

## 转化石胆酸为熊去氧胆酸的菌种 筛选和产物鉴定

孙 黎\* 法幼华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 筛选到一株泡木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*) 90-9 菌株, 它能转化石胆酸 (Lithocholic acid) 为熊去氧胆酸 (Ursodeoxycholic acid)。该菌转化 0.1% (W/V) 石胆酸 96h, 熊去氧胆酸重量收率为 38.1%。经各项理化性质, 包括熔点、比旋值、红外光谱、核磁共振谱、质谱和元素分析等项鉴定, 证明产物为熊去氧胆酸。

**关键词** 石胆酸, 熊去氧胆酸, 泡木贼镰刀菌

熊去氧胆酸 (Ursodeoxycholic acid, 以下简称 UDCA) 是天然熊胆汁的主要有效成分<sup>[1,2]</sup>, 是一种高效安全的溶结石药物, 也是治疗肝炎的良药<sup>[3,4]</sup>。Danziger<sup>[3]</sup>发现鹅去氧胆酸 (Chenodeoxycholic acid, 简称 CDCA) 具有溶解胆固醇结石的能力, Makino<sup>[4]</sup>和 Dowling<sup>[5]</sup>等发现 UDCA 比 CDCA 具更好的疗效, 且副作用小。胆石症已成为普外科最多见病种, 患者约占我国总人口的 7%, 但天然 UDCA 来源少, 化学合成 UDCA 步骤多, 收率低<sup>[6-8]</sup>。因此, 寻求有效的 UDCA 生产途径, 具有重要的经济和社会意义。

Sawada<sup>[9]</sup>曾报道泡木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*) M41 能转化石胆酸 (Lithocholic acid, 以下简称 LTCA) 为 UDCA 之后, Kulprecha, Nihira<sup>[10,11]</sup>对该菌进行了生化及发酵工程的研究。LTCA 广泛存在于猪、牛、羊等动物胆汁中, 并可由胆酸制备<sup>[12-15]</sup>。国内 UDCA 基本依赖进口, 为了满足我国医药界对 UDCA 的需要, 本文开展了微生物转化 LTCA 生产 UDCA 的研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 微生物

本试验初筛所用微生物详见表 1。

#### 1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基: 葡萄糖 30g, 酵母膏 5g,  $\text{NaNO}_3$  5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01g, LTCA 1g, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 1000ml (pH 7.0)。

1.2.2 碳源选择培养基: 碳源 10g,  $\text{NaNO}_3$  5g, 酵母膏 1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{MnSO}_4$

\* 系 88 级硕士研究生, 现在湖南医科大学附属湘雅医院工作。

本文于 1993 年 9 月 13 日收到。

•  $\text{H}_2\text{O}$  0.01g KCl 3g, LTCA 1g, pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 1000ml。

表 1 菌株的筛选

Table 1 Screening of microorganisms

菌名 Name	菌株数 Strains	能利用 LTCA 的菌株数 Strains using LTCA	产 UDCA 的菌株数 Strains producing UDCA	UDCA 产生菌 百分率 Percent of strains producing UDCA (%)
泡木贼镰刀菌 <i>Fusarium equiseti</i>	36	36	8	22.2
被孢霉 <i>Mortierella</i>	11	9	2	18.2
犁头霉 <i>Absidia</i>	11	11	1	9.1
棕曲霉 <i>Aspergillus ochraceus</i>	7	7	0	0
未定名 Unidentified	131	82	0	0
总计 Total	201	150	11	4.9

1.2.3 氮源选择培养基: 以不同氮源代替相当于 5g/L 等摩尔含量的  $\text{NaNO}_3$ , 以糊精 10g/L 作为碳源, 其他同碳源选择培养基。

1.2.4 发酵培养基: 糊精 20g, 天冬酰胺 12g, 酵母膏 1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, KCl 3g, 自来水 1000 ml, pH 7.0。

以上所有培养基装量均为 250ml 三角瓶装 40ml, 110℃ 30 分钟灭菌。

### 1.3 菌体培养与转化

取 26℃ 旋转 (190 r/min) 培养 24 小时的菌液接种新鲜培养基, 同时投加 0.1% (W/V) 浓度 LTCA, 转化 36 小时后添加 0.5 mol/L KCl, 继续转化至 96 小时, 测定菌体干重并进行产物分析。

### 1.4 菌体干重的测定

发酵液经 6 层纱布过滤获取菌丝体, 于 105℃ 烘烤至恒重, 称量。

### 1.5 产物分析

采用硅胶 GF<sub>254</sub> 制板进行薄层层析色谱 (TLC) 测定, 层析系统为: (1) 氯仿: 丙酮: 乙酸 (100:100:1, V/V/V); (2) 氯仿: 丙酮: 乙酸: 甲醇 (110:100:0.5:0.1, V/V/V/V); (3) 苯: 丙酮 (9:1, V/V); (4) 氯仿: 乙醇 (9:1, V/V)。显色剂为: (1) 5% 的磷钼酸乙醇溶液; (2) 50% 浓硫酸溶液。

定性分析: 根据样品中主产物与标准 UDCA 的  $R_f$  值和显色情况进行比较, 初步判断有无 UDCA 生成。

定量分析: 用层析系统 (1) 作为展开剂, 5% 磷钼酸为显色剂, 经 CAMAG 薄层扫描仪扫描, 根据扫描各点的积分面积对照已知标准品点进行线性回归分析, 求出各被测样品点的转化率。

### 1.6 转化产物的分离纯化与鉴定

将转化后的发酵液用 6 层纱布过滤, 滤液酸化到 pH3.0 左右, 加等量乙酸乙酯抽提三次, 提取液减压浓缩至干, 得粗产物。该产物经丙酮溶解, 加在 LBC 离心薄层仪的薄

板上, 选用层析系统 (2) 为洗脱液, 分别收集含 UDCA 和 LTCA 的洗脱部分, 浓缩至干, 称量, 计算产物的重量收率。洗脱产物用氯仿: 丙酮 (5: 1, V/V) 重结晶后, 得到分析样品, 并进行熔点、元素分析、比旋光值的测定及紫外、红外、质谱和核磁共振等物理化学特性鉴定。

## 1.7 化学药品

石胆酸、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸均为 Sigma 公司产品。其他均为国产分析纯试剂。

# 2 实验结果

## 2.1 菌株的筛选

对 201 株霉菌进行发酵转化试验, 测定结果见表 1。继续对具  $7\beta$  羟化能力的 11 株菌株进行比较, 发现泡木贼镰刀菌 90-9 菌株具较强的转化能力 (其转化反应式如图 1), 用该菌进行下一步的研究。

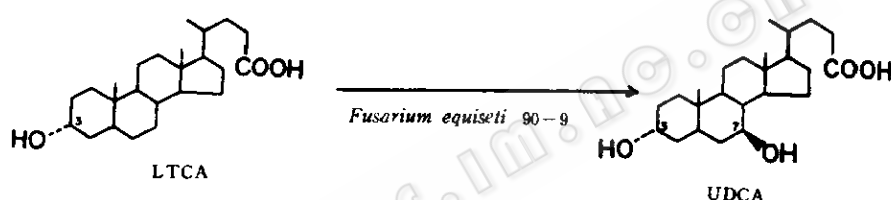


图 1 泡木贼镰刀菌转化 LTCA 为 UDCA 的反应式

Fig. 1 Reactive formula of UDCA form LTCA by *F. equiseti* 90-9

## 2.2 菌株的生长和转化条件

**2.2.1 碳源:** 试验了十二种不同类型的碳源对生长和转化的影响。表 2 的结果说明, 该菌转化 LTCA 为 UDCA 的有效碳源为葡萄糖、可溶性淀粉及糊精。

**2.2.2 氮源:** 选用七种氮源进行试验, 发现在有机氮中, 该菌的生长和转化活性均比在无机氮中高, 其中天冬酰胺是最好的氮源 (见表 3)。

**2.2.3 温度:** 在不同温度下培养 90-9 菌株。结果表明, 该菌在  $26^{\circ}\text{C}$  时生长旺盛; 超过  $31^{\circ}\text{C}$ , 菌体自溶。

**2.2.4 金属离子对转化的影响:** 在培养基中加入 0.1% 的各种离子的氯化物, 结果表明, 除  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  外, 其他离子, 如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等对转化有强抑制作用, 但对菌体的生长影响不大, 只有  $\text{Fe}^{3+}$  对生长和转化有强抑制作用。

**2.2.5 90-9 菌株在不同转化液中的转化:** 用培养 48 小时的菌体悬液在不同转化液中转化 (起始 pH 均为 7.0), 表 4 的结果说明, 在发酵培养基中转化最好。

表 2 碳源对生长和转化的影响

Table 2 Effect of carbon source on growth and transformation

碳 源 Carbon source	菌株干重 Dry weight (mg/50ml)	UDCA 的产量 UDCA production (mg/50ml)	UDCA (mg/g)	转化率 Transformation rate (%)
D-葡萄糖 D-Glucose	270.3	2.75	10.02	5.5
D-果糖 D-Fructose	306.3	<1.5	—	—
D-半乳糖 D-Galactose	308.5	<1.5	—	—
L-山梨糖 L-Sorbose	284.2	<1.5	—	—
蔗糖 Sucrose	272.1	<1.5	—	—
可溶性淀粉 Starch (soluble)	355.9	4	11.5	8.2
糊精 Dextrin	409.7	5.4	13.5	10.8
甘油 Glycerol	372.2	<1.5	—	—
羧甲基纤维素 Carboxymethyl cellulose	154.0	<1.5	—	—
D-木糖 D-Xylose	250.3	<1.5	—	—
D-甘露糖 D-Mannose	290.1	<1.5	—	—
麦芽糖 Maltose	278.5	<1.5	—	—

表 3 氮源对生长和转化率的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on growth and transformation rate

氮 源 Nitrogen source	干重 Dry weight (mg/50ml)	UDCA 产量 UDCA production (mg/50ml)	UDCA (mg/g)	转化率 Transformation rate (%)
NaNO <sub>3</sub>	378.4	3.5	9.3	7.0
KNO <sub>3</sub>	383.5	3.8	9.9	7.6
CH <sub>3</sub> COONH <sub>3</sub>	357.8	4.6	12.9	9.2
NH <sub>4</sub> Cl	341.2	<2.0	<6.0	<5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	320.5	<2.0	<6.5	<5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	399.7	5.74	14.4	11.4
L-天冬酰胺 L-Asparagine	324.9	7.22	22.2	14.4
蛋白胨 Peptone	321.5	5.77	17.9	11.7

表 4  在几种转化液中的转化结果

Table 4  Results of transformation in several transformation fluids

转化液 Transformation fluids	发酵液 Fermentation broth	自来水 Water	0.1 mol/L Tris-HCl buffer	0.1 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> buffer
转化率 Transformation rate (%)	23.2	9.2	13.4	8.7
96h 时 pH 值 pH in 96h	8.5	7.0	7.0	7.0

2.2.6  乙醇浓度对转化的影响：用乙醇溶解 LTCA，使乙醇在发酵液中的百分比浓度 (V/V) 分别为：0、1、2、3、4，图 2 的结果说明，乙醇对该菌的生长和转化有明显的抑制作用。

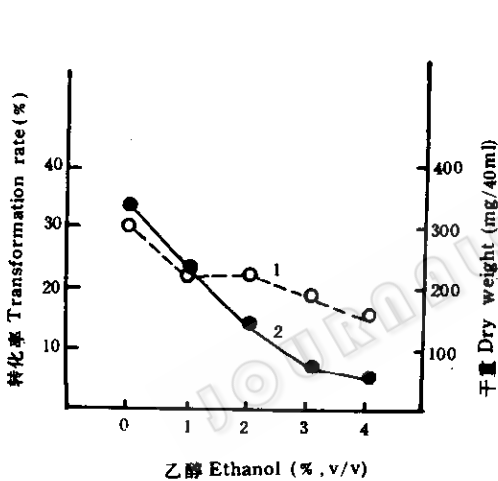


图 2  乙醇浓度对生长和转化的影响

Fig. 2  Effect of ethanol concentration on growth and transformation  
1. 菌体干重 Dry weight;  
2. 转化率 Transformation rate;

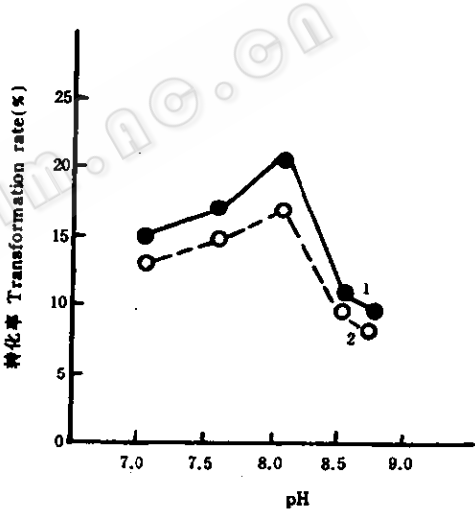


图 3  pH 对转化的影响

Fig. 3  Effect of pH on transformation  
1. 96h;  
2. 72h.

2.2.7  pH 对转化的影响：将培养 36 小时的菌丝体转入不同 pH 值的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中，转化结果 (图 3) 表明，菌体在 pH8.0 条件下，具有最高的转化活性，但超过 pH 8.0，转化率急剧下降。

2.2.8  分生孢子的转化：实验中发现，菌体在生长过程中，会产生大量分生孢子。为了解分生孢子是否具有转化活性，曾取等量的菌丝体和分生孢子在 pH8.0 的 Tris 缓冲液中，以比较它们转化 LTCA 为 UDCA 的情况。结果表明，在转化 72 小时时，分生孢子具有与菌丝体几乎相同的转化活性。

## 2.3 产物的制备与鉴定

2.3.1 产物的制备: 在 500ml 锥形瓶中装 80ml 发酵培养基, 投加 0.1% (W/V) LTCA, 于 26℃, 190r/min 培养 36 小时, 投加 2.76g KCl/80ml, 转化 96 小时, 合并三瓶发酵液, 酸化到 pH3.0, 再用等体积乙酸乙酯抽提三次, 得 1.53g 油状物。经 LBC 离心薄层层析仪制备得 439 mg UDCA 粗品, 含量为 94.2%, 同时回收得到 307mg LTCA, 计算重量收率为 38.1%。用氯仿: 丙酮 (5:1) 重结晶, 得 309 mg 精品。最后用水: 乙醇 (9:1) 再重结晶, 得产品 220 mg 产品, 用于各项理化性质的测定。

2.3.2 理化性质的测定结果: m. p. 197.3—198.4;  $[\alpha]_D^{25} = 56.7$  (C, 1; CH<sub>3</sub>OH); IR  $\gamma_{\max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>) 3359 (-OH), 2932, 2865 (C-H), 1713 (C=O), 1079 (C-O); MS (m/e) M<sup>+</sup> 392, 375 (M-OH), 357 (M-H<sub>2</sub>O-OH), 341 (M-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>HNMR  $\delta_{Me_4Si}$  (ppm) 0.76 (C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.98 (C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.07 (3 $\beta$ -H, 7 $\alpha$ -H), 4.98 (3 $\alpha$ -OH, 7 $\beta$ -OH)。C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> 计算值; C, 73.47; H, 10.20; 测定值: C, 73.19; H, 10.36。

根据上述测定结果, 确认转化产物为熊去氧胆酸。

致谢 承蒙北京医科大学药学院协助进行波谱测定和本所白逢彦先生提供泡木贼镰刀菌, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下). 上海: 上海人民出版社, 1977. 2584.
- [2] 中华人民共和国药典二部. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 810.
- [3] Danziger R G, Hofmann A F, Schoenfield L S. *N Engl J Med*, 1972, **286**: 1—2.
- [4] Makino I, Shinozaki K, Yoshino K *et al. Jap. J. Gastroent*, 1975, **72**: 690—702.
- [5] Dowling R H, Hofmann A F, Barbara L. Workshop on ursodeoxycholic acid. London: MTP Press Ltd., 1978.
- [6] Hofmann A F. *Acta Chem. Scand*, 1963, **17**: 173—186.
- [7] 王鍾麟, 阙浩泉, 姜立中, 等. 有机化学, 1989, **9**: 83—88.
- [8] 庄治平, 陈 英, 周维善. 有机化学, 1986, **4**: 281—285.
- [9] Sadawa H, Kulprecha S, Nilubol N *et al. Appl Environ Microbiol*, 1982, **44** (6): 1249—1252.
- [10] Kulprecha S, Veda T, Nihira T *et al. Appl Environ Microbiol*, 1985, **49** (2): 338—344.
- [11] Nibira T, Nishino T, Maehara M *et al. Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** (3): 670—675.
- [12] Sarel S, Yanuka Y, Shalon Y *et al. Israeli Patent*, 1965, 6, 414, 155.
- [13] Bor D, Hortobagyi G, Fari J *et al. Hung Patent*, 1964, 151, 398.
- [14] Mazurkiewicz W, Piatkowski W, Petsus R *et al. Pol PL Patent*, 1990, 149, 890.
- [15] Rao P N. Indian Patent, 1963, 75, 699.

## SCREENING OF STRAINS PRODUCING URSODEOXYCHOLIC ACID FROM LITHOCHOLIC ACID AND IDENTIFICATION OF PRODUCT

Sun Li Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** *Fusarium equiseti* 90-9 was screened for microbial production of ursodeoxycholic acid from lithocholic acid. The weight yield was 38.1% in the presence of 0.1% lithocholic acid (W/V) within 96h of cultivation. Determination of several physical-chemical characteristics including melting point, specific rotation, infrared absorption spectrum, nuclear magnetic resonance, mass spectrum and element composition etc indicated that the main product was ursodeoxycholic acid.

**Key words** Lithocholic acid, Ursodeoxycholic acid, *Fusarium equiseti*