2016-10-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2015.11057 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 Chin J Appl Environ Biol 2016, 22(5): 0860-0864

*Thanatephorus cucumeris*对可托多松19位甲基羟化反应条件的优化*

王 玉[1] 张凤禹[1,2] 陈 曦[1] 冯进辉[1] 吴洽庆[1**] 朱敦明[1] 马延和[1]
[1]中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程实验室, 天津市生物催化技术工程中心 天津 300308
[2]中国科学院大学 北京 100049

摘 要 甾体化合物19位甲基羟化反应是甾体药物合成中脱除19位甲基的关键步骤, 需要多步化学反应才能实现, 酶催化则一步就能完成. 为寻找更多能够实现甾体化合物19位甲基羟化反应的微生物和酶并利用酶法实现这一反应, 本研究重新考察丝核薄膜革菌(*Thanatephorus cucumeris*)催化可托多松19位甲基羟基化的反应, 发现除了产生主产物19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松外, 还产生一种极性与19-OH-可托多松非常相近的产物7β-OH-可托多松, 导致19-OH-可托多松分离纯化困难. 通过对转化条件进行控制和优化, 提高了目标产物19-OH-可托多松的比例, 减少了7β-OH-可托多松的生成, 在初始pH 9.0, 装液量100 mL(250 mL锥形瓶), 助溶剂为N,N-二甲基甲酰胺(0.5%, *V*/*V*), 底物投加时间36 h, 底物浓度为0.5 g/L的最适条件下, 几乎不产生7β-OH-可托多松, 转化60 h后, 19-OH-可托多松的产量可达到117 mg/L, 而且产物易于分离纯化. 本研究对*T. cucumeris* 合成19-OH-可托多松的反应条件进行了控制和优化, 使产物易于分离纯化, 为进一步从该菌中获得甾体化合物19位羟基化酶奠定了基础. (图7 参16)

关键词 19位羟基化; 可托多松; 生物转化; 丝核薄膜革菌
CLC TQ464 : Q939.9

Optimization of the transformation conditions for the 19-hydroxylation of cortexolone by *Thanatephorus cucumeris**

WANG Yu[1], ZHANG Fengyu[1,2], CHEN Xi[1], FENG Jinhui[1], WU Qiaqing[1**], ZHU Dunming[1] & MA Yanhe[1]
[1]*National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Engineering Research Center of Biocatalytic Technology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences,* Tianjin 300308, China
[2]*University of Chinese Academy of Sciences,* Beijing 100049, China

Abstract The preparation of 19-hydroxyl steroids, the key intermediates for the synthesis of 19-nor-steroids, requires multistep chemical reactions. Compared to the chemical methods, the 19-hydroxylation of steroids may be achieved with microorganisms or enzymes in one step. The biocatalytic process avoids use of toxic reagents and solvents, and reduces discharge of waste. However, the biocatalytic 19-hydroxylation of steroids has been barely studied. Therefore, searching for biocatalysts for the 19-hydroxylation steroids is of great significance. In this work, we reexamined the biotransformation of cortexolone by *Thanatephorus cucumeris* through isolating and characterizing the products, and investigating the effects of the incubation and biotransformation conditions on the ratio of the products. In addition to the previously reported two products (19-OH-cortexolone and 11β-OH-cortexolone), a new product 7β-OH-cortexolone was identified. The ratio of 19-OH-cortexolone and 7β-OH-cortexolone was found to depend on the biotransformation conditions. The optimal conditions for formation of 19-OH-cortexolone was as follows: initial pH 9.0, medium volume 100 mL (per 250 mL flask), co-solvent N,N-dimethylformamide (0.5%, *V*/*V*), adding cortexolone (final concentration 0.5 g/L) after inoculation for 36 h. Under the optimal conditions, the concentration of 19-OH-cortexolone reached 117 mg/L and only trace amount of 7β-OH-cortexolone was produced at 60 h. The product 19-OH-cortexolone was easily purified by column chromatography. This work studies optimization of transformation conditions for the 19-hydroxylation of cortexolone by *T. cucumeris* and lays a foundation for obtaining effective enzyme catalysts for 19-hydroxylation of steroids.

Keywords 19-hydroxylation; cortexolone; bioconversion; *Thanatephorus cucumeris*

收稿日期 Received: 2015-11-26 接受日期 Accepted: 2015-12-31
*国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA02A211)资助 Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2011AA02A211)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wu_qq@tib.cas.cn)

甾体激素药物对机体有重要的调节作用，广泛应用于临床，其市场规模仅次于抗生素类药物，其生产已经成为医疗保健行业的重要分支[1-4]. 19-去甲甾体药物，如炔诺酮、米非司酮、替勃龙等，是甾体药物一大品种[5-6]. 在这类药物的合成中，19位甲基的羟基化是19去甲化中的关键步骤，利用化学方法进行19位甲基羟基化需要5-6步[7]，而酶催化则一步就能完成. 然而，可以催化甾体化合物进行19位甲基羟化反应的微生物和酶的报道非常少. 因此，寻找酶并利用酶法实现这一反应具有非常重要的意义.

来源于人的芳香化酶CYP19在将雄甾-4-烯-3,17-二酮（简称4-AD）转化为雌酚酮过程中，19-OH-4-AD为第一步转化的中间产物，但很难停留在羟基化这阶段，而是终止于A环的芳香化，这也限制了该酶在合成中的应用[8-10]. 1961年，Hasegawa等人筛选得到一株丝核薄膜革菌（*Thanatephorus cucumeris*），可催化转化可托多松生成两个主产物19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松[11]. 20世纪80年代，Clark等研究了溶氧和葡萄糖对*T. cucumeris*转化可托多松的影响，结果表明该菌转化可托多松得到的产物中，19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松的比例保持不变，维持在1.0∶0.84（19-OH-可托多松∶11β-OH-可托多松）[12-13].

为寻找甾体化合物19位羟化酶，在考察*T. cucumeris*对可托多松进行19位甲基羟基化反应中，我们发现除了产生19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松外，还产生一个极性与19-OH-可托多松非常相近的产物，导致了19-OH-可托多松分离纯化困难，而且随着菌体培养和转化条件的变化，该产物与19-OH-可托多松的比例会发生显著的改变. 为了提高目标产物19-OH-可托多松的比例，减少副产物的生成，我们对转化条件进行控制和优化，从而为后续通过不同菌体培养和转化条件下的组学分析来指导从该菌中获取19位羟化酶奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌种：丝核薄膜革菌（*Thanatephorus cucumeris*）购自日本NBRC保藏中心，保藏编号NBRC 6298.

菌株以马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基保存. 液体培养基组成为（g/L）：葡萄糖25，酵母膏20，pH 9.0，250 mL三角瓶装100 mL培养基，115 ℃湿热灭菌20 min.

1.2 培养与转化条件优化

取PDA上生长好的丝核薄膜革菌，将菌体捣碎后接种到盛有培养基的三角瓶中，30 ℃、200 r/min培养，一定时间后投加底物可托多松（最终投料浓度为0.5 g/L），继续在相同培养条件下进行转化.

考察不同条件下，底物转化情况和产物分布情况. pH作为菌体培养的重要条件之一，直接影响菌体的生长及酶的催化能力，从而影响菌体的代谢和产物的合成[14]，因此对初始pH值进行优化：分别调配不同初始pH（4.0-9.0）的培养基（100 mL锥形瓶中加入20 mL培养基），菌体培养36 h后，向其中加入预先用N,N-二甲基甲酰胺（DMF）溶解的底物，使底物终浓度为0.5 g/L，助溶剂用量0.5%，继续转化72 h. 装液量优化：250 mL锥形瓶分别加入不同体积的培养基，培养基初始pH为优化后pH值，菌体培养36 h后，向其中加入预先用DMF溶解的底物，使底物终浓度为0.5 g/L，助溶剂用量0.5%，继续转化72 h. 不同时期的菌体的生理状态、酶催化能力不同，底物的投加时间是影响甾体转化的一个重要因素[15]，因此对底物投加时间进行优化：菌体在优化后的初始pH值的培养基中（装液量为优化后装液量）分别培养0、12、24、36、48、60、84 h后投加预先用DMF溶解的底物，使底物终浓度为0.5 g/L，助溶剂用量0.5%，继续转化48 h. 助溶剂种类：菌体在优化后的初始pH值的培养基中（装液量为优化后装液量）培养36 h后，向其投加底物，选取不同助溶剂及不加助溶剂为对照组，使底物终浓度为0.5 g/L，助溶剂用量0.5%，继续转化72 h. 助溶剂添加量：菌体在优化后的初始pH值的培养基中（装液量为优化后装液量）培养36 h后，投加预先用DMF溶解的底物，使底物终浓度为0.5 g/L，不同的DMF添加量，继续转化72 h.

1.3 分析方法

产物含量及底物转化率测定采用HPLC法. 全部发酵液用等体积乙酸乙酯萃取，取2 mL有机相挥干，加入1 mL甲醇溶解后经0.22 μm有机膜过滤. 色谱条件：Eclipse XDB-C18（4.6 mm × 150 mm）色谱柱，流动相甲醇∶水，采用梯度洗脱法，流速0.6 mL/min，柱温30 ℃；UV 254 nm检测，梯度洗脱程序为25 min甲醇∶水，36∶64（*V*/*V*）；25.5 min甲醇∶水，70∶30；45 min甲醇∶水，36∶64；60 min甲醇∶水，36∶64.

1.4 产物提取及分离纯化

投料60-72 h后底物基本转化完全，菌体与发酵液抽滤分离，滤饼用适量乙酸乙酯萃取3次，滤液用等体积乙酸乙酯萃取3次，有机相使用旋转蒸发仪浓缩，柱层析分离后制备色谱分离. 制备色谱流动相比例为甲醇∶水= 29∶71.

2 结果与分析

2.1 7β-OH-可托多松的发现与鉴定

为寻找甾体化合物19位羟化酶，在考察*T. cucumeris*对可托多松进行19位甲基羟基化反应过程中，除了产生19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松外，还产生了另外一种产物，该产物与19-OH-可托多松的极性非常接近. 而且在转化过程中，还发现随着菌体培养和转化条件的变化，19-OH-可托多松和该化合物的比例会发生显著的改变（图1）.

将该化合物进行分离和鉴定，鉴定为7β-OH-可托多松. ^{1}H NMR（CD_3OD, 400 MHz）δ（10^{-6}）5.78 （s, 1H），4.47（dd *J* =53, 72 Hz, 2H），3.37-3.32（m, 1H），2.61-2.68（m, 1H），2.42-2.58（m, 3H），2.25-2.33（m, 1H），2.04-2.14（m, 2H），1.82-1.98（m, 2H），1.74-1.61（m, 4H），1.38-1.56（m, 3H），1.24（s, 3H），0.92-1.03（m, 1H），0.69（s, 3H）. ^{13}C NMR（CD_3OD, 100 MHz）δ（10^{-6}）214.0, 202.3, 171.7, 124.9, 89.7, 75.8, 68.1, 52.0, 51.3, 49.8, 44.3, 43.9, 39.5, 36.8, 35.7, 34.8, 31.6, 27.4, 21.8, 17.7, 15.6. HR-MS（ES+）. 理论值：$C_{21}H_{30}O_5$（M + Na）385.1991；实测值：385.1997.

产物7β-OH-可托多松与19-OH-可托多松的极性非常接近，导致了19-OH-可托多松分离纯化困难，为了提高19-OH-可

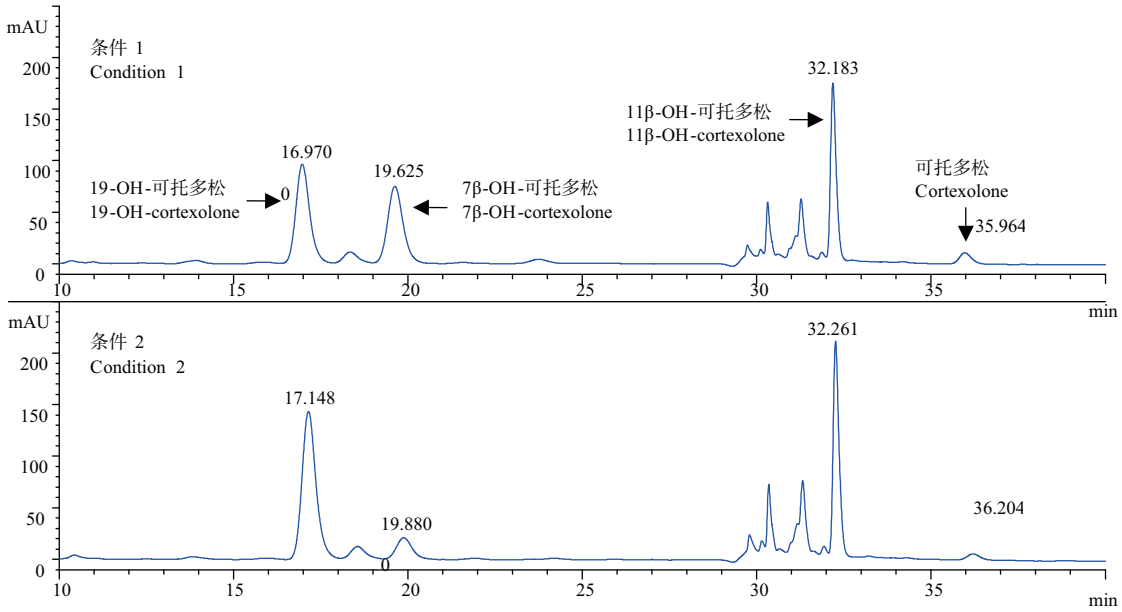


图1 ***T. cucumeris*在不同条件下转化可托多松的HPLC谱图.**

Fig. 1 HPLC analysis of the cortexolone biotransformation by *T. cucumeris* under different conditions.

托多松的比例，减少7β-OH-可托多松的生成，对菌体的转化条件进行了优化.

2.2 转化条件对各产物含量及底物转化率的影响

2.2.1 初始pH值对各产物含量及底物转化率的影响 用不同的初始pH条件进行实验，由图2可以看出偏酸以及偏碱性的pH值有利于19-OH-可托多松的生成，而中性的pH值则更利于生成7β-OH-可托多松，随着起始pH值的变化，二者的比例变化明显. 11β-OH-可托多松的产量以及在3个产物中的比例随起始pH值的变化波动不大. 不同起始pH值对底物转化率的影响不大.

在起始pH为9.0时，19-OH-可托多松在3个产物中所占的比例最高，产量为112 mg/L，7β-OH-可托多松的产量很低. 由此确定pH 9.0为最佳初始pH值.

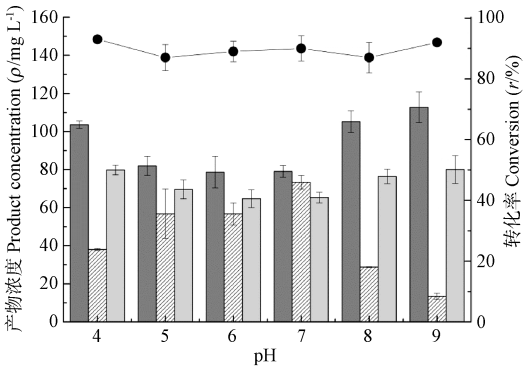


图2 不同pH对各产物含量及底物转化率的影响. ▬: 19-OH-可托多松; ▨: 7β-OH-可托多松; ▭: 11β-OH-可托多松; ●: 转化率.

Fig. 2 Effect of the pH on the product concentration and conversion of the substrate. (▬) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (●) conversion.

2.2.2 装液量对各产物含量及底物转化率的影响 由图3可以看出，随着装液量的增加，可托多松的转化率随之增加，同时19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松的含量也随之增加，但是装液量的变化对7β-OH-可托多松的含量没有影响，始终保持在低浓度. 装液量对菌体的生长有影响，装液量过低（25 mL/250 mL）不利于菌体生长，所以导致转化率下降，进而影响到19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松的含量. 250 mL三角瓶中装液量为50 mL、75 mL、100 mL时，各产物的含量以及可托多松的转化率增加不明显，选择250 mL三角瓶中装液量为100 mL时为当前条件下较佳的装液量.

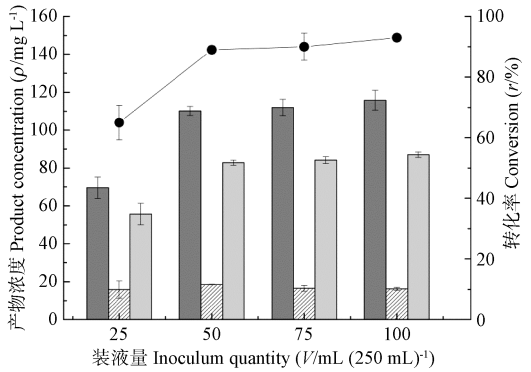


图3 不同装液量对各产物含量及底物转化率的影响. ▬: 19-OH-可托多松; ▨: 7β-OH-可托多松; ▭: 11β-OH-可托多松; ●: 转化率.

Fig. 3 Effect of inoculum quantity on the product concentration and conversion of the substrate. (▬) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (●) conversion.

2.2.3 底物投加时间对各产物含量及底物转化率的影响 分别在菌体生长不同时期加入底物，结果如图4所示. 可以看出，菌龄较小的菌体倾向于生成19-OH-可托多松，而菌龄较大的菌体则更倾向于生成7β-OH-可托多松，可能造成这种现象的原因主要有两点：一是随着菌体的生长，发酵液中的营养成分消耗同时会产生一些代谢物，导致发酵液pH值变化影响可托多松羟化酶的活性. 通过监测36 h和84 h投加

底物后反应液pH值的变化，发现二者反应体系的pH值有一些差异，36 h投加底物，反应液pH值从8.22变为7.85，84 h投加底物，反应液pH值从7.90变为8.26. 二是随着菌龄的增加，*T. cucumeris*菌体更倾向于产生可托多松7位羟化酶. 36 h前投加底物，由于底物及有机溶剂对菌体生长的抑制作用，导致菌体生长缓慢，菌体量少故而产物的含量及底物转化率都不高. 菌体培养48 h后投加底物，底物转化率有所下降，可能是由于菌体培养后期酶的活性降低所造成的.

在菌体培养36 h和48 h投加底物，19-OH-可托多松在3个产物中所占的比例、产物19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松的含量以及底物转化率都是最优的，因此选择菌体培养36 h-48 h时投加底物.

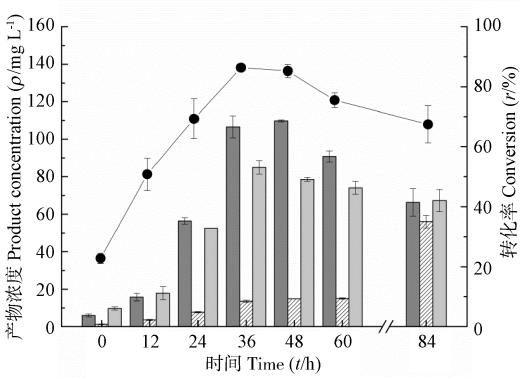


图4 底物投加时间对各产物含量及底物转化率的影响. ▭: 19-OH-可托多松；▨: 7β-OH-可托多松；▭: 11β-OH-可托多松；●: 转化率.

Fig. 4 Effect of feeding time on the product concentration and conversion of the substrate. (▭) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (●) conversion.

2.2.4 **助溶剂种类对各产物含量及底物转化率的影响** 为了增加甾体底物的溶解性，本研究中选择了6种常用的有机助溶剂，包括乙醇、丙酮、DMF、二甲基亚砜（DMSO）、二氯甲烷和乙酸乙酯（EA）来提高底物在转化液中的浓度和分散度，助溶剂对各产物含量及底物转化率的影响如图5所示. 与对照相比，DMF和DMSO对可托多松的转化均有明显的促进作用，而其他有机溶剂则对可托多松的转化有轻微的抑制作用. 其中添加助溶剂DMF时，产物19-OH-可托多松在3个产物中所占的比例最高，且7β-OH-可托多松的含量低；添加助溶剂EA时，产物7β-OH-可托多松在产物中的比例升高. 故选择DMF为最佳的助溶剂.

2.2.5 **助溶剂添加量对各产物含量及底物转化率的影响** 在确定DMF为助溶剂后，再次确定其添加量，如图6所示. 向培养基中添加不同浓度的DMF时发现：添加量为0.5%时，19-OH-可托多松的浓度和底物转化率最高，略高于添加量为0.25%；而再提高DMF添加量时，各产物的浓度及底物的转化率大幅度下降. 过多的有机溶剂会对菌体产生毒性，影响菌体生长和酶的催化活性. 因此选择向培养基中添加0.5%（*V*/*V*）的DMF.

2.2.6 **最适转化条件下底物转化进程** 在最适转化条件下，对*T. cucumeris*转化可托多松的过程进行分析，结果如图7所示. 产物19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松在底物转化36 h之前快速生成，36 h之后底物虽有所转化但19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松产量增加幅度不大，在转化60 h时，19-OH-可托多松和11β-OH-可托多松产量达到最高，转化60 h后，两种产物的产量有下降的趋势，分析其原因可能是由于菌体对产物有一定的代谢[16]. 在底物转化48 h前，7β-OH-可托

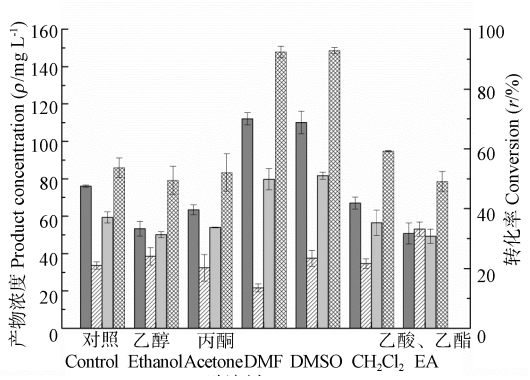


图5 有机助溶剂对各产物含量及底物转化率的影响. ▭: 19-OH-可托多松；▨: 7β-OH-可托多松；▭: 11β-OH-可托多松；▨: 转化率.

Fig. 5 Effects of the organic solvent on the product concentration and conversion of the substrate. (▭) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (▨) conversion.

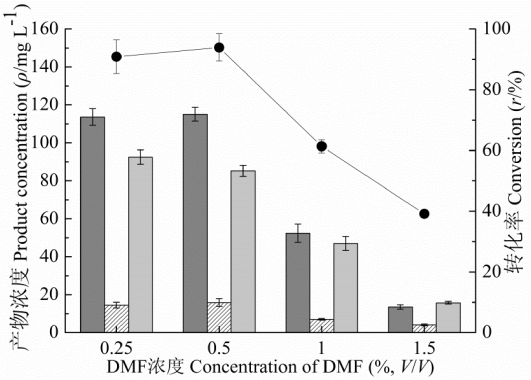


图6 DMF添加量对各产物含量及底物转化率的影响. ▭: 19-OH-可托多松；▨: 7β-OH-可托多松；▭: 11β-OH-可托多松；●: 转化率.

Fig. 6 Effect of DMF concentration on the product concentration and conversion of the substrate. (▭) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (●) conversion.

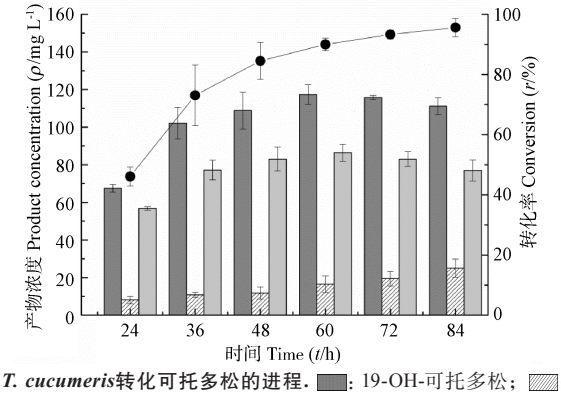


图7 *T. cucumeris*转化可托多松的进程. ▭: 19-OH-可托多松；▨: 7β-OH-可托多松；▭: 11β-OH-可托多松；●: 转化率.

Fig. 7 Process curves of cortexolone transformation by *T. cucumeris*. (▭) 19-OH-cortexolone; (▨) 7β-OH-cortexolone; (▭) 11β-OH-cortexolone; (●) conversion.

多松产量没有明显增加，保持在低浓度. 在反应后期，随着底物的转化，7β-OH-可托多松含量有所增加. 因此转化时间控制在60-72 h，有利于19-OH-可托多松的生成，且7β-OH-可托多松含量低，该条件下19-OH-可托多松产量可达117 mg/L.

2.3 产物19-OH-可托多松的分离纯化及鉴定

在最适转化条件下进行3.8 L发酵，底物投料浓度为0.5 g/L，转化60 h后合并所有发酵液，HPLC检测底物转化率为90%，19-OH-可托多松产量115 mg/L，7β-OH-可托多松含量低. 在此条件下，通过一步柱层析就可以分离得到高纯度的19-OH-可托多松，鉴定结果如下.

^{1}H NMR（CD_3OD, 400 MHz）δ（10^{-6}）5.88（s, 1H），4.47（dd J = 52, 79 Hz, 2H），3.95（dd J =26, 42 Hz, 2H），2.61-2.83（m, 2H），2.48-2.59（m, 1H），2.21-2.45（m, 3H），1.90-2.01（m, 1H），1.69-1.86（m, 6H），1.24-1.58（m, 4H），0.98-1.21（m, 2H），0.68（s, 3H）. ^{13}C NMR（CD_3OD, 100 MHz）δ（10^{-6}）213.4, 203.2, 171.7, 126.7, 90.3, 67.8, 65.9, 55.2, 52.1, 49.3, 45.3, 37.5, 35.8, 34.9, 34.6, 34.4, 33.7, 32.1, 24.5, 22.3, 15.4. HR-MS（ES+）理论值： $C_{21}H_{30}O_5$（M + Na）385.1991，实测值：385.1996.

3 结论

本研究重新考察了*T. cucumeris*催化可托多松19位甲基羟基化的过程，发现除了主产物19-OH可托多松和11β-OH-可托多松，还产生一种极性与19-OH-可托多松非常相近的产物，鉴定为7β-OH-可托多松. 随着菌体培养和转化条件的变化，7β-OH-可托多松与19-OH-可托多松的比例会发生显著的改变. 通过单因素试验考察了初始pH、装液量、底物投加时间以及有机溶剂助溶对各产物含量及底物转化率的影响，结果发现，初始pH 9.0，装液量100 mL（250 mL锥形瓶），菌体培养36 h后投加底物，底物用0.5% DMF（*V*/*V*）助溶，转化60 h，此时19-OH-可托多松含量最高，且7β-OH-可托多松含量低，从而提高了产物中19-OH-可托多松的比例，减少了7β-OH-可托多松的生成，通过一步柱层析分离就可以得到高纯度的19-OH-可托多松.

在本研究结果的基础上，我们已开始对*T. cucumeris*在不同条件下的转录组进行测定和分析，以获得19位甲基羟化酶基因和羟基化酶.

参考文献 [References]

1 Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **32** (6): 688-705

2 Tong WY, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2009, **3** (2): 141-153

3 Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **94** (6): 1423-1447

4 Bhatti HN, Khera RA. Biological transformations of steroidal compounds: a review [J]. *Steroids*, 2012, **77** (12): 1267-1290

5 Lakha F, Ho P, Van der Spuy ZM, Dada, K, Elton, R, Glasier, AF, Critchley, HOD, Williams, ARW, Baird, DT. A novel estrogen-free oral contraceptive pill for women: multicentre, double-blind, randomized controlled trial of mifepristone and progestogen-only pill (levonorgestrel) [J]. *Hum Reprod*, 2007, **22** (9): 2428-2436

6 Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz, IM. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, **11** (3): 293-307

7 Heusler K, Kalvoda J. Selective functionalization of the angular methyl group and further transformation to 19-norsteroids [J]. *Organ Reactions Steroid Chem,* 1972, **2**: 237-287

8 Sohl CD, Guengerich FP. Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1 [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285** (23): 17734-17743

9 Kao YC, Korzekwa KR, Laughton CA, Chen, S. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450 [J]. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (2): 243-251

10 Hong YY, Yu B, Sherman M, Yuan YC, Zhou DJ, Chen, SA. Molecular basis for the aromatization reaction and exemestane-mediated irreversible inhibition of human aromatase [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, **21** (2): 401-414

11 Takahashi T, Hasegawa T. Studies on the microbiological transformation of steroids: Part IX. Transformation of C19-Steroids by *Pellicularia filamentosa* f. sp. *microsclerotia* IFO 6298 [J]. *Agric Biol Chem*, 1964, **28** (1): 38-47

12 Clark TA, Chong R, Maddox IS. The effect of dissolved oxygen tension on 11β-and 19-hydroxylation of Reichstein's Substance S by *Pellicularia filamentosa* [J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1982, **14** (3): 131-135

13 Clark TA, Maddox IS, Chong R. The effect of glucose on 11β-and 19-hydroxylation of Reichstein's substance S by *Pellicularia filamentosa* [J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1983, **17** (4): 211-215

14 郭倩, 张铁雨, 冯进辉, 王玉, 陈曦, 路福平, 吴洽庆, 朱敦明. 高效转化胆固醇菌株的筛选、鉴定及转化条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (1): 101-106 [Guo Q, Zhang TY, Feng JH, Wang Y, Chen X, Lu FP, Wu QQ, Zhu DM. Screening, identification and condition optimization of a bacterial strain efficient in biotransforming cholesterol [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (1): 101-106]

15 付珍珍, 李恒, 李会, 许正宏. *Gibberella intermedia* CA3-1羟基化去氢表雄酮的工艺[J]. 生物加工过程, 2015, **13** (1): 1-5 [Fu ZZ, Li H, Li H, Xu ZH. C7α-hydroxylation of dehydroepiandrosterone by *Gibberella intermedia* CA3-1. *Chin J Bioprocess Eng*, 2015, **13** (1): 1-5]

16 Takahashi T, Hasegawa T. Studies on the oxidation of steroids by fungi part I. The steroid oxidizing property of Corticium sasakii [J]. *Bull Agric Chem Soc Japan*, 1958, **22** (4): 212-217