

梅林青霉对熊果酸的微生物转化研究

朱铁梁^{1,2}, 延慧君², 郝素云², 高文远^{1*}

1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

2. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院 药剂科, 天津 300162

摘要: 目的 利用梅林青霉 (*Penicillium melinii* AS3.4474) 对熊果酸进行微生物转化研究。方法 将熊果酸投入梅林青霉液体培养基中, 28 °C、140 r/min 条件下共培养 5 d 后, 利用多种色谱学方法分离纯化转化产物, 核磁共振波谱学技术进行结构鉴定。结果 熊果酸在梅林青霉液体培养基中发生了生物转化反应, 分离出 3 个主要转化产物, 依次鉴定为 3-羰基熊果酸、28-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖熊果酸酯和 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖熊果酸酯。结论 首次利用梅林青霉对熊果酸进行微生物转化并获得糖苷化和羰基化的转化产物, 为熊果酸的衍生物研究奠定了基础。

关键词: 梅林青霉; 熊果酸; 微生物转化; 3-羰基熊果酸; 28-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖熊果酸酯; 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖熊果酸酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0476-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.005

Microbial transformation of ursolic acid using *Penicillium melinii*

ZHU Tie-liang^{1,2}, YAN Hui-jun², HAO Su-yun², GAO Wen-yuan¹

1. College of Pharmaceutical Sciences and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Logistics College, Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Abstract: Objective To study the microbial transformation of ursolic acid using *Penicillium melinii*. **Methods** Ursolic acid was put into the fluid medium inoculated with fungus (*P. melinii* AS3.4774) and cultured in the shaker at 28 °C and 140 r/min for 5 d. The crude extract was separated by chromatography. The structures of transformed products were elucidated based on the extensive NMR studies. **Results** Ursolic acid was transformed by *P. melinii* AS3.4774 and three major derivatives were isolated and elucidated. They were 3-carbonyl ursolic acid, ursolic acid-28-*O*-β-*D*-glucopyranosyl ester, and ursolic acid-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside. **Conclusion** It is the first time that the three major derivatives could be microbial synthesized from ursolic acid by *P. melinii* AS3.4774.

Key words: *Penicillium melinii* Thom; ursolic acid; microbial transformation; 3-carbonyl ursolic acid; ursolic acid-28-*O*-β-*D*-glucopyranosyl ester; ursolic acid-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside ester

熊果酸 (ursolic acid, UA, 化学结构见图 1) 又名乌苏酸、乌索酸, 是一种重要的 α-香树脂醇型五环三萜类化合物^[1], 广泛存在于多种天然植物中。因其具有抗肿瘤、降血糖、抗炎、抗菌活性、抗 HIV 活性、抗氧化^[2-5]等多种生物学活性而备受国内外关注。但熊果酸的脂溶性强, 制成药物制剂后溶出度不理想, 体内药动学研究表明熊果酸生物利用度低^[6], 口服吸收情况比较差。因此有必要对熊果酸的结构进行改造, 以探索能否找到极性增加同时活性增强的转化产物。

到目前为止, 通过有机合成的方法对 UA 结构

改造的报道较多, 主要是对 C-3 位羟基的酯化、氧化、乙酰化, C-28 位羧基的酰胺化、酯化以及 A 环的结构修饰, 但利用传统的有机催化方式实现对 UA 的 C-3 位和 C-28 位糖苷化比较困难。而微生物转化 (microbial transformation) 具有区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低等多个优点^[7], 尤其在合成一些不容易直接从自然界或利用有机化学合成的方法获得的化学结构新颖的产物方面已经显现出令人关注的优越性。本实验通过微生物转化的方法首次采用梅林青霉 (*Penicillium melinii* AS3.4774) 对熊果酸进行结构修饰, 转化生

收稿日期: 2013-11-25

作者简介: 朱铁梁 (1968—), 男, 药事管理专业博士研究生, 药理学专业硕士, 药学学士, 副主任药师, 研究方向为药事管理、医院药学。

Tel: (022)60578717 E-mail: zhutl@eyou.com

*通信作者 高文远, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为天然药物分析、药事管理。Tel: (022)87401895 E-mail: pharmgao@tju.edu.cn

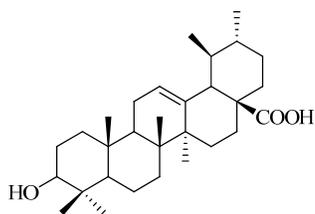


图1 熊果酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of UA

成 3-羧基熊果酸、28-O-β-D-吡喃葡萄糖熊果酸酯和 3-O-β-D-吡喃葡萄糖熊果酸酯。

1 仪器与材料

HZQ—QX 全温振荡器 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司), SW—CJ—2FD 双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司), SHB—IIIS 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), 岛津高效液相色谱仪 (包括 LC—20AT 双泵、SPD—M20A UV 检测器、CTO—20A 柱温箱, 日本岛津公司), SHMADZU VP-ODS 柱 (250 mm×20 mm, 10 μm, 日本岛津公司)。FA1204B 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。甲醇、乙腈 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 葡萄糖 (天津市化学试剂一厂), GF₂₅₄ 薄层硅胶板 (10 cm×10 cm, 青岛海浪硅胶干燥剂厂), 无水乙醇 (分析纯, 天津康科德科技有限公司), 纯净水 (杭州娃哈哈饮料有限公司)。

梅林青霉 *Penicillium melinii* Thom 购自中国科学院微生物研究所。固体培养基: PDA 培养基 (马铃薯葡萄糖琼脂培养基); 转化培养基: PDB 培养基 (马铃薯葡萄糖液体培养基)。熊果酸对照品和熊果酸试药 (对照品质量分数为 98%, 试药质量分数为 90%, 天津市科曼思特医药科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 生长曲线的绘制

取 21 瓶 250 mL 的三角瓶, 每瓶里装入 60 mL PDB 培养基, 分别接入同一浓度的梅林青霉菌孢子悬液 1 mL 后放入摇床中振荡培养 (28 °C, 140 r/min), 同时准备同样数量的空白样品 (只装入 60 mL PDB 培养基不接种菌种) 也放入摇床中。每间隔 6 h 分别取出一瓶菌种样品和一瓶空白培养基, 即分别在培养时间为 0、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96、102、108、114、120 h 时取样, 超声 20 min 后, 用一次性无菌吸管吸取少量培养液, 以空白培养液作为对照, 于 560 nm 处测定菌液的吸光度 (*A*) 值。以培

养时间为横坐标、菌悬液的 *A*₅₆₀ 为纵坐标, 绘出梅林青霉菌的生长曲线。

2.2 生物转化方法

取活化后的梅林青霉斜面菌种 1 支, 用无菌水冲洗斜面上的孢子, 振摇, 得梅林青霉孢子悬浮液。取适量的孢子悬浮液接入新鲜无菌液体培养基中, 在 28 °C、140 r/min 条件下培养 2 d。取适量熊果酸用无水乙醇溶解, 配成质量浓度为 9 mg/mL 的药液, 60 °C 加热超声 10 min 溶解。在无菌条件下取适量药液加入到培养液中, 底物质量浓度为 0.3 mg/mL, 在相同条件下继续培养 3 d。

2.3 转化产物的分离

按照“2.2”项中的转化方法累积样品, 将累积的培养液抽滤后, 用等体积正丁醇萃取 2 次, 合并萃取液, 减压浓缩至干, 称质量得到浸膏 8.95 g, 取其中 5 g 样品利用硅胶柱色谱进行分离。氯仿-甲醇 (99:1~80:20) 梯度洗脱, 氯仿-甲醇 98:2 洗脱部分析出白色针状结晶 (420 mg) 为化合物 1。氯仿-甲醇 8:2 洗脱部分 (1.2 g) 再经 ODS 柱色谱纯化, 70% 甲醇水溶液洗脱部分经过制备型反相 HPLC, 60% 甲醇为流动相精制获得化合物 2 (56 mg) 和 3 (120 mg)。通过共薄层、理化性质和现代波谱学技术 (ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR) 等手段鉴定了其中 3 个化合物的结构。

3 实验结果

3.1 梅林青霉菌生长曲线的测定结果

按照“2.1”项中的菌种培养方法, 以空白培养基作为对照, 对梅林青霉菌种液体培养液测定了最大吸收波长为 560 nm, 因此选择 560 nm 波长绘制菌种的生长曲线。每间隔 6 h 从摇床中取出一瓶样品及空白样, 测菌液的 *A*₅₆₀ 值, 绘制梅林青霉菌的生长曲线 (图 2)。由图 2 可知, 在 24 h 后微生物进入对数生长期, 48 h 后进入稳定期。生长曲线的研究确定了菌种在适宜的时期加入底物进行转化, 以及为转化结束时间的确定提供参考依据。

3.2 转化产物的结构鉴定

化合物 1: 白色粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜类化合物。ESI-MS 结合碳谱、氢谱确定分子式 C₃₀H₄₆O₃, 比底物熊果酸少 2 个 H。

¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) 中, δ 0.84, 0.94, 0.97, 0.98, 1.01, 1.04, 1.13 为 7 个熊果酸型的三萜甲基氢信号; δ 5.46 (1H, s) 为烯氢信号, 推测为熊果

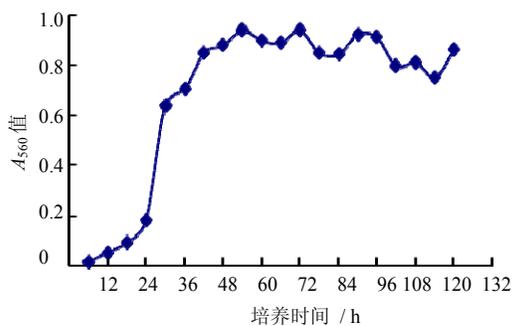


图2 梅林青霉菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *P. melinii* AS3.4774

酸型。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) 中共显示 30 条谱线, 与熊果酸的碳谱数据相对照, δ 125.4, 139.2 是 C-12、C-13 的烯碳信号, δ 179.5 是 28 位的羧基碳信号。而 C-3 位的碳信号消失却新增了 1 个 δ 215.8 的酮基碳信号, 同时 C-2 (δ 34.1) 及 C-4 (δ 47.2) 的碳信号向低场移动, 确定 3 位为羰基取代。经文献检索, 对比核磁数据^[8], 确定该化合物为 3-羰基熊果酸, 结构见图 3。化合物 1 的碳谱数据见表 1。

化合物 2: 白色粉末 (甲醇), Libermann-Burchard 和 Molish 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜皂苷类化合物。ESI-MS *m/z*: [M-H]⁻ 617.3, 结合核磁数据确定分子式为 C₃₀H₄₆O₃。糖水解衍生化后经气相色谱分析确定结构中存在 1 个 D-葡萄糖。

¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) 中, δ 0.77, 0.81, 0.84, 0.93, 0.95, 0.98, 0.99 为 7 个熊果酸型的三萜甲

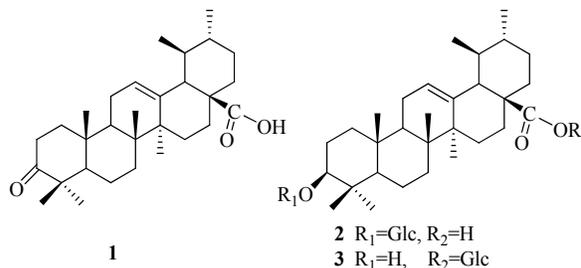


图3 转化产物的结构

Fig. 3 Structures of transformed products

基氢信号; δ 4.93 (1H, d, *J* = 7.8 Hz) 糖的端基氢信号, 苷键构型为 β 型; δ 5.45 (1H, d, *J* = 3.2 Hz) C-12 的氢信号; δ 3.28 (1H, t, *J* = 13.4, 3.9 Hz) 和 δ 2.22 (1H, t, *J* = 13.5, 3.6 Hz) 为 C-11 的 2 个氢信号。¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) 中共显示 36 条谱线, 与熊果酸母核对比, 化学位移值在 δ 60~90 多了 5 个连氧碳信号, δ 179.5 (C-28) 为 C-28 位碳信号, δ 88.6 (C-3) 与 δ 106.7 (C-1') 表明糖连接在 C-3 位的羟基上形成糖苷键, δ 125.5, 139.0 是熊果酸 C-12、C-13 位双键碳信号。经文献检索, 对比核磁数据^[9], 确定该化合物为 3-O-β-D-吡喃葡萄糖熊果酸酯, 结构见图 3。化合物 2 的碳谱数据见表 1。

化合物 3: 白色粉末, Libermann-Burchard 和 Molish 反应阳性, 提示该化合物与底物类似, 为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 给出 *m/z*: [M-H]⁻ 617.3, 结合碳谱氢谱数据确定分子式为 C₃₀H₄₆O₃。糖水解衍生化后经气相色谱分析确定结构中存在

表1 化合物 1~3 的碳谱数据

Table 1 ¹³C-NMR data for compounds 1-3

碳位	1	2	3	碳位	1	2	3
1	39.1	38.8	39.1	19	39.2	39.2	39.0
2	34.1	28.4	28.2	20	39.3	39.8	30.8
3	215.8	88.6	78.1	21	31.1	31.0	28.7
4	47.2	39.4	39.3	22	37.2	36.8	36.7
5	55.1	55.6	55.6	23	21.4	28.1	28.1
6	19.7	18.3	18.5	24	26.6	16.8	16.5
7	32.8	33.3	33.5	25	15.0	15.4	15.7
8	39.7	39.8	40.1	26	17.1	17.3	17.6
9	46.9	48.0	48.3	27	23.6	23.7	23.7
10	36.6	37.2	37.2	28	179.5	179.5	176.0
11	23.4	23.3	23.7	29	21.1	17.3	17.3
12	125.4	125.5	126.0	30	17.3	21.2	21.2
13	139.2	139.0	138.3	1'		106.7	95.5
14	42.4	42.4	42.4	2'		75.7	73.8
15	28.5	26.5	28.6	3'		78.8	79.2
16	24.6	24.6	24.6	4'		71.7	71.2
17	47.9	47.7	48.1	5'		78.2	78.6
18	53.5	53.4	53.2	6'		63.0	62.2

1个D-葡萄糖。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 中, 低场区存在葡萄糖的端基氢信号 δ 6.25 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 苷键构型为 β 型; δ 5.45 (1H, brs) 为 C-12 位烯氢质子信号, 高场区有 7 个熊果酸型角甲基氢质子信号 (δ 0.80, 0.83, 0.87, 0.92, 0.94, 1.01, 1.13)。将化合物 **3** 的 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 数据与熊果酸数据相比较, 多了 6 个碳信号 (δ 95.5, 73.8, 79.2, 71.2, 78.6, 62.2); 其中 δ 176.0 (C-28) 与糖的端基碳信号数据 δ 95.5 (C-1') 表明糖连接在 C-28 的羧基上形成酯苷键。经文献检索, 对比核磁数据^[9], 确定该化合物为 28-O- β -D-吡喃葡萄糖熊果酸酯, 结构见图 3。化合物 **3** 的碳谱数据见表 1。

4 讨论

本实验首次利用梅林青霉 (*Penicillium melinii* AS 3.4474) 对熊果酸进行微生物转化研究, 分离并鉴定了 3 个转化产物, 依次为 3-羧基熊果酸 (**1**)、28-O- β -D-吡喃葡萄糖熊果酸酯 (**2**) 和 3-O- β -D-吡喃葡萄糖熊果酸酯 (**3**)。3 个化合物纯化后经 HPLC 检测后纯度分别为 90%、88% 和 92%, 实现了对熊果酸 C-3 位和 C-28 位的糖苷化。

本研究获得的 3 个转化产物再次确定了微生物体内具有能够促进天然产物尤其是三萜类化合物进行糖苷化反应的特异性酶, 在温和的条件下实现三萜类化合物的糖苷化, 这为天然产物实现糖苷化产物制备奠定实验基础。

参考文献

- [1] 向敏, 王建梅, 凌婧, 等. 熊果酸抗肿瘤和抗心血管疾病作用的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(6): 7-10.
- [2] Muto Y, Ninomiya M, Fujiki H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1990, 20(3): 219-224.
- [3] 陈军, 柳军, 龚彦春, 等. 新型糖原磷酸化酶抑制剂熊果酸衍生物的合成及其生物活性 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 397-402.
- [4] Kwon T H, Lee B, Chung S H, *et al.* Synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2009, 30(1): 119-123.
- [5] 孟艳秋, 陈瑜, 王赧, 等. 熊果酸的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(1): 25-28.
- [6] Liao Q F, Yang W, Jia Y, *et al.* LC-MS Determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional Chinese medicinal preparation Lu-Ying extract [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2005, 125(6): 509-515.
- [7] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [8] 陈磊, 杨小生, 杨娟, 等. 五环三萜衍生物的合成和对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3): 222-225.
- [9] Miyase T, Melek F R, Elgindi O D, *et al.* Saponins from *Fagonia ababica* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(4): 1175-1179.