

# 黄芩苷发酵转化成黄芩素和千层纸素 A 的黄芩内生真菌的筛选及鉴定

马宗敏<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 段绪红<sup>1</sup>, 孙国强<sup>1</sup>, 黄璐琦<sup>2</sup>, 裴林<sup>1\*</sup>

(1. 河北省中医药科学院 河北省浊毒证重点实验室, 石家庄 050031;

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**采用现代微生物发酵转化技术开发传统中药——黄芩,从黄芩植株体内筛选可发酵转化黄芩苷的内生真菌,以期替代传统化学方法获得天然药效成分,同时缓解该中药资源紧张的现状。**方法:**以新鲜黄芩植株为材料,采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养消毒组织块,分离单菌落,黄芩药粉选择性培养法初筛,黄芩苷发酵转化实验复筛,HPLC分析转化产物。**结果:**从新鲜黄芩植株根部分离得到一株发酵转化黄芩苷的内生真菌 R3,该菌在添加 0.1% 黄芩苷的马铃薯葡萄糖培养液(PDB)中能转化黄芩苷,同时产生黄芩素和千层纸素 A 共 2 种产物,于 28 ℃,150 r·min<sup>-1</sup>培养 5 d 转化率 61.09%,其中黄芩素和千层纸素 A 的摩尔比 3:5。利用形态分析及显微鉴定并结合分子生物学技术手段,鉴定该菌为青霉菌,定名为 *Penicillium* sp. R3。**结论:**筛选得到黄芩内生真菌 *Penicillium* sp. R3,该菌能够转化黄芩苷得到活性更强、更易吸收的黄芩素,以及近年来因更多药效不断被发现而备受关注的千层纸素 A,具有一定的研究价值与应用价值。

**[关键词]** 黄芩苷; 黄芩素; 千层纸素 A; 青霉菌 R3; 黄芩; 马铃薯葡萄糖琼脂; 转化率

**[中图分类号]** R22;Q815;R28;R93;TQ92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0166-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190105

**[网络出版地址]**

**[网络出版时间]**

## Screening and Identification of Endophytic Fungi in *Scutellariae Radix* Transformed Baicalin to Baicalein and Oroxylin A

MA Zong-min<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, DUAN Xu-hong<sup>1</sup>, SUN Guo-qiang<sup>1</sup>, HUANG Lu-qi<sup>2</sup>, PEI Lin<sup>1\*</sup>

(1. Hebei Key Laboratory of Turbiditytoxin Syndrome, Hebei Academy of Chinese Medical Sciences,

Shijiazhuang 050031, China; 2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China

Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** In order to explore natural active ingredients of *Scutellariae Radix* and alleviate the pressure of traditional medicinal resources, this research aimed to screen endophytic fungus strains from *Scutellariae Radix* which could transform baicalin into some active ingredients. **Method:** Taking fresh plants of *Scutellariae Radix* as strain resource, endophytic fungus strains were isolated by potato dextrose agar (PDA) plate separation, *Scutellariae Radix* powder selective culture and HPLC detection. **Result:** An endophytic fungus strain R3 was isolated and it can transform baicalin to baicalein and oroxylin A simultaneously in potato dextrose broth (PDB) contained 0.1% baicalin and the conversion rate reached 61.09% in 5 d cultured at 28 ℃ and 150 r·min<sup>-1</sup>, molar ratio of baicalein and oroxylin A was 3:5. With the method of morphological analysis,

**[收稿日期]** 20180621(010)

**[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302);国家重点研发计划项目(2017YFC1701701);河北省中医药管理局科研计划项目(2015087)

**[第一作者]** 马宗敏, 硕士, 主管技师, 从事微生物和分子生物学研究, Tel:0311-89697693, E-mail:hsifme@qq.com

**[通信作者]** \*裴林, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医诊断学和中药学研究, Tel:0311-85363996, E-mail:peilin148@163.com

microscopic identification and 18SrDNA sequence analysis, the bacterium was identified as *Penicillium* sp. R3.

**Conclusion:** *Penicillium* sp. R3 can transform baicalin to baicalein and oroxylin A with certain research value and application value.

[ **Key words** ] baicalin; baicalein; oroxylin A; *Penicillium* sp. R3; *Scutellariae Radix*; potato dextrose agar; conversion rate

黄芩是唇形科植物黄芩的干燥根,为大宗传统中药,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多重功效<sup>[1]</sup>,其主要药效成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等,2015 年版《中国药典》(一部)规定黄芩药材中黄芩苷的质量分数不低于 9.0%。但研究表明黄芩素的各方面药理作用均强于黄芩苷<sup>[2]</sup>,且黄芩苷须在体内转化为黄芩素后方可发挥药效<sup>[3]</sup>,近年来的研究还发现黄芩中的千层纸素 A 具有抗肿瘤、神经保护、抗炎、抗分娩等广泛的生物活性,其能够抑制白细胞介素-1 $\beta$  转化酶 (ICE) 的活性,可作为抗炎药物进行研发<sup>[4]</sup>,这已引起了国内外学者的广泛关注。

虽然具有如此良好的功效和开发前景,但黄芩素和千层纸素 A 在药材中含量少,分离纯化的成本高,化学制备能源消耗大,且污染环境,生产应用受到限制,阻碍了其作为单方制剂的应用<sup>[4-5]</sup>。利用微生物转化法制备天然药物具有反应特异性强、条件温和、副产物少及清洁环保等优点<sup>[6-7]</sup>;且微生物生长周期短、繁殖速度快、适应能力强、酶系丰富<sup>[7]</sup>,因此,微生物发酵在天然药物成分的合成转化方面越来越受到关注和推崇<sup>[8-9]</sup>。刘伶文等<sup>[10]</sup>利用人肠道菌将黄芩苷转化为黄芩素,汪红等<sup>[11]</sup>和陈丽艳等<sup>[12]</sup>利用黑曲霉和侧耳菌对黄芩苷进行了生物转化研究,2 项研究同时证明黑曲霉能够转化黄芩苷为黄芩素,还有多位学者利用白腐真菌<sup>[13]</sup>、纳豆菌<sup>[14]</sup>、米曲霉<sup>[15-16]</sup>、酵母菌<sup>[16]</sup>、罗尔夫青霉<sup>[17]</sup>等将黄芩苷转化为黄芩素,但是微生物发酵转化黄芩苷为千层纸素 A 的研究尚未见报道。

在 1993 年,能够产生抗癌药物紫杉醇的太平洋红豆杉内生真菌 *Taxomyces andreanae* 的发现,使得药用植物内生真菌开始受到天然产物研究者的关注<sup>[18]</sup>。药用植物内生菌在长期进化过程中与植株共存共生,在植物活性成分的代谢转化上具有其他来源微生物无可比拟的优势<sup>[19]</sup>,是发现新化合物和寻找生物活性代谢产物的重要来源,但利用黄芩内生菌发酵转化黄芩苷的研究尚属空白。本实验以此为出发点,采用新鲜黄芩植株为材料,从中分离得到一株内生真菌,该菌株可发酵转化黄芩苷同时生成黄芩素和千层纸素 A,且千层纸素 A 质量分数达

二者总量的 63.5%,为黄芩素尤其是千层纸素 A 的开发利用开辟了新途径。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),SPX-150 型生化培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司),THZ-98AB 型恒温振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),LS-35HD 型高压蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限公司),VS-840-1 型洁净工作台(上海博迅实业有限公司),CHN-01 型超纯水仪(英国威立雅公司),BT125D 型电子分析天平(德国赛多利斯集团),DYCP-31D 型电泳槽和 DYY-5 型稳压电泳仪(北京六一仪器厂),FR980 型凝胶成像仪(上海复日科技有限公司),2720 Thermal Cycler 型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司),HC-2518R 型冷冻高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),DMBA300 型生物数码显微镜(Motic 实业集团中国有限公司)。

黄芩苷(批号 C22J7Y9309,纯度 90%)和黄芩素、千层纸素 A 对照品(批号分别为 C02A6Y1, Y29D6Y17716,纯度均  $\geq 98\%$ )均购自上海源叶生物科技有限公司,DreamTaq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶(加拿大 MBI 公司),PCR 引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)[生工生物工程(上海)股份有限公司],琼脂糖(BBI 生命科学有限公司),黄芩苷对照品(北京盛世康普化工技术研究院,批号 151121,纯度  $\geq 99\%$ ),水为自制超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。内生菌来源植株为野生黄芩新鲜植株,采自河北省承德市滦平县安纯沟门乡桑园村西梁山,经河北师范大学赵建成教授鉴定为黄芩 *Scutellaria baicalensis*;黄芩药材购自河北安国药材市场,经河北省中医药科学院段绪红主管中药师鉴定为唇形科植物黄芩 *S. baicalensis* 的干燥根。

菌种分离培养基马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)包括新鲜马铃薯 200 g(去皮),葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 L,自然 pH;配制方法为新鲜马铃薯切小块,加水煮沸 30 min,4 层纱布过滤后加入琼脂,继续加热至琼脂完全溶解,加入葡萄糖,搅拌均匀,补足水分,分装后 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min。菌种活化培养基马铃薯

葡萄糖培养液 (PDB) 包括新鲜马铃薯 200 g (去皮), 葡萄糖 20 g, 水 1 L, 自然 pH; 配制方法为新鲜马铃薯切小块, 加水煮沸 30 min, 4 层纱布过滤后加入葡萄糖, 搅拌均匀, 稍冷却后再补足水分, 分装后 121 °C 灭菌 20 min。初筛培养基包括黄芩药材粉末 (粉碎, 过 40 目筛) 10 g, 水 1 L, 自然 pH; 配制方法为黄芩药材 60 °C 烘干 5 h, 研磨机磨粉后过 40 目筛, 按配方比例称取一定量的药材粉末于锥形瓶中, 加入 100 倍量水, 封口, 121 °C 灭菌 20 min。复筛培养基为 PDB 培养液灭菌后加入 0.1% 黄芩苷。上述培养基均为实验室自制。

## 2 方法与结果

**2.1 菌种的分离** 新鲜黄芩植株清洗后自然风干, 分别取根、茎、叶新鲜组织, 根与茎切成 1 cm 左右圆柱形块, 叶取完整叶片, 将上述新鲜组织置于 75% 乙醇中浸泡 3 min, 用无菌水冲洗 5 次, 用 3% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 用无菌水冲洗 8 次, 进行植株组织表面消毒。消毒后在无菌环境下将根与茎切成 1~3 mm 薄片, 叶片从中间切开, 将植物组织切面接种到新鲜的 PDA 平板上, 28 °C 恒温培养, 最后 1 次冲洗的无菌水作为空白组<sup>[20]</sup>。5~7 d 后表面消毒的植物组织在 PDA 平板上长出大量菌落, 而空白组未见菌落生长, 证明表面消毒完全, 生长的菌株均来自黄芩新鲜组织内。挑取形态不同的菌落进一步分离, 直至分离得到单菌落。实验得到单克隆菌株 14 株, 其中 4 株来自根部, 5 株来自茎部, 5 株来自叶片。

**2.2 菌种的初步筛选** 取上述黄芩体内分离得到的单菌株, PDB 培养液活化后按 5% 接种量接种到初筛培养基中, 于 28 °C, 150 r·min<sup>-1</sup> 培养 5~7 d, 14 株菌株中 6 株能够生长且生长较快; 其中 4 株来自黄芩的茎部, 2 株来自根部, 能够以黄芩药粉为唯一营养源生长, 表明这 6 株菌株可分解代谢黄芩的某些成分为自身提供营养物质, 这就为获取黄芩苷转化菌株提供了极大可能性。

### 2.3 菌种的复筛

**2.3.1 供试品溶液的制备**<sup>[21]</sup> 取 2.2 项下能够生长的菌株, 按 5% 接种量转接至复筛培养液中, 于 28 °C, 150 r·min<sup>-1</sup> 培养 5 d, 取发酵液 20 mL, 加无水乙醇 47 mL, 超声 10 min 后于 85 °C 加热回流 3 h, 取出, 冷却后过滤, 滤液加 70% 乙醇定容至 100 mL, 精密量取 2.5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。以未接种菌株的培养液同法处理作为空白溶液。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 对照品适量, 分别加甲醇使溶解, 配成质量浓度为 1.024, 1.000, 0.993 g·L<sup>-1</sup> 的 3 种对照品储备液; 临用前取储备液适量加甲醇稀释得到相应的对照品溶液, 质量浓度依次为 40.96, 10.00, 9.93 mg·L<sup>-1</sup>。

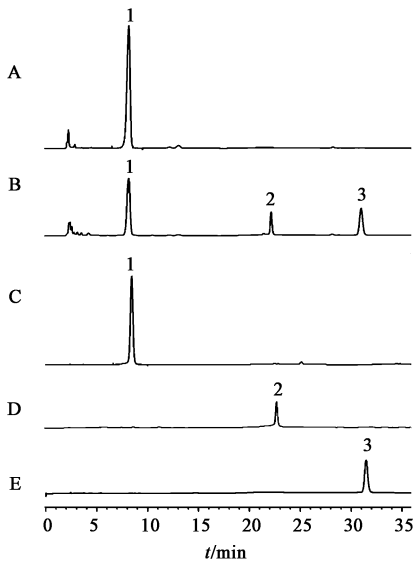
**2.3.3 色谱条件** ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 紫外检测器, 流动相选择 0.2% 冰乙酸水溶液 (A)-0.2% 冰乙酸甲醇溶液 (B) 梯度洗脱 (0~15 min, 49% B, 15~18 min, 49%~61% B, 18~36 min, 61% B), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 275 nm, 进样量 10 μL。

**2.3.4 转化产物的 HPLC 鉴定** 取 2.3.2 项下黄芩苷、黄芩素及千层纸素 A 对照品溶液适量, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 记录黄芩苷、黄芩素、千层纸素 A 的出峰时间。将 2.2 项下得到的 6 株菌接种至复筛培养液中, 分别按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液及空白溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 结果发现来自根部的菌株 R3 发酵黄芩苷后, 样品中黄芩苷较空白溶液明显减少, 并检测到 2 种主要产物, 产物出峰时间分别与黄芩素和千层纸素 A 对照品的出峰时间一致, 见图 1。说明该菌株能够将黄芩苷转化成黄芩素和千层纸素 A。根部的另一株菌发酵后黄芩苷含量与空白溶液相比无明显变化, 未检测到产物生成。来自黄芩茎部的 4 株菌生长很快, 发酵液迅速变绿, 黄芩苷几乎全部被分解, 但并未检测到产物生成, 推测菌株将黄芩苷全部分解代谢。提示来自茎部菌株有无应用价值还有待于进一步研究。

### 2.4 转化率的测定

**2.4.1 标准曲线绘制** 取 2.3.2 项下 3 种对照品储备液, 分别加甲醇稀释成 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定 ( $n=3$ )。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 的线性回归方程分别为  $Y=32.045X-134.4 (R^2=0.9953)$ ,  $Y=53.739X-78.4 (R^2=0.9985)$ ,  $Y=50.948X+5.480 (R^2=0.9997)$ , 线性范围分别为 0.102~1.024, 0.010~0.400, 0.050~0.496 μg。

**2.4.2 方法学考察** 取 3 种对照品溶液分别连续进样 6 次, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.9%, 1.6%, 表明仪器精密度良好。取同一份菌株 R3 发酵转化样品, 按 2.3.1 项下方法制备



A. 阴性样品; B. 供试品; C, D, E. 对照品; 1. 黄芩苷; 2. 黄芩素; 3. 千层纸素 A

图 1 菌株 R3 发酵产物的 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of fermentation product of strain R3

供试品溶液, 室温下于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 2.2%, 2.5%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定性良好。取同一份菌株 R3 发酵转化样品, 平均分成 6 份, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 的平均质量浓度分别为 27.9, 4.32, 7.17 mg · L<sup>-1</sup>, RSD 依次为 2.4%, 3.7%, 2.7%, 表明该方法重复性良好。取同一份已知待测成分含量的菌株 R3 发酵转化样品, 随机分为 3 组, 每组 3 份, 分别按 0.8, 1.0, 1.2 倍量加入对照品, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算黄芩苷、黄芩素和千层纸素 A 平均加样回收率分别为 99.92%, 99.70%, 101.3%, RSD 分别为 2.6%, 3.8%, 3.5%, 表明该方法准确可靠。

**2.4.3 样品测定** 取菌株 R3 转化黄芩苷发酵液及空白培养液, 按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下色谱条件测定, 计算样品及空白培养液中各成分的含量, 计算转化率<sup>[14]</sup>。

$$\text{转化率} = \frac{n_{\text{黄芩素}} + n_{\text{千层纸素A}}}{n_{\text{黄芩苷(空白)}} - n_{\text{黄芩苷(发酵液)}}}$$

$$= \frac{\frac{\rho_{\text{黄芩素}}}{M_{\text{黄芩素}}} + \frac{\rho_{\text{千层纸素A}}}{M_{\text{千层纸素A}}}}{\frac{\rho_{\text{黄芩苷(空白)}}}{M_{\text{黄芩苷}}} - \frac{\rho_{\text{黄芩苷(发酵液)}}}{M_{\text{黄芩苷}}}}$$

式中  $n$  表示物质的量,  $\rho$  表示物质的质量,  $M$

表示摩尔质量。菌株 R3 在装量 20 mL 的 PDB 培养液中能将黄芩苷 11.55 mg 转化成黄芩素 1.61 mg 和千层纸素 A 2.80 mg, 转化率 61.09%, 其中黄芩素和千层纸素 A 的摩尔比为 3:5。

**2.5 菌株形态分析及显微鉴定** 将菌株 R3 接种到 PDA 平板 28 °C 恒温培养, 逐日观察菌落形态, 培养 7 d 后取出用乳酸石炭酸棉蓝溶液染色, 显微镜观察菌丝及孢子形态并进行形态学分析<sup>[22]</sup>。在 PDA 培养基上菌株生长较快, 开始为白色菌落, 之后产生孢子逐渐变绿。培养 7 d 后菌落直径 1.5 cm 左右, 菌体致密, 菌丝较短, 呈羊绒状, 菌落正面呈墨绿色, 中央有水滴滴着。菌落背面中心橘黄色, 周围黄绿色, 呈同心圆状, 见图 2。显微观察菌株 R3 分生孢子梗直立, 顶端分枝成扫帚状, 其顶端着生成串的分生孢子, 孢子呈椭圆形或圆形, 菌丝较细, 有隔, 见图 3, 其形态特征及显微结构符合青霉菌的基本特征, 可初步将菌株 R3 归为半知菌类青霉菌属<sup>[23]</sup>。

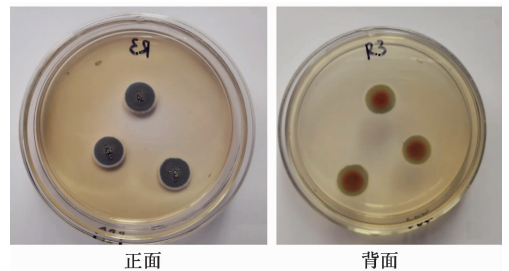


图 2 菌株 R3 平板菌落的形态(培养 7 d)

Fig. 2 Morphologies of strain R3 on PDA plate (culture for 7 d)

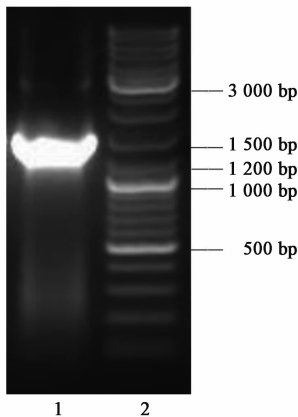


图 3 菌株 R3 的显微形态(×400)

Fig. 3 Micromorphologies of strain R3 (×400)

**2.6 菌株的分子生物学鉴定** 用真菌 DNA 提取试剂盒提取菌体的全基因组 DNA, 利用 18SrDNA 通用引物 NS1, NS6 (NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'; NS6: 5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3') 扩增菌体 18SrDNA。PCR 扩增体系为 25 μL, DNA 模板 0.5 μL, 10 × PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTP (各 2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 1 μL, Taq 酶 0.5 μL, NS1 引物 0.5 μL, NS6 引物 0.5 μL, 加水至 25 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸

10 min。采用 1% 琼脂糖电泳 (150 V, 100 mA, 20 min) 分离检测 PCR 产物, 电泳后在 1 200 ~ 1 500 bp 出现目的条带, 见图 4, 证明序列扩增成功。用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化回收 18SrDNA 扩增序列, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 得到了菌株的 18SrDNA 碱基序列信息 (1 285 bp)。将该序列在 GenBank 上比对 (Blast), 菌株 R3 与青霉菌 [*Penicillium frei* (IBT 3464)] 18SrDNA 相似度达到 99%, 结合形态学特征可鉴定该菌株为青霉菌, 定名为 *Penicillium* sp. R3。提交菌株 18SrDNA 序列后得到 GenBank 登录号 MH259812.1, 搜索 GenBank 中相似性高的序列, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 利用 Mega7 软件构建系统发育树, 见图 5。



1. 菌株 R3 的 18SrDNA 序列扩增产物; 2. 标准相对分子质量 DNA  
图 4 菌株 R3 的 18SrDNA 序列 PCR 扩增产物的电泳分析  
Fig. 4 Electrophoretic analysis of 18SrDNA sequence PCR amplification products of strain R3

青霉菌 *Penicillium* sp. R3。在添加 0.1% 黄芩苷的 PDB 培养液中该菌株能转化黄芩苷同时产生黄芩素和千层纸素 A 共 2 种产物, 转化率达到 61.09%, 其中黄芩素和千层纸素 A 的摩尔比为 3:5, 未经优化条件下转化率较高, 可进一步开发应用。黄芩素和千层纸素 A 均具有良好的生物学活性和多种药效, 但因其含量少, 化学提取合成成本高、污染严重, 并未得到广泛应用。通过生物发酵转化得到的产品清洁环保、活性高、后期处理工艺简单, 有利于工业化应用, 同时缓解了中药资源紧张。利用微生物将黄芩苷转化成黄芩素已有部分报道<sup>[10-17]</sup>, 但利用植物内生菌将黄芩苷转化为黄芩素和千层纸素 A 的研究尚未见公开报道<sup>[5]</sup>, 本文利用黄芩内生真菌实现了黄芩苷的生物转化, 发现了黄芩素和千层纸素 A 的生物合成新途径。

本实验对转化产物的提取采用含菌发酵液超声后加热回流浸提。有文献报道, 发酵结束后进行超声处理有利于产物提取<sup>[10]</sup>, 笔者认为可能是微生物产生了胞外酶, 导致转化反应集中在菌体周围发生, 使得产物吸附在菌体上, 超声后产物从菌体脱落进入发酵上清液中, 提取后得到更多产物。无论菌株 R3 对黄芩苷的转化发生在菌体内还是菌体外, 超声后回流浸提都能保证产物得到充分提取, 且采用乙醇提取清洁环保。但是这种提取方法所需试剂量大, 不利于大规模生产, 还有待于改进。

研究发现将黄芩苷通过微生物转化为黄芩素时, 转化率最高的是纳豆菌, 优化工艺后达到 96.7%<sup>[14]</sup>。但是该文献的转化率计算采用的是发生反应的黄芩苷与初始反应体系内黄芩苷的比值, 这只能反映有多少黄芩苷参与了转化, 并不能反映真实的产物得率, 在生物转化过程中并非所有参加反应的底物都等摩尔的转化为产物。本文采用的是产物的摩尔数与参加反应的黄芩苷摩尔数之比, 反映的是产物得率。通过优化实验得到最佳底物添加量后, 可采用流加底物的发酵方式, 获取更高的产量。千层纸素 A 与黄芩素在结构上的区别仅为 6 号位取代基不同, 黄芩素为羟基而千层纸素 A 为甲氧基, 在转化的过程中, 2 个成分是否存在相互关联, 黄芩素是否为中间代谢物, 菌株 R3 是通过怎样的途径转化得到这 2 种产物, 以上内容均有待于进一步研究。如果两者有代谢关联性, 通过调控菌株代谢可以控制产物的比例及含量, 这为后期应用提供了更多可能。后续实验将进行转化规律研究、转化条件优化、产物的分离纯化与鉴定, 结果稳定后

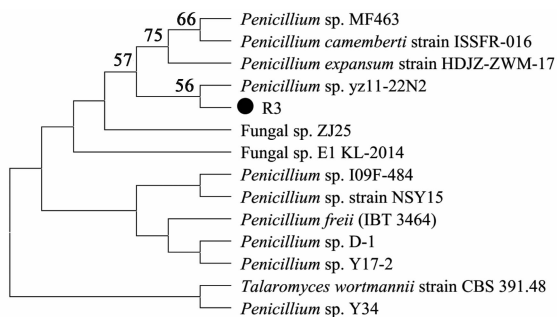


图 5 菌株 R3 的系统进化树  
Fig. 5 Phylogenetic tree of strain R3

### 3 讨论

本实验以内生真菌在代谢植物活性成分上的优势为出发点, 以新鲜黄芩植株为原料, 分离可转化黄芩苷的内生真菌, 从其根部分离得到黄芩苷转化菌株 R3, 通过形态学结合分子生物学方法鉴定该菌为

进行放大培养,以适用于工业化生产。

[参考文献]

- [ 1 ] 王沛明,陈文,孟宪丽. 黄芩有效成分在炎症通路中的作用靶点研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(17):193-197.
- [ 2 ] Muto R, Motozuka T, Nakano M, et al. The chemical structure of new substance as the metabolite of baicalin and time profiles for the plasma concentration after oral administration of sho-saiko-to in human[J]. Yakugaku Zasshi,1998,118(3):79-87.
- [ 3 ] Yim J S, Kim Y S, Moon S K, et al. Metabolic activities of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, baicalin, glycyrrhizin and genposide to their bioactive compounds by human intestinal microflora[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(10):1580-1583.
- [ 4 ] 周锡钦,梁鸿,路新华,等. 中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2009,41(5):578-584.
- [ 5 ] 陈卫卫,刘灵杰,张自力,等. 千层纸素 A 的药理作用及制剂开发的最新进展[J]. 中华中医药学刊,2018, 36(2):412-416.
- [ 6 ] Dordick J S, Clark D S. Biocatalysis and biotransformation[J]. Curr Opin Chem Bio,2002,6(2):121-122.
- [ 7 ] 郑丽娜,张明春. 中药有效成分的酶法生物转化[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2556-2558.
- [ 8 ] LI M X, ZHU H Y, YANG D H, et al. Production of secoisolaricresinol from defatted flaxseed by bacterial biotransformation[J]. J Appl Microbiol,2012,113(6):1352-1361.
- [ 9 ] 马宗敏,段绪红,秦梦,等. 微生物发酵技术在中药苷类生物转化中的应用进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2017,19(5):858-864.
- [10] 刘伶文,司磊,任树勇,等. 人肠道菌对黄芩苷的生物转化[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(10):1437-1440,1392.
- [11] 汪红,高陪,廖勇,等. 微生物发酵转化黄芩苷生成黄芩素的研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2009, 46(3):795-798.
- [12] 陈丽艳,张迎,金爽,等. 黄芩经侧耳菌和黑曲霉发酵后黄酮类成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(5):63-65.
- [13] 杨希,刘伶文,王璐倩,等. 白腐真菌转化黄芩苷生成黄芩素的研究[J]. 西安工程大学学报,2015,29(1):57-61.
- [14] 姚磊,张敏,王鹏娇,等. 黄芩中黄芩苷生物转化工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):22-24.
- [15] 贺美,邱德全,柏仕杰,等. 米曲霉两步活化法对黄芩苷的生物转化及转化产物的纯化与鉴定[J]. 广东海洋大学学报,2007,27(6):41-44.
- [16] 管悦,孙佰贺,边淑玲,等. 固定化酵母菌和米曲霉生物转化黄芩的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017,51(3):206-210.
- [17] 苏龙,梁广波,龙文英,等. 黄芩苷微生物转化菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 湖北农业科学,2017,56(8):1483-1488.
- [18] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreana*, an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science,1993,260(5105):214-216.
- [19] 宝艳儒,刘悦,解生旭,等. 内生真菌对药用植物活性成分影响研究进展[J]. 人参研究,2017,29(5):40-45.
- [20] 张黎光. 黄芩内生真菌的初步研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:301-302.
- [22] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,2006:29-31.
- [23] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:501-512.

[责任编辑 刘德文]