

## 一种真菌对人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的转化

吴秀丽, 王艳, 赵文倩, 张怡轩\*

(沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

**摘要:**【目的】筛选长白山人参土壤中的活性微生物, 转化人参总皂苷及单体人参皂苷产生稀有抗肿瘤成份。【方法】从长白山人参根际土壤中分离各类菌株, 对人参总皂苷及单体人参皂苷进行微生物转化, 并通过硅胶柱层析等方法对转化产物进行分离纯化, 采用波谱解析及理化常数对其进行结构鉴定; 结合菌落形态、产孢结构、孢子形态特征以及菌株 ITS rDNA 核酸序列分析, 对活性菌株进行鉴定。【结果】从长白山人参根际土壤中分离各类真菌菌株 68 株, 有 12 株菌株对人参总皂苷有转化活性, 其中菌株 SYP2353 对二醇组人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 具有较强的转化活性。【结论】阳性菌株 SYP2353 被鉴定为疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*), 能将人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 转化为稀有人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 及二醇组人参皂苷苷元 PPD, 为稀有人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的制备提供了新的方法。

**关键词:** 人参皂苷 Rg<sub>3</sub>; 人参皂苷 Rh<sub>2</sub>; 苷元 PPD; 疣孢漆斑菌; 生物转化

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1181-05

人参及其制品中的主要活性成份是人参皂苷, 由于人参皂苷分子结构中糖基侧链的不同而显示出不同的性质和药理活性<sup>[1, 2]</sup>。例如人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 有促进神经细胞生长的作用; 人参皂苷 Rd 能促进 T 细胞增殖, 提高天然杀伤细胞(NK)的活性<sup>[3]</sup>; 20(S)-原人参二醇苷元(PPD)具有抗癌活性<sup>[4]</sup>等。目前, 许多研究表明人参中二醇组的稀有人参皂苷(如 Rh<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Compound K 等)在抗肿瘤活性方面显示了独特的作用<sup>[5]</sup>。而其中研究最多且与肿瘤细胞凋亡最为相关的为 Rh<sub>2</sub><sup>[6]</sup>。有文献报道人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 有极强的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>, Rh<sub>2</sub> 对小鼠的肺癌细胞、B16 黑色素瘤细胞、大鼠 Morris 肝癌细胞的增殖具有明显的特异性抑瘤作用<sup>[8]</sup>。由于 Rh<sub>2</sub> 含量极少, 只存在于红参和山参中, 研究者们便采用化学法制备, 如宋长春等<sup>[9]</sup>用国产西洋参茎叶总皂苷直接碱催化水解制取 Rh<sub>2</sub>; 陈燕萍等<sup>[10]</sup>用 20(S)-原人参二醇组皂苷碱催化、热回流制取 Rh<sub>2</sub>。但化学法有污染环境、副产物多等诸多缺点, 相比之下, 微生物转化法具有微生物资源丰富、种类

繁多, 底物特异性强的优势。因此, 本研究拟从人参根际土壤中分离得到的真菌, 转化各种类型的人参皂苷, 以期待获得具有抗肿瘤活性成份的稀有人参皂苷。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 人参总皂苷、各种人参单体皂苷及对照品均购自昆明赛勤生物技术有限公司; 薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub>(10 μm~40 μm) 和柱色谱硅胶 H(200~300 目) 为青岛海洋化工有限公司生产; 引物 ITS1 和 ITS4 由上海博亚生物技术公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、RNase A、DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司(大连); 其他试剂均为分析纯试剂。

**1.1.2 培养基:** 真菌分离用 PDA 培养基<sup>[11]</sup>。固体转化培养基为在 PDA 培养基中加入 2% (W/W) 底物, 即得。种子培养基: 每升常水含 10 g 葡萄糖、10 g 蔗糖、10 g 蛋白胨、10 g 氯化铵、3 g 磷酸

基金项目: 国家自然科技资源共享平台项目(2005DKA21203)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-24-23986576; E-mail: yixuan\_zhang@hotmail.com

作者简介: 吴秀丽(1978-), 女, 黑龙江依安县人, 硕士研究生, 主要从事微生物转化的研究。E-mail: wuxiuli2008@eyou.com

收稿日期: 2008-01-28; 修回日期: 2008-05-25

二氢钾、3 g 七水硫酸镁, pH 自然, 分装 40 mL/250 mL 三角瓶, 115 °C 灭菌 20min。液体转化培养基: 每升含 10 g 葡萄糖、0.1 mg 硫酸锰、2 g 天冬氨酸、0.1 mg 硫酸锌、1 g 磷酸二氢钾、0.2 mg 氯化铁、0.5 g 七水硫酸镁、1 mg 维生素 B<sub>1</sub>、5 μg 生物素, pH 6.0, 分装 40 mL/250 mL 三角瓶, 115 °C 灭菌 20min。真菌鉴定用察氏琼脂培养基(CA); 察氏酵母浸出物琼脂培养基(CYA); 麦芽汁琼脂培养基(MEA)参见文献<sup>[11]</sup>。

## 1.2 人参根际真菌的分离

取长白山 2 年和 5 年人参根际土壤样品于 40 ~ 50 °C 烘 2~3h, 取 1 g 烘干的土样溶于 10 mL 无菌蒸馏水中, 将土样从 10<sup>-1</sup> 稀释至 10<sup>-6</sup>, 选择 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 4 个浓度, 分别取 0.1 mL 用无菌三角爬把溶液均匀涂布在含有庆大霉素 (50 μg/mL) 的 PDA 平板培养基表面, 25 °C 倒置培养 7 d。挑取单一菌落经反复划线分离得纯培养, 传至 PDA 斜面培养 7 d, 4 °C 保藏备用。

## 1.3 活性菌株的筛选

分别采用固体初筛和液体复筛方法筛选活性菌株。固体初筛使用含有 2% 的人参总皂苷的固体转化培养基制备培养基小块(φ5 mm × H5 mm), 分别将已活化好的真菌点种至块状培养基上, 于 25 °C 静置培养 7 d 将菌块浸泡在 0.5 mL 正丁醇中, 取上清进行 TLC 分析。在氯仿: 甲醇 (4: 1) 系统中展开后, 挥干溶剂, 喷 10% (V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-EtOH 于 105 °C 下显色, 与原人参皂苷所显示的斑点比较, 获得固体初筛的阳性菌株。液体复筛方法参见文献<sup>[15]</sup>, TLC 检测方法同上, 获得液体复筛的阳性菌株。

## 1.4 以各种单体人参皂苷为底物研究活性菌株的转化功能

以各种单体人参皂苷作为底物, 使用上述筛选获得的阳性菌株先进行固体转化, 再进行液体转化, 确定各种活性菌株的转化功能。

## 1.5 Rg<sub>3</sub> 转化产物的纯化与鉴定

将 Rg<sub>3</sub> 的转化液离心, 上清液用水饱和正丁醇 (1:3) 分别萃取 3 次, 合并正丁醇萃取部分, 浓缩得提取物 A, 菌丝体用甲醇 (1:1) 提取一次, 浓缩得提取物 B, 合并 A、B 两部分提取物。将浓缩液用甲醇溶解, 与硅胶 1:1.5 (W/W) 拌样, 硅胶柱色谱 1:20 (W/W) 进行分离, 采用氯仿-甲醇梯度洗脱 (100:2 100:5 100:8 100:10) 根据 TLC 分析, 合并极性相近部分, 得到 A、B 两部分。

## 1.6 菌种鉴定

**1.6.1 形态学鉴定:** 采用三点接种法将阳性菌株的孢子分别接种于培养基 (CA、CYA、MEA 和 PDA) 上, 25 °C 倒置培养 7 d 后肉眼观察菌落特征, 并采用插片培养法进行显微观察, 依据参考文献<sup>[12-14]</sup> 鉴定菌株的种属。

**1.6.2 分子生物学鉴定:** 真菌染色体 DNA 的提取方法参见<sup>[16]</sup>。以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-G-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 为引物, PCR 扩增 ITS 片段的反应采用 50 μL 体系, 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 40 °C 2 min, 72 °C 3 min, 5 个循环; 95 °C 1 min, 53 °C 2 min, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。使用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 委托上海生工生物工程有限公司进行 DNA 测序。将获得的 ITS 序列与 GenBank 核酸数据库进行 Blast 分析, 结合形态学特征, 确定菌株种属。

## 2 结果

### 2.1 活性菌株的筛选

从长白山的 2 年和 5 年人参根际土壤样品中共分离获得各种类型真菌 68 株, 通过固体初筛与液体复筛, 发现具有转化人参总皂苷的活性菌株 12 株 (表 1); 使用各种单体人参皂苷对活性菌株的转化功能进行验证时, 发现一株编号为 SYP2353 的真菌菌株对人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 有较强的转化活性。

表 1 具有转化人参总皂苷能力的 12 株活性菌株及其分布  
Table 1 12 active strains with the capability of transformation of ginsenosides

Strains number	Genus of strains
SYP2353	<i>Myrothecium</i>
SYP2354	<i>Aspergillus</i>
SYP2350	<i>Fusarium</i>
SYP2367	<i>Penicillium</i>
SYP2351	<i>Alternaria</i>
SYP2352	<i>Alternaria</i>
SYP2246	<i>Penicillium</i>
SYP2268	<i>Aspergillus</i>
SYP2370	<i>Trichoderma</i>
SYP2280	<i>Trichoderma</i>
SYP2369	<i>Fusarium</i>
SYP2288	<i>Penicillium</i>

### 2.2 Rg<sub>3</sub> 的转化产物的研究

**2.2.1 TLC 分析:** 菌株 SYP2353 转化人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的产物, 使用展层剂 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=4:1) 进行 TLC 分析, 实验结果如图 1 所示。和其他菌株相比,

可以明显地看出来，菌株 SYP2353 能将底物 Rg<sub>3</sub> 转化，且转化产物的 Rf 分别与人参皂苷物 Rh<sub>2</sub> 和二醇组皂苷元 PPD 相同，而且从薄层板上的显影可以看出，转化产物人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 产生的比较多。

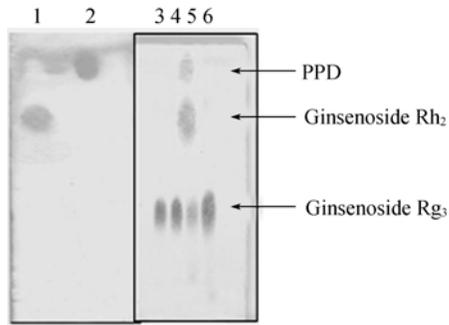


图 1 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 转化产物的 TLC 分析

Fig. 1 The TLC analysis of Ginsenoside Rg<sub>3</sub> biotransformation products. 1.Ginsenoside Rh<sub>2</sub>; 2.PPD; 3 and 4. biotransformation products of other fungi strains; 5.biotransformation products of strain SYP2353; 6.Ginsenoside Rg<sub>3</sub>.

**2.2.2 转化产物鉴定：**对转化产物进行柱层析纯化，得到的 A、B 两个组分，分别进行鉴定，结果如下：  
 (A) 白色针状结晶，mp218-220，ESI-MS m/z：1245(2M+H)分子量 622；<sup>13</sup>C-NMR (75MHz,C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)：δ 39.2(C-1)，26.7(C-2)，88.8(C-3)，40.0(C-4)，56.4(C-5)，18.5(C-6)，35.2(C-7)，37.0(C-8)，50.4(C-9)，39.7(C-10)，32.2(C-11)，70.9(C-12)，49.2(C-13)，51.8(C-14)，31.4(C-15)，26.8(C-16)，50.6(C-17)，17.8(C-18)，16.4(C-19)，73.0(C-20)，22.8(C-21)，43.3(C-22)，22.6(C-23)，126.1(C-24)，

130.8(C-25)，25.9(C-26)，17.7(C-27)，28.2(C-28)，15.9(C-29)，17.4(C-30)，107.0(3-glc-1')，75.8(C-2')，78.8(C-3')，71.9(C-4')，78.4(C-5')，63.1(C-6')。物理性质、质谱数据及核磁共振碳谱数据与文献[17]比较，数据基本一致，故鉴定该转化产物为人参皂苷 Rh<sub>2</sub>。(B) <sup>13</sup>C-NMR (75MHz,C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)：δ 39.4(C-1)，28.3(C-2)，78.0(C-3)，40.0(C-4)，56.4(C-5)，18.8(C-6)，35.2(C-7)，39.6(C-8)，50.5(C-9)，37.4(C-10)，32.1(C-11)，71.0(C-12)，48.6(C-13)，51.7(C-14)，31.4(C-15)，27.1(C-16)，54.8(C-17)，16.5(C-18)，15.9(C-19)，73.0(C-20)，26.8(C-21)，35.9(C-22)，23.0(C-23)，126.3(C-24)，130.8(C-25)，25.8(C-26)，17.7(C-27)，28.7(C-28)，16.4(C-29)，17.1(C-30)核磁共振碳谱数据与文献[18]比较，数据基本一致，故鉴定该转化产物二醇系人参皂苷元 PPD。

**2.3 菌种鉴定**

**2.3.1 形态学特征：**菌落形态：菌落在 CA 上生长缓慢，7 d 后直径 1.0 cm ~ 1.2 cm，质地呈纯白色致密绒状，突起，背面乳白色，边缘菌丝白色 (图略)；在 MEA 上生长 7 d 后直径 3.1cm，质地致密绒状突起，白色，偶有黑色颗粒状孢子团，边缘菌丝白色，背面乳黄色，具同心轮纹 (图略)；在 PDA 上生长 7 d 后直径 3.4 cm，质地致密绒状突起，呈纯白色，具同心轮纹，背面乳黄色，无溢物 (图 2-A)；在 CYA 上不生长。菌丝体形态：产孢结构 3 ~ 6 个瓶梗轮生，分生孢子宽梭形，顶端略尖，基部平截，顶端生有漏斗形附属物 (图 2-B,C)。

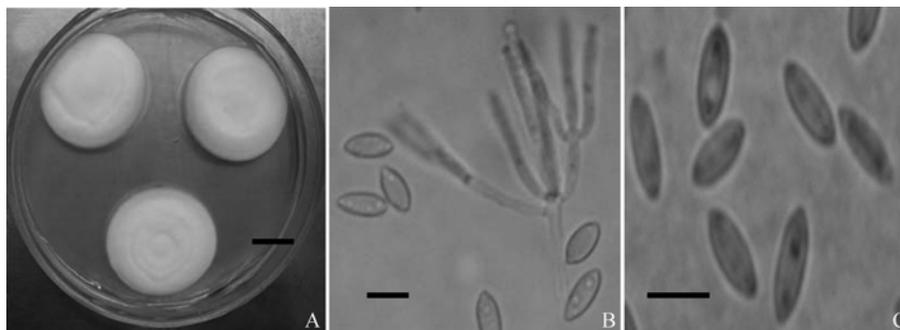


图 2 疣孢漆斑菌的形态特征

Fig. 2 The morphological characteristics of colonies on PDA (A), conidium (B) and conidiophore (C) of *Myrothecium verrucaria*. B, C: magnification of 10 × 40(ocular × objective).Scale bars: A =10mm; B, C=10 μm.

**2.3.2 ITS 序列比对：**通过 PCR 扩增后，得到片段大小为 604 bp。通过 Blast 将所测得的序列与 GenBank 中的 ITS 基因序列进行比对，发现获得具有较高同源

性的菌株 7 株。Strain SYP2353 与 GenBank 中的 *Myrothecium atroviride* AF455507、*Myrothecium atroviride* AJ302002 的同源性分别为 100%、100%；

与 *Myrothecium verrucaria* AJ302003 同源性为 100% ; 与 *Myrothecium roridum* EF211125、*Myrothecium roridum* EF211124 同源性为 99%、99% ; 与 *Stachybotrys echinata* EU30164、*Stachybotrys echinata* AF205446 的同源性分别为 90%、90%。使用 Mega 2.1 软件对 Strain

SYP2353 与上述 7 个菌株的 ITS-5.8S 序列进行邻接法聚类得到系统发育树 (图 3)。结合形态学特征, 如菌落的颜色、大小、质地、分生孢子梗及分生孢子的特征, 最终鉴定菌株 SYP2353 为疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*)。

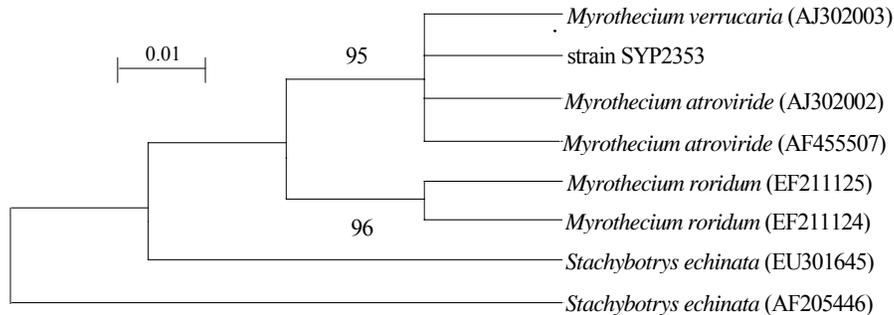


图 3 依据 ITS-5.8S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ITS-5.8S rDNA sequences constructed by neighbor-joining method. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers near the branches indicate the percentage support in 1000 bootstrap replications. A scale bar, 1% indicates the genetic distance in the NJ tree.

### 3 讨论

目前, 对于二醇组人参皂苷的转化, 通常认为是由糖苷酶水解侧链糖基而得的转化产物。根据本研究的转化底物及转化产物的结构特征推测, 本研究筛选到的疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*) 菌株 SYP2353 的转化机理可能为该菌产生  $\beta$ -葡萄糖苷水解酶, 水解人参皂苷  $Rg_3$  皂苷 C3 位一个葡萄糖基转变成稀有人参皂苷  $Rh_2$ , 再进一步水解掉 C3 位另一个葡萄糖基转化成二醇组皂苷元 PPD; 或者直接水解人参皂苷  $Rg_3$  C3 位的两个葡萄糖基直接变成皂苷元 PPD, 如图 4 所示。金凤鸾课题组<sup>[19, 20]</sup>和林国强课题组<sup>[17]</sup>采用酶法制备人参皂苷  $Rh_2$ , 他们分别对黑曲霉

(*Aspergillus niger*) 及层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 的酶催化体系进行了较为详细的研究。本课题筛选到不同于前者的新菌株—疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*), 对该菌株产生的酶的底物特异性、酶催化活性以及酶的分子结构等还需做进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Chen X, Zhou QL, Wang BX. The metabolism of ginsenoside  $Rb_1$  by intestinal Bacteria. *Acta Pharm Sin*, 1999, 34(6): 410-414.
- [2] 庄毅. 菌质 - 一个中药的新领域. *中药新药与临床药理 (Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology)*, 1992, 3(2): 49-51.
- [3] 李泰平. 人参皂苷药理活性的研究进展. *生物学教学 (Biology Teaching)*, 2003, 28(4): 34-37.
- [4] Takahide O, Masayo M, Shizuo O. Mechanism of action of ginsenoside  $Rh_2$ : uptake and metabolism of ginsenoside  $Rh_2$  by cultured B16 melanoma cells. *J Pharm Science*, 1991, 80(12): 1141-1146.
- [5] Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside  $Rb_1$  by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration-measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3): 245-249.
- [6] 郭志廷, 王鲁, 褚秀玲, 等. 浅谈人参皂苷  $Rh_2$  对肿瘤细胞增殖周期和凋亡的影响. *中国医学杂志 (The Medicine Magazine of China)*, 2006, 2: 40-42.

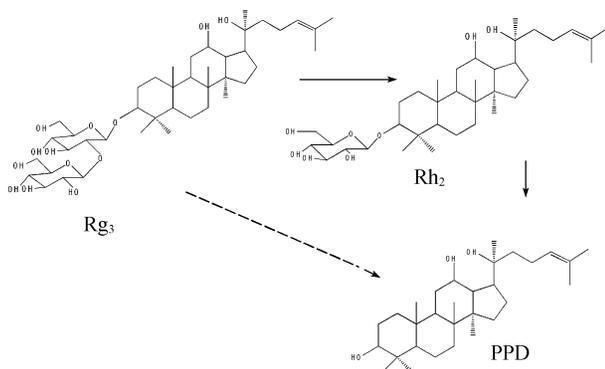


图 4 疣孢漆斑菌转化人参皂苷  $Rg_3$  的生物转化过程

Fig. 4 Presumed biotransformation processes of Ginsenoside  $Rg_3$  by *Myrothecium verrucaria*.

- [7] 赵越, 苏适. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗肿瘤作用的研究. 微生物杂志 (*Chinese Journal of Microbiology*), 2003, 23(2): 61–63.
- [8] Xia LJ, Han R. Differentiation of B16 melanoma cells induced by ginsenoside Rh<sub>2</sub>. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1996, 31(10): 742–745.
- [9] 宋长春, 马兴元, 徐景达. 用西洋参茎叶总皂苷制取人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 和 Rh<sub>2</sub>. 中国药学杂志 (*Chinese Pharmaceutical Journal*), 1992, 27(1): 6–10.
- [10] 陈燕平, 孟勤, 宋长春, 等. 20 (s)-原人参二醇组皂苷的制备及其转化制取人参皂苷 Rh<sub>2</sub>. 中国药学杂志 (*Chinese Pharmaceutical Journal*), 1997, 32 (5): 273–278.
- [11] Pitt JI. A Laboratory Guide to Common Penicillium Species. Australia: CSIRO Division of Food Research, 1985.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [13] 戴芳澜. 真菌的形态与分类. 北京: 科学出版社, 1987.
- [14] von Arx JA. The genera of fungi sporulating in pure culture. *Mycologia*, 1975, 67(4): 892.
- [15] Dong AL, Cui YJ, Guo HZ, *et al.* Microbiological Transformation of Ginsenoside Rg<sub>1</sub>. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10 (3): 115–118.
- [16] Joseph S, David R. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] Su JH, Xu JH, Lu WY, *et al.* Enzymatic transformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub> to Rh<sub>2</sub> using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042. *J Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2006, 38: 113–118.
- [18] Sung RK, Kang JC, Kei S, *et al.* Enzymatic preparation of ginsenosides Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub> and F<sub>1</sub>. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(4): 404–408.
- [19] 赵立亚, 鱼红闪, 金凤夔. 酶法生产稀有人参皂苷及其产物成份的分析. 大连轻工业学院学报 (*Journal of Dalian Institute of Light Industry*), 2002, 21(3): 112–115.
- [20] 金东史, 鱼红闪, 金凤夔. 酶法制备人参皂甙 Rh<sub>2</sub> 的研究. 大连轻工业学院学报 (*Journal of Dalian Institute of Light Industry*), 2001, 20(2): 99–104.

## Fungal biotransformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub>

Xiuli Wu, Yan Wang, Wenqian Zhao, Yixuan Zhang\*

(School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** [Objective] Ginsenosides are important bioactive compounds in Ginseng. Sugar chains of ginsenosides are closely related to the bioactivity. Rare ginsenosides can be achieved by modifying sugar chains through biotransformation. Samples of Ginseng root soils, collected from Changbai Mountain, were used to screen active microorganism which can transform total ginsenosides and single ginsenoside, so as to obtain anti-tumor components. [Methods] The strains were isolated and screened on solid transfer medium and yield transfer process for active strains. Then the active strains were tested for their biotransformation properties by using different purified ginsenosides, including ginsenoside Rg<sub>3</sub>. The biotransformation products were separated and purified through column chromatography on silica gel (300mesh), and identified by spectral analysis and physical constants. Simultaneously, the active strain was identified based on morphological characteristics of colonies, conidium and conidiophore, as well as ITS-5.8S rDNA sequences. [Results] Total 68 fungal strains were isolated and 12 active strains showed positive activity on total ginsenosides. One strain, SYP2353, was found to have the strong activity on Rg<sub>3</sub>. [Conclusion] The active strain SYP2353 was identified as *Myrothecium verrucaria*, and the biotransformation products of Rg<sub>3</sub> were identified to be rare ginsenoside Rh<sub>2</sub> and aglycon PPD.

**Keywords:** ginsenoside Rg<sub>3</sub>; ginsenoside Rh<sub>2</sub>; aglycon PPD; *Myrothecium verrucaria*; biotransformation