

## 人源肠道菌中转化连翘苷制备连翘脂素的菌株筛选及固定化

郭雪健<sup>1,2</sup>, 李彬春<sup>3</sup>, 赵 邑<sup>2</sup>, 尉敬涛<sup>2</sup>, 张立伟<sup>1\*</sup><sup>1</sup>山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室;<sup>2</sup>山西省生物研究院; <sup>3</sup>山西大学生物技术研究所, 太原 030006

**摘要:**为了实现生物转化连翘苷制备连翘脂素, 本文以连翘脂素得率为指标, 采取涂布平板法和 16S rDNA 测序对人源肠道菌中可以转化连翘苷生成连翘脂素的菌株进行了筛选和鉴定; 为了提高菌株的使用稳定性和效率, 利用微生物固定化技术, 优化了固定化菌球的制备工艺以及转化连翘苷制备连翘脂素的工艺条件。从人源肠道菌中筛选到一株菌为肠杆菌科埃希氏属大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 该菌株可高效转化连翘苷生成连翘脂素, 且无副产物的生成。优化的固定化菌球制备工艺条件为: 海藻酸钠浓度 3%、氯化钙浓度 3.5%、交联时间 3 h。固定化菌球在 pH 值为 8、底物浓度为 0.8 mg/mL、温度为 39 °C 的条件下, 连翘苷在 25 h 左右可完全转化生成连翘脂素, 连翘脂素的平均得率可达 97.0%。并且固定化菌球循环使用 13 次后, 连翘苷的转化率仍能达到 70.2%。

**关键词:**连翘脂素; 连翘苷; 菌株筛选; 微生物固定化

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)12-2090-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.12.014

## Screening and immobilization of the strains for transforming phillyrin into phillygenin from human intestinal flora

GUO Xue-jian<sup>1,2</sup>, LI Bin-chun<sup>3</sup>, ZHAO Yi<sup>2</sup>, WEI Jing-tao, ZHANG Li-wei<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University;<sup>2</sup>Shanxi Biological Research Institute Co., Ltd.; <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** In order to biotransform phillyrin into phillygenin, the strains which could biotransform phillyrin into phillygenin were screened and identified from human intestinal flora by spreading plate method and 16S rDNA sequencing with the yield of phillygenin as the evaluation index. In order to improve the stability and efficiency of the strain, immobilized microorganism technology was used to optimize the preparation conditions for immobilization of bacterial balls and the reaction conditions for biotransformation of phillyrin into phillygenin. The results indicated that a novel *Escherichia coli* strain was isolated from human intestinal bacteria. The strain could efficiently biotransform phillyrin into phillygenin without the by-products. The optimized preparation conditions for immobilization of bacterial balls were as follows sodium alginate of 3%, calcium chloride of 3.5%, and crosslinking time of 3 h. Under substrate concentration of 0.8 mg/mL in pH 8.0 at 39 °C, the phillyrin was completely biotransformed into phillygenin in about 25 h, and the yield of phillygenin was 97.0%. Moreover, the transformation rate of phillyrin could still reach 70.2% after the immobilized balls were recycled for 13 times.

**Key words:** phillygenin; phillyrin; strain screening; microbial immobilization

连翘脂素, 主要存在于中药连翘、桂花、小白菊及石榴籽中。近年来, 人们发现连翘脂素具有多种药理活性, 如抗炎活性<sup>[1]</sup>、抑制人肺癌细胞株增

殖<sup>[2]</sup>、抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移<sup>[3]</sup>、调节自发性高血压大鼠收缩压和舒张压<sup>[4]</sup>等。连翘脂素是连翘苷脱糖后的苷元(见图1), Quan<sup>[5]</sup>、Mao等<sup>[6]</sup>研究发现连翘脂素在抗炎及抗癌效果上优于连翘苷, 此外, Ye等<sup>[7]</sup>发现连翘脂素的生物利用度较连翘苷高。目前, 连翘脂素的制备方法主要有两种: 直接从植物中提取和经由连翘苷转化获得。Wang等采用

收稿日期: 2021-07-22 接受日期: 2021-11-19

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省重点研发计划(201603D3114010)

\* 通信作者 Tel: 86-351-7018113; E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

发酵连翘叶的方式制备获得连翘脂素<sup>[8]</sup>。Mei等<sup>[9]</sup>从土壤中筛选得到一株具有转化连翘苷生成连翘脂素的霉菌,还有使用纤维素酶或酸水解连翘苷制备连翘脂素<sup>[10]</sup>。但以上方法都存在一些缺陷,如酶的

加入易造成乳化现象使产物难以分离制备;酸和霉菌可造成连翘脂素不稳定产生副产物。基于以上原因,目前还没有一种简单易行、完整可靠的转化方法,需进一步完善。

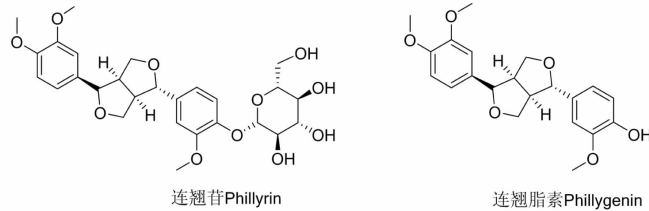


图1 连翘苷及连翘脂素结构式

Fig. 1 Molecular structures of phillyrin and phillygenin

有报道称连翘苷与人的肠道菌共孵育后会代谢产生连翘脂素。并且,连翘脂素可进一步代谢为小分子物质<sup>[11]</sup>。因此,本研究希望从人源肠道菌中筛选出可以高效转化连翘苷制备连翘脂素的菌,以弥补现有方法的不足,旨在为连翘脂素的进一步开发利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

GAM液体培养基、GAM固体培养基、革兰氏染色试剂盒(北京 Solarbio 生物科技有限公司);连翘苷(批号: MUST-18020210)、连翘脂素(批号: MUST-18072402)(成都曼思特生物科技有限公司);色谱甲醇(Fisher Scientific 上海公司)。

ACQUITY H-class UPLC(美国 Waters 公司); ionexUltiMate 3000 超高效液相色谱及四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪、Xcalibur 工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LAI-3T 厌氧培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司);高压蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司)。

### 1.2 菌株筛选

#### 1.2.1 肠道菌混悬液与培养基的制备

取健康成人的 4 g 中段粪便,立即溶于 20 mL 冰浴生理盐水中,搅拌均匀后经三层纱布过滤取上清,即为肠道菌混悬液<sup>[12]</sup>。

配置 GAM 液体培养基,灭菌后加入连翘苷至终浓度为 0.5 mg/mL。药物空白的 GAM 培养基为同法配置,但不含连翘苷。

#### 1.2.2 菌株初筛

菌株初筛的主要目的是确定混菌液中含有转化连翘苷的菌株,并利用连翘苷的抗菌作用缩小菌株

筛选范围<sup>[13]</sup>。具体方法为:量取 4 mL 含底物的 GAM 液体培养基于 5 mL 离心管中,加入肠道菌混悬液 1 mL,置于 37 °C 厌氧培养箱中培养 12 h 后取出。吸取 1 mL 转化液加入 4 mL 甲醇,离心去除蛋白,将上清液减压蒸干后,用 2 mL 乙酸乙酯溶解提取三次,过滤,合并溶解液减压蒸干,然后用 1 mL 甲醇复溶,过 0.22 μm 滤膜、UPLC 分析。同时做菌液空白及底物空白,各样平行 3 份。

#### 1.2.3 菌株复筛及纯化

取“1.2.2”中转化液,配制浓度为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 的菌液。取 100 μL 涂布平板,于 37 °C 下厌氧培养后挑取平板中形态及颜色不同的单菌落,于试管中划线培养再纯化,至同一试管中长出的菌落形态及颜色均相同,获得纯化的单克隆菌株。取 9 mL GAM 液体培养基于 10 mL 带盖 EP 管中,将单菌株扩增培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.7 ~ 0.8。

#### 1.2.4 转化模型的建立

主要采用 Guo 等<sup>[14]</sup>建立的人肠内菌体外转化模型,并略有修改。取 4 mL 含底物的 GAM 液体培养基于 5 mL 带盖 EP 管中,加入 1 mL 扩增的菌液,平行制备 11 份培养。分别于 0、1、3、5、7、9、11、13、15、25、35 h 取出一管。吸取 1 mL 加入 2 mL 甲醇中淬灭,并离心去除蛋白后按“1.2.2”中方法溶解转化产物分析。单菌株保存于终浓度为 20% 甘油中,置于 -80 °C 冰箱保存。

UPLC 色谱分析条件:使用 Waters ACQUITY H-class 型超高效液相色谱仪(UPLC),ACQUITY-UP-LC-BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(1.7 μm, 2.1 × 100 mm)。流动相为乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)。梯度洗脱(0

~4 min;10% →23% A;4 ~ 9.5 min:23% →23% A;  
9.5 ~ 11 min:23% →30% A;11 ~ 15 min:30% →  
40% A;15 ~ 17 min:40% →10% A;17 ~ 18 min:10%  
A)。流速 0.3 mL/min,检测波长 280 nm,柱温 40  
℃,进样量 2 μL。

标准曲线的绘制:以甲醇为溶剂配制浓度分别为 0.01、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL 的连翘苷对照品溶液,进行 UPLC 分析,绘制标准曲线。同法绘制连翘脂素对照品溶液标准曲线。

### 1.2.5 转化模型的方法学验证

#### 1.2.5.1 精密度考察

日内精密度的考察:在同一日内将连翘苷和连翘脂素对照品溶液各浓度的样品连续测定 6 次。根据标准曲线计算浓度和连续 6 次进样的相对标准偏差(RSD)和准确度(RE)<sup>[14]</sup>。日间精密度的考察:将各浓度的同一样品连续进样 3 天,每天进样 2 次。

#### 1.2.5.2 基质效应和回收率试验

按“1.2.2”中方法除去 GAM 培养基中的蛋白,再用其分别配制不同浓度的连翘苷和连翘脂素溶液,每个浓度平行 6 份,得到样品 A。然后,用甲醇代替除去蛋白的 GAM 培养基,同法配制,得到样品 B<sup>[14]</sup>。另用 GAM 培养基配制连翘苷和连翘脂素溶液,除去蛋白得到同样浓度的样品 C。分别分析 A、B 和 C,计算连翘苷和连翘脂素的浓度<sup>[14]</sup>,按照 A/B × 100% 和 C/A × 100% 计算基质效应和回收率。

#### 1.2.5.3 重复性考察

用 GAM 培养基配制 3 个不同浓度的连翘苷和连翘脂素溶液,每个浓度 6 份,除去蛋白得供试品溶液<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.6 液质联用对产物鉴定

采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)的方法,将连翘苷的转化产物与标准品比对保留时间、一级碎片和二级碎片来鉴定产物。

质谱参数为:离子源以电喷雾离子源(ESI)离子化方式;扫描模式:full scan/dd-MS<sup>2</sup>,正负离子切换并同时采集模式;正离子模式喷雾电压为 3.5 kV,负离子为 2.5 kV;质核比采集范围 100 ~ 1000;毛细管温度 320 ℃;鞘气体积流量 35 arb,辅助气体积流量 10 arb;加热器温度 300 ℃;碰撞量设定为 12.5、25 和 37.5 eV;分辨率设定为 MS full scan 35000 FWHM 以及 MS/MS 17500 FWHM<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.7 菌株鉴定

观察包括液体培养与平板培养后的菌株,并用

革兰氏染色法染色后进行显微观察。

16S rDNA 测序分析:本部分 16S rDNA 测序工作交由华大基因科技有限公司武汉分公司完成。利用 Premier 5.0 软件设计细菌的扩增引物得 27f:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG,1492R:TACGGYTACCTTGTTACGACTT。然后提取目的基因后扩增,通过琼脂糖凝胶电泳检测纯度,上机测序。将所得序列提交 NCBI 网站在线 Blast 分析序列的同源性,并与数据库中的序列进行比对分析,利用 MEGA 5.1 软件构建 16S rDNA 序列系统发育树。

#### 1.2.8 菌株转化的氧气条件考察

大肠杆菌 SXUXJ-1 为革兰氏阴性兼性厌氧菌,为了提高后续实验操作的简便性,需要对其转化条件的需氧性进行探究。在“1.2.4”的基础上只改变厌氧培养为普通培养箱中培养,其余条件均不改变,同时做厌氧培养对照。

### 1.3 菌株的固定化

#### 1.3.1 固定化菌球的制备

取 9 mL 不同浓度的海藻酸钠溶液,加入菌液 1 mL(平板菌落计数法<sup>[16]</sup>测得活菌数为  $3 \times 10^{11} \sim 4 \times 10^{11}$  CFU/mL),搅拌均匀后使用 1 mL 的注射器吸取溶液,在距离氯化钙溶液液面垂直距离为 10 ~ 15 cm 处,将海藻酸钠溶液匀速滴入氯化钙溶液中,边滴入边匀速摇动。静置交联后滤出菌球,用灭菌的生理盐水冲洗菌球 3 遍后备用。然后进行单因素条件探究,分别考察海藻酸钠浓度、氯化钙溶液浓度、交联时间对菌球比活力的影响。最后,通过正交实验优化制备条件。

#### 1.3.2 固定化菌球的酶活检测

对硝基苯酚(p-nitrophenol,pNP)标准曲线绘制:配制浓度分别为 30.3、60.6、121.2、151.5、242.4、303、484.8、606 μmol/L 的 pNP 溶液。吸取 100 μL 的 pNP 溶液加入 100 μL 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液混合均匀,然后取 100 μL 于 96 孔板中,用酶标仪在 400 nm 处测吸光度,以 pNP 浓度(μmol/L)为横坐标,以 OD<sub>400</sub> 为纵坐标绘制标准曲线。

固定化菌球酶比活力的检测参照文献<sup>[17]</sup>稍作修改:取 5 g 菌球放入 5 mmol/L 的 pNPG(对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷)溶液中,于 37 ℃ 下诱导产酶 1 h 后滤出固定化的菌球,冲洗 3 遍。然后将菌球放入 10 mL 浓度为 5 mmol/L 的 pNPG 溶液中,置于 37 ℃ 的摇床中以 150 rpm 反应 1 h。取初加入菌球时(空白)和反应结束时的 pNPG 溶液各 100 μL 分别

测吸光度,每组 3 平行。 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶比活力计算公式如下:

$$\text{连翘苷转化率} = \frac{\text{连翘苷转化量}}{\text{连翘苷总量}} \times 100\%$$

$$\text{连翘脂素得率} = \frac{\text{连翘脂素生成量}}{\text{连翘脂素理论产量}} \times 100\%$$

公式中,比活力的单位为 U/g; $\Delta C$ :pNP 摩尔浓度差 (mmol/L); $V$ :pNPG 溶液体积 (mL); $t$ :反应时间 (h); $m$ :菌球质量 (g)。

固定化菌球酶活大小以  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力大小评价,一个酶活单位(U)定义为:在上述反应条件下,每小时释放 1  $\mu\text{mol}$  的 pNP 所需要的固定化菌球量。

### 1.3.3 固定化菌球转化连翘苷研究

配置 10 mL 的连翘苷生理盐水溶液,调整 pH 值后超声 15 min。取 5 g 菌球放入溶液中,在不同温度的恒温振荡箱中以 150 rpm 转化 20 h 后取出。向体系中加入 30 mL 甲醇终止反应,并超声提取 15 min。按“1.2.2”中方法溶解产物并计算连翘苷的

转化率,平行重复 3 次。分别考察 pH 值、温度和底物浓度的对转化率的影响。

菌球的耐用性考察:根据单因素确定的最优转化条件将同一批菌球连续使用 14 天,每天使用一次,观察连翘苷转化率的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 连翘苷、连翘脂素标准曲线

连翘苷标准曲线符合线性回归方程  $y = 4\ 156\ 129x + 36\ 654$ ,相关系数  $R^2$  为 0.999 2,线性范围为 0.01 ~ 1 mg/mL;连翘脂素标准曲线符合线性回归方程  $y = 6\ 163\ 326x + 83\ 565$ ,相关系数  $R^2 = 0.999\ 0$ ,线性范围为 0.01 ~ 1 mg/mL。式中  $y$  为峰面积, $x$  为标准品浓度 (mg/mL)。

### 2.2 方法学验证结果

如表 1 所示,连翘苷和连翘脂素的 RSD 和 RE 均符合要求,该方法的日内、日间精密度和准确度良好。如表 2 所示,连翘苷和连翘脂素的基质效应和回收率的误差都在  $\pm 5\%$  以内,并且重复性的 RSD 在 2% 以内,表明模型可靠可以用于后续转化研究。

表 1 精密度、准确度考察结果 ( $n = 6$ )

Table 1 The results of precision and accuracy experiment ( $n = 6$ )

| 项目<br>Item       | 浓度<br>Concentration (mg/mL) | 精密度<br>Precision (RSD, %)  |                           | 准确度<br>Accuracy (RE, %) |
|------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
|                  |                             | 日内<br>Within-day precision | 日间<br>Inter-day precision |                         |
|                  |                             | 连翘苷 Phillyrin              | 0.201                     |                         |
|                  | 0.403                       | 0.31                       | 1.42                      | 0.66                    |
|                  | 0.611                       | 1.49                       | 0.74                      | 0.90                    |
| 连翘脂素 Phillygenin | 0.201                       | 1.50                       | 2.59                      | 3.79                    |
|                  | 0.404                       | 0.52                       | 1.87                      | 3.95                    |
|                  | 0.613                       | 1.74                       | 0.88                      | 2.36                    |

表 2 基质效应、回收率和重复性考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 The results of matrix effect, recovery rate and repeatability experiment ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 项目<br>Item       | 浓度<br>Concentration (mg/mL) | 基质效应<br>Matrix effect (%) | 回收率<br>Recovery rate (%) | 重复性<br>Repeatability (RSD, %) |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 连翘苷 Phillyrin    | 0.100                       | 95.98 $\pm$ 2.16          | 97.32 $\pm$ 2.74         | 0.281                         |
|                  | 0.301                       | 104.90 $\pm$ 0.51         | 104.64 $\pm$ 2.93        | 1.489 6                       |
|                  | 0.411                       | 97.63 $\pm$ 0.71          | 103.79 $\pm$ 3.24        | 1.319 1                       |
| 连翘脂素 Phillygenin | 0.107                       | 95.44 $\pm$ 1.47          | 96.08 $\pm$ 2.79         | 1.083 5                       |
|                  | 0.304                       | 95.42 $\pm$ 0.49          | 95.14 $\pm$ 2.17         | 1.770 8                       |
|                  | 0.413                       | 102.55 $\pm$ 0.86         | 104.21 $\pm$ 2.90        | 1.529 2                       |

## 2.3 菌株筛选结果

筛选纯化后获得了一株具有较强的连翘苷转化

能力的单菌株,命名为 SXUXJ-1。图 2 为该菌株的平板生长图。

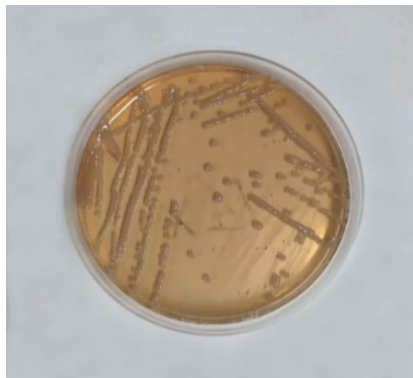


图 2 菌株 SXUXJ-1 在平板上生长图

Fig. 2 The growth of strain SXUXJ-1 on the plate

图 3 反应了菌体在培养开始后 5 h 进入对数生长期,同时开始转化连翘苷;15 h 后进入稳定期,此时连翘苷已基本转化完全。反应持续 20 h 后,产物连翘脂素的量基本保持不变。

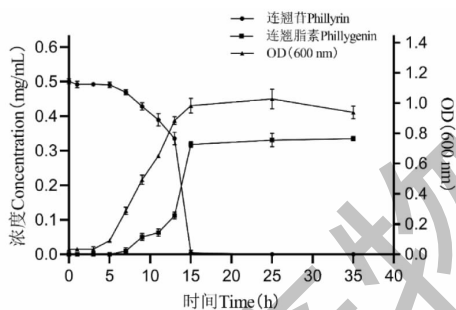


图 3 菌株 (SXUXJ-1) 生长曲线及转化连翘苷的时效曲线

Fig. 3 The growth curve and the time-activity curve of transforming phillyrin of strain (SXUXJ-1)

从图 4 中可以看出,连翘苷转化产物的液相保留时间与连翘脂素对照品一致。

## 2.4 产物 UPLC-MS 分析结果

在正离子模式下,比较产物与标品相对丰度最高(依次为 355.15、373.16、390.19、189.09、395.15)的五个分子离子峰保持一致。推测其中质核比为 355.15 的碎片为连翘脂素中性损失水而产生。比较其二级质谱图,相对丰度最高的五个碎片分别为 337.14、355.15、284.10、137.06、286.11。以上五个碎片在产物与标准品中均保持一致。

结合图 4 中样品与标准品液相色谱保留时间的一致性,及连翘脂素的理论生成量与实际生成量无明显差别,可以判断产物为连翘脂素。并且在转化

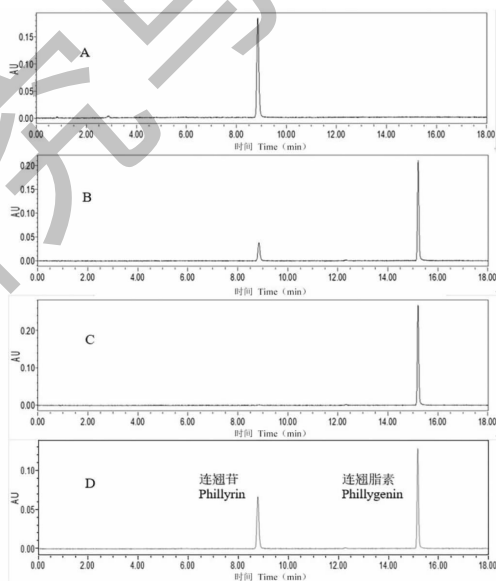


图 4 菌株 SXUXJ-1 转化连翘苷液相色谱图

Fig. 4 Liquid chromatographic image of phillyrin transformed by strain SXUXJ-1

注:A 为菌液空白组;B 为实验组 12 h;C 实验组转化结束;D 为混标。Note: A: Bacterial liquid blank group; B: Experimental group 12 h; C: The end of transformation of experimental group; D: Mixed standard solution.

体系中,连翘脂素生成后可以在 20 h 内保持稳定,无副产物生成。

## 2.5 菌株的鉴定结果

如图 5 所示,经革兰氏染色后在显微镜下可观察到菌株 SXUXJ-1 呈短杆状,两端圆头。图 2 所示平板上菌落为圆或近圆,边缘整齐表面光滑,颜色为乳白色,培养 24 h 后菌落大小为 2 mm,在有氧或无氧状态

均可生长。菌株在液体培养基中培养 24 h 后培养基变 浑浊,产生气泡及沉淀。革兰氏染色结果为阴性。

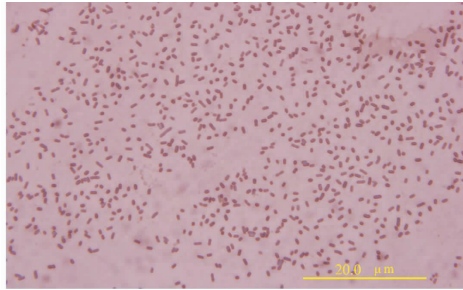


图 5 菌体显微形态

Fig. 5 Micromorphology of the strain

16S rDNA 测序结果经拼接,得到菌株 SXUXJ-1 的 16S rDNA 序列,长度为 1 409 bp,序列如下:

```
AAGTCGAACGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT
GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGC
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGG
TGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
TGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGA
GTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTT
GTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCT
CGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC
GAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGA
GCTAACCGGTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGA
CATCCACGGAACCTTCCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC
AGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGAC
CTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACAC
ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTA
CCA。
```

将测序所得序列与 NCBI Genbank 数据库进行 blast 同源序列分析。通过绘制菌株系统进化树(图 6)发现,菌株 SXUXJ-1 与埃希氏属大肠杆菌(*Escherichia coli*)的多个菌株具有较高的同源性,与登录号

为 CCFM8336 及 KVP104 的大肠杆菌菌株具有 99.86% 的相似度,序列比对覆盖率达 100%。参考《伯杰氏细菌手册》第八版相关内容及测序结果,综合该菌株的形态特征及革兰氏染色结果,可以确定

菌株 SXUXJ-1 为肠杆菌科埃希氏属大肠杆菌,已保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号:

CGMCC No.:21514。

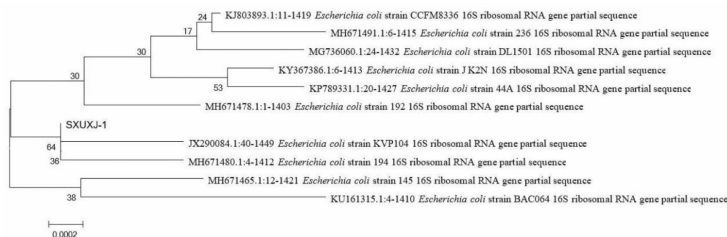


图6 菌株 SXUXJ-1 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of SXUXJ-1 based on 16S rDNA

## 2.6 有氧与厌氧培养对比

有氧及厌氧培养条件下连翘脂素的最终得率分别为 96.9% 和 96.0%。结合表 3,可以看出是否提

供厌氧培养条件对连翘苷转化率与连翘脂素转化得率无明显影响。在后续转化中无需提供严格厌氧条件,这样可以减少成本及降低操作复杂性。

表3 有氧及厌氧培养对比

Table 3 Comparison of aerobic and anaerobic culture

| 培养条件<br>Culture condition | 连翘苷转化率<br>The transformation rate of phillyrin(%) |                             | 连翘脂素得率<br>The yield of phillygenin(%) |                             |
|---------------------------|---|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
|                           | 培养 6 h<br>Culture for 6 h                         | 培养 12 h<br>Culture for 12 h | 培养 6 h<br>Culture for 6 h             | 培养 12 h<br>Culture for 12 h |
| 有氧 Aerobic                | 20.1  | 78.4                        | 18.6                                  | 85.3                        |
| 厌氧 Anaerobic              | 23.3  | 78.6                        | 18.2                                  | 81.6                        |

注:连翘苷转化率的初始值记为 1;连翘脂素理论得率记为 1。

Note:The initial value of phillyrin transformation rate is recorded as 1;The theoretical yield of phillygenin is recorded as 1.

## 2.7 菌株的固定化条件

对硝基苯酚标准曲线符合线性回归方程  $y = 0.002\ 075x + 0.050\ 51$ ,相关系数  $R^2 = 0.998\ 7$ ,线性范围  $0 \sim 606\ \mu\text{mol/L}$ ,式中  $y$  为吸光度, $x$  为对硝基苯酚浓度。

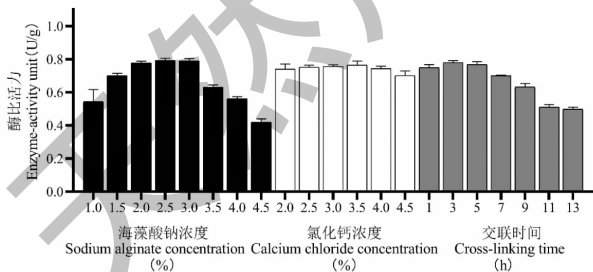


图7 单因素考察结果

Fig. 7 Results of single factor investigation

根据图 7 单因素结果确定的最佳条件为海藻酸钠浓度 2.5%、 $\text{CaCl}_2$  浓度 3.5%、交联时间 3 h。则正交实验因素水平设置为:A 海藻酸钠浓度 2、2.5、3%;B 氯化钙浓度 3、3.5、4%;C 交联时间 1、3、5 h。

通过极差分析可知(见表 4),3 个因素对酶活

影响的大小顺序为:A > C > B,即海藻酸钠浓度 > 交联时间 > 氯化钙浓度。

正交分析的效应曲线给出固定化菌球工艺条件为海藻酸钠浓度为 3%,氯化钙浓度为 3.5%,交联时间 3 h,以此工艺条件制作的凝胶球如图 8 所示,胶球大小适中,机械强度较好。

根据最优条件重复三次验证得到酶活平均为 0.836 U,标准差(SD)为 0.013 3,相对标准偏差(RSD)为 1.6%。

在 pH 值条件考察中,pH 值为 8 时连翘苷的转化率达到最大 82.5%,说明此时菌体活力旺盛,转化效率最高,因此确定 pH 值为最适条件。

当底物浓度逐渐增大时,由于连翘苷具有一定的抗菌作用,浓度过大必然会在一定程度上影响微生物生存,同时也会超过菌的催化能力,则转化效率较低,经济性不高;而如果底物浓度过小时,又不利于充分发挥菌球效力。因此,菌球与底物浓度之间存在一个最佳比例。从图 9 中可以看出,当底物浓度从 0.2 ~ 0.8 mg/mL 逐步增大时,连翘苷的转化

表 4 正交实验结果

Table 4 The results of orthogonal experiment

| 项目<br>Project     | 海藻酸钠浓度<br>Sodiumalginate<br>concentration(%) | 氯化钙浓度<br>CaCl <sub>2</sub><br>concentration(%) | 交联时间<br>Crosslinking<br>time(h) | 实验结果<br>Result(U/g) |
|-------------------|--|--|---------------------------------|---------------------|
| 实验 1 Experiment 1 | 1  | 1  | 1                               | 0.401               |
| 实验 2 Experiment 2 | 1  | 2  | 2                               | 0.638               |
| 实验 3 Experiment 3 | 1  | 3  | 3                               | 0.529               |
| 实验 4 Experiment 4 | 2  | 1  | 2                               | 0.726               |
| 实验 5 Experiment 6 | 2  | 2  | 3                               | 0.674               |
| 实验 6 Experiment 6 | 2  | 3  | 1                               | 0.580               |
| 实验 7 Experiment 7 | 3  | 1  | 3                               | 0.774               |
| 实验 8 Experiment 8 | 3  | 2  | 1                               | 0.802               |
| 实验 9 Experiment 9 | 3  | 3  | 2                               | 0.826               |
| 均值 1 Average1     | 0.523  | 0.634  | 0.594                           | —                   |
| 均值 2 Average2     | 0.660  | 0.705  | 0.730                           | —                   |
| 均值 3 Average3     | 0.801  | 0.645  | 0.659                           | —                   |
| 极差 Range          | 0.278  | 0.071  | 0.136                           | —                   |

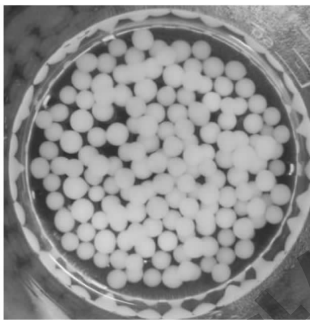


图 8 海藻酸钠凝胶球

Fig. 8 Sodium alginate hydrogel beads

率下降缓慢。这可能是由于菌球提供的酶量较为充足,底物可以与酶充分接触。而当底物浓度高于 0.8 mg/mL 后,连翘苷的转化率急剧下降,这可能是因为底物量超过了体系中酶的最大催化能力,而使连翘苷的转化率下降。因此综合考虑转化率以及经济性,选择底物浓度为 0.8 mg/mL。

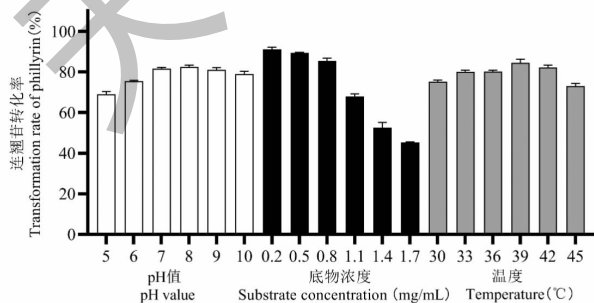


图 9 单因素条件转化条件考察

Fig. 9 Investigation on single-factor condition transformation process

### 2.8 转化条件考察结果

肠杆菌科的细菌一般最适温度在 33 ~ 42 °C,因此本研究选择考察范围为 30 ~ 45 °C。如图 9 所示,当温度为 39 °C 时,连翘苷转化率最大,即选择 39 °C 为最优转化温度。

综上,确定固定化菌球转化连翘苷的条件为 pH 值为 8,底物浓度为 0.8 mg/mL,温度为 39 °C。在此条件下重复三次,得到连翘苷在 20 h 内的转化率分别为 84.3%、85.7%、85.6%,平均转化率达到 85.2%,将转化时间延长至 25 h 左右,连翘苷即可实现完全转化;计算连翘脂素的最终得率分别为 96.8%、97.2%、96.9%,平均得率为 97.0%。

### 2.9 菌球的耐用性

图 10 所示固定化菌球连续循环使用 13 次后,连翘苷在 20 h 内的转化率仍能达到 70.2%。说明在此工艺条件下,微生物经固定化后可以维持其生命活力,连续产生酶,菌球具有良好的耐用性。

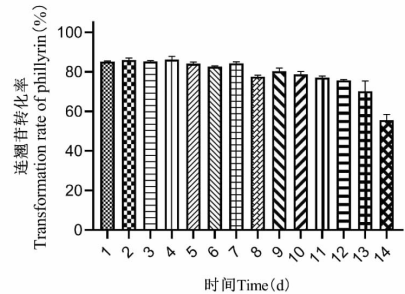


图 10 菌球的耐用性

Fig. 10 Durability of the bacteria ball



### 3 讨论与结论

首先在筛菌研究中,由于连翘苷具有一定的抗菌作用,我们在初筛所用的液体培养基及复筛所用的平板培养基中均加入一定量的连翘苷,可以抑制与连翘苷不友好的菌株生长,为筛选缩小了一定的范围。其次,已有研究表明,连翘苷在肠道菌的作用下转化为连翘脂素后会继续代谢产生副产物<sup>[11]</sup>。本研究筛选得到的单菌株在转化连翘苷得到连翘脂素后,产物可在 20 h 内保持稳定,未发生继续代谢,无副产物的生成。本方法克服了已有微生物转化法中连翘脂素继续被代谢的缺点,也未引入多余基团。再次,大肠杆菌是一种革兰氏阴性兼性厌氧菌,由于其良好的生长活力及可有效利用廉价碳源,在基因工程中被改造为工程菌。其兼性厌氧的特点对于发酵工程上具有重要的意义,本研究筛选到的大肠杆菌同时具备以上特性。最后,我们还使用固定化微生物的方法将菌株 SXUXJ-1 固定,通过优化制作工艺最终制得了一种实用性较强的菌球。在最优转化条件下,连翘苷可在 25 h 左右转化完全。固定化菌球转化法是一种简单、高效、环保的方法,且转化后的产物连翘脂素易于提取分离,因此具备非常好的应用前景。

#### 参考文献

- Hu N, Wang C, Dai X, et al. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 248: 112361.
- Wu S, Zhang Y, Zhang Y, et al. Phillygenin regulates proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer through by AMPK/ERK/NF-kappaB axis [J]. *Pharmazie*, 2020, 75: 512-515.
- Li H, Chen M, Yang Z, et al. Phillygenin, a MELK inhibitor, inhibits cell survival and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2833-2842.
- Liu W, Lu Y, Chu S, et al. Phillygenin, a lignan compound, inhibits hypertension by reducing PLC $\beta$ 3-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillation [J]. *J Funct Foods*, 2019, 60: 103432.
- Quan YY, Yuan A, Gong XH. Investigation on anti-inflammatory components of *Forsythia suspensa* [J]. *Nat Prod Res Dev*

(天然产物研究与开发), 2017, 29: 435-438.

- Mao W. Study on the chemical constituents and antitumor activity of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl [D]. Wuhan: Hubei College of Traditional Chinese Medicine (湖北中医药大学), 2009.
- Ye LH, Li YX, Peng C, et al. Determination of phillygenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies [J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2013, 38: 201-207.
- Wang QB. Study on the preparation technology of phillygenin in *Forsythia suspense* leaves [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2019.
- Mei JF, Dong ZH, Yi Y, et al. Production of phillygenin from phillyrin by microbial bioconversion [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol* (工业微生物), 2016, 46(6): 7-12.
- Fan HY, Fu L. Study on preparation of (+) -phillygenin by enzymolysis of phillyrin with cellulase [J]. *Jilin J Tradit Chin Med* (吉林中医药), 2014, 34: 403-405.
- Xing SH. The study on effective substances of *Scutellariae Radix* and *Forsythiae Fructus* based on gastrointestinal metabolism [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (上海交通大学), 2015.
- Li GL, Qi YJ, Li HB et al. Preliminary study on the difference metabolism of several ginsenosides in *Panax notoginseng* with rat or human gut microflora by UPLC method [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1203-1210.
- Zhang JS, Luo JB, Jiang JH, et al. Optimization of extraction process of phillyrin and its antibacterial activity [J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2020, 36(7): 193-201.
- Guo LN, Zheng SQ, Wang TY, et al. Transformation of tecomin by human intestinal flora [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药学刊) 2016, 34: 2921-2924.
- Du K, Gao XX, Feng Y, et al. Effects of guilingji on Kidney-Yang deficiency syndrome in rats based on serum metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报) 2019, 54: 1476-1483.
- Wang MM, Zhang L, Li H, et al. Study on growth curve of *Enterococcus faecalis* and its effect on brain tissue of mice [J]. *China Anim Husb Vet Med* (中国畜牧兽医), 2018, 45: 1041-1049.
- Wang X, Ike M, Shiroma R, et al. Expression of neutral beta-glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw [J]. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116: 362-365.