

## · 制剂与质量 ·

## 微生物对人参果总皂苷中人参皂苷化合物 K 的转化作用

崔宇<sup>1</sup>, 姜彬慧<sup>1</sup>, 韩颖<sup>1</sup>, 赵余庆<sup>2\*</sup>

(1. 东北大学资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 利用微生物转化法对人参果总皂苷(SFPG)进行生物转化, 制备人参皂苷化合物 K(C-K)。方法 从种植人参的土壤中筛选、分离 4 种微生物  $m_{14}$ 、 $m_3$ 、 $m_8$ 、 $m_9$  对 SFPG 进行转化, 筛选最佳活性菌株; 以 C-K 的量为指标, 采用 TLC 和 HPLC 法检测微生物的转化结果。结果 真菌  $m_{14}$  为转化 C-K 的最佳活性菌株, 最佳转化条件为转化时间 6 d, 转化温度 30 ℃, 摇床转速 160 r/min, 转化初始 pH 值为自然 pH 5.5, 转化底物质量浓度为 120 mg/mL。转化后的 C-K 的量是转化前的 41.65 倍。结论 真菌  $m_{14}$  转化 SFPG 中 C-K 的专属性强、转化效率高, 为 C-K 的工业化生产提供了一条新的途径。

**关键词:**人参果总皂苷(SFPG); 人参皂苷化合物 K(C-K); 菌株  $m_{14}$ ; 微生物转化

**中图分类号:**R282.15; R284.2; R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)02-0189-05

### Microbial transformation on ginsenoside compound K from total saponins in fruit of *Panax ginseng*

CUI Yu<sup>1</sup>, JIANG Bin-hui<sup>1</sup>, HAN Ying<sup>1</sup>, ZHAO Yu-qing<sup>2</sup>

(1. College of Resources and Civil Engineering, Northeast University, Shenyang 110004, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract: Objective** To apply the microbial transformation to transforming the total saponins in the fruit of *Panax ginseng* (SFPG) and preparing ginsenoside compound K (C-K). **Methods** The four microbial strains  $m_{14}$ ,  $m_3$ ,  $m_8$ , and  $m_9$  were screened and isolated from the soil in the botanic garden planted for *P. ginseng* and they were used for the microbial transformation of SFPG to optimize the strains. Taking C-K contents as index the microbial transformation was detected and analyzed by TLC and HPLC. **Results** The strain  $m_{14}$  was found to transform the SFPG efficiently to C-K at first. The optimal culturing and transformation conditions of  $m_{14}$  were obtained; time, 6 d; temperature, 30 ℃; revolution of cradle, 160 r/min; initial pH value, 5.5; substratum concentration, 120 mg/mL. Under the optimal condition, the content of C-K was 41.65 times as much as before transformation by  $m_{14}$ . **Conclusion** The  $m_{14}$  is the most effective strain among the four fungal strains. It is the new way available for the C-K industrialized production.

**Key words:** the total saponins in the fruit of *Panax ginseng* C. A. Meyer (SFPG); ginsenoside compound K (C-K); strain  $m_{14}$ ; microbial transformation

人参果总皂苷(the total saponins in the fruit of *Panax ginseng*, SFPG)是从五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 果实中提取得到的皂苷类物质。人参果实的果皮和果肉中含有的 SFPG 除与人参根中的人参皂苷具有相似的作用外, 还有其独特的作用, 且人参果中二醇组人参皂苷的量相对较多<sup>[1]</sup>。20(S)原人参二醇-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(人参皂苷化合物 K, compound K, 简称 C-K)是人参二醇组皂苷的次生代谢产物, 其在体内、体外均具

有良好的抑制癌细胞生长作用和抗癌细胞转移作用, 是一种较有开发前景的抗癌新药<sup>[2]</sup>。

利用生物转化法制备高活性次生皂苷相对于酸、碱水解法具有反应条件温和、操作简便、成本较低等优点, 属于环境友好型技术。为此, 本研究利用从种植人参的土壤中筛选的有效微生物菌株对二醇组皂苷量相对较高的 SFPG 进行转化, 以制备 C-K 为目标, 优选出最佳转化菌株, 并确定了菌株的最佳生长条件和最佳转化条件, 为 C-K 的工业化生产提

收稿日期: 2006-04-23

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20062031, 20062069)

作者简介: 崔宇(1978—), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物技术。

\* 通讯作者 赵余庆 Tel: (024)23986522 E-mail: zyuq4885@126.com.

供了一个可行的方法。

### 1 仪器与试剂

日立 L-7100 高效液相色谱仪, L-7400 紫外检测器, N2000 双通道色谱工作站; DL-CJ-1N 高性能无菌实验台; SHZ-82 恒温振荡器; HG303-3A 电热恒温培养箱; XY-280 手提式高压蒸汽灭菌锅; TG332A 微量分析天平。

人参皂总皂苷(总皂苷质量分数大于 80%)由抚顺鑫泰人参保健品有限公司提供, 人参皂苷 R<sub>g1</sub>、Re(质量分数均大于 98%)由中国药品生物制品检定所提供, C-K 和人参皂苷 Mc 对照品(质量分数为 98%)由辽宁省中药现代化工程技术中心提供。乙腈、甲醇为色谱纯, 重蒸水(自制); 薄层色谱硅胶 G(青岛海洋化工厂); 其他试剂均为分析纯。

土样采于辽宁省新宾县人参栽培基地。选用由东北大学资源与土木工程学院韩颖博士筛选出的 4 种对人参皂苷有转化作用的微生物为转化菌株。

### 2 方法与结果

2.1 SFPG 供试品溶液的制备: 准确称取 SFPG 适量, 用蒸馏水加热溶解, 配成质量浓度为 50 mg/mL 溶液, 置冰箱中备用。

#### 2.2 培养基的制备

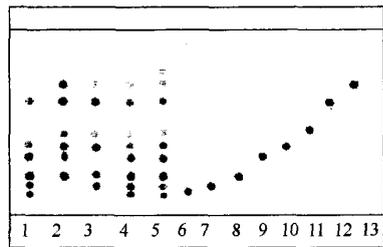
2.2.1 液体接种培养基的制备: 称取液体霉菌培养基 16.5 g, 加入蒸馏水 1 000 mL 溶解, 自然 pH 值 5.5, 高压灭菌后, 置冰箱备用。

2.2.2 固体(斜面或平板)接种培养基的制备: 称取孟加拉红培养基 31.6 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水, 自然 pH 值 5.5, 高压灭菌后倒斜面或平板, 置冰箱备用。

2.3 TLC 法鉴别微生物转化产物: 取灭菌后的 50 mg/mL SFPG 溶液, 分别加入到 4 种生长状况良好的霉菌培养基中, 于 30 ℃, 160 r/min 的摇床中转化 15 d, 取出, 用水饱和正丁醇萃取, 静置。另取等量蒸馏水作为对照组, 同法操作。定量吸取 5 μL 上述水饱和正丁醇萃取液点板, 以氯仿-甲醇-水(70:30:10)为展开剂展开至同样距离, 取出, 挥干溶剂, 喷 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液, 加热显色。根据显色斑点的颜色深浅和大小来确定微生物转化作用的强弱。结果表明菌株 m<sub>14</sub> 相对于其他菌株对 SFPG 的转化作用最强, C-K 的生成量最多, 结果见图 1。

#### 2.4 HPLC 法测定微生物转化产物中 C-K

2.4.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(60:40); 检测波长: 203 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃。



1-SFPG 2-菌株 m<sub>14</sub> 3-菌株 m<sub>8</sub> 4-菌株 m<sub>3</sub> 5-菌株 m<sub>9</sub>  
6-人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 7-人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 8-人参皂苷 Re  
9-人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 10-人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 11-人参皂苷 Mc  
12-人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 13-C-K  
1-SFPG 2-strain m<sub>14</sub> 3-strain m<sub>8</sub> 4-strain m<sub>3</sub> 5-strain m<sub>9</sub>  
6-ginsenoside Rb<sub>1</sub> 7-ginsenoside Rb<sub>3</sub> 8-ginsenoside Re  
9-ginsenoside Rg<sub>2</sub> 10-ginsenoside Rg<sub>1</sub> 11-ginsenoside Mc  
12-ginsenoside Rh<sub>1</sub> 13-C-K

图 1 4 种菌株转化人参皂总皂苷的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC Chromatogram of SFPG transformed by four strains

2.4.2 标准曲线及线性范围考察: 精确称取 C-K 对照品 2.70 mg, 甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 用微孔滤膜滤过, 配制成质量浓度为 0.54 mg/mL 对照品溶液。准确吸取对照品溶液 2、4、6、8、10、12 μL, 按上述色谱条件测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标作标准曲线, 得回归方程  $Y = 40\ 394.73 X + 862\ 835.78$ ,  $r = 0.999\ 9$ 。结果表明 C-K 进样量在 1.08~10.8 μg 时, 峰面积与进样量线性关系良好。

2.4.3 精密度试验: 吸取 C-K 对照品溶液, 重复进样 5 次, 每次进样量 10 μL, 记录峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 0.75%。

2.4.4 稳定性试验: 吸取 C-K 对照品溶液, 每隔 1、2、4、8 h 进样, 每次进样量为 10 μL, 记录峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 0.87%。

2.4.5 重现性试验: 吸取同一个菌株的微生物水解样品 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 每次进样量为 10 μL, 记录 C-K 峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 2.37%。

2.4.6 加样回收试验: 吸取 50 mg/mL SFPG 1 mL, 再取 C-K 对照品 1 mg, 同时加入到含有微生物菌株的 30 mL 的液体霉菌培养基中, 制备供试品溶液, 进样测定, 每次进样量为 10 μL, 记录 C-K 峰面积积分值, 计算得 C-K 的平均回收率为 99.28%, RSD 为 2.12%。

2.4.7 测定: 准确量取灭菌后的 1 mL 50 mg/mL SFPG 供试品溶液, 加入到含有微生物菌株的 30 mL 的液体霉菌培养基中, 在 30 ℃、自然 pH 5.5、

160 r/min 的摇床中培养 6 d,用水饱和正丁醇萃取,除去溶剂,色谱甲醇定容在 2 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,测定 C-K,采用外标一点法计算,结果见表 1。表明菌株 m<sub>14</sub>大约为其他 3 个菌株 C-K 生成量的 10 倍,因此将菌株 m<sub>14</sub>确定为 SFPG 的最佳转化菌株。

表 1 4 种菌株转化 SFPG 的结果

Table 1 Results of SFPG transformed by four strains

菌株	峰面积	C-K/(mg · g <sup>-1</sup> )
m <sub>14</sub>	4 732 051	22.04
m <sub>3</sub>	618 299	2.88
m <sub>8</sub>	480 136	2.24
m <sub>9</sub>	410 136	1.94

2.5 转化 SFPG 的 HPLC 图谱的比较:流动相乙腈-水梯度洗脱,0~30 min,(19:81);30~45 min,(20:80);45~85 min,(30:70);85~115 min,(45:55);115~130 min,(60:40);130~140 min,(85:15);140 min 以后,(19:81),其他色谱条件与 2.4.1 色谱条件相同。HPLC 图谱见图 2。结果表明 SFPG 经菌株 m<sub>14</sub>微生物转化后与转化前对比,C-K 的量增加了 40 多倍。

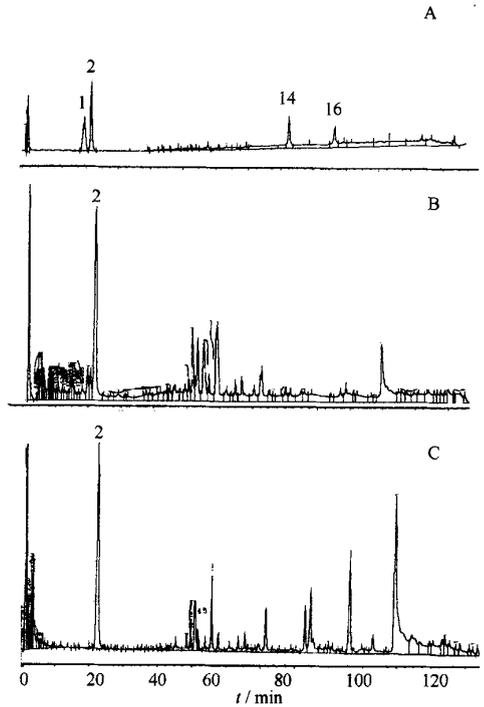
2.6 菌株 m<sub>14</sub>的分类鉴定:菌株 m<sub>14</sub>的菌落特征为:在 PDN 培养基上,菌落大且质地绒毡状,白色,边缘为浅紫色,中间为紫色,随着时间的延长,菌落颜色加深,小型分生孢子聚集成头状,0~1 隔短杆状或弯月状,经中国科学院微生物研究所鉴定菌株 m<sub>14</sub>为真菌中的镰刀霉属(*Fusarium spp.*)微生物。

2.7 菌株 m<sub>14</sub>的最佳生长条件的确定:由于菌株 m<sub>14</sub>为真菌,所以生长情况主要根据目测确定,包括菌体的菌落生长状况,出现孢子的时间及孢子颜色的变化等。

定量选取目标菌株 m<sub>14</sub>接入到液体霉菌培养基中,分别在不同的温度(15、20、25、30、35、40 ℃)、不同的培养基初始 pH 值(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、不同的摇床转数条件下(120、140、160、180、200 r/min)培养不同时间(1、4、8、24、48、72、96、120 h),观察菌落的生长状况、菌体分裂速度、孢子出现、颜色的变化情况。每组试验为 3 个平行样。结果确定菌株 m<sub>14</sub>的最佳培养时间为 72 h、最佳培养温度为 30 ℃、最佳摇床转数为 160 r/min、最佳培养基的初始 pH 值为 5,该菌株属于偏酸性菌。

2.8 菌株对 SFPG 最佳转化条件的确定

2.8.1 最佳转化时间:准备 2 瓶灭菌后的液体霉菌培养基,定量挑取目标菌株接种到其中一瓶培养基



1-人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 2-人参皂苷 Re 14-人参皂苷 Mc 16-C-K  
1-ginsenoside Rg<sub>1</sub> 1-ginsenoside Re  
14-ginsenoside Mc 16-C-K

图 2 混合对照品(A)、SFPG 原样(B)和微生物 m<sub>14</sub>的转化产物(C)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), SFPG original sample (B), and SFPG transformation product by strain m<sub>14</sub> (C)

中作为转化组,另一瓶培养基不接菌株作为空白对照组,于自然 pH 5.5、30 ℃、160 r/min 摇床中培养 3 d 后,2 瓶培养基中均加 1 mL 灭菌的 50 mg/mL SFPG 溶液,继续培养,在 8、12 h 和 1~15 d 时分别取样,水饱和正丁醇萃取,除去溶剂,用色谱纯甲醇定容,0.45 μm 滤膜滤过,测定 C-K,结果见图 3。可以看出,SFPG 经转化作用后,在最初的 2 d,C-K 的增加不明显;随着转化时间的延长,C-K 的量明显增加,2~6 d 时 C-K 增加最为明显,6 d 达到最大,而后则下降。同时因为对照组中反应时间的改变与 C-K 的增量没有相关性,即 C-K 的量不随着时间的延长而增加,说明持续 30 ℃ 温度下不能使 SFPG 转化产生 C-K,但微生物的加入却能使 SFPG 转化产生 C-K。因此选定底物的最佳转化时间为 6 d。

2.8.2 最佳转化温度:方法同上,于 30 ℃、自然 pH 5.5、160 r/min 摇床中培养 3 d,加入 1 mL 灭菌的 50 mg/mL SFPG 溶液,然后将其分别放在 15、20、

25、30、35、40 ℃ 的 160 r/min 摇床中继续培养,培养 6 d,制备供试品溶液,测定 C-K 的量,结果见图 4。可知,SFPG 经菌株转化后,反应温度低于 20 ℃ 时,随温度的增加 C-K 的生成量也在增加,20~30 ℃ 增加最明显,在温度达到 30 ℃ 时 C-K 的生成量达到最大值。因此,选定最佳的转化温度为 30 ℃。

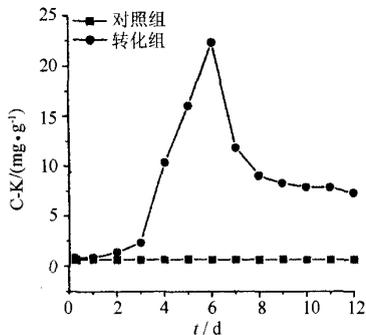


图 3 不同转化时间对 C-K 的影响

Fig. 3 Effects of various transforming times on C-K

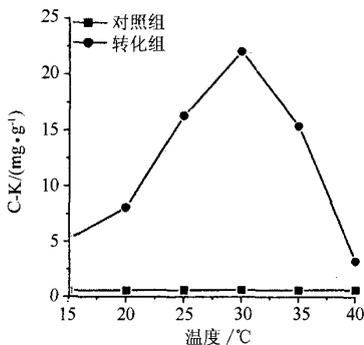


图 4 不同转化温度对 C-K 的影响

Fig. 4 Effects of various transforming temperatures on C-K

2.8.3 最佳摇床转数:方法同前,将加有 1 mL 灭菌的 50 mg/mL SFPG 溶液的培养基分别放在摇床转数为 120、140、160、180、200 r/min 条件下 30 ℃ 培养 6 d,制备供试品溶液,测定 C-K 的量,结果见图 5。可知,摇床转数从 120~160 r/min 时,C-K 的量逐渐增加,且增加幅度较大;在 160、180、200 r/min 时 C-K 的量达到最大值且变化不大,即菌株对 SFPG 的转化效果在低转数时与转数成正比,达到一定值时不再改变。由对照组结果可知,不同的摇床转数不能使 SFPG 得到转化,而微生物的作用可以使其转化生成 C-K。考虑到对实验设备的维护,选定最佳摇床转数为 160 r/min。

2.8.4 最佳转化 pH 值:实验方法同前,将 1 mL 灭菌的 50 mg/mL SFPG 溶液加入到 pH 值分别为 4.0、5.0、5.5(自然 pH 值)、6.0、7.0、8.0 的培养基

中,160 r/min,30 ℃ 培养 6 d,制备供试品溶液,测定 C-K 的量,结果见图 6。在 pH 4.0 时,有少量的 C-K 生成;随着 pH 值的增加,C-K 的量逐渐增加;在 pH 值 5.5 时达到最大;而后则逐渐下降。因此可以确定最佳的 pH 值为自然 pH 值 5.5。

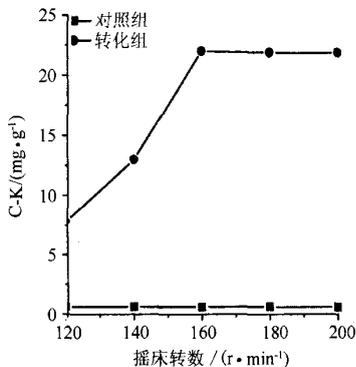


图 5 不同摇床转数对 C-K 的影响

Fig. 5 Effects of various revolutions of cradle on C-K

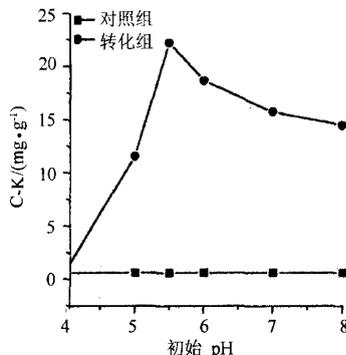


图 6 不同初始 pH 值对 C-K 的影响

Fig. 6 Effects of various initial pH values on C-K

2.8.5 最佳转化底物浓度:方法同前,在相同培养条件下的培养基中分别加入质量浓度为 20、50、80、120、160、200 mg/mL 的 SFPG 溶液,160 r/min,30 ℃ 培养 6 d,制备供试品溶液,测定 C-K 的量,结果见图 7。可知,底物质量浓度在 20~120 mg/mL 时,C-K 的生成量不断提高;底物质量浓度为 120 mg/mL 时,C-K 生成量达到最大;当底物质量浓度大于 120 mg/mL 时,C-K 生成量呈下降趋势,质量浓度大于 160 mg/mL 时,C-K 生成量迅速减小,因此确定,转化反应最佳的底物质量浓度为 120 mg/mL。

2.8.6 最佳转化条件下对 SFPG 的转化:在上述实验确定的最佳转化条件下,即转化时间 6 d,转化温度 30 ℃,摇床转数 160 r/min,转化初始 pH 值为自然 pH 值 5.5,转化底物质量浓度 120 mg/mL 的条件下对底物 SFPG 进行转化,同时做 3 个平行样品,

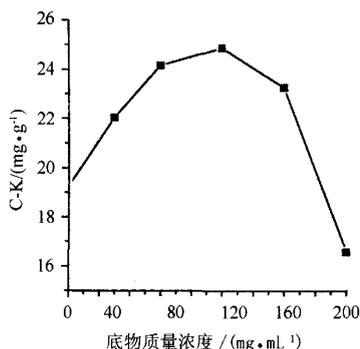


图 7 底物质量浓度对 C-K 的影响

Fig. 7 Effects of various substratum concentrations on C-K

结果原样品中 C-K 的质量分数为 0.60 mg/g, 转化后样品中 C-K 的质量分数为 24.99 mg/g。在最佳转化条件下, 菌株  $m_{14}$  对 SFPG 转化后目标产物 C-K 的量是转化前的 41.65 倍, 说明菌株  $m_{14}$  对 SFPG 的具有较强的转化作用。

### 3 讨论

3.1 本实验利用从人参种植土壤中筛选的野生菌株对人参果总皂苷进行转化, 以生成人参皂苷化合物 K 的量为指标, 确定镰刀霉属霉菌  $m_{14}$  为最佳转化菌株。据国内外的文献报道, 通常进行生物转化的微生物除了肠道菌外, 主要有曲霉属、根霉属、毛霉属、红曲霉菌属等霉菌<sup>[3~6]</sup>。镰刀霉属中的微生物大多数是对作物产生毒害作用<sup>[7]</sup>, 在植物抗肿瘤有效活性成分转化中的应用鲜有报道。本研究说明的镰刀霉属中的某些菌株也可以产生能水解糖苷键的酶, 进一步的研究工作尚在进行。

3.2 菌株  $m_{14}$  的最佳转化条件与最佳生长条件相似, 说明在微生物生长情况较好的情况下对底物的

转化效果较好, 这是因为微生物的生物转化反应, 实际上就是利用微生物含有的一种或几种酶的专一催化功能, 对用作底物的某个有机化合物的分子结构的特定位置起催化作用, 使其转化成结构相似的更有价值的活性产物。所以只有在微生物生长良好的条件下获得的转化效果为最强。

3.3 本研究利用从土壤中筛选出的野生菌株对二醇组皂苷的量相对较多的人参果总皂苷进行转化可以得到较高量的抗肿瘤活性成分人参皂苷化合物 K, 为单体制剂人参皂苷化合物 K 的工业化生产提供了一条新的途径, 说明微生物转化法是一种较有开发前景的有效方法。

### References:

- [1] Xu S Z, Zhang G G, Chen Y J, et al. Study on the chemical constituents of *Panax ginseng* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1988, 5(1):59.
- [2] Kazuhito S, Koji M, Jun M, et al. An intestinal bacterial metabolite (M1) of ginseng protopanaxadiol saponins inhibits tumor-induced neovascularization [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2000, 17:144-150.
- [3] Ma J S, Zhou Q L, Fei X F, et al. Metabolism of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and panaxadiol saponins by fungi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(8):603-605.
- [4] Liu K. Preparation and anti-tumor activities of rare ginsenoside [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(Suppl):57-59.
- [5] Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration—measurement of compound K by enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3):245-249.
- [6] Wang L P. *In vitro* metabolism of ginseng saponins [J]. *J Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(4):4-6.
- [7] Mahapatra S N, Swain P K. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on blackgram [J]. *Annals Plant Protection Sci*, 2001, 9: 92-94.

## 微量热法研究板蓝根的生物热力学特征

赵艳玲<sup>1,2</sup>, 王伽伯<sup>1,3</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

(1. 解放军第 302 医院, 北京 100039; 2. 军事医学科学院, 北京 100850; 3. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

**摘要:**目的 选取大肠杆菌做为工具菌, 建立板蓝根不同萃取部位的生物热力学研究方法。方法 采用微量热法测定大肠杆菌在板蓝根不同萃取部位作用下的生长热曲线特征谱图, 得到相应的生物热力学参数, 评价板蓝根不同萃取部位的差异性。结果 板蓝根不同萃取部位能够不同程度地抑制或促进大肠杆菌的生长, 其中水提物、萃取后残渣促进其生长, 而有机溶剂萃取物则抑制其生长; 在热力学参数上表现为随着有机溶剂萃取物的极性降低, 萃取物的抑制率下降、细菌传代时间延长; 在生长热特征曲线上则表现为最大产热峰强度和对应的培养时间具有

收稿日期: 2006-04-11

基金项目: 国家中医药管理局面上项目 (04-05ZP70)

\* 通讯作者 肖小河