文章编号: 1004-4353(2015)01-0079-06

党参内生菌转化人参根总皂苷为稀有人参皂苷 F2 和 C-K 的研究

崔磊[1], 金英今[2], 尹成日[1,2*]
(1. 延边大学理学院 化学系; 2. 延边大学分析测试中心: 吉林 延吉 133002)

摘要: 利用组织分离法从党参中分离得到 32 种内生菌,其中菌株 D19 转化人参主皂苷为稀有皂苷的活性最强. 在最佳发酵条件(水培养基,pH 5.0)下,稀有人参皂苷 F2、C-K 和 Rh1 的最高产率分别为 30%、17%和 8%. 根据单体皂苷转化实验确定了稀有人参皂苷的来源和人参皂苷 Rb1 的转化路径,并通过 16S rDNA 序列分析,鉴定内生菌 D19 为藤黄色杆菌属(*Dyella*).

关键词: 党参; 稀有人参皂苷; 内生菌; 生物转化
中图分类号: Q815 **文献标识码:** A

Study on biotransformation of ginseng root saponins to minor ginsenosides F2 and C-K by endophyte from *Codonopsis pilosula*

CUI Lei[1], JIN Yingjin[2], YIN Chengri[1,2*]
(1. *Department of Chemistry*, *College of Science*; 2. *Analytical and Testing Center*: *Yanbian University*, *Yanji* 133002, *China*)

Abstract: A total of 32 kinds of endophytes form *Codonopsis pilosula* were isolated through the method of organizational separation. Among these endophytes, strains D19 showed the strongest activities to convert major ginsenosides to minor ginsenosides. When in the medium of H_2O, pH of 5.0, the maximum yield of minor ginsenosides F2, C-K and Rh1 reached to 30%, 17% and 8%, respectively. The source of minor ginsenosides and the transformation pathway of ginsenoside Rb1 were confirmed according to the saponin monomer conversion experiments. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences indicated that the strain D19 belongs to the genus *Dyella*.

Key words: *Codonopsis pilosula*; minor ginsenosides; endophytes; biotransformation

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科人参属植物的根,其成分有人参皂苷、多糖、黄酮类化合物、挥发性油等[1],其中人参皂苷为人参属植物的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗衰老、软化血管、保肝等作用[2-3]. 研究表明[4],由于稀有人参皂苷(Rh1、Rh2、F2、C-K 等)具有尺寸小、生物利用度高、细胞膜渗透性强等特点,因此比人参主皂苷(Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg1 等)具有更好的药理活性. 然而,稀有人参皂苷在天然人参属植物中的含量极少,因此将人参主皂苷转化为稀有人参皂苷的研究具有重要的意义[5]. 近些年,以人参主皂苷为原料进行生物转化的研究取得了许多有意义的成果[6-8],其方法主要有化学法(酸水解、碱水解、Smith 降解)和生物法(酶或微生物),其中生物转化法具有特异性高、成本低、反应条件温和、选择性高、环境友好的优点[9-10],被认为是获取稀有人

收稿日期: 2014-12-07 * **通信作者:** 尹成日(1963—),男,博士,教授,研究方向为天然产物生物转化.
基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目(2015—2017);国家自然科学基金资助项目(20862017)

参皂苷的最有效的方法.

植物内生菌(endophytes)是指存活于健康植物组织内部,而又不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群,主要包括真菌、细菌和放线菌[11].近年来,内生菌在生物转化上的应用已引起了人们的广泛关注,并已经应用于一些天然化合物的生物合成,如黄烷、四氢呋喃木酚素和黄芪皂苷[12-14].本文首次从含有三萜类成分的党参中分离得到具有人参皂苷生物转化活性的内生菌,并探讨了其转化率及转化路径.

1 材料与方法

1.1 试剂

人参皂苷从成都思科华生物技术有限公司购买,党参从延吉市参茸市场购买,薄层层析板 Silica gel 60-F254 从德国 Merck 公司购买,R_2A 琼脂培养基从 Sigma 公司购买.化学试剂均为分析纯.

1.2 仪器

实验仪器有:立式电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-30KB,上海申安医疗器械);生物安全柜(BSC-1300ⅡA/B3);pH 计(雷磁 PHS-3C 型);PCR 仪(TC-512,英国 Techne 公司);光学显微镜(BX61,上海比目仪器公司);电子天平(JA5003 型,上海良平仪器仪表有限公司);高速离心机(MCD-2000 HSIANGTAI);液相色谱仪(LC-6A,日本岛津);振荡培养箱(HZQ-C,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);高效液相色谱仪(Agilent 1100,美国 Agilent 公司).

1.3 培养基

马铃薯琼脂培养基(PDA 培养基):去皮马铃薯 200~300 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,去离子水 1 L.将去皮马铃薯切成小块,加 1 L 水煮沸,沸腾 30 min 后,用纱布过滤,补足 1 L 水,加入葡萄糖和琼脂粉,搅拌溶解后,分装灭菌.

液体培养基(LL 培养基):NH_4Cl 0.5 g,K_2HPO_4 1.0 g,KH_2PO_4 0.5 g,$MgSO_4$ 0.25 g,酵母粉 1.0 g,蒸馏水 1 L,pH 7.0.

1.4 党参内生菌的分离筛选

参照 Surette 等[15]描述的方法,将新鲜无损的党参在 48 h 内进行内生菌分离.消毒前,将党参在流动的自来水下充分冲洗,然后按以下顺序进行表面消毒:70%(体积分数)乙醇 1 min,5%(体积分数)次氯酸钠 5~10 min,70%(体积分数)乙醇 1 min,无菌水 1 min,洗涤 4 次.消毒后的样本用干燥无菌滤纸擦干,然后用无菌手术刀去除外部组织,切成 0.5 cm×0.5 cm 小段,按压在 PDA 琼脂平板、R2A 琼脂平板和 LB 琼脂平板上,于 30 ℃恒温培养箱中培养 5~7 d.

在培养期间,基于菌落的形态学特征和外貌形态,分离不同菌落,经反复多次得到单一菌株.利用七叶苷显色原理[8],把单一菌株涂在由七叶苷(Esuclin)修饰的 R2A 琼脂(E-R2A)培养基上培养,观察培养基的颜色变化(变黑),筛选出产 β-葡萄糖苷酶的菌株.七叶苷修饰的 R2A 琼脂培养基成分为:R2A 琼脂 15.2 g,七叶苷 1.0 g,柠檬酸铁 0.5 g.

1.5 人参根总皂苷的微生物转化

在 1.5 mL 离心管内加入 270 μL 无菌液体培养基和 30 μL 20 mg/mL 的人参根总皂苷,然后接种 300 μL 产 β-葡萄糖苷酶的菌株培养液;培养 7 d 后,加入 600 μL 饱和正丁醇液终止反应,高速离心后取上清液进行 TLC 和 HPLC 分析,筛选出具有人参皂苷生物转化活性的菌株.

1.6 人参根总皂苷发酵条件的优化

为了得到较高产量的稀有人参皂苷,对生物转化条件进行优化.选取 6 种不同的培养基:水、R2A、PDB、LB、NB、LL,pH 值 7.0,以 20 mg/mL 的人参根总皂苷为底物,30 ℃空气振荡浴中培养 7 d后,加入等体积饱和正丁醇终止反应,离心后用于 TLC 分析,以此确定活性菌株的最适培养基.在最优培养基条件下,对生物转化的 pH 条件进行优化,起始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,后续处理同上.

在最适培养基和 pH 值条件下,利用高效菌株 D19 对人参根总皂苷进行微生物转化,并用 HPLC 分析人参皂苷含量的变化.

1.7 内生菌 D19 对单体皂苷的生物转化

分别以灭菌后的 1 mg/mL 单体人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd 和 Rg1 为底物,于内生菌 D19 的

菌悬液中进行微生物转化实验；在 30 ℃，160 r/min 空气浴恒温振荡器中发酵 7 d，每隔一定时间用饱和正丁醇终止反应，然后进行 TLC 和 HPLC 分析.

1.8　内生菌 D19 的 DNA 提取、PCR 扩增及克隆测序

在光学显微镜下观察内生菌 D19 的微观形态. 采用氯化苄法提取内生菌 D19 基因组总 DNA，先用引物 27F（5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′）和 1492R（5′-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′）进行 PCR 扩增[16]. PCR 反应体系（20 μL）为：dNTPs 2 μL，10×PCR 缓冲液（Mg^{2+}）2 μL，引物各 2 μL，DNA 模板 2 μL，超纯水 10 μL. PCR 扩增程序为：首先在 95 ℃预变性 3 min；然后在 95 ℃变性 30 s，在 56 ℃退火 30 s，在 72 ℃延伸 90 s，进行 30 个循环；最后在 72 ℃延伸 7 min. PCR 产物切胶回收，将目的片段与载体 pMD -18T 连接后转入感受态细胞（JM109），在 LB 平板（含氨苄）上进行蓝白斑筛选；挑取白斑在液体培养基中进行摇菌，然后用 M13 引物（T 载体上的测序引物）进行菌液 PCR，最后送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序.

将测得的基因序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据库进行对比分析（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast），其中相似的序列进行多重匹配排列分析（clustalx 1.83），然后用 Mega 4.0[17]分析软件中的 Neighbor Joining 方法构建系统发育树.

1.9　TLC 法测定人参皂苷

TLC 展开剂为氯仿-甲醇-水（体积比为 10∶5∶1），展开后用 10%硫酸乙醇溶液显色，并与标准品 R_f 值比对，以此初步判断样品中是否有稀有人参皂苷的生成.

1.10　HPLC 法测定人参皂苷

高效液相色谱仪 HP 1100，UV 检测器，色谱柱采用 BDS HYPERSIL C18（250 mm×4.6 mm），检测波长为 203 nm，流速为 1.0 mL/min，柱温 25 ℃，流动相为水（A）-乙腈（B）溶液，梯度洗脱，条件如表 1.

表 1　高效液相色谱梯度洗脱条件

t/min	A（水）/%	B（乙腈）/%
0	77	23
13	77	23
33	54	46
38	32	68
45	32	68
55	0	100
60	0	100
63	77	23

2　结果与讨论

2.1　党参内生菌的分离筛选

从党参中共分离得到 32 种内生菌，筛选出 15 种产 β-葡萄糖苷酶的内生菌，其中内生菌 D19 显示出较好的人参皂苷生物转化活性. 由图 1 可以看出，菌株 D19 菌体呈油状（黄色）、有隆起，为细菌形态特征.

图 1　内生菌 D19 在 PDA 培养基上的生长特性

2.2　发酵条件对人参根总皂苷生物转化的影响

通过人参皂苷活性筛选实验，发现内生菌 D19 能够有效地将人参根总皂苷转化为稀有人参皂苷 F2、C-K 和 Rh1. 为了得到较高产率的稀有人参皂苷，探讨培养基、pH 值对内生菌 D19 转化人参根总皂苷的影响，确定最佳生物反应条件.

由图 2 可知，当水为培养基时内生菌 D19 能有效地将人参根总皂苷中的主皂苷转化为稀有人参皂苷 F2 和 C-K，而培养基为 R2A 和 PDB 时，仍有较多未转化的人参主皂苷 Rb1，因此本文选择水为最适培养基.

由图 3 可知，在最适培养基中，菌株在整个 pH 值范围内对主皂苷 Rb1、Rb2 和 Rc 均有较好的转化能力，在 3.0～7.0 pH 值范围内都能产生稀

有人参皂苷 F2 和 C-K,其中 pH 值为 5.0 时转化效果最好,因此本文选择 pH5.0 为最适 pH 值.

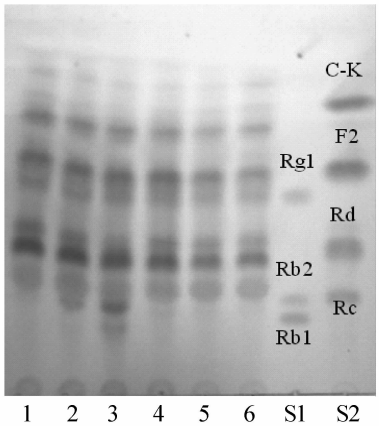

图 2 内生菌 D19 在不同培养基中转化人参根总皂苷的 TLC 图(1 为水;2 为 R2A;3 为 PDB;4 为 LB;5 为 NB;6 为 LL;S1、S2 为标准品)

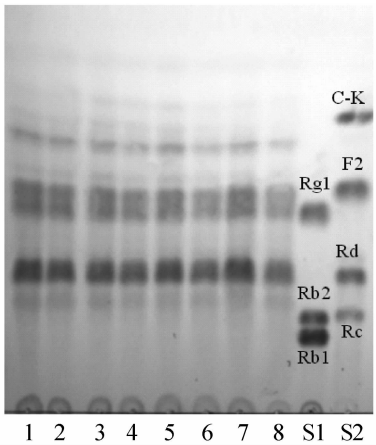

图 3 内生菌 D19 在不同 pH 条件下转化人参根总皂苷的 TLC 图(1 为 3.0;2 为 4.0;3 为 5.0;4 为 6.0;5 为 7.0;6 为 8.0;7 为 9.0;8 为 10.0;S1、S2 为标准品)

2.3 内生菌 D19 对人参根总皂苷的微生物转化

在 100 mL 锥形瓶中加入 60 mL 水和 0.9 g 人参根总皂苷粉末,pH 值为 5.0,经高压蒸气灭菌锅灭菌后,进行生物转化实验. 发酵 10 d 后对发酵液进行 HPLC 分析(图 4). 通过发酵前后人参皂苷含量的变化可知,发酵后 Rb2、Rd、Rg1 和 Re 的含量明显减少,Rb1 几乎完全转化,且稀有人参皂苷 F2、C-K 和 Rh1 的含量均有不同程度的增加. HPLC 分析结果显示,最佳生物反应条件下稀有人参皂苷 F2、C-K 和 Rh1 的最高产率分别为 30%、17%和 8%.

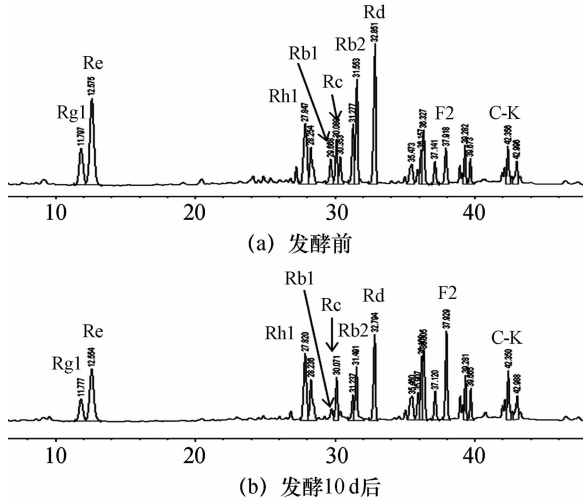

图 4 内生菌 D19 发酵人参根总皂苷的 HPLC 谱图

2.4 内生菌 D19 对单体皂苷的生物转化

为了探明稀有人参皂苷 Rh1、F2 和 C-K 的来源,利用内生菌 D19 分别对人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd 和 Rg1 进行转化实验.

利用内生菌 D19 对人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 进行转化,通过转化前后的 TLC 对比可知(图 5),内生菌 D19 能够将人参皂苷 Rb1 和 Rd 转化为稀有人参皂苷 C-K,还能将人参皂苷 Rb1、Rc 和 Rd 转化为稀有人参皂苷 F2,并在人参皂苷 Rb2 的转化中,生成稀有人参皂苷 C-Y,因此可以确定稀有人参皂苷 F2 和 C-K 是由 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 等人参二醇类皂苷转化产生.

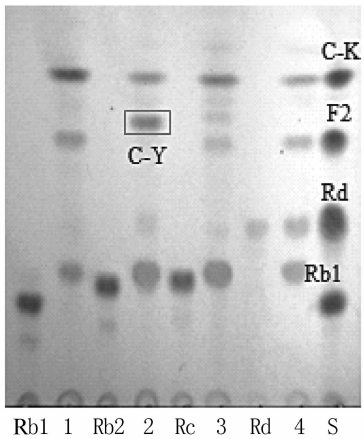

图 5 内生菌 D19 转化二醇类单体皂苷的 TLC 图(底物:1 为 Rb1;2 为 Rb2;3 为 Rc;4 为 Rd;S 为标准品)

利用内生菌 D19 对人参三醇类皂苷 Rg1 进行转化,通过转化前后的 TLC 对比可知(图 6),

内生菌 D19 能够将人参皂苷 Rg1 转化为稀有人参皂苷 Rh1 和 F1，因此可以确定稀有人参皂苷 Rh1 是由 Rg1 等人参三醇类皂苷转化产生.

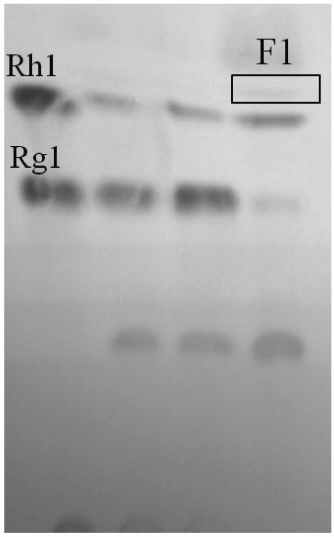

图 6　内生菌 D19 转化三醇类单体皂苷 Rg1 的 TLC 图

（D19 为 Rg1 的内生菌转化产物；S 为标准品）

2.5　内生菌 D19 对单体皂苷 Rb1 的转化路径

以人参皂苷 Rb1 为例，探讨内生菌 D19 对单体皂苷的转化路径. 微生物转化实验过程中，每隔一定时间取样，进行 HPLC 分析，并利用人参皂苷峰面积变化与发酵时间的关系作图（图 7）. 从图 7 可以看出：反应开始后，底物人参皂苷 Rb1 的含量急剧下降，直到 3 h 后被完全水解；人参皂苷 Rd 的含量随 Rb1 的减少而逐渐增多，4 h 后随 F2 的急剧上升而迅速下降，直至完全消失；人参皂苷 F2 的含量在 Rd 产生后逐渐增加，在 Rd 趋于消失时达到最大值，后随 C-K 的产生而逐渐下降；人参皂苷 C-K 在 24 h 后生成，含量随 F2 的下降而增加，直到反应结束. 因此，可以推测内生菌 D19 对单体皂苷 Rb1 的转化路径为 Rb1→Rd→F2→C-K（图 8）.

2.6　内生菌 D19 的鉴定

由图 9 可以看出，内生菌 D19 为大小均匀、规则的杆形细菌. 内生菌 D19 通过 16S rDNA 提取，PCR 扩增，质粒重组等一系列操作后，得到的凝胶电泳图（图 10）中显示 DNA 的片段大小约为 1 600 bp. 通过与 GenBank 中核酸数据进行对比分析，找到与内生菌 D19 相似的物种基因，然后利用 Clustal X 进行多重序列分析，使用 Mega 4.0 软件进行邻接法聚类分析，最终得到内生菌 D19 的系统发育树（图 11）. 以上分析表明，内生菌 D19 归属于藤黄色杆菌属（*Dyella*），与 *Dyella ginsengsoil strain* LA-4 相似性达到 97%.

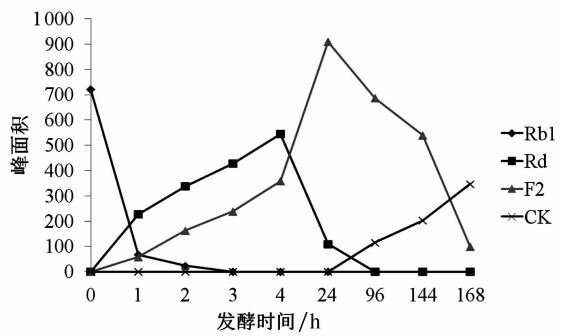

图 7　内生菌 D19 转化人参皂苷 Rb1 过程中峰面积的变化与发酵时间的关系图

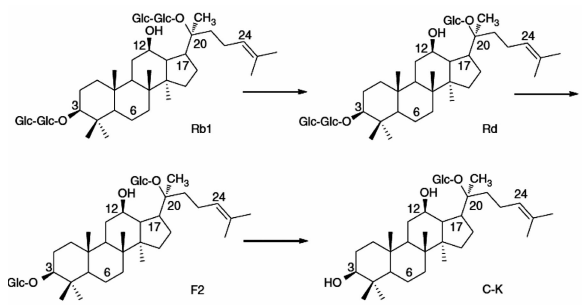

图 8　内生菌 D19 转化人参皂苷 Rb1 的转化路径

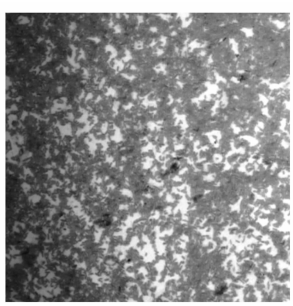

图 9　内生菌 D19 在光学显微镜下的微观形态

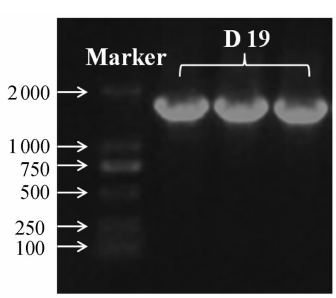

图 10　内生菌 D19 重组质粒 DNA 的凝胶电泳图

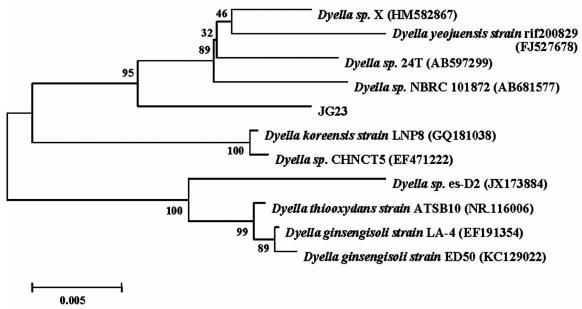

图 11 内生菌 D19 的无根系统发育树

3 结论

从党参中分离得到能够将人参根总皂苷中的 Rb1、Rb2、Rc、Rd 和 Rg1 等转化为稀有人参皂苷 F2、C-K 和 Rh1 的内生菌 D19,在最佳转化条件(水为培养基、pH 5.0)下 F2、C-K 和 Rh1 的最高产率分别为 30%、17%和 8%.单体皂苷的转化结果表明,稀有人参皂苷 F2 和 C-K 是由 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 等人参二醇类皂苷转化,而稀有人参皂苷 Rh1 是由 Rg1 等人参三醇类皂苷转化产生.菌株 D19 对人参皂苷 Rb1 的转化路径为 Rb1→Rd→F2→C-K.通过 16S rDNA 序列分析,鉴定内生菌 D19 为藤黄色杆菌属(*Dyella*).

参考文献:

[1] Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytomedicine-ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009,16(19):2475-2484.

[2] Wang L, Liu Q M, Sung B H, et al. Bioconversion of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc and Rd by novel β-glucosidase hydrolyzing outer 3-O glycoside from *Sphingomonas* sp. 2F2: Cloning, expression, and enzyme characterization[J]. Journal of Biotechnology, 2011,156(2):125-133.

[3] Chen Y, Xu Y, Zhu Y, et al. Anti-cancer effects of ginsenoside compound k on pediatric acute myeloid leukemia cells[J]. Cancer Cell International, 2013, 13(1):24.

[4] Xu Q F, Fang X L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from Panax notoginseng in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003,84(2/3):187-192.

[5] Shin K C, Oh D K. Characterization of a novel recombinant β-glucosidase from Sphingopyxis alaskensis that specifically hydrolyzes the outer glucoseat the C-3 position in protopanaxadiol-type ginsenosides [J]. Journal of Biotechnology, 2014,172:30-37.

[6] 白龙律,臧蕴霞,尹成日.微生物转化人参皂苷 Rb1 为 Rg3 的研究[J].延边大学学报:自然科学版,2009,35(2):141-144.

[7] 崔磊,金护定,尹成日.人参总皂苷的发酵及其产物的抗癌活性研究[J].延边大学学报:自然科学版,2014,40(4):314-319.

[8] Wu L P, Jin Y, Yin C R, et al. Co-transformation of Panax major ginsenosides Rb1 and Rg1 to minor ginsenosides C-K and F1 by *Cladosporium cladosporioides*[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2012,39(4):521-527.

[9] Yang X B, Hou J, Liu D, et al. Biotransformation of isoimperatorin by *Cunninghamella blakesleana* AS 3.970[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013,88:1-6.

[10] Lü X, Liu D, Hou J, et al. Biotransformation of imperatorin by *Penicillium janthinellum*. Anti-osteoporosis activities of its metabolites[J]. Food Chemistry, 2013,138(4):2260-2266.

[11] 李端,郭利伟,郭伟云,等.抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物的研究[J].安徽农业科学,2009,37(16):7508-7509.

[12] Agusta A, Maehara S, Ohashi K, et al. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant [J]. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 2005,53 (12):1565-1569.

[13] Verza M, Arakawa N S, Lopes N P, et al. Biotransformation of a tetrahydrofuran lignin by the endophytic fungus *Phomopsis* sp.[J]. Journal of the Brazilian Chemistry Society, 2009,20(1):195-200.

[14] Yao M L, Liu J Z, Jin S, et al. A novel biotransformation of astragalosides to astragaloside IV with the deacetylation of fungal endophyte *Penicillium canescens*[J]. Process Biochemistry, 2014,49 (5):807-812.

[15] Surette M A, Sturz A V, Lada R R, et al. Bacterial endophytes in processing carrots (Daucus carota L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth[J]. Plant Soil, 2003,253(2):381-390.

[16] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012,62(3):716-721.

[17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(8):1596-1599.