



## 三种真菌对洋地黄毒苷的生物转化特性研究

王丽娟, 王 敏, 温 竹, 刘增兵

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘 要:** 考察了新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) AS3.3589、蓝色犁头霉 (*Absidia coerulea*) CICC40302 和雷斯青霉 (*Penicillium raistrickii*) ATCC10490 对洋地黄毒苷的生物转化特性. 结果表明: 新月弯孢霉 AS3.3589 转化洋地黄毒苷得到 2 个产物, 即产物 I 和产物 II, 产物 I 的转化率为 27%, 产物 II 的转化率为 5%; 蓝色犁头霉 CICC40302 转化洋地黄毒苷得到 1 个产物, 即产物 III, 转化率为 6%; 雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷不发生转化反应. 通过优化新月弯孢霉 KA-91 生物转化反应的工艺条件, 使转化产物 I 的转化率达到 38%, 产物 II 的转化率达到 10%.

**关键词:** 洋地黄毒苷; 新月弯孢霉; 蓝色犁头霉; 雷斯青霉; 生物转化

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0008-05

## Studies on Biotransformation Identity of Digitoxin by Three Fungi

WANG Li-juan, WANG Min, WEN Zhu, LIU Zeng-bing

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Biotransformed identity of digitoxin is investigated by *Curvularia lunata* AS3.3589, *Absidia coerulea* CICC40302 and *Penicillium raistrickii* ATCC1049. Results of the experiment are these: Two products are gotten when digitoxin is biotransformed by *Curvularia lunata* AS3.3589, named product I and product II, and the biotransformation yields are 27% and 5%; One product is gotten when digitoxin is biotransformed by *Absidia coerulea* CICC40302, named product III, and the biotransformation yield is 6%; *Penicillium raistrickii* ATCC1049 can not biotransform digitoxin. The optimum conditions of transformation by *Curvularia lunata* AS3.3589 are studied by transformed experiment. After that, the biotransformation yield of product I is attained to 38% and of product II is attained to 10%.

**Keywords:** digitoxin; *Curvularia lunata*; *Absidia coerulea*; *Penicillium raistrickii*; biotransformation

洋地黄强心苷类 (digitalis glycosides) 药物是一类有强心作用的苷类化合物, 应用于临床已有 200 余年的历史, 至今仍是治疗充血性心力衰竭 (心衰) 的主要药物之一<sup>[1]</sup>. 强心苷类药物除了具有增强心肌收缩力的作用外, 还有治疗室上性心律失常的作用. 洋地黄苷类治疗充血性心力衰竭的确切作用机制目前尚不完全清楚, 普遍认为是通过抑制心肌细胞膜上  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶, 使心肌细胞内过多的  $\text{Na}^+$  不能泵出到细胞外, 导致心肌细胞内  $\text{Na}^+$  浓度升高. 过多心肌细胞内的  $\text{Na}^+$  又通过细胞膜上  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  交换机制而被泵出细胞外, 与此同时, 将细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  摄入心肌细胞

内, 使细胞内可利用的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加, 进而使心肌细胞的兴奋-收缩耦联作用增强, 呈现出心肌收缩力增加. 近年来有文献报道洋地黄强心苷类药物具有抗肿瘤活性, 与白血病或淋巴瘤、肾或泌尿系肿瘤的低发生率之间有某种相关性<sup>[2-5]</sup>. 洋地黄强心苷类药物的缺点主要表现在排泄缓慢、易于蓄积中毒, 而且治疗量和中毒量接近 (治疗量约为中毒量的 60%), 故易发生中毒<sup>[1]</sup>. 对洋地黄强心苷类药物进行结构修饰, 期望得到高效、速效、低毒的强心苷类药物成为该类药物研究开发的方向之一. 以甾醇为母体经多次转化生成洋地黄强心苷元的过程, 涉及到大约 20 种酶

收稿日期: 2008-01-17; 修回日期: 2008-03-13

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目 (08JCZJC15200)

作者简介: 王丽娟 (1982—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通讯作者: 王 敏, 教授, minw@tust.edu.cn.

的作用,步骤烦琐<sup>[6]</sup>.利用生物转化的方法对洋地黄毒苷进行结构修饰已成为研究的热点<sup>[7-9]</sup>.其中,胡之璧院士应用洋地黄悬浮培养细胞,筛选出“胡氏细胞株”,经转化后甾体母核C<sub>12</sub>位上增加了一个羟基,将洋地黄毒苷羟化为地高辛<sup>[10]</sup>.微生物代谢过程中,对外界物质的利用及转化,能起到降低物质毒性的作用.新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)、蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*)、雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*)都是常用的微生物转化菌株<sup>[11-14]</sup>.本实验以洋地黄毒苷为底物,探讨新月弯孢霉、蓝色犁头霉和雷斯青霉对其进行生物转化的特性.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

新月弯孢霉(*Curvularia lunata*) AS3.3589、蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*) CICC40302、雷斯青霉(*Penicillium raistrickii*) ATCC1049,均为天津科技大学微生物制药研究室保存.

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 新月弯孢霉 AS3.3589 培养基

斜面培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,琼脂 20. 发酵培养基(g/L):葡萄糖 22,牛肉膏 5,酵母膏 4, pH6.5.

#### 1.2.2 蓝色犁头霉 CICC40302 培养基

斜面培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,琼脂 20. 发酵培养基(g/L):葡萄糖 10.5,酵母膏 2.5,玉米浆 12.0,硫酸铵 5.0, pH6.4~6.7.

#### 1.2.3 雷斯青霉 ATCC10490 培养基

斜面培养基(g/L):麦芽提取物 20,葡萄糖 20,蛋白胨 1,琼脂 20. 发酵培养基(g/L):葡萄糖 30,玉米浆 20,硝酸钠 2,磷酸二氢钾 1,磷酸氢二钾 2,硫酸镁 0.5,硫酸亚铁 0.02,氯化钾 0.5, pH7~7.5.

### 1.3 主要试剂与仪器

洋地黄毒苷,美国 BE 公司;地高辛,中国药品生物制品鉴定所;薄层硅胶板 GF254,烟台市化学工业研究所;其他试剂,天津市元立化工有限公司.

HYG-II型回旋式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司;超净工作台,苏州净化设备厂;WS2-134-75 电热恒温培养箱,天津市实验仪器厂;低速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;三用紫外分析仪,上海强运科技有限公司.

### 1.4 底物溶液的制备

准确称取洋地黄毒苷原料溶于 V(氯仿):V(甲醇)=1:1 的溶剂中,配制成 100 mg/mL 的底物

溶液.

### 1.5 新月弯孢霉 AS3.3589 对洋地黄毒苷的转化反应

新月弯孢霉 AS3.3589 接种于新鲜斜面培养基,置于 28 °C 恒温培养 7 d,于 4 °C 冰箱保存备用.用无菌水制备孢子悬浮液,调整孢子浓度为  $3.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,取 1 mL 孢子悬液接种到含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,28 °C,180 r/min 摇床培养 24 h,加入底物溶液 30  $\mu\text{L}$ ,使转化液中洋地黄毒苷的浓度达到  $1 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ ,28 °C,180 r/min 继续培养 48 h,终止发酵.

### 1.6 蓝色犁头霉 CICC40302 对洋地黄毒苷的转化反应

蓝色犁头霉 CICC40302 接种于新鲜斜面培养基上,28 °C 恒温培养 5 d,置于 4 °C 冰箱保存备用.用无菌水制备孢子悬浮液,调整孢子浓度为  $3.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,取 1 mL 孢子悬浮液接种含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,置于摇床上 28 °C 振荡(0~7 h,150 r/min,然后调节转速为 170 r/min)培养 19~21 h,培养液的 pH 降至 3.8 左右,用 NaOH 溶液将培养液的 pH 调至 5.4~5.6,加入底物溶液 30  $\mu\text{L}$ ,使转化液中洋地黄毒苷的浓度达到  $1 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ ,28 °C,150 r/min 继续培养 24 h,终止发酵.

### 1.7 雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷的转化反应

雷斯青霉 ATCC10490 接种于新鲜斜面培养基上,28 °C 恒温培养 5 d,置于 4 °C 冰箱保存备用.用无菌水制备孢子悬浮液,调整孢子浓度为  $3.0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,取 1 mL 孢子悬液接种到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,28 °C,210 r/min 摇床培养 36 h,加入底物溶液 50  $\mu\text{L}$ ,使转化液中洋地黄毒苷的浓度达到  $1 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ ,28 °C,210 r/min 继续培养 72 h,终止发酵.

### 1.8 产物的分离提取

转化结束后,离心(4 500 r/min,10 min)分离菌丝体和发酵液.分别用 30 mL 氯仿萃取菌丝体和发酵液,振荡 0.5 h,合并萃取液,减压蒸发除去溶剂,残留物用 V(氯仿):V(甲醇)=1:1 的混合溶剂溶解,移至 1.5 mL 离心管内,用于分析.

### 1.9 分析方法

薄层色谱(TLC)法的精密度足以将本实验的转化产物迅速分析出来,且操作方便,因此,本实验采用薄层色谱法进行转化产物的分析.展开剂为:V(氯仿):V(甲醇):V(苯)=10:2:5,取上一步离心管内提取物溶液 6  $\mu\text{L}$  点板,展开后待溶剂挥发

完,置于紫外分析仪 254 nm 下观察底物及产物斑点,观察完毕喷以显色剂(10%的硫酸水溶液),并将硅胶板置于烘箱内90℃干燥 10~15 min,斑点显色,根据斑点面积的大小,采用归一化法计算转化率。

转化率的计算公式如下:

$$\text{转化率} = \frac{P_1}{P_1 + P_2 + \dots + P_n + S} \times 100\%$$

式中:  $P_1$  为产物 I 在薄板上的面积;  $P_2$  为产物 II 在薄板上的面积;  $P_n$  为产物  $n$  在薄板上的面积;  $S$  为洋地黄毒苷在薄板上的面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种真菌对洋地黄毒苷的转化

#### 2.1.1 新月弯孢霉 AS3.3589 的转化结果分析

由图 1 可知,新月弯孢霉 AS3.3589 转化洋地黄毒苷得到 2 个转化产物,命名为产物 I 和产物 II,其中产物 I 的  $R_f$  值为 0.424,转化率为 27%;产物 II 的  $R_f$  值为 0.228,转化率为 5%。洋地黄毒苷标准品的  $R_f$  值为 0.523,地高辛标准品的  $R_f$  值为 0.357,产物 I 的  $R_f$  值介于洋地黄毒苷和地高辛之间,产物 II 的  $R_f$  值则小于两者,即表明产物 I 的极性介于洋地黄毒苷和地高辛之间,而产物 II 的极性大于洋地黄毒苷和地高辛。

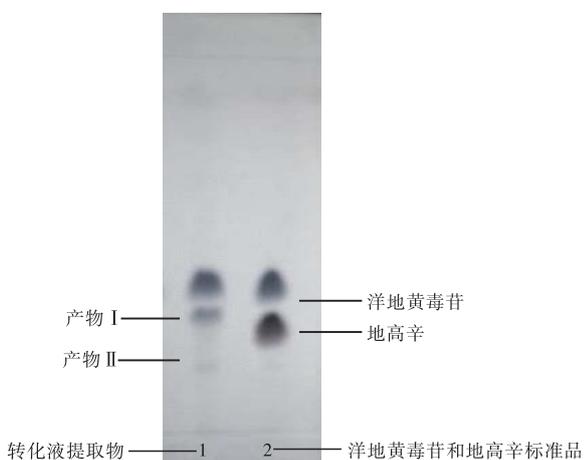


图 1 新月弯孢霉 AS3.3589 对洋地黄毒苷的转化结果  
Fig. 1 Transformation of digitoxin by *Curvularia lunata* AS3.3589

#### 2.1.2 蓝色犁头霉 CICC40302 的转化结果分析

由图 2 可知,蓝色犁头霉 CICC40302 转化洋地黄毒苷得到 1 个转化产物,命名为产物 III,  $R_f$  值为 0.605,转化率为 6%。产物 III 的极性小于洋地黄毒苷和地高辛。

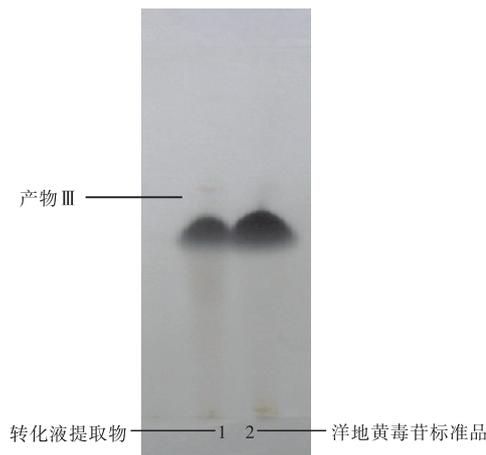


图 2 蓝色犁头霉 CICC40302 对洋地黄毒苷的转化结果  
Fig. 2 Transformation of digitoxin by *Absidia coerulea* CICC40302

#### 2.1.3 雷斯青霉 ATCC10490 的转化结果分析

如图 3 所示,雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷未发生转化反应,没有新斑点产生,即无转化产物。

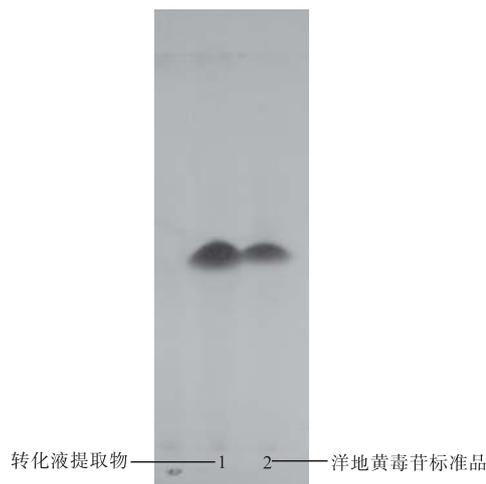


图 3 雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷的转化结果  
Fig. 3 Transformation of digitoxin by *Penicillium raistrickii* ATCC10490

综合分析三种真菌对洋地黄毒苷的转化结果(结果见表 1),新月弯孢霉 AS3.3589 的转化效果较好,得到 2 个转化产物,二者的  $R_f$  值相差较大,便于转化产物的分离纯化。

表 1 三种真菌对洋地黄毒苷的转化结果

Tab. 1 Biotransformation of digitoxin by three epiphyte

菌种	转化率/%		
	产物 I	产物 II	产物 III
新月弯孢霉 AS3.3589	27	5	—
蓝色犁头霉 CICC40302	—	—	6
雷斯青霉 ATCC10490	—	—	—

## 2.2 新月弯孢霉 AS3.3589 对洋地黄毒苷转化反应条件的初步优化

### 2.2.1 底物浓度对新月弯孢霉 AS3.3589 转化反应的影响

洋地黄毒苷对菌体有较大的毒性,投料量高会抑制菌体的生长.从图 4 可知,底物浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 4.0 \times 10^{-4}$  g/L 范围内,随着底物浓度的增加,产物 I 和产物 II 的转化率呈下降的趋势,其中产物 II 在底物浓度 $\geq 2.0 \times 10^{-4}$  g/L 时,转化率趋于 0.综合考虑产物 I 和产物 II 的转化率,选择 $1.7 \times 10^{-4}$  g/L 的底物浓度.

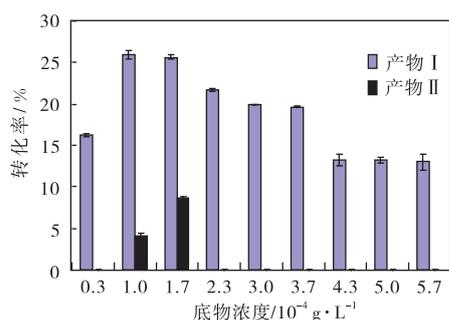


图 4 底物浓度对洋地黄毒苷转化的影响

Fig. 4 Effect of digitoxin concentration on transformation of digitoxin

### 2.2.2 培养基装液量对新月弯孢霉 AS3.3589 转化反应的影响

如图 5 所示,装液量在 30~60 mL 时,产物 I 的转化率均在 33% 以上,产物 II 的转化率均在 5% 以上,转化效果较好;当装液量为 70 mL 时,转化率开始下降.新月弯孢霉 AS3.3589 属于好氧微生物,摇瓶培养氧传递的气液界面是明确的,通过改变摇瓶的装液量,即可改变培养液的比表面积,影响溶氧.供氧不足,菌体代谢会发生异常;供氧过度对菌体细胞有所损伤<sup>[15]</sup>,从而影响转化结果.

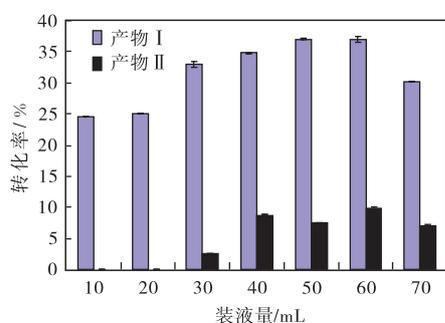


图 5 装液量对转化的影响

Fig. 5 Effect of the volume of culture medium on transformation of digitoxin

### 2.2.3 培养基初始 pH 对新月弯孢霉 AS3.3589 转化反应的影响

如图 6 所示,培养基的初始 pH 在 5.5~6.5 有利于转化反应的进行,当初始 pH 6.0 时,产物 I 的转化率达到最大,为 38%,产物 II 的转化率为 10%.

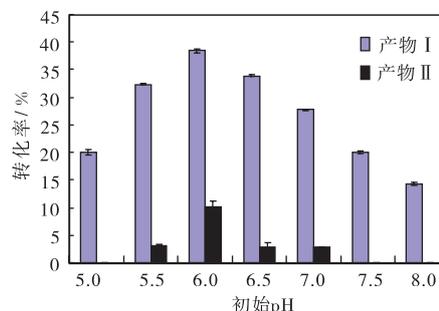


图 6 初始 pH 对转化的影响

Fig. 6 Effect of original pH on transformation of digitoxin

### 2.2.4 转化过程曲线

如图 7 所示,转化时间在 8~56 h 时,底物洋地黄毒苷的含量逐渐减少,产物的生成量明显增多,转化 56 h 时,产物的生成量达最高值,继续延长反应时间,底物的含量继续减少,但产物的含量开始出现下降趋势.分析原因可能有两种:一种是产物不稳定,在发酵过程中降解;另一种是菌体发酵后期,能源物质耗尽,菌体开始利用底物和产物.

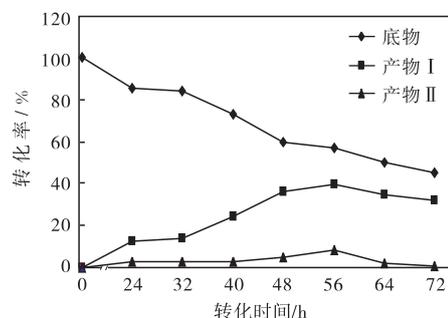


图 7 转化过程曲线

Fig. 7 Curve of the transformation process

## 3 结论

由于洋地黄强心苷类药物具有排泄缓慢、易于蓄积中毒、且治疗量和中毒量非常接近等缺点,而微生物代谢过程中对外界物质的转化能起到降低物质毒性的作用,因此,本课题通过微生物转化方法,选用新月弯孢霉 AS3.3589、蓝色犁头霉 CICC40302 和雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷进行结构修饰,期望得到高效、速效、低毒的强心苷类先导化合物.新月弯孢霉 AS3.3589 转化洋地黄毒苷得到 2 个产物,

即产物 I 和产物 II, 转化率分别为 27% 和 5%; 蓝色犁头霉 CICC40302 转化洋地黄毒苷得到 1 个产物, 即产物 III, 转化率为 6%; 雷斯青霉 ATCC10490 对洋地黄毒苷不发生转化反应. 并初步确定了新月弯孢霉 AS3.3589 转化反应的条件, 菌株在初始 pH 为 6.0, 装液量为 60 mL/250 mL 三角瓶时, 28 °C 下以 180 r/min 振荡培养 24 h, 加入底物溶液, 使转化液中洋地黄毒苷的初始浓度为 0.017%, 经 48 h 转化, 产物 I 的转化率可达 38%, 产物 II 的转化率可达 10%.

#### 参 考 文 献:

- [1] 陈尔昌. 洋地黄的药理及其临床应用 [M]. 吉林: 吉林人民出版社, 1979: 2—3.
- [2] 林心建, 黄自强, 李常春. 洋地黄毒苷体外抗人癌细胞株的作用 [J]. 福建医学院学报, 1996, 30 (1): 17—21.
- [3] 林心建. 洋地黄毒苷抗肿瘤作用及机理研究 [J]. 福建医学院学报, 1993, 27 (4): 378—379.
- [4] 白 强, 冷 静, 陈 方, 等. 洋地黄对雄激素依赖和非依赖性前列腺癌细胞的抑制作用 [J]. 中国男科学杂志, 2004, 18 (2): 37—41.
- [5] Miguel L ó pez-L á zaro. Anti-Tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *Heywoodii* [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 701—704.
- [6] 姚新生. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 317.
- [7] Doller P C, Alfermann A W, Reinhard E. Biotransformation of cardenolides by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* and *Thevetia nerifolia* [J]. *Planta Med*, 1977, 31: 1—6.
- [8] Alfermann A W, Schuller J, Reinhard E. Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of *Digitalis lanata* [J]. *Planta Med*, 1980, 40: 218—223.
- [9] Kreis W, Reinhard E. 12  $\beta$ -hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: production of digoxin in 20-litre air-lift bioreactors [J]. *J Biotechnol*, 1992, 26: 257—273.
- [10] Hu Z B, Alfermann A W. Diterpenoid production in hairy root cultures [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32: 699—703.
- [11] 王 敏, 郭亚文, 卢文玉, 等. 氢化可的松高转化菌株的选育及其发酵条件 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10 (5): 663—666.
- [12] 冯 冰, 马百平, 康利平, 等. 新月弯孢霉对重楼皂苷的生物转化 [J]. 中草药, 2005, 36 (7): 978—983.
- [13] 李秀秀, 温 竹, 肖克胜, 等.  $\beta$ -环糊精对菌株微生物转化菌种生长特性的影响 [J]. 天津科技大学学报, 2006, 21 (3): 1—4.
- [14] 李 骏. *Penicillium raistrickii* 15  $\alpha$  羟基化左旋乙基甾烯双酮工艺研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- [15] 叶 勤. 发酵过程原理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 108—117.

### 《天津科技大学学报》变更刊期的启事

《天津科技大学学报》(ISSN1672-6510, CODEN TQIXES) 是经国家科技部、国家新闻出版署批准, 由天津市教育委员会主管, 天津科技大学主办的公开发行的自然科学学术期刊。本刊一直被中国科学文献计量评价研究中心、中国学术期刊(光盘)编辑委员会作为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 《中国科学引文数据库》来源期刊, 并且是美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、《中国无机分析化学文摘》、《中国生物学文摘》、《电子科技文摘》等多家文摘的期刊源。《中国期刊网》(CNKI)、《万方数据—数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》(VIP) 全文收录, 被国家科技部“中国科技论文统计源期刊”收录评为“中国科技核心期刊”。

为了增加信息量, 缩短论文出版周期, 进一步适应现代化期刊的发展要求, 自 2009 年起本刊由原季刊变更为双月刊, 原有栏目不变, 主要刊登轻工技术与工程、食品工程与生物技术、材料科学与化学工程、机械及自动化、海洋科学与生物工程等学科的理论及应用的研究论文、研究报告。欢迎广大作者踊跃投稿。

本刊编辑部