

# 银杏叶提取物微生物转化的研究

## 转化菌株鉴定及转化特性的初步研究\*

邢珂<sup>1</sup>, 陈有为<sup>1</sup>, 秦盛<sup>1</sup>, 张琦<sup>1</sup>,  
吴少华<sup>1</sup>, 李治滢<sup>1</sup>, 李绍兰<sup>1</sup>, 杨丽源<sup>1</sup>, 夏国兴<sup>2</sup>

(1. 云南大学 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091;

2. 夏翰生物工程(上海)有限公司, 上海 200051)

**摘要:**从银杏(*Ginkgo biloba*)叶提取物的微生物转化试验中, 获得1株能够转化银杏叶提取物组分, 编号为YM34161的微生物菌株. 通过对该菌的形态特征观察及ITS(internal transcribed spacer)序列分析, 确定该菌株为小刺青霉的1个新变种, 命名为小刺青霉云南变种(*Penicillium spinulosum* var. *yunnanensis* n. var. Xing et Chen). 同时对菌株YM34161转化银杏叶提取物组分前后变化进行了TLC对比.

**关键词:**银杏叶提取物; 分类鉴定; 新变种

**中图分类号:** Q 939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2007)02-0213-04

微生物转化是利用微生物生长、代谢过程中产生的酶对底物进行结构修饰的一种化学反应, 其本质为酶催化反应<sup>[1,2]</sup>. 它具有选择性高、反应条件温和、副产品少及污染小等优点, 并已日渐成为天然产物结构修饰和寻找新的先导化合物的一个有效工具<sup>[3]</sup>. 微生物转化具有很强的专一性, 能够用来进行特定的药物代谢反应<sup>[4]</sup>, 还具有易调节、易放大等特点.

银杏(*Ginkgo biloba*)系银杏科植物, 是世界上最古老的子遗植物, 我国特产. 随着对银杏的利用、开发、研究, 特别是国际市场对银杏叶及其提取物、制品的需求, 其提取物和制剂已被广泛用于药品、保健品和化妆品<sup>[5]</sup>. 银杏叶中含有多种生理活性成分, 如黄酮类化合物、萜内酯等, 具有改善心脑血管循环、抗过敏、抗病毒、抗癌、抗衰老及降低胆固醇等作用, 而且银杏叶提取物毒副作用很小, 食用安全<sup>[6]</sup>. 用微生物转化处理银杏叶提取物对银杏新型药物的开发具有重要意义.

通过反复筛选, 最终获得1株对银杏叶提取物转化效果明显的微生物菌株. 现将该菌株的分类鉴定结果及其转化银杏叶提取物的初步研究报道如下.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及原料

1.1.1 菌种 分离自云南省老君山自然保护区土壤, 编号YM34161, 保存于云南省微生物研究所.

1.1.2 银杏叶提取物 国际标准银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* Extractant, GBE): 其中黄酮质量分数24%, 萜内酯6%, 白果酸小于0.0005%, 原花青素类7.0%, 羧酸类成分13.0%, 儿茶素类2.0%, 非黄酮苷类20%, 高分子化合物4.0%, 其他3.0%. 该提取物按德国Schwabe专利工艺生产, 由浙江华东药业有限公司提供.

### 1.2 培养基

1.2.1 固体斜面培养基 PDA 固体培养基.

1.2.2 种子培养基 PDA 液体培养基.

\* 收稿日期: 2006-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20502021).

作者简介: 邢珂(1980-), 女, 河南人, 硕士生, 主要从事真菌资源学及应用微生物学方面的研究.

通讯作者: 陈有为(1957-), 男, 上海人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事应用微生物学方面的研究.

1.2.3 转化培养基 每 500 mL 玻璃瓶中麦麸 25 g, 新鲜豆渣 20 g, 银杏叶提取物 10 g.

1.2.4 菌落观察培养基 PDA 平板培养基、麦芽汁平板培养基、察氏平板培养基.

1.3 形态观察 取菌种斜面少量孢子, 分别点植于 PDA 培养基、麦芽汁培养基、察氏培养基平板上适当位置,  $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$  静置培养, 分别在第 4, 7 和 11 天观察菌落特征. 另取培养 7 d 后的 YM34161 菌体在 Olympus BH-2 型光学显微镜及 JSM-5600LV 型扫描电镜下进行形态特征的观察.

#### 1.4 分子鉴定

1.4.1 菌株总 DNA 的提取 采用李绍兰等的方法<sup>[7]</sup>.

1.4.2 PCR 反应与序列测定 PCR 扩增反应采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物 ITS<sub>1</sub> 和 ITS<sub>4</sub>. ITS<sub>1</sub> 和 ITS<sub>4</sub> 序列分别为:

ITS<sub>1</sub>: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3';

ITS<sub>4</sub>: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'.

PCR 扩增反应体系 (50  $\mu\text{L}$ ) 如下: PCR Buffer ( $\times 10$ , 含  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ ) 5  $\mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 4  $\mu\text{L}$ ,  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 5U *Taq* 酶,  $50 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ITS<sub>1</sub> 和  $50 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ITS<sub>4</sub> 各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu\text{L}$ . 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性 4 min,  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $54^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  2 min 为 1 个循环, 扩增 35 个循环, 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min. 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测. 由上海博亚生物技术有限公司进行测序.

1.4.3 ITS 序列分析 根据测序结果, 在 GenBank 中进行同源序列搜索, 并调出相关菌株的 ITS 序列用 ClustalX 软件进行多序列比对, 通过 MEGA2.1 软件选用 Kimura 2-parameter 距离模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 1000 次随机抽样计算 Bootstrap 值以评估系统发育树的置信度.

1.5 微生物转化实验 取活化的种子斜面接入三角瓶中 (每个 250 mL 三角瓶加入 50 mL 液体 PDA 培养基), 摇瓶培养 48 h ( $28^\circ\text{C}$ , 200 r/min) 后, 获得一级种子. 然后取一级种子按 10% 的接种量接入扩大三角瓶中 (每个 500 mL 三角瓶中加入 100 mL 液

体 PDA 培养基), 同样置于  $28^\circ\text{C}$ , 200 r/min 的培养条件下摇瓶培养 5 d 后为二级种子. 另取已灭菌的转化培养基, 在无菌条件下, 按 10% 的接种量接入二级种子,  $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$  静置发酵 15 d.  $60^\circ\text{C}$  下干燥后即得转化物. 取转化物按 1 g 转化物加入 1 mL 95% 乙醇浸提. 另设 2 组对照样品: 对照 1 不含银杏叶提取物, 排除非微生物因素的干扰; 对照 2 不接入菌株 YM34161, 排除微生物自身代谢产物的干扰.

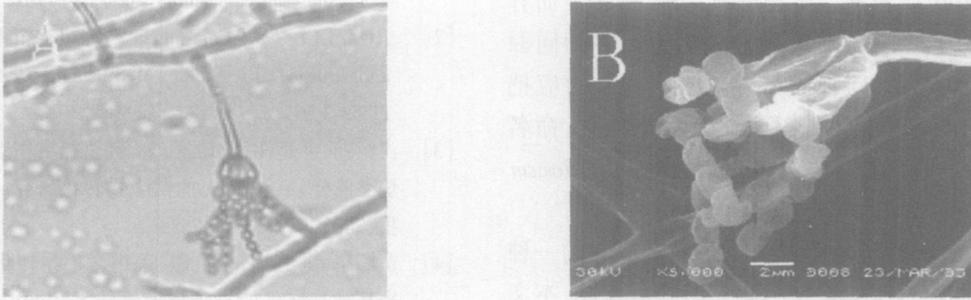
1.6 薄层层析分析 取菌株 YM34161 的发酵浸提浓缩液在硅胶 G 板上点样, 于层析缸中展开, 进行 TLC 分析. 展开剂为 V(氯仿): V(甲醇) = 4:1 混合液体. 取出晾干后, 用 5% 硫酸醇溶液喷雾显色, 加热检测成像, 观察银杏叶提取物转化前后的组分变化.

## 2 结果与分析

2.1 培养和形态特征 菌株 YM34161 在 PDA 琼脂平板上  $28^\circ\text{C}$  培养 4 d 菌落直径为 20 mm, 7 d 为 40 mm, 11 d 为 50 mm. 菌落边缘整齐, 紧密细绒状, 中间白色小凸起, 外缘浅青灰色, 背面黄色. 麦芽汁培养基  $28^\circ\text{C}$  培养 4 d 菌落直径 20 mm, 7 d 为 45 mm, 11 d 为 50 mm. 菌落紧密白色细绒状, 中间白色小凸起; 背面褐色. 察氏培养基  $28^\circ\text{C}$  培养 4 d 菌落直径 10 mm, 7 d 为 15 mm, 11 d 为 25 mm. 菌落紧密细绒状, 中部浅黄色外缘白色, 中央浅黄色小凸起; 背面咖啡色, 有同心环.

通过光学显微镜和扫描电镜观察, 菌丝有隔, 无色, 分生孢子梗从气生菌丝生出, 小梗瓶状, 单层,  $(7 \sim 10) \mu\text{m} \times (2 \sim 3) \mu\text{m}$ . 分生孢子串生, 光滑, 椭圆形, 直径约  $3 \mu\text{m}$ . 如图 1 所示. 综合上述形态观察结果, 参照文献[8, 9], 菌株 YM34161 应列为青霉属 (*Penicillium*).

2.2 构建系统发育树 对 YM34161 的 ITS 部分序列 (532 bp) 进行测序, 测定的 532 个碱基已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中, 基因登陆号为 DQ219458. 以 ITS 序列同源性为基础构建了包括菌株 YM34161 在内的 8 株相关真菌的系统发育树, 如图 2 所示. 从 ITS 序列聚类分析结果可以看出, 菌株 YM34161 与 *P. spinulosum* AY373933 菌株形成一个小分支, 二者在比对的 532 个碱基中, 差别仅为 4 个碱基, 序列相似性在 99% 以上.



A. YM34161 在光学显微镜下的产孢结构(×400);B. YM34161 在扫描电镜下的产孢结构(×6 000)

图 1 菌株 YM34161 的形态特征

Fig.1 Morphological characters of strain YM34161

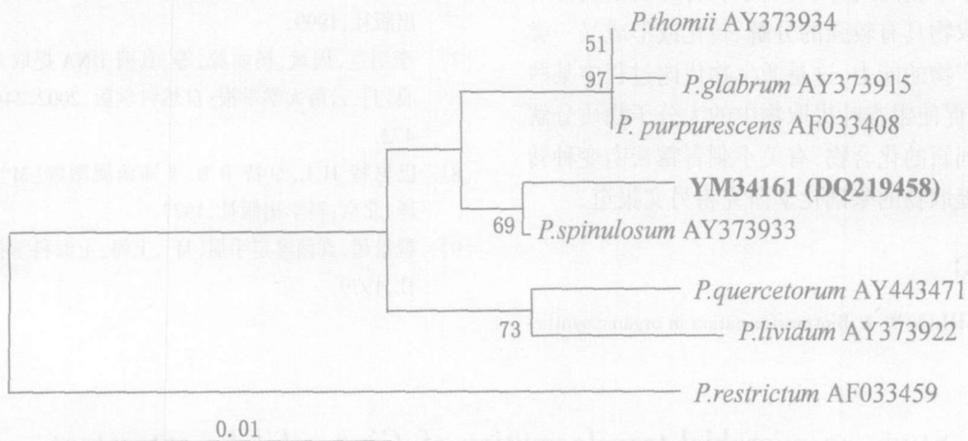


图 2 菌株 YM34161 及从 GenBank 数据库中调集的相关种构建的以 ITS 序列为基础的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the ITS sequences of strain YM34161 and related strains downloaded from GenBank

2.3 薄层层析分析 采用薄层层析法(TLC)对菌株 YM34161 的转化结果进行检测.可见通过菌株 YM34161 转化后,与 2 组对照样品相比,转化组显示银杏叶提取物的组分发生了变化.在 TLC 上明显出现 5 个新的组分,如图 3 所示.

### 3 讨论

真菌 rDNA 相对保守,但 rDNA 内转录间区(internal transcribed spacer, ITS)进化相对较快,流行于真菌的较低分类阶元.根据对银杏叶提取物微生物转化菌株的形态观察、培养特征及 ITS 序列分析,菌株 YM34161 具备青霉属的形态特征.尽管菌株 YM34161 的 ITS 序列同本属的典型菌株 *Penicillium spinulosum* AY373933 仅有 0.56% 的差异,但该菌株与 *Penicillium spinulosum* AY373933 菌株的培养特征存在明显不同.菌株 YM34161 的菌落呈紧密细绒状,在察氏培养基上生长缓慢,分生孢子表面光滑,无小刺或刺状突起.



CK1 转化组 CK2

图 3 菌株 YM34161 转化银杏叶提取物的薄层层析分析

Fig. 3 TLC of GBE by microbial transformation of YM34161

而 *Penicillium spinulosum* AY373933 菌株的菌落

疏松,在察氏培养基上生长迅速,分生孢子表面有小刺.目前真菌分类学家普遍认为 ITS 序列同源性大于 99% 的为同种成员.因此,我们认为应把 YM34161 菌株列为小刺青霉的 1 个新变种,命名为小刺青霉云南变种 (*Penicillium spinulosum* var. *yunnanensis* n. var. Xing et Chen).

微生物转化可能是开发天然新药成分的一种新途径,也是当今生物技术研究的热点课题.本文转化产物的薄层层析表明,小刺青霉云南变种对银杏叶提取物具有明显的转化作用.转化产物与原银杏叶提取物相比所含化学组分发生了变化,并且转化后出现 5 个新的组分,说明小刺青霉云南变种对银杏叶提取物具有较强的分解、转化或形成又一类次生代谢产物的能力.这是微生物代谢过程中某些酶的作用,促使银杏叶提取物中的大分子物质分解形成一系列新的化合物.有关小刺青霉云南变种转化银杏叶提取物的基础化学研究将另文报道.

### 参考文献:

- [1] LOUGHLIN W A. Biotransformation in organic synthesis[J]. *Bioresource Technol*, 2000, 74: 49-62.
- [2] ROZZELL J D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities [J]. *Bioorg Med Chem*; 1999, 7 (10): 2 253-2 261.
- [3] 占纪勋,钟建江,戴均贵,等.红豆杉愈伤组织中紫杉烷类成分 sinenxan A 的微生物转化研究[J]. *药学报*, 2003, 38(7): 555-558.
- [4] 黄海华,陈笑艳,崔洪霞.采用微生物转化法合成 5-羟基普萘洛尔[J]. *药物生物技术*, 2001, 8(5): 268-271.
- [5] 李兆龙,胡李强,卢耀明.银杏的开发利用[M].上海:上海科学技术出版社,1996.
- [6] 刘魁英.食品研究与数据分析[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [7] 李绍兰,周斌,杨丽源,等.真菌 DNA 提取方法的改良[J]. *云南大学学报:自然科学版*, 2002, 24(6): 471-472.
- [8] 巴尼特 H L,亨特 B B.半知菌属图解[M].沈崇尧译.北京:科学出版社,1977.
- [9] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

## Study on microbial transformation of *Ginkgo biloba* extractant

### I. Identification of microbial strain and its microbial characteristics

XING Ke<sup>1</sup>, CHEN You-wei<sup>1</sup>, QIN Sheng<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>,

WU Shao-hua<sup>1</sup>, LI Zhi-ying<sup>1</sup>, LI Shao-lan<sup>1</sup>, YANG Li-yuan<sup>1</sup>, XIA Guo-xing<sup>2</sup>

(1. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Xiahhan Biotech (Shanghai) CO. LTD., Shanghai 200051, China)

**Abstract:** A strain which was able to transform *Ginkgo biloba* extractant was isolated in microbial transformation experiments and named YM34161. After observing and analyzing its micromorphology and ITS sequence, it was identified as a new variety of *Penicillium spinulosum* and designated as *Penicillium spinulosum* var. *yunnanensis* n. var. Xing et Chen, and also described TLC before and after microbial transformation.

**Key words:** *Ginkgo biloba* extractant; classification and identification; new variety