

三株梭菌通过生物转化形成熊去氧胆酸的研究*

黄爱珉** 胡宝龙 周德庆

(复旦大学微生物学和微生物工程系, 上海)

用改进的薄层层析法定量测定了三株厌氧梭菌——产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) HS-10、丁酸梭菌 (*C. butyrium*) DL-20 和 LQ-29 形成熊去氧胆酸 (UDCA) 的生物转化能力, 并用正交法确定了 HS-10 菌株的最佳转化条件。发现该菌株在含 0.2 mmol/L 鹅去氧胆酸 (CDCA) 的 RCM 培养基中培养 6—48 小时内, UDCA 转化率均在 80% 以上。而且, 当 CDCA 的浓度高达 0.8—1.0 mmol/L 时, 其转化率仍在 70% 以上。此外, 还初步发现未加任何营养成分的豆腐废水也可作为良好的转化培养基。本文是这两种菌能单独将 CDCA 转化为 UDCA 的首次报道。

关键词 鹅去氧胆酸; 熊去氧胆酸; 产气荚膜梭菌; 丁酸梭菌

熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, 简称 UDCA) 是名贵中药熊胆的主要成份^[1], 它对肝胆系统疾病, 特别是对溶解胆固醇结石有很好的疗效^[2]。目前采用的化学方法生产 UDCA, 成本高、污染严重。已发现不少厌氧菌具有将来源广又价格低的鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, 简称 CDCA) 转化为 UDCA 的能力^[3-9], 且厌氧发酵还具节约能源和简化工艺设备等优点^[10], 故筛选和研究具有将 CDCA 转化为 UDCA 的厌氧菌有着重要的理论意义和实用前景。

本世纪 40 年代, Hughes 等最先报道了粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 可对胆汁酸的 3 α 、7 α 、12 α -OH 进行氧化; 1970 年 Aries 等发现, 许多肠道菌具有 3 α 、7 α 、12 α -羟甾醇脱氢酶 (HSDH)^[11] 随后, Macdonald^[4,3,7,11] 和 Sutherland 等^[8,9] 以及 Hirano 等^[4] 先后开展了利用厌氧菌的生物转化能力, 使初级胆汁酸异构为次级胆汁酸的研究。

迄今, 人们已从粪便和土壤中分离到

许多具有通过生物转化形成 UDCA 能力的微生物, 其中以来自粪便的厌氧菌为主^[9]。目前, 国外从土壤中仅分离到两种具有单独转化 CDCA 为 UDCA 能力的梭菌——*Clostridium absonum*^[7] 和 *C. limosum* (泥渣梭菌)^[9]。Macdonald 等^[7] 和 Sutherland 等^[9] 分别对其进行了转化条件 (O₂, pH, 培养时间, 底物浓度) 及其诱导酶系统的研究。

我们采用“针筒法”, 从 640 份土样中筛选到三株 UDCA 转化率相对较高和较稳定的菌株^[12], 经过鉴定, 确定该三株菌种分别属于两个种, 即产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) HS-10 及丁酸梭菌 (*C. butyricum*) DL-20 和 LQ-29^[13]。在对 Eastwood^[4] 薄层层析定量方法进行简化和改进的基础上, 又研究了这三株菌在 RCM 培养基中的生长规律和 UDCA

本文于 1989 年 5 月 3 日收到。

* 国家自然科学基金资助课题; 张春香和邵雪萍曾参加部分测定。

** 广州市暨南大学生物学系。

的生化转化规律。还用正交法比较了温度、时间、pH 和 CDCA 浓度对 HS-10 菌株在 RCM 中 UDCA 转化率的影响,从而获得了 HS-10 菌株的最佳生物转化条件。此外,还试用未补加任何营养的豆腐废水作为 HS-10 的廉价转化培养基,并取得了较好的结果。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 自行分离并鉴定的产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) HS-10 以及丁酸梭菌 (*C. butyricum*) DL-20 和 LQ-29。

2. 培养基: 含 0.2 mol/L CDCA 的 RCM (蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母膏 3g, 盐酸半胱氨酸 0.5g, 葡萄糖 5g, 无水醋酸钠 5g, 可溶性淀粉 1g, 刃天青 3mg, 加蒸馏水定容至 1000ml)^[12]; 豆腐废水 (自豆腐作坊取来, 加热去多肽沉淀后, 另加 0.2 mmol/L CDCA 和 3 mg/L 刃天青, pH7.4)。

3. 仪器: 721 型分光光度计, 55 DIGITAL MINI-pH-METER。

4. 试剂: CDCA (Sigma)、UDCA (Fluka)、刃天青 (Sigma), 其余试剂除专门注明外, 均使用 A. R. 级。

(二) 方法

1. 胆汁酸的薄层层析定量测定: 按照我们对 Eastwood^[14] 的改良法进行, 即在薄层层析后改用 Komarowsky 试剂^[13] 显色, 刮下斑点, 在 70% H₂SO₄ 中用 0.25% 糠醛显色, 离心后作比色测定。

2. 三菌株在 RCM 中的生长和 UDCA 转化时程曲线: 将保存于庖肉培养基中的三株梭菌活化两次后, 以 10% 的量接种于 45 ml RCM (装于 100ml 针筒内) 中, 在 37℃ 培养。15 小时前每隔 3 小时取样, 以

后分别在 24、36 和 48 小时取样。每次取 4ml 于无菌离心管中, 分别测定菌浓度 (OD₆₆₀)、pH 和 UDCA 转化率。采用类似方法, 将菌培养在 10 ml 针筒中测其产气量。

3. 温度、时间、pH 和 CDCA 浓度对 HS-10 在 RCM 中 UDCA 转化率的影响: 采用 L₁₆(4³) 正交表进行测定, 共 16 个试验。

4. HS-10 在豆腐废水中的生长和 UDCA 转化的时程曲线: 方法同“2”。

5. CDCA 浓度对 HS-10 的 UDCA 转化率的影响: CDCA 在 RCM 和豆腐废水两种培养基中的浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mol/L, 培养基的 pH 均为 8.5, 培养时间为 6 小时。

结果

(一) CDCA 的薄层层析定量测定

CDCA 薄层层析定量测定的标准曲线见图 1。

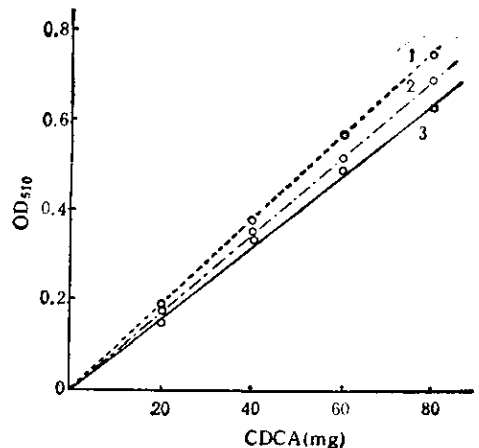


图1 CDCA 定量测定标准曲线

1. 未层析; 2. 层析; 3. 层析+显色

Fig. 1 Standard curve of determining the CDCA contents

1. Unchromatographed; 2. Chromatographed; 3. Chromatographed and sprayed

由图 1 可知, CDCA 在一定的含量范围之内 (<80mg), 其 OD₅₁₀ 与 CDCA 含量呈正比。经试验还发现层析后如先用 Komarowsky 试剂显色, 再刮斑、糠醛显色、离心和测定 OD₅₁₀, 也可获得良好的结果。

(二) 菌株的生长和 UDCA 转化曲线

由图 2 的光密度曲线可知: 三株梭菌在培养后期, OD₆₆₀ 逐渐减小。此外, 从三株梭菌的 pH 时程曲线可知, HS-10 的 pH 从 7.5 下降为 5.7, 然后稍上升至 6.1。DL-20 和 LQ-29 的 pH 曲线, 在早期呈下降趋势, 稳定期以后基本趋于平稳。HS-10 的产气量很大, 而 DL-20 和 LQ-29 则相应产生得较少。

从图 2 可知, HS-10 在接种后 6 小时, UDCA 的转化率就达 80%, 到 24 小时, 转化率达到最大值(约 88%), 在 48 小时以前, 转化率稍有下降, 但仍在 80% 以上。可见, HS-10 的 UDCA 转化速率及转化能力较高。由 DL-20 的转化率时程曲线(图 3) 可知, 只有在培养 24 小时转化

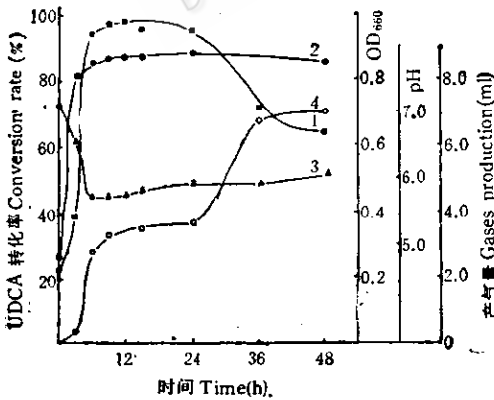


图 2 HS-10 在 RCM 培养基中的时程曲线
Fig. 2 The time course curve of strain HS-10 growing in the RCM medium
1.光密度 OD; 2.UDCA 转化率 Conversion rate; 3. pH; 4.产气量 Gases production

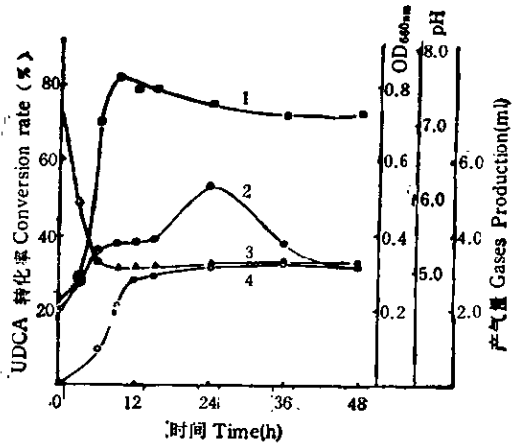


图 3 DL-20 菌株在 RCM 培养基中的时程曲线
Fig. 3 The time course of strain DL-20 growing in the RCM medium
1-4 同图 2 The same as Fig. 2

率在 50% 以上, 在此前后, 转化率均较低。LQ-29 也有类似情况, 且转化率不够稳定(图 4)。

(三) HS-菌株在 RCM 中最佳转化条件的选择

选用 L₁₆(4⁵) 正交表进行实验, 以提高试验效率和获得 UDCA 转化的最佳外界条件, UDCA 转化率随各因素变化的情

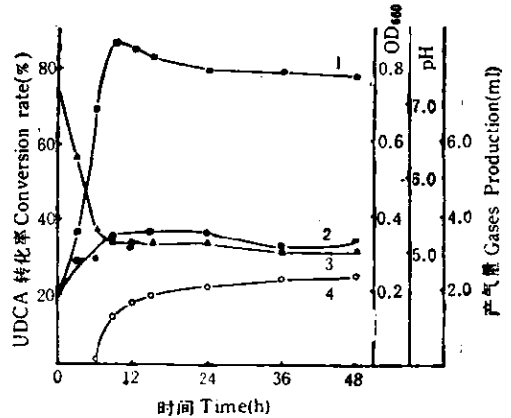


图 4 LQ-29 在 RCM 培养基中的时程曲线
Fig. 4 The time course curve of strain LQ-29 growing in the RCM medium
1-4 同图 2 The same as Fig. 2

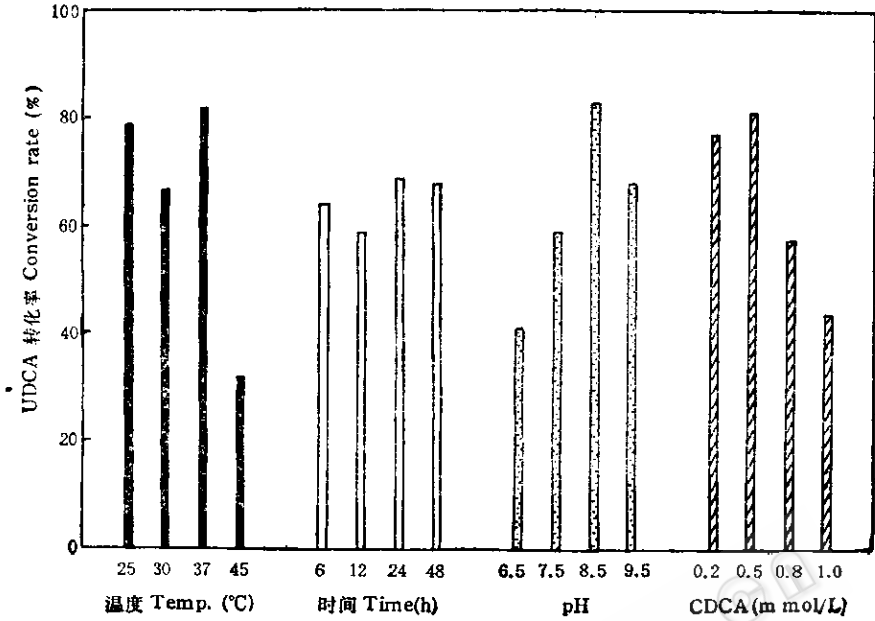


图 5 正交试验结果

Fig. 5 Illustrations of orthogonal test

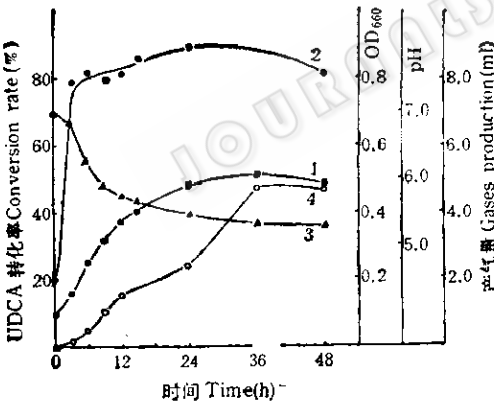


图 6 HS-10 培养在豆腐废水中的时程曲线

Fig. 6 The time course curve of strain HS-10 growing in WWBCD

1—4 同图 2 The same as Fig. 2

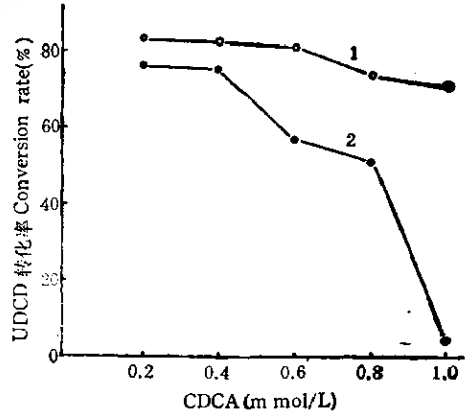


图 7 CDCA 浓度对 HS-10 菌株 UDCA 转化率的影响

Fig. 7 Effects of different CDCA concentrations on UDCA conversion rate of strain HS-10 growing in RCM (1) and WWBCP(2)

况见图 5。

从图 5 中四个因素的各个水平的差值可知, 各因素对转化率影响的大小依次为温度 > 培养基 pH > CDCA 浓度 > 培养时

间。由实验可知, UDCA 转化的最佳外界条件为: 培养温度为 37°C, 培养基 pH 为 8.5, CDCA 浓度为 0.2—0.5 mmol/L, 培养时间为 6—48 小时。

(四) HS-10 菌株在豆腐废水中的生长和 UDCA 转化

HS-10 在豆腐废水中的菌浓度(OD_{660})、pH、产气量和 UDCA 转化率的时程曲线见图 6。与在 RCM 中的时程曲线(图 2)比较可知, 虽在豆腐废水中其 OD_{660} 值较低, 但两者的转化速度和转化能力却相近。不同的是, HS-10 在豆腐废水中的 pH 一直呈下降趋势, 即由初始的 pH 7.0 降至 5.3, 另外, 产气量也较低。

(五) CDCA 浓度对 UDCA 转化率的影响

较高浓度 CDCA 对 HS-10 的 UDCA 转化率影响的结果见图 7。在 RCM 培养基中, 当底物浓度增至 0.8—1.0 mmol/L 时, 其转化率仍在 70% 以上。HS-10 在豆腐废水中的转化率随着 CDCA 浓度的增高有所下降。当 CDCA 浓度在 0.4 mmol/L 以内时, 其转化率约为 75%。当浓度在 0.6—0.8 mmol/L 时, 转化率下降为 50%。若 CDCA 浓度提高到 1 mmol/L 时, 则菌体的生长被抑制, 其转化率低于 5%。

讨 论

1. 关于生长曲线: 三株梭菌在其生长稳定期后, 生长曲线都有下降趋势, 尤以 HS-10 为甚(图 2—4)。经涂片观察发现, DL-20 和 LQ-29 会形成芽孢, 在培养后期, 芽孢囊迅速消失; HS-10 虽不形成芽孢, 但会形成荚膜, 在生长后期, 荚膜明显萎缩。这些都是菌体 OD 下降的原因。

2. 关于 UDCA 转化率: HS-10 在接种后的 6—48 小时时间, 转化率一直在 80% 以上(图 2)。据文献记载, *Clostridium absonum* 在接种后的 9—16 小时内转化率最高(约 65%)^[2]; *C. limosum* 在 6—68 小时内转化率仅达 50% 左右^[2]。因此,

HS-10 的生物转化能力优于文献报道。*C. butyricum* 两个菌株(DL-20 和 LQ-29)的转化率稍低。从薄层层析谱上可以发现, 它们的 CDCA 转化产物除 UDCA 外, 还可见到 7-酮石胆酸(7-KLC)或石胆酸(LCA)等其他胆汁酸存在。

3. 关于生物转化的最适 pH: 图 5 指出, HS-10 转化 CDCA 为 UDCA 时的最适 pH 为 8.5。在 pH 8.5—9.5 时, 转化率达 75% 以上, 而在 6.5 时, 只有 40%。推测 $7\alpha/7\beta$ -HSDH 这类诱导酶在呈负离子态时活力更高, 这与 Sutherland 等^[9] 在 *C. limosum* 中获得的结果类似。

4. 关于菌体生长量与 UDCA 转化的关系: 比较图 6 和图 2 后可以看出, HS-10 在豆腐废水中的生长量虽比 RCM 中要低, 但两者的 UDCA 转化速率和转化率却相似。说明菌体生长量与其生物转化活力间并无严格的对应关系。

5. 关于菌体对 CDCA 的耐受性: 这是微生物生物转化能否获得实际应用的一个重要依据。从图 7 可以看出, HS-10 在 RCM 中当 CDCA 浓度达到 0.8—1.0 mmol/L 时, 转化率仍可达到 70% 以上。说明其对 CDCA 的耐受性和转化率均比国外报道的 *C. absonum* 和 *C. limosum* 为高^[12]。通过本实验室的初步研究已知, 通过用包埋的方式对 HS-10 活细胞进行固定化后, 还可提高菌体对 CDCA 的耐受性。

6. 关于豆腐废水用作转化培养基问题: 通过初步试验已证明它是一种能化废为宝的廉价转化培养基, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Macdonald, I. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 135: 349—354, 1983.

- [2] Makino, I. et al.: *Jap. J. Gastroenterol.*, **72**: 851—860, 1975.
- [3] Macdonald, I. A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1187—1195, 1982.
- [4] Hirano, S. et al.: *J. Lipid Res.*, **22**: 1060—1067, 1981.
- [5] Edenharder, R. et al.: *J. Lipid Res.*, **22**: 652—658, 1981.
- [6] Edenharder, R. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org.*, **174**: 91—104, 1981.
- [7] Macdonald, I. A. et al.: *J. Lipid Res.*, **22**: 458—466, 1981.
- [8] Sutherland, J. D. et al.: *J. Lipid Res.*, **23**: 723—732, 1982.
- [9] Sutherland, J. D. et al.: *J. Lipid Res.*, **25**: 1084—1089, 1984.
- [10] Zeikus, J. G.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 423—464, 1980.
- [11] Macdonald, I. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **450**: 142—153, 1976.
- [12] 周德庆等: 复旦学报(自然科学版), **29**: 174—179, 1990。
- [13] 黄爱瑛等: 复旦学报(自然科学版), **29**: 180—188, 1990。
- [14] Eastwood, M. A. et al.: *J. Chromatogr.*, **65**: 407—411, 1972.
- [15] Macdonald, I. A.: *J. Chromatogr.*, **136**: 348—352, 1977.
- [16] Louis, D. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. p. 562, (ed. Buchanan, R. E. et al.), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [17] 黄爱瑛、周德庆: 中国医药工业杂志, **21**: 325—331, 1990。

STUDY ON URSODEOXYCHOLIC ACID BIOTRANSFORMATION BY THREE STRAINS OF CLOSTRIDIA *

Huang Aimin Hu Baolong Zhou Deqing

(Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Fudan University, Shanghai)

Using the improved TLC procedure, we measured the conversion rates of ursodeoxycholic acid (UDCA) from chenodeoxycholic acid (CDCA) by 3 strains of clostridia—*C. perfringens* HS-10, *C. butyricum* DL-20 and LQ-29 isolated. The orthogonal test was used to determine the optimal conditions of biotransformation for HS-10. It was found that the conversion rate of UDCA by HS-10 was over 80% during 6—48 h in RCM medium containing 0.2 mmol/L CDCA. The UDCA conversion rates were still over 70%

when the CDCA concentrations were as high as 0.8—1.0 mmol/L. In addition, the WW-BCP (Waste water from bean curd production) without any supplemental nutrients was preliminarily proved to be a potential inexpensive conversion medium.

Key words

Chenodeoxycholic acid; Ursodeoxycholic acid; *Clostridium perfringens*; *Clostridium butyricum*