

人参皂苷 Rd 高产突变株 *Paecilomyces bainier* sp229-7 的生长特性和生物转化

周超群[▲] 史训龙[▲] 李继扬 周 珮[△]

(复旦大学药学院生物合成药物化学教研室 上海 200032)

【摘要】 目的 通过研究突变株拟青霉菌 sp229-7(*Paecilomyces bainier* sp229-7)的生长及转化底物情况,探讨突变株转化三七茎叶总皂苷的高效性。**方法** 在不同条件下,运用摇瓶转化法考查菌株生长和转化底物特性;分别采用静息态细胞、胞外酶以及粗酶液,测定其对底物转化情况。**结果** 菌体 12~48 h 之间生长最旺盛,36 h 加入底物转化率最高,加入底物后 72 h 转化基本结束,转化产物只有人参皂苷 Rd,底物投料量至少可以达到 20 mg/mL,克分子转化率达 80%以上,转化温度 27 °C~32 °C 之间最佳。静息态细胞、胞外酶以及粗酶液都可以将人参皂苷 Rb1 转化为人参皂苷 Rd。**结论** 与文献报道相比,*Paecilomyces bainier* sp229-7 突变株具有良好的底物耐受性和专一性,快速生长的后期是底物投料的最佳时机,Rb1 转化为 Rd 的时间缩短为 3 d,投料量至少增加 20 倍,显著提高了转化效率,可望应用于工业生产。突变株的高转化效率可能与转化酶由细胞内产生并部分分泌到胞外有关,增加了酶与底物接触机会,避免了产物在胞内过量积累。

【关键词】 人参皂苷 Rd; 生物转化; 菌株特性; 底物耐受; 拟青霉菌 sp229-7

【中图分类号】 R 915 **【文献标志码】** A

The growth and biotransformation characteristics of a high ginsenoside Rd productive mutant strain *Paecilomyces bainier* sp229-7

ZHOU Chao-qun[▲], SHI Xun-long[▲], LI Ji-yang, ZHOU Pei[△]

(Department of Biosynthetic Drug, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the mycelia growth of the mutant strain *Paecilomyces bainier* sp229-7 and its biotransformation from ginsenoside Rb1 to Rd. **Methods** The substrate was biotransformed by the mutant in different conditions, and the products were analyzed by HPLC. **Results** The period of vigorous growth of the mutant was 12 - 48 h. The optimal transformation temperature range was from 27 °C to 32 °C. The best time for adding substrate was 36 h after inoculation and the substrate (Rb1 20 mg/mL) was specifically transformed into ginsenoside Rd. The transformation process was terminated at 72 h. The ginsenoside Rb1 could be transformed to Rd by all of mycelia, crude enzymes and external enzymes.

Conclusions Compared with the reference, the mutant of *Paecilomyces bainier* sp229-7 growth is quicker and the transformation efficiency has been greatly improved. The reaction time can be shortened to 3 days, and the amount of substrate increased at least 20 times.

【Key words】 ginsenoside Rd; biotransformation; strain characteristics; substrate tolerance; *Paecilomyces bainier* sp229-7

现代药理学研究发现,人参的主要活性成分为人参皂苷,现已分离并确定结构的单体皂苷成分近 50 种。人参皂苷 Rd 是二醇型人参皂苷在人体肠道内的主要代谢产物之一,具有广泛的生物活性,对心脑血管、神经系统、免疫系统疾病以及抗辐射等作用

独特^[1-4]。人参皂苷 Rd 在人参属植物中含量较低,因其结构复杂,化学合成至今尚未成功,目前主要依靠从人参、三七等植物根、茎、叶中提取来获得,由于提取方法收率低,成本较高,影响了人参皂苷 Rd 的进一步研究,因此,获得大量、高纯度的人参皂苷 Rd

[▲]共同第一作者(Co-first author)

[△]Corresponding author E-mail: pz19444@yahoo.com.cn

具有重要的研究价值与应用前景。

近年来,大量研究试图通过植物或微生物来源的粗酶或经过纯化的酶制备具有药理活性的人参皂苷 Rd^[5-7]。Kim 等^[8]从 70 多株好气菌中筛选到 12 株,其产生的酶均可将主要皂苷 Rb1 转化为人参皂苷 Rd,底物浓度为 0.47 mg/mL,能将主要皂苷 Rb1 较完全转化的有 3 株菌株,但有人参皂苷 CK 等副产物产生。Son 等^[9]利用 *Thermus caldophilus* 产生的 β -葡萄糖苷酶将主要皂苷 Rb1 转化为 Rd,底物浓度为 1 mg/mL,温度为 75 °C。但由于人参皂苷的抑制作用,当底物采用人参总提取物时,反应时间比用纯 Rb1 延长 30 倍;当人参总提取物浓度达到 4.2 mg/mL 时,人参皂苷 Rd 的转化率从 80% 降低到 12%。Zhao 等^[10]最近报道了从 14 株植物致病菌中筛选到制备 Rd 的转化菌株 *Cladosporium fulvum*,在优化条件下,底物浓度为 0.25 mg/mL,温度为 37 °C,

转化时间为 9 d,最大转化率为 86%,制备规模底物投料量最大为 100 mg,转化率为 80%。这些文献方法普遍存在转化过程中转化产物不专一、作为转化底物的主要皂苷浓度低、底物对酶有抑制作用、转化周期长等问题,难以用于人参皂苷 Rd 的工业化生产。

菌株是生物转化的关键,上述问题的出现与文献方法制备人参皂苷 Rd 的菌株都是野生型有很大关系。人参皂苷对菌株生长以及对酶的抑制作用成为制约人参皂苷 Rd 工业化制备的主要因素。本实验室通过 UV-LiCl 联合诱变得到可以将人参皂苷 Rb1 专一性转化为人参皂苷 Rd 的突变菌株 *Paecilomyces bainier* sp229-7(图 1),该菌株对转化底物三七茎叶皂苷有较强的耐受性。本文通过研究突变株 *Paecilomyces bainier* sp229-7 的生长特性及转化底物情况,探讨突变株转化底物的高效性。

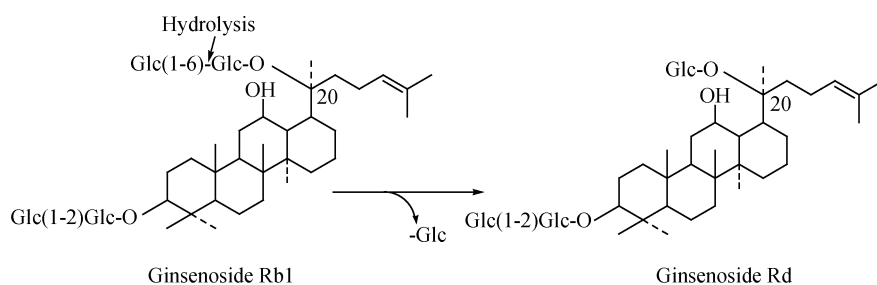


图 1 人参皂苷 Rb1 到 Rd 的转化途径

Fig 1 The transformation pathway of ginsenoside Rb1 to Rd

材料和方法

菌株 通过 UV-LiCl 联合诱变对亲代菌株 *Paecilomyces bainier* sp229 进行诱变,并且在高浓度三七茎叶皂苷培养基中培养,筛选出耐受 60 mg/mL 三七茎叶皂苷的菌株,进一步通过摇瓶培养筛选得到可以将人参皂苷 Rb1 专一性转化为人参皂苷 Rd 的菌株 *Paecilomyces bainier* sp229-7。

培养基 斜面培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;种子培养基(g/L):蔗糖 30,黄豆粉 30,硫酸铵 1,硫酸镁 1,氯化钙 1,麸皮 5;生长培养基(g/L):葡萄糖 20,花生粉 20,硝酸钠 0.5,磷酸二氢钾 1,磷酸氢二钠 2,硫酸亚铁 0.2,硫酸锌 0.1,硫酸铜 0.2,氯化钙 1,硫酸镁 0.5。

接种后摇床培养(220 r/min、28 °C),每个条件下重复 3 次,结果取平均值。

药品与试剂 三七茎叶皂苷(云南香格里拉生物技术有限公司),人参皂苷 Rb1 含量为 62.08%,人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd 标准品(中国药品生物

制品检定所)。

HPLC 法检测条件 色谱柱: C₁₈ (Waters Symmetry, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm);检测波长: 203 nm;柱温: 30 °C;流动相: 乙腈:水 = 48:52;流速: 0.8 mL/min。样品用 70% 甲醇溶解。

菌体生长及 pH 变化 取 0、12、24、36、48、60、72 h 等 7 个时间点检测 pH,并在显微镜下观察菌体的生长情况,每个摇瓶取 20 mL 菌液,5 000 g 离心 10 min,去除上清液,称量菌体的湿重。考察不同生长时间的单位菌体重量及 pH 变化。

不同投料时间比较 接种时,培养基中加入转化底物记为 0 h,之后每 12 小时即第 12、24、36、48 和 60 小时分别加入底物,一共 6 个时间点,每个时间点从接种开始,菌体的生长和转化总时间均为 108 h,通过检测底物的转化情况得出最佳的投料时间。

不同转化时间比较 接种后培养 36 h,加入底物转化,之后分别于转化 6、12、24、48、72 和 84 h 取样,测定底物的转化情况。

不同底物投料量比较 按发酵液体积的 1%、

2%、3%、4%、5%和6%的量加入三七总皂苷,对应皂苷浓度分别为10、20、30、40、50和60 mg/mL。考察不同投料量时转化产物的情况。

不同温度比较 分别考察在25℃、28℃、31℃、34℃和37℃时,菌体对底物的转化情况和转化产率,得出最佳的生长和转化温度。

静息态细胞、胞外酶及粗酶液转化总皂苷 接种后,28℃、220 r/min摇床上培养36 h,菌液5 000 g离心10 min,取上清60 mL,分装入3个三角烧瓶,每瓶20 mL,编号为C。菌体用pH 5.0磷酸缓冲液洗涤2遍,取菌体30 g悬浮于60 mL pH 5.0磷酸缓冲液中,分装入3个三角烧瓶,每瓶20 mL,编号为A。取30 g洗涤后的菌体加入60 mL pH 5.0磷酸缓冲液,100 Hz超声破壁处理1 h,5 000 r/min离心10 min,取上清液(粗酶液),分装入3个三角烧瓶,每瓶20 mL,编号为B。每个三角烧瓶中加入400 mg三七总皂苷和0.5% Tween-80溶液,继续在28℃、220 r/min摇床上培养72 h。

结 果

生长过程中菌体重量及 pH 变化 在不加入底物时,菌体自然生长情况下,菌体在前12 h内重量基本没有变化,之后迅速增加,48 h时菌体重量最大,之后菌重开始减轻。整个过程中,pH从5.0逐步升高到7.0(图2)。

不同投料时间比较 36~60 h之间投料最好,产物的产率相差不大。为了缩短发酵时间,选择36 h时加入底物,见图3。

不同转化时间比较 根据产物生成的规律可以判断转化时间。从投料开始,一直到72 h时不断有产物生成,转化产率不断提高,之后维持在85%左右,见图4。因此,摇瓶发酵转化时间在72 h时比较合适。

不同底物投料量比较 在250 mL摇瓶装液量为30 mL,加入底物量为10~60 mg/mL的条件下,考察了三七茎叶皂苷转化为人参皂苷Rd的产率情况。结果表明10~20 mg/mL之间,产率达到84%,随着底物量增加,转化产率有所降低,见图5。底物投料量为20~30 mg/mL时,产率降低明显,底物投料量为30~60 mg/mL时,转化产率略有降低,但维持在70%~80%之间的水平。考虑到工业生产上的生产效率,可以将投料量提高到6%。

不同温度比较 菌体的生长和转化过程都在各种酶催化下进行,从酶反应动力学来看,温度升高,反应速率加快、生长代谢加速、发酵周期缩短,但是

高温下酶失活也愈快,菌体易衰老自溶。从图6可以看出温度在28℃~31℃时,产率最高,超过这个范围则产率下降较快。

突变株与亲代菌株转化产物比较 HPLC检测结果显示,亲代菌株将总皂苷转化为人参皂苷CK,而突变株可以专一性转化得到人参皂苷Rd(图7)。

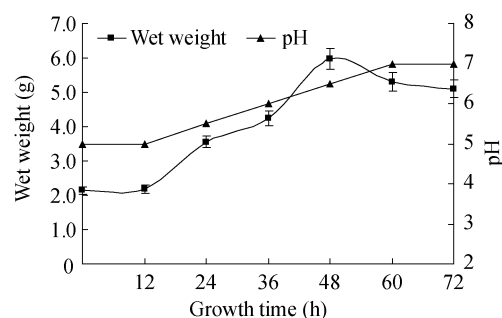


图2 不同生长时间菌体湿重和pH变化曲线

Fig 2 The variation curves of wet weight and pH at different stages

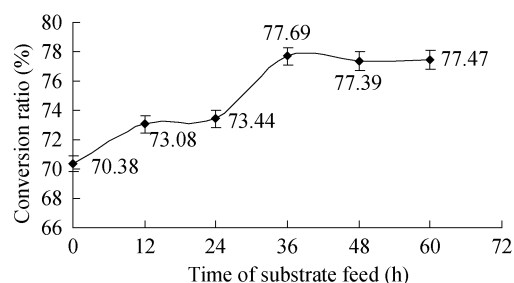


图3 投料时间对人参皂苷Rd转化影响

Fig 3 Effect of time of feed substrate on ginsenoside Rd production

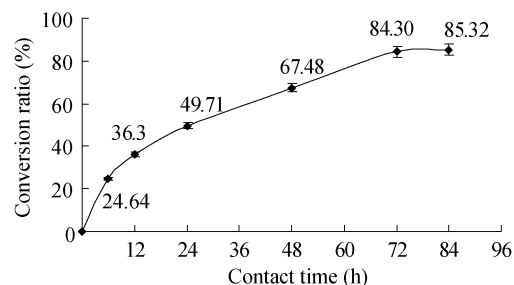


图4 转化时间对人参皂苷Rd转化影响

Fig 4 Effect of contact time on ginsenoside Rd production

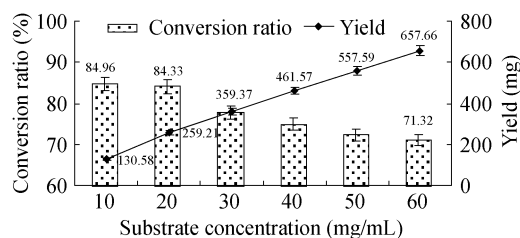


图5 底物浓度对人参皂苷Rd转化影响

Fig 5 Effect of substrate concentration on ginsenoside Rd production

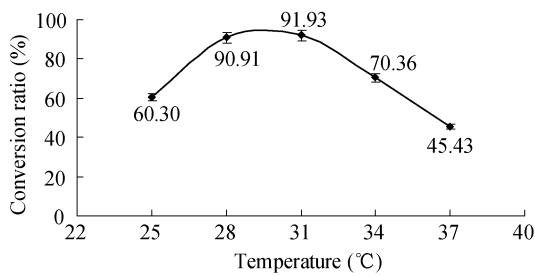


图6 温度对人参皂苷Rd转化影响

Fig 6 Effect of temperature on ginsenoside Rd production

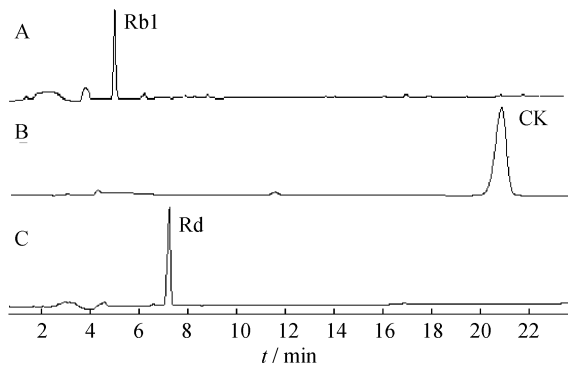
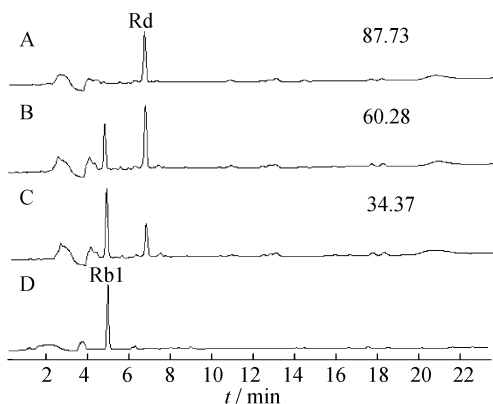


图7 亲代和突变株转化产物HPLC检测图

Fig 7 HPLC profiles of the products converted by parental and mutant strains

A: Substrate, B: Parental strain, C: Mutant strain
Paecilomyces bainier sp229-7

静息态细胞、胞外酶以及粗酶液转化总皂苷分别考查了静息态细胞、胞外酶以及粗酶液转化总皂苷的情况。结果表明,菌体、上清以及粗酶液对总皂苷都有不同程度的转化,如图8,静息态细胞(A)可以将底物总皂苷完全转化,Rd产率为87.73%,粗酶(B)和胞外酶(C)转化产率分别为60.28%和34.37%。

图8 突变株 *Paecilomyces bainier* sp229-7 的不同媒介转化产物HPLC图Fig 8 HPLC profiles of the products converted by different media of the mutant *Paecilomyces bainier* sp229-7

A: Mycelia; B: Crude enzymes; C: External enzymes;
D: Substrate. The yield (%) represented by the number.

讨 论

通过研究突变株 *Paecilomyces bainier* sp229-7 的生长及转化底物情况发现,该菌株对三七茎叶皂苷的转化具有高效性。菌体在12~48 h之间生长最旺盛,36 h时加入底物转化率最高,结果表明,摇瓶投料时间是与菌丝种龄相关的,过于年轻的菌丝中加入底物后,菌丝生长受到影响,直接影响后面转化的产率;菌的种龄过老,酶的活力也会下降,同样不利于产物转化,菌体快速生长的后期是底物投料的最佳时机。加入底物后72 h转化基本结束,底物投料量至少可以达到20 mg/mL,转化温度27°C~32°C最佳。与已报道的野生型转化菌株最好水平相比,在相同的80%转化率时,底物的投料量增加20倍,克服了野生型菌株在高浓度下转化率下降问题,突变株增强了耐受底物能力,专一性转化底物至人参皂苷Rd,转化时间缩短,投料量增加,提高了转化效率。

菌种是生物转化的基础。从植物生长的环境中筛选菌株是菌株筛选的一个重要途径,筛选得到的菌株具有转化该植物化学成分能力的可能性也较大。实验中的亲代菌株从野山参生长的土样中分离得到,该菌株可以将人参总皂苷转化为人参皂苷CK,转化途径可能为人参皂苷Rb1→Rd→F2→CK^[11,12],但是转化过程中发现,产物主要积累在细胞内,胞外没有产物形成。高浓度人参总皂苷对菌株的转化率有较大影响,随着皂苷浓度提高,转化率并没有相应提高。

人参皂苷对转化菌株的抑制现象是人参皂苷转化过程中普遍存在的问题,菌株对转化底物的耐受性提高将有助于转化率的提高。通过UV-LiCl联合诱变得到的可以将人参皂苷Rb1专一性转化为人参皂苷Rd的突变菌株 *Paecilomyces bainier* sp229-7,底物三七茎叶总皂苷中人参皂苷Rb1含量高,该菌株对底物有较强的耐受性。

筛选得到的菌株酶的产生方式与亲代有较大差异, *Paecilomyces bainier* sp229-7 转化酶由细胞内产生,可以分泌到胞外,不论胞内胞外,酶对总皂苷都有转化作用。这样,产物不会过量积累于细胞内而损害菌体生长,并且分泌到胞外的酶也能发挥作用,增加了酶与底物接触机会,使得转化效率提高。而亲代菌株转化酶主要在胞内,产物主要在细胞内累积^[13],产物的积累会对菌株正常生长以及转化酶造成不良影响,这也许是突变株转化底物浓度高的

(下转第67页)