

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0087-06

绿僵菌生物转化熊果酸生成烟曲霉酸的研究

陈燕琼¹,李晓青^{1,2},欧阳文¹,徐 鸿¹,陈洪璋¹,曹 庸^{1*}¹华南农业大学食品学院,广州 510642; ²中国科学院深圳先进技术研究院,深圳 518055

摘要:本研究利用波谱学方法对金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)在添加了熊果酸溶液的培养基中生物转化所得的产物进行纯化及结构鉴定,并对其生物转化条件进行正交优化。研究结果表明,金龟子绿僵菌在添加了熊果酸溶液的培养基中生物转化所得主要产物为烟曲霉酸,其产量比未添加熊果酸溶液时明显增多,最佳生物转化条件为:培养基 pH 为 6.5,摇床转速为 160 rpm,反应温度为 28 ℃。

关键词:金龟子绿僵菌;熊果酸;结构鉴定;烟曲霉酸

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

Helvolic Acid Obtained From Biotransformation of Ursolic Acid by *Metarhizium Anisopliaein*

CHEN Yan-qiong¹, LI Xiao-qing^{1,2}, OUYANG Wen¹, XU Hong¹, CHEN Hong-zhang¹, CAO Yong^{1*}¹College of Food Science, South China University of Agricultural, Guangzhou 510642, China;²Shenzhen Advanced Tochenology Institute, CAS, Shenzhen 518055, China

Abstract: In this study, the biotransformation products of ursolic acid by *Metarhizium anisopliae* were isolated and purified. The chemical structure of the isolated product was identified by spectral analysis. The biotransformation conditions were optimized using single factor and orthogonal experiments. The results showed that the main product of the biotransformation process was helvolic acid. The yield of helvolic acid was obviously increased using ursolic acid as the reaction medium. The optimal biotransformation conditions were obtained as follow: 28 ℃ as reaction temperature, pH 6.5 and 160 rpm as the rotation speed of the incubator.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; ursolic acid; spectral analysis; helvolic acid

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*),属于半知菌亚门绿僵菌属,是一种能侵染多种农林害虫的广谱性昆虫寄生真菌,可寄生 8 个目 30 个科共约 200 多种昆虫、螨类及线虫,是一种常用的萜类物质生物转化的真菌^[1]。研究表明,金龟子绿僵菌作为一种具有广谱杀虫作用的真菌杀虫剂,可用于防治地上、地下害虫,对人、畜、农作物无毒,且具有使用后无残毒、菌剂易生产、持效期长等优点^[2],利于林产业的发展,具有广阔的应用前景。

烟曲霉酸(Helvolic Acid, 图 1),一种四环三萜类化合物,具有强的抗菌活性^[3],不仅能通过抑制幽门杆菌的活性而防止和减轻十二指肠溃疡,并作为抗葡萄球菌的抗生素^[4],还能通过其抗菌能力加强人类免疫系统从而有效地增强人体的生命力^[5],在农业和药业生产中颇具开发潜力^[6]。目前有关

烟曲霉酸的生产工艺还不是很成熟,生物转化以其高的区域选择性、强的立体选择性、反应类型众多等特点,以及能弥补有机合成修饰所无法完成的化学反应而受到青睐^[7]。微生物转化技术在熊果酸等萜类结构修饰的应用中越来越多,其本质是利用微生物本身所产生的酶对外源化合物进行的催化反应^[8]。早期烟曲霉酸大多从烟曲霉的发酵液中分离得到^[9],随着科技的进步,有研究发现,金龟子绿僵菌能发酵生成烟曲霉酸等多种具有生物活性的代谢物^[10],为了开发大量生产烟曲霉酸的方法,本实验研究了金龟子绿僵菌在含熊果酸溶液的培养基中,生物转化生成烟曲霉酸,并对烟曲霉酸的生物转化条件进行正交优化,为未来工业化生产烟曲霉酸提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器设备

LC-10ATVP plus 高效液相色谱仪(日本岛津公

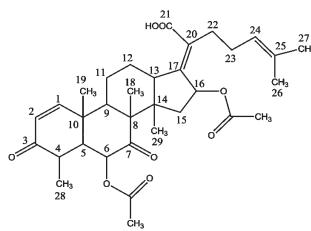


图 1 烟曲霉酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of helvolic acid

司), Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本岛津公司), HZQ-C 恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司), SHZ-D(Ⅲ) 循环水多用真空泵(巩义市予华仪器), SW-CJ-IG 单人净化工作台(苏州净化), IC402 生化培养箱(YAMATO), AL104 电子天平(梅特勒-托利多), R204 旋转蒸发器(上海申生科技), 玻璃层析柱(上海精科实业有限公司), G254 硅胶薄层板(青岛海洋化工厂), 立式冰箱(青岛海尔股份有限公司), 恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司), 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), 全自动高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂), BRUKER AV600 型核磁共振仪, 电喷雾电离质谱仪(ESI-MS)。

1.2 原料与试剂

金龟子绿僵菌(上海中科院研究所)。熊果酸试药(纯度质量分数为 95%, 华南农业大学食品学院萃取分离实验室提取), 吐温 80(天津市大茂化学试剂厂), 乙腈(色谱纯, Fisher 公司), 甲醇(分析纯/色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂/Fisher), 乙酸乙酯(天津市富宇精细试剂有限公司), 超纯水(超纯水机制备)。

2 实验方法

2.1 生物转化条件及步骤

生物转化培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)液体培养基(121 °C, 高压灭菌 20 min)。

培养条件: 28 °C 下摇床培养, 摆床转速为 160 rpm, 培养 24 h 后菌体进入成熟期。

生物转化实验分反应组和空白组。反应组: 菌体进入成熟期后, 加入熊果酸吐温 80 溶液 2 mL(70 mg 熊果酸, 7 mL 蒸馏水, 0.5 mL 吐温 80 超声混匀), 继续摇床培养 3 d; 空白组: 菌体进入成熟期后, 不加任何物质, 继续摇床 3 d。

2.2 转化产物的分离纯化

2.2.1 粗提

分别对反应组和空白组的生物转化产物进行固液分离, 将固体碾碎处理后加入 2 倍体积的乙酸乙酯, 超声提取 15 min 后, 过滤, 滤液经真空浓缩至干, 用甲醇溶解, 备用。

2.2.2 分离

对粗提物进行正相硅胶柱分离, 100~200 目的硅胶于 105 °C 恒温活化 30 min, 用洗脱剂浸泡过夜, 匀浆湿法装柱, 用洗脱剂以一定流速淋洗色谱柱使之达到平衡状态, 按 50:1 上样, 洗脱剂为环己烷: 乙酸乙酯: 乙酸, 依次按 40:5:1、30:5:1 和 20:5:1 梯度洗脱, TLC 监测流出组分, 得到的物质进行 60 °C 烘干, 备用。

2.2.3 纯化

将分离得到的晶体移入锥形瓶中, 加入甲醇至刚好完全溶解, 再加入少许水至出现浑浊, 50 °C 水浴加热溶解后, 将锥形瓶置于 5 °C 冰箱中至晶体完全析出, 提取晶体并于烘干至恒重, 备用。

2.3 转化产物的检测及结构鉴定

2.3.1 HPLC 检测条件

流动相为乙腈: 水(65:35, V:V), 等度洗脱; 检测波长为 210 nm, 流速为 1.0 mL/min, 进样方式为手动进样, 进样量为 10 μL。

2.3.2 结构鉴定

对纯化的产物用¹H NMR 和¹³C NMR 经 BRUCKER AV600 型核磁共振仪进行分子结构表征, 并通过 ESI-MS 确定它的分子量。

2.4 生物转化条件的优化

2.4.1 菌接种量对转化的影响

分别接种一定量的金龟子绿僵菌悬液于盛有 100 mL PDA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 使最终孢子浓度分别达到 10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 个/mL, 菌体培养 48 h 后投入 2 mL 熊果酸吐温溶液, 摆床培养, 转速为 160 rpm, 培养基 pH 为 6.5, 温度为 28 °C, 培养时间为 72 h。所得菌体分别进行减压抽滤, 用蒸馏水洗涤, 混合洗涤液与滤液, 浓缩滤液, 然后进行液相检测, 测得产物产率。

产率测定: 采用 2.3.1 项下所述 HPLC 法, 采用峰面积归一化计算转化率。

2.4.2 培养基初始 pH 对转化的影响

采取不同的培养基 pH, 用 6N HCl 和 6N NaOH 分别将初始培养基 pH 调整为 3.5、4.5、5.5、6.6 和 7.5, 其它培养和检测条件同 2.4.1 所示。

2.4.3 不同培养温度对转化的影响

分别在不同温度下对绿僵菌进行培养转化,分别为24、26、28、30、32℃,其它培养和检测条件同2.4.1所示。

2.4.4 不同培养时间对转化的影响

在培养时间分别为24、36、48、60、72、84 h下培养,其它培养和检测条件同2.4.1所示。

2.4.5 不同摇床转速对转化的影响

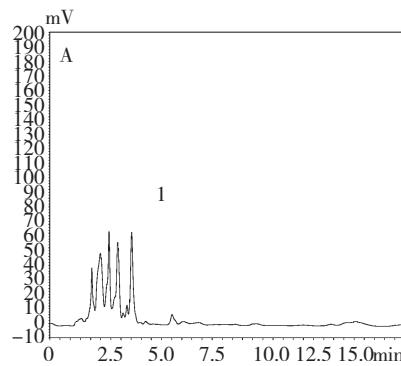
采取不同的摇床转速,分别采取120、140、160、180和200 rpm,其它培养和检测条件同2.4.1所示。

2.4.6 不同熊果酸接种量对转化的影响

通过分别加入一定量的不同浓度的熊果酸对金龟子绿僵菌进行培养转化,分析熊果酸浓度对金龟子绿僵菌在含熊果酸培养基中生物转化产物产率的影响。加入熊果酸的浓度分别为0.1、0.4、0.7、1.0、1.3 mg/mL,其它培养和检测条件同2.4.1所示。

2.4.7 转化工艺条件的优化实验

根据单因素实验结果,主要考察转化温度、培养基pH、摇床转速三个因素,考虑的因素及其水平见表2。根据因素和水平,采用正交表L₉(4³)进行了



1:生物转化产物;2:熊果酸;1:biotransformation product;2:ursolic acid

图2 金龟子绿僵菌在不含熊果酸溶液(A)和含熊果酸溶液(B)培养基中生物转化产物的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the biotransformation products of the *M. anisopliae* in medium without (A) and with (B) ursolic acid

3.1.2 结构鉴定

化合物1为白色针状晶体(CDCl₃),mp. 202~205℃,ESI-MS m/z:567 [M-H]⁻. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.31 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-1), 5.88 (1H, m, overlapped, H-16), 5.87 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), 5.24 (1H, s, H-6), 5.11 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-24), 2.77 (1H, m, H-4), 2.62 (1H, m, H-9), 2.59 (1H, m, H-13), 2.49 (2H, m, H-22), 2.44

9组实验,结果见表2。

表1 转化工艺正交实验的因素及水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment of the biotransformation process

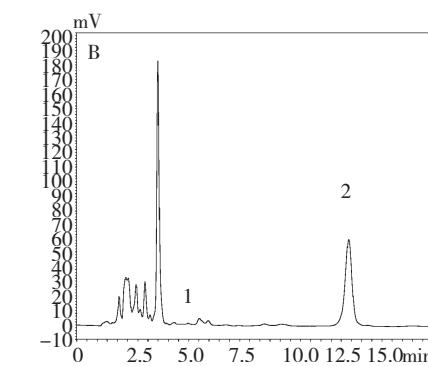
水平 Level	因素 Factor			空白列 Blank column
	(A) 温度 Temperature(℃)	(B) pH	(C) 转速 Rotation speed(rpm)	
1	26	5.5	140	0
2	28	6.5	160	0
3	30	7.5	180	0

3 结果与分析

3.1 金龟子绿僵菌在含熊果酸培养基生物转化产物的HPLC检测及结构鉴定

3.1.1 液相检测结果与分析

图2为金龟子绿僵菌在加(B)和未加(A)熊果酸溶液的液体培养基中生物转化产物的HPLC指纹图谱。从HPLC指纹图谱可见,化合物1的出峰时间为4.25 min,且在加入熊果酸的培养基中化合物1的产量明显增加。



(1H,m,H-12), 2.27 (1H,d,J = 12.0 Hz,H-5), 2.21 (1H,m,H-15), 2.15 (1H,m,H-23), 2.11 (3H,s,6-OCOCH₃), 2.11 (1H,m,H-23), 1.99 (1H,m,H-11), 1.95 (3H,s,16-OCOCH₃), 1.91 (1H,d,J = 14.8 Hz,H-15), 1.81 (1H,m,H-22), 1.69 (3H,s,H-26), 1.61 (3H,s,H-27), 1.57 (1H,m,H-11), 1.45 (3H,s,H-19), 1.28 (3H,d,J = 6.6 Hz,H-28), 1.18 (3H,s,H-18), 0.93 (3H,s,H-

29); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 157.0 (C-1), 127.8 (C-2), 201.2 (C-3), 40.4 (C-4), 47.3 (C-5), 73.8 (C-6), 208.8 (C-7), 52.7 (C-8), 41.6 (C-9), 38.1 (C-10), 23.9 (C-11), 25.9 (C-12), 49.4 (C-13), 46.6 (C-14), 40.7 (C-15), 73.4 (C-16), 147.7 (C-17), 18.2 (C-18), 27.2 (C-19), 130.2 (C-20), 173.3 (C-21), 28.7 (C-22), 28.3 (C-23), 122.8 (C-24), 132.9 (C-25), 25.7 (C-26), 17.7 (C-27), 13.1 (C-28), 17.9 (C-29); 168.8, 20.7 (6- OCOCH_3), 170.0, 20.5 (16- OCOCH_3)。以上数据和文献^[11]报道基本一致,故鉴定该化合物结构为烟曲霉酸(helvolic acid,图1)。

3.2 金龟子绿僵菌在含熊果酸的培养基中生物转化条件的优化

3.2.1 菌接种量对转化的影响

菌接种量对熊果酸生物转化情况的影响结果如表2所示。

表2 孢子浓度对化合物1产率的影响

Table 2 Production rate of compound 1 with different concentrations of mycelium morphology

孢子浓度 Spore Concentration (个/mL)	菌丝体形态 Mycelium Morphology	化合物1产率 Production Rate (%)
10^4	球状(直径约3~4 mm)	7.90
10^5	球状(直径约2~3 mm)	11.91
10^6	球状(直径约0.5~1 mm)	17.50
10^7	丝状	13.62

由表2可见,当孢子悬浮液的浓度太低时,菌量少,菌丝体呈大的球状,此时菌体不易接触到氧气,故产率底,当孢子的浓度为 10^6 个/mL时,菌丝体呈细小的微粒状,此时营养物质和氧气的传递效果好,有利于产率提高。当孢子悬浮液的浓度达到 10^7 个/mL时,产率有所下降,这是因为菌量增大会影响氧的传递,而且营养物质会过早消耗完,不利于生成新的物质。由此确定最佳孢子悬浮液浓度为 10^6 个/mL,以下的实验均采用此孢子悬浮液浓度。

3.2.2 培养基初始pH对转化的影响

培养基初始pH对熊果酸生物转化影响结果如图3所示。

从图3中可以看出pH在6~7之间时,有较高的产率,此pH为酶的最佳pH,因此得出最适pH为6.5。

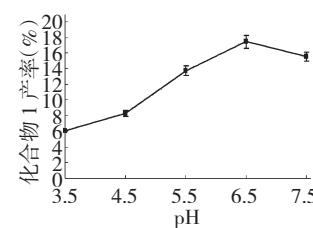


图3 pH对化合物1产率的影响

Fig. 3 Production rate of compound 1 with medium of different pH values

3.2.3 不同培养温度对转化的影响

不同温度下对绿僵菌进行培养转化的结果如图4所示。

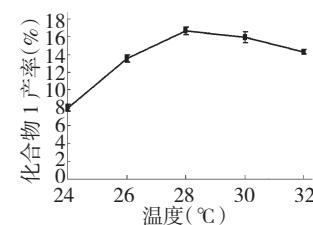


图4 温度对化合物1产率的影响

Fig. 4 Production rate of compound 1 under different temperatures

在25 °C时,菌丝生长较慢,代谢能力弱,进入稳定期迟,在30 °C和32 °C时在孢子萌发和菌体生长快,温度高,对菌体产生不利的影响,细胞功能下降,易老化死亡,造成菌体生长异常,产率低。如图显出在28 °C时,产率最高。因此确定培养温度为28 °C。

3.2.4 不同培养时间对转化的影响

不同温度下对绿僵菌进行培养转化的结果如图5所示。

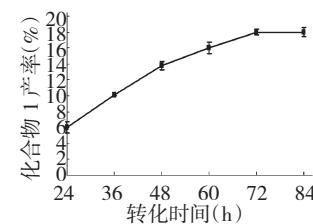


图5 转化时间对化合物1产率的影响

Fig. 5 Production rate of compound 1 with different conversion times

由图5可以看出,72 h时产率达到最大值,72 h后产率不再增大,因此选取最佳转化时间为72 h。

3.2.5 不同摇床转速对转化的影响

不同摇床转速下绿僵菌进行培养转化的影响结果如图6所示。

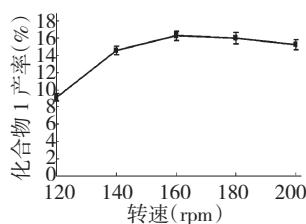


图 6 摆床转速对化合物 1 产率的影响

Fig. 6 Production rate of compound 1 with different rotation speeds of the table concentrator

由图 6 可以看出,随着摇床转速增加,产率也增加,当转速达到 160 rpm 时,产率达到最高值,转速继续提高时,产率反而下降了,这是因为转速过高,剪切力过大破坏菌丝体生长,降低了产酶量,从而影响了反应进行。此后实验摇床转速控制为 160 rpm。

3.2.6 不同熊果酸接种量对转化的影响

不同熊果酸接种量对金龟子绿僵菌转化产物影响的结果如图 7 所示。

由图 7 可知,当熊果酸的添加量增加时,化合物 1 的产率也随之增加,当熊果酸在培养基中的浓度

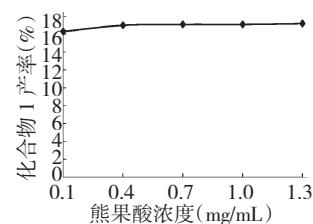


图 7 熊果酸浓度对化合物 1 产率的影响

Fig. 7 Production rate of compound 1 with different concentrations of ursolic acid

从 0.1 mg/mL 增加到 0.4 mg/mL 时,化合物 1 的产率有所增加,当熊果酸浓度继续增加到 1.3 mg/mL 时,化合物 1 的产率变化不大。因此,为避免浪费又要保证反应充分进行,实验可以将熊果酸的添加浓度设定为 0.4 mg/mL。

3.2.7 转化工艺条件的优化实验

各种最优转化工艺条件单因素的组合并不一定能获得最佳的发酵结果,因此需进行正交设计进一步优化,以确定最佳转化工艺条件组合,结果如表 3 和表 4 所示。

表 3 转化工艺正交实验结果

Table 3 Results of the orthogonal experiment of the transformation process

水平 Level	温度 Temperature (°C)	pH	转速 Rotation speed (rpm)	空白列 Blank column	转化率 Conversion rate (%)
1	1	1	1	1	14.21
2	1	2	2	2	15.51
3	1	3	3	3	14.75
4	2	1	2	3	14.56
5	2	2	3	1	16.31
6	2	3	1	2	15.28
7	3	1	3	2	14.65
8	3	2	1	3	15.83
9	3	3	2	1	15.02
k_1	14.83	14.47	15.11	15.18	
k_2	15.34	15.88	15.03	15.15	
k_3	15.17	15.02	15.24	15.05	
R	0.56	1.41	0.21	0.13	

表 4 转化工艺方差分析

Table 4 The variance analysis of the orthogonal experiment of the transformation process

因素 Element	SS	df	MS	F	P
温度 Temperature	0.48	2	0.24	16.56	0.06
pH	3.03	2	1.52	105.04	0.01
转速 Rotation Speed	0.06	2	0.03	2.27	0.31

Error	0.29	2	0.01
Total SS	3.61	8	

由表3和表4进行显著性可知, $P_{\text{pH}} < 0.05$, 而 $P_{\text{温度}}$ 和 $P_{\text{转速}}$ 都大于0.05, 即培养基pH对实验结果有显著性影响而培养温度和摇床转速则无显著影响, 影响因子主次顺序为:pH>温度>转速;且极差分析确定的最佳工艺为温度、pH、转速分别为28℃、6.5、180 rpm, 方差分析确定最佳转化条件为:温度、pH、转速分别为28℃、6.5、160 rpm。结果以方差分析为准, 因此, 金龟子绿僵菌在含熊果酸的培养基中的最佳转化条件为:培养基pH为6.5, 摆床转速为160 rpm, 反应温度为28℃。

4 结论

通过对金龟子绿僵菌在含熊果酸溶液的培养基中生物转化的主要产物的HPLC分析及结构鉴定, 可知该产物为烟曲霉酸, 一种抗菌物质, 而利用该转化方法生产烟曲霉酸的最佳发酵条件为: 培养基pH、摇床转速、反应温度分别为6.5、160 rpm、28℃。本研究还表明, 烟曲霉酸在加入熊果酸的培养基中的产量大大增加, 由此可以得知熊果酸对烟曲霉酸的生成具有促进作用, 然而, 是否由金龟子绿僵菌生物转化熊果酸使得烟曲霉酸的含量增加则有待进一步研究。随着科技的发展, 越来越多的学者开始研究并利用微生物转化技术生产低毒、低残留的新药物。利用金龟子绿僵菌作为媒介、熊果酸作为底物发酵生产烟曲霉酸的研究, 将为利用微生物转化技术进行药物的结构修饰以生产更强功效的药物提供参考。

参考文献

1 Sun JB(孙家宝), Deng X(邓勋), Song XS(宋小双). Biological property and virulence measurement of *Metarhizium anisopliae*. *Forest By-product and Speciality in China*(中国林副特产), 2007, 3:17-19.

- 2 Qiu H(裘晖), Wu ZQ(吴振强), Liang SZ(梁世中). *Metarhizium anisopliae and its mechanism for killing insects*. *Chinese Journal of Pesticides*(农药), 2004, 43:342-345.
- 3 Angela Pinheiro, Tida Dethou, Ju lia Bessa, et al. A new bicyclic sesquiterpene from the marine sponge associated fungus *Emericellopsis minima*. *Phytochemistry*, 2012, 5:68-70.
- 4 Li Y, Song YC, Liu JY, et al. Anti-helicobacter pylori substances from endophytic fungal cultures. *Microbiol Biotechnol*, 2005, 21:553-558.
- 5 Lee Si-Young, Hiroshi Kinoshita, Fumio Ihara, et al. Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* grown in medium with insect component. *Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105:476-480.
- 6 Feng C, Ma Y. Isolation and anti-phytopathogenic activity of secondary metabolites from *Alternaria* sp. FL25, an endophytic fungus in *Ficus carica*. *Appl Environ Biol*, 2010, 16:76-78.
- 7 Ro DK, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the anti-malarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440:940.
- 8 Zhang LP(张利平), Cheng KL(程克棣), Zhu P(朱平). Biotransformation of taxanes. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2004, 39:153.
- 9 Espada A. Effect of the cyclopeptolide 90-215 on the production of destruxins and helvolic acid by *Metarhizium anisopliae*. *J Ind Microbiol& Biotech*, 1997, 19:7-11.
- 10 Suthitar S, Hiroshi K, Fumio I, et al. Cloning and functional analysis of the second geranylgeranyldiphosphate synthase gene influencing helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 10:1077-1088.
- 11 Chen C(陈超), Pan WD(潘卫东), Xiao JH(肖建辉), et al. Investigations on chemical constituents of methanolic extract from *Penicillium jiangxiense*. *Chin J Experim Trad Med Formulae*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:97-101.