

脱氧胆酸钠对麦角菌 *Claviceps purpurea* 94002 (EKP_N94002)产生 α -麦角隐亭的刺激作用

朱 平 何惠霞 陈世智

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

麦角菌属(*Claviceps*)真菌可以产生一系列的麦角生物碱。有些生物碱及其半合成的衍生物已经应用于临床,如 α -麦角隐亭的衍生物,2-溴- α -麦角隐亭(或溴隐亭)广泛应用于治疗神经内分泌系统的疾病^[1~8]。 α -麦角隐亭主要由麦角菌 *Claviceps purpurea* 产生。在菌种选育工作中,我们偶然发现脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SDC)能够有效地提高 EKP_N94002 菌株的 α -麦角隐亭生产水平。本文报道脱氧胆酸钠对麦角菌 *Claviceps purpurea* 94002(EKP_N94002)在液体发酵中 α -麦角隐亭产生的刺激作用。初步实验结果表明脱氧胆酸钠作为一种刺激物在适当浓度范围内能够显著提高该生物碱的细胞外水平及其总水平。当种子和发酵培养基中脱氧胆酸钠含量均为 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, α -麦角隐亭水平的提高幅度最为明显。并对脱氧胆酸钠的可能作用机制进行了讨论。

材 料 和 方 法

菌种 麦角菌 *Claviceps purpurea* 94002 (EKP_N94002)。该菌株系由亚硝基胍(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, NTG)诱变处理亲本菌株的原生质体以后筛选到的一个优良菌株。亲本菌株是经过多次原生质体诱变(紫外线、 γ -射线(Co^{60})辐射等)选育获得^[9]。该菌株主要产生麦角胺和麦角毒碱类次生代谢物(如 α -麦角隐亭)。

培养基 斜面培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):蔗糖,150;柠檬酸,30;酵母膏,0.1; KH_2PO_4 ,0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5; KCl ,0.125; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.0035; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.003;琼脂,18;pH 5.0~5.4。种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):蔗糖,100;草酸铵,3;棉籽粉,10; KH_2PO_4 ,0.25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.25; KCl ,0.12; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.0166; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.0068;pH 6.2。培养基 T25^[10]用作液体发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):蔗糖,300;柠檬酸,15;酵母膏,0.1; KH_2PO_4 ,0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5; KCl ,0.12; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.007; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.006;pH 5.2(NH_4OH 调)。发酵培养条件参考文献[9]。

仪器和试剂 高效液相色谱仪为日本岛津公司生产,LC-6A 高压泵,SPD-6A 紫外检测器,C-R3A 型记录仪;质谱仪为 ZAB-ZF 型,EI 源 70 eV;核磁共振仪为 Bruker AM-500 型, CDCl_3 作溶剂,TMS 为内标。标准品 α -麦角隐亭为 Sigma 公司产品。甲醇为优级纯,其它试剂均为分析纯(北京化工厂产品)。

结 果

1 α -麦角隐亭含量测定

滤除发酵培养液中的菌丝,取上清液。另取未过滤的发酵培养液进行匀浆。上清液及匀浆后的发酵培养液均用 NH_4OH 碱化,然后分别用相同体积的 CH_2Cl_2 提取 1 次, CH_2Cl_2 提取液中的麦角碱含量用高效液相色谱法(HPLC)测定(外标法)(图 1)。上清液中麦角隐亭含量表示细胞外的分泌水平,匀浆后的发

醇培养液中麦角隐亭含量表示麦角隐亭总生产水平。色谱条件: 色谱柱, 25 cm × 4.6mm ID, YWG-C₁₈(10 μm); 流动相, 甲醇—水—乙酸乙酯(75:25:1), 流速 1.0 ml·min⁻¹; 检测波长 312 nm, 检测灵敏度(Abs), 0.08 吸收单位; 目标化合物分离纯化后用质谱和核磁共振(¹H-NMR, 500 MHz)等方法进行确证。

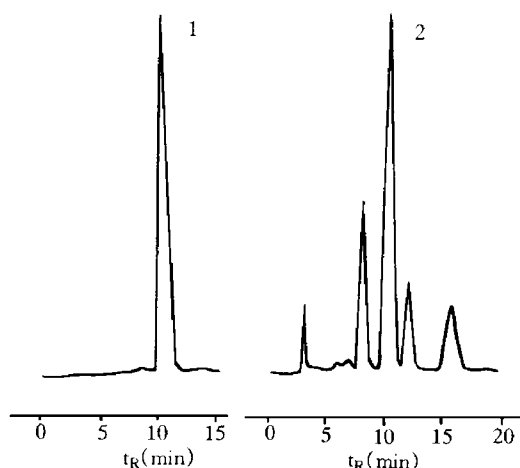


Fig 1 HPLC analysis of α-ergocryptine in the non-filtered culture broth. NTG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)-mutated strain *Claviceps purpurea* 94002 was grown in the media containing 6.0 mg·L⁻¹ of sodium deoxycholate (SDC) and the alkaloid was detected by HPLC as described in materials and methods. 1. Standard; 2. Sample.

样品纯化后经核磁共振(¹H-NMR, 500 MHz)(表 1)和质谱等分析, 并与标准品作比较, 证明确系 α-麦角隐亭。EI-MS m/z(%): 575(6.7, M⁺), 365(52), 322(28.7), 308(4.6), 268(71.4), 267(100, 基峰), 250(60.7), 238(32.0), 225(27.2), 154(10.0)。

Tab 1 ¹H-NMR data of isolated α-ergocryptine

H	δ(ppm)	H	δ(ppm)
18-NH*	9.7(s)		3.9~3.5(m)
1-NH*	8.03(s)	8,9'	3.4~3.2(m)
12'-OH*	7.45(s)	7,9'	3.0~2.8(m)
12~14	7.3~7.1(m)	6-NCH ₃	2.65(s)
2	6.95(s)		2.2~1.7(m)
9	6.38(m)	14',15',18',19'-CH ₃	1.4~0.8(m)
5'	4.51(m)		

* Exchangeable.

2 SDC 对 α-麦角隐亭产率的影响

在 α-麦角隐亭发酵试验中, 向培养基中添加不同剂量的 SDC, 观察 α-麦角隐亭产率的变化。实验表明, SDC 作为一种刺激物在适当浓度范围内, 能够非常显著地增加细胞外 α-麦角隐亭水平, 提高该生物碱总的生产水平。当种子和发酵培养基中 SDC 浓度均为 6.0 mg·L⁻¹ 时, 效果最佳, α-麦角隐亭的细胞外水平和总水平分别为对照组的 6 倍和 1.7 倍。SDC 对细胞内该生物碱水平(*T-E*)的影响却不太显著(表 2)。

此外, 我们也初步观察了 SDC(浓度: 6.0 mg·L⁻¹)对其它麦角菌株在液体发酵条件下 α-麦角隐亭分泌水平(细胞外水平)的影响, SDC 虽能增加这些菌株麦角隐亭的细胞外水平, 但增加幅度均低于 EKP_N94002 菌株(图 2)。

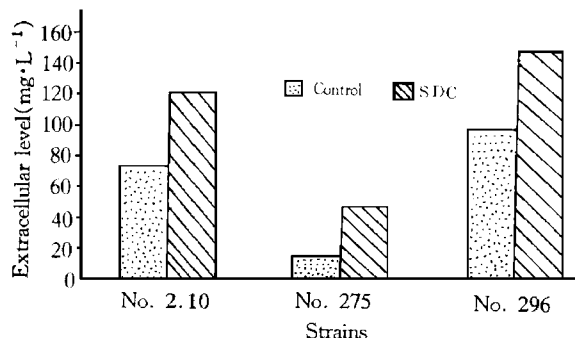


Fig 2 Influence of sodium deoxycholate (SDC) on the secretion of α-ergocryptine in other *Claviceps purpurea* strains.

SDC 通常不作为培养基的营养成分, 仅用来限制真菌菌落的扩大以形成小菌落^[11,12]。在麦角菌 *C. purpurea* 菌种选育工作中, 我们偶然观察到当固体培养基中含有 SDC 时, 菌落能较快产生紫色色素, 并出现较强的荧光, 通常麦角菌菌落所产生的紫色色素以及荧光之强弱均与该菌株的产碱能力有相关性。上述现象促使我们进一步探讨其对 α-麦角隐亭产生的影响, 根据表 2 的数据我们推测, SDC 对该生物碱的产生有正向刺激作用, 这种效应主要是通过增加该生物碱的细胞外水平来体现。但 SDC

Tab 2 Effect of sodium deoxycholate (SDC) on α -ergocryptine productivity in the NTG-mutated *Claviceps purpurea* 94002 (EKP_N94002) (the alkaloid mg·L⁻¹)

Dosages of SDC (mg·L ⁻¹)		Extracellular level (E)	Total level (T)	T-E
SC	FC	($\bar{x} \pm s$)	($\bar{x} \pm s$)	
0.0 (control)	0.0 (control)	84.1 ± 21.7 (n = 3) P < 0.005*	524.80 ± 73.0 (n = 2) P < 0.005**	440.7
6.0	0.0	83.2 ± 24.2 (n = 3) P < 0.005*	753.3 ± 23.6 (n = 3) P < 0.01**	670.1
6.0	6.0	502.4 ± 79.4 (n = 3) (A)	908.5 ± 53.9 (n = 3) (B)	406.1
6.0	12.0	437.3 ± 87.7 (n = 3) P < 0.05*	832.0 ± 83.5 (n = 3) P < 0.05**	394.7
6.0	18.0	84.4 ± 13.7 (n = 3) P < 0.005*	ND	

Note: α -ergocryptine was determined by HPLC method as described in materials and methods. NTG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; SC: seed culture; FC: fermentation culture; T-E: intracellular level; ND: not determined. * t test, compared with (A); ** t test, compared with (B).

浓度过高,可能抑制菌丝生长,反而会降低这一刺激作用。

讨 论

SDC 对于微生物次生代谢的影响至今未见报道,尽管这类胆酸盐对于哺乳动物有某些刺激功能,但是如何刺激 α -麦角隐亭的产生,目前尚不清楚。我们推测 SDC 可能改变细胞膜的功能使其有利于产物的运输,从而提高该生物碱的分泌能力,或直接作用于 α -麦角隐亭生物合成的调节系统。此外,SDC 的这种作用似乎存在菌株间的差异,所以,NTG 的诱发突变可能对后来的 SDC 刺激作用产生影响。SDC 的上述效应是否有普遍意义,以及其作用机制均有待进一步阐明。这一信息对于麦角碱(尤其是 α -麦角隐亭)的工业化生产提供了帮助。

致谢 本文得到李焕娄教授的指教。

关键词 脱氧胆酸钠;刺激作用; α -麦角隐亭;麦角菌

参 考 文 献

- Obeid LJ, Carballar G, Espinosa de los Monteros A, *et al.* Therapeutic efficacy of vaginal administration of bromocriptin in patients with hyperprolactinemia. *Ginecol Obstet Mex*, 1993, **61**:254
- Stankovski M, Palcevski G, Stojanovic V, *et al.* Hyperprolactinemia and hypophyseal tumors — results of treatment with bromocriptine. *Jugosl Ginekol Opstet*, 1984, **24**:1
- Floersheim-Shachar Y, Keller PJ. Treatment of hyperprolactinemia-ovulation syndrome. *Fertil Steril*, 1977, **28**:1158
- Spark RF, Dickstein G, Pallotta J. Complete remission of acromegaly with

- medical treatment. *J Am Med Assoc*, 1979, **241**:573
- 5 Mornex R, Orgiazzi J, Hugues B, *et al.* Normal pregnancies after treatment of hyperprolactinemia with bromoergocryptine, despite suspected pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1978, **47**:290
 - 6 Steinbeck K, Turtle JR. Treatment of acromegaly with bromocryptine. *Aust N Z J Med*, 1979, **9**:217
 - 7 Summers VK, Hipkin LJ, Diver MH, *et al.* Treatment of acromegaly with bromocryptine. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975, **40**:904
 - 8 Vardi J, Flechter S, Oberman Z, *et al.* Effect of bromocriptine on secretion of the enzyme dopamine-B-hydroxylase (DBH) in patients with Parkinson's disease. *Riv Neurol*, 1979, **49**:291
 - 9 何惠霞, 朱平, 李焕姿. α -麦角隐亭产生菌原生质体诱变育种. *真菌学报*, 1996, **15**:215
 - 10 Spalla CM. Genetic aspects of the formation of ergot alkaloids. In: Hutter R, Leisinger T, Nuesch J, *et al.* *Antibiotics and Other Secondary Metabolites Biosynthesis and Production*. New York: Academic Press, 1978:219
 - 11 Kobel H, Sanglier JJ. Ergot alkaloids. In: Pape H, Rehm HJ. *Biotechnology*. Vol 4. Weinbein: VCH, 1986:569
 - 12 朱平, 何惠霞, 岳德超. 麦角菌和雀稗麦角菌原生质体形成与再生. *真菌学报*, 1992, **11**:279

STIMULATORY EFFECT OF SODIUM DEOXYCHOLATE ON α -ERGOCRYPTINE PRODUCTIVITY OF *CLAVICEPS PURPUREA* 94002(EKPN94002)

P Zhu, HX He and SZ Chen

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT The stimulation of sodium deoxycholate (SDC) on α -ergocryptine production of *Claviceps purpurea* strain 94002(EKPN94002) was investigated. Preliminary results indicated that SDC, as a stimulator and at appropriate concentrations, could obviously increase the extracellular and the total production levels of the ergot alkaloid. Satisfied results were obtained when $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of SDC was present in the seed and fermentation media. The possible mechanism was discussed.

KEY WORDS Sodium deoxycholate; Stimulation; α -ergocryptine; *Claviceps purpurea*