

文章编号: 1004-4353(2019)02-0122-06

利用透性化黑曲霉细胞制备稀有人参皂苷 Rh₁ 的方法研究

耿瑜¹, 蒋明星², 熊正红², 文孟良^{1*}

(1. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214)

摘要: 以三七的常量三醇组人参皂苷(含 Re、Rg₁、R₁)为底物,研究了不同通透处理工艺对黑曲霉细胞转化人参皂苷 Rh₁ 的影响. 实验结果表明:当通透剂为 3% EDTA(质量分数),透性化处理时间为 30 min (28 ℃),超声处理时间为 15 min 时,黑曲霉细胞的通透性最佳;该条件下得到的黑曲霉细胞与三醇组人参皂苷底物反应 30 min (45 ℃)时,Rh₁ 的产量达到最佳.

关键词: 黑曲霉; 透性化; 稀有人参皂苷 Rh₁

中图分类号: R28 **文献标识码:** A

Study on preparation of minor ginsenoside Rh₁ from permeable *Aspergillus niger* cells

GENG Yu¹, JIANG Mingxing², XIONG Zhenghong², WEN Mengliang^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China;
2. College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China)

Abstract: The permeation treatment of *Aspergillus niger* cells producing ginsenoside Rh₁ by microbial transformation was studied, with constant protopanaxatriol of Panax notoginseng (including Re, Rg₁ and R₁) used as the substrates. The results showed that the permeability of *Aspergillus niger* cells was the best when the penetrating agent was 3% EDTA (mass fraction), the permeation time was 30 minutes (28 ℃) and the ultrasonic treatment was 15 minutes. Under this condition, the Rh₁ production was optimum when the *Aspergillus niger* cells reacted with the protopanaxatriol for 30 minutes (45 ℃).

Keywords: *Aspergillus niger*; permeabilization; minor ginsenoside Rh₁

0 引言

三七人参皂苷是三七的主要药效成分之一,包括 Rb₁、Rb₂、Rg₁、R₁ 等常量人参皂苷组分^[1-2]. 研究表明,常量人参皂苷在人体内代谢后,其产生的稀有人参皂苷在抗炎、抗肿瘤、抗氧化以及提高免疫方面具有显著的疗效^[3-7]. 目前,稀有人参皂苷 Rh₁ 主要是通过合成和转化的方法来获取^[8],其中微生物转化法具有反应体系稳定、菌种生长

迅速、转化周期短且无需分离纯化酶液等优点,受到众多研究者的青睐^[9]. 目前,我国利用微生物转化反应生产稀有人参皂苷的研究仍处于初期阶段^[3],相关研究多集中于把分离纯化得到的单一常量人参皂苷转化为另一种稀有人参皂苷. 例如,利用 *Mucilaginibacter* sp. (鞘氨醇单胞菌) 和 *Microbacterium esteraromaticum* (酯香微杆菌) 的 β -glucosidase 重组酶将 Re、Rg₁ 转化为 Rg₂ 和

收稿日期: 2019 - 02 - 27

* 通信作者: 文孟良(1965—),男,博士,教授,研究方向为微生物次生代谢产物.

Rh₁^[10-11];利用 *Aspergillus niger*(黑曲霉菌)中的 β -glucosidase 将 Rf 转化为 Rh₁^[12]. 本文以三七的三醇组常量人参皂苷(含 Re、Rg₁、R₁)为底物,以透性化处理的黑曲霉细胞为转化菌株,以此探索获取稀有人参皂苷 Rh₁ 的微生物转化法.

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂和培养基

黑曲霉菌,由实验室分离并保存. Span-20, 生工生物工程上海股份有限公司;四氯化碳、吐温-60、吐温-80,天津风船化学试剂科技有限公司;EDTA,BioFRoxx;戊二醛,天津盛奥化学试剂有限公司;乙醇,广东光华科技股份有限公司;液氮,普诺斯商贸有限公司;三醇组人参皂苷(含 Re、Rg₁、R₁,其中 Rg₁ 含量大于 50%,Re 和 R₁ 含量小于 10%),云南西草生物科技有限公司;Rh₁ 标样,云南与诺生物工程有限责任公司;硅胶板,青岛海洋化工厂分厂. PDB 黑曲霉菌丝体培养基(1 L): 20 g 葡萄糖,200 g 马铃薯,自然 pH. PDA 黑曲霉孢子培养基(1 L): 20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,200 g 马铃薯,自然 pH. 液体诱导培养基(1 L): 1 g 酵母粉,1 g 胰蛋白胨,2 g 三醇组人参皂苷(Rg₁ 含量大于 50%、Re 和 R₁ 含量小于 10%),自然 pH.

1.2 仪器

电子天平,Denver Instrument TP-214;恒温培养振荡器,Eppendorf Thermonixer;恒温水浴

锅,北京长风仪器仪表公司;离心机,Eppendorf Centrifuge 5418;超声破碎仪,Kudos Ultrasonic;摇床,Shiping Rocking Incubator;旋转蒸发仪,EYELA OSB-2100;高效液相色谱仪,Agilent 1100.

1.3 实验方法

1.3.1 种子液的制备与诱导培养 在三角瓶(250 mL)中加入 50 mL PDB 培养基,接种黑曲霉孢子,在 28℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床培养 2 d,制得黑曲霉菌丝体,作为种子液待用. 在三角瓶(250 mL)中加入 50 mL 液体诱导培养基,接种 10%的种子液,在 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床培养 4 d 后,转至室温静置培养 7 d 直至在培养基中能够检测到有稀有人参皂苷 Rh₁ 产生.

1.3.2 透性化细胞的制备 1)化学法. 将湿重 1 g 的黑曲霉细胞置于 2 mL 离心管中,然后加入表 1 中的透性化试剂 1 mL. 在 28℃、50 r·min⁻¹ 条件下振荡处理 30 min,离心 5 min(12 000 r·min⁻¹),以去除透性化试剂. 用 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠+0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠,pH=8.0)洗涤沉淀细胞,离心 5 min(12 000 r·min⁻¹),最终收集的菌体即为通透性细胞.

2)物理法. 冻融处理:将湿重 1 g 的黑曲霉细胞置于 2 mL 离心管中,使用冻融(液氮速冻、45℃水浴溶解)的方法处理细胞,离心 5 min(12 000 r·min⁻¹)后收集得到的菌体即为通透性细胞. 超声

表 1 不同方法选用的试剂及其用量

编号	方法 ^[13-15]	透性化试剂(体积分数)	试剂用量/mL
1	有机溶剂法	2%甲苯	1
2	有机溶剂法	2%戊二醛	1
3	有机溶剂法	2%四氯化碳	1
4	有机溶剂法	10%乙醇	1
5	有机溶剂法	1%四氯化碳+5%乙醇	0.5+0.5
6	螯合剂法	4.5% EDTA	1
7	去垢剂法	45% Span-20	1
8	去垢剂法	0.4%吐温-60	1
9	去垢剂法	0.4%吐温-80	1
10	不同试剂联用法	1%四氯化碳+2.25% EDTA	0.5+0.5
11	不同试剂联用法	5%乙醇+22.5% Span-20	0.5+0.5
12	不同试剂联用法	2.25% EDTA+22.5% Span-20	0.5+0.5

处理:用磷酸缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 + $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠, $\text{pH}=8.0$)洗涤诱导培养的细胞,离心 5 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)后将沉淀超声处理(53 kHz) 15 min 即得通透性细胞。

3)联合法.将湿重 1 g 的黑曲霉细胞置于 2 mL 离心管中,分别使用冻融(液氮速冻 + 45°C 水浴溶解) + 超声的方法、冻融 + 化学的方法、冻融 + 超声 + 化学的方法、超声 + 化学的方法处理细胞,然后离心 5 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)去除透性化试剂.用磷酸缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 + $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠, $\text{pH}=8.0$)洗涤细胞后再离心 5 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)即得通透性细胞。

1.3.3 产物检测 将上述方法得到的透性化细胞与 1 mL 0.2% (质量分数)的三醇组皂苷溶液水浴反应 30 min (45°C),用等体积正丁醇萃取溶液,然后取正丁醇层溶液进行薄层层析,展开剂为氯仿-甲醇(体积比为 $85:15$),显色剂为甲醇-硫酸-乙酸(体积比为 $85:5:10$),蒸干每组实验产量最高的正丁醇层(0.9 mL),将得到的粉末状样品溶于 5 mL 甲醇中,过滤后取 $10 \mu\text{L}$ 进行高效液相色谱(HPLC)检测.色谱柱为 Lichrospher C18 色谱柱,柱温为 30°C ,紫外检测波长为 203 nm ,进样量为 $10 \mu\text{L}$,流动相为水(A)和乙腈(B).流动相洗脱梯度: $0 \sim 52 \text{ min}$, $69\%(\text{A}) + 31\%(\text{B})$; $52 \sim 53 \text{ min}$, $35\%(\text{A}) + 65\%(\text{B})$; $53 \sim 69 \text{ min}$, $100\%(\text{B})$; $69 \sim 76 \text{ min}$, $69\%(\text{A}) + 31\%(\text{B})$ (百分数均为体积分数)。

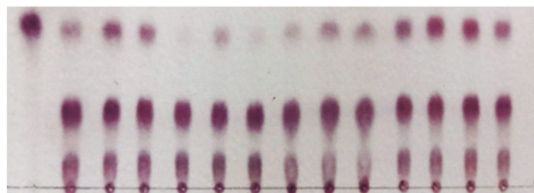
2 结果与分析

2.1 不同试剂透性化处理黑曲霉细胞对 Rh_1 产量的影响

利用不同试剂对黑曲霉细胞进行透性化处理,使用磷酸缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 + $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠, $\text{pH}=8.0$)洗涤通透性细胞,然后将其与 0.2% (质量分数)的三醇组人参皂苷溶液反应 30 min (45°C),结果如图 1 所示.对照组细胞用 1 mL 无菌水代替透性化试剂进行处理。

由图 1 可知,不同的透性化试剂对细胞产生

的影响不同.四氯化碳组、四氯化碳 + 乙醇组的 Rh_1 转化率低于对照组,其原因可能是四氯化碳、四氯化碳 + 乙醇抑制了生物的修复功能^[16],进而导致细胞死亡和蛋白变性; 45% span-20 组、span-20 + EDTA 组、span-20 + 乙醇组的 Rh_1 转化率与对照组接近,这可能是 45% span-20、span-20 + EDTA、span-20 + 乙醇组未能损伤细胞膜表面蛋白,因而无法提升黑曲霉细胞的通透性作用;甲苯组、戊二醛组、乙醇组、吐温-60 组、吐温-80 组、EDTA 组的 Rh_1 转化率均得到提高,其中 EDTA 组的转化率最好.甲苯组、戊二醛组和乙醇组能够提高 Rh_1 转化率的可能原因是,这 3 种试剂对微生物细胞具有微毒性,能部分损伤黑曲霉的细胞壁及细胞膜,进而能够促进细胞通透性的提高^[17].吐温-60 组和吐温-80 组能够提高 Rh_1 转化率的可能原因是,去垢剂促使细胞膜自溶,从而提高了细胞通透性^[14].螯合剂能够提高 Rh_1 转化率的可能原因是,EDTA 螯合细胞膜表面的阳离子后,失去阳离子的失活膜蛋白破坏了细胞膜的完整性,进而提高了细胞的通透性^[18]。



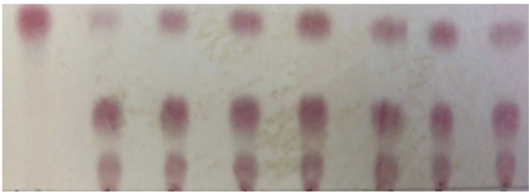
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
1 为 Rh_1 标样; 2 为对照组; 3 为 2% 甲苯; 4 为 2% 戊二醛; 5 为 $2\% \text{CCl}_4$; 6 为 $1\% \text{CCl}_4 + 2.25\% \text{EDTA}$; 7 为 $1\% \text{CCl}_4 + 5\%$ 乙醇; 8 为 45% span-20; 9 为 22.5% span-20 + $2.25\% \text{EDTA}$; 10 为 22.5% span-20 + 5% 乙醇; 11 为 0.4% 吐温-60; 12 为 0.4% 吐温-80; 13 为 $4.5\% \text{EDTA}$; 14 为 10% 乙醇

图 1 不同试剂透性化处理黑曲霉细胞对 Rh_1 产量的影响

2.2 不同质量分数的 EDTA 对 Rh_1 产量的影响

分别选择质量分数为 1% 、 2% 、 3% 、 4.5% 、 5% 和 6% 的 EDTA 透性化处理黑曲霉细胞,结果如图 2 所示.由图 2 可以看出,用不同质量分数的 EDTA 透性化处理细胞时,其 Rh_1 的产量不同;当

EDTA 质量分数为 3% 时,其 Rh₁ 的产量最佳.

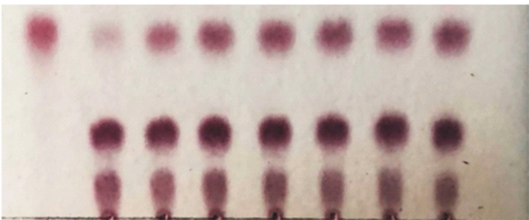


1 为 Rh₁ 标样; 2 为对照组; 3 为 1% EDTA; 4 为 2% EDTA; 5 为 3% EDTA; 6 为 4.5% EDTA; 7 为 5% EDTA; 8 为 6% EDTA

图 2 不同质量分类的 EDTA 对 Rh₁ 产量的影响

2.3 不同透性化处理时间对 Rh₁ 产量的影响

以 3% EDTA 为透性化试剂时,不同透性化处理时间对细胞通透性的影响,如图 3 所示. 由图 3 可以看出,当处理时间超过 30 min 时,Rh₁ 的产量不再明显增加. 这表明,透性化处理 30 min 即可达到较好的渗透效果.



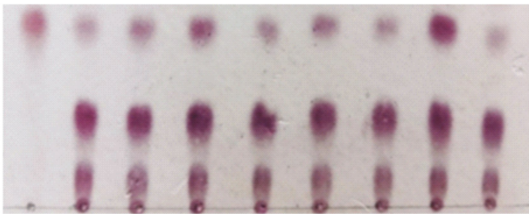
1 为 Rh₁ 标样; 2 为对照组; 3 为 3% EDTA 处理 15 min; 4 为 3% EDTA 处理 30 min; 5 为 3% EDTA 处理 45 min; 6 为 3% EDTA 处理 60 min; 7 为 3% EDTA 处理 75 min; 8 为 3% EDTA 处理 90 min

图 3 不同透性化处理时间对 Rh₁ 产量的影响

2.4 不同透性化处理方法对 Rh₁ 产量的影响

分别采用物理法(冻融的方法、超声的方法)、化学法(3% EDTA)、物理和化学联合法(冻融+超声的方法、冻融+化学的方法、超声+化学的方法、冻融+超声+化学的方法)^[13]透性化处理黑曲霉细胞,结果如图 4 所示. 超声与 3% EDTA 联用的方法获得通透性细胞的效果最好,其原因可能是超声处理对细胞损伤适宜,既能提高通透性,又可避免因改变外界环境而对胞内复合酶系造成的伤害,即促进了胞内复合酶系与底物的结合反应;冻融法、化学法、冻融+超声的方法、冻融+化

学的方法以及冻融+超声+化学的方法对 Rh₁ 的产量影响不大,均与对照组相似,这可能是冻融的过程能够引起蛋白交联,从而导致蛋白变性^[19].



1 为 Rh₁ 标样; 2 为对照组; 3 为冻融法; 4 为超声法; 5 为 3% EDTA 法; 6 为冻融+超声的方法; 7 为冻融+3% EDTA 的方法; 8 为超声+3% EDTA 的方法; 9 为冻融+超声+3% EDTA 的方法

图 4 不同透性化处理方法对 Rh₁ 产量的影响

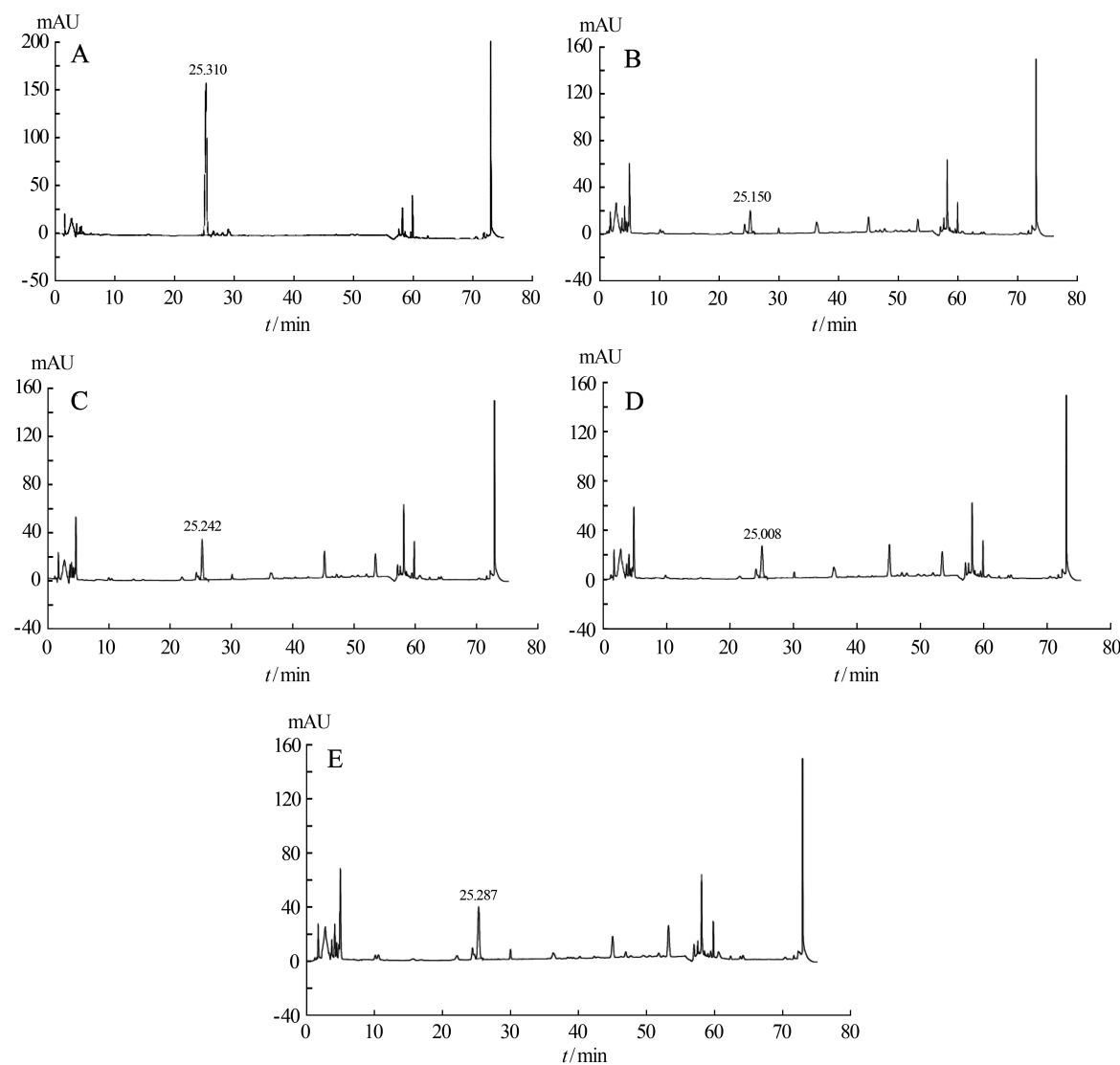
2.5 产物的 HPLC 检测

取待测样品(2.1 中 4.5% EDTA 样品、2.2 中 3% EDTA 样品、2.3 中 30 min 样品、2.4 中超声+3% EDTA 样品)的正丁醇层溶液 0.9 mL,蒸干后溶解于 5 mL 甲醇中(稀释 5.56 倍). 各取 10 μ L 待测样品进行 HPLC 检测,结果如图 5 所示. 采用单点校准法^[20]对得到的峰面积数据,按照公式 $C_i = C_s \times S_i / S_s$ 计算 Rh₁ 的浓度值,结果如表 2 所示. 上式中 C_i 和 C_s 分别为待测溶液和标准溶液中 Rh₁ 组份的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), S_i 和 S_s 分别为待测溶液和标准溶液中 Rh₁ 组份的峰面积(mAU).

由图 5 B—图 5 E 可知,4 种样品的出峰保留时间(25.150、25.242、25.008、25.287 min)与 Rh₁ 标样(图 5 A, 25.310 min)基本一致,这表明透性化处理黑曲霉细胞的转化反应中有 Rh₁ 生成. 由表 2 可知,超声+3% EDTA 联用方法的通透性效果最好.

表 2 单点矫正法测得的样品浓度

待测样品	Rh ₁ 峰面积/ mAU	样品浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Rh ₁ 标样	2 834.9	241.00(定容)
4.5% EDTA 样品	365.6	0.223
3% EDTA 样品	541.1	0.330
30 min 样品	540.5	0.329
超声+3% EDTA 样品	713.8	0.435



A 为 Rh_1 标样; B 为不同试剂透性化处理黑曲霉细胞的 13 号样品(4.5% EDTA); C 为不同质量分数的 EDTA 透性化处理黑曲霉细胞的 5 号样品(3% EDTA); D 为不同透性化处理时间处理黑曲霉细胞的 4 号样品(30 min); E 为不同透性化处理方法处理黑曲霉细胞的 8 号样品(超声+3% EDTA)

图 5 产物的 HPLC 检测图

3 结论

本文使用不同透性化试剂、不同质量分数的试剂、不同透性化处理时间以及不同的透性化方法对黑曲霉细胞进行透性化处理以制备稀有人参皂苷 Rh_1 。通过薄层层析检测和 HPLC 分析表明,联合 3% EDTA 与超声法(53 kHz)时, Rh_1 的制得效果最好。这表明该方法能在保证细胞完整性的前提下,提高细胞壁和细胞膜的通透性,进而

使底物能够进入细胞内与复合酶结合反应。该方法对细胞毒性小,反应条件温和,操作简单,实用性强。另外,用三七的三醇型常量人参皂苷(Re 、 Rg_1 、 R_1)作为转化反应的底物,可节省分离和纯化单一常量人参皂苷成分的时间和成本,因此本文方法为制备 Rh_1 提供了新的思路。

参考文献:

[1] 李娟,王如锋,杨莉,等.三七皂苷类成分及对心血

管作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (17):3480-3487.

[2] 甘烦远,郑光植. 三七化学成分研究概况[J]. 中国药 学杂志, 1992, 27(3):138-143.

[3] 郭枫,刘焕焕,邱智东,等. 稀有人参皂苷的酶转化 研究进展[J]. 生物技术进展, 2017, 7(4):279-283.

[4] PARK E K, CHOO M K, HAN M J, et al. Gin- senoside Rh₁ possesses antiallergic and anti-inflam- matory activities[J]. *Int Arch Allergy Imm*, 2004, 133(2):113-120.

[5] 丁艳芬,李江霞,杨崇仁. 人参皂苷 Rh₁ 的药理作用 研究进展[J]. 中国现代中药, 2013, 15(4):282-285.

[6] LU J M, YAO Q Z, CHEN C Y. Ginseng com- pounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009, 7(3):293-302.

[7] PARK C S, YOO M H, NOH K H, et al. Bio- transformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial gly- cosidases[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 87(1):9- 19.

[8] BISWAS T, MATHUR A K, MATHUR A. A lit- erature update elucidating production of Panax gin- senosides with a special focus on strategies enriching the anti-neoplastic minor ginsenosides in ginseng preparations[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2017, 101 (10):4009-4032.

[9] 田蕾. 三七双向发酵技术的研究[D]. 辽宁:大连工 业大学, 2015.

[10] CUI C H, LIU Q M, KIM J K, et al. Identifica- tion and characterization of a *Mucilaginibacter* sp. strain QM49 β -glucosidase and its use in the pro- duction of the pharmaceutically active minor gin- senosides (S)-Rh₁ and (S)-Rg₂ [J]. *Appl Environ Microb*, 2013, 79(19):5788-5798.

[11] QUAN L H, MIN J W, SATHIYAMOORTHY S, et al. Biotransformation of ginsenosides Re and Rg₁ into ginsenosides Rg₂ and Rh₁ by recombinant β -glucosidase[J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 913-917.

[12] RUAN C C, ZHANG H, ZHANG L X, et al. Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh₁ by re- combinant β -glucosidase[J]. *Molecules*, 2009, 14 (6):2043.

[13] 刘晓华,李海星,陈燕,等. 透性化细胞制备方法的 研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11):475- 479.

[14] 张建双,郭晓兵,于爽,等. 透性化酒精酵母细胞产 海藻糖方法的研究[J]. 中国酿造, 2010(11):56- 59.

[15] 朱义松. 固定化及透性化对瑞士乳杆菌 L7 生产共 轭亚油酸的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2012.

[16] 单爱琴,郝红艳,韩宝平,等. 四氯化碳浓度对其自 身厌氧生物降解的影响[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(1):1-4.

[17] 吴晖,杨美艳,赖富饶,等. 有机溶剂对米曲霉及荧 光假单胞菌细胞毒性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4):15-20.

[18] 徐立新,贾梅,师忠芳,等. 大鼠星形胶质细胞无血 清培养方法的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2018, 34(6):633-636.

[19] 刘铭. 冻融所致蛋白质交联对豆腐体外消化及质 构特性的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2016.

[20] 蔡定建,谢志鹏,郭晟. HPLC 法检测南酸枣糕中 的合成色素、防腐剂、甜味剂、山梨酸、食品胶[J]. 中国调味品, 2008(1):79-83.