

高效液相法测定明党参内生菌对其呋喃香豆素的生物转化

叶晓婉, 马明莉, 李宇, 范淑恒, 王星哲, 朱大恒*

郑州大学生命科学学院, 郑州 450000

摘要:为了探究明党参内生菌对其三种呋喃香豆素成分的生物转化作用,本文采用平板培养法分离明党参内生菌株。通过HPLC法测定明党参原粉培养液经明党参内生菌发酵后欧前胡素、异欧前胡素、补骨脂素三种呋喃香豆素成分的含量。采用Promosil C₁₈-BIO色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm),流速1.0 mL/min,柱温30 °C,流动相配比为乙腈:水=80%:20%,检测波长203 nm。菌株NMY1、PMG3、NMG10和NMJ10能提升三种呋喃香豆素成分含量,其中菌株NMJ10和NMY1的促进作用最佳;内生菌NMY1和NMJ10发酵明党参培养液在24 h时呋喃香豆素总量最高,菌株PMG3和NMG10在发酵48 h时三种呋喃香豆素成分总含量最高;菌株NMJ10、NMY1、NMG10对三种呋喃香豆素类成分总含量的增加比例分别为17.47%、17.26%、16.16%;菌株在整个发酵过程中对欧前胡素这一成分的含量有显著的提高作用,更有利于欧前胡素成分的转化合成。研究表明明党参内生菌NMY1、PMG3、NMG10和NMJ10对明党参三种呋喃香豆素成分的含量具有生物转化作用。

关键词:明党参内生菌; 呋喃香豆素; 生物转化; 高效液相色谱

中图分类号:Q939.96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0054-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.010

Determination of the biotransformation of the furocoumarins by endophytes from *Changium smyrnioides* Wolff by high performance liquid chromatography

YE Xiao-wan, MA Ming-li, LI Yu, FAN Shu-heng, WANG Xing-zhe, ZHU Da-heng*

School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450000, China

Abstract: To explore endophytes from *Changium smyrnioides* Wolff have biotransformation effects on its three furanocoumarins components, the endophytic strains from *Changium smyrnioides* Wolff were separated by plate culture method. After fermentation of *Changium smyrnioides* Wolff raw powder culture medium of endophytes from *Changium smyrnioides* Wolff, the content of three furanocoumarin components of imperatorin, isoimperatorin and psoralen was determined by HPLC. The samples were separated on a Promosil C₁₈-BIO column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (80:20) as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, the temperature of column was 30 °C, and the detection wavelength was 203 nm. Strains NMY1, PMG3, NMG10 and NMJ10 can increase the content of three furocoumarin components, among which the strains NMJ10 and NMY1 have the best promoting effect. The endophytes NMY1 and NMJ10 had the highest total amount of furocoumarins by fermenting the *Changium smyrnioides* Wolff culture liquid at 24 h, and the strains PMG3 and NMG10 had the highest total content of the three furocoumarin components at 48 h of fermentation. The increasing proportions of strains NMJ10, NMY1 and NMG10 on the total content of three furocoumarins were 17.47%, 17.26% and 16.16%, respectively. The strains have a significant improvement on the content of imperatorin in the whole fermentation process, and it is more conducive to the conversion synthesis of imperatorin components. It is studied that the endophytes NMY1, PMG3, NMG10 and NMJ10 from *Changium smyrnioides* Wolff have biotransformation effects on the content of three furanocoumarins components.

Key words: endophytes of *Changium smyrnioides* Wolff; furanocoumarin; biotransformation; HPLC

收稿日期:2019-01-09 接受日期:2019-04-02

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(19A180031);郑州大学生创新创业训练计划(2018cxy412);郑州大学生创新创业训练计划(2017cxy371);中国烟草总公司科技重点项目(110201402011)

*通信作者 E-mail: zhudaheng2000@aliyun.com

目前,从植物尤其是药用植物内生菌的生物转化功能中寻找和发现新的药用活性化合物已成为国内外研究的一个热点^[1-4]。许多研究表明,微生物转化在绿色化学领域高度活跃,内生菌不仅可以参与

药用植物自身化学药物的合成,还可对宿主本身的次级代谢产物进行转化修饰,而且可通过独立培养,产生丰富多样的次级代谢产物。明党参以根入药,具有润肺化痰、养阴和胃、平肝、解毒之效,并用于肺热咳嗽,呕吐反胃,食少口干,目赤眩晕,疗毒疮疡,滋补强壮^[6,7]。新近研究表明,明党参可以降低血清胆固醇及甘油三酯,有控制血小板聚集和抗凝血作用。呋喃香豆素类是明党参中的一大类成分,其能够抑制多种肿瘤细胞的繁殖、影响药物代谢酶的活性,是天然的活性物质^[5,11]。本实验从明党参中分离内生菌,并进行内生菌的发酵、提取,分析明党参内生菌对呋喃香豆素类成分的影响,以期获得具有优良转化活性的内生菌株,并探究利用内生菌增加呋喃香豆素类成分的含量,获得具有开发利用价值的欧前胡素(imperatorin,1)、异欧前胡素(isoimperatorin,2)、补骨脂素(psoralen,3),或通过生物转化产生新的药源香豆素衍生物或代谢产物。开展明党参植物体内生菌分离筛选与鉴定、呋喃香豆素类成分的生物合成与转化等研究,可为微生物资源和药用成分开发提供理论依据,有利于发现新的药源香豆素衍生物或代谢产物,具有重要创新意义和开发潜力。

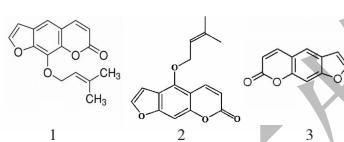


图1 化合物1~3的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-3

1 材料

1.1 试验材料与药品

试验用明党参(*Changium smyrnioides* Wolff)采自郑州某中草药种植田,欧前胡素(imperatorin,BMS7-AJUW,中国食品药品检定研究院),异欧前胡素(isoimperatorin,J26Q-3FA6,中国食品药品检定研究院),补骨脂素(psoralen,YA5F-2XML,中国食品药品检定研究院),乙腈(色谱纯),超纯水,超滤装置,离心机,超声清洗机,0.22 μm有机过滤膜,0.22 μm水系过滤膜,一次性无菌进样器,1.5 cm无菌进样瓶,自动进样器,粉碎机。

1.2 培养基配制

营养琼脂培养基(nutrient agar,NA)、营养肉汤培养基(nutrient broth,NB):青岛海博生物技术有限公司。

明党参培养基(*Changium smyrnioides* Wolff medium):取明党参干根若干,放入粉碎机中粉碎5~10 min,成粉末状,过筛,分装,密封保存。精称明党参粉末0.5 g,溶于50 mL 60 °C左右的超纯水中,包扎,0.1 MPa、121 °C下高压蒸汽灭菌20 min。

1.3 色谱条件

Promesil C₁₈-BIO色谱柱(4.6×250 mm,5 μm),流速1.0 mL/min,柱温30 °C,检测波长203 nm,进样量10 mL,在下述条件下经梯度洗脱:0~5 min,100%~80%乙腈;5~10 min,80%~70%乙腈;10~15 min,70%~60%乙腈;15~20 min,60%~50%乙腈;20~25 min,50%~40%乙腈;25~30 min,40%~30%乙腈;30~35 min,30%~20%乙腈;35~40 min,20%~10%乙腈;流动相最终确定水:乙腈为20:80,欧前胡素、异欧前胡素、补骨脂素和其他杂质峰达到了基线分离,各对照品高效液相色谱图见图2。

2 实验方法

2.1 明党参内生菌的分离

取明党参的组织部位(根、茎、叶),用自来水冲洗明党参表面的泥土和其他杂质,并在干净的自来水中浸泡1 h。过后移入无菌超净工作台,用无菌水再次冲洗3遍,用无菌滤纸吸干表面的水分。进行“75%乙醇-2.5%次氯酸钠-75%乙醇”的三步表面消毒法(根组织:75%乙醇浸泡3 min,2.5%次氯酸钠7 min,75%乙醇浸泡20 min;茎组织:75%乙醇浸泡3 min,2.5%次氯酸钠5 min,75%乙醇浸泡18 min;叶组织:75%乙醇浸泡2 min,2.5%次氯酸钠3 min,75%乙醇浸泡15 min),表面消毒过后的植物组织,分别用无菌水冲洗6次,再用无菌滤纸吸干组织表面的水分。并用灭菌后的镊子、剪刀、无菌刀片分别将明党参的根与叶组织剪切成0.5 cm×0.5 cm的小块,明党参的茎剪切成长度约为0.5 cm的组织。在NA、PDA、高氏一号培养基的平板上,分别等距接种4个根、茎、叶组织块,每个处理重复3次。将平板依次放置到37、28、30 °C培养箱中,观察平板中组织边缘菌落生长状况。

表面消毒效果的检验:对照组实验采用组织印迹法,将经过以上消毒处理的根、茎、叶组织放入NA、PDA、高氏一号培养基内,使灭菌材料表面与培养基接触20 min左右,再移开明党参组织块,将其置于相同条件下培养相同时间,检验平板是否有菌

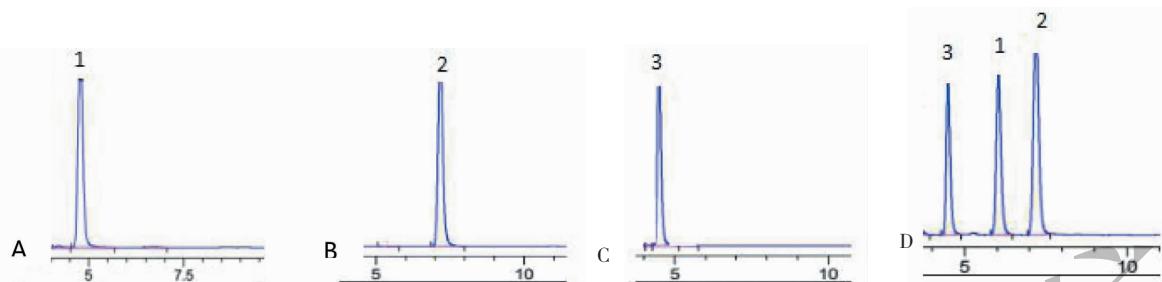


图2 明党参中三种呋喃香豆素的对照品及混合对照品高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of reference substance and mixed reference of three furocoumarins in *Changium smyrnioides wolff*

注:A-欧前胡素标准品样品;B-异欧前胡素标准品样品;C-补骨脂素标准品样品;
D-混合对照品样品;1-欧前胡素;2-异欧前胡素;3-补骨脂素。

Note: A-imperatorin standard sample; B-isoimperatorin standard sample; C-psoralen standard sample;
D-mixed reference sample; 1-imperatorin; 2-isoimperatorin; 3-psoralen.

落长出。空白对照实验采用植物最后一次表面消毒的无菌水清洗液作为阴性对照,取90 μL涂布于空白分离培养基上,同实验组相同条件下培养相同的天数,若没有菌落长出,说明植物表面消毒彻底,则实验组分离出来的菌株为内生菌。

2.2 明党参内生菌的筛选

待平板中组织块边缘长出肉眼可见的菌落后,用接种环挑取少许边缘菌落接种到新的NA培养基中,37 ℃恒温箱中倒置培养,待菌落生长后重复此操作6次以上,直到经多次纯化后,得到单一纯菌落。将各优势菌株接种到明党参培养基的平板上,挑选能在此特定培养基上优势生长的菌株,命名并标记,定期观察,选取优势菌株甘油冷冻法保藏备用。

2.3 明党参内生菌发酵液的处理

配置13瓶50 mL的明党参液体培养基,分别接人在明党参液体培养基中培养12 h的菌株NMY1、NMJ10、NMG10、PMG3,其中1瓶不接菌液(作对照)。每隔24 h从各菌株发酵液中取7.5 mL放置于已灭菌的离心管中,4 ℃、12 000 rpm下离心10 min,离心后分开上清液与沉淀,分别加入10 mL甲醇,超声提取30 min后,在30 ℃、150 rpm下摇匀30 min,再进行超滤、定容10 mL。在超净工作台中,用一次性无菌进样器在0.22 μm有机过滤膜下,在2 mL无菌进样瓶中加入约1 mL的已处理过的发酵液。

2.4 对照品溶液配制

精密称取欧前胡素对照品4.97 mg,异欧前胡素对照品4.64 mg,补骨脂素对照品5.33 mg,分别

溶于25 mL甲醇中,制得1 mL含有199.8 μg的欧前胡素对照品溶液,1 mL含有185.6 μg的异欧前胡素对照品溶液,1 mL含有213.2 μg的补骨脂素对照品溶液。

2.5 混合对照品溶液配制

精密吸取2.4中配制的对照品欧前胡素溶液1 mL,异欧前胡素溶液2 mL,补骨脂素溶液1 mL,置于10 mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得欧前胡素、异欧前胡素、补骨脂素质量浓度分别为19.98、37.12、21.32 μg/mL的混合对照品溶液。

2.6 供试品溶液配制

精密称定明党参样品粉末0.5 g,置10 mL容量瓶中,超声提取30 min,混合摇匀,超滤,取续滤液加入10 mL容量瓶,加提取溶剂定容至刻度。进样前用0.22 μm微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.7 高效液相测定三种呋喃香豆素含量的线性关系、定量限考察

精密吸取2.4项下欧前胡素对照品、异欧前胡素对照品、补骨脂素对照品溶液10 μL,2.5项下的混合对照品溶液5,10,15,20,25,30 μL,注入高效液相色谱仪,按1.3项下色谱条件分别进样测定,测定其出峰时间和峰面积。以各峰面积作为纵坐标(y),以各对照品溶液进样量作为横坐标(x),进行线性回归计算,即得三者线性方程。得到欧前胡素、异欧前胡素和补骨脂素回归方程分别为: $y = 9231.7x - 577.92 (R^2 = 0.9999)$; $y = 7288x - 838.59 (R^2 = 0.9999)$; $y = 6776x - 447.61 (R^2 = 0.9996)$ 。结果表明欧前胡素进样量在0.0390~0.9740 μg,异欧前胡素进样量在0.0054~0.1352 μg之间呈

良好的线性关系。

2.8 样品的测定

按“2.3”项下方法制备样品溶液,用自动进样器精密吸取“2.3”中的发酵液 10 μL ,并按“1.3”项下色谱条件进行测定,每隔 24 h,分别测定各发酵液上清液和沉淀中所含欧前胡素、异欧前胡素和补骨脂素的含量,并记录。

3 结果与讨论

3.1 明党参内生优势菌株的鉴定

经过培养特征、形态特征、生化特征、全自动微生物质谱检测、16S rDNA 基因序列分析和系统进化树分析对菌株进行了分类学鉴定。经过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、纯化回收 DNA 目的条带、PCR 引物测序,通过 BLAST 同源性比对,结果表明,菌株与芽孢杆菌菌株具有高度同源性。选取与内生优势菌株同源性较高的 10 株菌株的 16S rDNA 基因序列构建系统发育进化树,结果见图 5。结合菌株形态特征、生化特性、全自动微生物质谱鉴定结果,初步鉴定菌株 NMJ10 为芽孢杆菌属新种 (*Bacillus spp.* NMJ10),菌株 NMY1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* NMY1),菌株 PMG3 为芽孢杆菌属新种 (*Bacillus spp.* PMG3),菌株 NMG10 为假蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus pseudomycoides* NMG10)。

3.2 明党参内生优势菌株对三种呋喃香豆素成分的生物转化

3.2.1 四株明党参内生优势菌株对发酵液中三种呋喃香豆素成分的含量对比

在明党参内生优势菌株 NMY1、PMG3、NMG10、NMJ10 对明党参培养液的发酵过程中,可看出,菌株 NMJ10 和 NMY1 对三种呋喃香豆素类成分的转化作用最佳。菌株在整个发酵过程中对欧前胡素这一成分的含量有显著的提高作用,可证明更有利于欧前胡素成分的转化合成。由图 3 可知,在整个发酵过程中,相对于对照组,经过菌株 NMJ10、NMY1、NMG10、PMG3 发酵后的明党参培养液,三种呋喃香豆素类成分欧前胡素、异欧前胡素和补骨脂素总含量的增加比例分别为 17.47%、17.26%、16.16%、2.03%,其中菌株 NMJ10 为芽孢杆菌菌株种。

3.2.2 明党参内生优势菌株发酵液中上清液与沉淀中三种呋喃香豆素成分的含量对比

分析明党参发酵原液、含 NMY1、PMG3、NMG10 和 NMJ10 的 4 种明党参菌悬液经过 24、48、72 h 发

酵并离心后上清液、沉淀及总和中各自所含欧前胡素、异欧前胡素和补骨脂素的含量可知,五种样品的上清液和沉淀中所含的欧前胡素、异欧前胡素及补骨脂素的含量大致相等,总含量大致是上清液或沉淀的二倍。如下图 4 所示,菌株 PMG3 的明党参发酵液中上清液和沉淀中所含的异欧前胡素的含量,由此证明菌株 PMG3 可发酵明党参培养基增加呋喃香豆素类成分的含量,菌体细胞可利用明党参培养基中的有效成分产生呋喃香豆素类成分。

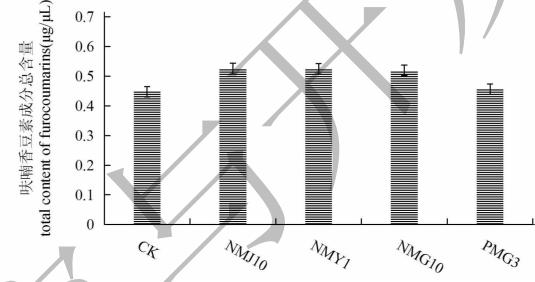


Fig. 3 The content of furocoumarins of four dominant strains

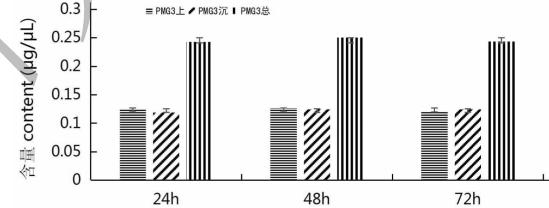


Fig. 4 The content of isoimperatorin in fermentation liquid of PMG3 strain

3.2.3 不同时期明党参内生优势菌株发酵液中三种呋喃香豆素成分的含量对比

在整个发酵过程中,发酵 48 h 内菌株 NMY1、PMG3、NMG10 和 NMJ10 对 3 种呋喃香豆素成分含量有显著的提升作用。菌株 PMG3 和 NMG10 两株内生菌发酵的明党参菌悬液在 24、48、72 h 这 3 个时期中呋喃香豆素总量呈先上升后下降趋势,发酵过程中呋喃香豆素类成分变化特点显著;而菌株 NMY1 和 NMJ10 两株内生菌发酵的明党参菌悬液在 24 h 左右呋喃香豆素总量最高,可能与该种菌的生长与代谢速度相关。由下表 1 可知,菌株 NMG10 在发酵 72 h 内,相较于原液三种呋喃香豆素类成分含量变化,欧前胡素含量虽较低,但对比初始值其增加的比例最高,在 48 h 左右总含量最高。

表 1 不同时期菌株 NMG10 的发酵液中三种呋喃香豆素成分的含量

Table 1 The content of three furocoumarins components in the fermentation liquid of NMG10 strain in different periods

| 呋喃香豆素成分含量 Content of furocoumarins ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 时间 Time | | |
|---|---------|---------|---------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 欧前胡素 Imperatorin | 0.130 9 | 0.131 0 | 0.065 4 |
| 异欧前胡素 Isoimperatorin | 0.123 8 | 0.246 6 | 0.123 3 |
| 补骨脂素 Psoralen | 0.143 9 | 0.141 9 | 0.146 5 |
| 总量 Total amount | 0.398 6 | 0.519 5 | 0.335 2 |

图 5 内生菌株基于 16S rDNA 序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of the stains

4 结论

本实验从明党参中分离内生菌，并对明党参发

酵液进行发酵、提取，结果表明明党参内生菌 NMY1、PMG3、NMG10 和 NMJ10 对明党参三种呋喃香豆素成分具有生物转化作用。开展明党参植物体内生菌分离筛选与鉴定、呋喃香豆素类成分的生物合成与转化等研究，对发现新的药源香豆素衍生物或代谢产物具有重要研究意义提供了巨大的开发潜力，有利于开发新的微生物资源和药用成分。明党参内生菌的生物转化作用之所以能使发酵液中呋喃香豆素类成分的含量增高原因大致有：内生菌发酵明党参培养液产生的次生代谢物有呋喃香豆素类成分，或为合成三种呋喃香豆素成分的底物或中间底物，或能提高酶活性；或含有促进生成三种呋喃香豆素合成酶的成分等。

参考文献

- Sun K, Liu J, Gao Y, et al. Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium Pseudomonas sp. Ph6-gfp [J]. Sci Rep, 2014, 4:5462.
- Shen L, Li LY, Zhang XJ, et al. A new indole derivative from endophyte Myrothecium roridum IFB-E091 in Artemisia annua [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2015, 50:1305-1308.
- Jia L, Chen SY, Zhai YG, et al. Recent advances in studies on endophytes and their associated bioactive products. [J]. China Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38:1750-1754.
- Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte[J]. J Ecol(生态学杂志), 2004, 23(2):86-91.
- Qiu Y, Fu C. Studies on the endangerment mechanism of and conservation strategies for *Changium smyrnioides* [J]. Biodiversity Sci(生物多样性), 2001, 9:151-156.
- Qiu YX, Huang AJ, Fu CX. Studies on genetic diversity in *Changium smyrnioides* Wolff(Umbelliferae) [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica(植物分类学报), 2000, 38:111-120.
- Liu SL, Ye JS, Chen CM, et al. A synthetic study on the Chinense Changium(Umbelliferae) [J]. Bull Bot Res(植物研究), 1991, 11(2):75-83.

(下转第 107 页)