

紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化对羟基苯甲醛生产天麻素

Production of Gastrodin Through Biotransformation of *p*-hydroxybenzaldehyde by Cell Suspension Cultures of *Datura tatula* L.

龚加顺^{1,2*}, 马维鹏², 普俊学², 徐树冠², 郑双庆², 肖春杰³

GONG Jia-Shun^{1,2*}, MA Wei-Peng², PU Jun-Xue², XU Shu-Guan², ZHENG Shuang-Qing² and XIAO Chun-Jie³

1 云南农业大学食品科学技术学院, 昆明 650201

2 昆明制药集团股份有限公司药物研究所, 昆明 650100

3 云南大学生命科学学院, 昆明 650091

1 Faculty of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2 Institute of Material Medical, Kunming Pharmaceutical Corp., Kunming 650100, China

3 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China

摘要 利用紫花曼陀罗细胞悬浮培养转化外源对羟基苯甲醛合成天麻素, 并应用多种色谱技术进行分离纯化, 根据转化产物的理化性质和光谱数据分析鉴定结构。实验表明, 紫花曼陀罗细胞成功将对羟基苯甲醛转化为天麻素(II), 同时也得到了由对羟基苯甲醛生成天麻素的转化中间体对羟基苯甲醇(I)。在培养基中添加 0.1mg/L 的水杨酸能显著提高细胞对外源对羟基苯甲醛的糖基化率, 而保持气升式发酵罐(25-L)罐内压力为低压(0.001MPa)也能提高细胞对外源对羟基苯甲醛的糖基化率。实验证明, 紫花曼陀罗细胞悬浮培养能有效转化对羟基苯甲醛合成天麻素。

关键词 紫花曼陀罗, 对羟基苯甲醛, 对羟基苯甲醇, 天麻素, 生物转化

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0800-05

Abstract The conversion of exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde to *p*-hydroxy-methyl-phenol- β -D-glucoside (gastrodin) was studied by using cell suspension culture of *Datura tatula* L. The chemical structure of this synthesized gastrodin was identified based on the spectral analysis and chemical evidence. The conversion procedure of *p*-hydroxybenzaldehyde into gastrodin by *D. tatula* L. cell suspension cultures was established. The synthesized gastrodin (II) was isolated from the ferment liquor and identified by spectral analysis. At the same time, the *p*-hydroxybenzyl alcohol (I) converted through biotransformation of *p*-hydroxybenzaldehyde by cell suspension cultures of *D. tatula* L. was also isolated and identified. The efficiency of glucosylation of *p*-hydroxybenzaldehyde was remarkably enhanced by adding salicylic acid (0.1mg/L) and keeping the lower pressure (0.001MPa) in 25L airlift loop bioreactor. The biotransformation of exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde to gastrodin by cell suspension culture of *D. tatula* L. is a promising approach.

Key words *D. tatula* L., *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxy-methyl-phenol- β -D-glucoside (gastrodin), biotransformation

天麻是中国名贵的中药之一^[1],其干燥的块茎民间称天麻,具有镇静、治疗风湿、治疗瘫痪和偏瘫、治疗腰痛、头痛、眩晕和抗惊厥的作用^[2,3]。天麻素(对羟基甲基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷)为天麻中的主要有效成分,具有抗炎、抗惊厥、镇痛、增强机体免疫、扩张血管、抗缺血缺氧、清除自由基等多种功能^[4]。70年代末期由昆明植物所周俊院士发现并人工合成^[5],但由于化学合成天麻素工艺难度大,环境污染严重,因此,寻求新的合成方法具有重要的意义。

生物转化技术应用于药物合成已成为近年来极为活跃的研究领域之一^[6]。许多研究表明,悬浮培养的植物细胞具有酯化、氧化、糖基化、甲基化和乙酰化等多种生物转化能力,其实质是一种酶的催化反应^[7]。至今已有许多研究涉及利用悬浮培养细胞、固定化植物细胞或其分泌的酶进行活性成分的转化合成^[8-19]。但利用植物细胞悬浮培养生物转化合成天麻素的研究却极少见报道,本文报道紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化外源对羟基苯甲醛生成天麻素。

1 材料与方法

1.1 植物细胞

将紫花曼陀罗嫩茎在 MS (Murashige T, Shoog F, 1962) 培养基上于 23℃ 下暗中诱导产生愈伤组织。MS 培养基附加 0.2mg/L 2, 4-D, 0.2mg/L 6-BA, 30.0g/L 蔗糖和 8.0g/L 琼脂, 初始 pH 值为 5.8, 并经 121℃, 灭菌 25min。诱导产生的愈伤组织在 LS (Linsmaier & Skoog, 1965) 固体培养基上继代培养, 每 2 周更换新鲜培养基。LS 培养基附加 2.0mg/L 2, 4-D, 30.0g/L 蔗糖和 8.0g/L 琼脂。然后挑选培养 6 周疏松的愈伤组织作为起始的液体培养细胞, 为了获得稳定的悬浮培养细胞, 愈伤组织在 LS 液体培养基上不断继代培养, 每 2 周更换新鲜培养基。培养温度为 23℃, 摇床转速 120r/min。

1.2 生物转化

对羟基苯甲醛和对羟基苯甲醇购自美国的 Sigma 公司, 化学合成的天麻素标样由昆明制药集团提供。外源底物(对羟基苯甲醛)在使用之前先用乙醇配成 20.0mg/mL 的母液。500mL 三角瓶中装入 250mL LS 液体培养基, 培养温度 25℃, 摇床转速 120r/min。悬浮细胞培养 3d 后加入底物继续培养。不加底物的相同培养细胞设为对照。为了在 25L 生物反应器中也能进行有效转化培养, 配制了底物浓度为 100.0mg/mL 的乙醇溶液作母液。在 25L 反应

器中加入 16.0L 液体 LS 培养基和 3500g 新鲜细胞, 培养基中附加 0.2mg/L 2, 4-D, 3.0mg/L 6-BA, 0.1mg/L 水杨酸和 60.0g/L 蔗糖, 培养温度 23℃。当细胞预培养 5d 后, 加入 120mL 底物溶液, 继续培养 15d。

1.3 细胞生长量的测定

细胞生长用生物量作为指标, 培养一定时间后, 过滤悬浮培养细胞, 所得细胞于 60℃ 下烘至恒重, 按: 生物量(g/L) = 最终细胞干重/培养液体积计算, 取 3 个平行试样的平均值。

1.4 RT-HPLC

将标样溶解于去离子水中配成 1.0mg/mL 的溶液。测定条件: HPLC 分析仪 Agilent 1100 Series, 分析柱 lichrospher RP-18 (7.8mm × 150mm, Waters), 流动相为乙腈:水 = 10/90, 流速 1.0mL/min; 检测器为 Hitachi Model L-400 UV Detector/OD_{220nm}; 进样量: 5 μ L; 保留时间: 20min。天麻素的质量按方程: $Y = 2E + 09X + 135\ 029$ ($R^2 = 0.996$) 计算, 其中, Y 代表天麻素峰面积, X 代表天麻素的毫克数。对羟基苯甲醛的质量按方程: $Y = 5E + 09X - 989\ 287$ ($R^2 = 0.994$) 计算, 其中, Y 代表对羟基苯甲醛峰面积, X 代表对羟基苯甲醛的毫克数。对羟基苯甲醛的糖基化率按方程 (%) = m/n 计算, m 为所得天麻素的摩尔数(mol); n 为添加对羟基苯甲醛的摩尔数(mol)。

1.5 结构鉴定方法

MS 用 VG-Autospec-3000 质谱仪测定, ¹H NMR 谱用 Bruker AM-400 型核磁共振仪测定(溶剂 CD₃OD), ¹³C NMR 谱用 Bruker AM-100 型核磁共振仪测定(溶剂 CD₃OD) 旋光用 JASCO-20 旋光测定。

1.6 转化产物的提取、分离与纯化

1.6.1 生物转化合成天麻素的分离: 500mL 发酵液(含天麻素 358mg) 经三氯甲烷(1:1) 萃取 5 次, 去除对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛, 水层用正丁醇(1:1) 萃取 5 次, 合并萃取液并减压浓缩成膏状物(含天麻素 314mg), 然后进行硅胶(GF-254, 160~200 目) 柱层析(Φ 5cm × 50cm) 分离, 先用氯仿洗脱, 再用乙酸乙酯-苯(1:8) 继续洗脱前体物, 之后用甲醇-乙酸乙酯(1:9) 洗脱, 收集含天麻素部分, 减压浓缩得天麻素粗品(含天麻素 276mg)。该粗品先经 RP-18 柱以甲醇-水梯度洗脱(10%、20%、40%、60% 和 100% 甲醇), 收集 10% 甲醇洗脱部分并减压浓缩(含天麻素 232mg), 再过 2 次 Sephadex LH-20 柱(氯仿-水 = 1:1 和甲醇-水 = 1:1 洗脱) 后, 收集甲醇-水冲洗部分, 减

压浓缩得到残渣 224mg(含天麻素 213mg)溶于水后进一步用 RT-HPLC(RP18, 10 μ m, 19mm \times 150mm)分离,得到 198mg 纯品天麻素用于 ^1H NMR 谱、 ^{13}C NMR、MS 质谱及旋光测定。

1.6.2 转化中间产物对羟基苯甲醇的分离 转化中间产物对羟基苯甲醇的分离参照文献进行[20],结构鉴定方法参照天麻素。

2 结果与讨论

2.1 紫花曼陀罗悬浮培养细胞对外源对羟基苯甲醛的转化

将悬浮培养细胞和 10mL 底物(200mg)加入到含有 250mL LS 液体培养基的 500mL 三角瓶中进行

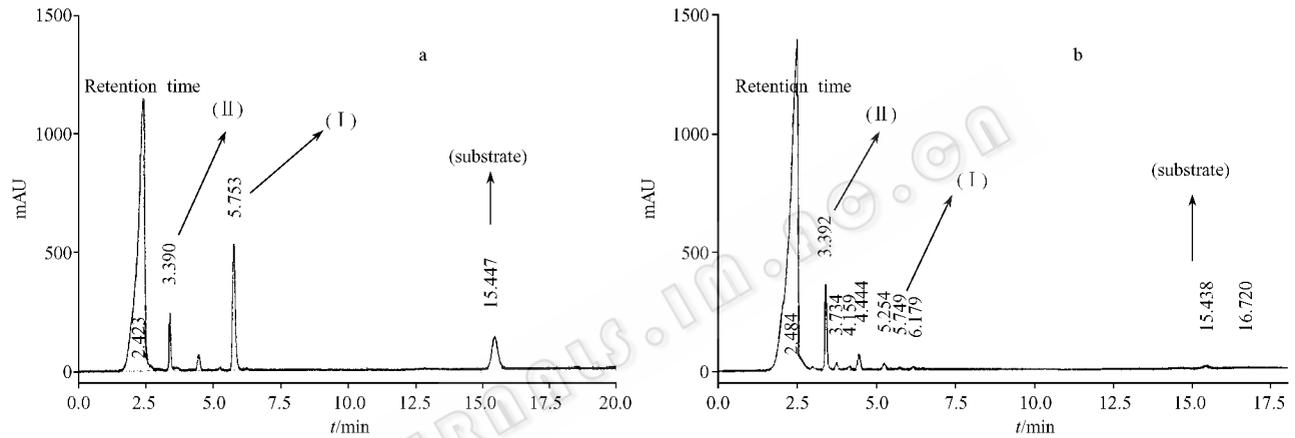


图1 紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化对羟基苯甲醛的 TR-HPLC 分析

Fig.1 RT-HPLC chromatogram analysis for biotransformation of exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde by *D. tatula* L. cell suspension cultures

3.39min shows compounds (II); 15.44min shows *p*-hydroxybenzaldehyde and 5.75min shows compounds (I).

峰(I): 对羟基苯甲醇, $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, ^1H NMR (CD_3OD , 400MHz): 4.46 (2H, s), 6.75 (2H, dd, $J = 2.8, 9.29$), 7.16 (2H, d, $J = 13.24$); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD): 65.1, 157.8, 116.0, 129.8, 133.4; EIMS m/z (%): 124(9), 107(100), 95(12), 77(27)。 EIMS m/z (%): 124(9), 107(100), 95(12), 77(27)。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 的数据与冯孝章等(1979)的分析结果一致^[21]。

峰(II): 天麻素, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7$, ^1H NMR (CD_3OD , 400MHz): 7.26 (d, $J = 8.6$) $\text{H}_{3,5}$, 7.06 (d, $J = 8.6$) $\text{H}_{2,6}$, 4.89 (d, $J = 9.7$, H-1'), 4.52 (2H, s), 3.89 (dd, $J = 1.9, 12.0$, H-6'), 3.69 (dd, $J = 4.9, 12.0$, H-6'), 3.29 ~ 3.45 (4H, H-2' ~ H-5') or (m, 4H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD): 136.6 (C1), 129.4 (C2, 6), 117.7 (C3, 5), 158.4 (C4), 64.8 (C7), 102.4 (

悬浮培养。LS 培养基附加 0.2mg/L 2,4-D, 0.1mg/L 水杨酸和 30.0g/L 蔗糖。对照为不含底物的悬浮培养细胞。培养温度 23 $^\circ\text{C}$, 摇床转速 120r/min, 培养 15d。15d 后过滤培养物并用少量蒸馏水冲洗 3 次, 合并滤液, 再用 0.45 μm 的滤膜过滤用于 RT-HPLC 的分析(结果见图 1)。图 1 显示了不同阶段的转化效果。图 1a 中底物下降了 69%, 图 1b 中底物下降了 91.3%。对发酵过程的监测发现, 第 4 天检测到了与标准品对羟基苯甲醇相对应的峰(I), 而第 10 天检测到了与标准品天麻素相对应的峰(II)。经提取分离纯化和相应的理化性质与光谱数据分析表明, 峰(I)为对羟基苯甲醛, 峰(II)为天麻素, 均为对羟基苯甲醛的衍生物。

C-1'), 74.9 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.3 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.5 (C-6')。 FAB⁻ MS m/z : 285 [M - H]⁻, 377 [M + Gly - H]⁻, 469 [M + 2Gly - H]⁻, 561 [M + 3Gly - H]⁻, $[\alpha]_D^{25} - 76.9$ (0.4g/100mL 水溶液) 也与冯孝章等(1979)的分析结果一致^[21]。

以上结果表明, 紫花曼陀罗悬浮培养细胞能够将对羟基苯甲醛转化生成天麻素, 其可能的途径如图 2 所示。

2.2 紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化对羟基苯甲醛的时间进程

由于培养细胞中葡萄糖基转移酶的活性随细胞生长阶段及其他一些环境因素变化很大, 因而对天麻素的合成也有较大影响。据文献 7 报道, 离体培养的植物细胞往往在指数生长期其葡萄糖基转移酶的活性最高, 此时加入特定的外源底物转化成相应的 β -D-葡萄糖苷的效率最高。为了揭示紫花曼陀罗

悬浮培养细胞糖基化外源对羟基苯甲醛的时间进程 将 5mL 底物(100mg)和 250mL 预培养 4d 的细胞培养物一起加入到 500mL 的三角瓶中进行培养转化 温度 23℃ 摇床转速 120r/min。取不同培养时间的细胞培养物进行天麻素的 RT-HPLC 分析 结果见图 3 所示。由图 3 可以看出 培养到 4d 时 天麻素

尚未检测到 当培养 12d 以后 其含量快速增加 16d 后达到了最高值 此时 对羟基苯甲醛的糖基化率达到 87.75%。说明葡萄糖基转移酶活性在细胞培养 4d 后逐渐增加 16d 后最高 从而使天麻素合成量大幅度上升。

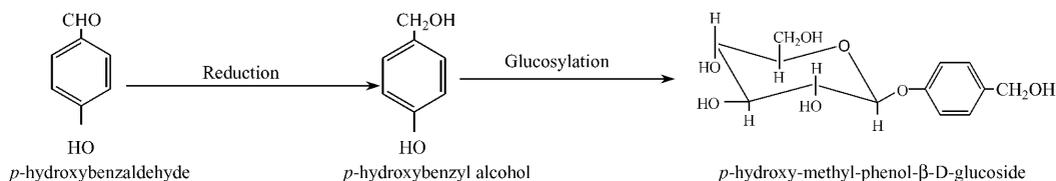


图 2 紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化对羟基苯甲醛生成天麻素的可能途径

Fig.2 Possible pathway of biotransformation for gastrodin from exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde using *D. tatula* L. cell suspension cultures

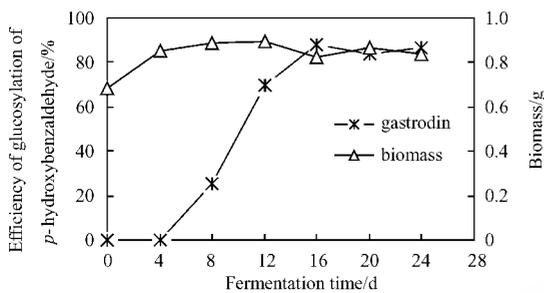


图 3 紫花曼陀罗悬浮培养细胞糖基化外源对羟基苯甲醛的时间进程

Fig.3 Time-course of glucosylation of exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde by cell suspension cultures of *D. tatula* L.

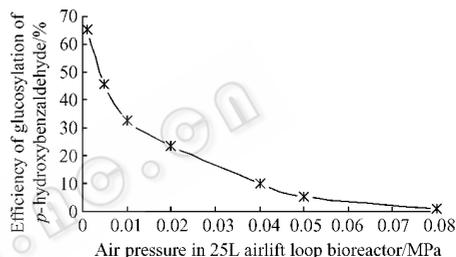


图 4 罐内压力对紫花曼陀罗悬浮培养细胞糖基化对羟基苯甲醛的影响

Fig.4 Effect of pressure in bioreactor on the efficiency of glucosylation of *p*-hydroxybenzaldehyde by cell suspension cultures of *D. tatula* L.

2.3 罐内压力对紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化对羟基苯甲醛的影响

为实现曼陀罗细胞在大规模发酵条件下能进行天麻素的转化合成 并取得相关的工艺参数和培养条件 研究了紫花曼陀罗悬浮培养细胞在 25L 发酵罐内的发酵转化。结果表明 细胞质量、培养基组成以及发酵罐内压力对天麻素的转化合成影响较大。发酵罐内压力主要由通气量决定 而通气量的大小反映了气流对细胞的剪切力大小。由于植物细胞的个体大 细胞壁僵硬和具有大的液泡 使其对剪切力敏感 (Payne G F *et al* ,1991)。因此 研究剪切力对细胞培养的影响是一个重要问题。从图 4 可知 随着罐内压力的增大 细胞糖基化对羟基苯甲醛的效率也随之下降。这说明流体剪切力过大会影响细胞分泌葡萄糖基转移酶 导致天麻素合成效率降低。

2.4 水杨酸对紫花曼陀罗细胞悬浮培养转化对羟基苯甲醛的影响

水杨酸(salicylic acid, SA)是一种植物信号分

子 在植物抵御外界侵扰过程中起很重要的作用 内源水杨酸可以诱导与抗病蛋白有关基因的表达 而外源水杨酸则可以诱导防御反应的产生 使次生代谢产物合成增加^[22-23]。

从表 1 的结果看 含有水杨酸的培养基能使细胞转化外源对羟基苯甲醛合成天麻素的效率显著提高。这可能是外源对羟基苯甲醛对植物细胞有一定的毒害作用 而外源水杨酸的加入诱导了植物细胞

表 1 水杨酸对紫花曼陀罗细胞悬浮培养转化对羟基苯甲醛的影响

Table 1 Effect of salicylic acid on the efficiency of glucosylation of *p*-hydroxybenzaldehyde in *D. tatula* L. cell suspension cultures

Treatments	Efficiency of glucosylation of <i>p</i> -hydroxybenzaldehyde/%
LS + 3% sucrose + 0.1mg/L salicylic acid	96.5 ± 1.47
LS + 3% sucrose	46.5 ± 2.89
LS + 6% sucrose + 0.1mg/L salicylic acid	97.7 ± 1.85
LS + 6% sucrose	30.8 ± 3.28

Note : each treatment contained 100g fresh cells and 150mg exogenous *p*-hydroxybenzaldehyde in 250mL LS liquid medium supplemented with

防御反应,使植物细胞的糖基化反应加快,从而提高天麻素的合成效率,其诱导机制尚待进一步研究。

一般天麻中含有大量的天麻素,而其它植物很难大量积累天麻素。本研究表明利用紫花曼陀罗悬浮培养细胞能将外源对羟基苯甲醛转化生成天麻素,而添加水杨酸能显著提高天麻素合成效率。在500mL摇瓶中,装入250mL LS液体培养基(附加6%蔗糖,0.1mg/L水杨酸和0.221mg/L 2,4-D)和100g新鲜细胞,培养4d后,加入150mg外源对羟基苯甲醛进行转化培养,控制温度25℃,摇床转速120 r/min,15d后最高糖基化率为97.7%。而在25L气升式发酵罐中,装入16L LS液体培养基(附加0.2mg/L 2,4-D,3.0mg/L 6-BA,0.1mg/L水杨酸和60.0g/L蔗糖)和3500g新鲜细胞,培养5d后,加入12.0g外源对羟基苯甲醛进行转化培养,控制温度23℃,罐内压力0.001MPa,15d后最高糖基化率为65.3%,并提出了紫花曼陀罗悬浮培养细胞转化外源对羟基苯甲醛生成天麻素的可能途径。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhao YK, Cao QE, Xiang YQ, Hu ZD. Identification and determination of active components in *Gastrodia elata* Bl. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1999, **849**: 277 - 283
- [2] Heihachiro T, Itiro Y, Kazuo Y, Il HK. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem Pharm Bull*, 1981, **29**: 55 - 62
- [3] Sun XF(孙晓芳), Wang W(王巍), Wang DQ(王丹巧), Du GY(杜贵友). Research progress of neuroprotective mechanisms of *Gastrodia elata* and its preparation. *China Journal of Chinese Material Medica* (中国中药杂志), 2004, **29**: 292 - 295
- [4] Zhou J(周俊), Yang YB(杨雁宾), Yang CR(杨崇仁). Chemical study on Gastrodin and related compounds, separation and identification of chemical constituents of *Gastrodia elata* Bl. *Acta Chemica Sinica* (化学学报), 1979, **37**: 183 - 189
- [5] Zhou J(周俊), Yang YB(杨雁宾), Yang CR(杨崇仁). Chemical study on Gastrodin and related compounds, the syntheses of gastrodin and related compounds. *Acta Chemica Sinica* (化学学报), 1980, **38**: 162 - 165
- [6] Achmad S, Evi R, Gunawan I, Alistair LW. Biotransformation of O- and p-aminobenzoic acids and N-acetyl p-aminobenzoic acid by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*. *Phytochemistry*, 1999, **51**: 615 - 620
- [7] Takayuki S, Toshifumi H. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry*, 1990, **8**: 2393 - 2406
- [8] Mamoru T, Yasuko U, Mitsuko O, Shigeo T. Glucosylation of phenolic compounds by plant cell cultures. *Phytochemistry*, 1988, **3**: 809 - 813
- [9] Yokoyama M. Industrial application of biotransformation using plant cell cultures. DiCosmo F, Misawa M. *Plant Cell Culture Secondary Metabolism: Toward Industrial Application*. Boca Raton: CRC Press 1995, pp. 79
- [10] Furuya T, Asada Y, Mizobata S. Biotransformation of p-aminobenzoic acid by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, 1998, **49**: 109 - 111
- [11] Vanek T, Valterova I, Vaisart T. Biotransformation of (S)(-) and (R)(+)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. *Phytochemistry*, 1999, **50**: 1347 - 1351
- [12] Sathuluri RR, Gokare AR. Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Journal of Biotechnology*, 2000, **76**: 137 - 146
- [13] Chai W, Hiroki H, Jumpei S, Horiuchi CA. Biotransformation of (+) and (-)-camphorquinones by plant cultured cells. *Phytochemistry*, 2001, **57**: 669 - 673
- [14] Yoshitomo M, Chai W, Etsuko E, Jumpei S, Hiroki H, Horiuchi CA. Oxidative cleavage of the C-C bond of 3,6-dialkylcyclohexane-1,2-diones by cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, 2002, **61**: 669 - 673
- [15] Hu YM(胡益明), Gan FY(甘烦远), Lu CH(鲁春华) et al. Production of taxol and related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2003, **45**: 373 - 378
- [16] Zaharia LI, Gai YZ, Ken MN, Stephen JA, Suzanne RA. Oxidation of 8'-hydroxy abscisic acid in Black Mexican Sweet maize cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 2004, **65**: 3199 - 3209
- [17] Marica LH, Dan I, Tomá V, Irena V, Högberg HE, Kristina S. Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *Journal of Biotechnology*, 2004, **107**: 173 - 184
- [18] Zhao DX, Fu CX, Han YS, Lu DP. Effects of elicitation on jaceosidin and hispidulin production in cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 739 - 745
- [19] Cheng XY, Zhou HY, Cui X, Ni W, Liu CZ. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*, 2006, **121**: 253 - 260
- [20] Dai JG, Gong Z, Zhu DM et al. Biotransformation of gastrodin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Acta Botanica Sinica*, 2002, **44**(3): 377 - 378
- [21] Feng XZ(冯孝章), Chen YW(陈玉武), Yang JS(杨峻山). Studies on constituents of tian-ma (*Gastrodia elata* Bl.). *Acta Chemica Sinica* (化学学报), 1979, **37**: 175 - 181
- [22] Durner J, Klessig DF. Salicylic acids is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 28482 - 28502
- [23] Dat JF, Christine H, Foyer CH, Scott IM. Effect of salicylic acid oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J Plant Physiol*, 2000, **156**: 659 - 665