

# 七种真菌对龙胆苦苷的生物转化研究

吴虹丽, 赵 俊, 张 秘, 孔传涛, 马 林

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

**摘 要:** 采用变温培养方式研究了 7 种真菌对龙胆苦苷的生物转化, 应用薄层色谱分析法(TLC)和高效液相色谱分析法(HPLC)检测转化产物。结果表明: 绿色木霉、米曲霉、黑曲霉、黑根霉、桔青霉以及辣椒炭疽菌能转化底物龙胆苦苷。其中, 绿色木霉具有最强的转化能力, 能将底物完全转化为 2 种产物。

**关键词:** 龙胆苦苷; 生物转化; 薄层色谱; 高效液相色谱; 微生物转化

**中图分类号:** Q 949.776.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0164-04

龙胆苦苷(Gentiopicroside)属于裂环环烯醚萜类化合物, 广泛存在于龙胆属植物中, 是龙胆科植物龙胆、当药和獐牙菜等中草药的苦味成分。已有研究表明, 龙胆苦苷具有显著的保肝、利胆、抗炎等药理作用<sup>[1-4]</sup>。

微生物转化是通过微生物细胞对外源底物进行结构修饰, 利用微生物代谢过程中产生的某种或某一系列的酶对底物特定部位(基团)进行催化反应。目前, 国内外文献中有关龙胆苦苷结构修饰的报道较少。Wang 等研究了冬虫夏草的无性菌丝对龙胆苦苷的转化, 得到 2 个转化产物, 其中 1 个为新的吡啶类单萜生物碱<sup>[5]</sup>。El-Sedawy 等曾报道小韦荣球菌小亚种(*Veillonella parvulus parvula*)能将龙胆苦苷转化为红百金花内酯(erythrocinaurin)和龙胆苦醛(hentioipical)等 5 个产物<sup>[6]</sup>。宋纯清等通过离体试验研究人肠内菌对龙胆苦苷的代谢转化, 发现龙胆苦苷经人肠内菌代谢后生成了龙胆碱和龙胆醛等产物<sup>[7]</sup>。陈雷研究了苦杏仁酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和黑曲霉静息细胞对龙胆苦苷的水解反应, 结果表明龙胆苦苷可被转化为龙胆苦醛, 且龙胆苦醛的抗炎、镇痛等药理活性都大于龙胆苦苷<sup>[8]</sup>。该研究的目的在于进一步筛选能转化龙胆苦苷的微生物, 希望通过结构修饰得到龙胆苦苷的衍生物。该文报道采用变温培养方式筛选转化龙胆苦苷的真菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**菌种:** 绿色木霉(*Trichoderma viride*)、黑根霉(*Rhizopus nigricans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、腐乳毛霉(*Mucor sufu*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、辣椒炭疽菌(*Gloeosporium piperatum*), 均为西南科技大学生物科学试验中心保藏菌种。龙胆苦苷由成都普思生物科技有限公司提供, 纯度 $\geq 98\%$ 。用甲醇溶解配制成 50 mg/mL 的母液, 避光保存于 4℃冰箱备用。仪器: 手提式不锈钢蒸汽消毒器(YX280B, 上海三申医疗器械有限公司), 单人双面净化工作台(SW-CJ-1F, 苏州净化设备有限公司), 全温振荡培养箱(HZQ-160F, 上海齐欣科学仪器有限公司), 高速离心机(LD10-2.4A, 北京医用离心机厂), 紫外分析仪(WD-9403C, 北京市六一仪器厂), 高效液相色谱仪(日本岛津, SPD-M20 二极管阵列检测器, ODS-SP C18 柱, LSColution 色谱分析软件)。试剂: 甲醇为色谱纯, 石油醚、乙酸乙酯及正丁醇等均为分析纯。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 培养基** 斜面培养基(PDA): 马铃薯 20 g/L、蔗糖 2 g/L、琼脂 2 g/L, pH 自然。转化培养基: 葡萄糖 8 g/L、酵母膏 2.5 g/L、蛋白胨 2.5 g/L、NaCl 2.5 g/L、 $K_2HPO_4$  1.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L、 $MnSO_4 \cdot H_2O$  1.0 g/L, pH 6.0。

**1.2.2 菌种活化** 取斜面保藏菌种, 将其转接于新鲜的 PDA 培养基, 根据不同菌种生长情况在 28℃活化培养 3~5 d。挑取适量菌体于无菌水中, 振摇均匀后, 用移液枪吸取 1 mL 菌液加入到装有 100 mL 液体转化培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 28℃下振荡培养 2 d, 摇床转速 150 r/min。

**第一作者简介:** 吴虹丽(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为天然药物的生物转化。E-mail: swustwhl@gmail.com。

**通讯作者:** 马林(1964-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事天然药物生物转化和药用植物组织与细胞培养研究工作。E-mail: malin@swust.edu.cn。

**基金项目:** 四川省教育厅重点资助项目(2005A127)。

**收稿日期:** 2010-07-22

1.2.3 转化培养 向液体培养 2 d 后的培养基中加入 1 mL 龙胆苦苷甲醇液,使培养基中的底物浓度为 0.5 mg/mL。改变培养温度为 37℃,摇床转速保持不变(150 r/min),转化培养 5 d。设 2 个对照:(1)培养基对照(培养基不接菌种但加入龙胆苦苷底物,考察培养基成分与底物的作用);(2)菌种对照(培养基接入菌种但不加龙胆苦苷底物,仅加入等量甲醇,考察菌种发酵产生的成分)。

1.2.4 发酵液处理 转化结束后,用 200 目尼龙布过滤出大部分菌体,收集滤液,滤液用旋转蒸发仪在 50℃浓缩至 30 mL,再以 5 000 r/min 的速度离心 10 min。取上清液,对其依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇各萃取 3 次,分别合并各萃取液,于 45℃旋转浓缩至干,得发酵液粗提物。对照按同样方法处理。

1.2.5 薄层色谱法(TLC)检测 用适量甲醇溶解发酵液粗提物。分别将龙胆苦苷母液、转化处理及 2 个对照样品点样于硅胶板(硅胶 GF254-0.5% CM)。展开剂为氯仿:甲醇:水(V/V/V)=90:10:1。待溶剂挥干后,在紫外分析仪(波长为 254 nm)中观察斑点显示情况,再用碘熏蒸显色。

1.2.6 高效液相色谱(HPLC)检测 将发酵粗提物用适量甲醇溶解后,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。色谱条件:流动相为甲醇-水(30:70);柱温:30℃;进样量:10 μL;流速:1 mL/min;检测波长:273 nm。

2 结果与分析

2.1 龙胆苦苷真菌转化 TLC 分析

将 7 种真菌转化发酵液的乙酸乙酯提取物分别点样 TLC 紫外显色结果见图 1。

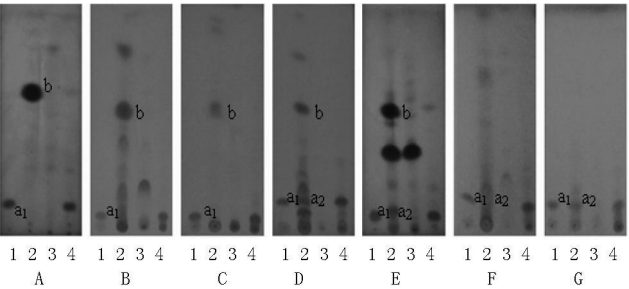


图 1 7 种真菌转化龙胆苦苷的 TLC 图谱(254 nm 紫外显色)  
注: a<sub>1</sub> 底物; a<sub>2</sub> 未转化的底物; b 转化产物。1-龙胆苦苷对照; 2-转化处理; 3-菌种对照; 4-培养基+底物对照。A-绿色木霉; B-米曲霉; C-黑曲霉; D-黑根霉; E-桔青霉; F-辣椒炭疽菌; G-腐乳毛霉。

图 1 显示出,绿色木霉(A)、米曲霉(B)、黑曲霉(C)、黑根霉(D)和桔青霉(E)的转化处理(2)与底物(1)比较, R<sub>f</sub> 值相同处的斑点消失或变浅。绿色木霉、米曲

霉和黑曲霉的转化处理与底物 R<sub>f</sub> 值相同处的斑点 a<sub>1</sub> 消失;同时,在 R<sub>f</sub> 值约 0.6 处出现了菌种对照(3)和培养基+底物对照(4)中没有的新点 b,且 b 的极性小于底物。黑根霉和桔青霉转化处理中也出现了新点 b,但尚存没有完全转化的底物点 a<sub>2</sub>。由此可知,绿色木霉、米曲霉、黑曲霉、黑根霉和桔青霉可能转化龙胆苦苷,并且绿色木霉、米曲霉和黑曲霉的转化率相对黑根霉和桔青霉更高。辣椒炭疽菌(F)和腐乳毛霉(G)转化处理未显示出新的斑点,这 2 个菌种可能无法转化龙胆苦苷。

将图 1 所示的 7 块薄层板再进行碘蒸气显色,结果见图 2。与紫外显色(图 1)相比,碘显色(图 2)区别不大。该方法进一步验证 b 为绿色木霉、米曲霉、黑曲霉、黑根霉和桔青霉转化处理中的新点。

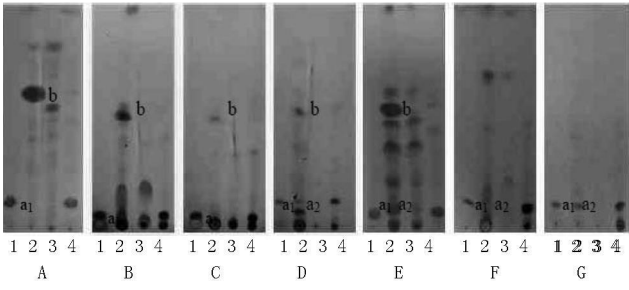


图 2 7 种真菌转化龙胆苦苷的 TLC 图谱(碘显色法)  
注: a<sub>1</sub> 底物; a<sub>2</sub> 未转化的底物; b 转化产物。1-龙胆苦苷对照; 2-转化处理; 3-菌种对照; 4-培养基+底物对照。A-绿色木霉; B-米曲霉; C-黑曲霉; D-黑根霉; E-桔青霉; F-辣椒炭疽菌; G-腐乳毛霉。

2.2 龙胆苦苷真菌转化 HPLC 分析结果

为考察底物龙胆苦苷与培养基相互作用,设置了在纯培养基中加底物的对照, HPLC 检测结果见图 3。

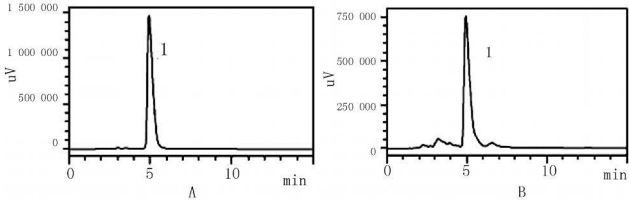


图 3 龙胆苦苷和培养基的 HPLC 图谱  
注: A-龙胆苦苷对照; B-培养基+底物对照; 1-龙胆苦苷。

由图 3-A 可知,底物龙胆苦苷的保留时间为 5.1 min;图 3-B 中龙胆苦苷的保留时间仍为 5.1 min,且没有出现其它色谱峰,因此底物与培养基成分之间没有发生相互作用。

为进一步证实各菌株对龙胆苦苷的转化,采用 HPLC 法进行了检测。图 4 为 7 种真菌对龙胆苦苷转化的检测结果。

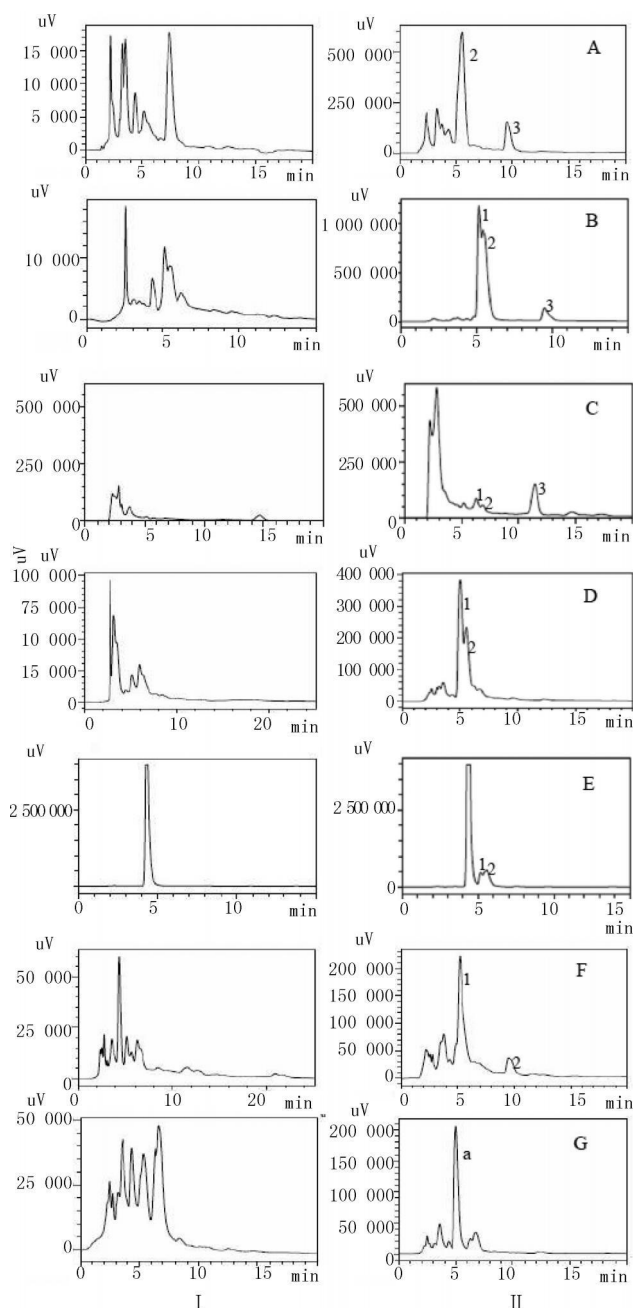


图4 7种真菌转化龙胆苦苷的HPLC图谱

注: I-龙胆苦苷; 2-转化产物 2; 3-转化产物 3; I-菌种对照; II-转化处理。A-绿色木霉; B-米曲霉; C-黑曲霉; D-黑根霉; E-桔青霉; F-辣椒炭疽菌; G-腐乳毛霉。

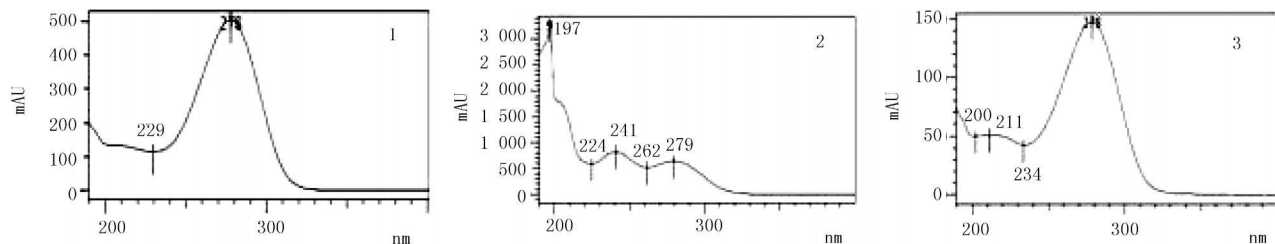


图5 底物和转化产物的紫外光谱

注: 1-龙胆苦苷; 2-产物 2; 3-产物 3。

对比菌种对照(图 4-I)和转化处理(图 4-II)的 HPLC 色谱图, 结合底物龙胆苦苷对照、培养基对照(图 3), 可知绿色木霉(A)、米曲霉(B)、黑根霉(D)和桔青霉(E)转化处理中保留时间为 5.1 min 处的底物峰完全消失或降低, 在保留时间 5.6 min 处出现了新峰 2; 黑曲霉(C)转化处理中保留时间 6.3 min 的底物峰降低, 在 6.8 min 处出现新峰 2, 11.4 min 处出现新峰 3; 绿色木霉(A)、米曲霉(B)和辣椒炭疽菌(F)在 9.5 min 处也出现了新峰 3。而腐乳毛霉(G)中未检测到任何新峰。

通过图 4 可知, 绿色木霉、米曲霉、黑曲霉、黑根霉、桔青霉、辣椒炭疽菌可能具有转化龙胆苦苷的能力。其中, 绿色木霉、米曲霉和黑曲霉可能有 2 个转化产物; 通过观察底物 a 峰和物质 b 峰的峰面积比例可以得知, 绿色木霉能将底物完全转化为物质 2 和 3。绿色木霉和米曲霉中物质 3 的峰面积明显低于物质 2 的峰面积, 表明这 2 个菌株的转化产物主要是物质 2; 而黑曲霉的结果显示, 其转化产物则主要是物质 3。在 HPLC 检测中, 辣椒炭疽菌的转化处理中也出现新峰 3, 而该物质作为黑曲霉的主要产物在图 1、2 的 TLC 中并没有被检测到, 表明所选的 TLC 展开剂(氯仿:甲醇:水=90:10:1)极性太大, 不利于物质 3 的显示。

图 5 显示的是图 4 中底物峰 1 以及转化产物峰 2、3 的紫外光谱。底物龙胆苦苷和物质 3 的最大紫外吸收波长为 278 nm, 而物质 2 的最大紫外吸收波长在 197 nm 处。

由图 5 可知, 物质 2 的最大紫外吸收波长与底物峰 1 最大紫外吸收波长有明显的区别, 这说明转化产物 b 与底物为完全不同的 2 种物质; 物质 3 的最大紫外吸收值与底物最大紫外吸收波长相同, 但是二者的保留时间(图 4)却相差很大, 说明二者也不是同一物质。底物与 2 个产物紫外光谱进一步验证 3 种物质各不相同。

综合分析图 1~5 可知, 龙胆苦苷可转化为 2 种产物, 分别是物质 2 和物质 3。绿色木霉、米曲霉和黑曲霉可能有 2 种转化产物, 黑根霉和桔青霉只能转化出物质 2, 辣椒炭疽菌只能转化出物质 3, 而腐乳毛霉则无法转化龙胆苦苷。

3 结论与讨论

研究结果表明,绿色木霉、米曲霉、黑曲霉、黑根霉、桔青霉、辣椒炭疽菌均能转化龙胆苦苷。其中,绿色木霉对龙胆苦苷具有更强的转化能力,在 TLC 检测中底物点完全消失,转化产物点明显;在 HPLC 分析中底物峰完全消失,并出现了 2 个明显的转化产物峰。常军报道了黑曲霉、米曲霉和康氏木霉能将獐牙菜苦苷转化为 3 种产物 M1、M2 和 M3,从黑曲霉的发酵液中分离纯化出了 1 个与獐牙菜苦苷转化相关的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。推测得到的 3 种转化产物的代谢途径为獐牙菜苦苷在  $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用下发生水解反应,生成相应的苷元,苷元在细胞内其它酶或在培养基的低 pH 值条件下再发生一系列的转化反应生成了 M1、M2 和 M3<sup>[9]</sup>。该研究中的龙胆苦苷的结构与獐牙菜苦苷极为相似,二者均为裂环烯醚萜类化合物。由此可以推测该试验中龙胆苦苷的转化产物极有可能与獐牙菜苦苷在黑曲霉中的代谢途径相似。此外,研究证明,苦杏仁酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和黑曲霉催化龙胆苦苷转化的产物均为龙胆苦醛<sup>[8]</sup>。因此,该研究中的转化产物之一很可能为龙胆苦醛;而另一个转化产物结构的确定则还需要更深入的研究。

$\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21),又称  $\beta$ -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,它能够水解结合于末端非还原性的  $\beta$ -D-葡萄糖苷键,同时释放出  $\beta$ -D-葡萄糖和相应的配基,存在于自然界的许多植物、昆虫、酵母、曲霉、木霉及细菌体内<sup>[10]</sup>。研究表明, $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 50~60℃,黑曲霉变温培养(首先将微生物在 28℃下进行液体活化培养,待菌体生长量足够、产酶较丰富时加入底物,然后再改变培养温度为 37℃,直至转化培养结束)的转化率可达 36%,比 28℃和 37℃恒温培养的转化率分别高 4%和 2%<sup>[9]</sup>。该试验采用变温培养方式对獐牙菜苦苷的类似物龙胆苦苷进行生物转化研究,从而更有效地发挥  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性作用。

HPLC 法检测的流动相参考的是龙胆苦苷的流动相<sup>[11]</sup>。从结果来看,该流动不利于分离底物龙胆苦苷和转化产物 b,物质 b 的保留时间 5.6 min 与底物峰 a 保留

时间 5.1 min 仅相差 0.5 min,2 种物质尚未完全分开,可能是底物与产物性质较为接近所致。另一方面,黑曲霉与其它菌种用同一台仪器在相同色谱条件下的不同时间测定,结果中相同物质的保留时间存在一定差异,可能因为不同时间配制的流动相有微小的差异或者检测时环境温度的差异影响了物质在 HPLC 测定中的保留时间。

该研究发现了绿色木霉对龙胆苦苷具有较强的转化能力,这为分离转化产物和微生物转化龙胆苦苷的扩大化培养奠定了一定基础。在接下来的工作中尚需调整流动相极性以更有效分离龙胆苦苷及其转化产物 b。该试验只是初步探讨了真菌对龙胆苦苷的生物转化,HPLC 检测结果显示龙胆苦苷有 2 个转化产物,要明确 2 种产物的化学结构,还有待更深入地研究。

参考文献

[1] 王国英,黄翠轩,蒋家雄等.龙胆苦苷对大鼠肝细胞试验性保护作用的病理观察[J].云南医药,1993,14(4):242-243,251.  
[2] Kondo Y, Takano F, Hojo H. Supression of chemically and ammunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice [J]. Planta Med 1994, 60(5): 414-416.  
[3] 刘占文,陈长勋,金若敏等.龙胆苦苷的保肝作用研究[J].中草药,2002,33(1):47-50.  
[4] 陈长勋,刘占文,孙峥嵘等.龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J].中草药,2003,34(9):814-816.  
[5] Wang D, Xu M, Zhu H T, et al. Biotransformation of gentiopicroside by asexual mycelia of *Cordyceps sinensis* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(11):3195-3197.  
[6] El-Sedawy A I, Hattoni M, Kobashi K, et al. Metabolism of gentiopicroside (gentiopicroin) by human intestinal bacteria [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(9): 2435-2437.  
[7] 宋纯清,杨肖锋,胡之璧.龙胆苦苷的人肠内菌代谢试验观察[J].时珍国医国药,2001,12(1):1-2.  
[8] 陈雷.龙胆苦苷衍生物合成及药理作用[D].西安:西北工业大学,2008.  
[9] 常军.獐牙菜苦苷生物转化研究[D].天津:天津大学,2009.  
[10] 王华夫,游小青.茶叶中  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的测定[J].中国茶叶,1996,12(3):16-17.  
[11] 张雅惠,孙文基.大孔吸附树脂分离秦艽中龙胆苦苷的比较研究[J].药物分析杂志,2007,27(11):1752-1755.

Biotransformation of Gentiopicroside by Seven Fungus

WU Hong-li, ZHAO Jun, ZHANG Mi, KONG Chuan-tao, MA Lin

(College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010)

**Abstract:** Using seven fungus cultured by variable temperature to transform gentiopicroside, and thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were applied to detect transformation products. The results showed that *Trichoderma viride*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium citrinum* and *Gloeosporium piperatum* had the ability of transforming gentiopicroside. Among them, *Trichoderma viride* had the strongest transformation ability that can completely transformed gentiopicroside into two products.

**Key words:** gentiopicroside; biotransformation; TLC; HPLC; microbial transformation