

CHUYỂN HÓA SINH HỌC PHYTOSTEROL THÀNH ANDROSTENEDIONE (AD) NHỜ CHŨNG *MYCOBACTERIUM NEOAURUM*

Nguyễn Thị Quý¹, Lê Văn Trường¹, Nguyễn Văn Hiếu¹, Phạm Thị Bích Hợp¹, Nguyễn Thị Diệp², Lưu Thị Kim Nhung², Lưu Đức Huy², Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Viện Hóa học

TÓM TẮT

Chuyển hóa vi sinh phytosterol (93% độ tinh sạch) thành androstenedione (AD) nhờ chủng *Mycobacterium neoaurum* được tiến hành trên quy mô bình tam giác dung tích 750 ml chứa 150 ml môi trường chuyển hóa và quy mô nổi lên men 5 l chứa 3,5 l môi trường chuyển hóa. Tỷ lệ cơ chất phytosterol trong môi trường chuyển hóa là 1%. Tỷ lệ tiếp giống là 10%. Quá trình chuyển hóa ở các bình tam giác được thực hiện ở 30°C, 220 vòng/phút, pH môi trường là 7,5. Khi nâng lên quy mô 5 l, các thông số lên men sau được duy trì trong suốt quá trình chuyển hóa: nhiệt độ ổn định ở 30°C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút, oxy hòa tan dao động trong khoảng 85%. Kết quả thí nghiệm cho thấy, thời gian chuyển hóa kéo dài 96 h ở các bình tam giác, trong khi ở nổi lên men 5 l là 88 h. Hàm lượng AD được chuyển hóa ở các bình tam giác đạt khoảng 4 g/l theo phương pháp phân tích bằng sắc ký bản mỏng (TLC) và hiệu suất chuyển hóa là 73,77% (mol), trong khi ở nổi lên men 5 l nhỏ hơn 3 g/l (TLC) và hiệu suất chuyển hóa chỉ đạt 31% (mol). Độ tinh sạch của sản phẩm AD tinh chế được phân tích theo hệ thống sắc ký lỏng cao áp đều đạt $\geq 95\%$.

Từ khóa: Androstenedione (AD), chuyển hóa vi sinh, *Mycobacterium neoaurum*, phytosterol

MỞ ĐẦU

Các hợp chất có nguồn gốc từ steroid được xếp vào một trong những sản phẩm tiêu thụ rộng rãi trên thị trường của ngành công nghiệp dược phẩm (Fernandes *et al.*, 2003). Nhóm tác giả này cũng cho biết việc sản xuất thuốc và các hormone có bản chất steroid là những ví dụ điển hình nhất trong việc ứng dụng thành công công nghệ vi sinh trong công nghiệp ở quy mô lớn. Trong số các steroid được tạo ra nhờ vi khuẩn thì 9 α -hydroxy-17-keto steroids đóng vai trò quan trọng vì chúng là tiền chất cho tổng hợp các corticosteroid. Một hợp chất được ưa dùng là 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione vì nó có hoạt tính kháng động dục nam và nữ nhưng chủ yếu nó được dùng làm nguyên liệu trung gian để tổng hợp các corticosteroids có giá trị trong y học (Slijkhuis *et al.*, 1994) hay các thuốc chống viêm, chống dị ứng như Dexametason, Cortinef, Ftrocort, Flucinar (Andryushina *et al.*, 2008). Một trong những phương pháp sản xuất androstenedion (AD) quy mô thương mại là chuyển hóa cholesterol (nguồn gốc động vật) hoặc β -sterols thực vật nhờ các chủng vi khuẩn đột biến (Stefanov *et al.*, 2006). Phytosterol là các hợp chất giống sterol được tổng hợp ở thực vật và không có giá trị dinh dưỡng cho con người. Trong thực vật, phytosterol đóng vai trò

tham gia vào chức năng của tế bào giống như vai trò của cholesterol trong cơ thể con người (Kutney *et al.*, 1998). Phytosterol cùng với diosgenin, solasodin được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm như là nguyên liệu đầu vào để sản xuất các hormone có bản chất steroid (Pérez *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2003). Hiện nay, phytosterol đóng vai trò là cơ chất để tổng hợp androstenedione đang được sử dụng rộng rãi (Pérez *et al.*, 2006). Hỗn hợp phytosterol được tách chiết từ nhiều nguồn rẻ tiền, chủ yếu từ ngành công nghiệp giấy và công nghiệp mía đường (Pérez *et al.*, 2006) hoặc dầu ngô, dầu mầm lúa mì, xi dầu đậu tương hay ngô (Kutney *et al.*, 1998). Trên thực tế, nhiều bằng sáng chế về tách chiết và tinh sạch hỗn hợp phytosterol đã được báo cáo (Kutney *et al.*, 1998). Một nguồn phytosterol rất quan trọng khác đó là đậu tương, là chất phụ gia thực phẩm đáng chú ý ở châu Á và trên thế giới (Pérez *et al.*, 2006). Nhóm tác giả này cũng trích dẫn rằng nền công nghiệp giấy, mía đường và chế biến đậu tương hiện đang phát triển ở Việt Nam.

Ở nước ta, lĩnh vực nghiên cứu sản xuất phytosterol nguyên liệu trong nước cũng như chuyển hóa phytosterol thành AD nhờ vi sinh vật chưa phổ biến rộng rãi. Tuy nhiên, vì cơ chất này có đặc điểm kỵ nước nên ảnh hưởng lớn đến việc tiếp xúc cơ chất của vi khuẩn, làm giảm hiệu suất sản phẩm tạo

thành, vì thế thời gian lên men kéo dài là điều cần thiết để đạt được mức độ chuyển hóa tốt hơn (Kutney *et al.*, 2005). Mục đích của bài báo này là thực hiện việc chuyển hóa vi sinh phytosterol (với thành phần có thể chuyển hóa được là trên 93%) thành AD nhờ chủng *Mycobacterium neoaurum* của Nga ở quy mô bình tam giác 750 ml và quy mô 5 l.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các hóa chất dùng cho môi trường nhân giống và lên men đạt tiêu chuẩn phân tích mua của các hãng Merck: Môi trường nhân giống (%): 1 g glucose, 0,5 g bột đậu tương, 0,1 g NH₄Cl, 0,05 g K₂HPO₄, pH 7,5; Môi trường lên men: là môi trường nhân giống chứa 1% phytosterol.

Chất chuẩn AD (98% tinh sạch) được mua của hãng Sigma. Cơ chất phytosterol (93% độ tinh sạch) có nguồn gốc từ phế phụ thải của ngành công nghiệp chế biến đậu tương do Phòng Hóa học Steroid, Viện Hóa học điều chế và cung cấp.

Chủng *Mycobacterium neoaurum* của Nga được dùng cho các thí nghiệm chuyển hóa vi sinh ở bình tam giác và nổi lên men 5 l. Nổi lên men 5 l Bioflo 110 fermentor (Mỹ).

Phương pháp

Phương pháp chuyển hóa ở bình tam giác

Trước hết, chủng *M. neoaurum* được làm giàu trong bình tam giác dung tích 500 ml chứa 100 ml môi trường nhân giống với các thành phần sau: 1 g glucose, 0,5 g bột đậu tương, 0,1 g NH₄Cl, 0,05 g K₂HPO₄, pH 7,5. Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở 220 vòng/phút, nhiệt độ 30°C, duy trì 96 h rồi chuyển sang môi trường chuyển hóa có bổ sung 1% cơ chất phytosterol với tỷ lệ giống là 10%. Quá trình chuyển hóa được thực hiện ở cùng điều kiện nuôi cấy như trên trong khoảng thời gian là 90 ± 10 h.

Phương pháp chuyển hóa ở nổi lên men 5 l

Cây chủng *M. neoaurum* từ ống thạch nghiêng vào bình tam giác 2 l chứa 500 ml môi trường nhân giống và nuôi cấy ở điều kiện như trên. Sau 96 h, chuyển toàn bộ giống sang nổi lên men 5 l chứa 3,5 l môi trường chuyển hóa có bổ sung 1% phytosterol. Cơ chất còn dư và AD tạo thành sau 3 ngày lên men được đánh giá bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Phân tích sản phẩm

Dịch nuôi cấy được đánh giá theo phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC). Dịch lên men được chiết với ethylacetate theo tỷ lệ 1 : 4 rồi chấm trên bản mỏng sắc ký cùng chất chuẩn AD có nồng độ 3, 4 và 5 mg/ml, chạy trong hệ dung môi n-hexan: acetone (3 : 2) và quan sát dưới kính lọc tia tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Độ tinh sạch của sản phẩm AD sau tinh chế được đánh giá bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC), sử dụng đệm H₂O: methanol (4 : 6), tốc độ 1 ml/phút, bước sóng phát hiện 240 nm, cột Cromasil LC18, thể tích mẫu đưa lên cột 10 µl.

Thu hồi sản phẩm

Sau khi ly tâm, sinh khối tế bào được chiết bằng dung dịch acetone và lọc qua phễu Buchner 0,01 m², áp suất 35 Kpa. Rửa sinh khối lại bằng acetone và chung cất qua hệ thống ống sinh hàn. Khử màu dịch lọc chứa AD bằng than hoa. Dịch chiết sau đó để bay hơi trong chân không. Phần lắng AD sau đó được lọc bằng giấy lọc và thu hồi AD thô, làm khô ở 60°C tới trọng lượng không đổi. AD thô thu lại tiếp tục được tinh chế bằng methylene chloride, khử màu bằng than hoa và chiết bằng n-hexan. Cuối cùng là kết tinh bằng diethyl ether để thu được AD tinh chế và làm khô đến trọng lượng không đổi ở 60°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chuyển hóa phytosterol thành AD ở quy mô bình tam giác 750 ml

Thí nghiệm được tiến hành trên quy mô bình tam giác sử dụng chủng vi sinh *M. neoaurum* của Nga nhằm đánh giá khả năng chuyển hóa phytosterol thành AD trên môi trường chuyển hóa sử dụng bột đậu tương mua ngoài thị trường Việt Nam. Mục đích của thí nghiệm này là nghiên cứu sử dụng nguyên liệu rẽ tiền và cơ chất chế biến trong nước ở quy mô lên men lớn hơn nhằm hạ giá thành sản phẩm cũng như thúc đẩy khả năng tự sản xuất thuốc có bản chất steroid ở Việt Nam. Thí nghiệm được thực hiện trong 5 bình tam giác 750 ml, mỗi bình chứa 150 ml môi trường chuyển hóa. Sau 77 h, mẫu ở bình số 5 được lấy ra để đánh giá lượng cơ chất còn dư và sản phẩm tạo thành. Hàm lượng AD tương ứng với vạch AD chuẩn (6) có nồng độ 3 mg/ml. Bình này được lấy ra khỏi tủ lạnh. Bốn bình còn lại tiếp tục lactic tới 96 h, dịch chiết từ các bình này tiếp tục được đánh giá trên bản mỏng sắc ký. Kết quả định tính ở hình 1 cho thấy hàm lượng AD tạo thành trong các bình (1 tới 4) tương đương với vạch AD chuẩn (7) có nồng độ 4

mg/ml. Dịch chuyển hóa từ 4 bình tam giác này được gom lại và tách chiết. Kết quả định tính và định lượng được trình bày trong hình 1 và bảng 1.

Sau tinh chế, độ tinh sạch của sản phẩm được đánh giá bằng HPLC (Hình 2).

Như nhiều tài liệu đã công bố, hiệu suất chuyển hóa phytosterol thành AD phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như chủng vi sinh vật, nhiệt độ lên men, thời gian chuyển hóa, thành phần môi trường, tỷ lệ cơ chất, cách hòa tan cơ chất và cả thành phần sterol trong cơ chất. Pérez và đồng tác giả (2006) đã công bố kết quả nghiên cứu sử dụng chủng MB3683 ở quy mô bình tam giác chứa 50 ml môi trường có bột đậu tương làm nguồn carbon và nitrogen đạt hiệu suất chuyển hóa là 60,6 và 64,8% với hai mẫu phytosterol Việt Nam (VN1, VN2) tách từ dầu đậu tương có thành phần phytosterol là 55,39 và 70,55%, trong khi với mẫu VN3 (70,1% phytosterol) hiệu suất chuyển hóa chỉ đạt 46,1%. Các kết quả này được nhóm tác giả giải thích là do thành phần phytosterol khác nhau (chủ yếu là campesterol, sitosterol và stigmasterol) trong các mẫu cơ chất đã ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hóa. Như vậy, hiệu suất chuyển hóa (73%) trong thí nghiệm của chúng tôi cao hơn khá nhiều so với kết quả ở trên, đó là do cơ chất có độ tinh khiết 93% đã làm tăng khả năng chuyển hóa của chúng.

Chuyển hóa phytosterol thành AD ở quy mô nồi lên men 5 l

Dựa trên những kết quả nghiên cứu thành công ở quy mô bình tam giác, chúng tôi nâng thí nghiệm lên quy mô 5 l với tổng thể tích môi trường chuyển hóa là 3,5 l, tỷ lệ cơ chất 1%. Ngoài ra, 2 bình tam giác loại 500 ml chứa 100 ml môi trường chuyển hóa trong mỗi bình cũng được lắc song song để so sánh. Lượng bọt sinh ra được kiểm soát bằng cách tăng tốc độ khuấy kết hợp với giảm nguồn cung cấp oxy hoặc bằng một lượng tối thiểu dầu phá bọt. Dịch lên men được đánh giá sau 70 và 88 h chuyển hóa. Kết quả từ bản mỏng sắc ký cho thấy quá trình chuyển hóa đã kết thúc, vạch AD ở nồi 5 l và hai bình tam giác có độ đậm không giống nhau. Hàm lượng AD ở nồi 5 l (5) so với AD chuẩn (1) ước tính khoảng 2,5 g/l, trong khi ở hai bình tam giác (6 và 7) ước đạt khoảng 5 g/l (Hình 3). Dịch lên men được ly tâm và tinh chế. Kết quả định lượng được trình bày ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy hiệu suất chuyển hóa ở nồi lên men 5 l (31%) thấp hơn nhiều so với kết quả ở

bình tam giác (73,77%). Những nguyên nhân chính sau đã ảnh hưởng tới quá trình chuyển hóa: i) Bột đậu tương trong môi trường phản ứng có hàm lượng lipid khá cao (16,20%) và cơ chất phytosterol không tan trong nước gây trở ngại cho việc lợi dụng cơ chất của chủng thí nghiệm. Kết quả là đã có một lượng lớn cơ chất bám vào xung quanh thành nồi và các điện cực trong nồi. ii) Sau khi khử trùng, môi trường chuyển hóa trong nồi 5 l không được khuấy ngay nên đã có một lượng nhất định phytosterol kết tụ lại với nhau thành những hạt lớn, do đó góp phần nhỏ ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hóa. iii) Hệ thống cánh khuấy của nồi lên men chưa được thiết kế phù hợp cho mục đích của thí nghiệm. Trục khuấy cần được thiết kế sao cho khi cánh khuấy hoạt động, môi trường và lượng bột trên bề mặt nồi lên men phải được cuốn xuống dưới giống như dòng xoáy nước.

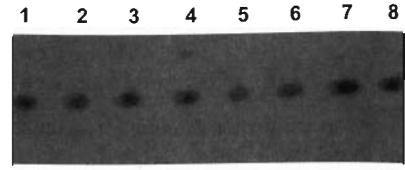
Vì thiết kế của nồi 5 l chưa phù hợp cho thí nghiệm chuyển hóa này nên sau khi rút hết dịch lên men ra khỏi nồi, lớp bám trên thành nồi và các điện cực được gom lại và phân tích định tính trên bản mỏng sắc ký (Hình 4).

Như vậy, mẫu phân tích chứa chủ yếu là phytosterol chưa được chuyển hóa, một phần AD đã tạo thành và một phần nhỏ sản phẩm phụ trong quá trình chuyển hóa, đó là androstadienedione (ADD), một chất có công thức hóa học tương tự AD nhưng bị dehydro hóa ở vị trí carbon thứ 2 và 3 nên trọng lượng phân tử của ADD (285,4) nhỏ hơn của AD (286,4) và nằm ngay sát phía dưới vạch AD trên sắc ký đồ (đường chạy số 2, Hình 4). Để khẳng định cho kết quả này, mẫu (2) được chấm lại trên bản mỏng sắc ký khác (Hình 5) cùng với phytosterol chuẩn (1), ADD chuẩn (3) và AD chuẩn (4) và hiện màu trong Cs_2SO_4 , ủ ở 150°C cho tới khi xuất hiện các vạch màu trên bản sắc ký. Như vậy, từ kết quả ở hình 5 ta có thể kết luận chính xác rằng sản phẩm phụ của quá trình chuyển hóa trong nồi lên men 5 l chính là ADD.

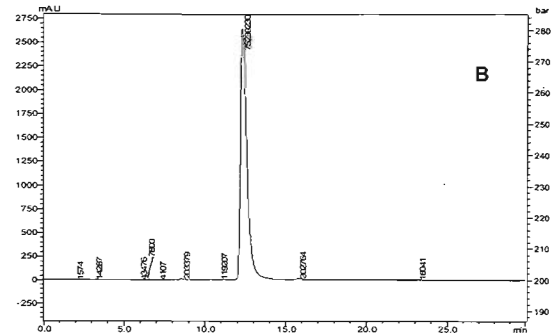
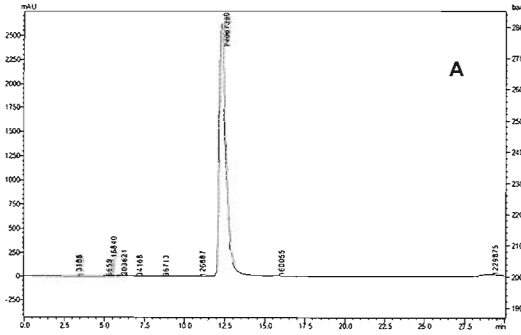
Theo kết quả công bố của Kutney và đồng tác giả (2005), hiệu suất chuyển hóa phụ thuộc vào hàm lượng cơ chất và cách hòa tan cơ chất. Chủng *Mycobacterium* MB3683 đã chuyển hóa phytosterol thành AD với hiệu suất là 30% trong fermentor 50 l chứa 15 l môi trường chuyển hóa. Phytosterol (5 g/l) được hòa tan trong dầu hướng dương (1 kg/l), thời gian chuyển hóa kéo dài 7 ngày. Hiệu suất chuyển hóa lên tới 50% nếu phytosterol được hòa tan trong silicone và đạt tới 90% nếu thay silicone bằng polypropylene glycol (100 g/l).

Bảng 1. Kết quả định lượng sản phẩm AD quy mô bình tam giác.

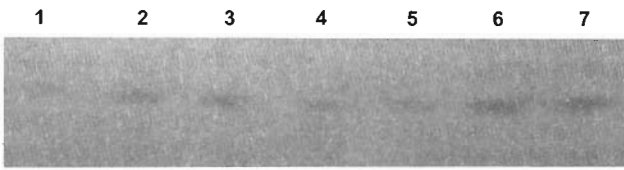
Thể tích lên men (ml)	Cơ chất (g)	AD thô (g)	AD tinh chế (g)	Độ tinh sạch (HPLC) (%)	Hiệu suất chuyển hóa theo Mol (%)	
150 ml/bình x 4 bình	600	6	3,9	2,84	99,55	73,77



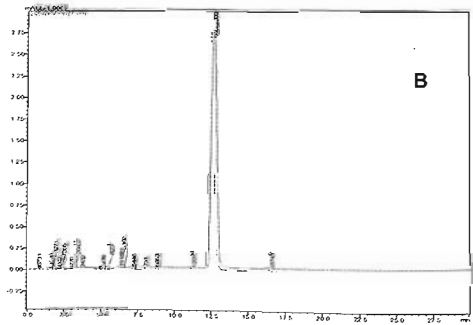
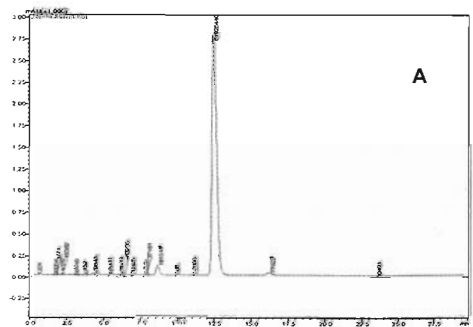
Hình 1. Sắc ký đồ TLC dịch chuyển hóa ở 5 bình tam giác 750 ml. 1 - 5: Các bình tam giác thứ 1, 2, 3, 4, và 5; 6 - 8: AD chuẩn có nồng độ 3, 4, và 5 mg/ml.



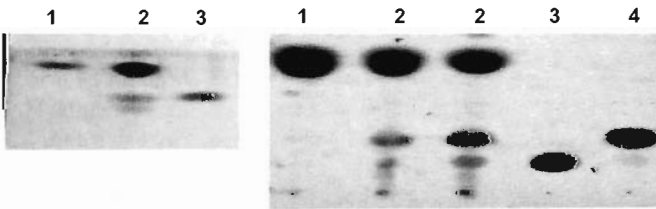
Hình 2. Sắc ký đồ HPLC sản phẩm tinh chế ở các bình tam giác (A) và chất chuẩn AD (B).



Hình 3. Sắc ký đồ dịch lên men ở nồi 5 l và 2 bình tam giác 500 ml. 1 - 3: AD chuẩn có nồng độ 3, 4, và 5 mg/ml; 4 - 5: Mẫu thu lúc 70 h và 88 h ở nồi 5 l. 6 - 7: Mẫu thu lúc 88 h ở 2 bình tam giác 500 ml.



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm tinh chế ở nồi 5 l (A) và chất chuẩn AD (B).



Hình 4. Sắc ký đồ TLC lớp bám trên thành và các điện cực trong nồi 5 l (2), Phytosterol chuẩn (1), AD chuẩn (3).

Hình 5. Sắc ký đồ TLC lớp bám trên thành và các điện cực trong nồi 5 l (2), Phytosterol chuẩn (1), ADD chuẩn (3) và AD chuẩn (4).

Bảng 2. Kết quả định lượng sản phẩm AD quy mô nồi lên men 5 l.

Thể tích lên men (l)	Cơ chất (g)	AD thô (g)	AD tinh chế (g)	Độ tinh sạch (HPLC) (%)	Hiệu suất chuyển hóa theo Mol (%)
3,5 l /nồi 5 l và 0,1 l x 2 bình	3,7	37	8,25	94,79	31

Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Stefanov và đồng tác giả (2006) đối với chủng *Mycobacterium* sp. MB 3683 thực hiện trong fermentor 50 l chứa 30 l môi trường chuyển hóa cho thấy AD là sản phẩm chính và một lượng nhỏ ADD cũng đã tạo thành (chiếm khoảng 10% tổng sản phẩm). Các điều kiện như tốc độ khuấy, tuổi và lượng giống tiếp vào môi trường, nhiệt độ và nguồn carbon đã được nghiên cứu. Tốc độ chuyển hóa cao nhất khi tiếp giống từ 10 đến 15 % sau khi làm giàu 16 - 20 h, và nhiệt độ thích hợp từ 34 - 35°C, tốc độ khuấy 400 vòng/phút. Dầu silicon và tác nhân hòa tan polypropylene-glycol là phù hợp cho quá trình chuyển hóa, làm tăng đáng kể lượng cơ chất hòa tan trong môi trường. Tuy nhiên, tốc độ chuyển hóa phụ thuộc vào lượng dầu vì nó ức chế sinh trưởng của vi khuẩn.

Sau khi tách chiết và tinh chế sản phẩm thu được từ nồi 5 l, độ tinh sạch của AD được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp (Hình 6).

KẾT LUẬN

Đã thực hiện việc chuyển hóa vi sinh phytosterol thành AD nhờ chủng *Mycobacterium neoaurum* ở quy mô bình tam giác 750 ml đạt hiệu suất chuyển hóa là 73,77% (mol) trong khi ở nồi lên men 5 l thì hiệu suất bị giảm đi nhiều (31%). Sản phẩm AD tinh chế có độ tinh sạch từ 95% trở lên (HPLC). Yếu tố quyết định nhất ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển hóa là thiết bị lên men 5 l chưa được thiết kế phù hợp cho việc chuyển hóa phytosterol sang AD. Do đó cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn đòi hỏi thời gian nhiều hơn để cải tiến hệ thống cánh khuấy của nồi lên men 5 l nhằm khắc phục tình trạng nhiều bọt, hạn chế việc đem cơ chất ra khỏi bề mặt môi trường chuyển hóa.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho đề tài thuộc nghị định thư cấp nhà nước với Liên bang Nga: "Nghiên cứu công nghệ vi sinh chuyển hóa phytosterol đến androstenedione (AD) và 9 α -hydroxy AD sử dụng trong công nghệ vi sinh chuyển hóa - dược" do PGS. TS. Lưu Đức Huy làm chủ nhiệm. Công trình có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS (2003) Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enz Microb Technol* 32: 688-705.
- Kutney JP, Milanova RK, Vassilev CD, Stefanov SS, Nedelcheva NV (2005) Process for the microbial conversion of phytosterols to androstenedione and androstadienedione. *European Patent EP1066399*: 1-13.
- Kutney JP, Novax E, Jones PJ (1998) Process for isolating a phytosterol composition from pulping soap. *US patent* 5,770,749.
- Pérez C, Faleró A, Luu Duc H, Balcinde Y, Hung BR (2006) A very efficient bioconversion of soybean phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 148: 719-723.
- Slijkhuis H, Berkel En Rodenrijs AE, Marx AF, Delft GM (1994) Preparation of 9-alpha-hydroxy-17-keto steroids using *Mycobacterium* species CBS 482.86. *US patent*: 1-8
- Stefanov S, Yankov D, Beschkov V (2006) Biotransformation of Phytosterols to Androstenedione in two phase water-oil systems. *Chem Biochem Eng Q* 20(4): 421-427.

BIOCONVERSION OF PHYTOSTEROL TO ANDROSTENEDIONE (AD) BY STRAIN *MYCOBACTERIUM NEOAURUM*

Nguyen Thi Quy¹, Le Van Truong¹, Nguyen Van Hieu¹, Pham Thi Bich Hop¹, Nguyen Thi Diep², Luu Thi Kim Nhung², Luu Duc Huy², Truong Nam Hai^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology*

²*Institute of Chemistry*

SUMMARY

Bioconversion of phytosterol, which has a purity of 93%, to androstenedione (AD) by *Mycobacterium neoaurum* was conducted in 150 milliliters of transformation media in 750 milliliter conical flasks and a five liter fermentor with 3.5 liters of transformation medium. The amount of phytosterol substrate in the transformation media was 1 percent. The culture seed was fed into the transformation media with a ratio of 10 percent. Conversion process in conical flasks was carried out in a rotary shaker at 220 rpm, 30°C, and media pH at 7.5. When the bioconversion process was scaled up in a 5 liter fermentor, the following parameters were maintained: stable temperature at 30°C, agitation speed at 500 rpm, dissolved oxygen content around 80%, pH adjusted to 7.0. The results of all experiments showed that the whole bioconversion period of phytosterol to AD lasted for 96 hours in conical flasks, whereas it was 88 hours in the fermentor. The amount of AD analyzed by thin layer chromatography was 4 grams per liter and its yield output (molar) reached to 73.77% in conical flasks, whereas the result obtained in the fermentor was less than 3 grams per liter according to thin layer chromatography analysis and only 31% (molar) achieved in terms of yield output. The purity of AD products by high performance liquid chromatography (HPLC) was 99.55% and 94.79% in conical flasks and in the fermentor, respectively.

Keywords: *Androstenedione (AD), bioconversion, Mycobacterium neoaurum, phytosterol*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562790; Fax: 84-4-38363144; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn