

# 新疆胀果甘草内生细菌枯草芽胞杆菌 产甘草酸类代谢产物的初步研究

宋素琴\* 欧提库尔·玛合木提 房世杰 顾美英 朱 静

(新疆农业科学院微生物应用研究所 乌鲁木齐 830091)

**摘 要:** 为筛选到可产生甘草酸的内生菌,从健康的胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)不同组织中分离得到 149 株内生细菌,采用发酵培养的方法,以甘草酸单铵盐为标准品采用 TLC 法和 HPLC 法对这些细菌的代谢产物进行筛选,得到一株可能产甘草酸类似物的内生枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*。

**关键词:** 胀果甘草, 内生细菌, 甘草酸单铵盐

## Preliminary Studies on Its Glycyrrhizinic Acid Metabolites of Endophytic Bacteria from *Glycyrrhiza inflata* Bat. of Xinjiang

SONG Su-Qin\* Otkur-Mahmut FANG Shi-Jie GU Mei-Ying ZHU Jing

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830091)

**Abstract:** Total 149 strains of endophytic bacteria were isolated from different healthy organisms of *Glycyrrhiza inflata* Bat. from Xinjiang. The fermented liquids of these strains were screened by TLC and analysed by HPLC, and the glycyrrhizinic acid monoammonium salt was taken as standard control at the same time. Only one endophytic bacterial strain of *Bacillus subtilis* could produce Glycyrrhizinic acid monoammonium salt analogue.

**Keywords:** *Glycyrrhiza inflata*, Endophytic bacteria, Glycyrrhizinic acid monoammonium salt

植物内生菌是一类相对来说开发较少、次生代谢产物丰富、应用前景广阔的资源微生物。近年来,随着各种各样的癌症和对药物产生抗性的病原菌的出现,人类的健康受到严重的威胁。人们更加渴望获得更多新型、疗效更为显著的药物。利用某些内生菌的活性代谢产物对人类疾病和癌症有治疗作用,因此,内生菌可作为新型药物的筛选源。这对于从天然药用植物中提取活性产物带来的资源短缺、生

态平衡破坏、甚至物种灭绝将起到有效缓解作用,也为内生菌资源的合理利用提供了参考<sup>[1,2]</sup>。

药用植物可产生多种类型的内生菌,产抗肿瘤活性物质的内生真菌首先从产紫杉醇的植物红豆杉中分离到。紫杉醇是一种重要的抗肿瘤药物,对卵巢癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤具有突出的疗效,但因红豆杉植物资源有限,造成紫杉醇价格昂贵,此发现为解决紫杉醇药源危机提供了新的思路<sup>[1,2]</sup>。

胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 为豆科 (Leguminosae) 灌木状多年生草本植物, 主要分布于新疆南疆塔里木盆地干旱、炎热、温差大、土壤盐碱重的暖温带荒漠区, 以干燥的根及根状茎入药。它的药用有效成分为甘草酸 (Glycyrrhizic acid), 又称甘草甜素 (Glycyrrhizin) 及其水解产物甘草次酸 (Glycyrrbetinic acid)。其药理作用表现在: 抗炎作用; 抗病毒作用包括抗肝炎病毒、抗艾滋病 (AIDS) 病毒和抗单纯疱疹病毒作用; 防治肝损伤作用; 抗癌作用; 免疫调节作用和抗动脉硬化作用、对内耳听觉功能的作用等其它作用。由于甘草酸为五环三萜皂苷类物质, 结构复杂, 无法人工合成, 因此, 甘草酸的获得只能依赖从甘草根中提取, 而野生甘草资源已近枯竭<sup>[3-6]</sup>。

为保护日益减少的有限的甘草资源, 目前研究多集中在微生物转化甘草皂甙和利用组织培养的方法获取更多的甘草酸, 本研究着手从胀果甘草内生菌的代谢物中找与其宿主产相类似活性物质的探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胀果甘草采自新疆焉耆甘草自然保护区, 采集时间 2005 年 10 月, 由新疆石河子大学生物学院阎平教授鉴定。

### 1.2 试剂和仪器

正丁醇、冰醋酸、乙酸乙酯、甲酸、浓硫酸均为分析纯, 硅胶 G 板和 GF254 板 (青岛海洋化工厂), ZF-I 型三用紫外分析仪、HPLC (Waters1525 Pump 系列): C18 反相柱, 2487 双通道紫外检测器, Yj-875 型医用净化工作台, 9082-B 型电热恒温培养箱 (上海福玛实验设备有限公司), QZX-C 型恒温振荡培养箱 (太仓市实验设备厂), E360K 离心机。

### 1.3 内生细菌液体发酵培养

1.3.1 种子培养基: 肉汁胨培养基 (NA): 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 8 g, 琼脂粉 16 g, 水 1000 mL。

1.3.2 种子培养液: 蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 3 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.4~7.6。

1.3.3 发酵培养基: 发酵液: 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 30 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2。

发酵液 (TYEG): 胰蛋白胨 20 g, 酵母浸膏 10 g, 葡萄糖 2 g,  $K_2HPO_4$  6 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0~6.5。

发酵液 (MM): 柠檬酸钠 0.5 g,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g, 葡萄糖 5 g,  $K_2HPO_4$  7 g,  $KH_2PO_4$  3 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0~6.5

1.3.4 摇瓶发酵: 在无菌操作条件下, 将已纯化的菌株接入种子培养基 28℃ 暗培养 24 h, 将灭菌的种子培养液按每瓶 100 mL 分装于 500 mL 三角瓶中, 然后将活化的菌株接种于以上培养液中, 30℃, 200 r/min, 摇培 16 h。取种子液 2 mL 接入 50 mL 发酵液中, 30℃, 200 r/min 摇培, 分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 取出 1 mL 至灭菌的 1.5 mL 离心管中, 4600 r/min, 20 min 离心, 取上清液 1 mL 转入 1.5 mL 离心管中与标准液一起在同一薄层板上点薄层。

### 1.4 薄层层析 TLC

1.4.1 标准液的配制: 甘草酸单铵盐购自中药固体制剂国家工程技术研究中心 (江西本草天工科技有限责任公司), 标准液甘草酸单铵盐的浓度 1 mg/mL, 用 50% 乙醇溶解, 10 mL 容量瓶定容。

展开剂: (1) 正丁醇:冰醋酸:水 (4:1:2, V/V/V);

(2) 乙酸乙酯:甲酸:冰醋酸:水 (15:1:1:2, V/V/V/V)

显色剂: 浓  $H_2SO_4$ :无水乙醇 (1:9, V/V)

1.4.2 TLC 筛选: 用直径为 0.1 mm 毛细管吸取发酵液和甘草酸单铵盐标准品溶液, 分别点于同一 GF254 薄层硅胶板上, 以正丁醇-冰醋酸-水 (4:1:2, V/V/V) 为展开剂进行展开, 晾干, 置紫外分析仪在 254 nm 和 365 nm 下检视。再喷以 10% 硫酸乙醇, 在电炉上烘干至显色清晰, 再置紫外分析仪在 254 nm 和 365 nm 下检视, 重复点板 3 次再薄层层析。选择与标样处在相同或相近的  $R_f$  值的发酵液, 再与标准液点薄层用第二系统乙酸乙酯:甲酸:冰醋酸:水 (15:1:1:2, V/V/V/V) 展开, 用同样显色的方法, 然后将与标样具有相同或相近的  $R_f$  值的发酵液对应的菌株选择出来, 重复 3 次<sup>[7,8]</sup>。

### 1.5 HPLC 检测

经过薄层筛选的菌株 200633 用同样的方法发酵放大培养, 离心取上清液, 旋转蒸发至棕色黏稠液体, 用少量的水溶解, 先用小薄层板点定位初步计算  $R_f$  值, 再上 25 cm × 25 cm 的自制 GF254 板, 在紫外分析仪 254 nm 下定位, 用刮板法将所要的条带挂下, 溶解过滤, 滤液至水浴 50℃ 挥发干燥, 溶解转入 1 mL 离心管中待测, 然后和甘草酸单铵盐标样

一起做高效液相检测，流动相为甲醇:0.2 mol乙酸胺 (60:40,  $V/V$ )；检测波长为 250 nm；流速为 1 mL/min, RT标样为 5.758 min<sup>[9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 TLC 筛选结果

按照前述方法，筛选出与标准品  $R_f$  值相同的菌株发酵液，然后找出与其编号相对应的菌株保存。图 1 为TLC筛选图示。

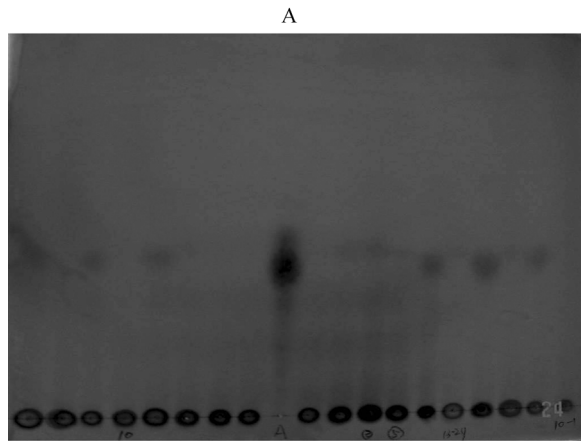


图 1 72 h 菌株发酵液的 TLC 筛选  
Fig. 1 The screened TLC of strains' fermented liquid after 72 h incubated  
注：中间 A 为甘草酸单铵盐标准品，其余为内生细菌发酵液的离心上清液  
Note: A is the glycyrrhizinic acid monoammonium salt, the rest are the fermented' liquids

2.2 HPLC 测定结果

如图 1 所示薄层层析，经过两个不同展开剂系统重复筛选后，选择与甘草酸单铵盐标准品有相同  $R_f$  值的菌株，因此菌株 *Bacillus subtilis* 被选择出来，再用HPLC做了进一步检测。根据图 2 和表 1 表明：该菌株的发酵液中含有甘草酸单铵盐类似物质，含量分别为 0.119  $\mu\text{g/mL}$  和 0.127  $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

药用植物内生真菌的种类具有丰富的多样性；还可以产生与宿主相同、相似或在医药、农业、工业等行业有重要应用价值的活性物质；通过与药用植物的共生关系对某些药物的形成具有重要作用。目前已研究过内生真菌的药用植物至少有 145 种<sup>[10]</sup>。当前，药用植物内生菌的研究多集中于内生真菌的分离和代谢产物的研究。由于本研究多次的分离结果表明，

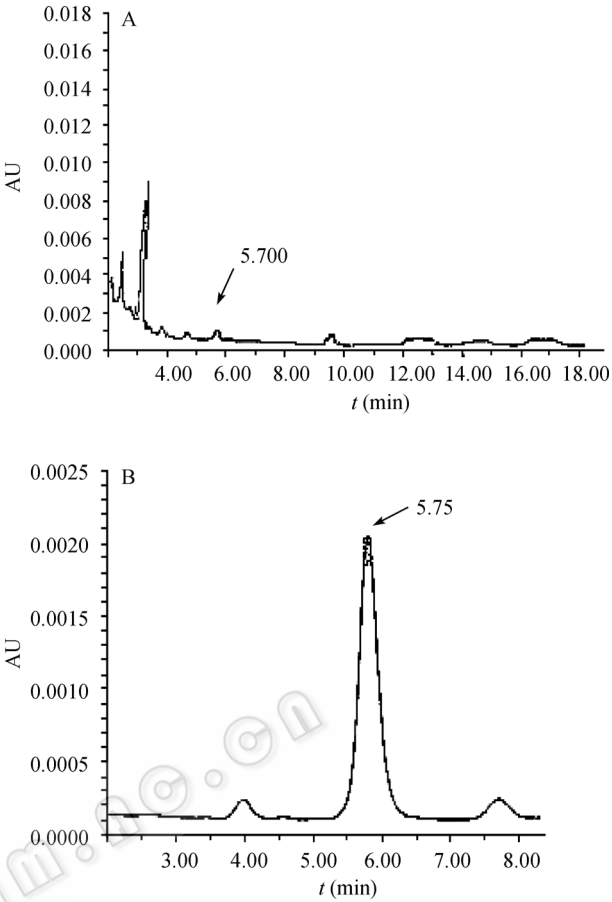


图 2 筛选菌株 *Bacillus subtilis* 发酵液的 HPLC(A)和甘草酸标准品的 HPLC(B)  
Fig. 2 HPLC of the selected *Bacillus subtilis* fermented liquid(A) and HPLC of the glycyrrhizinic acid monoammonium salt(B)

表 1 菌株 <i>Bacillus subtilis</i> 发酵液 HPLC 结果					
Table 1 The result of HPLC of fermented liquor of the strain <i>Bacillus subtilis</i>					
	RT (min)	Area (uVsec)	% Area	Height (uV)	% Height
1	5.758	42728	100.00	2644	100.00
2	5.700	479	3.88	53	4.83
3	5.700	406	3.46	53	5.11

注：1：标准品；2,3: *Bacillus subtilis* 发酵液；RT: 保留时间  
Note: 1: Standard control; 2,3: The fermented liquor of the strain *Bacillus subtilis*; RT: Retention times

在可培养条件下，新疆胀果甘草的内生菌绝大多数为内生细菌<sup>[11]</sup>，因此本研究的重点是：在实验室摇瓶液体发酵的条件下，定向筛选已分离得到的胀果甘草内生细菌的次生代谢产物是否有产生和其寄主有相同或相似产物——甘草酸。  
近年在皂苷类成份的测定方法学研究中，出现了比色法、分光光度法、色谱法(TLC, TLCS, HPTLC,

HPLC, GC)和近红外光谱法及高效毛细管电泳等方法。结合现有的内生菌发酵代谢产物通常使用TLC法和HPLC法相结合的筛选方法, 为避免漏筛现象, 本研究针对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和芽胞菌(根据梅里埃细菌鉴定卡要求区分)分别使用3种不同发酵培养基<sup>[11]</sup>, 在发酵时间选择24 h、48 h、72 h、96 h取样和标准品一起点薄层初筛, 然后再用HPLC检测验证的方法, 筛选出了可能的甘草酸产生菌株200633, 对照该菌株的编号查到其鉴定结果为枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis*<sup>[11]</sup>。

利用内生真菌发酵实现生物活性物质的工业化生产, 可以提高产量、降低产品成本, 满足人们日益增长的需求; 同时有利于珍稀、濒危药用植物资源的保护, 对减少野生药用植物多样性的破坏具有重要意义。但是我们也应该看到, 药用植物内生真菌产生的活性物质离大规模的工业生产还相距甚远, 实现工业化生产的瓶颈是内生真菌产生的生物活性物质产量过低<sup>[12]</sup>。虽然就目前技术水平而言, 每升内生菌发酵液中仅能获得纳克级的活性成分, 离工业化生产还有很大的距离, 有许多问题尚待解决, 但我们相信, 随着技术手段的提高, 一定会在天然药物的研究中占有不可忽视的地位<sup>[13]</sup>。该菌株发酵条件的优化和该发酵产物的分离纯化和鉴定工作将进一步展开进行。

## 参 考 文 献

- [1] 李海燕, 刘 丽. 产生物活性物质植物内生菌的研究进展. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 482-485.
- [2] 姜 怡, 杨 颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源. 微生物学通报, 2005, 32(6): 146-147.

- [3] 管延英, 滕忠才, 梁玉玲. 胀果甘草(*Glcyrrhiza inflat Bat*)组织培养物的有效成分分析. 河北农业大学学报, 2003, 126(4): 34-37.
- [4] 崔国盈, 赵桂林, 杨启元, 等. 新疆甘草资源的分布及其开发利用. 草食家畜, 1999, (2): 40-42.
- [5] 王玉庆, 朱 玫. 我国甘草资源的调查与分析. 山西农业大学学报, 2002, 22(4): 366-369.
- [6] 李翠芹. 甘草有效成分甘草酸和甘草次酸及其衍生物的药理作用研究进展. 中华医学研究与实践, 2004, 12(3): 48-51.
- [7] 王晓颖, 刘大有, 夏忠庭, 等. 三萜皂苷定性定量分析方法研究进展. 中草药, 2002, 33(9): 861-862.
- [8] 高素莲, 王雪梅. 甘草中皂甙和黄酮类化合物的提取分离与测定. 安徽大学学报(自然科学版), 2000, 24(4): 70-74.
- [9] Helle KH, Steen HH, Marianne K, *et al.* Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid in pharmaceutical preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, 9: 41-46.
- [10] 陈利军, 陈月华, 史洪中, 等. 药用植物内生真菌研究进展. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2438-2440.
- [11] 宋素琴, 欧提库尔, 张志东, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定. 微生物通报, 2007, 34(5): 867-870.
- [12] 孙剑秋, 郭良栋, 臧 威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1505-1519.
- [13] 黎万奎, 胡之璧. 内生菌与天然药物. 中国天然药物, 2005, 3(4): 193-199.