

熊去氧胆酸的微生物转化条件及其制备

熊安明 法幼华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从416株泡木贼镰刀菌中,筛选出一株92-5菌株,它能在30℃转化石胆酸为熊去氧胆酸。研究了该菌株的最适转化条件,在该条件下,熊去氧胆酸的重量收率为42.3%。建立了适于工业化生产的产物分离制备方法。

关键词 石胆酸,熊去氧胆酸,泡木贼镰刀菌

前文^[1]曾报道泡木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)和被孢霉能转化石胆酸(Lithocholic acid,以下简称LTCA)为熊去氧胆酸(Ursodeoxycholic acid,以下简称UDCA),并筛选到一株泡木贼镰刀菌90-9菌株,但该菌在高于26℃转化时,菌体易自溶,这给发酵后处理工作带来不便。本文着重从泡木贼镰刀菌中,筛选能在28℃以上生长和转化均较好的菌株,并提出了一种适于工业生产的分离制备方法。

1 材料和方法

1.1 微生物

416株泡木贼镰刀菌由中国科学院微生物研究所白逢彦先生提供。

1.2 培养基

生长和发酵培养基组成:糊精20g,氮源G14g, KCl 3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 酵母抽提物1g, 加自来水至1000ml, 自然pH值。250ml锥形瓶装30ml或40ml培养基, 110℃ 30min灭菌。底物LTCA浓度除初筛为0.05%(W/V)外,其他均为0.1%(W/V)。

1.3 菌体的生长和转化

取2ml无菌水,加入在28℃已生长8d的泡木贼镰刀菌土豆汁斜面中,制成分生孢子悬液,倾入装有30ml培养基的250ml锥形瓶中,加0.1%(W/V)浓度的LTCA进行诱导, 28℃ 190r/min旋转培养24h,按10%(V/V)接种量接种二级摇瓶,同时投加底物,30℃下培养至40h,加0.5mol/L KCl 96h取样分析。

1.4 转化产物的分离制备

将发酵液调到pH11—12,过滤除去菌体,滤液用5mol/L HCl调至pH2—3, 3000r/min离心20min,沉淀物用乙酸乙酯抽提,得胆酸混合物。该混合物在含TEAB的碱性条

件下, 用环己烷: 正丁醇 (9: 1) 萃取, LTCA 等杂质进入有机相, 而 UDCA 留在水相中, 除去水中少量有机溶剂, 滴加 5 mol/L HCl, 直至有白色沉淀析出, 过滤, 滤物经水洗得产物。

1.5 其他

菌体干重测定、转化产物的分析和化学试剂等均同前文^[1]。

2 结果

2.1 菌株的筛选

对 416 株泡木贼镰刀菌进行培养转化试验, 观察其利用 LTCA 和转化 LTCA 为 UDCA 的情况, 发现 65.4% 的菌株能利用 LTCA, 其中有 111 株菌转化 LTCA 为 UDCA, 占 26.7%。另外, 有 3 株菌利用 LTCA 只产生 UDCA, 有 2 株菌利用 LTCA 只产生 CDCA, 但它们的转化率均在 10% 以下。从初筛的 111 株产 UDCA 的菌株中, 挑选出产 UDCA 较多的 71 株进行复筛, 从中选出 92-5 号菌。该菌的转化主产物量较多, 副产物较少, 在 30℃ 下培养后, 未发生溶菌 (图 1)。为此, 选用该菌进行以下条件试验。

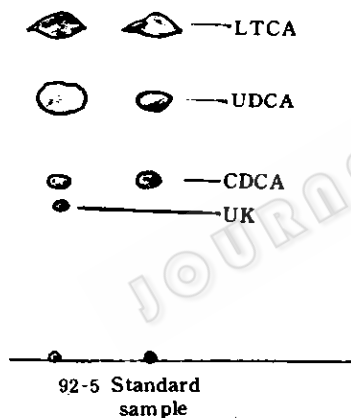


图 1 92-5 菌株转化石胆酸形成几种胆酸化合物的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC of several kinds of bile acids from LTCA in *Fusarium equiseti* 92-5 culture broth

LTCA, 底物; UDCA, 主产物; CDCA, 副产物; UK, 未知物
LTCA; substrate; UDCA; main product; CDCA; by-product; UK; unknown. TLC, Thin-Layer Chromatogram.

2.2 温度对菌生长和转化的影响

试验了在不同温度下, 泡木贼镰刀菌 92-5 的生长和转化情况。图 2 的结果表明, 在 30℃ 时, 转化率最高; 高于 32℃ 时, 菌体自溶, 转化率明显下降。综合生长和转化情况, 选择 30℃ 作为 92-5 菌株的转化温度。

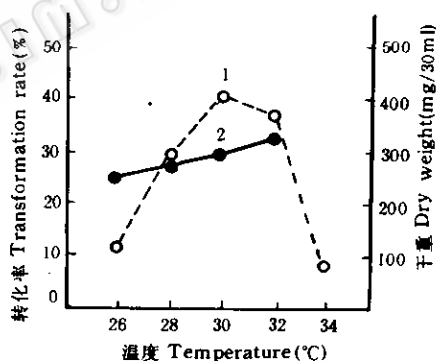


图 2 温度对生长和转化的影响

1. 转化率; 2. 干重.

Fig. 2 Effect of temperature on growth and transformation

1. Transformation rate; 2. Dry weight.

2.3 KCl 浓度对转化的影响

于转化 40h 时,投加不同浓度的 KCl。图 3 的结果表明,KCl 能增强转化活性。当 KCl 为 0.5 mol/L 时,转化率最高,但高于 0.5 mol/L,则有显著抑制作用。

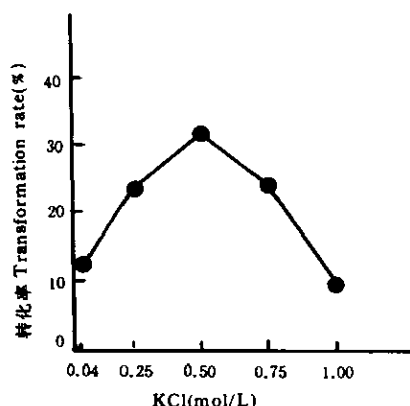


图 3 KCl 浓度对 UDCA 产生的影响
Fig. 3 Effect of KCl concentration on UDCA formation

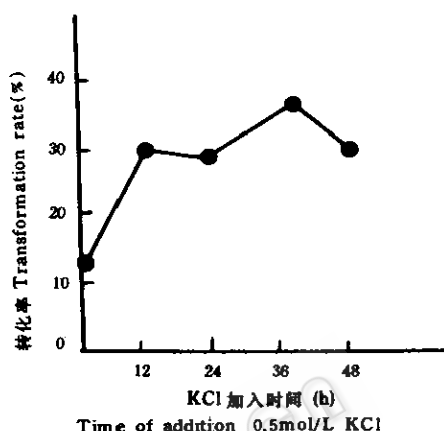


图 4 KCl 投加时间对 UDCA 形成的影响
Fig. 4 Effect of time of addition KCl on UDCA formation

2.4 KCl 投加时间对转化的影响

于发酵转化的不同时间,投加 0.5 mol/L KCl。图 4 的结果表明,在 40h 投加 0.5 mol/L KCl,转化率最高。

2.5 LTCA 颗粒大小对转化的影响^[2]

采用超声波处理 LTCA 无菌水悬液,显微镜下测定颗粒大小。结果(表 1)表明,超声处理时间越长,颗粒越小,转化率越高。

表 1 LTCA 颗粒大小对转化的影响

Table 1 Effect of the size of LTCA particle on transformation

超声时间 (min) Supersonic time	0	10	20	30
转化率 (%) Transformation rate	34.1	34.5	36.7	41.9
颗粒大小 (μm)* The size of particle *	40—100	40—60	20—40	10—20

* 多于 70% 在此范围之内。

There are more than 70% in the range.

2.6 通气量对转化的影响

水中溶解氧浓度大小会影响甾体羟化反应的进行^[3,4]。于 250ml 三角瓶中装不同体积已生长 40h 的发酵液进行转化。结果表明(图 5),随装量的增加,转化率逐步下降。这

说明, 在一定范围内, 通气量越大, 转化率越高。

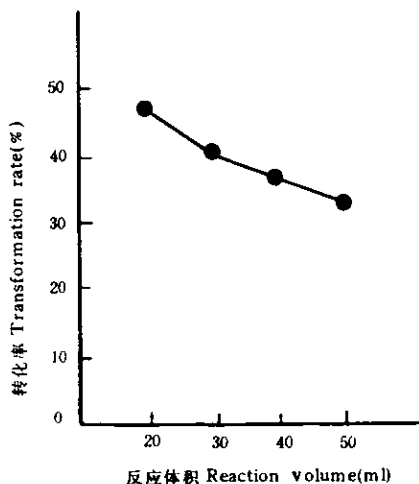


图 5 通气量对 UDCA 生产的影响

Fig. 5 Effect of aerobic condition on UDCA production

2.7 产物的制备

接种 3ml 已生长 24h 的种子液于装有 30ml 培养基的 250ml 三角瓶中。每瓶投加 30mg LTCA, 40h 投加 KCl 至 0.5mol/L 调节 pH 值为 6.0—6.5, 于 30℃, 190 r/min 振荡下转化 96h, 合并发酵液后, 取样测定转化率为 45.1%。经抽提、分离、纯化, 得 UDCA 168.4mg, 回收 LTCA 82.0mg, 计算重量收率为 42.3%, 纯度为 92.4%。

3 讨论

一般泡木贼镰刀菌在 15—25℃ 和 pH 5—7 时生长较好。高温及培养条件的变化, 易使培养物发生变异^[5,6]。孙黎等^[1]筛选到的 90-9 号菌株, 生长温度高于 26℃ 时, 菌体发生自溶, 这不利于工业化生产。为了筛选一株耐热的菌株, 在初筛时就采用 28℃ 培养, 发现有 36.0% 的菌株出现明显的溶菌现象, 19.5% 的菌株生长较差。在生长较好的菌株中, 发现 92-5 号菌株于 30℃ 生长仍较好, 转化率也较高, 转化性能稳定, 副产物较少, 这些特点适于工业化生产的要求。

据报道^[2,3,7], pH、通气量、KCl 浓度、LTCA 颗粒大小等转化条件均影响 *Fusarium equisrti* M41 菌株的转化率。本文通过对 *Fusarium equisrti* 92-5 菌株转化条件的研究, 发现两者结果基本一致。这说明不同的泡木贼镰刀菌株转化 LTCA 为 UDCA 的条件基本相同。因此, 下一步工作主要应考虑在自控发酵罐上, 通过控制该菌生长和转化的 pH、通气量以及微粒投料, 进一步提高该菌的投料浓度和转化率。

孙黎等^[1]采用离心薄层法分离纯化产物。本文根据胆酸的性质, 采用酸性沉淀得胆酸混合物^[8], 在含 TEAB 的碱性条件下, 经有机溶剂萃取, 分离得到 UDCA。该方法简便, 不需特殊设备, 可以作为工业生产应用的后处理工艺。

参 考 文 献

- [1] 孙黎, 法幼华. 微生物学报, 1995, 35 (3): 197—203.
- [2] Attrat P, Hosel P, Richter W *et al.* *J Basic Microbiol*, 1991, 31 (6): 413—422.
- [3] Kulprecha S, Veda T, Nihira T *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49 (2): 338—344.
- [4] Hanisch H. W, Dunni P, Lilly M D *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1980, 22: 555—570.
- [5] Booth C. *Fusarium*. London: The Eastern Press Ltd, 1977.
- [6] 拉依洛 H A. 镰刀菌. 北京: 科学出版社, 1958.
- [7] Sadawa H, Kulprecha S, Nilubol N *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44 (6): 1249—1252.
- [8] 法幼华, 苏起恒. 微生物学报, 1992, 32: 17—22.

MICROBIAL TRANSFORMATION CONDITIONS OF UROSODEOXYCHOLIC ACID AND ITS PREPARATION

Xiong Anming Fa Youhua

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract Among 416 strains of *Fusarium equiseti*, a strain of No. 92-5 were selected for microbial production of ursodeoxycholic acid from lithocholic acid at 30°C. The optimum conditions for ursodeoxycholic acid production of *Fusarium equiseti* 92-5 were studied. The weight yield was 42. 3% under the above conditions. An easy method, suitable for separation and preparation of industrial production ursodeoxycholic acid, was established.

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