

三七中分离微生物对其转化的初步研究

赵方允 虞泓 陈自宏 曾文波 殷勤红 葛锋

摘要 **目的** 从云南三七材料中分离共生菌,对三七进行发酵转化,研究转化后皂苷成分的变化。**方法** 采用平板划线分离法,从三七根茎、花、种子等材料中分离纯化共生菌,经液体发酵,通过 TLC、UV、HPLC 等检测方法,对转化前后皂苷变化进行分析。**结果** 共分离出真菌 27 株,细菌 2 株初步筛选出两株对皂苷单体转化明显的菌株,转化后总皂苷含量有所增加。**结论** 从三七材料中分离的真菌可以对三七进行定向转化,得到稀有皂苷,并提高总皂苷含量。

关键词 三七 真菌 发酵 人参皂苷 皂苷

A Study on Transformation of *Panax Notoginseng* by Microbes Isolated from *Notoginseng*. Zhao Fangyun, Yu Hong, Chen Zihong, Zeng Wenbo, Yin Qinrong, Ge Feng. Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Yunnan 650091, China

Abstract Objective The microbes were isolated from notoginseng materials sampled in Yunnan. After the microbes were isolated into transforming notoginseng, the chemical ingredients of saponin were determined. **Methods** With plate streaking method, the microbes were isolated from samples of *notoginseng* roots, flowers, and seeds. After the microbes being isolated into liquid fermentation of the notoginseng samples, the changes of saponins were analysed by TLC, UV and HPLC methods. **Results** The twenty – seven microbes were identified as fungi and two as bacteria by microbial classification. The two strains of fungi were selected to convert ginsenosides into monomer. **Conclusion** The strains of fungi isolated from notoginseng samples could directionally transform ginsenosides into some rare single compounds of saponins, with increasing total ginsenosides.

Key words *Panax notoginseng*; Fungi; Fermentation; Ginsenosides; Saponin

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属植物,是传统名贵中药,具有多方面生理活性。其主要活性成分人参皂苷属于达玛烷型四环三萜类皂苷,依据苷元不同,可分为原人参二醇皂苷如 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Rh₂, 原人参三醇皂苷如 Re、Rg₁、Rg₂、R_f、Rh₁ 等^[1]。在三七中人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 含量较高,而 Rg₃、Rh₂、compand K 等含量甚微。

目前,人参皂苷主要从三七和人参等植物中分离获取。许多药理研究表明,稀有人参皂苷(如 Rh₁、Rh₂、Rg₃、Rb₃ 等)在某些难治性疾病如肿瘤治疗方面显示独特的疗效^[2,3]。但由于原药材生长周期长,资源短缺,价格昂贵。因此,国内外学者采用化学法、组织培养法、酶法等做了不少研究。然而,这些方法由于反应条件不好控制、副产物多、成本高等种种原因,目前还无法用于工业化生产^[4~6]。近年来,利用微生物

转化法对人参皂苷进行生物转化,制备稀有人参皂苷,取得了不少有意义的成果,对转化机制的研究也取得不少进展^[7]。采用微生物发酵法获取人参皂苷,反应周期短,成本低,条件易于控制。本研究利用从三七材料中分离纯化得到的微生物对三七进行转化,对转化前后皂苷变化进行分析研究,以期获得具有较强生理活性的稀有皂苷,为更好地利用三七资源开辟新的途径。

材料与方法

1. 仪器:高效液相色谱仪(戴安 ULTIMATE 3000 LPG – 3400A 四元梯度泵, WPS – 3000SL 自动进样器, PDA – 3000 二极管阵列检测器, TCC – 3000 柱温箱);戴安 ACCLAIM C18 色谱柱(5 μ m, 4.6mm $\times$ 250mm);“变色龙”控制分析色谱工作站软件;紫外可见分光光度计(T6 系列,北京普析通用仪器有限责任公司);高速万能粉碎机 FW – 100(北京中兴伟业仪器有限公司);卧式圆形压力蒸汽灭菌器 YXQ. WY(上海医用核子仪器厂);电热恒温水浴锅 DZKW – 8 – 6(北京市永光明医疗仪器厂);无菌操作台(苏州净化设备有限公司);SCS – 24 SHAKER 恒温摇床(上海离心机械研究所);电子天平(sartorius AG Bp221S);eppendorf 移液器(100 μ l, 德国);硅胶高效 G 板(50mm $\times$ 100mm, 5cm $\times$ 2cm 厚度 0.20 ~ 0.25mm, 批号 08AT2, 青岛海洋化工厂)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060044)

作者单位:650091 昆明,云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室(赵方允、虞泓、陈自宏、曾文波、殷勤红);650051 昆明市延安医院(赵方允);650224 昆明理工大学生命科学与技术学院(葛锋)

通讯作者:虞泓,教授,博士生导师,电子信箱: hongyu@ ynu. edu. cn 或 herbfish@ 163. com

2. 药品:三七(40头,产地云南,批号20091101,安徽新兴中药材饮片有限公司);三七花、毛根等均购于云南;三七皂苷 R_1 (批号110745-200415),人参皂苷 R_{g_1} (批号110703-200424),人参皂苷 R_{b_1} (批号110704-200318),人参皂苷 R_e (批号110754-200320),均购于中国药品生物制品检定所;三七总皂苷(云百草实验室自制);PPDA培养基(自配)。

3. 主要试剂:乙腈、甲醇均为美国fisher色谱纯;发酵用水为自来水;其余水为纯净水;其他试剂均为分析纯。

4. 微生物的分离与纯化:将三七根茎、须根、花、种子等分别粉碎,使用PPDA培养基,采用稀释划线(涂布)平板分离法,菌落长出后,挑取不同形态菌丝分别接种于新鲜培养基上,反复纯化。最终挑取单菌落转入试管斜面PPDA培养基,于4℃冰箱保存。

5. 培养基的配制及发酵:将三七根茎粉碎,过60目筛,粗颗粒再次粉碎直至完全过筛,混匀。精密称取三七粉5g于培养瓶中,加入0.1ml无机盐(10% KH_2PO_4 , 5% $MgSO_4$), 100ml自来水,配成5%的溶液,平行做33瓶。于121℃流通蒸汽灭菌35min即得三七培养基。取分离到的菌株6株分别接种于PPDA培养基,25℃活化至产孢子后分别接种于灭菌后冷却的三七培养基中,每菌10瓶,留3瓶做灭菌对照。将接种好的培养瓶放于恒温摇床(25℃, 100r/min)发酵120h。将发酵好的培养液用纱布过滤,滤渣(菌丝体)用自来水(超声)洗至无色,合并入滤液,水浴蒸干,滤渣烘干,分别编号。

6. 薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)分析:将原药材(O)、三七总皂苷(T),滤液(Y)和滤渣(Z)分别取适量用甲醇溶解,超声30min。分别点样,展开剂为氯仿:甲醇:水=7:3:0.5,展开后,挥干溶剂,喷5% H_2SO_4 -EtOH溶液,120℃加热显色,并计算 R_f 值。

7. 总皂苷含量测定(紫外分光光度法 ultraviolet spectrophotometry, UV):(1)标准曲线的制备:参照采用香草醛-高氯酸比色法^[8],精密称取三七皂苷 R_1 对照品适量,加甲醇制成每毫升含0.4mg的对照品溶液,用移液器精密吸取三七皂苷 R_1 50、100、150、200、250、300、350 μ l分别注入具塞试管中,去塞,挥干溶剂,分别精密加入新配制的5%香草醛冰醋酸溶液0.2ml,高氯酸0.8ml,摇匀,于60℃水浴中加热15min,取出后立即用冷水冷却,分别精密加入冰醋酸5ml,摇匀,放置10min,即得三七皂苷 R_1 标准溶液。精密称取三七总皂苷对照品适量,加甲醇制成每毫升含0.8mg的对照品溶液,精密吸取三七总皂苷20、50、100、150、200、250 μ l同上操作,即得三七总皂苷标准溶液。在最大吸收波长下测定吸光度,计算回归方程。(2)最大吸收波长测定:将处理好的三七皂苷 R_1 对照品溶液精密吸取200 μ l,按照标准曲线的制备项下注入具塞试管开始。显色后在450~650nm范围内每间隔2nm测吸光度A,绘制曲线,观察最大吸收波长。(3)样品的制备与测定:精密称取原药材(O)、灭菌对照(D),滤液(Y)和滤渣(Z)适量,置于25ml容量瓶中,加甲醇定容,超声提取10min,0.45 μ m微孔滤膜过滤,分别精密吸取40 μ l,按标准曲线的制备项下处

理,测定吸光度A,带入回归方程计算浓度,并折算成相当于原药材的含量。

8. HPLC测定(high performance liquid chromatography, HPLC):采用梯度洗脱法,流动相为乙腈:水(0~24min, 22:78;24~40min, 22:78~33:67;40~90min, 33:67~48.6:51.4;90~93min, 48.6:51.4;93~105min, 48.6:51.4~90:10;105~108min, 90:10;108min, 22:78),进样量15 μ l,流速1ml/min;检测波长:203nm;柱温:30℃。精密称取原药材(O)、发酵对照(D), Y_{03} 、 Y_{04} 、 Y_{06} 、 Z_{04} 各0.50g,置于25ml容量瓶中,加甲醇定容,放置过夜,超声提取30min,0.45 μ m微孔滤膜过滤,上柱,记录图谱数据。

结 果

1. 微生物分离结果:共分离到真菌27株(编号 F_{01} ~ F_{27}),编号情况见表1。

表1 发酵产物编号情况

菌株	滤液	滤渣(菌丝体)
F_{01}	Y_1	Z_1
F_{02}	Y_2	Z_2
F_{03}	Y_3	Z_3
...	...	...
F_{27}	Y_{27}	Z_{27}

2. TLC结果:见图1。可以看出,发酵滤液中均多出小极性皂苷,其中 Y_{03} 中出现的皂苷显色点较多,在254nm紫外灯下可以看出 Y_{03} 有两个荧光点; Y_{04} 中 R_{b_1} 消失同时出现了一系列小极性皂苷;而 Y_{01} 、 Y_{02} 、 Y_{06} 变化不明显。菌丝体中也有少量的皂苷点,颜色较浅,但 R_f 值与滤液中基本一致。通过设计固体培养将菌丝体与培养基分离后,发现有三七提取液的培养基菌丝体中也含有皂苷成分,这说明,有些皂苷是不能通过水洗转移至滤液,其所含的皂苷成分不易溶于水但可溶于甲醇。所以 F_{03} 、 F_{04} 对三七皂苷的转化作用明显,具有研究价值。

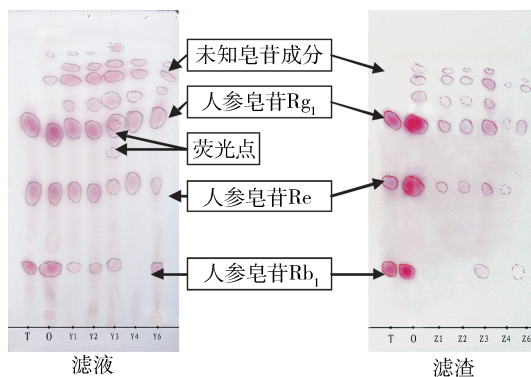


图1 发酵物TLC结果

3. 最大吸收波长:通过波长扫描,结果在 550nm 处有最大吸收,见图 2。

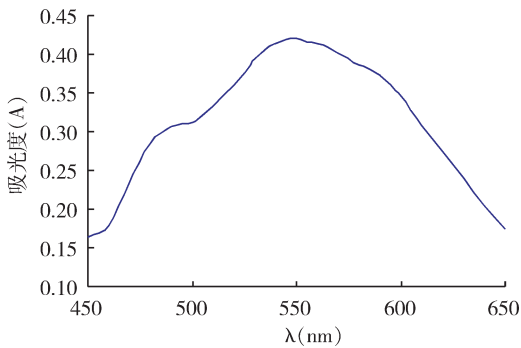


图 2 三七皂苷 UV 收波长扫描

在 550nm 处测定三七皂苷 R_1 和三七总皂苷的吸光度 A。以吸光度 A 为纵坐标 (Y),浓度为横坐标 (X),绘制标准曲线,计算回归方程。三七皂苷 R_1 : $Y = 0.0268X + 0.0611$; 三七总皂苷: $Y = 0.022X + 0.0987$ 。结果表明,三七皂苷 R_1 在 20 ~ 140 $\mu\text{g/ml}$ 之间呈良好线性,三七总皂苷在 18 ~ 200 $\mu\text{g/ml}$ 之间呈良好线性。

4. 总皂苷含量测定结果:见表 2。可以看出,发酵后产物总皂苷含量都有所增加。以三七皂苷 R_1 与三七总皂苷两种做标准计算三七总皂苷含量相近,无显著性差异。

样品	标准三七皂苷 R_1		标准三七总皂苷	
	总皂苷含量	合计	总皂苷含量	合计
原药材	9.62	9.62	9.62	9.62
灭菌对照	8.95	8.95	8.34	8.34
Y_{03}	9.11	10.70	9.91	11.40
Z_{03}	1.59	1.49		
Y_{04}	10.49	11.00	11.40	11.65
Z_{04}	0.51	0.24		
Y_{06}	11.80	13.25	13.18	14.41
Z_{06}	1.44	1.23		

5. HPLC 结果:见图 3 和图 4。由图 3 看出 Y_{03} 中人参皂苷 R_{g1} 、 Y_{04} 中人参皂苷 R_{b1} 几乎完全消失,同时出现新的皂苷峰 5 和 6,与 TLC 结果基本一致。决定针对菌株 F_{04} 的发酵产物做进一步的研究。由图 4 看出 Z_{04} 中仍含有皂苷成分 5,说明菌丝体中也含有皂苷成分,不易被水溶解,但可被甲醇溶解。

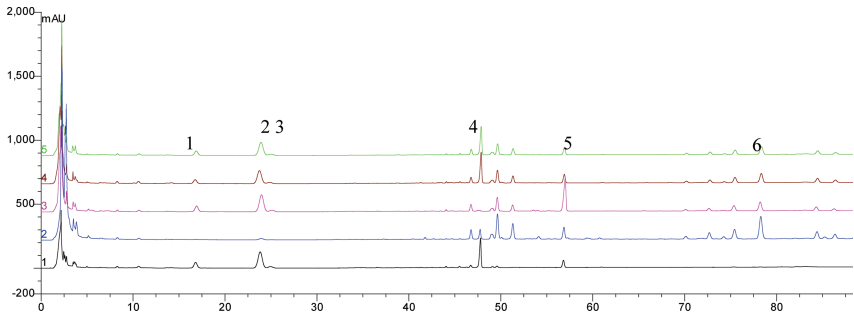


图 3 发酵三七 HPLC 分析

由下往上:O、 Y_{03} 、 Y_{04} 、 Y_{06} 、D。1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g1} ; 3. 人参皂苷 R_e ; 4. 人参皂苷 R_{b1}

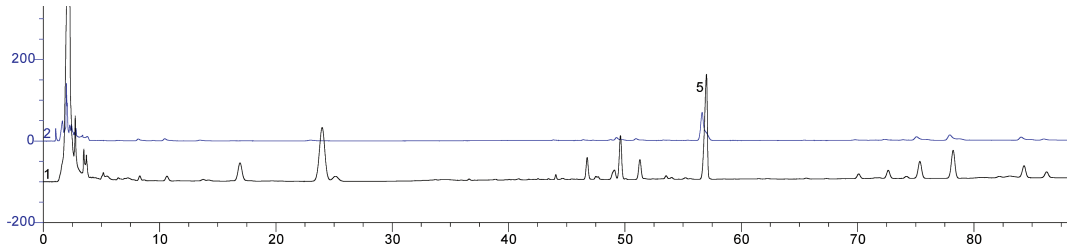


图 4 菌株 F_{04} 发酵后 HPLC 分析

由下往上: Y_{04} 、 Z_{04}

讨 论

目前,国内外都有不少关于微生物转化人参和三

七中皂苷的报道,微生物来源有从人参生长的土壤中分离、试验室保存菌株筛选、大型药食两用菌、肠内菌

群或从真菌中分离的酶^[9,10]。本研究利用从三七的各种材料中分离纯化微生物,寻找适合三七生长的共生菌株,更有可能发现新的转化三七皂苷的微生物。

本研究利用从三七材料中分离的微生物对三七根茎进行转化,对比 HPLC、TLC 及总皂苷含量,筛选出具有明显转化的菌株,初步鉴定菌株 F_{03} 为根霉属 (*rhizopus*) 真菌,菌株 F_{04} 为毛霉属 (*mucor*) 真菌。由于菌株鉴定发现 F_{04} 与 F_{05} 为同种真菌,故 F_{05} 未做 TLC、UV 和 HPLC 的测定。关于三七总皂苷的测定方法,目前多采用紫外可见分光光度法,有香草醛-高氯酸显色法和浓硫酸裂解法,吸收波长选择有 560nm 和 545nm,本文采用香草醛-冰醋酸显色法,通过波长扫描,确定最大吸收波长为 550nm。

由样品测定结果看,菌株 F_{03} 、菌株 F_{04} 和菌株 F_{06} 发酵产物中总皂苷含量略高于原药材与灭菌对照。结合 TLC 和 HPLC 结果可以得出结论,三七微生物转化过程中总皂苷含量略有增加,在三七皂苷单体间进行了转化,一种皂苷如菌株 F_{04} 转化后 Rb_1 点的消失,必定有其他皂苷成分的增加,由 TLC 看出 R_f 值大的斑点颜色加深、变多,都可以说明问题。三七中含量比较高的人参皂苷如 Rb_1 可能转化成稀有人参皂苷(原药材中没有或含量甚微)如 Rg_3 ,因其结构上仅是 20 位糖基的差别,利用结构分析来解析微生物转化人参皂苷的机制,如果能够鉴定出皂苷单体的结构,并研究药理作用,对稀有人参皂苷的研究具有重大价值。

由图 3 看出,菌株 F_{04} 的发酵产物 Y_{04} 中皂苷 5 峰值较高,峰面积大。由图 4 看出, Z_{04} 中仍含有皂苷成分 5,说明菌丝体中也含有皂苷成分,不易被水溶解,但实验中发现用甲醇仍能溶解部分皂苷成分。本研

究中在对菌株 F_{04} 转化后的三七产物成分进行分离,发现 TLC 中 R_f 值大于 Rg_1 的皂苷成分极性较小,呈油状,具有一定挥发性,不太稳定,可能受光热影响分解。在分离中应当严格控制条件,控制温度,并少过柱子分离,以提高产率。同时分离到 R_f 值小于 Rb_1 成分,极性较大溶于含水甲醇,可能为皂苷水解掉的糖类成分。目前对于发酵产物的分离、纯化和结构鉴定正在进一步研究之中。

参考文献

- 1 Jeong CS, Murthy HN, Hahn EJ, *et al.* Improved Production of Ginsenosides in Suspension Cultures of Ginseng by Medium Replenishment Strategy. *Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105 (3) : 288 - 291
- 2 李学哲, 朴惠顺. 人参皂苷 Rh_2 含量测定方法及药理作用研究现状. *延边大学医学学报*, 2009, 32 (2) : 153 - 155
- 3 Wang CZ, Xie JT, Fishbein A, *et al.* Antiproliferative Effects of Different Plant Parts of *Panax notoginseng* on SW480 Human Colorectal Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 2009, 23 : 6 - 13
- 4 刘娜, 朴虎日, 赵余庆. 稀有抗肿瘤人参皂苷衍生物的制备与分离. *中药材*, 2009, 32 (5) : 707 - 709
- 5 郑光植, 王世林. 三七愈伤组织的培养. *云南植物研究*, 1989, 11 (3) : 255 - 262
- 6 姜彬慧, 韩颖, 赵余庆, 等. 酶转化三七叶总皂苷制备人参皂苷 C-K 的工艺优化. *中草药*, 2004, 35 (9) : 986 - 988
- 7 赵方允, 陈自宏, 虞泓, 等. 微生物转化人参皂苷研究进展. *中国医药生物技术*, 2010, 5 (3) : 216 - 219
- 8 谭朝阳, 袁宏伟, 尤昭玲. 三七有效成分的分离纯化研究. *中医药导报*, 2010, 16 (1) : 63 - 65
- 9 崔宇, 姜彬慧, 韩颖, 等. 微生物对人参果总皂苷化合物 K 的转化作用. *中草药*, 2007, 38 (2) : 189 - 193
- 10 吴秀丽, 王艳, 赵文倩, 等. 一种真菌对人参皂苷 Rg_3 的转化. *微生物学报*, 2008, 48 (9) : 1181 - 1185

(收稿: 2010 - 12 - 14)

(修回: 2011 - 05 - 31)

四嗪二甲酰胺对 K562 和 K562/Adr 的作用及其与 NF- κ B 信号分子的关系

张玉霞 周永列 徐菲 邱莲女

摘要 目的 探讨四嗪二甲酰胺 (ZGDHu-1) 对慢性粒细胞白血病细胞株 K562 (K562-S) 和耐药细胞株 K562/Adr (K562-R) 的抑制作用及其对 p210 BCR/Abi 融合蛋白和转录核因子 κ B (NF- κ B) 表达的影响。**方法** MTT 比色法观察其对

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973568)

作者单位: 310014 杭州, 浙江省人民医院检验中心

通讯作者: 周永列, 电子信箱: lab_zyl@126.com