

## 滇重楼内生真菌转化万古霉素的研究

宣群<sup>1)</sup>, 潘红梅<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学微生物学暨免疫学教研室; 2) 昆明医科大学营养学系, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 利用滇重楼内生真菌生物转化万古霉素. **方法** 分离滇重楼内生真菌并筛查它们的生物转化能力. 鉴定具有转化能力的内生真菌. **结果** 有 2 株内生真菌可以转化万古霉素. 经鉴定为产黄青霉和 *Fusarium nematophilum*. 菌株 G01 和 G03 在添加万古霉素的液体培养基中培养 6 d 后, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 分析发现, 万古霉素的峰面积下降并有新吸收峰出现. **结论** 内生真菌发酵产生了某些新成分.

**[关键词]** 滇重楼; 内生真菌; 生物转化; 万古霉素

**[中图分类号]** R931.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0010-03

## Biotransformation of Vancomycin by Endophytic Fungi from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz

XUAN Qun<sup>1)</sup>, PAN Hong-mei<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Microbiology and Immunology, Kunming Medical University; 2) Dept. of Nutriology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** The biotransformation of vancomycin by endophytic fungi isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz was studied. **Methods** Endophytes were isolated and screened for their biotransformational abilities. Afterwards, these endophytic fungi having transformation abilities were identified. **Results** Two strains of the endophytic fungi were able to transform vancomycin. Based on their 26S rDNA or ITS sequences, they were identified as *Penicillium chrysogenum* and *Fusarium nematophilum*. After strains G01 and G03 cultivated for 6 days in liquid media containing vancomycin, the peak area of vancomycin decreased and new absorption peaks appeared according to the high performance liquid chromatography (HPLC). **Conclusion** Some new components were produced by fermentation of the two stains of endophytic fungi.

**[Key words]** *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz; Endophytic fungi; Biotransformation; Vancomycin

内生真菌是指生活在健康植物细胞内或细胞间, 但不引起明显病症的真菌. 由于与宿主植物长期共同进化和基因重组, 内生真菌获得了多样化的生物合成能力. 它们可以产生具有抗癌、抑菌及调节植物生长等多种生物活性的物质<sup>[1]</sup>. 此外, 与植物的共生关系迫使它们必须形成特殊的生物降解途径以分解有毒化合物, 因此有的内生真菌还能转化天然化合物产生高效低毒产物<sup>[2]</sup>. 经

内生真菌立体选择性转化后, 镇静剂甲硫哒嗪可转化为具有高效镇静作用的 R 型 2-甲基亚砷吩噻嗪, 这是采用化学法难于做到的<sup>[3]</sup>. 协同进化使植物内生菌可能形成独特的酶系统. 因此, 它们可以修饰相关药物的化学结构, 增强药理活性并提高药物的生物利用度. 目前, 越来越多研究者关注内生真菌不仅因为它们能产生许多新物质, 而且因为它们可以转化天然产物.

**[基金项目]** 云南省教育厅科研基金资助项目 (2012Y006); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2014FB017)

**[作者简介]** 宣群 (1968~), 女, 云南昆明市人, 理学硕士, 副教授, 主要从事微生物资源开发利用及医学微生物学暨免疫学教学科研工作.

万古霉素属于糖肽类抗生素, 是临床上治疗革兰阳性菌尤其是耐甲氧西林金葡菌、肠球菌和肺炎球菌性严重感染的最后一线药物. 然而, 由于滥用抗生素和病原菌变异, 已经出现万古霉素耐药菌, 万古霉素的抗菌作用大打折扣, 严重的革兰阳性菌感染再一次向人类提出了严峻挑战. 由于化学方法制备的半合成万古霉素仍处于试验阶段, 而且这些半合成万古霉素具有较大副作用或尚未确认其安全性能, 所以化学合成的万古霉素衍生物是否能应用于临床还是一个未知数<sup>[4]</sup>. 由于内生菌具有局部立体选择性的多酶系统, 笔者采集了药用植物滇重楼并分离其内生真菌. 希望用这些内生真菌转化万古霉素, 为抗菌药物生物转化研究提供有价值的参考. 本文报导了分离自药用植物滇重楼的内生真菌转化万古霉素.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

HPLC DIONEX (戴安) UltiMeter3000; 水为去离子水 (实验室自制); 其余试剂均为分析纯. 滇重楼采自云南武定, 由云南白药集团优质种源繁育有限责任公司惠赠. 万古霉素盐酸盐 (Sigma), 纯度 $\geq 99\%$ , 购自昆明丰科生物科技有限公司.

### 1.2 培养基

分离培养基: 酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基 (yeast peptone dextrose agar, YPD). 其成分: 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 2 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 琼脂 12 g/L) 1 000 mL 灭菌后, 加入氨苄青霉素 (1 mg/mL) 1 mL. 液体发酵培养基: YPD 液体培养基.

### 1.3 内生真菌的分离

取新鲜健康滇重楼植株的根状茎、根、茎、叶、花等样品用自来水冲洗干净, 消毒纸巾擦干. 将各部位切成小块, 于 75% 酒精中漂洗 3~5 min 后, 无菌水冲洗, 随即用 0.1% 升汞浸泡 0.5~1 min, 无菌水冲洗数分钟. 实验组样品边缘剪开, 置 YPD 平板上, 于 25℃ 培养箱中培养 7 d; 对照组样品直接置 YPD 平板, 于相同条件下培养. 实验组有菌丝长出并进行纯化、斜面 4℃ 保藏. 在培养期间, 对照组无菌丝长出.

### 1.4 底物发酵

在每个 250 mL 三角瓶中放入 150 mL 液体 YPD 培养基, 接种 3 块菌丝块 ( $\phi 5$  cm). 25℃、120 r/min 摇瓶培养 4 d 后, 加入 75 mg (溶于无菌

纯净水) 的底物万古霉素盐酸盐再培养 6 d 后收获培养物. 底物对照含有底物没有真菌, 而培养对照含有真菌没有底物, 2 种对照均在上述同样条件下培养. 过滤分离培养物和发酵液, 发酵液冷藏待测.

### 1.5 HPLC 分析条件

流速 0.8 mL/min, 柱子 C18 (Welch Materials), 流动相甲醇: 磷酸二氢钾 (0.05 mol/L pH3.2) =28: 82, 波长 230 nm, 手动进样 20  $\mu$ L/ 针.

### 1.6 菌株鉴定

对具有生物转化作用的内生真菌菌株进行分子生物学鉴定. 从真菌 G01 中扩增 26s rDNA D1/D2 区序列, 从真菌 G03 中扩增 ITS 区 (Internal transcribed spacer regions) 序列, 并分别回收测序.

从斜面培养物中挑取菌丝于 50  $\mu$ L TaKaRa Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR (Code No.9164) 中于 80℃ 处理 15 min, 变性后离心取上清作为模板. 使用 TaKaRa 真菌鉴定 PCR 试剂盒 (Code No.RR178), 进行 PCR 扩增 G01 菌株的 26S D1/D2 区目的片段和 G03 菌株的 ITS 区目的片段. 然后使用 Takara MiniBEST 琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒 Ver.3.0 (Code No.9762) 切胶回收目的片段进行 DNA 测序.

## 2 结果

### 2.1 HPLC 分析

按化学成分分析条件检测, 比较 250 nm 波长下底物万古霉素盐酸盐与内生真菌转化产物的保留时间, 发现底物经生物转化后不仅化学成分含量出现不同程度的变化, 且出现了底物不具有的化学成分, 从保留时间上反映出新吸收峰的化合物极性相对偏高, 见图 1.

对比含有万古霉素盐酸盐培养基中, 经内生真菌 G01 转化后, 万古霉素盐酸盐的峰面积下降, 并在保留时间 12.357 min 和 17.867 min 有新色谱峰出现; 而经 G03 转化后, 万古霉素盐酸盐的峰面积同样下降, 并在保留时间 15.683 min 和 17.193 min 有新色谱峰出现. 这说明, 经内生真菌 G01 和 G03 可转化万古霉素盐酸盐并产生新的转化产物.

### 2.2 内生真菌鉴定

经鉴定, 内生真菌 G01 为产黄青霉 (图 2), G03 为镰孢菌属的 *Fusarium nematophilum* (图 3).

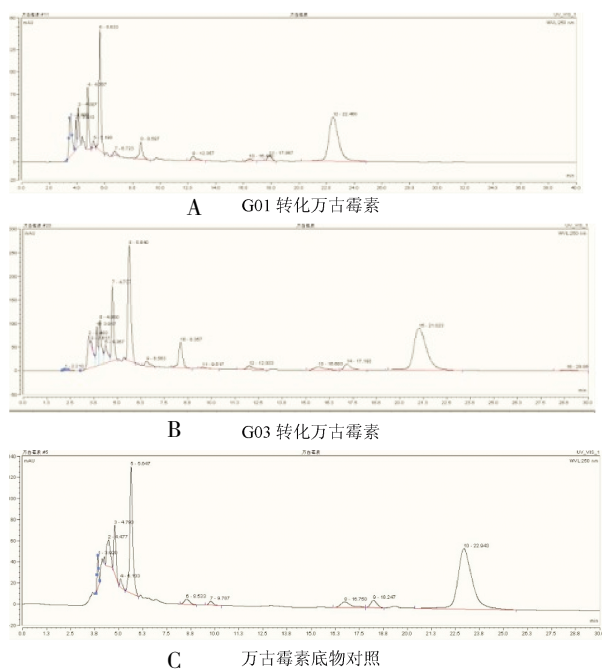


图 1 转化产物及万古霉素底物对照在 250 nm 的 HPLC 图谱

Fig. 1 The HPLC chromatograms of transformation products and vancomycin (230 nm)

A:G01 转化万古霉素; B:G03 转化万古霉素;  
C:万古霉素底物对照.

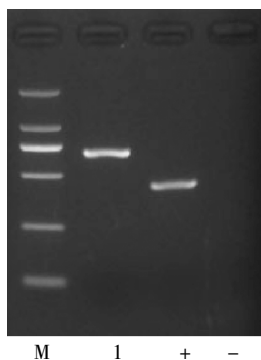


图 2 G01 26SrDNA D1/D2 区 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified D1/D2 regions of G01 26SrDNA

M:DL2, 000 DNA Marker; 1:26S rDNA-G01-PCR 产物;  
+: 正对照; -: 负对照.

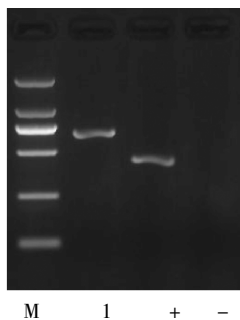


图 3 G03 ITS 区 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified ITS regions

M:DL2 000 DNA Marker; 1: ITS-G03-PCR 产物; +: 正对照;  
-: 负对照.

### 3 讨论

很少有研究者们用滇重楼内生真菌修饰天然产物. 笔者研究了内生真菌产黄青霉和 *Fusarium nematophilum* 转化万古霉素盐酸盐的能力.

生物转化结合现代生物工程技术, 利用微生物或其代谢酶对现存有机物质进行分解或水合、酯化、酯转移、脱水、脱羧、酰化、胺化、异构化和芳构化等各类化学反应, 产生新的活性物质, 从而导致药物活性发生相应的改变<sup>[5]</sup>. 从结果可知, 万古霉素盐酸盐在滇重楼内生真菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和 *Fusarium nematophilum* 代谢中某些酶的催化下发生了生物转化, 导致底物万古霉素盐酸盐含量下降, 且伴随新化合物的产生. 为万古霉素衍生物的筛选与发现提供了新途径.

总之, 内生真菌作为有用的资源不仅因为它们代谢物具有生物活性, 而且因为它们对天然产物的生物转化能力. 研究证明, 内生真菌等微生物能通过生物转化获得手性化合物, 这在化学方法是很难获得的. 本研究发现, 内生真菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和 *Fusarium nematophilum* 可转化万古霉素盐酸盐并产生新的代谢物. 关于转化产物中的化学成分的改变及其所引起的药理作用差别有待对转化产物进一步的分离纯化、结构鉴定及相关药理的分析来解释.

### [参考文献]

- [1] SHEELA CHANDRA. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(1):47-59.
- [2] Soizic Prado, Didier Buisson, Idrissa Ndoye, Marine Vallet, Bastien Nay. One-step enantioselective synthesis of (4S)-isosclerone through biotransformation of juglone by an endophytic fungus [J]. Tetrahedron Letters, 2013, 54: 1189-1191.
- [3] Keyller Bastos Borges, Warley De Souza Borges, M?nica Tallarico Pupo & Pierina Sueli Bonato. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77: 669-674.
- [4] 王德心. 活性多肽与药物开发[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2008:147-773.
- [5] 王劝绪. 浅谈微生物催化在药物合成中的应用及其发展前景[J]. 科技创新, 2012, 5:31.

(2014-07-10 收稿)