵条件以提高 C25 羟基化维生素 D₃ 的产量, 为其高效生产的研究打下良好基础。

(2) **C25 羟基化维生素 D₃ 关键酶的挖掘。**采用转录组测序技术对经维生素 D₃ 诱导前后的目标菌株进行分析, 获得目标菌株全部蛋白信息, 并对含有 CYPs 结构域 (PF00067) 的转录本进行筛选, 挖掘潜在的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶。根据潜在目标蛋白的登录号从 NCBI 数据库查找相关基因序列并设计引物、克隆测序, 并将测序结果与 NCBI 数据库进行比对以筛选维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶, 将挖掘所得的维生素 D₃ 的 C25 位羟基化酶进行生物信息学分析合理推测其催化功能。

(3) **C25 羟基化维生素 D₃ 关键酶的表达验证与全细胞催化体系的构建。**在上述工作基础上, 为了进一步探究 C25 位羟基化维生素 D₃ 关键酶的性质与功能, 本论文通过异源表达关键酶, 并构建其重组基因工程菌进行维生素 D₃ 的全细胞转化来进行功能表征。采用 LC-MS 法鉴定发酵产物结构, 明确关键酶对维生素 D₃ 的羟基化位点, 再通过探究发酵过程中各组分的变化情况验证关键酶的催化能力。

第二章 材料与amp;方法

2.1 研究材料

2.1.1 试剂材料

蛋白胨、酵母粉、葡萄糖、琼脂粉、氯化钠、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸钾、硫酸钙、七水硫酸镁、氢氧化钾、甘油、氨水、磷酸、浓硫酸、乙腈、甲醇、乙酸乙酯等购自国药集团化学试剂有限公司；氨苄青霉素（Amp）、卡那霉素（Kana）、小鼠抗 His 单克隆抗体、HRP 标记小鼠抗 HIS 单克隆抗体购自上海上海生工生物工程股份有限公司；维生素 D₃ 购自上海生工有限公司；25(OH)VD₃（25(OH)VD₃）标准品、1 α ,25(OH)₂VD₃ 标准品（1 α ,25(OH)₂VD₃）购自源叶生物科技有限公司；DNA 聚合酶、同源重组酶、溶菌酶购自诺唯赞生物科技有限公司；BamHI 和 NdeI 限制性内切酶、4 × Loading Buffer 购自宝日医生物技术有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒购自上海捷瑞生物工程股份有限公司。

2.1.2 菌株

本文所使用的菌株如表2-1所示。

表 2-1 本文所用的菌株

Table 2-1 Strains used in this study

| 菌株 | 相关特性 | 来源 |
|--|--|-------------------------------|
| <i>Bacillus megaterium</i> H-1 | | 本文筛选， (CGMCC No. 20362) |
| <i>E. coli</i> JM109 | <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk-mk+) supE44</i> | Invitrogen |
| <i>Bacillus subtilis</i> WB600 | | 实验室保藏 |
| <i>B. subtilis</i> 重组菌 WB600-pMA5-CYP109E1-H | 重组 <i>B. subtilis</i> ，整合 <i>cyp109e1-h</i> 基因 | 本文构建 |
| <i>B. subtilis</i> 重组菌 WB600-pMA5-CYP109A2-H | 重组 <i>B. subtilis</i> ，整合 <i>cyp109a2-h</i> 基因 | 本文构建 |
| <i>B. subtilis</i> 重组菌 WB600-pMA5 | 重组 <i>B. subtilis</i> ，无整合基因 | 本文构建 |

2.1.3 质粒

本文所使用的质粒如表2-2所示。

表 2-2 本文所用的质粒

Table 2-2 Plasmids used in this study

| 质粒 | 相关特性 | 来源 |
|-----------------------|--|-------|
| pMA5 | <i>B. subtilis</i> WB600 胞内表达质粒, Kana ^R | 实验室保藏 |
| pMA5- <i>cyp109eh</i> | pMA5 携带 <i>cyp109eh</i> 基因 | 本文构建 |
| pMA5- <i>cyp109ah</i> | pMA5 携带 <i>cyp109ah</i> 基因 | 本文构建 |

2.1.4 引物

本文所使用的引物如表2-3所示。

表 2-3 本文所用的引物

Table 2-3 Primers used in this study

| 引物 5'-3' | 序列 |
|----------------|--|
| 扩增引物 | |
| primer A | CAGAGTTTGATCCTGGCT |
| primer B | AGGAGGTGATCCAGCCCA |
| <i>Cyp-1-F</i> | TTATTCGAAGGATCCTACGTAATGGCTTCTTATGCGCCCC |
| <i>Cyp-1-R</i> | CGCGGCCCGCCCTAGGGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGATGACA |
| <i>Cyp-2-F</i> | AAAAGGAGCGATTTACATATGATGAATCCAAAAGCAGTGAAAAGA |
| <i>Cyp-2-R</i> | GAGCTCGACTCTAGAGGATCCTCAGGCGTTATTAAGCAATTTC |

2.1.5 培养基

LB 培养基 (g·L⁻¹): 酵母粉 5; 蛋白胨 10; NaCl 10; 琼脂 20。

TB 培养基 (g·L⁻¹): 酵母粉 23.6; 蛋白胨 11.8; K₂HPO₄ 9.4; KH₂PO₄ 2.2; 甘油 4。

富集培养基 (g·L⁻¹): 葡萄糖 10; (NH₄)₂SO₄ 0.1; 蛋白胨 5; MgSO₄·7H₂O 0.2; K₂HPO₄ 0.1; CaSO₄ 0.05; FeSO₄·7H₂O 0.002; pH 7.0。

筛选培养基 (g/L): 维生素D₃ 8×10⁻⁴; K₂HPO₄ 0.75; (NH₄)₂SO₄ 0.8; MgSO₄·7H₂O 0.1; 琼脂 20; pH 7.0。

GM I 培养基: 1x 盐溶液 95.6 mL; 20%葡萄糖溶液 2.5 mL; 5% 水解酪蛋白 0.4 mL; 10% 酵母溶液 1 mL; 10 mg/mL 色氨酸溶液 0.5 mL^[74]。

GM II 培养基: 1x 盐溶液 96.98 mL; 20%葡萄糖溶液 2.5 mL; 5% 水解酪蛋白 0.08 mL; 10% 酵母溶液 0.04 mL; 1 M MgCl₂ 0.25 mL; 1M CaCl₂ 0.05 mL; 10 mg/mL 色氨酸溶液 0.1 mL^[74]。

10×盐溶液 (g/L): K₂HPO₄ 70; KH₂PO₄ 30; (NH₄)₂SO₄ 10; 柠檬酸钠 5; MgSO₄ 1^[74]。

2.1.6 实验试剂

0.1 M PBS 缓冲液 (g/L): 80 g NaCl; 2 g KCl; 7.62 g Na₂HPO₄; 0.77 g KH₂PO₄; 调节 pH 7.4。

0.1 M 磷酸钾缓冲液: 1 mM EDTA, 20%甘油, 1 μg/mL 藏红 T, 调节 pH 至 8.0。

2.1.7 实验仪器

本文所用的主要仪器如表 2-4 所示。

表 2-4 实验仪器

Table 2-4 The experimental instrument

| 仪器名称 | 生产公司 |
|-------------------------|-------------------------|
| SW-CJ-1FD 超净工作台 | 苏州净化设备有限公司 |
| HYL-C 组合式摇床 | 太仓强文研究设备有限公司 |
| SPX-150B-Z 生化培养箱 | 上海博讯实业有限公司 |
| 电子天平 | 美国 OHAUS 公司 |
| pH 计 | 美国 OHAUS 公司 |
| 多功能酶标仪 | 美国 Molecular Devices 公司 |
| 压力蒸汽灭菌器 | 美国 Zealway 公司 |
| 冷冻离心机 | Eppendorf 公司 |
| HTCR002 孔板离心机 | Canvic 公司 |
| DW-86L728J 超低温冰箱 | 中国海尔公司 |
| 1260 Infinity II 液相色谱系统 | 美国安捷伦科技公司 |
| ETC821 型 PCR 仪 | 苏州东胜兴业科学仪器有限公司 |
| UV-2000Z 紫外可见分光光度计 | 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司 |
| 恒温水浴锅 | 上海博讯实业有限公司 |
| 核酸电泳系统 | 北京市六一仪器厂 |
| 蛋白电泳、转膜系统 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 凝胶成像仪 | 上海天能科技有限公司 |

2.2 研究方法

2.2.1 菌种的分离与筛选

称取 2 g 土壤置于 100 mL 烧杯中, 加入 20 mL 无菌水搅拌静置, 吸取上清液 1 mL 于富集培养基, 在 30 °C, 220 r/min 摇床培养 12 h。吸取 50 μL 富集培养液涂布于以维生素 D₃ 为唯一碳源的固体培养基筛选平板上, 置于 30 °C 培养箱倒置培养 36 h。观察筛选平板上菌

落的形态，挑取单菌落在新鲜的LB固体培养基平板上三区划线，划线平板在30 °C培养箱倒置培养16 h，获得潜在目标菌株。分别挑取潜在目标菌株进行维生素D₃转化研究（详见2.2.3），待发酵结束后取样采用硅胶薄层层析法（TLC）（详见2.2.12.1）检测，筛选获得具有转化维生素D₃能力的目标菌株。

2.2.2 菌种的鉴定与系统发育学分析

2.2.2.1 形态与菌落特征

观察菌株在LB固体培养基及筛选培养基上的菌落形态，并用挑取的菌落在显微镜下观察菌株形态。

2.2.2.2 16S rDNA 的扩增和系统发育学分析

采用上海生工UNIQ-10柱式细菌基因组DNA试剂盒进行基因组的提取。以表2-3所示的primer A、primer B为上下游引物扩增菌株的16S rDNA。PCR反应条件见2.2.6。扩增的菌株16S rDNA由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

2.2.2.3 系统发育学分析

目标菌株的16S rDNA序列通过与NCBI数据库做对比，筛选出14个高亲缘性的菌株并从数据库调取该14个菌株的16S rDNA序列用于系统发育学分析。16S rDNA序列用MEGA（11.0）软件对齐、排序，采用Neighbor-Joining法构建系统进化树，计算自引导值（Bootstrap，1000次重复）评估系统发生树的置信度^[75]。

2.2.3 维生素 D₃ 的全细胞转化研究

在新鲜划线的平板上挑取单菌落于装有10 mL LB液体培养基的50 mL锥形瓶中，30 °C，220 r/min 摇床培养24 h，按总体积2%的接种量转接至LB液体培养基（50 mL/250 mL）中，投入底物维生素D₃，投料终浓度为0.25 g/L。发酵培养基在30 °C，220 r/min 摇床培养72 h，即获得转化发酵液。

2.2.4 产物的分离与结构鉴定

量取500 mL发酵液用二氯甲烷等体积反复萃取2次，合并有机相。有机溶剂用真空旋转蒸发仪浓缩，浓缩样用10 mL甲醇复溶，过0.22 μm有机滤膜，备用^[76]。用岛津半制备液相LC20A收集出峰时刻的流份。通过TLC法（详见2.2.12.1）检测流分纯度。纯化后的产物分别通过LC-MS、¹H-NMR进行分析鉴定其结构。

采用液相色谱-质谱联用（LC-MS）对发酵液样品及维生素D₃羟基化物标准品进行分析。分析采用Agilent 1260 Infinity LC系统和Agilent 6520精确质量Q-TOF（四极杆飞行时间）质谱仪，采用双电喷雾电离（ESI）源。采用Agilent Zorbax SB-C18色谱柱（2.1×150 mm，3.5 μM），流速为0.5 mL/min。纯化的产物经核磁共振波谱仪正相宽带探头分析。

采用标准脉冲程序，溶剂为氘代氯仿，TMS内标。

2.2.5 标准曲线绘制及产物浓度的计算

分别精密称取维生素D₃、25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品，采用甲醇作为溶剂配置成浓度为1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L的溶液，根据高效液相色谱（HPLC）分析条件（详见2.2.12.2）绘制峰面积-浓度标准曲线，根据标准曲线计算产物产量。

2.2.6 目标菌株的转录组测序

2.2.6.1 样品制备

采用维生素 D₃ 诱导目标菌株，接种比例约为 1%。培养时间为 12 h，培养条件为 30°C 和 220 r·min⁻¹。在诱导前和诱导 12 小时时分别取样进行转录组测序，并分析目标菌株在基因转录水平上经诱导前后的差异。

2.2.6.2 RNA 的提取转录组测序

为了分析目标菌株在受维生素 D₃ 诱导前后基因转录水平的差异，需要进行转录组测序。离心收集 50 mL 菌体，采用 TRIzol Reagent(Invitrogen)法^[77]提取菌体的总 RNA，并交由北京优吉科技（中国北京）进行测序分析。以下是建库测序项目的基本流程：

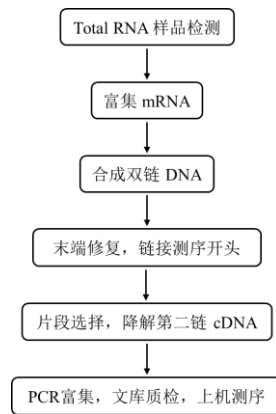


图 2-1 RNA-Seq 主要流程图

Fig. 2-1 RNA-Seq main Flowchart

2.2.7 目的基因的扩增与回收

根据转录组测序结果，从 NCBI 数据库查询并获取相关酶基因序列，并通过 Primer Premier 软件设计了所需基因的引物序列（详见表 2-2）。为了扩增目的基因，采用了特定的 PCR 体系（60 μ L），具体参数请参见表 2-5：

表 2-5 基因扩增的 PCR 反应体系

Table 2-5 PCR reaction system of gene amplification

| 试剂 | 体积 (μL) |
|----------------------|---------|
| 模板 DNA | 1 |
| 上游引物 | 1 |
| 下游引物 | 1 |
| PrimeSTAR HS(Premix) | 30 |
| ddH ₂ O | 27 |

反应程序为：95℃ 预变性 5 min，随后进行 30 个循环，每个循环包括：95℃ 变性 30 s，T1℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 T2 分钟；最后进行 72℃ 终延伸 15 min。其中，T1 和 T2 分别由引物的 T_m 值和目的基因的长度决定 (T2=1 kb·min⁻¹)。扩增完成后，通过琼脂糖凝胶电泳分离产物，然后将目的产物对应的条带进行割胶回收。回收方法详见琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的说明书。

2.2.8 重组质粒的构建

经回收试剂盒回收的目的基因与克隆载体 pMA5 在 16℃ 金属浴中连接 8-16 h，将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 中。涂布于含 100μg/mL 氨苄平板后通过 PCR 验证的方式筛选阳性转化子，将正确的转化子送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

2.2.9 大肠杆菌 JM109 感受态的制备和转化

2.2.9.1 大肠杆菌 JM109 感受态的制备

将保存在-80℃ 的大肠杆菌 JM109 从 LB 固体培养基上挑取单菌落，37℃ 倒置培养直至单菌落生长。将单菌落接种到 10 mL LB 培养基中，以 37℃ 和 220 rpm 的条件下培养 12 h。将接种量为 1% 的菌液转移到 50 mL LB 中，在 37℃ 和 220 rpm 下培养 1.5 h，直到菌液的 OD₆₀₀ 值达到 0.4-0.6。将菌液导入预冷无菌的 50 mL 离心管中，在冰浴中静置 30 min。在 4℃ 和 4000 rpm 下离心 10 min，将上清抛弃。在无菌环境下，向离心管中加入 10 mL 预冷的 CaCl₂ 并吹吸混匀，在冰浴中静置 30 min。再次在 4℃ 和 4000 rpm 下离心 10 min，将上清弃去。向离心管中加入预冷无菌的 CaCl₂ 和 30% 甘油各 2 mL，并吹吸混匀。将 100 μL 的混合物分装到预冷无菌的 1.5 mL EP 管中，冻存于-80℃。

2.2.9.2 大肠杆菌 JM109 的转化方法

从-80℃ 保存的大肠杆菌 JM109 感受态细胞中取出适量的细胞，置于冰上融化。在超净工作台中，将 1 μL 质粒加入至感受态细胞的 EP 管中，然后在冰浴中放置 30 min。将管子置于 42℃ 水浴锅中，热激 90 s 后立即放入冰浴中静置 3-5 min。在超净工作台中，向管子中加入 800 μL LB (熟化液)，然后在 37℃，220 rpm 摇床中恢复 45-60 min。完成后，将管子放入离心机中，以 12000 rpm 离心 1 min，吸取 800 μL 上清。将剩余的液体吹吸均匀，然后涂布在含有 100 μL/mL 抗生素的 LB 平板上。将平板倒置，置于 37℃

培养箱中培养 10-12 h。挑取阳性转化子，通过 PCR 进行验证。

2.2.10 *B.subtilis* 感受态的制备转化和重组基因工程菌的构建

2.2.10.1 *B.subtilis* WB600 感受态的制备和转化

为制备 *B.subtilis* WB600 感受态细胞，可以采用简便的一步法：将 *B.subtilis* WB600 接种于 LB 平板上 37°C 培养 36 h，孢子形成率接近 100%。挑单菌落接种于 5 mL GM I 培养基中，在 30°C，125 r/min 振荡培养过夜。取 2 mL 上述培养液转接至 50 mL GM II 培养基中，37°C，250 r/min 培养 3 h，直到 OD₆₀₀ 达到 0.5 左右。将培养液于 4°C，3000 rpm 离心 10 min，弃去上清液。用 10 mL 无菌冷蒸馏水轻轻悬浮菌体，悬浮后的菌体即为感受态细胞可以直接用来转化。

2.2.10.2 重组 *B.subtilis* 基因工程菌的构建与验证

转化时取出离心管，在 0.5 mL 菌液中加入 1 μg/mL 重组质粒，37°C，200 r/min 培养 1-2 h 后涂于相应抗性平板，再在 37°C 培养过夜，通过 PCR 验证的方式筛选阳性克隆子。将验证正确的转化子送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

2.2.11 P450 的 CO 特征光谱研究

首先通过 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定微粒体蛋白的浓度，然后用磷酸缓冲液 B 将浓度稀释至 1±0.1 mg·mL⁻¹。接下来，使用微量比色皿，在样品池和对照池中加入相同体积的微粒体蛋白，扫描 400-500 nm 范围内的吸收光谱并记录基线。然后取 300 μL 样品，在样品池和对照池中通入相同含量的 CO 和 N₂，通气量为 2-5 mL·min⁻¹，通气时间约为 50 s。通完气后，加入还原剂低亚硫酸钠，使其浓度为 0.4 mol·L⁻¹，扫描后得到的谱线则为 CO 还原结合差光光谱。

2.2.12 分析方法

2.2.12.1 薄层层析法 (TLC)

采用 GF 254 硅胶薄层层析板，并进行预处理：首先，将硅胶板放入 60°C 的烘箱中进行 1 h 的活化处理。展开剂选择乙酸乙酯:正己烷=2: 1 (V:V)。使用香草醛-浓硫酸溶液作为显色剂。通过对样品的点样和层析，可视化检测结果并分析样品的化学组成。

2.2.12.2 高效液相色谱 (HPLC) 分析条件

吸取 1 mL 发酵液用二氯甲烷等体积反复萃取 2 次，合并有机层。有机溶剂置于通风橱内挥干，加入 1 mL 甲醇复溶，过 0.22 μm 有机滤膜即获得发酵液样品。发酵液样品在 Sunfire™ C18 色谱柱 (5 mm, 4.6×160 mm Agilent) 中通过乙腈:水的线性梯度洗脱办法进行检测: 0-10 min, 50% 乙腈; 10-15 min, 50-100% 乙腈; 15-25 min, 100% 乙腈; 25-30 min, 100-50% 乙腈; 30-35 min, 50% 乙腈。单次进样体积为 20 μL, 检测波长为

265 nm, 流速为1.0 mL/min, 柱温40 °C。

2.2.12.3 目标蛋白的 Western-Blot 分析

底物诱导重组基因工程菌表达 24 h 后, 取 50 mL 培养液, 离心收集菌体, 并用 0.1 M PBS 缓冲液 (pH 7.4) 清洗三次。加入 25 mL PBS 缓冲液重悬菌体, 并加入 15 μg/mL 溶菌酶, 在 37 °C 水浴锅反应 30 min。使用超声破碎仪将菌体破碎, 破碎条件: 破 4 s, 停 6 s, 30 min。离心后得到的上清液即为粗酶液。取 30 μL 粗酶液与 10 μL 4 × Loading Buffer 混匀, 95°C 孵育 10 min 以裂解菌体并使蛋白变性。将蛋白样品上样至 8% 分离胶, 通过 SDS-PAGE (160 V, 30 min) 分离蛋白。随后, 按照韩等人的方法进行 Western-Blot 分析^[78]。

2.2.12.4 数据统计

本文中的数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 采用 SPSS 统计软件对研究数据进行处理, 采用 ANOVA 检验进行统计分析。

第三章 结果与讨论

3.1 C25 位羟基维生素 D₃ 菌株的筛选及发酵优化

通过以维生素 D₃ 为唯一碳源的无机盐平板筛选获得潜在目标菌株，并对其全细胞转化维生素 D₃ 的产物进行结构鉴定，确定潜在目标菌株的反应类型及反应位点。选取具有 C25 位羟基化功能的菌株作为目标菌株，根据目标菌株的系统发育学分析结果确定其种属。通过底物助溶、优化培养条件等方法，提高目标产物 25(OH)VD₃ 的浓度，从而为后续目标菌株高效羟基化维生素 D₃ 奠定良好的基础。

3.1.1 目标菌株筛选

通过唯一碳源平板法^[61]初筛获得34个潜在目标菌株，进一步对潜在目标菌株进行转化维生素D₃的发酵研究。通过薄层层析法（TLC）检测各个菌株转化维生素D₃的情况。由TLC检测结果（图3-1）可知，菌株1-18能够将维生素D₃转化为两种主要产物Product 1和Product 2（简称P1和P2）。P1和P2在TLC板上分别和25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品位置相同，初步判断产物P1为目标产物25(OH)VD₃，P2为副产物1 α ,25(OH)₂VD₃。

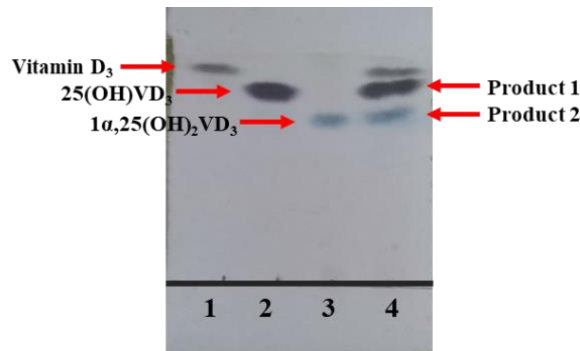


图3-1 菌株1-18发酵产物TLC检测

Figure 3-1 TLC detection of fermentation products of strain 1-18

（1-3：标准品；4：菌株1-18的全细胞转化液）

3.1.2 转化产物的结构鉴定

发酵产物通过HPLC、LC-MS检测证实P1和P2存在，且出峰时间分别与25(OH)VD₃标准品和1 α ,25(OH)₂VD₃标准品相对应（图3-2）。菌株H-1对维生素D₃的转化液质谱检测结果如图3-2所示。通过分析可得到结果：P1在 m/z 401[M+H]⁺处存在一个分子离子，在383[M-H₂O]⁺和365[M-2H₂O]⁺处存在碎片离子，与25(OH)VD₃（C₂₇H₄₄O₂）标准品的MS图谱一致。P2在 m/z 417[M+H]⁺处存在一个分子离子，在399[M-H₂O]⁺和383[M-2H₂O]⁺处存在碎片离子，与1 α ,25(OH)₂VD₃（C₂₇H₄₄O₃）标准品的MS图谱一致。合理推测菌株1-18具有特异性羟基化维生素D₃的C1 α 和C25位点的能力。

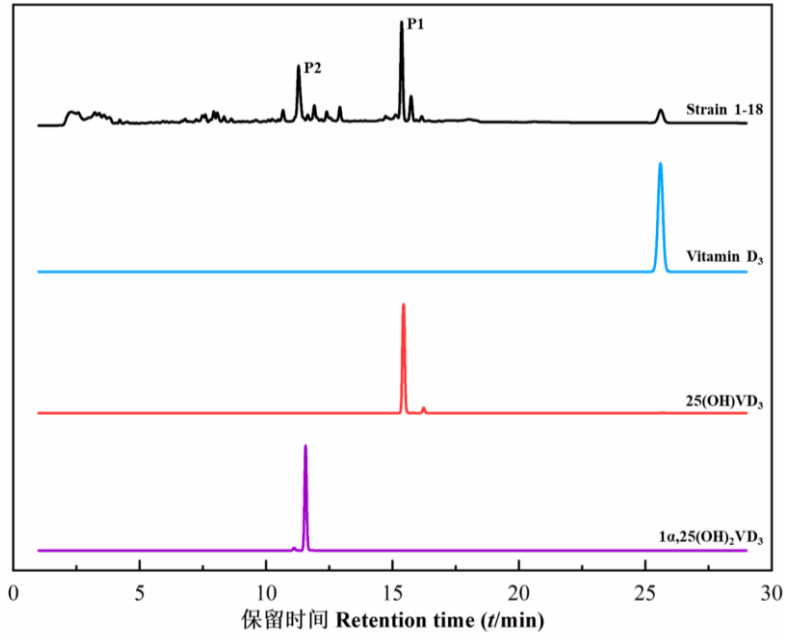


图3-2 菌株1-18全细胞转化产物的HPLC结果

Figure 3-2 HPLC results of whole-cell transformation products of strain 1-18

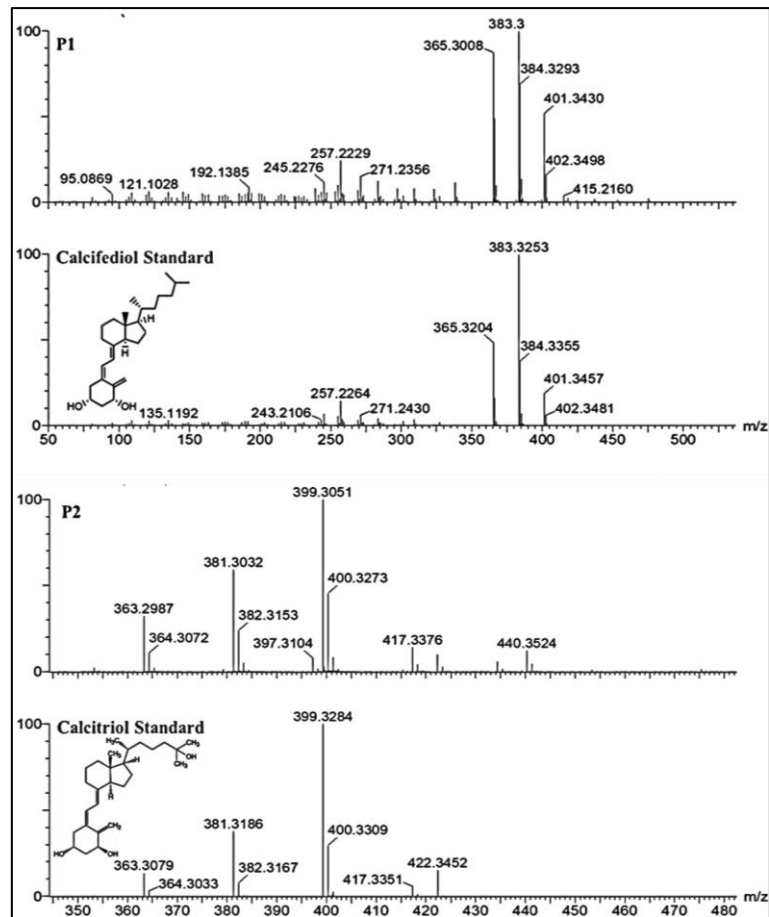


图3-3 菌株1-18全细胞转化产物的MS图谱

Figure 3-3 MS profile of whole-cell transformation products of strain 1-18

通过批量发酵、产物提取、分离纯化分别获得P1和P2的单一成分，分别进行¹H-NMR

结构分析, $^1\text{H-NMR}$ 图谱见附图3-1和附图3-2。产物P1的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta 6.05-6.57$ (d, $J=11.3$ Hz, 2H), $\delta 5.04$ (s, 3H), $\delta 4.82$ (d, $J=2.0$ Hz, 1H), $\delta 2.84$ (m, 1H), $\delta 2.23$ (m, 1H), $\delta 0.93$ (d, $J=6.1$ Hz, 3H), $\delta 0.88$ (d, $J=6.6$ Hz, 6H), $\delta 0.54$ (s, 3H), 与文献中报道一致^[65, 73], 由此判断P1为目标产物25(OH)VD₃。

产物P2的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta 6.44-6.23$ (d, $J=11.3$ Hz, 2H), $\delta 5.33$ (s, 1H), $\delta 5.00$ (s, 1H), $\delta 4.43$ (m, 1H), $\delta 4.23$ (m, 1H), $\delta 2.83$ (d, $J=12.5$ Hz, 1H), $\delta 2.60$ (d, $J=9.9$ Hz, 1H), $\delta 2.30$ (m, 1H), $\delta 1.21$ (m, 6H), $\delta 0.92$ (d, $J=6.2$ Hz, 3H), $\delta 0.54$ (s, 3H)。与文献中报道一致^[79], 由此判断副产物P2为1 α ,25(OH)₂VD₃。

3.1.3 菌株鉴定

3.1.3.1 形态与菌落特征

菌株1-18平板划线后30℃倒置培养16 h, 菌落呈乳白色, 边缘整齐(图3-4A)。菌株1-18在LB液体培养基中呈白色混浊状, 不形成菌膜。普通光学显微镜下观察到菌株1-18呈杆状, 末端圆, 长4.0-10.0 μm , 单个或短链状排列, 为革兰氏阳性菌(图3-4B)。

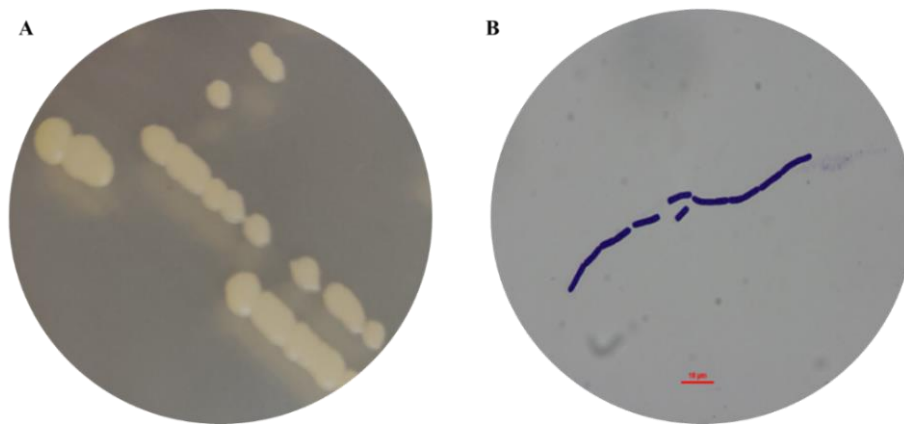


图3-4 菌株1-18的形态特征

Figure 3-4 Morphological characteristics of strain 1-18

(A: 菌落形态; B: 显微特征)

3.1.3.2 系统进化树的构建

通过测序获得菌株1-18的16S rDNA部分序列, 包括1393个碱基。选择15个高亲缘性菌株的16S rDNA与菌株1-18的16S rDNA序列比对, 并构建系统进化树(图3-5)。结果表明, 菌株1-18与巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)的同源性达到99%以上。菌株1-18命名为*B. megaterium* H-1, 保藏至中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC No. 20362)。由于*B. megaterium*发酵周期短、易于培养、适应性强等优势, 广泛应用于维生素B12、聚羟基丁酸酯(PHB)等医药原料的生物合成中^[80], 但关于其在羟基化维生素D₃方面的研究鲜有报道。

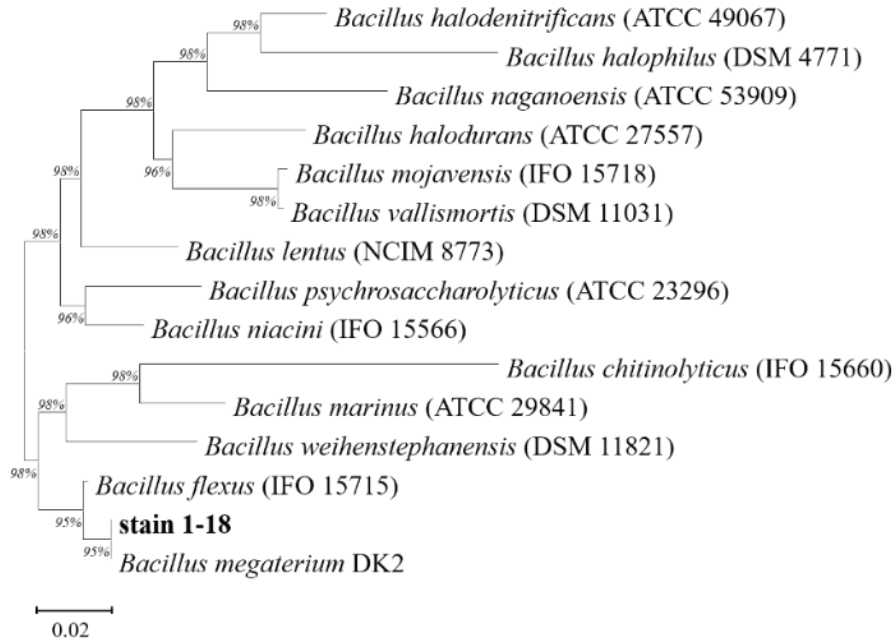


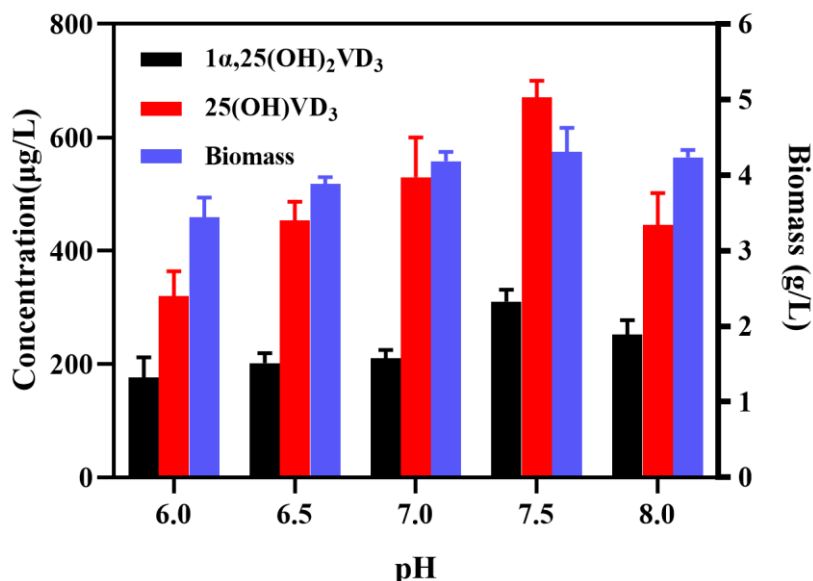
图3-5 菌株1-18的进化树分析

Figure 3-5 Evolutionary tree analysis of strain 1-18.

3.1.4 *B.megaterium* H-1 转化维生素 D₃ 的工艺优化

3.1.4.1 培养基初始 pH 对 *B.megaterium* H-1 转化维生素 D₃ 的影响

培养基初始pH对于菌体的生长极其重要，影响着微生物对营养物质的代谢。培养基的初始pH一方面通过改变菌体的细胞膜电荷、膜渗透性及营养物质离子化程度，影响菌体对养分的吸收。另一方面，对催化反应相关酶的活性也具有一定程度的影响^[81]。维生素D₃羟基化酶属于胞内酶，因此考察pH对*B.megaterium* H-1转化维生素D₃的影响。通过NaOH和HCl调节培养基初始pH值，考察不同初始pH值的条件下，培养基对*B.megaterium* H-1的生长及菌体转化维生素D₃的影响。结果表明（图3-6），培养基初始pH在7.0-8.0范围内利于*B.megaterium* H-1的生长，转化72 h时目标产物25(OH)VD₃和副产物1 α ,25(OH)₂VD₃浓度较高，其中菌株生长最适初始pH为7.5。在最适初始pH条件下*B.megaterium* H-1转化底物72 h时产物浓度最高，目标产物25(OH)VD₃浓度为670.19 μ g/L，副产物1 α ,25(OH)₂VD₃浓度为310.25 μ g/L。已有研究表明，*B.megaterium*来源P450羟基化酶BM3的最适pH在7.0-8.0范围内^[82]，枯草芽孢杆菌（*B.subtilis*）来源羟基化酶CYP109B1的最适pH在7.5左右^[83]，该结果与文献报道芽孢杆菌胞内羟基化酶的最适pH值一致。

图3-6 初始pH对*B.megaterium* H-1转化维生素D₃的影响Figure 3-6 Effect of initial pH on the transformation of vitamin D₃ by *B.megaterium* H-1.

3.1.4.2 底物助溶剂对 *B.megaterium* H-1 转化维生素 D₃ 的影响

由于维生素D₃属于脂溶性底物，其在水相中被微生物摄取进入到细胞内的浓度有限^[61]。因此，需要在体系中加入底物助溶剂以促进微生物细胞对底物的摄取速率。有机溶剂在生物法催化合成医药原料、生物柴油、香料等精细化工领域应用广泛，如Panaya等人通过添加丁醇作为助溶剂，提高枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）GRSW1-B1生产香兰素的产量。本论文以有机溶剂对底物的溶解性以及其对菌体的毒性为依据，选择9种常用的有机助溶剂，包括乙醇、乙二醇、丙二醇等来提高底物维生素D₃在发酵培养基中的浓度和分散度^[84]。有机助溶剂对*B.megaterium* H-1转化维生素D₃的影响如图3-7所示，乙二醇与甘油均具有较好的效果。通过对转化结果进行显著性差异分析，虽然添加乙二醇与甘油均可显著提高目标产物25(OH)VD₃的浓度，但是利用乙二醇作为底物助溶剂存在生长抑制现象。另外，在实际应用中甘油常常作为碳源使用，从而促进微生物的生长，属于助溶型碳源^[63]。相较于生物毒性较强的工业有机溶剂，碳源型有机溶剂在发酵过程中可以起到一举多得的效果，因此本论文确定以甘油作为底物维生素D₃的助溶剂。

据文献报道，Tang等人以蜡状芽孢杆菌zju 4-2（*Bacillus cereus* zju 4-2）为羟基化菌株，通过添加200 g/L羟丙基- β 环糊精（HP- β -CD）助溶底物，使产物25(OH)VD₃的浓度达到830 mg/L^[61]。放线菌*Kutzneria albida*在含1%（W/V）甲基- β 环糊精（M- β -CD）的优化培养基中可产生70.4 mg/L的25(OH)VD₃和2.0 mg/L的1 α ,25(OH) $_2$ VD₃^[58]。与环糊精相比，甘油更容易获取且成本低廉，所以本论文采用甘油替代环糊精作为助溶剂也为今后其他维生素D₃生物转化体系的构建提供了指导和借鉴。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/485102343040011114>