枇杷叶内生菌与金龟子绿僵菌对熊果酸的生物转化研究

李晓青，陈燕琼，欧阳文，肖苏尧，陈海燕，邱益池，曹庸
（华南农业大学食品学院，广东广州 510642）

摘要：本研究旨在利用微生物对熊果酸进行生物转化，以期对其结构进行修饰。首先从六种枇杷叶中筛选内生菌，将筛选到的内生菌对熊果酸进行转化实验，其中窄叶、解放钟和茂木三种枇杷叶中分离到的枇杷叶内生菌 1 对熊果酸有明显转化作用，并得到萜类物质；其次利用金龟子绿僵菌和熊果酸的共同发酵培养得到一种白色针状晶体，它的熔点为 202~205 ℃，高温易溶于甲醇，并对此晶体的结构进行了初步研究。

关键词：熊果酸；生物转化；枇杷叶；内生菌；金龟子绿僵菌
文章篇号：1673-9078(2012)5-490-493

Transformation of Ursolic Acid by Endophytic Fungus in Loquat Leaf and *Metarhizium anisopliae*

LI Xiao-qing, CHEN Yan-qiong, OUYANG Wen, XIAO Su-Yao, CHEN Hai-yan, QIU Yi-chi, CAO Yong
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This research studied the transformation of ursolic acid by some microorganism in order to modify its structure. Through the incubation of ursolic acid with the endophytic fungus isolated from six different kinds of loquat leaves, the loquat leaf endophytic fungus1 founded in loquat leaf Narrow leaf, Jiefangzhong and Mogi can transform the ursolic acid to a Terpenoid compound. By incubation of ursolic acid with metarhizium anisopliae, a acicular crystal was obtained with the melting point being of 202~205 ℃ and high solubility in methanol. The crystal was then preliminarily analyzed.

Key words: ursolic acid; biotransformation; loquat leaf; endophytic fungus; *Metarhizium anisopliae*

熊果酸（Ursolic Acid）是存在于天然植物中的一种三萜类化合物[1]，分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$。熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、抗溃疡、抗肿瘤、保肝、降低血糖等多种功效[2~4]。但是熊果酸生物利用度低，制剂种类单一，限制了其生物活性的开发。修饰改造其分子结构，可提高生物利用度，达到保护环境、创制新药的目的。自 20 世纪后半叶以来化学家和药物学家努力用有机合成方法对萜类化合物进行结构改造以降低毒性、提高药效，确实取得了一定的成绩[5,6]。但由于化学反应对结构区域选择性和立体构型选择性差，加上化学反应条件一般都需要加热和较低或较高的 pH 作用条件，因此除少数的萜类化合物外，应用化学法合成、改造或修饰三萜或四萜等结构复杂的化合物的困难是很大的。近三十年来酶工程和生物催化技术的迅速发展[7]，并向各个学科渗透，应用微生物转化技术对萜类化合物的分子结构进行修饰和改造的研究也逐步展开[8]。微生物转化的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[9~11]，进行结构修饰而获得有价值产物的代谢反应。利用生物的酶对特定底物进行结构修饰的化学反应，与化学合成法相比，具有区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简单、成本较低、公害少等优点。

为了实现熊果酸的微生物转化，本论文选择不同来源的菌进行转化研究。有研究表明，枇杷叶中含有大量熊果酸及其类似物[12]，其中可能存在能够实现转化的内生菌，因此本论文选择从枇杷叶中筛选内生菌研究对熊果酸的转化；另外选择外界已知的可进行生物转化的真菌-金龟子绿僵菌[13]对熊果酸进行比较。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

LC-10ATVP plus 高效液相色谱仪（日本岛津公司），Diamonsil C18 色谱柱（200 mm×4.6 mm×5 μm,

收稿日期：2012-03-11
作者简介：李晓青（1989-），女，在读硕士，食品科学
通讯作者：曹庸（1966-），男，博士，教授，食品科学

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），KQ-500B 超声波清洗器（昆山超声仪器公司），电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司），高速中药粉碎机（瑞安市环球药械厂），全自动高压蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）。

1.2 原料与试剂

原料：MCB（西班牙）、窄叶、黄金块（美国）、解放钟、茂木（日本）、香花等六种新鲜枇杷叶（华南农业大学园艺学院），金龟子绿僵菌（上海中科院研究所）。

试剂：熊果酸标准品（纯度质量分数为 98%）、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），乙醇（天津市富宇精细试剂有限公司），乙酸乙酯（天津市富宇精细试剂有限公司），G254 硅胶薄层板（青岛海洋化工厂），次氯酸钠（广东光华化学厂有限公司），超纯水（超纯水机制备）。

1.3 方法

1.3.1 对枇杷叶中熊果酸和科罗索酸的测定

测定方法：利用高效液相检测，柱温 32 ℃，流动相为乙腈:水（*V/V*）为 88：15，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。

标准对照品溶液的配制：分别准确称取 10.0 mg 科罗索酸及熊果酸对照品，置于 25.0 mL 容量瓶中，以甲醇超声溶解定容后备用。

原料样品溶液的配制：把枇杷叶烘干后磨成粉，过筛，用 95%乙醇按 50 mL/g 在 70 ℃回流提取 4 h，然后超声 10 min，用旋转蒸发仪把过滤得到的提取液蒸干，8 mL 甲醇溶解后，过滤膜备用。

1.3.2 枇杷内生菌的提取

取无病无霉的成熟枇杷叶，在自来水下冲 10 min，然后使用 70%酒精浸润 5 s 后，5% NaClO 浸润 5 min，再用 10 mL 无菌水反复冲洗 5 遍。回收最后一次冲洗液，取 200 μL 涂布至 PDA 平板中，检测表面消毒效果。用灭过菌的剪刀把消毒完全的枇杷叶剪成小碎片，用灭菌的镊子将小碎片在 PDA 培养基上，每皿 4~6 块再将培养皿放入恒温培养箱中 28 ℃培养。每隔 12 h 进行观察，48 h 后将长出的菌体转接至相同的培养基上 28 ℃培养 48 h 后进行纯化；同时取 5 mL 生理盐水冲洗平板，并采用梯度稀释涂布上述平板培养基中，28 ℃培养 48 h 后挑取单菌落接至相应培养基斜面上。

1.3.3 内生菌对熊果酸的转化及转化产物的提取与分析

利用内生菌对熊果酸进行生物转化，发酵培养基为 PDA 液体培养基，在 28 ℃下摇床培养，摇床转速为 160 r/min，培养 24 h 后菌体进入成熟期。

反应组：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：不加任何物质，继续摇床 3 d。

对反应组和空白组的发酵产物进行固液分离，然后固体经碾碎处理后用 2 倍体积的乙酸乙酯浸泡，超声提取 15 min，过滤得乙酸乙酯经真空浓缩至干，用甲醇溶解，备用。

分析方法：TLC 法：展开剂：环己烷:乙酸乙酯:乙酸（体积比 4:1.5:3 滴）；显色剂：体积分数 10%的硫酸乙醇溶液；105 ℃烘烤 5 min。

1.3.4 金龟子绿僵菌对熊果酸的转化及转化产物的提取与分析

转化和提取方法同 1.3.3 中内生菌对熊果酸的转化及提取方法。

分析方法：液相色谱法：流动相为乙腈：水（*V/V*）为 85:12，Diamonsil C18 色谱柱，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。

1.3.5 发酵产物的分离纯化及检测

对发酵产物进行硅胶柱分离，按 50:1 上样，流动相为环己烷:乙酸乙酯:乙酸，先后按 8:1:2 滴和 4:1:2 滴进行过滤，得到的物质经制备液相纯化，便得到化合物纯品。

对化合物纯品以 ^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 经 BRUCKER AV400 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 实验结果

2.1 熊果酸及科罗索酸的标准曲线

采用外标法定量，以熊果酸进样量 X(μg)为横坐标，以其峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线，其回归方程为 y=299355x+95091 (R^2=0.9992)。该方程的线性范围为 0.8~4.0 μg。

采用外标法定量，以科罗索酸进样量 X(μg)为横坐标，以其峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线，其回归方程为 y=277684x+55903 (R^2=0.9996)。该方程的线性

范围为 0.8~4.0 μg。

2.2 对枇杷叶中熊果酸和科罗索酸的测定结果

表 1 枇杷叶中熊果酸与科罗索酸的含量表

Table 1 The content of ursolic acid and corosolic acid in loquat leaf

品种	熊果酸含量/%	科罗索酸含量/%
MCB(西班牙)	1.28	0.86
窄叶	1.89	1.27
黄金块(美国)	1.96	1.04
解放钟	1.71	1.27
茂木(日本)	1.74	1.25
香花	2.26	0.78

由表 1 可知，窄叶、解放钟和茂木枇杷叶中科罗索酸的含量最高。

2.3 内生菌筛选结果及形态观察

从六种枇杷叶中都分离到了内生菌，其中从窄叶、解放钟和茂木枇杷叶中得到一种形态一致的菌，命名为枇杷叶内生菌 1，其表面较干燥，边缘为规则、整齐的花纹，菌落半径约为 6 mm，菌落正面中心为绿色四周为白色，背面为浅绿色，表面有白色绒毛，菌落较厚，不透明，疏松的致密度，因此推测为一种霉菌。

2.4 枇杷叶内生菌对熊果酸的转化结果分析

利用窄叶、解放钟和茂木三种枇杷叶中筛选到的枇杷叶内生菌 1 对熊果酸进行生物转化，结果如图 1 所示，经过转化后的薄层条带中出现一个 Rf 值小于熊果酸的斑点，由此可以判断，熊果酸被转化成另外一种物质。由于 10%的硫酸乙醇溶液显色有一定选择性，能够对萜类化合物显为紫红色，因此，枇杷叶内生菌 1 转化熊果酸得到了一种萜类化合物。



图 1 枇杷内生菌转化熊果酸的 TLC 图谱

Fig.1 TLC diagram of Transformation of ursolic acid by endophytic fungus

注:（1）熊果酸原料样;（2）枇杷内生菌 1 发酵产物;（3）枇杷内生菌 1 与熊果酸发酵产物。

由表 1 的结果可知窄叶、解放钟和茂木中科罗索酸的含量最高，而从此三种枇杷叶中都可以分离到对熊果酸有转化作用的枇杷叶内生菌，由此推测该种菌与其中科罗索酸的含量有一定相关性，但是具体情况有待进一步研究。

2.5 金龟子绿僵菌对熊果酸的转化及产物的分析

2.5.1 熊果酸转化产物的 HPLC 图谱分析

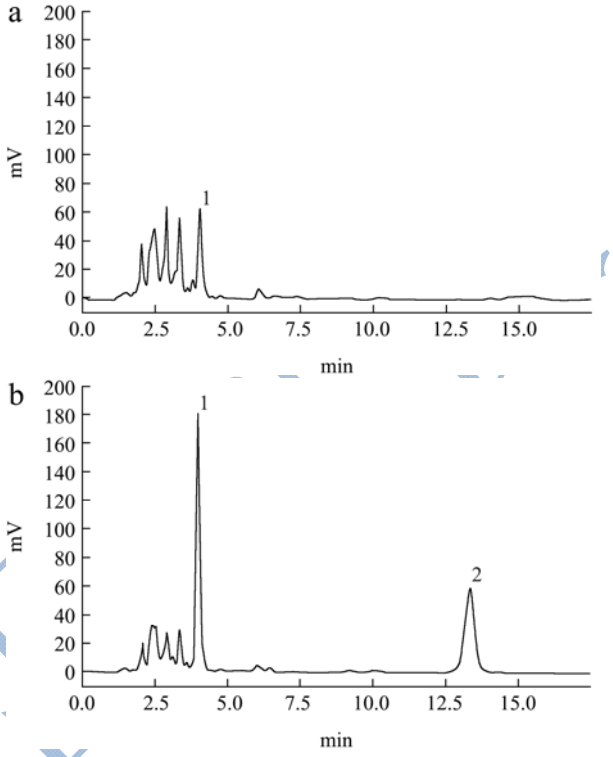


图 2 金龟子绿僵菌对熊果酸转化的 HPLC 指纹图谱

Fig.2 HPLC chromatography of transformation of ursolic acid by *Metarhizium anisopliae*

注：A=空白组；B=反应组；1=化合物 1；2=熊果酸。

金龟子绿僵菌对熊果酸的转化产物进行提取分离，用 HPLC 图谱进行分析，得到色谱图（见图 2），由液相图谱得出熊果酸与金龟子绿僵菌进行发酵培养后，得到化合物 1，含量很高，但金龟子绿僵菌本身进行发酵培养亦可得化合物 1，但含量明显降低，所以推测熊果酸的加入可能对化合物 1 的产生有促进作用。

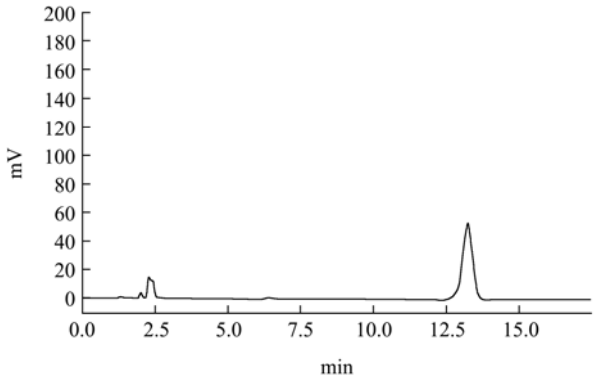


图 3 熊果酸标样 HPLC 指纹图谱

Fig.3 HPLC finger print of ursolic acid standard samples

对化合物 1 分离纯化后得到一种熔点为 202~205 ℃，易溶于甲醇的白色针状晶体化合物 1。熊果酸标样及化合物 1 的 HPLC 图谱如图 3、4。

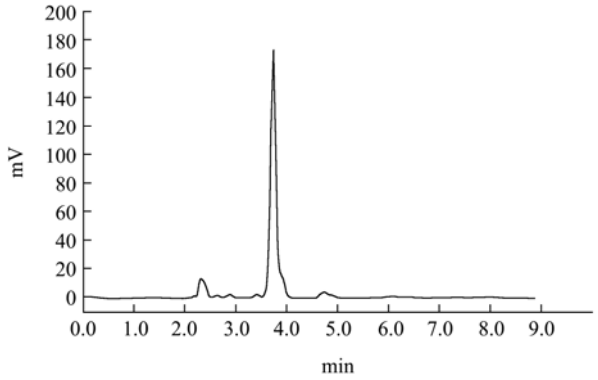


图 4 化合物 1 的 HPLC 指纹图谱

Fig.4 HPLC finger print of the compound 1

2.5.2 熊果酸转化产物的显微镜观察

对化合物 1 在 10×100 倍显微镜下观察（见图 5），晶体显示为透明针状。



图 5 化合物 1 的晶体图像

Fig.5 The crystal picture of the compound 1

2.5.3 熊果酸转化产物结构的初步判定

由于化合物 1 的碳谱、氢谱数据复杂，所以未能解出化合物的分子结构。只通过其碳谱、氢谱数据确定了图 6 其分子结构中的两个片段，后续会继续做相关研究，以确定化合物 1 的分子结构。

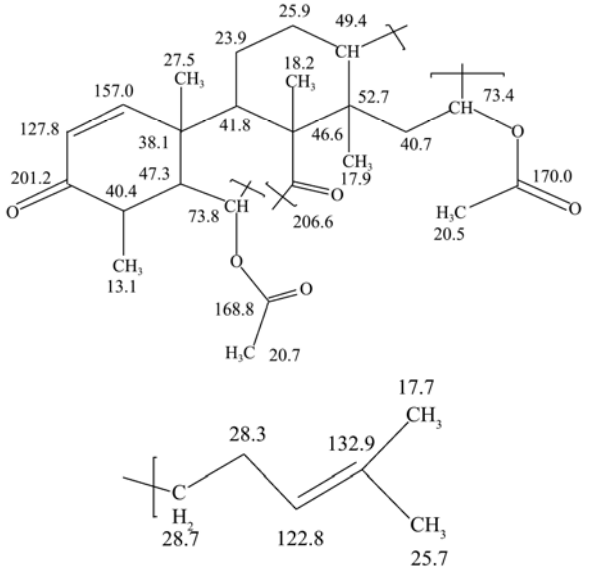


图 6 化合物 1 的分子片段

Fig.6 The molecule fragment of compound 1

3 结论

3.1 从窄叶、解放钟和茂木中提取到枇杷叶内生菌 1 对熊果酸有明显的转化作用，生成萜类物质，但由于生成的萜类物质量少，未能分离到足够的纯品得出它的结构，所以后续工作会继续跟进，研究枇杷叶内生菌 1 转化熊果酸得到的萜类物质的结构。

3.2 通过对六种枇杷叶中熊果酸与科罗索酸的含量测定以及从科罗索酸含量高的三种枇杷叶中分离到的菌对熊果酸有转化作用，推测枇杷叶中的菌系的不同与其中所含科罗索酸的含量有关系。

3.3 金龟子绿僵菌与熊果酸共同发酵可得到一种白色针状晶体，它的熔点为 202~205 ℃，高温易溶于甲醇。但由于金龟子绿僵菌自身发酵亦可得到此化合物，所以不能推断此化合物为金龟子绿僵菌转化熊果酸产生，但熊果酸与金龟子绿僵菌共同发酵培养后，得到化合物含量明显高于其自身发酵所得，所以推想熊果酸的加入可能对化合物 1 的产生有促进作用。

参考文献

[1] 李开泉,陈武,熊筱娟,等.乌索酸的药理作用研究(Ⅱ)[J].中成药,2002,24(9):709-711

[2] Yoshikawa M, Matsuda H. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from Medicinal food stuffs [J]. Biofactors, 2000, 13: 231-237

[3] 王冰,蒋朝晖.齐墩果酸的研究[J].中国药学杂志,1992,27(7):393-397

[4] 王迪峰.熊果酸衍生物的合成与表征[D].大连:辽宁师范大学,2009

[5] 廖晓峰.栀子中熊果酸的制备和结构修饰研究[D].无锡:江南大学,2006

[6] Mahato SB, Garai S. Advances in microbial steroid biotransformation [J]. Phytochemstry, 1993, 34(4): 883-898

[7] 沈珈琦,范伟平.应用霉菌单加氧酶羟基化齐墩果酸的研究[D].南京:南京工业大学,2006

[8] 张利平,程克棣,朱平.紫杉烷类化合物的生物转化[J].药学学报,2004,39(2):153

[9] 张莉力,迟玉杰.微生物转化阿魏酸生产香兰素的研究[J].现代食品科技,2005,21(2):47-49

[10] 邹水洋,郭祀远,肖凯军.生物转化木质纤维素原料生产乳酸的研究进展[J].现代食品科技,2008,24(4):394-40

[11] 鞠建华,周亮,林耕,等.枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J].中国药学杂志,2003,38(10):752

[12] 李安华,王艺军,王明道,等.绿僵菌羟基化 16α,17α-环氧黄体酮的工艺研究[J].河南科学,2007,25(5):754-757