



研究报告

一株蟾毒灵转化菌株的筛选鉴定与转化条件优化

黄新蕾¹ 王晓政¹ 吴迎春² 梁如冰¹ 刘京京² 卞雪莲³ 李医明² 林双君^{*1}

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

2 上海中医药大学中药学院 上海 201203

3 上海金蟾健康科技有限公司 上海 201900

摘要:【背景】微生物转化是对天然产物进行结构修饰的重要手段,具有催化反应快、选择性强、反应条件易控制和污染小等特点。许多微生物能够对蟾毒配基类化合物进行生物转化,在不同位置进行结构修饰,并且产生毒性减弱的活性衍生物。【目的】筛选蟾毒灵生物转化菌株,以期发现活性更好、毒性降低的化合物。【方法】利用蟾毒灵为底物筛选其生物转化菌株,通过 HPLC (High performance liquid chromatography)/LC-MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer) 鉴定转化产物;对可生物转化蟾毒灵的菌株进行菌落形态观察和分子生物学鉴定,并优化发酵条件提高转化率,同时测试该菌株对其他甾体化合物的转化作用。【结果】筛选获得一株蟾毒灵转化菌,经形态学与 ITS (Internal transcribed spacer) 分析鉴定为 *Naganishia* 属菌,转化产物为 3-去氢蟾毒灵。该菌株生物转化的培养基最适底物浓度为 8 mg/L,最适初始 pH 值为 6.5,最佳接种量为 3%,最佳转化时间为 96 h,最终转化率为 48.3%。该菌株可将雌酮 E1 转化为雌二醇 E2,也可将雌二醇 E2 逆向转化为 E1。【结论】首次发现 *Naganishia* 属菌株对甾体类化合物具有转化活性,其产生的弱细胞毒性的转化产物 3-去氢蟾毒灵有望成为高效、安全的强心药物。微生物转化法选择性高、反应条件温和、操作简单,为大量制备活性化合物 3-去氢蟾毒灵提供了一条简便易行的道路,也为更多甾体化合物结构修饰提供了可能。

关键词: 微生物转化, *Naganishia* 属, 蟾毒灵, 3-去氢蟾毒灵, 甾体

Isolation and characterization of a fungus for bufalin transformation

HUANG Xin-Lei¹ WANG Xiao-Zheng¹ WU Ying-Chun² LIANG Ru-Bing¹LIU Jing-Jing² BIAN Xue-Lian³ LI Yi-Ming² LIN Shuang-Jun^{*1}

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3 Shanghai Jinchan Health Technology Company, Shanghai 201900, China

Abstract: [Background] Microbial transformation is an important means for structural modification of natural products, featured with fast reaction, high selectivity, easy-controlled conditions and little pollution. Many microorganisms have been isolated for transformation of bufadienolides and several derivatives of reduced toxicity can be obtained by the modification at different positions. [Objective] The aim of this work

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31425001)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

Received: 13-03-2019; **Accepted:** 25-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31425001)

***通信作者:** Tel: 021-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-13; **接受日期:** 2019-04-25

is to find compounds with better bioactivity or reduced toxicity by screening the converting strains towards bufalin. **[Methods]** Substrate transformation experiments were carried out with bufalin as substrate to screen strains, and the products were identified by HPLC (High performance liquid chromatography) and LC-MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer). The selected strain was determined in terms of colony morphology observation and molecular biological identification. The fermentation conditions were optimized to increase the conversion rate. The transformation of other steroids were also determined. **[Results]** One bufalin-transforming strain was obtained and identified as *Naganishia* sp. by the morphological characteristics and evolutionary analysis on the basis of ITS sequence. The transformation product of this strain to bufalin was 3-ketobufalin. The optimal conversion conditions were determined with the initial pH value of 6.5, substrate concentration of 8 mg/L, the inoculation amount of 3% and the transformation time of 96 hours. About 48.3% of bufalin was converted into 3-ketobufalin. In addition, this strain could also transform the reversible reaction of estrone and 17 β -estradiol. **[Conclusion]** It is first reported that *Naganishia* strain can transform bufalin into 3-ketobufalin, with less toxicity and great potential for safe drug to heart failure. The capability of transforming steroids of this strain also makes it possible to bioconvert and modify other steroidal compounds. The microbial conversion can provide a convenient path for large-scale production of the valuable compound because of high selectivity, mild reaction conditions and simple operation process.

Keywords: Microbial transformation, *Naganishia* sp., Bufalin, 3-Ketobufalin, Steroids

蟾酥是一种传统中药, 是中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍耳后腺分泌物, 具有开窍醒神、解毒、止痛的功效^[1], 也具有良好的强心效果^[2]和多种抗肿瘤活性, 对肝癌^[3]、结肠癌^[4]和肺癌^[5]等多种癌细胞有很好的抑制作用, 是药物“六神丸”、“麝香保心丸”和“蟾毒灵注射液”的主要原料。蟾毒配基类化合物是蟾酥中的有效活性成分, 包括蟾毒灵(图1)、脂蟾毒配基、华蟾毒精等多种化合物, 占蟾酥总量10%^[6]。临床实验证实蟾毒配基类活性成分具有一定的心脏毒性^[7-10], 因此限制了蟾酥药物的进一步使用。如何克服蟾酥化合物毒副作用, 是当前亟待解决的关键问题, 也是提高蟾酥药物使用效率的必经之路。

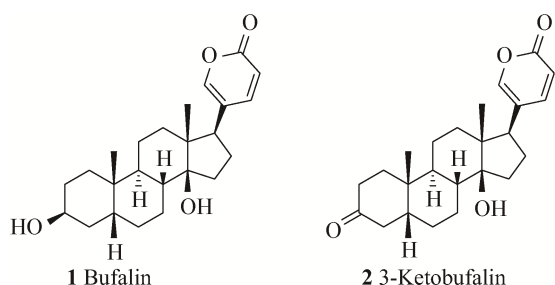


图1 蟾毒灵及3-去氢蟾毒灵结构^[20]

Figure 1 Structure of bufalin and 3-keto bufalin^[20]

微生物转化技术是中药现代化研究的热点之一, 它可以利用微生物产生的一系列酶作用于中药底物, 通过酶的催化作用影响天然药物的成分含量^[11], 借此提高药效, 去除杂质, 增加稳定性, 降低毒性或产生新的成分^[12-14]。例如 Yu 等对人参中的 Rb1、Re 及 Rg1 等成分进行了微生物转化, 产物的量和抗炎的效果明显提高($P < 0.05$)^[15]; 叶敏利用连格孢霉对华蟾毒精进行转化, 通过羟基化、脱氢、脱乙酰基反应得到了6种羟基化和乙酰基产物, 得到的去乙酰化产物毒性更小, 使得华蟾毒精毒性大大降低^[16], 增加了蟾酥的药效。

本研究以蟾酥中重要有效成分蟾毒灵为底物, 筛选可对其进行生物转化的菌株, 以期通过生物转化手段获得活性更好、毒性减弱的化合物。通过筛选最终得到一株蟾毒灵转化菌, 转化产物为3-去氢蟾毒灵(图1), 该化合物细胞毒性明显减弱^[17-19], 在强心应用上有很大的潜在价值。这是 *Naganishia* 属菌株首次被发现具有甾体类转化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验室前期从土壤、湖水和植物组织中分离了35株菌。

1.1.2 培养基

发酵基础培养基参考文献[21], 固体培养基加 18 g/L 的琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器

蟾毒灵, 上海中医药大学李医明课题组提供; GC 纯 17 β -雌二醇、雌酮、雌三醇和 17 α -炔雌醇(图 2), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 甲醇、乙酸乙酯、丙酮等有机试剂, 摩贝(上海)生物科技有限公司; 色谱纯乙腈(Acetonitrile, ACN), 上海百灵威化学技术有限公司; 氘代甲醇(Methanol-d₄), Cambridge Isotope Laboratory 公司。

C18 反相色谱柱, 广州菲罗门科学仪器有限公司; C18 反相半制备柱、高效液相色谱仪(Agilent 1260 infinity HPLC)、超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; 600 MHz 核磁共振波谱仪, 布鲁克科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 转化菌筛选

将菌种划线接种于固体平板培养基, 30 °C 恒温培养 36 h 长出单菌落, 挑取单菌落接种于含 4 mL 基础培养基小白管中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 12 h 至菌液浑浊; 取种子液, 按 2% 接种量接种于装有 50 mL 基础培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h, 然后添加 0.5 mg 蟾毒灵甲醇溶液(终浓度 10 mg/L)继续振荡培养 48 h;

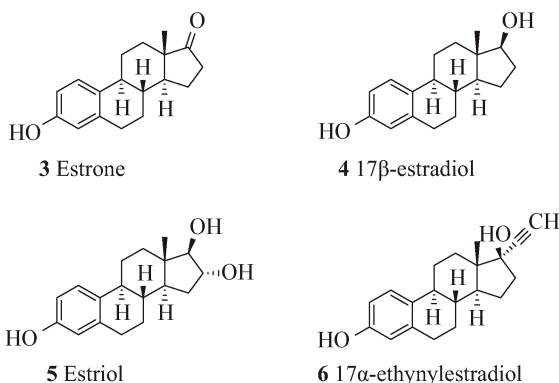


图 2 本研究中其他甾体化合物结构^[22]

Figure 2 Structure of other steroidal compounds in the study^[22]

4 000 r/min 离心菌液 10 min, 将上清液倒出, 用与发酵液等体积的乙酸乙酯常温振荡萃取, 振荡 30 s 后静置分层。将水相用等体积乙酸乙酯再次萃取, 离心后菌体沉淀加入 15 mL 丙酮重悬并过夜浸泡萃取, 过滤后与乙酸乙酯萃取液合并, 30 °C 减压蒸馏浓缩, 产物用 1 mL 甲醇溶解后进行 HPLC 检测分析, 有转化产物的菌株进行后续实验分析。

1.2.2 产物检测方法

色谱条件: 色谱柱 Phenomenex C18 4.6 mm \times 250 mm, 检测波长 296 nm, 流速设定为 0.6 mL/min, 进样量 20 μ L。洗脱条件为梯度洗脱法, 乙腈初始浓度为 5%, 0–30 min 由 5% 增至 60%, 30–45 min 由 60% 增至 100%, 45–48 min 乙腈浓度保持 100%, 48–50 min 由 100% 降至 5%, 50–55 min 保持 5%。

1.2.3 产物转化率计算

转化率 = $S_1 / (S_1 + S_2) \times 100\%$, 式中 S_1 为产物峰峰面积, S_2 为实验组中底物峰峰面积。

1.2.4 目标产物的分离纯化及结构鉴定

250 mL 三角瓶分批发酵 40 瓶共 2 L, 置于 30 °C 的相同条件培养并处理发酵液得到分离粗品 1.2 g。吸取 5 mL 甲醇溶解发酵产物, 用 C18 半制备色谱柱收集目标组分, 每次进样 100 μ L。色谱条件: 色谱柱 Agilent C18 9.4 mm \times 250 mm, 检测波长 296 nm, 流速设定为 2 mL/min, 进样量 100 μ L。洗脱条件为梯度洗脱法, 乙腈初始浓度为 5%, 0–20 min 由 5% 增至 60%, 20–30 min 由 60% 增至 80%, 30–31 min 乙腈浓度升至 100%, 31–34 min 保持 100% 3 min, 34–35 min 降至 5%, 35–39 min 保持 5%。根据 HPLC 实时在线图谱, 收集可能的目标化合物出峰时的流出组分, 共计接样 50 次, 收集流出组分约 40 mL。

取 20 μ L 收集组分用 C18 分析色谱柱检测, 确保收集组分的纯度。将纯品组分减压蒸馏蒸干。取少许纯化后样品, 溶解于甲醇中, 使用 LC-MS 检测, 获得高分辨质谱[HPLC 条件与产物检测方法一致, 电离源为 APCI (Atmospheric pressure

chemical ionization 源)。剩余样品溶于 0.5 mL 氘代甲醇中, 以四甲基硅烷(Tetramethyl silane, TMS)作为内标进行核磁共振光谱(Nuclear magnetic resonance, NMR)分析。检测结束后回收样品, 减压蒸馏去除溶剂, 将干燥的样品于 -80°C 保存。

1.2.5 菌株形态观察

将筛选菌株接种到固体基础培养基上, 30°C 培养 3 d, 观察菌落形态包括形状、大小、颜色等, 通过扫描电镜进一步观察细胞形态^[23]。

1.2.6 菌株分子生物学鉴定

筛选得到的菌株送交上海融享生物科技有限公司进行 ITS 基因序列分析鉴定。正、反向引物分别为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。50 μL ITS 序列扩增体系: 基因组 DNA 1.0 μL , 10 \times Buffer 5.0 μL , *Taq* 聚合酶(5 U/ μL) 1.0 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL , 引物 ITS1 和 ITS4 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.5 μL , ddH₂O 39.0 μL 。PCR 反应条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 共 35 个循环; 72°C 7 min。

测得的序列提交 GenBank, 并利用 NCBI 的 BLAST 软件进行同源性比对。将筛选菌株及近缘菌株的 ITS 基因序列用 MEGA 6.0 软件构建系统发育进化树, 采用邻接法(Neighbor-Joining method)、1 000 次自展(Bootstrap)来评估所建进化树的准确性。

1.2.7 转化条件优化

以菌株筛选实验的发酵方法和培养基作为基础, 先后探索底物浓度、初始 pH 值、接种量和发酵时间对底物转化率的影响。每个影响因素均设

置 5 种不同条件, 统计每个条件下可重复实验数据(3 次及以上), 计算平均值。每个变量摸索出最佳条件后, 下一个变量最佳条件摸索实验按照该参数最佳条件进行, 最终确定最佳转化条件, 并计算得到最佳转化率。

1.2.8 转化菌株对其他甾体类的转化

选取雌酮、雌二醇、雌三醇和 17 α -乙炔雌二醇 4 种甾体进行转化菌株生物转化实验, 按照蟾毒灵喂养实验的步骤进行, 采用 HPLC 和 LC-MS 检测反应结果(4 种化合物配置成 1 mg/mL 的溶液, 溶于 DMSO 中)。

其他甾体化合物 HPLC 色谱条件: 色谱柱 Phenomenex C18 4.6 mm \times 250 mm, 检测波长 280 nm, 流速设定为 0.6 mL/min, 进样量 20 μL 。洗脱条件为梯度洗脱法, 乙腈初始浓度为 5%, 0–20 min 由 5%增至 55%, 20–40 min 由 55%增至 100%, 40–43 min 乙腈浓度保持 100%, 43–45 min 由 100%降至 5%, 45–50 min 保持 5%。

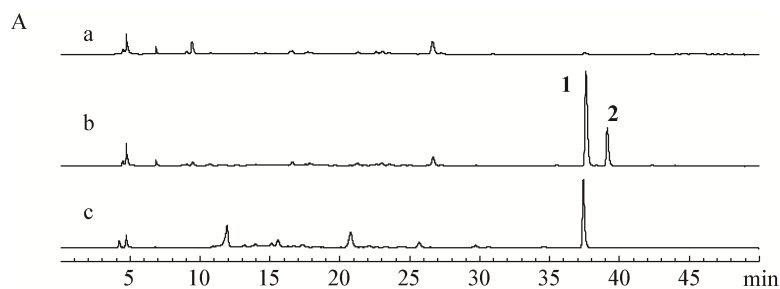
LC-MS 色谱方法与 HPLC 一致, 质谱方法为 APCI 源负离子模式。

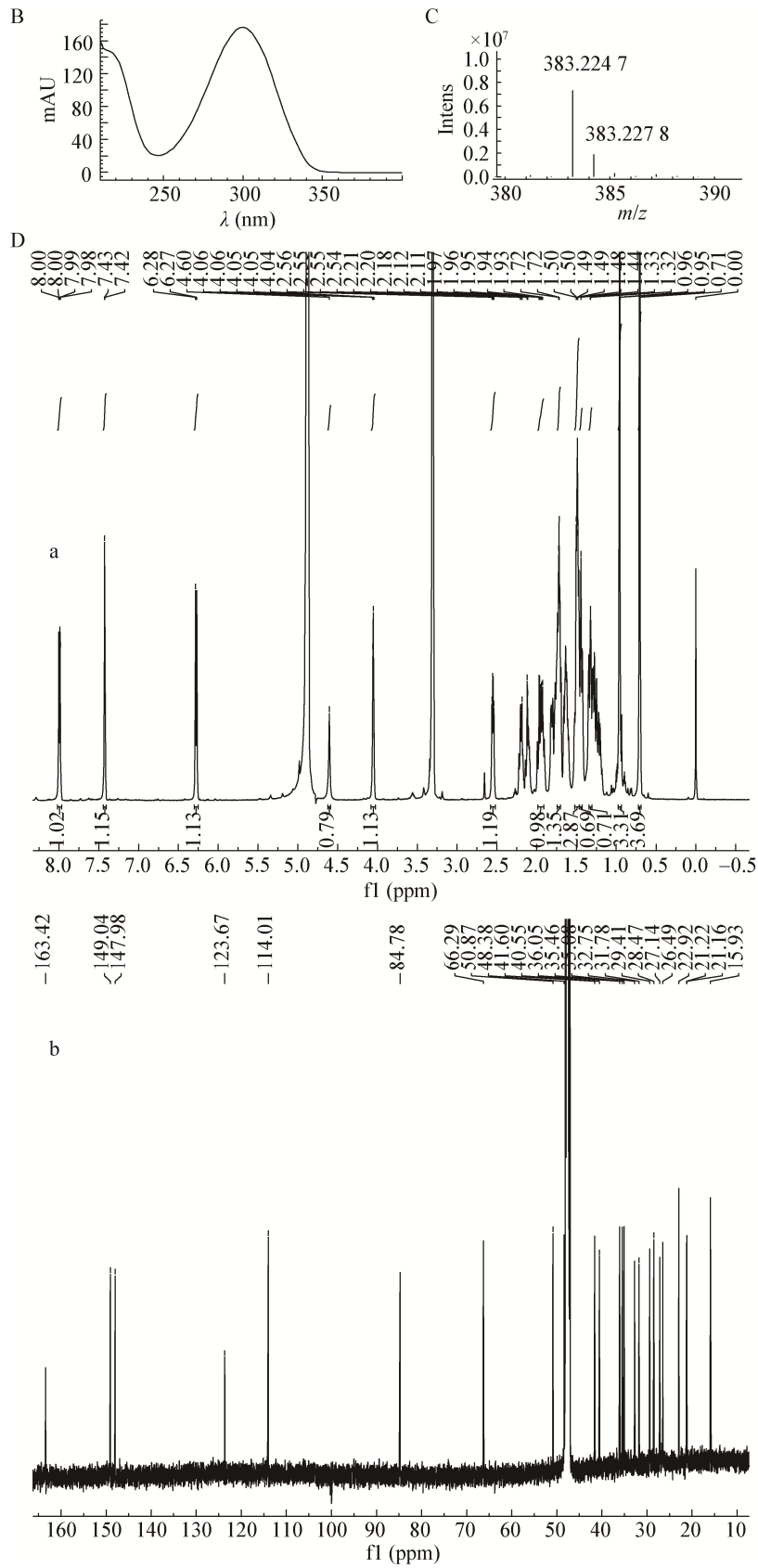
2 结果与分析

2.1 蟾毒灵转化产物检测与结构鉴定

2.1.1 转化产物 HPLC 检测

分别设置对照组 a、c 和实验组 b, 在实验组 b 的发酵液中添加底物蟾毒灵, 在对照组 a 发酵液添加等量的甲醇, 在对照组 c 发酵液中添加底物蟾毒灵, 不加种子液, 其他条件相同。HPLC 检测结果显示一株菌的发酵液中有新峰产生, 该菌株编号为 x1-001。如图 3A 所示, 1 为蟾毒灵, 2 为转化产





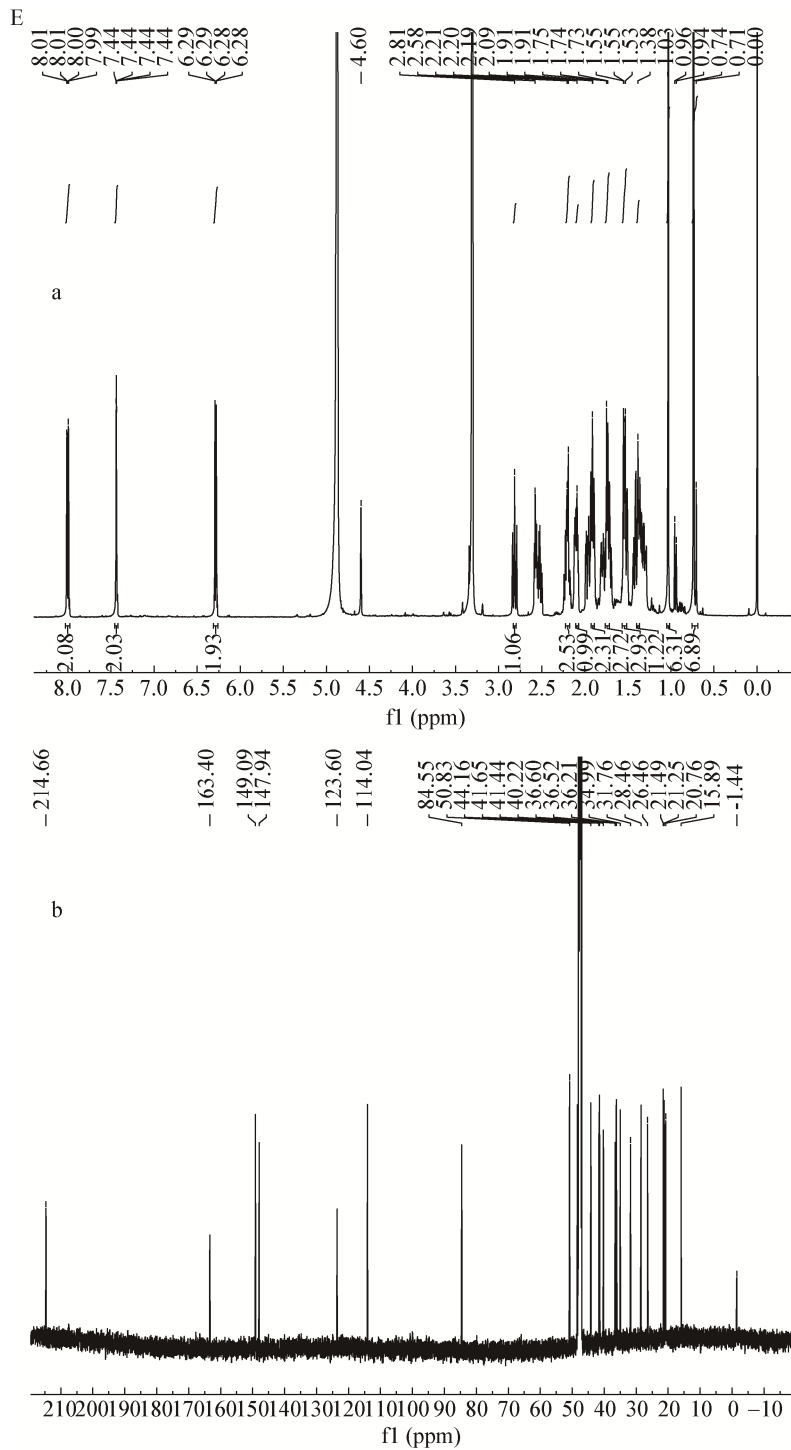


图 3 菌株 xl-001 转化蟾毒灵的产物检测与鉴定

Figure 3 Detection and characterization of the transformation product of bufalin by strain xl-001

注: A: HPLC 检测图: a: 菌株 xl-001 添加等量甲醇; b: 菌株 xl-001 喂养 0.5 mg 蟾毒灵; c: 培养基喂养 0.5 mg 蟾毒灵; 1: 蟾毒灵; 2: 产物. B: 转化产物紫外吸收图. C: 转化产物高分辨质谱图(负离子模式). D: 蟾毒灵 NMR 图谱: a: 氢谱; b: 碳谱. E: 蟾毒灵转化产物 NMR 图谱: a: 氢谱; b: 碳谱.

Note: A: HPLC map: a: Strain xl-001 feeding the same volume of methanol; b: Strain xl-001 feeding 0.5 mg bufalin; c: Medium feeding 0.5 mg bufalin. 1: Bufalin; 2: The transformation product of bufalin. B: The UV-vis spectra profiles. C: The HRMS spectra ($[M-H]^-$). D: NMR detection of bufalin: a: 1H NMR; b: ^{13}C NMR. E: NMR detection of the transforming product of bufalin: a: 1H NMR; b: ^{13}C NMR.

物。转化产物的全波长扫描图与底物基本一致，在 296 nm 处有特征吸收。通过峰面积比值估算转化率约为 36%。

2.1.2 化合物结构鉴定

化合物 2 是淡黄色粉末，易溶于甲醇和氯仿。紫外吸收如图 3B 所示，其中 λ_{\max} 为 210 nm 和 296 nm。在 APCI 源下，高分辨质谱分析(图 3C)给出其准分子离子峰为 383.224 7 [M-H]⁻，而其理论分子量为 384.230 1。因此确定它的分子式为 C₂₄H₃₂O₄。将该化合物和蟾毒灵分别溶解在 0.5 mL 的氘代甲醇中，进行核磁共振(NMR)分析，并以四甲基硅烷(TMS)作为内标。对比两个化合物的 ¹H NMR，发现该化合物少了一个连氧次甲基信号 δ_{H} 4.05 (brs,

H-3)。¹³C NMR 显示该化合物少了一个连氧碳信号 δ_{C} 66.3 (C-3)，多了一个羰基信号 δ_{C} 214.7 (C-3)。因此推测 3 号位变成了羰基，结合 ¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC 等 2D NMR 光谱，确定该化合物为 3-去氢蟾毒灵，化学结构如图 1 所示，核磁数据与文献[20]报道一致。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌种形态学鉴定

筛选获得的蟾毒灵转化菌株 xl-001 在固体培养基上呈白色较大菌落，表面光滑，质地为稀奶油状，光滑，不产掷孢子。电镜下观察其细胞呈椭圆形，球径约为 2 μm × 3 μm (图 4A)。根据菌落形态和显微观察结果可初步判定该菌为酵母菌。

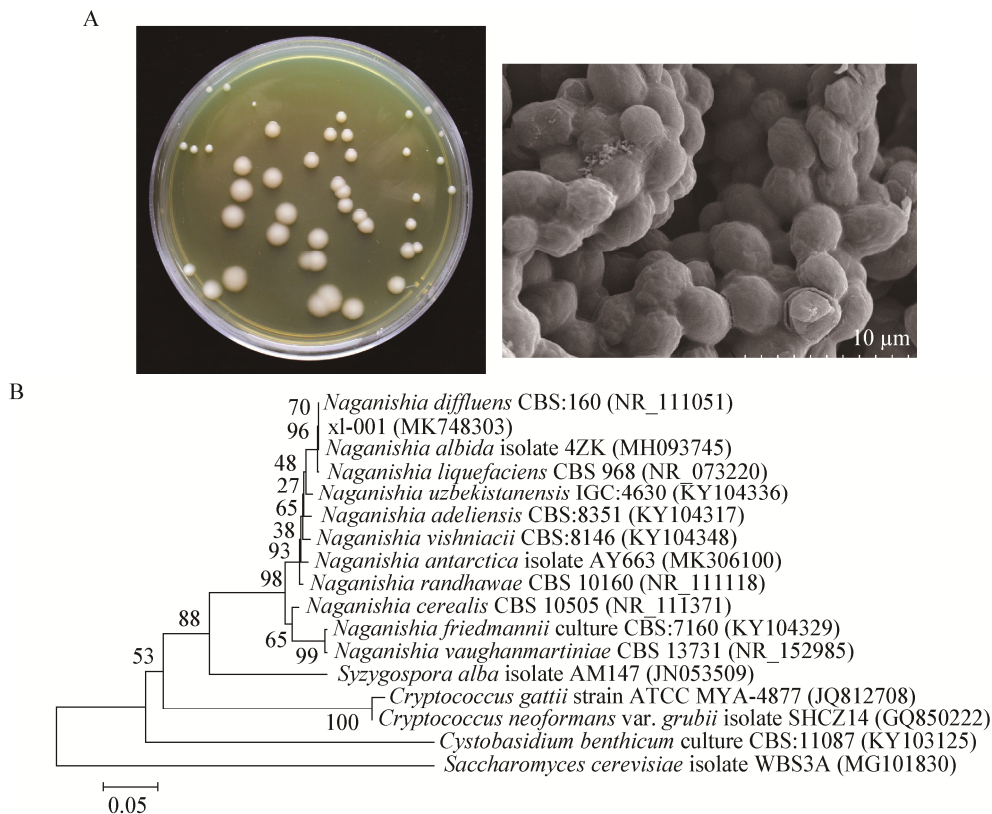


图 4 菌株 xl-001 的菌落形态图和系统发育进化树

Figure 4 The colony morphology and phylogenetic tree of strain xl-001

注：A：菌株 xl-001 平板菌落和菌体扫描电镜照片；B：基于 ITS 序列构建的系统发育进化树：括号内为菌株的 ITS 序列在 GenBank 的登录号；分支结点处数字为 Bootstrap 值；标尺的数据为进化距离。

Note: A: The photographs of the colonial morphology of xl-001 on the plate and under the scanning electron microscope; B: Phylogenetic tree constructed on the basis of ITS sequences: Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the ITS sequences of the strain; The numbers on the branches refer to bootstrap values; Bar (0.05) represents sequence divergence.

2.2.2 ITS 序列比对及系统进化树分析

经 NCBI 比对显示, 菌株 xl-001 与 *Naganishia diffluens* 等几种菌的 ITS 序列相似性为 99%。根据比对结果选取近缘菌株构建系统发育进化树, 在进化树上 xl-001 与 *Naganishia diffluens* 及 *Naganishia albida* 位于同一支, 亲缘关系较近(图 4B)。结合菌株形态学鉴定结果, 菌株 xl-001 应属于 *Naganishia* 属。

2.3 转化条件优化

2.3.1 底物浓度对菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率的影响

在培养基初始 pH 为 7.0、接种量为 2%、发酵时间为 48 h 的初始条件下, 探索不同底物浓度对转化率的影响。如图 5 所示, 随着底物浓度的增加, 转化率不断提高, 当底物浓度达到 8 mg/L 时转化率最高, 大于 8 mg/L 时转化率随着底物浓度增高反而降低, 可能是由于底物浓度较高从而抑制了转化酶的转化活性。从转化率和底物添加总量来看, 最佳底物浓度为 8 mg/L, 最佳转化率为 43.0%。

2.3.2 初始 pH 值对菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率的影响

每组底物均定为 8 mg/L, 探索不同初始 pH 值对转化率的影响。如图 6 所示, 当初始 pH 值为 6.5

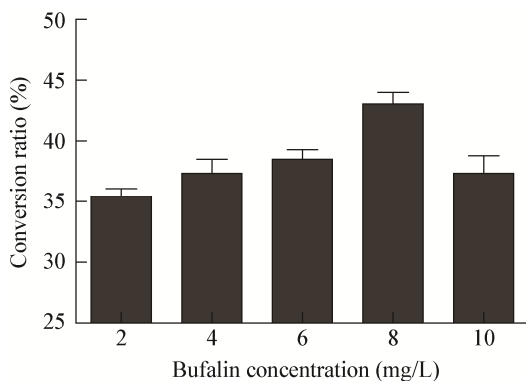


图 5 不同底物浓度下菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率
Figure 5 The conversion ratio of strain xl-001 with different bufalin concentration

注: 反应条件: 培养基初始 pH 为 7.0, 菌株 xl-001 接种量为 2%, 发酵时间 48 h, 底物(蟾毒灵)浓度依次为 2、4、6、8 和 10 mg/L。
Note: The reaction conditions: the initial pH was 7.0, the inoculation of strain xl-001 was 2%, the fermentation time was 48 h and the concentration of bufalin was 2, 4, 6, 8 and 10 mg/L.

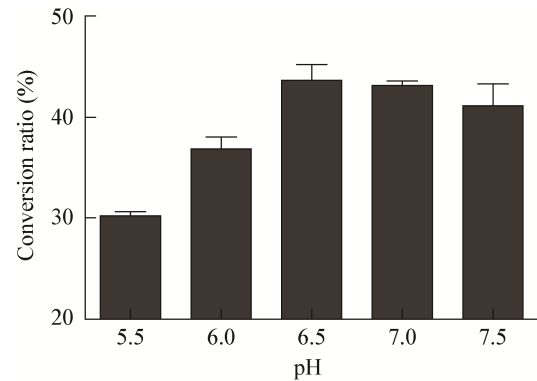


图 6 不同初始 pH 值下菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率
Figure 6 The conversion ratio of strain xl-001 under different initial pH

注: 反应条件: 菌株 xl-001 接种量为 2%, 发酵时间 48 h, 底物(蟾毒灵)浓度为 8 mg/L, 培养基初始 pH 依次为 5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5。

Note: The reaction conditions: the inoculation of strain xl-001 was 2%, the fermentation time was 48 h and the concentration of bufalin was 8 mg/L, and the initial pH was 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5.

时, 底物转化率最高, 溶液偏酸性或碱性转化率均不是很理想。因此最佳转化初始 pH 值为 6.5, 最佳转化率为 43.6%。

2.3.3 起始接种量对菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率的影响

每组的初始 pH 值均为 6.5, 探索不同接种量对转化率的影响。如图 7 所示, 当起始接种量为 3% 时, 菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率最高, 为 43.9%。

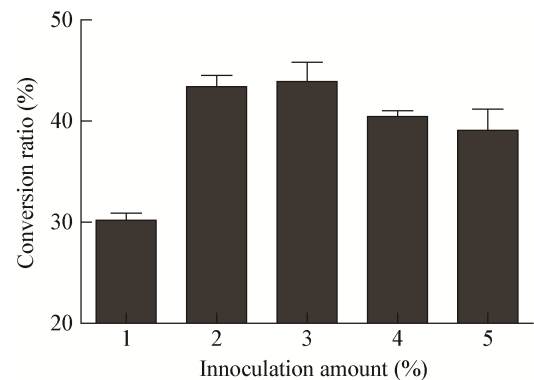


图 7 不同起始接种量时菌株 xl-001 的蟾毒灵转化率
Figure 7 The conversion ratio of strain xl-001 under different inoculation amount

注: 反应条件: 底物(蟾毒灵)浓度为 8 mg/L, 培养基初始 pH 为 6.5, 发酵时间 48 h, 菌株 xl-001 接种量为 1%、2%、3%、4% 和 5%。
Note: The reaction conditions: the concentration of bufalin was 8 mg/L, and the initial pH was 6.5, the fermentation time was 48 h, and the inoculation of strain xl-001 was 1%, 2%, 3%, 4% and 5%.

接种量太小, 发酵迟滞期增长, 转化率降低; 接种量偏大, 菌的生长活力可能会降低, 不利于底物的有效转化。

2.3.4 转化时间对菌株 x1-001 的蟾毒灵转化率的影响

每组的起始接种量均为 3%, 探索不同转化时间对转化率的影响。随着时间延长, 菌株 x1-001 的蟾毒灵转化率逐步提高, 96 h 时达到最大转化率, 为 48.3%。96 h 后随着时间继续增加, 转化率不再增加(图 8)。因此最佳转化时间应为 96 h。

2.4 菌株 x1-001 对其他甾体类化合物的转化

如图 9A 所示, 分离的蟾毒灵转化菌株 x1-001 可对雌酮进行生物转化, 底物为 **3**, 产物为 **4**, 产物与雌二醇标准品紫外吸收和保留时间完全一致; 高分辨质谱显示产物 **4** 在 APCI 源负离子模式下准分子离子峰为 271.170 9, 理论分子量为 272.177 6, 与雌二醇一致, 因此转化菌株可将雌酮转化为雌二醇。同时, 该菌株还可对雌二醇进行生物转化, 底物峰完全消失, 产物为 **3**, 与雌酮标准品紫外吸收和保留时间完全一致(图 9B); 高分辨质谱显示产物 **3** 在 APCI 源下准分子离子峰为 269.156 5, 理论

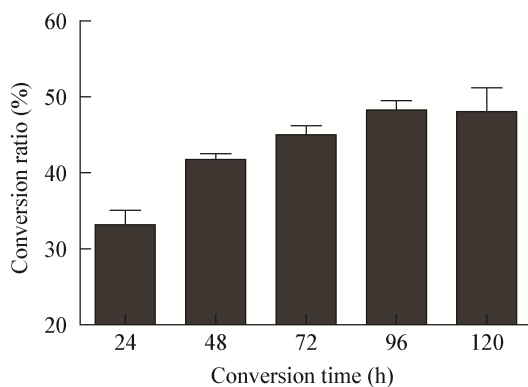


图 8 不同转化时间后菌株 x1-001 的蟾毒灵转化率
Figure 8 The conversion ratio of strain x1-001 after different transformation time

注: 反应条件: 底物(蟾毒灵)浓度为 8 mg/L, 培养基初始 pH 为 6.5, 菌株 x1-001 接种量为 3%, 发酵时间 24、48、72、96 和 120 h。

Note: The reaction conditions: the concentration of bufalin was 8 mg/L, the inoculation of strain x1-001 was 3%, the initial pH was 6.5, and the fermentation time was 24, 48, 72, 96 and 120 h.

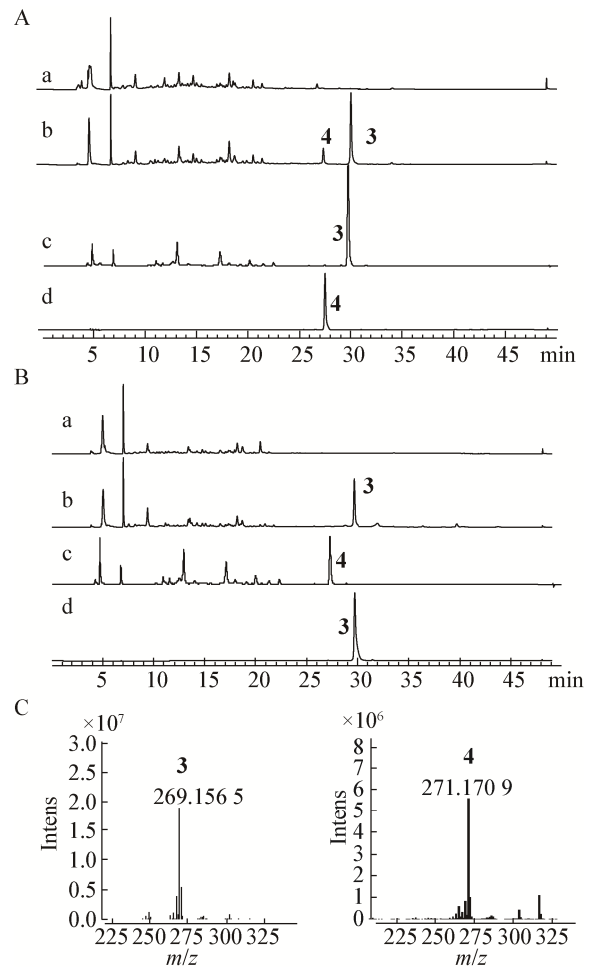


图 9 转化菌株 x1-001 对雌酮和雌二醇的转化

Figure 9 The transformation of strain x1-001 to estrone and 17β-estradiol

注: A: 雌酮转化 HPLC 检测图, a: 菌株 x1-001 添加等量 DMSO; b: 菌株 x1-001 喂养 0.5 mg 雌酮; c: 培养基喂养 0.5 mg 雌酮; d: 雌二醇标准品。B: 雌二醇转化 HPLC 检测图, a: 菌株 x1-001 添加等量 DMSO; b: 菌株 x1-001 喂养 0.5 mg 雌二醇; c: 培养基喂养 0.5 mg 雌二醇; d: 雌酮标准品。C: 转化产物高分辨质谱图, **3**: 雌酮; **4**: 雌二醇。

Note: A: HPLC detection of estrone transformation, a: Strain x1-001 feeding the same volume of DMSO; b: Strain x1-001 feeding the 0.5 mg estrone; c: Medium feeding the 0.5 mg estrone; d: Standard of 17β-estradiol. B: HPLC detection of 17β-estradiol transformation, a: Strain x1-001 feeding the same volume of DMSO; b: Strain x1-001 feeding the 0.5 mg 17β-estradiol; c: Medium feeding the 0.5 mg 17β-estradiol; d: Standard of estrone. C: The HRMS spectra, **3**: Estrone; **4**: 17β-estradiol.

分子量为 270.162 0, 与雌酮一致。因此该蟾毒灵转化菌株 x1-001 可实现雌二醇与雌酮可逆转化, 而还原反应效率较低, 氧化反应效率较高, 适当浓度下可实现全部转化。此外, HPLC 结果显示该菌

株不能对雌三醇和 17 α -乙炔雌二醇进行转化, 未见新产物生成。

3 讨论与结论

蟾毒灵是蟾酥中的重要有效成分, 本研究筛选获得了一株可对蟾毒灵进行生物转化的菌株, 其转化产物为 3-去氢蟾毒灵, 实现了通过生物转化手段获得毒性减弱的活性化合物。3-去氢蟾毒灵并非蟾酥药物的天然成分, 之前报道有一株 *Penicillium aurantigriseum* 转化蟾毒灵生成 3-去氢蟾毒灵, 转化率约为 23%; 肿瘤毒性实验结果表明相较于蟾毒灵, 3-去氢蟾毒灵的细胞毒性极大减弱, 有望发展成毒副作用小的强心药物^[17], 本研究筛选获得的 *Naganishia* 属菌也可将蟾毒灵转化生成 3-去氢蟾毒灵, 条件优化后该菌转化率可达到 48.3%, 较之前报道效果更好。尽管 3-氧代甾体化合物及其类似物也可由化学法合成制备, 但主要是通过沃式氧化法反应获得, 反应过程中使用了环己酮、异丙醇铝等多种有机试剂, 大量制备会产生较高除废成本, 且有一定副产物生成^[24-26]。相较于化学合成法, 通过微生物转化法制备 3-氧代甾体化合物反应选择性强, 能耗低, 污染小, 无副产物, 未转化底物易回收, 具有更好的应用前景。此外, 本文首次发现 *Naganishia* 属菌株具备蟾酥化合物的转化能力, 后续将继续进行其他有效成分的生物转化实验, 以期改善蟾酥药效, 发现更多新活性化合物。同时本文还证实了 *Naganishia* 属菌株可对典型甾体类化合物进行有效生物转化作用, 既能催化甾体 3 位和 17 位氧化反应, 也能催化 17 位还原反应, 具有一定的催化位点多样性。该菌株不仅可应用于自然界中雌激素类物质的减毒降效研究, 还可利用该菌进行多种甾体活性化合物的生物转化, 如果能发现活性、药效改良的化合物, 将为甾体化合物的应用打开新的大门。

REFERENCES

- [1] Qin ZF, Wang BH. The research progress of traditional Chinese medicine Toad Venom[J]. Chinese Journal of Drug Evaluation, 2014, 31(5): 306-309 (in Chinese)
- [2] Sun CF, Fan SC, Luo Y, et al. Research progress on chemical constituents and artificial synthesis of *Bufo venenum*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(13): 3183-3192 (in Chinese)
- [3] Hu FL, Han JW, Zhai B, et al. Blocking autophagy enhances the apoptosis effect of bufalin on human hepatocellular carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress and JNK activation[J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 210-223
- [4] Xie CM, Chan WY, Yu S, et al. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 51(7): 1365-1375
- [5] Li HX, Wang P, Gao Y, et al. Na⁺/K⁺-ATPase α 3 mediates sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to bufalin[J]. Oncology Reports, 2011, 25(3): 825-830
- [6] Nogawa T, Kamano Y, Yamashita A, et al. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(9): 1148-1152
- [7] Li XP, Lei L, Hu JY, et al. Acute toxicity of *Bufo venenum* and Danling Xinshu capsule[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2012, 28(6): 127-129 (in Chinese)
- [8] Gonano LA, Sepúlveda M, Rico Y, et al. Calcium-Calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias[J]. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, 2011, 4(6): 947-957
- [9] Vincent KP, McCulloch AD, Edwards AG. Toward a hierarchy of mechanisms in CaMKII-mediated arrhythmia[J]. Frontiers in Pharmacology, 2014, 5: 110
- [10] Li QC, Pogwizd SM, Prabhu SD, et al. Inhibiting Na⁺/K⁺ ATPase can impair mitochondrial energetics and induce abnormal Ca²⁺ cycling and automaticity in guinea pig cardiomyocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93928
- [11] Niu HJ, Wang P, Yang GE. Application of microbial transformation in research of Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(18): 346-349 (in Chinese)
- [12] Bilal M, Asgher M, Iqbal HMN, et al. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products - A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 447-458
- [13] Baydoun E, Bibi M, Asif Iqbal M, et al. Microbial transformation of anti-cancer steroid exemestane and cytotoxicity of its metabolites against cancer cell lines[J]. Chemistry Central Journal, 2013, 7: 57
- [14] Neoh CH, Lam CY, Yahya A, et al. Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulosic

- enzymes by *Curvularia clavata*[J]. Waste and Biomass Valorization, 2015, 6(3): 385-390
- [15] Yu SS, Zhou XL, Li F, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rb1, Re and Rg1 and its contribution to the improved anti-inflammatory activity of ginseng[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 138
- [16] Ye M. Study on biotransformation of cinobufagin and bufalin[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking University, 2003 (in Chinese)
叶敏. 华蟾毒精和蟾毒灵的生物转化研究[D]. 北京: 北京大学博士学位论文, 2003
- [17] Ma XC, Cui J, Zheng J, et al. Microbial transformation of three bufadienolides by *Penicillium aurantigriseum* and its application for metabolite identification in rat[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 48(1/2): 42-50
- [18] Ye M, Qu GQ, Guo HZ, et al. Specific 12 β -hydroxylation of cinobufagin by filamentous fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3521-3527
- [19] Zhang J, Sun Y, Liu JH, et al. Microbial transformation of three bufadienolides by *Nocardia* sp. and some insight for the cytotoxic structure-activity relationship (SAR)[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(22): 6062-6065
- [20] Li XL, Guo ZM, Wang CR, et al. Purification of bufadienolides from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor with positively charged C18 column[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 92: 105-113
- [21] Duan Y, Han BQ, Dong W, et al. Study on optimal fermentation conditions of a chitosanase-producing bacterium and purification of the chitosanase[J]. Marine Sciences, 2009, 33(1): 1-7 (in Chinese)
段妍, 韩宝芹, 董文, 等. 产壳聚糖酶菌株发酵条件优化及壳聚糖酶的分离纯化研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(1): 1-7
- [22] Zuo YG, Zhang K, Lin YJ. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1148(2): 211-218
- [23] Kantarcioğlu AS, Boekhout T, Yücel A, et al. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole[J]. Medical Mycology, 2009, 47(2): 169-176
- [24] Almeida MLS, Kocovsky P, Baeckvall JE. Ruthenium-catalyzed oppenauer-type oxidation of 3 β -hydroxy steroids. A highly efficient entry into the steroidal hormones with 4-en-3-one functionality[J]. ChemInform, 1997, 28(6). DOI: 10.1002/chin.199706185
- [25] Chorghade R, Battilocchio C, Hawkins JM, et al. Sustainable flow oppenauer oxidation of secondary benzylic alcohols with a heterogeneous zirconia catalyst[J]. Organic Letters, 2013, 15(22): 5698-5701
- [26] Liu CF, Tian GH, Zhang Q, et al. Analysis on generate and structure of the by-product in 16 α , 17 α -epoxyprogesterone production[J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(1): 132-136 (in Chinese)
刘存芳, 田光辉, 张强, 等. 沃氏氧化物制备过程中副产物的生成与结构分析[J]. 科学技术与工程, 2017, 17(1): 132-136