

碳和氮源以及 pH 对耐有机溶剂葛根素糖基化菌株 *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC 4913 生长及转化活性的影响

刘贵友^{1,2}, 王思渊², 袁 生²

(1. 江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 江苏 南京 210013)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心,
江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 本实验从当地土壤样品中分离纯化得到一株耐有机溶剂菌株 *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC 4913, 具有通过菌体细胞生物转化反应将葛根素转化得到葛根素-7-O-果糖苷的能力。本研究探讨碳源、氮源以及 pH 等培养条件对 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株生长及其转化活性的影响。研究表明, LB 培养基完全可以为 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株生长提供碳源, 蛋白胨和胰蛋白胨为氮源培养得到的菌株转化活性良好, 在 pH 7.0 条件下 LB 培养基培养 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株, 菌株生长较好, 有较高的转化活性且活性相对稳定。

[关键词] 葛根素, 耐有机溶剂, *Lysinibacillus fusiformis*, 培养条件

[中图分类号] Q939.99 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)02-0061-05

The Impact of Carbon, Nitrogen Source as well as pH Value on the Growth and Biotransformation Activity of *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC 4913, an Organic Solvent-Tolerant Glycosylation of Puerarin Producing Strain Organic

Liu Guiyou^{1,2}, Wang Siyuan², Yuan Sheng²

(1. Faculty of Life Science and Chemical Engineering, Jiangsu Second Normal University, Nanjing 210013, China)

(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Nanjing 210023, China)

Abstract: An organic solvent-tolerant *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC 4913, isolated from the local soil sample, has the ability to convert puerarin into puerarin-7-O-fructoside by the biotransformation. This study aimed to clarify the effects of carbon sources, nitrogen sources and pH on the growth and transforming activity of *L. fusiformis* CGMCC 4913. The results indicated that LB medium can totally act as carbon source for *L. fusiformis* CGMCC 4913. And the transformation activity of the strain taking peptone and tryptone as nitrogen source performs good. LB cultured *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC 4913 strain grows well and exhibits relatively high and stable transformation activity.

Key words: puerarin, organic solvent-tolerant, *Lysinibacillus fusiformis*, culture conditions

葛根素(puerarin)是由豆科植物野葛(*Pueraria lobata*)甘葛藤(*Puerarin thomsonii*)根中提取的一种异黄酮苷,既可以食用也可以入药。葛根素具有广泛的药理作用,被用于治疗心脑血管疾病、糖尿病及其并发症、骨坏死、帕金森氏症、老年痴呆症、子宫内膜异位症以及癌症^[1],具有很好的临床应用价值,已成为国内外天然药物开发利用研究的热点。但是,葛根素在水中的溶解度较低,目前临床应用的葛根素注射液大多需要加入

收稿日期: 2015-12-19.

基金项目: 国家自然科学基金(J1103507)、江苏省微生物与功能基因组学重点实验室基金(164070303402)。

通讯联系人: 袁生, 教授, 研究方向: 微生物代谢调控与药物合成研究、微生物生长代谢调控的分子生物学研究。E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或高浓度的丙二醇才能达到该注射剂要求的药物浓度,这样不仅增加成本,还增加了药物不良反应的发生^[2].同时,葛根素溶解性和渗透性差^[3],在胃肠道内较难吸收,导致生物利用度低下.在临床应用时,单靠增加剂量来提高生物利用度,不仅不能达到预期目的,反而会增加药物的毒副作用^[4-6].葛根素在水中较低的溶解度和较低的口服生物利用度限制了其进一步的药理学开发^[7].近年来开展的采用微生物和游离酶对葛根素的生物转化研究已取得可喜进展,不断有新的、极易溶解的、并且有生物活性的葛根素衍生物被开发出来.本实验室筛选得到一株耐有机溶剂的 *Lysinibacillus fusiformis* 菌株 CGMCC 4913,能在含有一定的有机溶剂的转化液中,将蔗糖上的果糖基高效地加到葛根素 A 环 7 羟基上^[8].本研究旨在探讨培养条件对 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株生长及其转化活性的影响,为实验室研究和工业应用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

葛根素(98%),购自江苏联创药业有限公司(南京,中国);甲醇和乙酸(HPLC级),均购自 Sigma 公司(St. Louis,美国);葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乙醇等均为分析纯级,购自上海生工(上海,中国).

1.2 培养基

Luria-Bertani(LB)培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 10,pH 7.2.

静息细胞转化液:1/15 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄缓冲液,pH 8.0,4 g/L 葛根素,60 g/L 蔗糖.

1.3 静息细胞的制备和转化

1.3.1 静息细胞的制备

将-80℃保存菌株接种于 LB 平板上,挑取平板上生长的单菌落接入含 30 mL LB 培养液的 100 mL 锥形瓶中.不同 pH 培养条件下,菌体分别接种于 pH 5.5、pH 6、pH 6.5、pH 7、pH 7.5 和 pH 8 的 LB 培养液中.碳源优化实验中,菌体分别接种于不同碳来源的培养液(酵母膏 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.2,分别含 10 g/L 甘油、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、糊精、水溶性淀粉、酒石酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、苹果酸作为碳源),以 LB 为对照组.氮源优化实验中,菌体分别接种于不同氮来源的培养液(柠檬酸 10 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.2,分别含 5 g/L 牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、L-谷氨酸、尿素、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、玉米浆作为氮源),以 LB 为对照组.30℃,220 rpm,震荡培养 12 h(OD_{600 nm} 3.0),收集菌液于 6 000 g 离心 10 min,收集菌体.

1.3.2 静息细胞转化

上述菌体细胞加入到含 10%(v/v)乙醇的 10 mL 转化液于 100 mL 锥形瓶中,30℃,220 rpm 震荡培养 48 h.定时取样,样品于 12 000 g 离心 10 min,收集上清液,100℃处理 10 min 灭活蛋白质,12 000 g 离心 10 min,收集上清液,HPLC 待测.

1.4 转化产物的分离和纯化

上清液以 10 mL/min 负载于多孔树脂 AB-8 普通玻璃层析柱(35 cm×2.5 cm)上,用去离子水冲洗柱子到流出液检测不到蔗糖后,接上一个 8 m 长的填充多孔树脂 AB-8 的连接管,用 10%乙醇在 10 mL/min 流速下梯度洗脱,分部收集.合并含产物的收集液,用 RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)60℃减压蒸馏(真空泵为 SHZ-DIII 循环水式真空泵,河南巩义市英峪予华仪器厂),得到粉末样品,室温真空干燥至恒重后保存于-20℃冰箱中.

1.5 转化产物 HPLC 分析和鉴定

HPLC 分析采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司,美国):色谱柱为 Agilent HC-C18(5 μm, 4.6 mm×250 mm),进样体积为 20 μL,柱温 25℃,检测器为 Agilent G1314A 紫外检测器(Agilent 公司,美国),检测波长为 254 nm,流动相:甲醇:水=30:70,流速为 1 mL/min.数据处理均在 1100 HPLC 系统中的 ChemStation 工作站上进行.

1.6 转化产物结构分析

1.6.1 高分辨质谱分析

取少量产物成品送上海药物研究所进行高分辨质谱分析.质谱仪为毛细管液相-四极飞行时间串联质谱仪 Q-TOF Ultima Global(Waters 公司,美国),离子源为电喷雾源.

1.6.2 核磁共振波谱分析

取少量产物成品送南京师范大学分析测试中心,进行 ^{13}C 和 ^1H 核磁共振波谱分析,仪器为 AVANCE 400 核磁共振波谱仪(Bruker 公司,瑞士). 溶剂为 $\text{DMSO}-d_6$, ^{13}C 和 ^1H 核磁共振波谱工作频率分别为 100 Hz 和 400 Hz. 化学位移采用四甲基硅烷(TMS)为内标测定. 采用 DEPT 谱测定碳原子的级数. 采用 2D-NMR 技术如 ^1H - ^1H COSY, HMBC, HSQC 谱等帮助确定碳原子和氢原子化学位移.

2 结果

2.1 不同 pH 培养条件对菌株转化活性的影响

不同 pH 培养条件对 *L. fusiformis* CGMCC 4913 转化活性的影响见图 1, *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株能在 pH 6.5~pH 7.5 间生长较好,但就 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株转化葛根素活性而言, pH 7.0 条件下培养得到的菌体细胞有较高转化活性且活性相对稳定. pH 8.0 培养条件下,菌株不能正常生长.

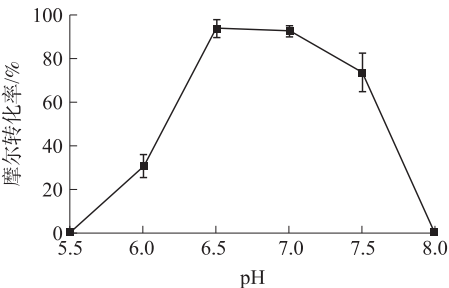


图1 不同 pH 培养条件对菌株转化活性的影响
Fig.1 The biotransformation activity in different pH conditions

2.2 不同碳源培养条件对菌株转化活性的影响

不同碳源培养条件对 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株转化活性的影响见图 2, 蔗糖、柠檬酸钠培养得到的菌体细胞转化能力略低于 LB 培养液培养得到的菌体细胞转化能力, 因此, 常规 LB 培养基完全可以为 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株生长提供碳源.

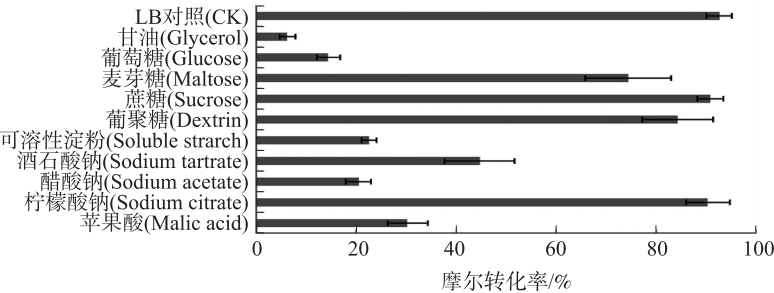


图2 不同碳源培养条件对菌株转化活性的影响
Fig.2 The biotransformation activity in different carbon source culture conditions

2.3 不同氮源培养条件对菌株转化活性的影响

氮源优化研究表明(表 1), 在以牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨或玉米浆为替代氮源的条件 下菌体细胞可以正常生长, 但生物转化活性有一定差异, 蛋白胨和胰蛋白胨为氮源培养得到的菌体细胞转化活性良好, 分别为 $(83.77\pm6.51)\%$ 和 $(92.75\pm2.00)\%$, 而以牛肉膏或玉米浆为替代氮源的培养基培养得到的菌体细胞转化活性较差. L-谷氨酸、尿素、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵作为氮源时, *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株不能生长.

表 1 不同氮源培养条件对菌株生长和转化活性的影响

Table 1 Effect of nitrogen sources on growth and biotransformation activity of <i>L. fusiformis</i> CGMCC 4913		
氮源	菌株生长	转化活性
牛肉膏(Beef extract)	+	15.92±12.80
蛋白胨(Peptone)	+	83.77±6.51
胰蛋白胨(Tryptone)	+	92.75±2.00
玉米浆(Corn steep liquor)	+	50.47±17.66
L-谷氨酸(L-Glutamic acid)	-	-
尿素(Urea)	-	-
硫酸铵(Ammonium sulfate)	-	-
氯化铵(Ammonium chloride)	-	-
硝酸铵(Ammonium nitrate)	-	-
LB 对照(CK)	+	86.90±3.80

2.4 转化产物的分离和纯化

3.6 g 葛根素经 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株转化后,经过分离、纯化、浓缩,得到 2.53 g 粉末样品,纯度为 97.42%(图 3)。

2.5 转化产物结构解析

转化产物经高分辨质谱分析和核磁共振波谱分析,确认葛根素经过 *L. fusiformis* CGMCC 4913 转化,一分子果糖基取代葛根素的 A 环 7 位羟基生成葛根素-7-O-果糖苷(图 4),与 Yu^[9]报道一致。

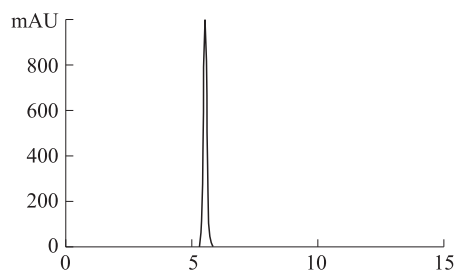


图3 纯化产物 HPLC

Fig.3 HPLC spectra of the purified products

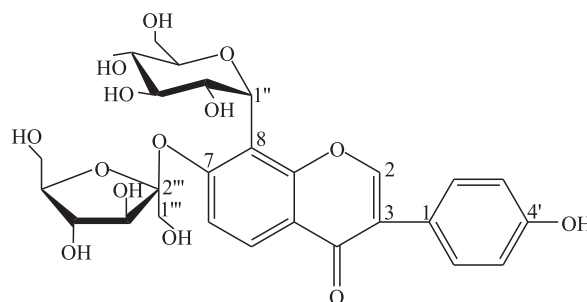


图4 葛根素-7-O-果糖苷结构

Fig.4 Structure of puerarin-7-O-fructoside

3 讨论

葛根素较低的水溶性与生物利用度限制了其在临床上的应用,同时复杂的结构也给利用化学合成方法进行结构修饰带来了巨大挑战。来源于自然界的微生物^[9-13]和酶^[14-17]通过生物转化方法对葛根素进行结构修饰,进行定向转化,这为以天然活性成分为先导化合物寻找和开发新药提供了行之有效的途径。耐有机溶剂的酶在工业上已开始应用,如脂肪酶有机相催化在食品工业中的应用。葛根素较低的水溶性导致了较低的转化产物收率,加入有机溶剂可以增加底物浓度,因此一般在糖基化反应中利用水-有机溶剂双相体系,但在该体系中葛根素糖基化酶易失活,这限制了生物转化在化学工业上的应用。近年来,为提高有机溶剂中酶催化反应的稳定性,有机溶剂耐受性酶的筛选和应用研究越来越多^[18],在葛根素有机相的生物转化中,由于有机溶剂耐受菌表现出很高的灵活性而变得非常有吸引力^[19-22]。本研究针对耐有机溶剂菌株 *L. fusiformis* CGMCC 4913 探讨了培养条件对菌株生长及其转化活性的影响。由于胰蛋白胨价格高于蛋白胨,考虑到成本因素,结合实验室实际情况,在 pH 7.0 条件下配制 LB 培养基培养 *L. fusiformis* CGMCC 4913 菌株,菌株生长较好,得到的菌体细胞有较高的转化活性且活性相对稳定。进一步优化耐有机溶剂菌株的培养条件,降低生产成本,为今后的工业化生产奠定基础,这也是今后研究工作的方向。

[参考文献]

- [1] BENLHABIB E, BAKER J I, KEYLER D E, et al. Effect of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol[J]. J Med Food, 2004, 79(2): 180-186.
- [2] 陈晓红. 266 例葛根素注射液不良反应分析[J]. 中国药事, 2010, 24(2): 203-205.
- [3] 崔升森, 赵春顺, 何仲贵. 大鼠肠管外翻模型对葛根素吸收机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1 715-1 716.
- [4] 李煦颖, 张懋璠, 赵妍, 等. 不同剂量葛根素在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(12): 885-887.
- [5] CHEN C C, CHAN W H. Impact effects of puerarin on mouse embryonic development[J]. Reprod Toxicol, 2009, 28(4): 530-535.
- [6] YUE P F, YUAN H L, ZHU W F, et al. The study to reduce the hemolysis side effect of puerarin by a submicron emulsion delivery system[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(1): 45-50.
- [7] REN F Z, JING Q F, SHEN Y J, et al. Quantitative determination of puerarin in dog plasma by HPLC and study on the relative bioavailability of sustained release tablets[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(2/3): 549-553.
- [8] WANG S Y, LIU G Y, ZHANG W, et al. Efficient glycosylation of puerarin by an organic solvent-tolerant strain of *Lysinibacillus fusiformis*[J]. Enzyme Microb Tech, 2014, 57: 42-47.

- [9] YU C G, XU H D, HUANG G D, et al. Permeabilization of *Microbacterium oxydans* shifts the conversion of puerarin from puerarin-7-*O*-glucoside to puerarin-7-*O*-fructoside[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(3): 863–870.
- [10] LI D, PARK S H, SHIM J H, et al. *In vitro* enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase[J]. Carbohydr Res, 2004, 339(17): 2 789–2 797.
- [11] JIANG J R, YUAN S, DING J F, et al. Conversion of puerarin into its 7-*O*-glycoside derivatives by *Microbacterium oxydans* (CGMCC 1788) to improve its water solubility and pharmacokinetic properties[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 81(4): 647–657.
- [12] YE H, YUAN S, CONG X D. Biotransformation of puerarin into 3'-hydroxy-puerarin by *Trichoderma harzianum* NJ01[J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 40(4): 594–597.
- [13] LIU G Y, SUN L, WANG S Y, et al. Hydroxylation modification and free radical scavenging activity of puerarin-7-*O*-fructoside[J]. Folia Microbiol, 2011, 56(4): 305–311.
- [14] HUANG W, OCHIAI H, ZHANG X Y, et al. Introducing N-glycans into natural products through a chemoenzymatic approach[J]. Carbohydr Res, 2008, 343(17): 2 903–2 913.
- [15] 张连文, 马晓峰, 王鹏. 一种半乳糖基转移酶修饰黄酮类糖苷化合物的方法: CN101575631[P]. 2009-11-11[2015-12-15].
- [16] CHOI C H, KIM S H, JANG J H, et al. Enzymatic synthesis of glycosylated puerarin using maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus* expressed in *Bacillus subtilis*[J]. J Sci Food Agr, 2010, 90(7): 1 179–1 184.
- [17] LIU G Y, SUN L, WU X X, et al. Immobilization of puerarin glycosidase from *Microbacterium oxydans* CGMCC 1788 increases puerarin transformation efficiency[J]. Braz J Chem Eng, 2014, 31(2): 325–333.
- [18] DOUKYU N, YAMAGISHI W, KUWAHARA H, et al. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming amylase that improves product selectivity in water-miscible organic solvents, from dimethylsulfoxide-tolerant *Brachybacterium* sp. strain LB25[J]. Extremophiles, 2007(11): 781–788.
- [19] 何冰芳, 吴薛明, 储建林, 等. 果糖基化葛根素及其制备方法与用途: CN102443027A[P]. 2012-05-09[2015-12-15].
- [20] HE B, WU X, CHU J, et al. Fructosylated puerarin, and preparation method and use thereof: US8598128 B2[P]. 2013-12-03[2015-12-15].
- [21] 何冰芳, 王瑞, 吴薛明, 等. 耐有机溶剂糖苷酶 Fru6 及其突变体和应用: CN102732456A[P]. 2012-10-17[2015-12-15].
- [22] WU X M, CHU J L, WU B, et al. An efficient novel glycosylation of flavonoid by β -fructosidase resistant to hydrophilic organic solvents[J]. Bioresour Technol, 2013, 129: 659–662.

[责任编辑: 黄 敏]