

虎杖中白藜芦醇生物转化菌的筛选及鉴定

肖苏尧¹, 彭维², 李赞¹, 农嘉仪¹, 陈雪香¹, 赵力超¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广州医学院, 广东广州 510182)

摘要: 白藜芦醇具有多种生物学活性, 具有很高的应用价值, 白藜芦醇的前体物质白藜芦醇苷在虎杖中含量较高, 可通过微生物转化成白藜芦醇。论文采用添加有白藜芦醇苷的固体培养基, 从虎杖内筛选能将白藜芦醇苷转化成白藜芦醇的内生菌, 然后对筛选到的菌种进行鉴定。通过菌种形态学、显微镜观察和18S rDNA序列分析等方法, 鉴定结果显示该菌种为卡门培尔青霉(*Penicillium camemberti*)。

关键字: 虎杖; 白藜芦醇; 生物转化; 菌种筛选; 卡门培尔青霉

文章编号: 1673-9078(2012)7-749-752

Screening and Identification of Strain for Resveratrol Biotransform from *Polygonum cuspidatum*

XIAO Su-yao¹, PENG Wei², LI Yun¹, NONG Jia-yi¹, CHEN Xue-xiang¹, ZHAO Li-chao¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

Abstract: Resveratrol is a grape polyphenol with a variety of bioactivities. The precursor substances of resveratrol, polydatin, have high content in plants, such as *Polygonum cuspidatum*. In this paper, screening medium with polydatin was used to screen a strain that can convert polydatin into resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. Then the screened strain was identified by morphology and 18S rDNA sequence analysis methods. The identified results showed that the strain was *Penicillium camemberti*.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; resveratrol; biotransformation; strain screening; *Penicillium camemberti*

白藜芦醇是一种广泛存在于自然界中的生物活性物质, 属非黄酮类多酚化合物, 具有抗氧化、抗肿瘤、动脉粥样硬化等多种生物学活性^[1-5], 在食品、保健和生物医学领域的应用越来越广泛^[6-8]。白藜芦醇目前有两种获得方法, 一是化学合成法^[9,10], 二是从虎杖等植物中提取, 从植物中提取获得天然白藜芦醇更符合现代人对健康追求的需要。但是植物中的含量不高, 自然资源有限, 制约了白藜芦醇的广泛应用。有研究表明, 白藜芦醇的前体物质白藜芦醇苷含量比白藜芦醇高2~5倍^[11,12], 因此将白藜芦醇苷转化成白藜芦醇, 将为充分利用自然资源、缓解自然资源的短缺提供有效途径。

生物转化有很强的专一性, 催化效率高, 反应过程条件温和, 绿色天然, 成本低廉, 在天然产品的生产中应用广泛。虎杖中同时含有丰富的白藜芦醇苷和白藜芦醇, 因此其生物体内可能含有能够实现转化的内

生菌。本论文通过微生物筛选的方法, 从虎杖中筛选到能够将白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的内生菌, 并进行菌种鉴定, 为白藜芦醇的生物转化提供依据。

1 材料及方法

1.1 材料与试剂

中药鲜虎杖, 采集于湖南省吉首; 白藜芦醇, 白藜芦醇苷标准品(纯度均≥99%), Sigma; 乙腈(色谱纯, Fisher); DNA Marker (D-2000)、LA Taq、PCR buffer (GCbuffer I)、dNTPs, Takara; 扩增引物, 吉美生物; DNA提取试剂盒, Solarbio; Gold view(II型), 优尼康。其余分析试剂均采用国产分析纯。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪(岛津 LC-10AT_{VP plus}); 色谱柱(迪马公司 Diamonsil); 快速基因扩增仪(PCR)(Eppendorf Mastercycle ep)

1.3 试验方法

1.3.1 白藜芦醇苷前处理及培养基配置

无菌工作环境下将0.5 g白藜芦醇苷加入10 mL无菌乙醇中进行灭菌, 自然挥干后备用。

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A010900003)

作者简介: 肖苏尧(1974-), 女, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质的研究

基础培养基：称量硝酸钠0.3 g，磷酸氢二钾0.1 g，硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 0.05 g，氯化钾0.05 g，硫酸亚铁0.001 g于容量瓶，蒸馏水定容至100 mL。富集培养基：称取已灭菌白藜芦醇苷100 mg加入已灭菌基础培养基中，既得富集培养基。筛选培养基：使用上述基础培养基并添加1.5%琼脂固定，使用前加热溶解，冷却至50 ℃时称取无菌白藜芦醇苷100 mg加入其中，充分混匀，防止结块，即得筛选培养基。

1.3.2 白藜芦醇与白藜芦醇苷的 HPLC 检测方法建立

标准品采用甲醇稀释 5 倍后，采用色谱进行检测，条件为：迪马 C18 钻石柱(200×4.6 mm)；检测波长：306 nm；流动相：A(0.05% 磷酸水溶液)，B(乙腈)，A:B=65:35；流速：1 mL/min；进样体积 10 μL。同时，使用外标法建立标准曲线，建立白藜芦醇与白藜芦醇苷同时检测的有效条件。

1.3.3 菌种的筛选

取打碎的虎杖 10.0 g 置于烧杯中，向其中加入 20 mL 去离子水，静置 24 h 备用。

取富集培养基分装至 5 个三角烧瓶中，分别加入虎杖浸出液 20 μL，封口于 28 ℃、避光、200 r/min 下震荡培养 4 d，然后将培养液涂布于筛选培养基上，于 28 ℃下培养，然后观察是否有能形成水解圈的菌种长出。挑出具有水解圈的单菌落涂布于筛选培养基上，48 h 后观察水解圈形成情况。

1.3.4 转化白藜芦醇的提取及检测

取水解圈培养基，用刀片切出 1 g，用 10 mL 甲醇提取后，稀释后进行 HPLC 分析，观察培养基中白藜芦醇的生成情况，从而得到具有高转化能力的菌种。

1.3.5 菌种的形态学观察及 18S rDNA 鉴定

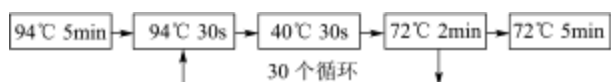
对得到的具有高转化能力的菌种通过显微镜进行形态学观察；并采用试剂盒提取菌种基因组DNA、PCR扩增，进行18SrDNA鉴定，条件如表1所示。

表1 菌种 18S rDNA 片段 PCR 扩增体系

Table 1 Strain 18S rDNA PCR amplification system

名称	用量/μL	名称	用量/μL
模板 DNA	1	GCbuffer I(2×)	15
*上游引物 NS1(10μm/mL)	1	LA Taq(5U/μL)	0.5
*下游引物 NS8(10μm/mL)	1	ddH ₂ O	加至 30

注：上游引物 NS1：GTAGTCATATGCTTGTCTC 下游引物 NS8：TCCGCAGGTTCACTACGGA。



2 结果与分析

2.1 HPLC 法检测白藜芦醇与白藜芦醇苷

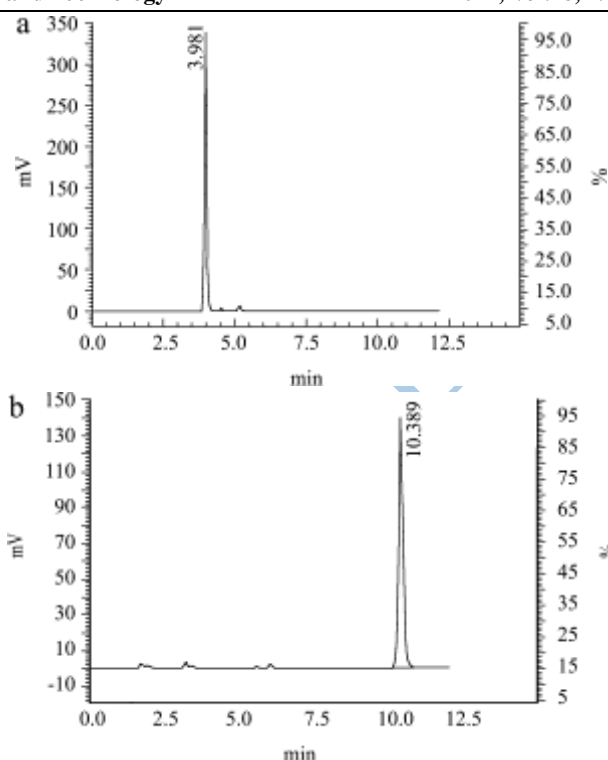


图1 白藜芦醇苷(a)与白藜芦醇(b)的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of resveratrol (a) and polydatin (b)

经HPLC法建立起白藜芦醇与白藜芦醇苷同时检测的方法，首先通过标准品检测确定白藜芦醇与白藜芦醇苷的保留时间(见图1)，白藜芦醇保留时间和峰面积的RSD分别为0.225%和0.027%，标准曲线为 $y=17129x-242771$ ，白藜芦醇苷的保留时间和峰面积的RSD分别为0.075%和0.173%，标准曲线为 $y=9695.2x-50378$ ，曲线的线性关系良好。

2.2 白藜芦醇转化菌种筛选



图2 虎杖中白藜芦醇转化菌筛选

Fig.2 Strain screening from *Polygonum cuspidatum* for resveratrol biotransform

注：A-未纯化菌落培养；B-纯化后菌落培养。

采用富集培养基，从虎杖浸出液中筛选具有白藜芦醇转化功能的内生菌。观察到平行培养的 5 个培养瓶中均有菌落生长，将瓶中生长的菌落接种于筛选培养基中，观察到瓶 4 的菌落在筛选培养基中有水解圈生成，而其余培养基无明显水解圈。再将瓶 4 中水解

圈中的菌纯化接种于上述筛选培养基中,培养48 h后,可看到明显的水解圈(图2所示)。

2.3 白藜芦醇转化效果的HPLC分析

瓶4中的菌在筛选培养基上产生明显水解圈,为了判断是否生成了白藜芦醇,对水解圈附近的培养基进行提取,用HPLC分析。取水解圈附近的培养基1 g,用甲醇提取,提取液的HPLC图显示,对照组中只有在白藜芦醇苷的出峰位置有个大峰,而水解圈提取物中则只有在白藜芦醇的出峰位置有个大峰,由此判断水解圈附近的白藜芦醇苷几乎全部转化为白藜芦醇(见图3)。

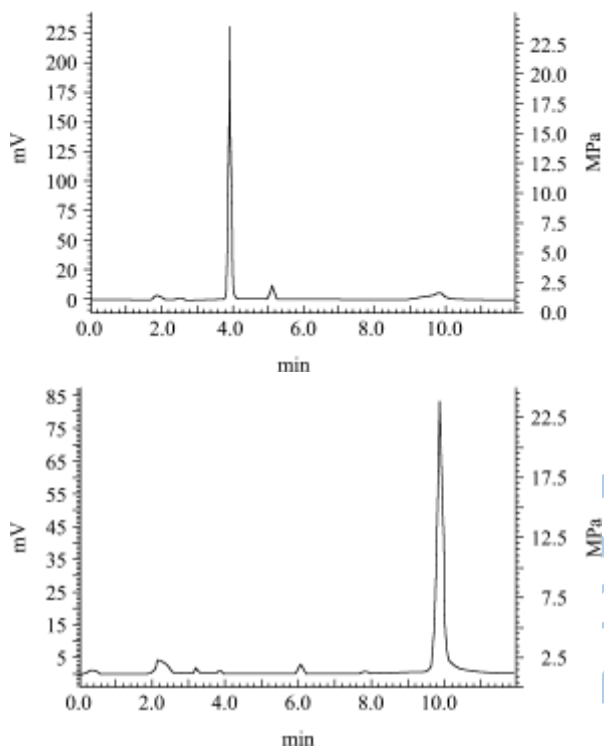


图3 水解圈附近培养基提取物的HPLC图

Fig.3 HPLC chromatograms of medium extracts

注: a-筛选培养基对照提取物; b-水解圈培养基提取物。

2.4 菌种鉴定

2.4.1 菌种的形态学鉴定结果



图4 菌种在固体培养基中生长和染色显微图

Fig.4 Plant colony and staining micrographs of strain

注: A-菌种在固体培养基中生长情况; B、C-菌种染色后的显微图。

将察氏固体培养基倒平板,冷凝后用接种钩挑取水解圈中的菌丝点接于平板,30℃培养箱中倒置培

养48 h以上,观察菌落形成的过程和形态。经菌落形态观察,在察氏培养基上,菌落呈青绿色,圆形,中间有突起,边缘呈白色(见图4A),参考真菌鉴定手册,根据菌落形态上的观察,该菌种疑似为青霉菌。

用水浸片法制片,在干净的载玻片中央滴加一滴乳酸石炭酸蓝棉液,用解剖针从菌落边缘划取菌丝体一小块,放入乳酸石炭酸蓝棉液中,盖上盖玻片,在显微镜下观察。观察菌株的菌丝有无横隔、足细胞,观察孢子的形状大小和着生方式及其孢子梗。经乳酸石炭酸棉兰染色液染色后于观察发现,基部无足细胞,顶端不形成膨大的顶囊,其分生孢子梗经过多次分枝,产生几轮对称或不对称的小梗,形如扫帚(图4B、C)。与《真菌鉴定手册》中关于青霉的描述一致,可鉴定为子囊菌亚门(*Ascomycotina*),不整囊菌纲(*Plectomycetes*),散囊菌目(*Eurotiales*),散囊菌科(*Eurotiaceae*),青霉属(*Penicillium*)。

2.4.2 菌种18S rDNA鉴定结果

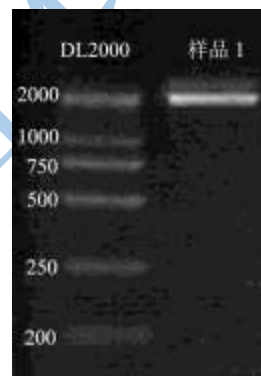


图5 PCR产物电泳图

Fig.5 Electrophoresis of PCR product

参照真菌提取试剂盒附带提取方法操作提取菌种基因组DNA。按照表1所示配制好PCR扩增体系,然后在PCR仪上进行扩增。完成后经1%琼脂糖凝胶电泳对扩增DNA进行分析,结果如图5所示,PCR扩增成功获得一条约在1800左右的亮带,条带亮度较高。将PCR产物外送上海吉美生物工程有限公司进行测序测序结果见附录所示。使用Bioedit等软件进行拼接,得到该菌种18S rDNA序列,长度为1735。经NCBI序列比对,该序列与青霉属具有高度的同源性,与卡门培尔青霉(*Penicillium camemberti*)等同源性在99%以上,由此判断应为卡门培尔青霉。卡门培尔青霉是一种用于干酪生产上的菌种,有数百年的使用经历,因此本研究中获得菌种具有安全性。

附录:

菌种的18S rDNA序列

GGGCTGTCTAGTATAGCACTTGTACTGTGAAGTGGGAATG
GCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACT

ACATGGATACCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTA
 AAAACCCCGACTTCAGGAAGGGGTGATTTATAGATAA
 AAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAAT
 AACTTAAGGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTC
 ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTGATGGTAGGATAGT
 GGCTTACCATGGTGGCAACGGGTAAACGGGGAATTAGGGT
 TCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT
 CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCG
 ATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACGGGGCT
 CTTTTGGGTCTCGTAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCC
 CTAAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGGCCAG
 CAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGT
 TGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGTCTG
 GCTGGCCGGTCCGCCTCACCGCGAGTACTGGTCCGGCTG
 GACCTTTCCTTCTGGGGAACCTCATGGCCTTCACTGGCT
 GTGGGGGAACCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAG
 TGTTCAAAGCAGGCCTTTGCTCGAATACATTAGCATGGAA
 TAATAGAATAGGACGTGTGGTCTAATTTGTTGGTTTCTAG
 GACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCGTCA
 GTATTGAGCTGTGAGAGGTGAAATTCTGGATTGCTGAA
 GACTAACTACTGCGAAAGCAATCGCCAAGGATGTTTTAT
 TAATCACGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
 ATACCGTCTGATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGG
 ATCGGACGGGATTCTATAATGACCCGTTCCGGACCTTACG
 AGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTTCG
 CACGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCAC
 AAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG
 GAAACTCACCAGGTCCAGACAAAATAAGGATTGACAGAT
 TGAGAGCTCTTCTTATGATCTTTGGATGGTGGTGCATGGC
 CGTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGA
 TAACGAACGAGACCTCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC
 ATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTAGGGGACTATCGGCTC
 AAGCCGATGGAAAGTGCGCCGCAATAACAGGTCTGTGATG
 CCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGACA
 GGGCCAGCGAGTACATCACCTTAACCGAGAGGTTTGGGT
 AATCTTGTTAAACCTGTCTGTGGGATAGAGCATTGC
 AATTATTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACGA
 GTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCCTGCCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAG
 GCCTTGGGATTGGCTTAGGAGGGTTGGCAACGACCCCC
 AGAGCCGAAAACCTTGGTCAAACCTCGGTCAATTAGAGAAG
 TAAAGTAAGGC

3 结论

本研究获得的菌种与卡门培尔青霉(*Penicillium camemberti*)具有很高的同源性, 该菌种文献中已有报道, 在欧洲多国常用于奶酪的发酵等工艺, 已有多年的应用历史, 因此该研究可以保证菌种使用的安全性。本研究建立了一种快速筛选分离纯化具生物转化能力菌种的方法, 该方法同时可移植到其他物质中取, 例如大黄素素等, 以便从自然界中快速筛选出对该物质的转化具有针对性的菌种, 为生物转化菌种资源库添加新的菌种。

参考文献

- [1] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(5297): 218-220
- [2] Das S, Das D K. Anti-inflammatory responses of resveratrol [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007, 6(3): 168-173
- [3] 胡可可, 谭琛, 张琴白, 等. 白藜芦醇对小鼠移植宫颈癌的抑制作用及机制研究[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(12): 944-949
- [4] Elmali N, Esenkaya I, Harma A, et al. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits [J]. *Inflamm Res*, 2005, 54(4): 158-162
- [5] Tou J S, Urbizo C. Resveratrol inhibits the formation of phosphatidic acid and diglyceride in chemotactic peptide or phorbol ester-stimulated human neutrophils [J]. *Cellular Signalling*, 2001, 13(3): 191-197
- [6] 王冲, 华子春. 白藜芦醇的免疫调节作用研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(1): 84-87
- [7] Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, et al. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes *in vitro* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(3): 677-687
- [8] 任亚浩, 李岩溪, 于飞, 等. 白藜芦醇对高脂高胆固醇饲料喂养小鼠脂质过氧化水平的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(1): 17-19
- [9] 丁刘刚, 晏日安, 黄雪松, 等. 功能性食品配料白藜芦醇的合成方法[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(3): 83-85
- [10] 丁刘刚, 晏日安, 黄雪松, 等. 白藜芦醇合成过程中双键形成方法的研究[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(1): 48-51
- [11] 庄彦, 袁经权, 周小雷, 等. 虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷提取工艺的研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(6): 61-64
- [12] 刘仁旺, 滕增辉, 张邦乐, 等. 虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取及含量测定[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(3): 197-199