短刺小克银汉霉对马钱子生物碱盐转化工艺的研究

潘自皓[1]，金 苗[2]，潘 扬[1*]

1. 南京中医药大学药学院，江苏 南京 210046
2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所，江苏 南京 210008

摘 要：目的 为提高短刺小克银汉霉对马钱子中马钱子碱与士的宁的转化率，构建高效的短刺小克银汉霉微生物转化体系。**方法** 根据菌种的生长代谢规律，采用单因素实验法，以马钱子碱硫酸盐和士的宁硝酸盐作为底物，以对底物的转化率作为指标，对可能的影响因素进行了考察。**结果** 获得了优化的转化工艺，即接种量为 4%、发酵时间为 2.5 d、底物质量浓度为 20 mg/L、转化时间为 3 d、培养温度为 28 ℃、培养基初始 pH 值为 6.5、摇床转速为 150 r/min。在此工艺条件下，2 种底物的平均转化率分别达到了 77.75%与 77.10%。**结论** 短刺小克银汉霉对 2 种底物的平均转化率分别提高了约 17%与 22%，此微生物转化体系能够满足马钱子减毒存效研究的需要。

关键词：短刺小克银汉霉；马钱子碱；士的宁；微生物转化；减毒存效

中图分类号：R282.15 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)23 - 3309 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.010

Study of microbial transformation process of *Strychnos nux-vomica* alkaloid salts by *Cunninghamella blakesleeana*

PAN Zi-hao[1], JIN Miao[2], PAN Yang[1]

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China
2. Nanjing Institute of Geography & Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To enhance the transformation rate of brucine and strychnine in *Strychnos nux-vomica* and establish a high efficient microbial transformation system by *Cunninghamella blakesleeana*. **Methods** Based on the growth and metabolic rule of *C. blakesleeana*, through single-factor experiments, by using brucine sulphate and strychnine nitrate as substrates and the transformation rate of each substrate as index, several influential factors were investigated. **Results** The optimal transformation condition was inoculation amount at 4%, fermentation time at 2.5 d, substrate concentration at 20 mg/L, transformation time at 3 d, culture temperature at 28 ℃, initial pH of medium at 6.5, and shaking speed at 150 r/min. Under the above condition, the average transformation rates of brucine sulphate and strychnine nitrate were approximate 77.75% and 77.10%, respectively. **Conclusion** The average transformation rates of brucine sulphate and strychnine nitrate are increased by about 17% and 22%, respectively by *C. blakesleeana*, and this microbial transformation system could meet the need of the study on “toxicity attenuation and efficacy reservation” of *S. nux-vomica*.

Key words: *Cunninghamella blakesleeana* L.; brucine; strychnine; microbial transformation; toxicity attenuation and efficacy reservation

马钱子是马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子，以番木鳖之名始载于《本草纲目》。马钱子是一味中医传统使用的“毒性中药”，《中国药典》2010 年版记载其内服一般需经炮制（如砂烫、油炸），且不宜多服或久服。中医认为其味苦、性寒，有大毒，归肝、脾经，有散结消肿、通络止痛的功效。

马钱子的临床应用已有近千年的历史，近年来又常配伍用于治疗皮肤癌、乳腺癌、脑肿瘤、食管癌、胃癌、子宫颈癌、鼻咽癌等病症，显示出较强

收稿日期：2013-06-18

基金项目：江苏省高校优势学科建设工程资助项目（ysxk-2010）；南京中医药大学青年自然科学基金资助项目（11XZR13）

作者简介：潘自皓（1981—），男，江苏南京人，助理研究员，主要从事中药有效成分（毒性成分）微生物转化的研究。
Tel: (025)86798185 E-mail: Lance814@163.com

***通信作者** 潘 扬 Tel: (025)86798185 E-mail: y.pan2006@163.com

的抗肿瘤活性。研究表明，马钱子生物碱中的马钱子碱（布鲁生，brucine）和士的宁（番木鳖碱，strychnine）既是其主要有效成分，也是其毒性成分，其含量各为 1.0%～1.4%[1]，其他尚有马钱子碱氮氧化物（brucine nitrogen oxides，BNO）、士的宁氮氧化物（strychnine nitrogen oxides，SNO）、伪马钱子碱（pseudobrucine，PB）和伪士的宁（pseudo-strychnine，PS）等。马钱子生物碱类成分抗肿瘤疗效确切，但其中多种成分均能产生较强的细胞毒作用与剧烈的中枢神经毒性[2]，同时，常规的炮制方法与制剂形式并不能产生令人满意的减毒效果，因而限制了其在临床上的应用。

生物转化（biotransformation）又称生物催化（biocatalysis），是指以生物有机体作为催化剂，以天然或合成的化合物为底物，在适宜的条件下进行培养，使得底物结构发生改变的过程，其本质是生物体中的酶（系）对外源性底物的催化反应。目前，用于生物转化研究的生物体主要有细菌、真菌、藻类、动植物的悬浮细胞、组织或器官等[3]。微生物由于具有种类繁多、对环境条件要求低、生长迅速、酶系丰富和酶表达效率高等突出优点，已成为生物转化中最常用的有机体[4]，广泛应用于天然活性化合物的结构修饰、光学活性化合物的拆分、药物先导化合物的合成、手性药物的不对称合成与药物代谢体外预测模型构建等领域[5-7]。

目前，中药毒性成分微生物转化的研究尚处于发展阶段。微生物转化法之所以可用于毒性中药的减毒是因为微生物对环境具有很强的适应性和抗逆性，对环境中的毒性物质具有强大的酶转化能力[8]。与炮制方法相比，微生物转化法不仅可以分解或转化中药毒性成分，提高有效成分的水溶性和浓度，并产生新的活性成分，而且立体、区域、基团选择性强、专一性高[9]，不会破坏中药有效成分，尤其可以对其过程进行控制，从而达到标准化、可重复的科学要求[10]。这对于充分发挥我国中药资源的优势，促进传统中药与现代科学技术的融合，开发具有自主知识产权的新药具有重要的意义[11]。

鉴于马钱子的主要有效成分毒性剧烈而限制其临床应用，采用微生物转化法，对马钱子中的马钱子碱与士的宁进行结构修饰与改造，在保留其抗肿瘤活性的基础上，较大幅度地降低其毒性是非常必要的。本实验室曾以筛选获得的红栓菌［*Trametes cinnabarina* (Jacq.) Fr.］为菌种，采用固态发酵法，对马钱子提取液进行微生物转化，在减毒存效方面取得了一定的进展，发酵产物的毒性显著下降，LD_{50} 较生品提高了约 30%[12]。然而固态发酵法具有培养周期长，工艺较为粗放，容易污染杂菌，过程不易控制，产物分离提取困难等缺点[13]。本实验将工艺成熟、过程易于控制的液态发酵技术应用于马钱子生物碱盐微生物转化工艺的研究中，以马钱子碱硫酸盐和士的宁硝酸盐作为底物，以短刺小克银汉霉 *Cunninghamella blakesleeana* 作为生物催化剂，以底物的转化率作为指标，对马钱子生物碱盐的微生物转化工艺进行考察，以期能够构建高效的微生物转化体系，提高短刺小克银汉霉对 2 种马钱子生物碱的转化率，从而满足马钱子减毒存效研究的需要。

1 仪器与材料

BCD—192KJ 冰箱（青岛海尔股份有限公司），MHP—100 霉菌培养箱（上海三发科学仪器有限公司），VS—1300L—U 洁净工作台（苏州安泰空气技术有限公司），JA1103N 电子天平（上海民桥精密科学仪器有限公司），PHS—3C pH 计（上海今迈仪器仪表有限公司），LDZX—50KB 立式高压蒸气灭菌器（上海申安医疗器械厂），TGL—10B 台式离心机（无锡瑞江分析仪器有限公司），THZ—C—L 台式冷冻恒温摇床（太仓强乐实验设备有限公司），HH2 数显恒温水浴锅（金坛市荣华仪器制造有限公司），752 紫外可见光分光光度计（上海舜宇恒平科学仪器有限公司），FA25 高速匀浆机（上海弗鲁克流体机械制造有限公司），1200 series 高效液相色谱仪（Agilent 公司）。

雅致小克银汉霉 *Cunninghamella elegans*（编号 3.1659）、短刺小克银汉霉 *Cunninghamella blakesleeana*（编号 3.0970）与刺孢小克银汉霉 *Cunninghamella echinulata*（编号 3.1969）均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心（CGMCC）。

马铃薯（市售），葡萄糖（分析纯）、牛肉膏（生化试剂）、3, 5-二硝基水杨酸（化学纯）、酒石酸钾钠（分析纯）、甲醇（分析纯）均为国药集团化学试剂有限公司产品，磷酸氢二钾（分析纯）、硫酸镁（分析纯）、氯化钠（分析纯）、盐酸（分析纯）、氨水（分析纯）、苯酚（分析纯）均购自南京化学试剂有限公司，蛋白胨（生化试剂，上海博微生物科技有限公司），马钱子碱硫酸盐（分析纯）、士的宁硝酸盐（分析纯）均购自 Johnson Matthey 公司，氯仿（分析纯，江苏永华精细化学品有限公司），磷酸二氢钾（分析

纯，上海凌峰化学试剂有限公司），十二烷基硫酸钠（分析纯，上海久億化学试剂有限公司），乙腈（色谱纯，Merck 公司）。

2 方法与结果

2.1 培养基制备

2.1.1 活化培养基 PDA 培养基，自然 pH；分装 18 cm 试管，每管 15 mL 培养基，硅胶塞密封；121 ℃，高压蒸气灭菌 20 min；将试管 15°倾斜放置于洁净工作台上，室温条件下冷却凝固。

2.1.2 发酵培养基 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、牛肉膏 5 g/L、K_2HPO_4 5 g/L、NaCl 0.5 g/L、$MgSO_4$ 0.5 g/L，pH 6.0；分装 250 mL 三角摇瓶，每瓶 100 mL 培养基，纱布与牛皮纸包扎；121 ℃，高压蒸气灭菌 20 min。

2.1.3 补料培养基 碳源培养基（Fed-C）：100 g/L 葡萄糖溶液，pH 6.0，10 mL。氮源培养基（Fed-N）：25 g/L 蛋白胨与 25 g/L 牛肉膏溶液，pH 6.0，10 mL。碳氮源培养基（Fed-CN）：100 g/L 葡萄糖、25 g/L 蛋白胨与 25 g/L 牛肉膏溶液，pH 6.0，10 mL。

2.2 发酵与转化方法[14-17]

2.2.1 菌种保藏方法 将斜面菌种置于冰箱中，4 ℃保藏。

2.2.2 菌种活化方法 将斜面菌种置于霉菌培养箱中，28 ℃，活化培养 1 d。

2.2.3 发酵与转化方法 用无菌水清洗经过活化培养的菌种斜面，振摇，制备得菌悬液；将菌悬液充分摇匀，并按 2%接种量，接种 100 mL 发酵培养基于 250 mL 三角摇瓶中，将摇瓶置于摇床中，28 ℃，150 r/min，发酵培养 3 d。

精密称取一定量的马钱子碱硫酸盐与士的宁硝酸盐；将其溶于水，配制成 5 mg/L 底物混合液；将底物混合液用 0.22 μm 无菌微孔滤膜滤过除菌；向每瓶发酵液中加入 0.4 mL 底物混合液；将摇瓶重新置于恒温振荡器中，28 ℃、150 r/min，转化 5 d。

每批次发酵与转化过程都将设置 2 组空白对照，第 1 组（空白 1）是在接种发酵培养基后进行发酵培养，但不在发酵液中添加底物混合液；第 2 组（空白 2）是不接种发酵培养基，但在发酵培养基中添加底物混合液。

2.3 转化产物分离提取方法

转化结束后，将含有菌丝体的转化液用匀浆机匀浆；将匀浆液用 20%氨水调 pH 9～10；氯仿萃取 3 次，每次加氯仿 40 mL，颠倒混匀，萃取 0.5 h；合并萃取液，90 ℃水浴蒸干，残渣用 10 mL 甲醇溶解；将甲醇溶液加入到 10 mL 量瓶中，并用甲醇定容；用 1 mL 注射器取 1 mL 甲醇溶液，0.45 μm 微孔滤膜滤过，注入 2 mL 进样瓶，备用。

2.4 检测方法

2.4.1 湿菌体质量浓度测定方法 称量经干燥的 50 mL 空离心管；将每瓶发酵液加入到 1 对 50 mL 离心管中；将各对离心管在天平上配平，保证两者质量相等；将各对离心管对位放置在台式离心机内，8 000 r/min，离心 15 min；收集上清液以备 pH 值与残留葡萄糖质量浓度测定；称量去除上清液的离心管质量，减去空管质量，再除以发酵液体积，即得湿菌体质量浓度。

2.4.2 pH 值测定方法 将 pH 计用标准液校正；取发酵上清液（转化上清液），用 pH 计测定 pH 值。

2.4.3 残留葡萄糖质量浓度测定方法 用微量移液器取 50 μL 发酵上清液（转化上清液），加入到 25 mL 具塞刻度试管中，其中 1 支试管不加上清液，而加入 50 μL 蒸馏水，作为空白；用移液器依次取 1.95 mL 蒸馏水与 1.5 mL 3, 5-二硝基水杨酸（DNS）试剂，分别先后加入到各试管中；将各试管共置于沸水浴中反应 5 min，迅速用流水冷却，分别用蒸馏水定容至 20 mL，摇匀；空白调零，用紫外分光光度计于 510 nm 处测定各样品的吸光度（A）值；计算得残留葡萄糖质量浓度。

$$\text{残留葡萄糖质量浓度} = (A + 0.047\,9) \times 20 / 1.009\,6$$

2.4.4 转化产物浓度及转化率的测定方法 采用文献报道的反相离子对高效液相色谱法进行测定[18]。

分别测定每批次各样品与空白 2 中的马钱子碱硫酸盐与士的宁硝酸盐质量浓度，计算转化率。

$$\text{转化率} = (C_{\text{空白}2} - C_{\text{样品}}) / C_{\text{空白}2}$$

2.5 微生物转化工艺的优化

2.5.1 不同种小克银汉霉对生物转化的影响 本实验在基础的发酵与转化条件下，考察了在微生物转化中常用的 3 种小克银汉霉（即短刺小克银汉霉、雅致小克银汉霉与刺孢小克银汉霉）对 2 种马钱子生物碱盐生物转化的影响。结果表明，3 种小克银汉霉对马钱子碱硫酸盐和士的宁硝酸盐的转化率分别为 60.51%、55.97%，56.52%、53.08%，54.36%、52.63%。可见，3 种小克银汉霉对 2 种马钱子生物碱盐均具有良好的转化作用，转化率均超过了 50%。其中，短刺小克银汉霉的转化率最高，分别达到 60.51%、55.97%，故将其作为进一步研究的

转化菌种。

2.5.2 短刺小克银汉霉生长代谢规律的研究 为了解短刺小克银汉霉的生长代谢规律，从而为马钱子生物碱盐转化工艺的优化提供依据，本实验在基础发酵的条件下，通过在不同的发酵培养时间取样，并分别测定各样品的湿菌体质量浓度（g/L）、pH 值与残留葡萄糖质量浓度（g/L），对短刺小克银汉霉的生长曲线进行了考察，结果见图 1。可见，在发酵开始后，短刺小克银汉霉经过短暂的延滞期（0～0.5 d）就适应了培养环境，迅速进入了对数生长期（0.5～4.5 d），以较快的生长速率［约 40 g/(L·d)］繁殖。同时，随着葡萄糖被菌体快速的利用，发酵液中的葡萄糖质量浓度迅速降低，并生成了大量的有机酸。发酵液 pH 值由初始的 6.0 快速降低至 4.0 左右，并稳定维持在 pH 4.0 附近；此后，随着培养基中葡萄糖等基质逐渐被菌体耗尽，发酵液中的氨基氮的量增加，菌体生长进入了稳定期（4.5～7 d），菌体质量浓度不再增加，发酵液 pH 值相应的从 4.5 d 起开始上升，至 7 d 已超过 6.0。

2.5.3 接种量对生物转化的影响 在基础的发酵与转化条件下，按 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0% 的接种量将菌悬液接入相同的发酵培养基，考察不同接种量对生物转化的影响。由表 1 可知，接种量为 0.5%时菌体对 2 种马钱子生物碱盐的转化率均最低，随着接种量的增加，转化率逐渐提高，至接种量 4.0%时达到最大值，底物得以充分转化；继续增加接种量至 8.0%，转化率显著降低，这可能是由于随着接种量的增加，菌体生长加快，菌体对营养物质与供氧的需求增大，经过一段时间的培养，培养基中有限的营养物质与溶解氧并不能满足菌种生长的需要，从而抑制了菌体对底物的转化能力。

2.5.4 发酵时间对生物转化的影响 由图 1 可知，发酵培养 2.5～4.5 d 是短刺小克银汉霉对数生长的中后期。在此阶段，不仅菌体生长速率高，细胞内的各种酶活力旺盛，能够高效地转化底物，而且菌体浓度已经积累到一定的水平，在添加底物后，能够耐受这 2 种底物较强的细胞毒性。在此基础上，为进一步确定最优的发酵时间，本实验在基础的转化条件下，考察了发酵培养 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 d 对生物转化的影响，结果见表 2。可知，不同的发酵时间对转化结果影响不大。其中，发酵培养 2.5 d 和 4 d 对 2 种底物的转化率均较高；同时考虑到提高单位时间的转化率，应缩短发酵周期，故选择 2.5

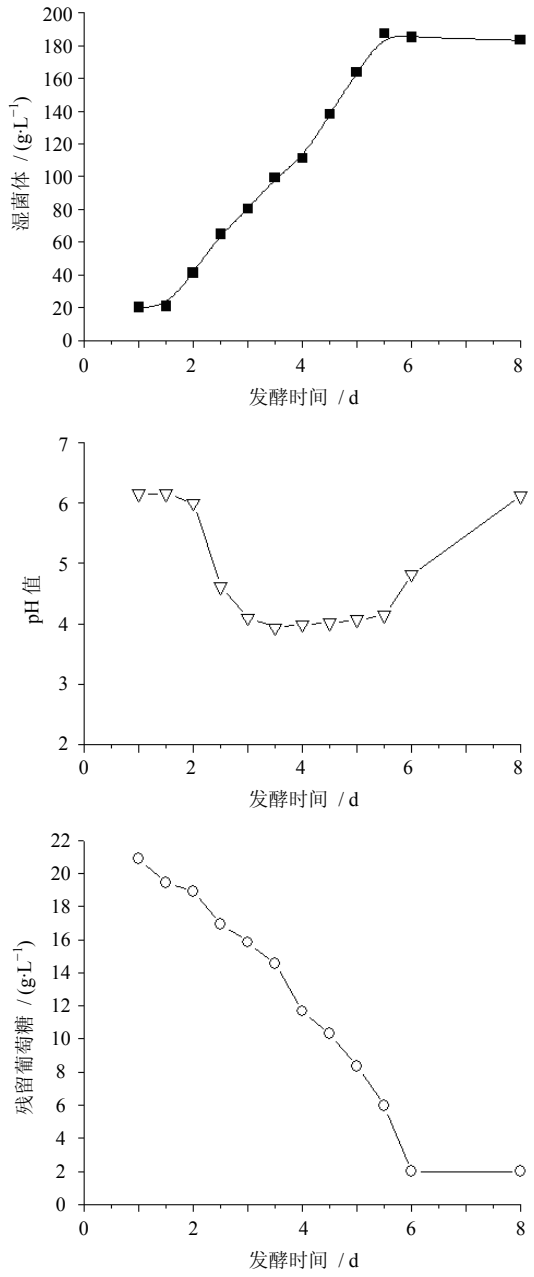

图 1 短刺小克银汉霉的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *C. blakesleeana*

表 1 接种量对生物转化的影响

Table 1 Effect of inoculation amount on microbial transformation

接种量 /%	转化率 /%	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
0.5	50.97	49.10
1.0	58.59	56.75
2.0	60.72	59.38
4.0	65.87	64.16
8.0	53.86	52.45

表 2 发酵时间对生物转化的影响

Table 2 Effect of fermentation time on microbial transformation

发酵时间 / d	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
2.5	62.24	62.17
3.0	60.08	59.70
3.5	60.06	59.30
4.0	62.49	61.15
4.5	60.51	60.58

d 作为发酵培养时间。

2.5.5 底物质量浓度对生物转化的影响 为提高短刺小克银汉霉生物转化的效率，本实验在基础的发酵与转化条件下，分别向发酵液中添加 0.4、0.8、1.2、1.6 mL 底物混合液，考察了底物质量浓度对生物转化的影响，结果见表 3。可见，增加 2 种底物的质量浓度，虽然转化的绝对量有所提高，但转化率持续降低。这说明现有体系的转化能力有限，在 2 种底物质量浓度为 20 mg/L 时已达到饱和，继续提高具有细胞毒性底物的浓度，并不利于生物转化的进行。

表 3 底物质量浓度对生物转化的影响

Table 3 Effect of substrate concentration on microbial transformation

底物质量浓度 / ($mg \cdot L^{-1}$)	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
20	61.27	61.03
40	52.96	49.93
60	43.29	40.69
80	32.59	36.09

2.5.6 转化时间对生物转化和转化液 pH 值的影响 本实验在基础的发酵条件下，考察了转化 1、2、3、4、5、6、7 d 对 2 种马钱子生物碱盐转化和转化液 pH 的影响，结果见表 4。可知，当转化 3 d 时，短刺小克银汉霉对 2 种底物的转化率均最高，相比基础的转化条件（即转化 5 d）分别提高了约 15%和 17%。同时，在发酵 3 d 后，转化 1～7 d，转化液 pH 值由 4.2 逐渐上升至 pH 7.0～7.5，呈现出与菌种生长代谢曲线相似的 pH 值变化规律，这说明在转化时，虽然在发酵液中添加了具有细胞毒性的底物，但菌体的生长代谢可能未受到显著影响，菌体仍然在生长繁殖，消耗营养基质，从而使 pH 值发生变化。综合上述结果，3 d 转化率最高的原因一方面可能是转化时间已充分满足底物转化的需要，另一方面可能是在此 pH 值条件下，酶的催化活性最高，最有利于底物的转化，故选择 3 d 作为转化时间。

表 4 转化时间对生物转化和转化液 pH 值的影响

Table 4 Effect of transformation time on microbial transformation and pH value of solution

转化时间 / d	转化率 / %		pH 值
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐	
1	20.95	21.30	4.27
2	50.39	47.25	4.43
3	75.31	73.71	4.58
4	71.94	69.96	6.12
5	60.95	56.39	7.11
6	60.27	56.81	7.19
7	57.61	56.11	7.42

2.5.7 温度对生物转化的影响 温度是影响微生物生命活动的重要因素，对于微生物生长代谢过程中的各种生化反应都具有显著影响。研究表明，短刺小克银汉霉适宜的生长代谢温度为 25～32 ℃，本实验在此范围内，在基础的发酵与转化条件下，研究不同的培养温度对生物转化的影响。由表 5 可知，当培养温度为 28 ℃时，小克银汉霉对 2 种底物的转化率均最高，这与文献报道一致[12-15]，故选择 28 ℃为发酵与转化过程中的培养温度。

表 5 温度对生物转化的影响

Table 5 Effect of temperature on microbial transformation

培养温度 / ℃	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
25	53.87	52.49
28	62.79	62.08
30	58.23	60.75
32	55.57	54.23

2.5.8 培养基初始 pH 值对生物转化的影响 pH 值的变化会引起微生物细胞通透性与各种酶活力的改变，并影响菌体对营养基质的利用速率，从而影响菌体的生长和代谢产物的合成。如果培养基初始 pH 值适宜，不仅可以在小克银汉霉的发酵阶段给予其良好的培养环境，有利于菌种的迅速增殖；而且能够在小克银汉霉的转化阶段提供适合的 pH 值，从而有利于酶对底物的转化。本实验考察了初始 pH

值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 对生物转化的影响，结果见表 6。可见，当培养基初始 pH 值为 5.0～7.0 时，小克银汉霉对 2 种底物的转化率变化不大，直至初始 pH 值增加至 7.5，转化率显著降低至 50%左右。结果说明，小克银汉霉对培养基的初始 pH 值具有较好的适应能力，能够通过自身的生长代谢进行调节，选择对 2 种底物转化率均最高的 pH 6.5 作为培养基的初始 pH 值。

表 6 培养基初始 pH 值对生物转化的影响

Table 6 Effect of initial pH value on microbial transformation

培养基初始 pH 值	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
5.0	60.16	58.57
5.5	58.17	57.12
6.0	61.05	59.18
6.5	63.45	60.73
7.0	60.87	58.36
7.5	50.87	52.23

2.5.9 摇床转速对生物转化的影响 与培养温度和 pH 一样，溶解氧浓度也是影响绝大多数微生物生长代谢的重要因素。在摇瓶培养条件下，摇床转速是决定氧溶解与传递水平的关键，本实验选择转速分别为 120、150、180、200、220 r/min，考察了不同的摇床转速对小克银汉霉生物转化的影响。由表 7 可见，当摇床转速从 120 r/min 增加至 150 r/min 时，菌体对底物的转化率提高；此后，随着转速的继续增加，转化率变化不大。其中，当转速为 150 r/min 和 200 r/min 时，对 2 种底物的转化率均较高；同时考虑到当转速达到 200 r/min 及其以上时，摇瓶中的菌丝体经过一段时间的培养，出现了明显的挂壁现象，这不利于菌体生长与对底物的转化，故选择 150 r/min 作为优化的摇床转速。

2.5.10 补加不同的营养物对生物转化的影响 在分批培养的过程中，根据菌体的生长代谢规律，以间歇、指数或连续的方式补加营养物质是改善营养供应，促进菌体生长与代谢产物积累，以及稀释有害代谢副产物的有效途径。由“2.5.2”和“2.5.6”项结果可知，在发酵与转化过程中，培养液中的营养物质将逐步消耗殆尽，这不仅使得菌体质量浓度不再增加，而且将导致环境中的氨基氮逐渐积累，pH 值逐步上升，从而对菌体的转化活性产生不利影响。鉴于此，本实验在基础的发酵与转化条件下，通过在添加底物的同时，分别向发酵液中加入 3 种补料培养基（即碳源培养基、氮源培养基和碳氮源培养基，其组成与质量浓度如“2.1.3”项所述）与等体积无菌水（作为空白对照），考察了补加不同的营养物质对生物转化的影响，结果见表 8。可见，在添加底物的同时，一次性补加不同的营养物质对生物转化基本无影响，这可能与补料策略不符合菌种的生长代谢规律有关。

表 7 摇床转速对生物转化的影响

Table 7 Effect of shaking speed on microbial transformation

摇床转速 / ($r \cdot min^{-1}$)	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
120	56.15	54.28
150	62.87	61.60
180	61.87	59.40
200	63.97	60.34
220	60.45	58.30

表 8 补加不同的营养物质对生物转化的影响

Table 8 Effect of feeding different nutrients on microbial transformation

补加营养物的种类	转化率 / %	
	马钱子碱硫酸盐	士的宁硝酸盐
碳源	62.53	58.48
氮源	60.51	55.96
碳氮源	61.58	57.28
空白对照	60.58	56.49

2.6 优化工艺的验证试验

根据上述优化实验的结果，选取各实验确定的最优条件，即接种量为 4 %、发酵时间为 2.5 d、底物浓度为 20 mg/L、转化时间为 3 d、培养温度为 28 ℃、培养基初始 pH 为 6.5、摇床转速为 150 r/min，进行优化工艺的验证试验，重复 3 次，马钱子碱硫酸盐和士的宁硝酸盐转化率分别为 77.81%、75.43%，76.10%、77.26%，79.35%、78.60%。结果表明经过转化工艺的优化，短刺小克银汉霉对 2 种底物的转化率获得了较为显著的提高，而且稳定性较好。

3 讨论

本实验以提高短刺小克银汉霉对马钱子中 2 种毒性主效成分——马钱子碱与士的宁的转化率，构

建高效的微生物转化体系为目标，以 2 种马钱子生物碱的盐（马钱子碱硫酸盐和士的宁硝酸盐）作为底物，对可能的影响因素进行了考察，获得了优化的转化工艺。在此工艺条件下，经过 3 次实验验证，短刺小克银汉霉对 2 种底物的平均转化率分别提高了约 17%与 22%。

实验结果还表明底物浓度与转化时间是影响生物转化的关键因素，其中底物质量浓度由基础条件的 20 mg/L 增加到 40 mg/L，短刺小克银汉霉对 2 种底物的转化率均下降了约 10%，并随着底物质量浓度的继续增加而进一步降低，这不仅说明转化体系的转化能力有限，而且反映出底物的细胞毒性可能会对转化反应产生抑制作用；而转化时间的影响更为显著，当转化时间为 3 d 时，2 种底物的转化率相比基础条件的 5 d 分别提高了约 15%和 17%，原因一方面可能是转化 3 d 已充分满足底物转化的需要，另一方面是在此条件下，酶的催化活性最高，最有利于转化的进行。

同时，接种量、培养温度、初始 pH 值与摇床转速对底物转化率都有一定程度的影响，而发酵时间与补加营养物质对转化结果几乎无影响，前者可能与考察的发酵时间都处于菌种生长代谢最旺盛的对数生长中后期有关；后者应该是补料策略不符合菌种的生长代谢规律所导致的，这有待在微生物反应器中，针对补加营养物质的组成与质量浓度、补加时间与补加方式开展进一步的优化研究。

参考文献

[1] 杨秀伟, 冉福香, 吴 军, 等. 马钱子生物碱成分的体外抗肿瘤活性筛选 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(9): 11-13.

[2] 马旭乾, 蔡宝昌, 吕晓宇, 等. 马钱子碱及其脂质体对移植性荷瘤小鼠抗肿瘤作用的比较 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 389-393.

[3] 马骁驰, 果德安. 中药活性成分生物转化的研究思路与方法 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 163-168.

[4] Urlacher V, Schmid R D. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6): 557-564.

[5] Ma B, Huang H H, Chen X Y. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(7): 1067-1074.

[6] Ma X C, Zheng J, Guo D A. Highly selective isomerization and dehydrogenation of three major bufadienolides at 3-OH by *Fusarium solani* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(3): 1585-1591.

[7] 阮晓东, 张惠文, 蔡颖慧, 等. 微生物在中药生物转化中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 149-152.

[8] 涂 霞, 潘 扬. 双向发酵——毒性中药炮制减毒的新途径 [J]. 菌物研究, 2010, 8(1): 52-56.

[9] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al*. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.

[10] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 267-268.

[11] 杨亚红, 吴少华, 王兴红, 等. 开展中药生物转化研究意义深远 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1321-1324.

[12] 刘亮镜, 曹 亮, 蒋亚平, 等. 马钱子经朱红栓菌发酵前后毒性及镇痛、抗炎作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2009, 25(3): 205-208.

[13] 陈 坚, 堵国成, 刘 龙, 等. 发酵工程实验技术 [M]. 第 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2013.

[14] Feng Y, Li M, Liu J, *et al*. A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalysed by *Cunninghamella blakesleeana* [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 73-79.

[15] Yang X B, Hou J, Liu D, *et al*. Biotransformation of isoimperatorin by *Cunninghamella blakesleana* AS 3. 970 [J]. *J Mol Catal B*: *Enzymatic*, 2013, 88(1): 1-6.

[16] Prasad G S, Rao K N, Preethi R, *et al*. Biotransformation of meloxicam by *Cunninghamella blakesleeana* significance of carbon and nitrogen source [J]. *Indian J Microbiol*, 2011, 51(1): 82-87.

[17] Amadio J, Murphy C D. Production of human metabolites of the anti-cancer drug flutamide via biotransformation in *Cunninghamella* species [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 321-326.

[18] 刘学湘, 潘 扬, 王 丽, 等. 反相离子对 HPLC 同时测定制马钱子中 4 种生物碱的含量 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(9): 698-702.