

虎杖内生菌转化虎杖苷和转化产物抗氧化活性研究

隆丽林, 易有金, 周金伟, 程远渡, 夏延斌

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 研究虎杖内生真菌对虎杖苷转化及转化产物抗氧化活性。采用薄层层析法筛选转化虎杖苷的内生真菌; 通过形态学特征和 ITS-5.8S rDNA 基因序列分析对内生真菌进行鉴定; 利用大孔吸附树脂、制备薄层色谱和高效液相色谱分离纯化生物转化产物; 以 VC、BHT、虎杖苷及 5 种虎杖苷衍生物为对照, 对转化产物清除 DPPH·自由基和 OH·自由基的生物活性进行比较研究。经筛选发现其中 1 株内生真菌 J3 能转化虎杖苷形成转化产物。内生真菌 J3 ITS-5.8S rDNA 序列全长 573bp, GenBank 登录号 KM 434883, 确定为烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*。转化产物 A-2 在体外具有清除 DPPH·自由基和 OH·自由基的能力, 且清除 OH·自由基的能力高于底物虎杖苷, A-1 在体外无清除 DPPH·自由基和 OH·自由基的能力。虎杖内生真菌 *Aspergillus fumigatus* 能对虎杖苷进行生物转化, 形成具抗氧化活性的物质。

关键词: 内生菌; 虎杖苷; 衍生物; 转化; 鉴定; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2015)5-76-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.013

Microbial Transformation of Polydatin by Endophytic Fungi Isolated from *Polygonum cuspidatum* and Antioxidant Activity of the Products

LONG Li-lin, YI You-jin, ZHOU Jin-wei, CHENG Yuan-du, XIA Yan-bin

(College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha Hunan 410128, China)

Abstract: The microbial transformation of polydatin by endophytic fungi isolated from *Polygonum cuspidatum* and the antioxidant activity of the transformed products were investigated. Screening of endophytic fungi for microbial transformation of polydatin was carried out using thin-layer chromatography (TLC). Fungi were identified by morphological characteristics and analysis of the ITS-5.8S rDNA region. Polydatin transformation products were isolated and purified by macroporous adsorption resin, preparative TLC, and high-performance liquid chromatography. Using vitamin C (Vc), BHT, polydatin, and five types of polydatin derivatives as standard substances, the DPPH· and OH· radical-scavenging capacities of transformation products were investigated. An endophytic strain J3, capable of transforming polydatin was identified preliminarily as *Aspergillus fumigatus* (Genbank accession number: KM434883) by morphological characteristics and analysis of the ITS-5.8S rDNA region (573 bp). The transformed product, A-2, showed DPPH· and OH· radical-scavenging capabilities *in vitro*, while the OH· radical-scavenging ability was higher than that of substrate polydatin. However, transformed product, A-1, did not show DPPH· and OH· radical-scavenging capabilities *in vitro*. Endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from *Polygonum cuspidatum* was thus shown to transform polydatin into products with antioxidant property.

Key words: endophyte; polydatin; derivative; transformation; identification; antioxidant activity

虎杖为蓼科蓼属多年生草本植物, 其干燥的根茎中富含虎杖苷, 含量可达 2.55%^[1]。虎杖苷化学名为

收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 湖南省博士后科研资助专项计划项目(2010RS4003); 长沙市科技局一般项目(K1005013-31); 湖南省中医药科研计划项目(2010079); 国家科技支撑计划项目(2015BAD16B00)、国家自然科学基金项目(31071738, 31000827)

作者简介: 隆丽林(1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 微生物作用开发与利用

通讯作者: 易有金(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物作用开发与利用、食品活性成分与功能评价

3,4'-5-三羟基二苯乙烯-3-β-D-葡萄糖苷, 属二苯乙烯类多酚物质, 具有保护心血管、抗血栓、降血脂、镇咳平喘、抗氧化和抗病原微生物等多种药理作用^[2]。

在植物中虎杖苷以稳定的反式异构体为主, 糖基为主要取代基, 近年来研究发现, 虎杖苷的两羟基、糖基或苯环上的氢被甲基或异戊烯基等基团取代, 形成的衍生物或类似物也具有多种生物活性^[3-4], 并被广泛应用于食品、医药、保健品、植物保护等领域, 故虎杖苷及其衍生物的研究引起广泛关注。

为获得新颖结构虎杖苷类活性衍生物, 现常用的途径有化学方法合成或改造其结构及微生物转化, 但

化学方法副产物多、反应步骤繁琐、污染环境,而微生物转化具有区域和立体选择性强、操作简单、反应条件温和、成本低廉等优点,能完成一些化学方法难以实现的反应^[5]。植物内生菌是生活在植物健康组织内,不引起宿主植物出现明显病害症状的一类微生物^[6]。大量研究表明,从虎杖根茎中可分离得到虎杖内生菌^[7-8],由于虎杖内生菌与宿主虎杖互惠共利协同进化,具有特定生活史,以虎杖内生菌为反应器对虎杖中虎杖苷进行发酵转化有其天然协调性,对发现新的高活性、高稳定性、低毒副作用的衍生物或类似物具有重要意义,因此,近年来研究虎杖内生菌转化虎杖苷形成衍生物或类似物成为热点。研究表明,虎杖根茎中含虎杖苷和类似物白藜芦醇^[9-10],其中可能存在具转化能力的内生菌,因此本文选择从已分离的虎杖根茎内生菌中筛选内生真菌转化虎杖中虎杖苷,以期得到转化虎杖苷形成衍生物的虎杖内生菌株,并且对转化菌株及转化产物的分离纯化方法和抗氧化活性进行研究,为得到结构新颖活性化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验菌种

实验菌株虎杖内生真菌由湖南农业大学食品科学与生物技术湖南省重点实验室从虎杖根、茎部分离所得,分别命名为 G2、J3 菌株。

1.1.2 培养基

斜面培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA),自然 pH。

转化培养基:10 g/100mL 虎杖煮提液,自然 pH。

马铃薯葡萄糖肉汤培养基(Potato Dextrose Broth, PDB):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,自来水 1000 mL,自然 pH。

鉴定培养基:查氏母液(Czapek concentrate)、查氏酵母膏琼脂(Czapek Yeast Extract Agar, CYA)、麦芽汁琼脂(Malt Extract Agar, MEA)、25%甘油硝酸盐琼脂(25% Glycerol Nitrate Agar, G25N)、查氏琼脂(Czapek Agar, CA)参照文献^[11]。

1.1.3 试剂

虎杖饮片,长沙药材市场;虎杖苷、白藜芦醇标准品,中国食品药品检定研究院;ε-葡萄糖素、α-葡萄糖素、氧化白藜芦醇标准品, BioBioPhaCo 公司;紫檀芪标准品,美国中草药公司;色谱级甲醇,国药集团化学试剂有限公司;薄层色谱板,烟台江友硅胶开发有限公司;羧甲基纤维素钠,国药集团化学试剂有限

公司;GF254 硅胶粉,青岛海洋化工有限公司;AB-8 树脂,安徽三星树脂科技有限公司;DNA 提取试剂,天根生化科技有限公司;PCR MasterMIX,天根生化科技有限公司;VC,国药集团化学试剂有限公司;BHT,国药集团化学试剂有限公司;其它药品均为分析纯。

1.1.4 仪器与设备

FD-1B 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;DGG-9620A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;LRH-250 型生化培养箱,北京中兴伟业仪器有限公司;CF16RX II 型冷冻离心机,北京瑞利分析仪器有限公司;HZQ-X100 型全温振荡培养箱,哈尔滨市东联电子科学技术有限公司;OLYMPUS CKC41 型光学显微镜,日本 Olympus 公司;TC-96/G/H(b)A 型 PCR 仪,杭州博日科技有限公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器;TGL-20M 型台式高速冷冻离心机,长沙英泰仪器公司;Gel Logic 212 型凝胶成像系统,美国柯达公司;LC-20A 高效液相色谱仪,VWD 检测器,日本岛津公司;2F-2 型三用紫外仪,上海安亭电子仪器厂;(Φ5×100cm)层析柱;OSB-2100 旋转蒸发仪,上海爱郎仪器有限公司;WFJ7200 型可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 虎杖苷转化菌株筛选

将已分离的内生真菌 G2、J3 菌接种至斜面培养基中 28 ℃、72 h 活化,然后接入转化培养基中(50/250 mL),28 ℃、180 r/min 生物转化 96 h,发酵液 10,000 r/min 离心 10 min,除去菌体、杂质。上清液冷冻干燥,甲醇溶解,制备发酵液备用。薄层色谱(TLC)对样品进行检测,以未接入内生菌虎杖煮提液为对照,筛选能对虎杖煮提液中虎杖苷进行转化的内生菌株。

将已筛选能对虎杖煮提液中虎杖苷进行转化的内生菌株接入含底物 10 mg 虎杖苷的 PDB 培养基中(30/250 mL),28 ℃、180 r/min 生物转化 96 h,发酵液 10,000 r/min 离心 10 min,除去菌体、杂质。上清液冷冻干燥,甲醇溶解,制备发酵液备用。TLC 对样品进行检测,以未接入内生菌的含虎杖苷的 PDB 液、未接入内生菌的不含虎杖苷的 PDB 液及接入内生菌的不含虎杖苷的 PDB 液为对照,进一步验证内生菌株转化底物虎杖苷形成新物质。

标准品溶液配制:准确称取虎杖苷、白藜芦醇、α-葡萄糖素、ε-葡萄糖素、紫檀芪、氧化白藜芦醇标准品,用甲醇配制成浓度分别为 0.2、0.2、0.02、0.02、0.02、0.02 μg/mL 的标准储备液,于 4 ℃冰箱避光保存备用。

TLC 检测条件研究: 取薄层色谱板 (5×10 cm) 于烘箱 105 °C 活化 0.5 h, 毛细管分别吸取虎杖苷、白藜芦醇、 α -葡萄糖素、 ϵ -葡萄糖素、紫檀芪、氧化白藜芦醇、未发酵液点样, 置于预先饱和的不同展开剂中直立上行展开 8 cm 后取出, 于 60 °C 烘干, 254 nm 紫外显色观察, 选择适合的展开剂。吸取未发酵液、G2 发酵、J3 发酵液、虎杖苷、白藜芦醇点样, 在选择的展开条件下展开、观察, 根据比移值 (Rf) 判断微生物转化的发生。

$Rf = \text{原点} \rightarrow \text{斑点中心} / \text{原点} \rightarrow \text{溶剂前沿} \text{ 的距离}$

1.2.2 虎杖苷转化菌株鉴定

1.2.2.1 形态学鉴定

采用点植法^[12]分别点种于 CYA、MEA、G25N、CA、PDA 平板中心, 25 °C 培养 7 天, 观察各培养基中菌落特征与生长情况, 包括菌落直径、菌落质地、菌落正反面培养基颜色、孢子颜色、菌丝颜色、渗液、菌落边缘特征、气味等。用镊子挑取少量菌丝, 于光学显微镜下观察记录菌丝体及孢子形态特征等。

1.2.2.2 分子生物学鉴定

(1) 菌株总 DNA 的提取及 ITS-5.8S rDNA 序列 PCR 扩增: 采用天根试剂盒提取菌丝体的总 DNA, 选用通用引物 ITS 1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', ITS 4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (由南金斯瑞公司合成) 扩增 ITS-5.8S rDNA 基因序列。PCR 反应体系: 模板 DNA 2 μ L, 10 μ M ITS1、ITS4 各 2.0 μ L, PCR MasterMIX 25 μ L, 加无菌超纯水至 50.0 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 然后以 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次后, 72 °C 终延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶检测扩增结果, 发现目的片断后, 委托上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

(2) PCR 产物序列分析: 将菌株 ITS-5.8S rDNA 序列提交至 GenBank 上进行 BLAST 同源性比对, 寻找与目的序列同源最高的已知分类地位的菌种。并将测得序列提交 GenBank 注册, 获取登录号。

(3) 系统发育分析及系统发育树构建: 在 GenBank 中索取与内生 J3 菌株同源性高的相似菌株 ITS-5.8S rDNA 序列, 用 MEGA 4.0 软件进行序列分析, 采用 Neighbor-Joining (N-J) 法构建系统发育树。

1.2.3 虎杖苷转化产物的分离纯化

按 1.2.1 方法对筛选获得的内生真菌发酵虎杖煮提液, 收集发酵液, 离心去菌丝体和杂质, 收集上清液; 上清液经预处理的大孔树脂吸附, 依次用 30%、50%、70%、90%、无水乙醇解吸, 每 50 mL 收集一

瓶, 直至流出液无色, 旋转浓缩收集液, TLC 跟踪检测, 将含有目标组分的收集液合并、浓缩; 制备薄层色谱 (PTLC) 分离部分浓缩液, 刮下 Rf 值与目标组分一致的展开点, 收集刮下的硅胶粉, 装柱, 展开剂冲洗, 蒸干得相关组分; 高效液相色谱 (HPLC) 纯化 PTLC 样品, 得转化产物, HPLC 条件为: 色谱柱为 ODS-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 紫外检测波长 306 nm, 流动相为甲醇和水, 梯度程序: 0~5 min 甲醇为 80%~40%; 5~20 min 甲醇为 40%~35%; 20~25 min 甲醇为 35%~30%; 25~30 min 甲醇为 30%~0; 30~35 min 甲醇为 0。在相同 HPLC 条件下检测 6 种虎杖苷衍生物, 初步分析转化产物。

1.2.4 虎杖苷转化产物抗氧化活性测定

1.2.4.1 清除 DPPH 自由基能力的测定

精确配制 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液, 摇匀, 于 4 °C 冰箱避光保存备用。准确称取各标准品、Vc、BHT 及转化产物, 用无水乙醇配制成浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.2 mg/mL 的待测液, 于 4 °C 冰箱避光保存备用。

分别在 1.0 mL DPPH 溶液中加入 1.0 mL 不同浓度的待测样品, 混匀放置 30 min 后, 以无水乙醇为参比, 于 517 nm 处测定吸光度, 即为 A_i ; 用 1.0 mL 溶剂取代 1.0 mL 待测样品, 同样条件下测定吸光度, 即为 A_0 ; 用 1.0 mL 溶剂取代 DPPH 溶液所测吸光值即为 A_j , 以 Vc、BHT 为阳性对照, 按下式计算 DPPH 清除率 (Y):

$$Y(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

IC_{50} 表示清除率为 50% 时体系中的供试物浓度, 即半数清除浓度。以清除率为纵坐标, 各供试物浓度为横坐标, 建立回归方程, 计算 IC_{50} 。

1.2.4.2 清除 OH 自由基能力的测定

精确配制 6 mmol/L 水杨酸溶液、6 mmol/L H_2O_2 溶液、6 mmol/L $FeSO_4$ 溶液, 摇匀, 于 4 °C 冰箱避光保存备用。

采用水杨酸法, 分别加入 6 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液 0.7 mL, 不同浓度待测样品各 0.7 mL, 6 mmol/L 的水杨酸溶液 0.7 mL, 最后加入 6 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 0.7 mL 启动反应, 摇匀, 静置 30 min 后, 以无水乙醇为参比, 于 510 nm 处测定各反应体系的吸光度 A_x ; 0.7 mL 溶剂取代待测样品测吸光度 A_0 ; 同时用蒸馏水代替双氧水, 测得本底吸收吸光度 A_{x0} , 以 Vc、BHT 为阳性对照, 根据下式计算待测液的清除率 (Y):

$$Y(\%) = [1 - (A_x - A_{x0}) / A_0] \times 100\%$$

以清除率为纵坐标, 各供试物浓度为横坐标, 建

立回归方程, 计算 IC₅₀。

1.2.5 数据分析

实验数据以平均值±标准差表示, 采用SPSS 11.0软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 虎杖苷转化菌株筛选

将已分离的内生菌G2、J3接种于转化培养基中, 28℃、180 r/min避光转化96 h后, 进行TLC检测, 筛选能转化虎杖苷的内生真菌。TLC检测条件研究, 结果见表1, 展开剂为氯仿: 甲醇5:1及7:1时6种标准品和未发酵液展开效果最佳, 考虑氯仿的毒性较大和试剂消耗量, 选择展开剂为氯仿: 甲醇(5:1)。

3次重复试验结果表明, 在以上展开条件下, 虎杖

煮提液中虎杖苷的展开点B (R_f=0.16±0.01) 经微生物转化后消失, J3发酵液形成了明显的新展开点A (R_f=0.45±0.00), G2发酵液中未见展开点, 如图1所示, 可知J3菌具有转化虎杖苷形成产物的能力, 根据R_f可知此展开点A非未发酵液已有的物质。由于虎杖煮提液中不仅虎杖苷B点经转化后消失, 其他点经转化后也都消失, 故以纯虎杖苷为底物进行转化实验, 以验证点A为转化虎杖苷所形成, 结果如图2所示, 可知在相同展开条件下, 接入J3菌的PDB培养基中的虎杖苷经转化后消失, 形成明显的新展开点C, 且此点与展开点A的R_f值一致, 进一步证明点A为J3转化虎杖煮提液中虎杖苷所形成。在此展开条件下, 根据转化组分A与6种标准品的R_f初步判断此点也非ε-葡萄糖素、α-葡萄糖素、白藜芦醇、虎杖苷、紫檀芪、氧化白藜芦醇, 如图3所示。

表 1 6 种标准品及未发酵液在薄层层析中展开剂的选择

Table 1 Comparison of results from six standard polydatin derivatives and the unfermented liquid using TLC

编号	展开剂	比例	R _f						未发酵液展开与分离效果
			虎杖苷	白藜芦醇	α-葡萄糖素	ε-葡萄糖素	紫檀芪	氧化白藜芦醇	
1	甲醇	1	1	1	1	1	1	1	展开呈条带状、无展开点
2	氯仿: 甲醇	1:1	0.98±0.00	1	1	1	1	1	展开呈条带状、无展开点
3	氯仿: 甲醇	1:5	1	1	1	1	1	1	展开呈条带状、无展开点
4	氯仿: 甲醇	5:1	0.16±0.01	0.72±0.00	0.53±0.01	0.56±0.00	0.98±0.00	0.63±0.00	展开均匀, 各物质呈斑点状, 无拖尾
5	氯仿: 甲醇	7:1	0.07±0.02	0.47±0.01	0.25±0.01	0.31±0.01	0.90±0.00	0.48±0.01	展开均匀, 各物质呈斑点状, 无拖尾
6	氯仿: 甲醇: 石油醚	5:2:1	-	1	-	-	1	-	展开点拖尾严重
7	氯仿	1	0	0	0	0	0	0	未展开

注: “0”表示未展开; “1”表示跑至溶剂前沿; “-”表示未成点。



图 1 J3、G2 菌株转化虎杖苷 TLC 图

Fig.1 TLC Chromatogram of polydatin transformation by strains J3 and G2

注: 1-未发酵液; 2-J3发酵液; 3-G2发酵液; 4-白藜芦醇; 5-虎杖苷; A-转化组分; B-虎杖苷。

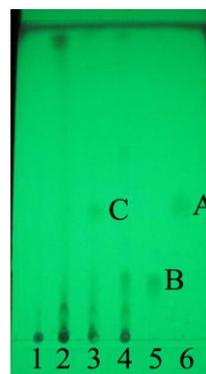


图 2 J3 菌株转化虎杖苷 TLC 图

Fig.2 TLC Chromatogram of polydatin transformation by strain J3

注: 1-不含虎杖苷未发酵液; 2-不含虎杖苷J3发酵液; 3-含虎杖苷未发酵液; 4-含虎杖苷J3发酵液; 5-虎杖苷; 6-转化组分; A-转化组分; B-虎杖苷。



图3 转化组分A与6种标准品TLC图

Fig.3 TLC Chromatogram of transformation products A and six standards

注：1-虎杖苷；2-白藜芦醇；3- α -葡萄糖；4- ϵ -葡萄糖；5-氧化白藜芦醇；6-紫檀芪；7-转化组分A。

2.2 虎杖苷转化内生真菌J3的鉴定

2.2.1 形态学鉴定

内生真菌J3在G25N、CA培养基中生长速度较慢，在CYA、MEA培养基中生长速度中等，在PDA培养基中生长最快，并且只在G25N中有黄褐色渗出液产生，具焦香味。各培养基下菌落形态、大小、颜色变化较大，见表2及图4。

表2 J3在不同培养基上的特征

Table 2 Characteristics of strain J3 growth on different media

培养基	菌落直径大小/mm	菌落描述							气味
		表面	边缘	隆起形状	正面颜色	反面颜色	水溶性色素		
CYA	52-72	较明显放射状沟纹和皱缩	整齐	中心突起	中央青灰色、边缘白色菌丝、有明显环带、孢子青灰色	浅黄色	无	无	
PDA	75-77	表面平整、绒状	整齐	中心小突起	淡绿色、无明显环带、孢子黑色	菌丝淡绿色	无	无	
MEA	50-55	平整、有较明显环带	整齐	平整	中心区白色、向外呈青灰色、边缘白色、孢子青灰色	中央青色，边缘菌丝白色	无	无	
CA	40-43	平整、绒状、有较明显环带、中央具明显褶皱	绒毛状	中心突起、褶皱	中心区青绿色，有明显环带、边缘白色绒状菌丝	中央青色，边缘菌丝白色	无	无	
G25N	40-43	有较明显放射状沟纹和皱缩	绒毛状	中心有凹陷	呈青绿色，菌落边缘为白色菌丝	浅黄褐色	有黄褐色渗出液	具焦香味	

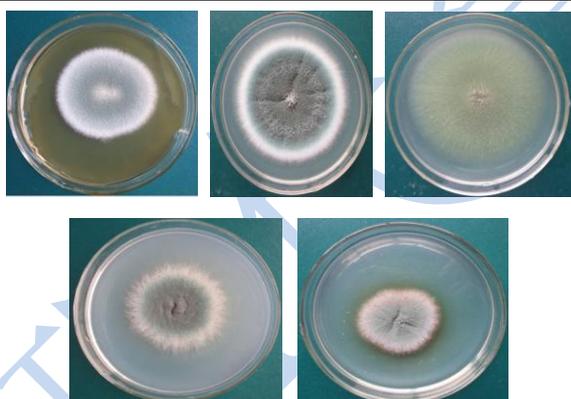


图4 内生真菌J3在CYA、MEA、G25N、CA、PDA培养基上的菌落形态

Fig.4 Morphological characteristics of strain J3 on CYA, MEA, G25N, CA, and PDA plates

注：1-MEA培养基；2-CYA培养基；3-PDA培养基；4-CA培养基；5-G25N培养基。

光学显微镜下观察内生真菌J3菌丝细长、交织分布，有隔膜，无假根，分生孢子梗发生于菌丝，顶囊烧瓶形，分生孢子圆球形、光滑，见图5。根据菌株的菌落、显微形态特征，参考《真菌鉴定手册》和《常

见及常用真菌》，初步鉴定该菌株为半知菌亚门丛梗孢目丛梗孢科曲霉属真菌。



图5 内生真菌J3菌丝的显微形态(10×40)

Fig.5 Microstructure of strain J3 mycelium (10 × 40)

2.2.2 分子生物学鉴定

2.2.2.1 内生真菌J3总DNA提取与ITS-5.8S rDNA扩增

提取J3菌株总DNA，经电泳检测得到特异性条带，如图6所示，表明内生真菌J3总DNA提取成功。以提取的总DNA为模板，进行PCR扩增，得到约600 bp的单一DNA条带，电泳图见图7，此结果与以往ITS-5.8S rDNA在所有真菌中都高度保守且长度恒定(约600 bp)的报道

相吻合^[13], 表明内生真菌J3 ITS-5.8S rDNA片段扩增成功。

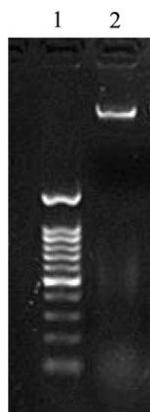


图 6 内生真菌 J3 DNA 电泳图

Fig.6 Genomic DNA electrophoresis of strain J3

注: 1:Marker 2: J3 基因组DNA。

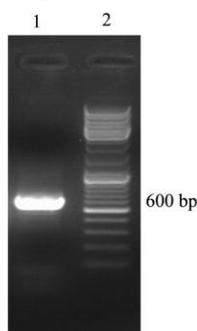


图 7 内生真菌 J3 ITS-5.8S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.7 Electrophoresis of PCR-amplified products from ITS-5.8S rDNA of strain J3

注: 1-Marker; 2-PCR 扩增产物。

2.2.2.2 内生真菌J1 ITS-5.8S rDNA 序列分析

测序结果显示内生真菌J3 ITS-5.8S rDNA序列全长573 bp, 该序列在GenBank数据库登录号为KM434883。将序列与GenBank数据库中序列进行BLAST 同源性比对, 结果表明: 内生真菌J3与烟曲霉*Aspergillus fumigatus* (NR 121481.1)同源性最高, 相似性为100%。

2.2.2.3 系统发育分析和系统发育树的构建

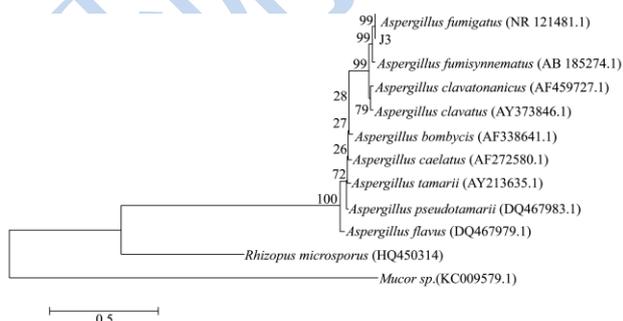


图 8 内生真菌 J3 的 ITS 系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree of endophytic fungus J3 based on ITS region sequences (neighbor-joining)

在GenBank中索取与内生真菌J3 ITS-5.8S rDNA 序列同源性高的相似菌株11株, 用MEGA 4.0软件进行序列分析, 采用N-J法绘制系统发育树, 见图8。结果显示, 内生菌株J3与*Aspergillus*属的真菌处于一个大的分支内, 与烟曲霉*Aspergillus fumigatus* (NR 121481.1) 处于同一分支, 进化距离最近。该结果与菌落和显微形态鉴定结果相符, 进一步确定J3菌属于半知菌亚门丛梗孢目丛梗孢科曲霉属烟曲霉*Aspergillus fumigatus*。

2.3 虎杖苷转化产物的分离纯化

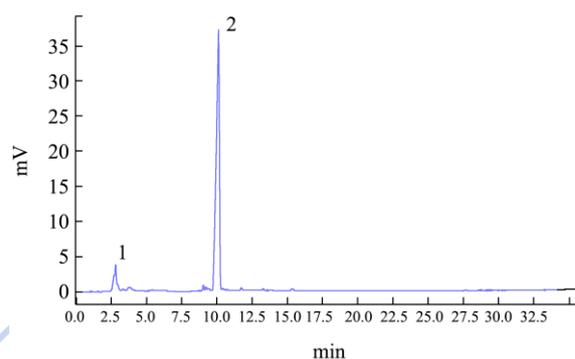


图 9 HPLC 分离 PTLC 样品图谱

Fig.9 HPLC chromatogram of PTLC sample

注: 1-A-1; 2-A-2。

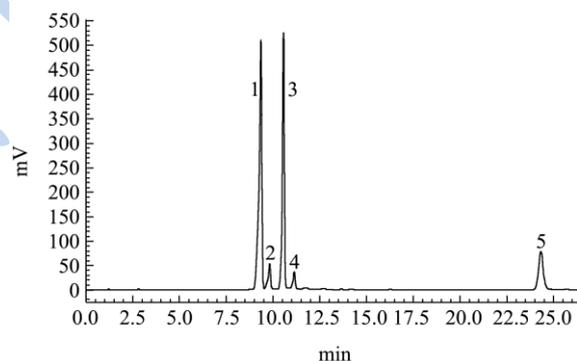


图 10 5 种标准品 HPLC 图谱

Fig.10 HPLC chromatogram of five standard polydatin derivatives

注: 1-虎杖苷; 2-氧化白藜芦醇; 3-白藜芦醇; 4-ε-葡萄糖; 5-紫檀芪。

按方法 1.2.1 制备得 3 L 上清液, 上清液经 300 g AB-8 大孔树脂吸附, 依次用 30%、50%、70%、90%、无水乙醇解吸, 直至各段流出液无色, 得 173 瓶收集液 (50 mL/瓶), TLC 跟踪检测, 发现 5~88 瓶收集液含有目标组分 A, 将有目标组分 A 的收集液合并、浓缩; PTLC 分离大孔树脂浓缩液 20 mL, 氯仿: 甲醇 (5:1) 展开, 刮下与目标产物一致的展开点, 收集刮下的硅胶粉, 装柱, 展开剂冲洗, 蒸干得相关组分 A 0.483g。HPLC 纯化 PTLC 样品, HPLC 图谱见图 9,

出现两个主要吸收峰,依次命名为 A-1 和 A-2, 出峰时间 (Rt) 分别为 2.552、10.166 min, 按此图谱手动收集各吸收峰。而在此 HPLC 检测条件下虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇、 ϵ -葡萄糖素、紫檀芪的 Rt 分别为 9.360、9.823、10.820、11.137、24.326 min, α -葡萄糖素未检出, 图谱见图 10, 进一步说明转化组分 A 并非此 5 种虎杖苷衍生物。

2.4 虎杖苷转化产物抗氧化活性测定

2.4.1 清除 DPPH·自由基能力

以清除率为纵坐标, 各供试物浓度为横坐标, 通过 Excel 软件建立各物质清除 DPPH·自由基的回归方程, 计算 IC_{50} 值, 并进行显著性分析, 结果见表 3。随着各物质浓度的增大, DPPH·自由基清除率也随之提高, 表明其浓度与清除 DPPH·自由基能力呈一定的量效关系。 IC_{50} 值越小表明清除能力越强, 抗氧化能力越高。由表 3 可知, 各物质清除 DPPH·自由基的能力强弱依次为 Vc>氧化白藜芦醇>白藜芦醇> ϵ -葡萄糖素>BHT>虎杖苷>紫檀芪>A-2> α -葡萄糖素>A-1。由此可知, 经内生真菌 J3 转化后分离得的 A-1 无清除 DPPH·自由基能力, A-2 具有清除 DPPH·自由基能力 (IC_{50} 为 0.195 ± 0.01 mg/mL), 且清除能力强于 α -葡萄糖素 ($IC_{50} > 0.2$ mg/mL), 但比底物虎杖苷 (IC_{50} 为 0.055 ± 0.00 mg/mL) 及其他 4 种虎杖苷衍生物弱。

2.4.2 清除 OH·自由基能力

表 3 各样品清除 DPPH·自由基及 OH·自由基的 IC_{50}

Table 3 IC_{50} values for DPPH· and OH· radical-scavenging

名称	capacity of each sample	
	IC_{50} /(mg/mL)	
	DPPH·	OH·
虎杖苷	0.055 ± 0.00^c	0.75 ± 0.13^b
白藜芦醇	0.02 ± 0.00^e	0.06 ± 0.00^f
紫檀芪	0.062 ± 0.00^b	0.10 ± 0.02^e
氧化白藜芦醇	0.008 ± 0.00^f	> 2
ϵ -葡萄糖素	0.04 ± 0.00^d	1.44 ± 0.13^a
α -葡萄糖素	> 0.2	0.16 ± 0.01^d
Vc	0.006 ± 0.02^f	0.05 ± 0.01^f
BHT	0.05 ± 0.00^d	0.07 ± 0.00^{ef}
A-1	-	-
A-2	0.195 ± 0.01^a	0.28 ± 0.03^c

注: 同列不同小写字母表示在 0.05 水平显著差异。

以清除率为纵坐标, 各供试物浓度为横坐标, 通过 Excel 软件建立各物质清除羟基自由基的回归方程, 计算 IC_{50} 值, 并进行显著性分析, 结果见表 3。随着各物质浓度的增大, OH·自由基清除率也随之提

高, 表明其浓度与清除 OH·自由基能力呈一定的量效关系。 IC_{50} 值越小表明清除能力越强, 抗氧化能力越高。由表 3 可知, 各物质清除 OH·自由基的能力强弱依次为 Vc>白藜芦醇>BHT>紫檀芪> α -葡萄糖素>A-2>虎杖苷> ϵ -葡萄糖素>氧化白藜芦醇。由此可知, 经内生真菌 J3 转化后分离得的 A-1 无清除 OH·自由基能力, A-2 具清除 OH·自由基能力 (IC_{50} 为 0.28 ± 0.03 mg/mL), 且清除能力比底物虎杖苷 (IC_{50} 为 0.75 ± 0.13 mg/mL) 及 ϵ -葡萄糖素 (IC_{50} 为 1.44 ± 0.13 mg/mL)、氧化白藜芦醇 ($IC_{50} > 2$ mg/mL) 更强, 但弱于白藜芦醇 (IC_{50} 为 0.06 ± 0.00 mg/mL)、紫檀芪 (IC_{50} 为 0.10 ± 0.02 mg/mL) 及 α -葡萄糖素 (IC_{50} 为 0.16 ± 0.01 mg/mL)。

3 结论

3.1 研究发现, 虎杖苷具有多种生物活性, 但是其生物利用度却远远低于其类似物白藜芦醇^[4], 且虎杖苷在肠道中糖苷酶作用下分解释放白藜芦醇, 从而发挥药理作用^[15], 在植物体内白藜芦醇会迅速代谢形成甲基化衍生物紫檀芪、二聚体 α -葡萄糖素、三聚体 ϵ -葡萄糖素、氧化白藜芦醇等具有相同或更高活性的转化产物^[3], 故近年来关于虎杖内生菌转化虎杖苷形成代谢物的研究引起广泛关注。田天丽等^[16]从虎杖中筛选到一株具有转化虎杖苷能力的根霉菌株 T-34, 利用该菌株产生的 β -葡萄糖苷酶可将虎杖苷转化为白藜芦醇, 转化率达 98%; 刘华金等^[17]发现从虎杖中分离到 6 株内生菌, 均具有转化虎杖苷形成白藜芦醇的能力。但目前, 关于虎杖内生真菌转化虎杖苷形成其他衍生物或类似物却鲜见报道。本研究发现, 源于虎杖茎部的内生真菌 J3 具有转化虎杖苷的能力, 根据消耗虎杖苷形成转化组分 A 的转化结果, 可知转化组分 A 为虎杖苷转化产物。TLC 展开剂为氯仿: 甲醇 (5:1) 时白藜芦醇、 α -葡萄糖素、 ϵ -葡萄糖素、紫檀芪、氧化白藜芦醇的 R_f 分别为 0.72 ± 0.00 、 0.53 ± 0.01 、 0.56 ± 0.00 、 0.98 ± 0.00 、 0.63 ± 0.00 , 而转化组分 A 的 R_f 为 0.45 ± 0.00 , 由此可知转化产物 A 非白藜芦醇也并非上述另 4 种虎杖苷衍生物; 相同 HPLC 检测条件下, 虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇、 ϵ -葡萄糖素、紫檀芪的 Rt 分别为 9.360、9.823、10.820、11.137、24.326 min, α -葡萄糖素未检出, 而转化组分 A 中的物质 A-1 和 A-2 的 Rt 为 2.552、10.166 min, 进一步证明上述结果即转化组分 A 非此 5 种虎杖苷衍生物。由此推测, A-1 和 A-2 可能为其他的或新的虎杖苷衍生物, 但它们的确切化学结构还待详细研究, 本课题组正在进行这方面的工作。

3.2 通过对内生真菌 J3 在上述 5 种不同培养基上菌落形态观察和菌丝、分生孢子等显微观察, 并结合

ITS-5.8S rDNA 序列比对和系统发育树分析, 鉴定内生真菌 J3 为烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*, GenBank 登录号为 KM 434883。

3.3 虎杖苷及衍生物均属于二苯乙烯类化合物, 有研究表明, 它们清除自由基能力的强弱与自身结构关系密切, 由酚羟基的位置和数目所决定^[18]。虎杖苷是一种天然活性物质, 在体外具有清除 DPPH· 自由基和 OH· 自由基的能力, 其衍生物白藜芦醇、氧化白藜芦醇、 α -葡萄糖素、 ϵ -葡萄糖素及紫檀芪也具有不同的清除能力。本研究发现, 内生真菌 J3 生物转化组分 A 经分离得到 A-1 和 A-2, A-1 在体外无清除 DPPH· 自由基和 OH· 自由基的能力, A-2 在体外具有清除 DPPH· 自由基和 OH· 自由基的能力, 且清除 DPPH· 自由基的能力强于衍生物 α -葡萄糖素、清除 OH· 自由基的能力强于底物虎杖苷及衍生物 ϵ -葡萄糖素、氧化白藜芦醇。可见, 虎杖苷经内生真菌 J3 生物转化, 改变了其结构, 既可能形成了无抗氧化活性的衍生物, 同时也形成了抗氧化活性更高的衍生物, 由此推测, 内生真菌 J3 可产生能改变虎杖苷上酚羟基位置或数目的酶系。因此, 可以通过内生真菌 J3 转化进一步改造虎杖苷获得新的二苯乙烯类化合物, 为天然抗氧化活性药物筛选提供更多先导化合物。

参考文献

- [1] 杨红美, 陈波, 曾建国, 等. HPLC 同时测定虎杖及其提取物中 4 种有效成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 202-205
YANG Hong-mei, CHEN Bo, ZENG Jian-guo, et al. Simultaneous determination of resveratrol, emodin, chrysophanol, physcion, in root of *Polygonum cuspidatum* and its extract by HPLC [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(3): 202-205
- [2] 白杨, 潘隽丽, 苏薇薇. 白藜芦醇与白藜芦醇苷的研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(1): 55-59
BAI Yang, PAN Jun-li, SU Wei-wei. The research progress of resveratrol and glycosides [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(1): 55-59
- [3] Pezet R, Gindro K, Viret O, et al. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2004, 65(6): 297-303
- [4] Nicotra S, Cramarossa M R, Mucci A, et al. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens* [J]. Tetrahedron, 2004, 60(3): 595-600
- [5] 李晓青, 陈燕琼, 欧阳文, 等. 枇杷叶内生菌与金龟子绿僵菌对熊果酸的生物转化研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(5): 490-493
LI Xiao-qing, CHEN Yan-qiong, OUYANG Wen, et al. Transformation of ursolic acid by endophytic fungus in loquat leaf and *Metarhizium anisopliae* [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(5): 490-493
- [6] Qin J C, Zhang Y M, Gao J M, et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19(6): 1572-1574
- [7] 肖苏尧, 彭维, 李赞, 等. 虎杖中白藜芦醇生物转化菌的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 749-752
XIAO Su-yao, PENG Wei, LI Yun, et al. Screening and identification of strain for resveratrol biotransform from *Polygonum cuspidatum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 749-752
- [8] 彭浩, 邓百万, 陈文强, 等. 虎杖内生真菌产白藜芦醇苷菌株的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 889-894
PENG Hao, DENG Bai-Wan, CHEN Wen-Qiang, et al. Isolation and identification of the endophytic fungus producing polydatin in *Polygonum cuspidatum* [J]. Microbiology China, 2011, 38(6): 889-894
- [9] 夏海武, 吕柳新. 虎杖不同部位白藜芦醇含量的分析[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(3): 55-56
XIA Hai-wu, LU Liu-xin. Analysis of resveratrol content in different parts of *Polygonum cuspidatum* [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2005, 14(3): 55-56
- [10] 张清峰, 付莹娟, 陈继光, 等. 高效液相色谱法同时测定虎杖中五种活性成分[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 216-219
ZHANG Qing-feng, FU Ying-juan, CHEN Ji-guang, et al. Simultaneous determination of five bioactive compounds in *Polygonum cuspidatum* by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 216-219
- [11] 李智伟. 一株产菌核青霉的分离鉴定与生物学特性研究[D]. 太原: 山西大学, 2010
LI Zhi-wei. Isolation and identification of one strain of *Penicillium* producing sclerotia and analysis of biological characteristics [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2010
- [12] 高宁. 盘龙参内生真菌的分离鉴定及其化学成分相关性的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009
GAO Ning. The study on identification of endophytic fungi isolated from *Spiranthes sinensis* (pers) ames and the chemical relationship among the fungi [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2009
- [13] 段春芳, 李枝林, 方飞, 等. 云南几种兰花菌根真菌的分离鉴定

- [J].西南农业学报,2010,23(3):756-759
- DUAN Chun-fang, LI Zhi-lin, FANG Fei, et al. Isolation and identification research of eycorrhizal isolated from *Several orchids* in Yunnan province [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(3): 756-759
- [14] MENG X F, Maliakal P, LU H, et al. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 935-942
- [15] CHEN Sh W, MA H Q, CHEN L, et al. Resveratrol and its derivatives in wines [J]. Food and Fermentation Industries, 1999, 25(4) :53-55
- [16] 田天丽,沈竞,徐萌萌.虎杖中虎杖苷的微生物发酵转化研究 [J].四川大学学报(自然科学版),2008,45(2):437-440
- TIAN Tian-Li, SHEN Jing, XU Meng-Meng, et al. Biotransformation of polydatin from *Polygonum cuspidatum* by *Rhizopus* sp. T-34 [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2008, 45(2): 437-440
- [17] 刘华金,易有金,杨建奎,等.转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的分离和鉴定[J].食品科学,2012,33(11):172-179
- LIU Hua-jin, YI You-jin, YANG Jian-kui, et al. Isolation and identification of endophytic fungi capable of transforming polydatin from *Polygonum cuspidatum* [J]. Food Science, 2012, 33(11): 172-179
- [18] Thomas S, Monika F S, Philipp S, et al. Resveratrol and resveratrol analogues-structure-activity relationship [J]. Pharmaceutical Research, 2010, 27(6): 1042-1048