

Fusarium sacchari 对三七茎叶中有效成分生物转化条件的优化*

韩颖¹ 胡筱敏¹ 姜彬慧¹ 赵余庆^{2**}

(¹ 东北大学资源与土木工程学院, 沈阳 110004; ² 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110006)

摘要 利用从种植人参的土壤中分离、筛选的稀有菌种 *Fusarium sacchari*, 对三七茎叶中的主要有效成分三七叶苷进行生物转化, 以 3 种抗肿瘤活性成分 20(S)-原人参二醇-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(C-K)、20(S)-原人参二醇-20-O-β-D-吡喃木糖苷(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷(C-Mx)和 20(S)-原人参二醇-20-O-α-L-呋喃阿拉伯糖基(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷(G-Mc)的总生成量为考查指标, 通过因子转化实验确定最佳转化条件为: 培养基初始 pH 值 6、底物加入量 40 mg、装液量 30 ml、30 °C、160 r·min⁻¹ 转化 6 d。该方法可提高三七茎叶的利用率和经济效益。

关键词 三七茎叶 植物资源 生物转化 抗肿瘤活性

文章编号 1001-9332(2007)12-2801-06 中图分类号 Q595; X787 文献标识码 A

Optimization of biotransformation conditions of active component in *Panax notoginseng* stalks and leaves by *Fusarium sacchari*. HAN Ying¹, HU Xiao-min¹, JIANG Bin-hui¹, ZHAO Yu-qing² (¹ College of Resources and Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110004, China; ² College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110006, China). -Chin. J. Appl. Ecol. 2007, 18(12): 2801-2806.

Abstract: By using *Fusarium sacchari*, a rare microbial strain isolated and screened from planted ginseng soil, the active component notoginseng triterpenes in *Panax notoginseng* stalks and leaves was biotransformed. Taking three main anti-tumor components, *i. e.*, 20(S)-protopanaxadiol-20-O-β-D-glucopyranose (compound K, C-K), 20-O-β-D-xylopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol (compound Mx, C-Mx) and 20(S)-protopanaxadiol-20-O-α-L-arabofuranose (1→6)-β-D-glucopyranose (ginseng Mc, G-Mc) as evaluation indices, the optimization of biotransformation conditions of notoginseng triterpenes in *P. notoginseng* stalks and leaves were obtained by factor biotransformation experiment, *i. e.*, initial pH value 6, substrate addition 40 mg, medium volume 30 ml, and transforming for 6 days at 30 °C. The method could increase the utility and economic benefit of *P. notoginseng* stalks and leaves effectively.

Key words: stalks and leaves of *Panax notoginseng*; plant resource; biotransformation; anti-tumor activity.

1 引 言

植物资源的综合开发利用是指充分利用植物地下和地上部分, 防止不必要的浪费, 或者对同种植物资源进行多方面、多层次的开发利用^[1, 19, 23]。我国传统中药材三七(*Radix notoginseng*)为多年生草本植物, 目前对三七产品的开发及加工主要集中于传统

入药部位根系和根茎。随着以三七(三七根)为原料的药品及保健食品的不断开发, 每年都会有大量的三七茎叶被废弃、堆置^[1], 造成资源浪费。而三七茎叶中的主要成分与三七根和人参类同, 是具有多种生理活性的达玛烷型四环三萜类人参皂苷^[13, 21]。人参皂苷具有多种生理活性和药理功能, 但天然人参皂苷的分子结构并不是活性最佳状态。通过对皂苷活性的研究发现, 人参皂苷的抗肿瘤活性与皂苷糖链结构的关系为: 苷元 > 单糖苷 > 二糖苷 > 三糖苷 > 四糖苷^[4]。采用生物转化技术能有效地改变皂苷

* 辽宁省自然科学基金资助项目(20062031 20062069)。

** 通讯作者。E-mail: zyzq4885@126.com

2007-08-15 收稿 2007-10-07 接受。

的糖链结构,提高其生物活性^[16,20],因此,现代研究把改变皂苷糖链技术的重点从传统的污染严重的酸、碱水解方法,逐步转向条件温和、操作简单的生物转化技术^[3,6-7,9,17],更重要的是生物转化技术对环境 and 生态系统不产生消极影响或消极影响处于生态系统容量之内^[2,14,18,22]。本研究应用一株从种植人参的土壤中分离筛选的活性菌株——*Fusarium sacchari*^[5]对三七茎叶中主要有效成分三七叶苷进行转化,并通过因子实验优化转化条件,获得较高生成量的稀有抗肿瘤活性人参皂苷 C-K^[10-12]、C-Mx^[11]和 G-Mc^[8],为三七茎叶的综合利用提供一种可行的方法,这不仅对实现植物资源综合利用具有重要的现实意义,而且还可通过“绿色”转化技术获得对人类健康有益的防治恶性疾病的生物活性物质,具有重要的医学和经济价值。

2 材料与方法

2.1 实验材料

土壤样品采自辽宁省抚顺市新宾满族自治县人参栽培基地;三七茎叶采自云南省文山州文山县三七栽培基地。转化及保存培养基均为马铃薯培养基:称取去皮马铃薯 200 g,切成薄片,加水煮沸后 80 °C 恒温加热 1 h,双层纱布过滤,滤液定容至 1 000 ml,加入 20 g 葡萄糖,搅拌使葡萄糖完全溶解。

2.2 三七叶苷的提取

将三七茎叶烘干后,取 2 kg 粉碎,用 80% 乙醇回流提取 3 次,合并提取液、浓缩。乙醇提取物用少量水溶解后,通过 D₁₀₁ 大孔吸附树脂柱,先用水洗脱至无色,再用 80% 乙醇洗脱,回收乙醇得三七叶苷 85 g。

2.3 转化产物含量测定

采用日立 L-7100 型高效液相色谱仪(日本日立公司)进行产物含量测定。紫外检测器型号为 L-7400,色谱检测条件:色谱柱为 Kromasil ODS 5 μm 柱(150 mm × 4.6 mm),柱温 25 °C,检测波长 203 nm,流速 1.0 ml · min⁻¹。转化产物用水饱和和正丁醇等体积萃取 3 次后,减压回收溶剂,并用色谱甲醇定容至 1 ml。分别以 3 种主产物产量作为检测指标,并以 3 种产物的总产量作为判断转化条件的依据。

流动相乙腈:水 = 60:40(V/V)条件下检测 C-K (0.54 mg · ml⁻¹),在 0.54 ~ 7.02 μg 范围内,峰面积与进样量呈良好的线性关系,得到的回归方程为: $Y_{C-K} = 12093.48 + 333821.39X_{C-K}$,则 1 g 原皂苷经转化后可获得的 C-K 生成量为:

$$M_{C-K} = \frac{(Y - 12093.48)V}{333.82vm} \quad (1)$$

流动相乙腈:水 = 48:52(V/V)条件下检测 C-Mx (0.55 mg · ml⁻¹),在 1.10 ~ 8.80 μg 范围内,峰面积与进样量呈良好的线性关系,得到的回归方程为: $Y_{C-Mx} = 21142.11 + 129057.97X_{C-Mx}$,则 1 g 原皂苷经转化后可获得的 C-Mx 生成量为:

$$M_{C-Mx} = \frac{(Y - 21142.11)V}{129.06vm} \quad (2)$$

流动相乙腈:水 = 40:60(V/V)条件下检测 G-Mc (0.39 mg · ml⁻¹),在 0.39 ~ 5.07 μg 范围内,峰面积与进样量呈良好的线性关系,得到的回归方程为: $Y_{G-Mc} = 164748.16X_{G-Mc} - 2755.41$,则 1 g 原皂苷经转化后可获得的 G-Mc 生成量为:

$$M_{G-Mc} = \frac{(Y + 2755.41)V}{164.75vm} \quad (3)$$

式(1)~式(3)中: M_{C-K} 、 M_{C-Mx} 、 M_{G-Mc} 分别表示 3 个产物的生成量(mg · g⁻¹); Y 为峰面积积分值(A); V 为转化产物的定容体积(ml); v 为进样量(μl); m 为转化前皂苷底物质量(mg)。

2.4 数据分析

采用 Origin 软件对数据进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 转化时间和温度对产物生成量的影响

将 *F. sacchari* 活化后接入液体马铃薯培养基中(40 ml/100 ml),于自然 pH、160 r · min⁻¹、30 °C 条件下培养 2 d 后,加入 50 mg · ml⁻¹ 的无菌三七叶苷水溶液 1 ml,继续培养 1 ~ 15 d。以相同条件下的皂苷空白(培养基中不接入 *F. sacchari*,其它条件相同)及菌株空白为对照(培养基只接入 *F. sacchari*,不加皂苷溶液,其它条件相同)。

高效液相色谱仪(HPLC)检测结果表明,三七叶苷经 *F. sacchari* 转化后,C-Mx、G-Mc 和 C-K 3 种产物的生成量呈不同的变化趋势(图 1)。反应开始后,三者的总产量呈逐渐上升趋势;6 d 时,三者的总产量达 446.55 mg · g⁻¹,之后以微弱的趋势上升;9 d 后缓慢下降。因此,确定最佳转化时间为 6 d。皂苷空白对照试验表明,3 种产物的含量并不随反应时间而变化,G-Mc 和 C-K 的含量分别在 4.5 mg · g⁻¹ 和 3.3 mg · g⁻¹ 上下浮动,而 C-Mx 在 1 ~ 15 d 内检测的含量均为 0,说明在 30 °C、振荡培养条件下,并不能使三七叶苷中的各成分发生变化生成 C-Mx、G-Mc 和 C-K,而真正导致它们产生的原因是由于

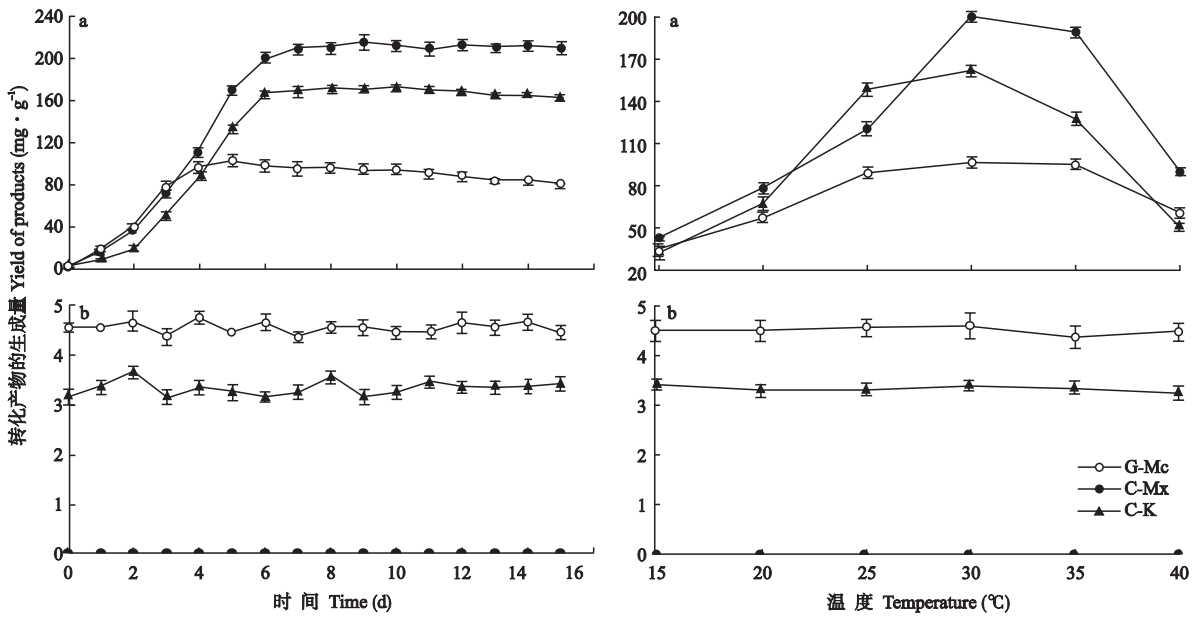


图 1 不同转化时间和温度对转化产物生成量的影响

Fig. 1 Effects of different transforming time and temperatures on contents of transformed products.

a) 转化产物 Transformed product b) 皂苷空白对照 Blank of saponin. 下同 The same below.

F. sacchari 的加入。菌株空白对照试验表明,在 1 ~ 15 d 内均未检测出 3 种产物,说明 *F. sacchari* 的生长代谢过程并不能产生 3 种产物。

取 6 瓶培养基(40 ml/100 ml)均接入活化的 *F. sacchari*, 分别置于 15、20、25、30、35 和 40 °C 的摇床中,在自然 pH、160 r · min⁻¹ 条件下培养 2 d 后,加入 1 ml 50 mg · ml⁻¹ 的无菌三七叶苷水溶液,继续培养 6 d。同样以相同条件下的皂苷空白和菌株空白为对照。当转化温度低于 20 °C 时,3 种产物的生成量都极低;当温度达到 30 °C 时,3 种产物的生成量均达到最大值,总产量为 451.32 mg · g⁻¹。皂苷空白对照试验表明,温度变化并不能改变 3 种产物的含量。菌株空白对照试验表明,*F. sacchari* 在 15 °C ~ 40 °C 条件下不能代谢产生 3 种转化产物,检测结果均为 0。

3.2 转化培养基初始 pH 值对产物生成量的影响

分别选取 pH 4、5、6、7、8 作为转化培养基(40 ml/100 ml)的初始 pH 值,接入活化的 *F. sacchari* 后,在 30 °C、160 r · min⁻¹ 条件下培养 2 d,加入 1 ml 50 mg · ml⁻¹ 的无菌三七皂苷水溶液,继续培养 6 d。以相同条件下的皂苷空白和菌株空白为对照。

由图 2 可知,C-Mx 和 C-K 在 pH 为 6 时获得最高生成量,而 G-Mc 在 pH 为 5 时获得最高生成量,3 种产物的总产量则在 pH 为 6 时获得最大值,为 437.09 mg · g⁻¹,比 pH 为 5 时高 57.32 mg · g⁻¹。因此,选择培养基初始 pH 值为 6。皂苷空白对照试验

表明,3 种产物的含量不发生改变;菌株空白对照试验表明,培养基 pH 值在 4 ~ 8 条件下不能使 *F. sacchari* 代谢产生 3 种产物。

3.3 转化底物加入量和培养基装液量对产物生成量的影响

取 10 个 100 ml 三角瓶各装入 40 ml 培养基,灭菌,并接入活化后的 *F. sacchari*,在培养基初始 pH 为 6、160 r · min⁻¹ 条件下培养 2 d 后加入转化底物

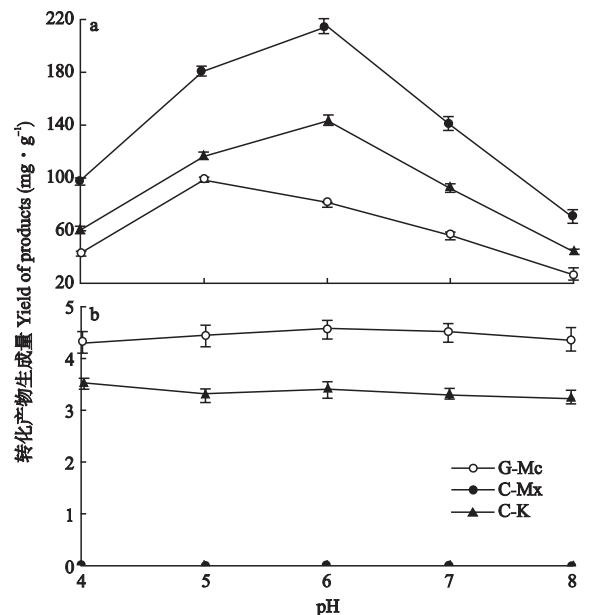


图 2 转化培养基不同 pH 值对转化产物生成量的影响

Fig. 2 Effect of different primary pH values on content of transformed products.

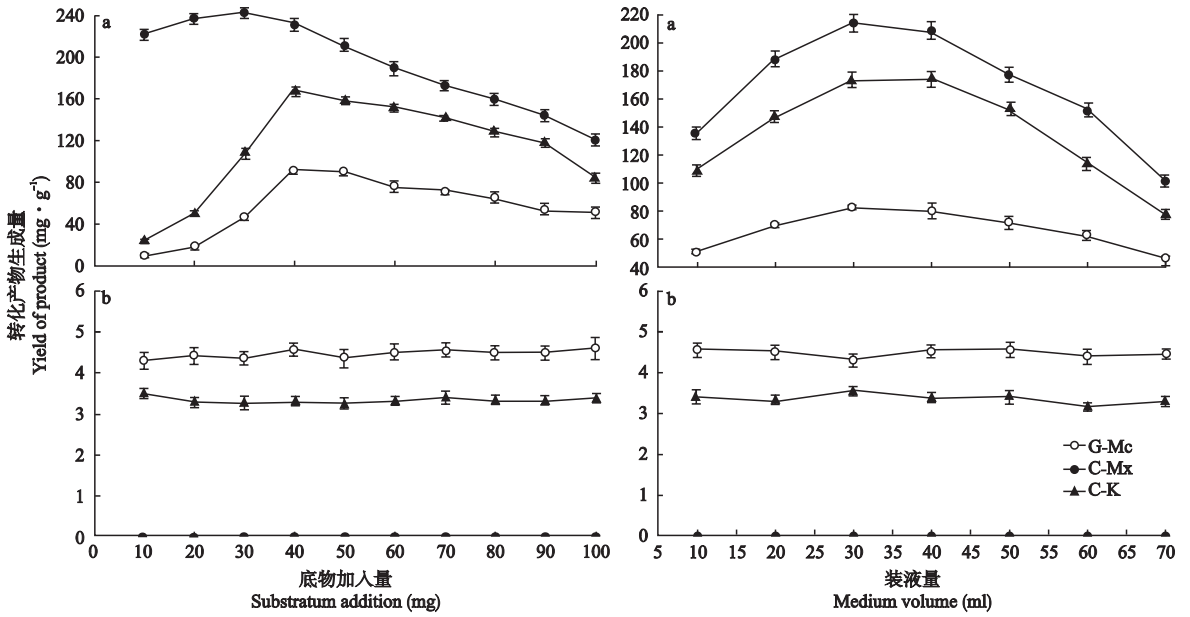


图3 不同底物加入量和培养基装液量对转化产物生成量的影响

Fig. 3 Effect of different substratum addition amounts and medium volumes on content of transformed products.

三七叶苷,加入量分别为10、20、30、40、50、60、70、80、90和100 mg,继续培养6 d。以相同条件下的皂苷空白和菌株空白为对照。

由图3可知,当底物加入量很少时,转化产物以C-Mx为主,当底物加入量为30 mg时其获得最高生成量。随着底物加入量的增加,G-Mc和C-K的生成量显著增加,并在加入量为40 mg时获得最高生成量,此时三者的总产量也达到最高值,为465.70 mg·g⁻¹。两组对照试验结果与前面相同,没有任何变化。

取7个100 ml三角瓶分别装入10、20、30、40、50、60、70 ml培养基。在培养基初始pH为6、30℃、160 r·min⁻¹条件下培养2 d后,加入1 ml、40 mg·ml⁻¹的三七叶苷水溶液,继续培养6 d。对照同前。结果表明,当装液量在10~30 ml时,3种产物的产量均呈增加趋势,当装液量在40~70 ml时,3种产物的产量均呈下降趋势。三者的总产量在装液量为30 ml时获得最大,为482.80 mg·g⁻¹。

3.4 摇床转速对产物生成量的影响

将活化后的*F. sacchari*分别接入5瓶培养基中(30 ml/100 ml),培养基初始pH为6,并将5瓶菌液分别置于转速为120、140、160、180、200 r·min⁻¹的摇床中30℃培养2 d后,加入1 ml、40 mg·ml⁻¹的三七叶苷水溶液,继续培养6 d。对照同前。由图4可知,转速在160~180 r·min⁻¹时,*F. sacchari*对三七叶苷具有良好的转化结果,3种产物都能获得较

高的生成量。当转速为160 r·min⁻¹时,3种产物的总产量为488.61 mg·g⁻¹;当转速为180 r·min⁻¹时,3种产物的总产量为480.96 mg·g⁻¹。因此,选择摇床转速为160 r·min⁻¹。

综上,在实验室条件下,*F. sacchari*对三七叶苷利用率最高的转化条件:培养基初始pH值为6、底物加入量为40 mg、装液量为30 ml、30℃、160 r·min⁻¹条件下转化6 d。

3.5 三七叶苷转化前后成分及含量分析

分别将三七叶苷及其转化产物配制成10 mg·

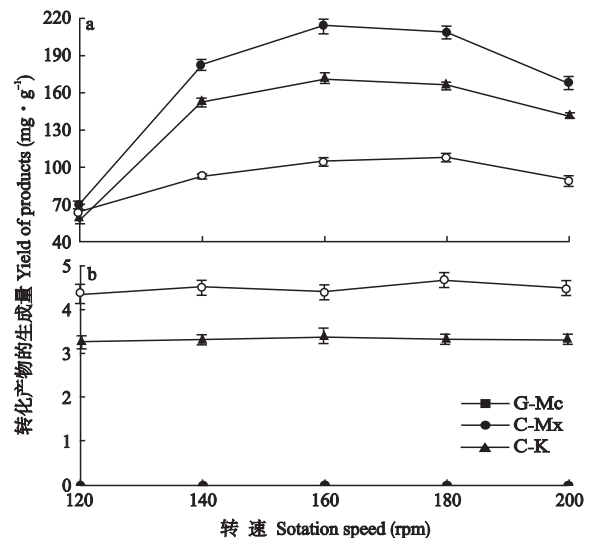


图4 不同摇床转速对转化产物生成量的影响

Fig. 4 Effect of different rotating speeds on content of transformed products.

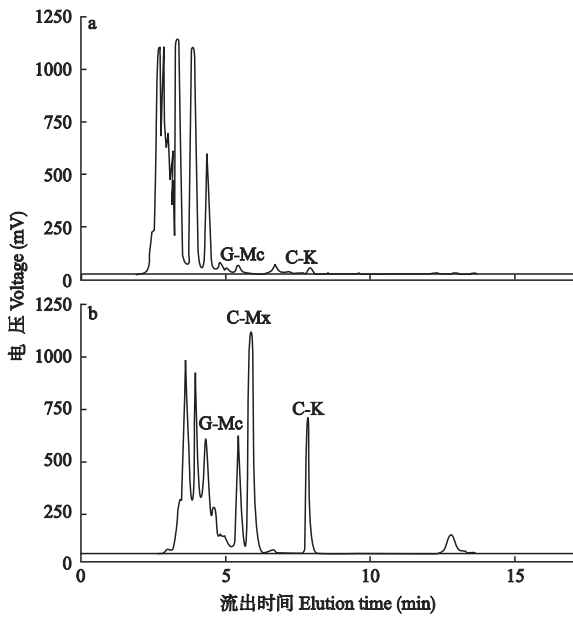


图5 三七叶苷(a)及转化产物(b)HPLC 色谱图

Fig. 5 Typical HPLC chromatogram of notoginseng leaf triterpenes (a) and transformed products (b).

ml^{-1} , 用 HPLC 在流动相乙腈:水 = 80:20(V:V)条件下检测, 进样量 $15 \mu\text{l}$, 分析转化前后三七叶苷中 C-Mx、G-Mc 和 C-K 的含量(图 5)。检测结果表明, 三七叶苷中只含有微量的 G-Mc 和 C-K, 并不含有 C-Mx, 说明人参皂苷 C-Mx 是 *F. sacchari* 对三七叶苷的转化产物。

4 讨 论

随着转化反应时间的延长, 三七叶苷中的多糖苷被不断转化成 G-Mc、C-Mx 和 C-K。C-Mx 在总产物中的含量最高, 其生成量在转化 6 d 时获得最大值, 之后基本呈平稳趋势, 并不下降, 因此, 可以判断 C-Mx 在目前这种转化状态下不会被进一步转化, 而 G-Mc 的生成趋势则不同, 其在转化 5 d 时生成量达到最大值, 之后逐渐下降, 即 G-Mc 能被 *F. sacchari* 进一步转化成 C-K, 但转化速度较慢。

当底物含量相对较少时, G-Mc 和 C-K 能被 *F. sacchari* 进一步转化, 而结构与 G-Mc 在 C-20 位上只有一糖之差的 C-Mx 则在产物中呈现极高的含量, 作为最终产物, 不被继续转化。说明 *F. sacchari* 在转化过程中对人参皂苷结构具有极强的选择性。随着 C-K 和 G-Mc 的进一步转化, 苷元类物质含量增加, 因此, 此时的最终产物以 C-Mx 和苷元类物质为主。

近年的研究表明, 在三七茎叶中共含有 23 种单体皂苷, 含量相对较高的人参皂苷依次为 Rb_3 、 Rc 和 Rb_1 ^[15]。由于转化后以上 3 种成分的含量都明显

减少, 因此从转化前后各成分的变化情况及原型皂苷与 3 种转化产物的化学结构判断, 转化产物中含量最大的 C-Mx 的前体应是人参皂苷 Rb_3 , G-Mc 的前体是 Rc , 而 C-K 的产生由两部分组成, 其中大部分由 Rb_1 转化获得, 另一小部分则由 G-Mc 被进一步转化产生。

通过因子实验优化, 三七叶苷经 *F. sacchari* 转化后生成的 G-Mc、C-Mx 和 C-K 3 种产物的总产量已占总产物的 80% 左右, 提高近 20%, 转化产物成分简单、集中, 便于成分分析及产物分离, 并且有利于获得 3 种高纯度、高产量的稀有抗肿瘤活性皂苷。

采用“绿色”生物转化技术处理植物废物三七茎叶, 不仅为三七茎叶的综合利用提供一种可行的方法, 而且还能从废物中获得对人类健康有益的生物活性物质, 对于实现植物资源的综合利用具有重要的现实意义及医学和经济价值。

参考文献

- [1] Bai Y (白音), Bao Y-H (包英华), Xiao R-G (肖荣高), et al. 2005. Pteridophytic resources and its comprehensive utilization in Chebaling National Nature Reserve, Guangdong Province. *Subtropical Plant Science (亚热带植物科学)*, **34**(4): 48-51 (in Chinese)
- [2] Chen J-P (陈俊平), Wu C-X (吴翠霞). 2003. Inexorable trend of sustainable development of chemical industries green-chemical engineering. *Liaoning Chemical Industry (辽宁化工)*, **32**(3): 112-115 (in Chinese)
- [3] Dong AL, Ye M, Guo HZ, et al. 2003. Microbial transformation of ginsenoside Rb_1 by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnology Letters*, **25**: 339-344
- [4] Dou D-Q (窦德强), Jin L (靳玲), Chen Y-J (陈英杰). 1999. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng*. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, **16**(2): 151-156 (in Chinese)
- [5] Han Y (韩颖), Hu X-M (胡筱敏), Jiang B-H (姜彬慧), et al. 2006. Screened active microbial from soils cultivated ginseng and transformation to anti-tumor component. *Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材)*, **30**(6): 705-707 (in Chinese)
- [6] Hasegawa H, Nagaoga T, Nagaoga T. 2000. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacterial and its transformation to biologically active fatty esters. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **23**: 298-304
- [7] He KJ, Liu Y, Yang Y, et al. 2005. A dammarane glycoside derived from ginsenoside Rb_3 . *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**(2): 177-179
- [8] Hideo H, Jong HS, Satoshi M, et al. 1996. Main ginseng sponin metabolites formed by intestinal bacteria.

- Planta Medica*, **62**:453–457
- [9] Hyun C, Geun EJ. 2005. Transformation of ginsenosides Rb₁ and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnology Letters*, **27**:765–771
- [10] Lee JY, Shin JW, Chun KC. 2005. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. *Carcinogenesis*, **26**:359–367
- [11] Lee SJ, Go WG, Kim JH. 2000. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochemical Pharmacology*, **60**:677–685
- [12] Lee SJ, Sung JH, Lee SJ. 1999. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Letters*, **144**:39–43
- [13] Li H-Z (李海舟), Zhang Y-J (张颖君), Yang C-R (杨崇仁). 2006. A further investigation on the chemical constituents from the leaves. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), **18**:549–554 (in Chinese)
- [14] Liu X (刘学), Shi J (史俊). 2006. Research and development of green synthesis. *Liaoning Chemical Industry* (辽宁化工), **35**(1):26–29 (in Chinese)
- [15] Lü Q-Y (吕青远). 2006. Chemical constituents and pharmacological effects of saponins of *Panax notoginseng* leave. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药), **17**(10):2065–2066 (in Chinese)
- [16] Park YC, Lee CH. 1996. Ginsenoside-Rh₁ and Rh₂ inhibit the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **40**:751–757
- [17] Sung RK, Kang JC, Kei S, et al. 2003. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg₂, Rh₁, and F₁. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **51**:404–408
- [18] Wang B-L (王伯鲁), Wang X-P (王筱平). 1997. Analysis on green technology. *Environment Herald* (环境导报)(1):29–30 (in Chinese)
- [19] Wang Q-I (王庆礼), Deng H-B (邓红兵). 2002. On eco-ethics and sustainable development of natural resource. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **13**(7):892–894 (in Chinese)
- [20] Xu M-M (徐萌萌), Wang J-F (王建芳), Xu C (徐春), et al. 2006. Sun Qiling microbial transformation of glycosides in traditional Chinese medicine: Mechanism and application. *World Science and Technology—Modernization of Traditional Chinese Medicine* (世界科学技术—中医药现代化), **8**(2):24–27 (in Chinese)
- [21] Yang CR, Kasai R, Zhou J, et al. 1983. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*, **22**(6):1473
- [22] Yuan L (袁凌), Shen Y-T (申颖涛), Jiang T-P (姜太平). 2000. On green technology innovation. *Environment Herald* (环境导报)(6):24–25 (in Chinese)
- [23] Zhou Y (周繇). 2002. Exploitation of medical plant resources in Changbai Mountains. *Journal of Biology* (生物学杂志), **18**(5):38–40 (in Chinese)

作者简介 韩颖,女,1980年生,博士研究生.主要从事药用植物废弃物的生物转化再利用研究,发表论文10余篇. E-mail:tase110@163.com

责任编辑 张凤丽
