

一株葛根素羟基化真菌的筛选及鉴定

杨莉萍, 徐磊, 朱新宇, 于丽娟, 唐苏苏, 崔志超, 叶辉*

(南通大学生命科学学院, 南通 226007)

摘要: 【目的】葛根素是一种常用的抗心血管药物, 主要从葛根中提取, 本文从土壤中分离转化葛根素的菌株, 并对转化产物进行了鉴定。【方法】用马铃薯培养基从土壤中分离真菌, 采用静息细胞转化法, 通过高效液相色谱法检测转化效果, 用有机溶剂萃取法和半制备高效液相色谱分离纯化得到转化产物, 质谱和核磁共振分析转化产物。【结果】从土壤中分离到 186 株真菌, 其中 1 株具有较高的转化活性, 命名为 NT-01, 经形态学和 ITS 序列系统发育分析鉴定为粘帚霉菌 (*Gliocladium* sp.)。质谱分析转化产物分子离子峰为 433, 而底物分子离子峰为 417, 表明转化产物为葛根素羟基化物, 核磁共振分析羟基位于葛根素 B-环的 3'-位碳原子上。【结论】真菌 NT-01 菌株能转化葛根素形成 3'-羟基葛根素。

关键词: 葛根素 3'-羟基葛根素 生物转化 粘帚霉菌

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 12-1571-05

葛根 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 是一种四季常青豆科类蔓生植物, 原产于喜马拉雅地区, 在我国绝大部分地区均有分布。葛根成分复杂, 其中含有各类化合物五十余种, 其主要有效成份为葛根素、大豆苷元、大豆苷等异黄酮类化合物。其中葛根素 (puerarin) 约占 30%, 其化学名: 4', 7-二羟基-8- β -D-葡萄糖基异黄酮。分子式: $C_{21}H_{20}O_9$; 分子量: 416.38。葛根素的溶解度为 12.4 mmol/L。从葛根提取的葛根素, 添加到食品中, 可以做成各类强身滋补的高级营养疗效食品, 又可制成各种治疗和保健药品。葛根素有广泛的生理活性, 如具有扩血管、抗血栓、降血糖、改善微循环等作用, 广泛用于心脑血管疾病的防治^[1-4]。因此, 对葛根素的研究有着重要的开发和利用价值。我们曾利用哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum* CGMCC1523) 菌株转化葛根素形成 3'-羟基葛根素, 其在水中的溶解性是葛根素的 1.3 倍, 去除自由基能力比葛根素提高了 20 倍^[5]; Jiang 等^[6] 利用氧化微杆菌 (*Microbacterium oxydans* CGMCC1788) 转化葛根素, 获得葛根素-7-O-

葡萄糖苷和葛根素-7-O-异麦芽糖苷, 两者的水溶性分别比葛根素提高了 18 倍和 100 倍。本文采用微生物转化的方法, 针对葛根素水溶性和脂溶性差, 生物利用度不高的缺陷, 而继续筛选能够转化葛根素的新菌株, 寻找和开发新的高活性药物。生物转化具有高效、多样、底物专一性、区域与化学特异性以及温和的反应特点, 显示出广阔的应用前景。在苯环上用化学合成方法增加羟基比较困难^[7], 目前国内外未见化学方法合成 3'-羟基葛根素的报道。本文报道从土壤筛选到的可转化葛根素的粘帚霉, 及对转化产物结构的表征。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 分离样品来源: 浙江省天目山国家自然保护区、南通大学校园、南通狼山、濠河等地采集腐烂树皮、土壤与污泥。

1.1.2 培养基: ① 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA); 马铃薯去皮, 切成小块称取 200 g, 加水 1 L 煮沸 30 min, 用双层纱布过滤, 取其滤液加葡萄糖

基金项目: 南通大学自然科学基金资助 (07Z028), 南通市科技计划项目 (K2009050)

* 通信作者。Tel: +86-851-85015962; Fax: +86-851-85015908; E-mail: nyehui@ntu.edu.cn

作者简介: 杨莉萍 (1978-), 女, 江西临川人, 硕士研究生, 研究方向为微生物生物转化。E-mail: ylp325@tom.com

收稿日期: 2009-04-30; 修回日期: 2009-09-04

20 g,定容至 1 L,琼脂 20 g,自然 pH 值;②马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB):不加琼脂的马铃薯葡萄糖培养基;③转化液:0.067 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 磷酸缓冲液, pH 5.0。

1.1.3 主要试剂和仪器:葛根素购自西安慧科生物技术有限公司,Agilent 1200 高效液相色谱仪购自 Agilent 公司,Avance 400 核磁共振仪购自 Bruker 公司,PTC-100 型 PCR 仪购自 MJResearch 公司,HYG-C 型多功能摇床购自江苏太仓实验设备厂,RE-52AA 型旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂,CR22E 冷冻高速离心机购自日立公司。

1.2 菌种分离及保藏

取 1 g 土样加入到含 100 mL 无菌水的烧杯中,振荡摇匀后,用接种环于 PDA 固体培养皿中划线,30℃ 培养 3~5 d。待平板上长出菌落后,挑取单菌落接入 PDA 培养基,30℃ 培养直到产生孢子 (5~7 d)。用 15% (V/V) 甘油无菌水溶液洗涤斜面,用无菌棉絮过滤吸起孢子悬液并调节到 10^8 个孢子/mL, -70℃ 保存。

1.3 静息细胞制备与转化

霉菌孢子接种于 PDB 培养基,孢子终浓度达到 10^6 个/mL,30℃,160 r/min 培养 40 h,用纱布过滤并用 pH 5.0 磷酸缓冲液洗涤 3 次菌丝,拧干。在 100 mL 三角瓶中,加入 1 g 菌丝及含 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根素的 20 mL 磷酸缓冲液 (pH 5.0),30℃、160 r/min 培养。实验过程中分别设菌体对照组和底物对照组,排除非微生物因素引起的底物结构的改变和菌体代谢物的干扰。转化 36 h 后补足蒸发的水分后取 1 mL 样品,置于微量恒温器中 100℃ 加热 5 min,17300 $\times g$ 离心 10 min,取上清液进行 HPLC 分析。Agilent 色谱柱型号为 XDB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),进样体积为 20 μL ,柱温 25℃,紫外检测器为 Agilent G1314B 检测波长为 254 nm,流动相为甲醇:水 (7:73),流速 1 mL/min。

1.4 转化产物的分离与鉴定

将转化液用等体积的正丁醇萃取 3 次,正丁醇萃取液用蒸馏水萃取 5 次,水萃取液 70℃ 减压蒸馏,浓缩至干,用少量甲醇溶解,以甲醇:水 (7:73) 为洗脱剂,利用制备型岛津高效液相色谱分离纯化,取少量粉末状样品送中国药科大学分析测试中心进行质谱分析,样品溶于甲醇中,质谱仪为 Agilent 1100LC-MSD 电喷雾液质联用仪,离子源为阳离子。取少量粉末状样品送南京师范大学分析测试中心进行核磁共振光谱分析,采用 Bruker AV-400 进行 ^{13}C 和 ^1H 核磁共振光谱分析,溶剂为 $\text{DMSO}-d_6$, ^{13}C 和 ^1H

核磁共振光谱工作频率分别为 100 MHz 和 400 MHz,化学位移采用四甲基硅烷 (TMS) 为内标测定,采用 DEPT 谱测定碳原子的级数,采用 $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NMR, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -NMR 谱等来帮助确定碳原子和氢原子化学位移。

1.5 菌株 NT-01 的鉴定

1.5.1 形态学观察:从 -70℃ 低温冰箱取出冷藏管,划线接种于 PDA 平板上,30℃ 培养至出现菌落,用插片培养法观察菌丝、孢子特征及菌落特征。

1.5.2 基因组 DNA 的提取:按马桂珍等^[7]的方法提取菌体 DNA。

1.5.3 ITS (Internal transcribed spacer, ITS) 序列系统发育分析:根据真菌的一对特异性通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 TS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 18S 与 28S rDNA 间的内部转录间隔区 (ITS)。PCR 扩增反应体系选用 50 μL 反应体系,扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 1 min 56℃ 40 s,72℃ 1.5 min,35 个循环;72℃ 10 min 4℃ 保存。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。送上海英俊生物技术有限公司测序。从 GenBank 中调取粘帚霉属 (*Gliocladium*) 13 个菌株的 ITS DNA 序列用于系统发育学分析。ITS DNA 全序列用 Clustal x (1.8) 软件包排序,用 MEGA version 2 软件包中的 Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离,用 Neighbor-Joining 法构建系统发生树,1000 次随机抽样,通过自展法 (Bootstrap),评估系统发生树的置信度^[8-10]。

2 结果和分析

2.1 转化葛根素菌株的分离和筛选

在 PDA 平板上挑取单菌落,对其进行静息细胞转化,HPLC 分析,筛选得到编号为 NT-01 菌株可转化葛根素形成一种极性更大的化合物,保留时间为 6.07 min,而菌体和底物对照均未在此保留时间出峰 (图 1)。

2.2 转化产物的分离与鉴定

用等体积的正丁醇萃取 3 次,正丁醇萃取液用蒸馏水萃取 5 次,水萃取液用 70℃ 减压蒸馏,浓缩至干,用少量甲醇溶解,再用制备型岛津高效液相色谱,收集层析液,70℃ 减压蒸馏至干,得到粉末状样品 0.06 g。取少量样品进行 HPLC 分析,样品的纯度为 96.5%。

一级质谱结果显示转化产物分子离子峰值 m/z 433 ($M+H$),与葛根素分子离子峰值 m/z 417,相比分子量增加了 16,因而推测转化产物为葛根素的羟基衍生物。图 2 为转化产物的二级质谱图。

转化产物的 ^{13}C -和 ^1H -NMR 的解析结果见下:

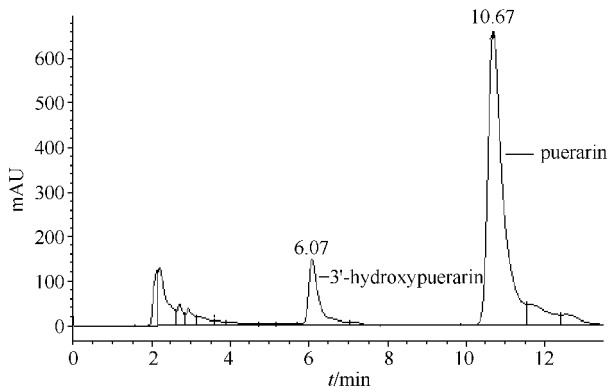


图1 NT-01 菌株转化葛根素的 HPLC 分析

Fig.1 HPLC spectrum of puerarin biotransformation of strain NT-01.

¹³C-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 153.1 (C-2), 123.8 (C-3), 175.4 (C-4), 126.7 (C-5), 115.8 (C-6), 161.5 (C-7), 113.2 (C-8), 153.0 (C-9), 117.4 (C-10); 123.5 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.3 (C-3'), 145.8 (C-4'), 117.2 (C-5'), 120.3 (C-6'); 74.0 (C-1''), 71.3 (C-2''), 79.3 (C-3''), 71.0 (C-4''), 82.3 (C-5''), 61.9 (C-6'') ppm

¹H-NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ = 4.80 (1H, d, J = 9.6 Hz, glcH-1), 6.76 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'),

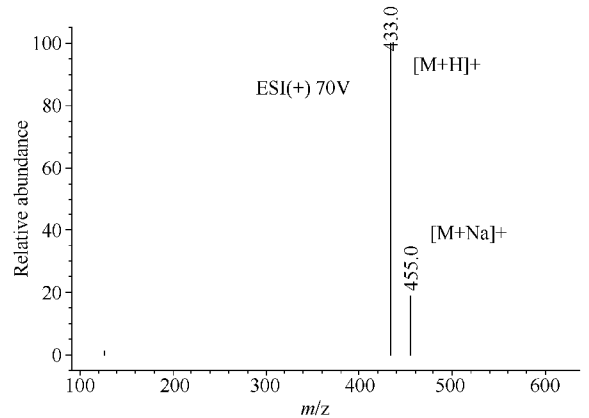


图2 3'-羟基葛根素的 ESI/MS

Fig.2 ESI/MS spectrum of 3'-hydroxypuerarin.

6.79 (1H, dd, J = 8.1, 1.9 Hz, H-6'), 7.03 (1H, d, J = 1.8Hz, H-2'), 6.99 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6), 7.92 (1H, d, J = 8.8Hz, H-5), 8.30 (1H, s, H-2) ppm.

以葛根素为底物进行转化,结果发现在底物上发生了 3'-羟基化反应,见图 3。这一结果与我们先前报道的哈茨木霉 (*T. harzianum* CGMCC1523) 转化葛根素形成 3'-羟基葛根素基本一致^[5]。

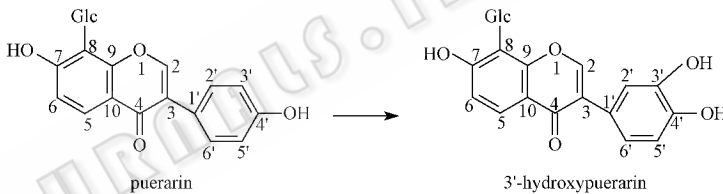


图3 NT-01 菌株代谢葛根素形成 3'-羟基葛根素示意

Fig.3 Chemical structure of 3'-hydroxypuerarin transformed from puerarin by strain NT-01.

2.3 转化菌株的鉴定

2.3.1 NT-01 菌株形态与培养特征: NT-01 菌株在 PDA 平板上生长 2 d,菌落呈疏松的棉絮状,白色,直径为 2 cm 左右,5 d 后呈青绿色,直径 6 cm 左右;基内菌丝无色,菌丝有横隔、透明,分生孢子梗由气生

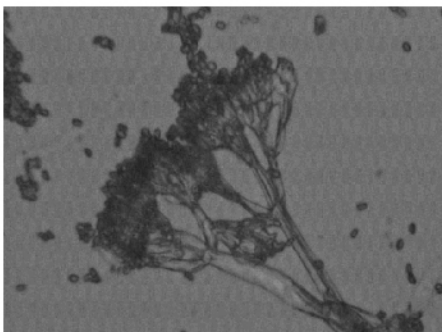


图4 NT-01 菌株的分生孢子梗形态 (400×)

Fig.4 Morphology of strain NT-01 (400×).

菌丝生出,呈分枝帚状,形成一个很紧密的刷子,分生孢子椭圆形,单个时无色透明,聚成团时青绿色(图4)。与《微生物分类学》所描述的融粘帚霉菌 (*Gliocladium deliquescens*) 形态一致^[11]。

2.3.2 ITS 序列的系统发育分析: NT-01 菌株的 ITS DNA 片段为 572 bp 长度,在 GenBank 中的登录号为 GQ229478。将此序列在 GenBank 中 BLAST 显示与粘帚霉属 (*Gliocladium*) 有较高的同源性 (100%) (图5) 结合形态学和 ITS 序列的系统发育分析结果,我们将 NT-01 鉴定为粘帚霉属中的一个菌株 (*Gliocladium* sp.)

3 讨论

黄酮类化合物的生理活性的研究是近年来研究热点之一,也是黄酮化学中发展最快的方向,而生物活性与黄酮类化合物的结构密切相关,黄酮类化合物的化学修饰的方法主要有酯化、醚化、酰基化等反应。目前主要通过酯化,改变其脂溶性较差的弱点,

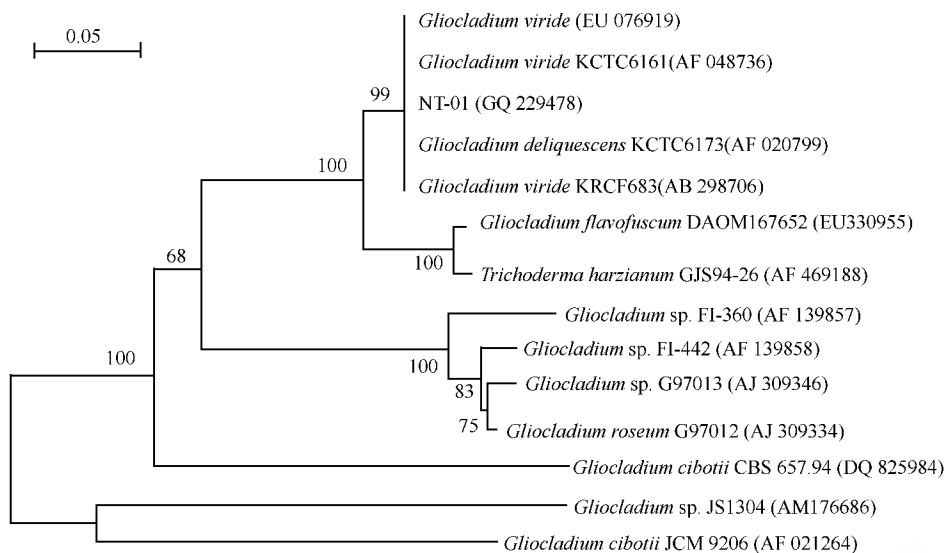


图 5 基于 ITS DNA 序列的 NT-01 菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of ITS DNA sequence in strain NT-01. Numbers in parentheses represent the GenBank accession number. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

但反应选择性差、反应条件苛刻、反应过程中往往结合或屏蔽了黄酮类化合物的主要官能团—酚羟基，虽然增加了其脂溶性，但降低了其抗氧化活性，限制了它的广泛应用。

将生物转化技术融入黄酮类化合物研究在很大程度上加速了中药新药的开发和中药现代化的进程。但目前绝大部分研究工作仍停留在实验室阶段，缺乏实现工业化生产的范例。虽然涉及的转化反应有氧化、还原、水解、转换等，但反应类型有限且转化效率比较低。因此仍需开发新的生物催化体系，以适应催化各种反应及提高转化效率的需要。利用具有特殊转化功能的微生物或酶，对黄酮类化合物进行转化，以得到化学结构的多样性，它是从已知化合物中寻找新型衍生物的有效手段，从某种角度讲，它比化学合成的方法更为有效，这是一个新的研究领域。

文献报道 3'-hydroxy puerarin 在葛根中存在，但含量很低，占葛根黄酮的 5% 左右。葛根素水溶性和口服吸收比较差，限制了其药理学的进一步研究。为了获得水溶性和生物利用度高的新型的葛根素衍生物，我们先前的研究发现哈茨木霉 (*T. harzianum* CGMCC1523) 也能催化葛根素羟基化，其酶活力单位 (即在 1L 转化液中，1min 内催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量) 为 0.28 units/min^[5]。本实验结果说明粘帚霉 NT-01 菌株的静息细胞也能催化葛根素羟基化，且反应具有严格的区域选择性，即在葛根素的 3'-碳原子上，其酶活力单位为 0.11 units/min。证明了真菌的不同种属，如在木霉属和粘帚霉属中存在代谢葛根素为 3'-羟基葛根素的途径，该菌株为今后

利用微生物转化法生产生物活性更高的 3'-羟基葛根素奠定了一定的基础。已有研究证明在芳香环上利用化学合成连接羟基是比较困难的，且需要多步化学反应，而利用生物转化在含芳香环的底物上羟基化是直接的。尽管酶与底物的相互作用、酶催化的处理方式在羟基化反应机理方面研究还不够深入^[2]，但利用微生物全细胞 (酶) 进行生物转化相对简单、廉价、方便，无需对酶分离与提纯，并能减少酶活的损失^[3-14]。

根据形态学和 ITS 序列的系统发育分析，NT-01 菌株被鉴定为粘帚霉菌。至今，中外学者从粘帚霉属 (*Gliocladium* spp.) 中共分离获得 50 多个代谢物，它们有着广泛的抑制植物病原真菌附着孢形成、毒杀肿瘤细胞等多种生物活性，其化学结构类型有二酮哌嗪、萜、聚酮、肽等^[5]。在国外，链孢粘帚霉 (*G. catenulatum*) 和绿粘帚霉 (*G. virens*) 已被开发成生物防治剂，商品名分别为 Primastop 和 SiilGard。粘帚霉属的菌株在生物转化领域中已引起人们的关注，如融粘帚霉 (*G. deliquescens*) 能转化 rapamycin^[6]。本文首次报道粘帚霉 NT-01 菌株转化葛根素形成 3'-羟基葛根素。因此，利用粘帚霉羟基化酶的特点，进行 3'-羟基葛根素的转化，这对提高传统中药葛根素的药理活性和利用价值具有重要意义。

致谢 南京师范大学生命科学学院陈双林教授在菌株鉴定及序列分析软件的应用、南京师范大学分析测试中心周家宏博士、中国药科大学刘吉华博士、戚进博士在转化产物的结构解析上提供了热情的指导和帮助。

参考文献

- [1] 王靖, 吉民, 华维一, 等. 葛根素研究进展. 药学进展 (Progress in Pharmaceutical Sciences), 2003, 27 (2): 70 - 73.
- [2] 林毅, 张若楠. 葛根素研究概况. 黑龙江中医药 (Heilongjiang Journal of Traditional Chinese Medicine), 2000, 4: 56 - 58.
- [3] 石瑞丽, 张建国. 葛根素对缺血性血管内皮细胞凋亡的保护作用. 药学学报 (Acta Pharmaceutica Sinica), 2003, 38 (2): 103 - 107.
- [4] 罗伟, 李保华, 杨瑞华, 等. 葛根素对高血压患者血浆 ET、TXB₂、6-K-PGF_{1α} 含量的影响. 中国中医基础医学杂志 (Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine), 2000, 6 (1): 45 - 47.
- [5] Ye H, Yuan S, Cong XD. Biotransformation of puerarin into 3'-hydroxypuerarin by *Trichoderma harzianum* NJ01. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 594 - 597.
- [6] Jiang JR, Yuan S, Ding JF, et al. Conversion of puerarin into its 7-O-glycoside derivatives by *Microbacterium oxydans* (CGMCC 1788) to improve its water solubility and pharmacokinetic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81 (4): 647 - 657.
- [7] 马桂珍, 张拥华, 李世东, 等. 18S rRNA 基因 ITS 区序列分析在粘帚霉属生防菌株种级分类上的应用. 应用与环境生物学报 (Chinese Journal Applied and Environmental Biology), 2007, 13 (5): 704 - 707.
- [8] Nikoh, N, Fukatsu, T. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17 (4): 629 - 638.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150 - 163.
- [10] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876 - 4882.
- [11] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [12] Holland H, Weber HK. Enzymatic hydroxylation reactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11: 547 - 553.
- [13] Duetz W, Beilen JB van, Witholt B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 419 - 425.
- [14] 宋欣. 微生物酶转化技术. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [15] 董锦艳, 李翎, 张克勤. 粘帚霉属真菌代谢物的研究进展. 微生物学通报 (Microbiology), 2006, 33 (2): 124 - 131.
- [16] Michaela Kuhn, Francis Bitsch, Monique Ponelle, et al. Microbial conversion of rapamycin. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21: 405 - 412.

Screening and identification of a fungal strain functioning in hydroxylation of puerarin

Liping Yang, Lei Xu, Xinyu Zhu, Lijuan Yu, Susu Tang, Zhichao Cui, Hui Ye*
(College of Life Science, Nantong University, Nantong 226007, China)

Abstract: [Objective] Puerarin is a Chinese herbal medicine. We isolated a fungus from soil which could convert puerarin to 3'-hydroxypuerarin. [Methods] Strains were cultivated on potato dextrose agar (PDA). The biotransformation product was extracted with an organic solvent and detected on high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] A total of 186 fungal strains were isolated from soil, and strain NT-01 was determined to transform puerarin into 3'-hydroxypuerarin. The product was identified as 3'-hydroxypuerarin by MS and ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The morphology characteristic of strain NT-01 was consistent with *Gliocladium deliquescens*. Phylogenetic analysis on sequences showed that strain NT-01 was clustered together with *G. deliquescens* and *G. viride* with high bootstrap supporting, so that strain NT-01 was identified as *Gliocladium* sp. [Conclusion] *Gliocladium* strain NT-01 can convert puerarin to 3'-hydroxypuerarin.

Keywords: puerarin; 3'-hydroxypuerarin; biotransformation; *Gliocladium* sp.

(本文责编: 王晋芳)