

· 化学与分析 ·

总状毛霉对20(S)-原人参二醇的微生物转化及条件优化

陈广通, 杨雪, 葛红娟, 李建林, 宋妍*

(南通大学药学院, 江苏南通 226001)

[摘要] 目的:利用微生物转化的方法构建20(S)-原人参二醇过氧衍生物的新合成途径,并对转化条件进行优化,提高过氧衍生物的产率。**方法:**选取总状毛霉 *Mucor racemosus* AS 3.205 为转化菌株,从接菌量,底物浓度,转化时间,加样时间,温度,转速等方面对转化条件进行优化。**结果:**获得2个20(S)-原人参二醇过氧衍生物,20(S)-原人参二醇为25,26-烯-24(R)过氧羟基-20(S)-原人参二醇和23,24-烯-25过氧羟基-20(S)-原人参二醇;获得了优化的转化工艺,即接种量为10%,底物浓度为0.25 mmol·L⁻¹,加样时间为转种后48 h,培养温度为28℃,转化时间为5 d,摇床转速为150 r·min⁻¹。**结论:**该方法能简便的获得20(S)-原人参二醇过氧衍生物,采用优化后的转化条件25,26-烯-24(R)过氧羟基-20(S)-原人参二醇和23,24-烯-25过氧羟基-20(S)-原人参二醇的产率均明显增大。

[关键词] 20(S)-原人参二醇; 过氧衍生物; 微生物转化; 总状毛霉 AS 3.205

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0034-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080034

Biotransformation Optimization of 20(S)-protopanaxadiol by *Mucor racemosus* AS 3.205

CHEN Guang-tong, YANG Xue, GE Hong-juan, LI Jian-lin, SONG Yan* (School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to provide a new approach to synthesize hydroperoxylated products of 20(S)-protopanaxadiol, and to optimize the microbial transformation conditions by *Mucor racemosus* AS 3.205. **Method:** Biotransformation conditions were optimized by altering several influencing factors. The yields of two hydroperoxylated products of 20(S)-protopanaxadiol were evaluated. **Result:** Two metabolites were isolated and identified as 25, 26-en-24(R)-hydroperoxyl-20(S)-protopanaxadiol and 23, 24-en-25-hydroperoxyl-20(S)-protopanaxadiol. The optimal transformation condition was as following: an inoculation amount at 10%, substrate concentration at 0.25 mmol·L⁻¹, sample injected after inoculated 48 h, transformation time of 5 d, culture temperature at 28℃, and shaking speed at 150 r·min⁻¹. **Conclusion:** Microbial transformation system by *M. racemosus* AS 3.205 can be used to obtain hydroperoxylated products of 20(S)-protopanaxadiol. The yields of two hydroperoxylated products could be greatly increased under the optimized condition.

[Key words] 20(S)-protopanaxadiol; hydroperoxylated products; microbial transformation; *Mucor racemosus* AS 3.205

20(S)-原人参二醇是人参,三七,西洋参,绞股蓝等药用植物中皂苷类物质(包括Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂)的主要苷元^[1-3]。20(S)-原人参二醇具有抑制癌细胞转移,改变癌细胞膜完整性,终止

癌细胞的细胞周期,诱导癌细胞凋亡等作用,使其成为人参皂苷中具有最强的抗癌活性的皂苷类成分之一^[4-7]。与相应的皂苷相比,20(S)-原人参二醇相对分子质量和极性都小,便于吸收入血而发挥药理

[收稿日期] 20140830(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102327)

[第一作者] 宋妍,硕士,中级工程师,从事天然药物化学研究, Tel:0513-85051728, E-mail:violet200599@ntu.edu.cn

[通讯作者] * 陈广通,博士, Tel:0513-85051749, E-mail:guangtong_chen@ntu.edu.cn

作用^[8]。因此,20(S)-原人参二醇是很有前景的癌症预防和治疗药物。但是 20(S)-原人参二醇属于脂溶性皂苷元,几乎不溶于水,很难制成注射剂进行应用,限制了其临床应用^[9]。

为了满足医药学的研究和特殊用途,更好地开发利用原人参二醇,人们对原人参二醇的结构改造进行了广泛的研究。对原人参二醇的结构改造主要有化学法,酶法和微生物法。主要是对其醇羟基的酯化和氧化还原等,得到烷基衍生物,脂肪酸酯及其碱金属盐,氨基酸衍生物等^[10-13]。而原人参二醇过氧衍生物的制备研究报道较少。

本试验对 20(S)-原人参二醇进行了生物转化及其转化条件的优化研究。获得了 2 个 20(S)-原人参二醇过氧衍生物,为 20(S)-原人参二醇的结构修饰开辟了一条新的途径。在生物转化条件的优化方面,从接菌量,底物浓度,加样时间,培养时间,培养温度以及摇床转速几方面对转化条件进行优化,以期寻找最合适的转化条件,提高过氧衍生物的产率。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Bruker AVANCE 400 型核磁共振谱仪(TMS 为内标,瑞士 Bruker 公司),SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏净集团安泰公司),ZHWHY-2102 型振荡培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司),CH-2 型显微镜(日本 Olympus 公司),色谱纯乙腈(Merck 公司),其他分析纯化学试剂均为国药集团化学试剂有限公司产品。

20(S)-原人参二醇(PPD,南京泽朗有限公司,批号 111747-201107)。实验用菌种总状毛霉(*Mucor racemosus* AS 3.205)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

2 方法与结果

2.1 培养基的制作

种子培养基的制作:取新鲜土豆 200 g,去皮,切成小丁,加入 1 000 mL 水煮沸,保持沸腾状态约 30 min,用纱布过滤,加水定容至 1 000 mL,定容前加入 20 g 的葡萄糖,5 g 的淀粉,250 mL 的锥形瓶装入 100 mL 培养液。

发酵培养基的制作:取新鲜土豆,去皮,切成小丁,加入 5 倍量水煮沸,保持沸腾状态约 30 min,用纱布过滤,加水定容,每 200 g 土豆配制 1 L 培养液,定容前加入 20 g 的葡萄糖,1 000 mL 锥形瓶装入 400 mL 的培养液。

PDA 培养基的制作:按前法制备好土豆培养

基,加入质量分数为 1.5% 的琼脂粉,加热振荡均匀后分装入试管(10 mm × 150 mm)中,5 mL/管。

2.2 生物转化方法

2.2.1 菌种的保藏

菌种于固体斜面培养基上置 4 °C 冰箱保存。

2.2.2 生物转化

在超净工作台中用接种针将菌丝从斜面培养基接种于内装 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中。于摇床上 160 r·min⁻¹,26 °C 下培养 2 d 后,加入 0.2 mL 20(S)-原人参二醇(10 g·L⁻¹ 95% 乙醇溶液),继续培养 7 d 后收获。培养结束后将发酵液过滤,滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 遍,合并乙酸乙酯萃取液浓缩至干,残渣用甲醇溶解,待检;菌丝体用适量的甲醇超声提取 30 min,滤去菌丝体的甲醇液浓缩至干,用甲醇溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,续滤液用 HPLC 进行分析。

同时设计空白组:Ⅰ. 培养菌液中不加入底物,加入 0.2 mL 95% 乙醇。Ⅱ. 未接入微生物的培养基中加入底物,观察培养基对底物的影响。2 种空白组与试验组平行培养,同法处理。

2.3 检测方法

高效液相色谱法,Zorbax SB C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水,梯度洗脱 0 ~ 10 min(70:30),10 ~ 35 min(90:10),35 ~ 60 min(90:10)。流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 203 nm,进样体积为 20 μL。

2.4 20(S)-原人参二醇的制备型生物转化

从试管斜面将微生物接入 1 个 250 mL 锥形瓶(装有 100 mL 土豆培养基)中,于摇床上 160 r·min⁻¹,26 °C 下培养 2 d,用事先灭好菌的移液管分别移取 1 mL 菌液至 20 个 1 000 mL 锥形瓶(装有 400 mL 土豆培养基)中,振荡培养 2 d 后,加入 0.5 mL 的 20(S)-原人参二醇(50 g·L⁻¹)无水乙醇溶液,继续在相同条件下培养 7 d。培养结束后,收集发酵液(8 L),累积投料 500 mg。对发酵液的乙酸乙酯萃取部分进行硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷无水乙醇梯度洗脱,获得流份再经制备液相得化合物 1 和 2,产率分别为 6.43% 和 8.97%。结构见图 1。

化合物 1 无色针晶(甲醇),HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 [M + Na]⁺ 515.372 5,¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.04 (1H, m, H-1), 1.70 (1H, m, H-1), 1.57 (1H, m, H-2), 1.68 (1H, m, H-2), 3.62 (1H, dt, J = 10.0, 7.2 Hz, H-3), 0.73 (1H, m, H-5), 1.43 (1H, m, H-6), 1.57 (1H, m, H-6), 1.27 (1H, m, H-7), 1.53 (1H, m, H-7), 1.40 (1H, m, H-9), 1.78 (1H, m, H-11), 1.85

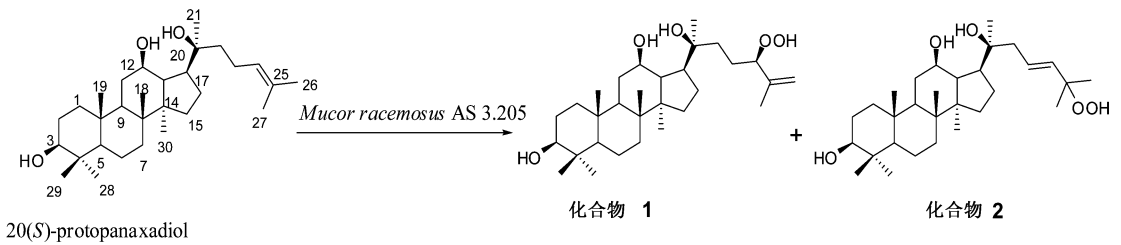


图 1 总状毛霉 AS 3.205 对 20(S)-原人参二醇的微生物转化

Fig.1 Microbial transformation of 20(S)-protopanaxadiol by *Mucor racemosus* AS 3.205

(1H, m, H-11), 3.20 (1H, dd, $J = 15.6, 7.4$ Hz, H-12), 1.73 (1H, m, H-13), 1.43 (1H, m, H-15), 1.48 (1H, m, H-15), 1.80 (2H, m, H-16), 2.50 (1H, m, H-17), 0.99 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-21), 1.54 (1H, m, H-22), 1.62 (1H, m, H-23), 1.77 (1H, m, H-23), 4.35 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 5.01 (1H, s, H-26), 5.02 (1H, s, H-26), 1.92 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-28), 0.87 (3H, s, H-29), 1.06 (3H, s, H-30)。¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 38.9 (C-1), 28.1 (C-2), 78.9 (C-3), 39.8 (C-4), 55.9 (C-5), 18.3 (C-6), 34.8 (C-7), 37.1 (C-8), 50.1 (C-9), 39.0 (C-10), 31.5 (C-11), 71.3 (C-12), 47.7 (C-13), 51.7 (C-14), 31.0 (C-15), 26.9 (C-16), 53.8 (C-17), 16.2 (C-18), 15.7 (C-19), 73.7 (C-20), 27.4 (C-21), 30.6 (C-22), 25.3 (C-23), 89.7 (C-24), 144.2 (C-25), 113.5 (C-26), 17.8 (C-27), 28.1 (C-28), 15.4 (C-29), 16.9 (C-30)。根据以上数据鉴定其结构为 25,26-烯-24(R) 过氧羟基-20(S)-原人参二醇。

化合物 2 无色粉末(甲醇), HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 $[M + Na]^+$ 515.372 4, ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.98 (1H, m, H-1), 1.72 (1H, m, H-1), 1.80 (1H, m, H-2), 1.89 (1H, m, H-2), 3.20 (1H, dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz, H-3), 0.72 (1H, m, H-5), 1.42 (1H, m, H-6), 1.58 (1H, m, H-6), 1.26 (1H, m, H-7), 1.54 (1H, m, H-7), 1.43 (1H, m, H-9), 1.56 (1H, m, H-11), 1.85 (1H, m, H-11), 3.60 (1H, dt, $J = 8.4, 4.0$ Hz, H-12), 1.74 (1H, m, H-13), 1.10 (1H, m, H-15), 1.27 (1H, m, H-15), 1.34 (1H, m, H-16), 1.81 (1H, m, H-16), 2.10 (1H, m, H-17), 0.89 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, s, H-21), 2.17 (1H, dd, $J = 10.8, 4.0$ Hz, H-22), 2.38 (1H, dd, $J = 10.8, 7.2$ Hz, H-22), 5.79

(1H, td, $J = 15.6, 7.2$ Hz, H-23), 5.63 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-24), 1.30 (3H, s, H-26), 1.36 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-28), 0.88 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, s, H-30)。¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 39.0 (C-1), 27.4 (C-2), 78.8 (C-3), 39.7 (C-4), 55.9 (C-5), 18.3 (C-6), 34.8 (C-7), 37.1 (C-8), 50.1 (C-9), 38.9 (C-10), 30.9 (C-11), 71.1 (C-12), 48.1 (C-13), 51.7 (C-14), 31.0 (C-15), 26.4 (C-16), 52.6 (C-17), 16.2 (C-18), 15.7 (C-19), 73.7 (C-20), 27.7 (C-21), 38.5 (C-22), 126.8 (C-23), 137.9 (C-24), 81.6 (C-25), 25.2 (C-26), 23.9 (C-27), 28.1 (C-28), 15.4 (C-29), 16.8 (C-30)。根据以上数据鉴定其结构为 23,24-烯-25 过氧羟基-20(S)-原人参二醇。

2.5 培养基条件优化

2.5.1 接种量对生物转化的影响 接种量分别设为 2%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 其他条件固定不变, 考察接种量对生物转化的影响。实验结果表明, 当接种量为 10% 时, 有利于 *Mucor racemosus* AS 3.205 菌体的生长和 20(S)-原人参二醇的微生物转化。此时, 菌体呈现细沙状, 菌浓度较大。化合物 1, 2 的产率分别为 10.73% 和 16.24%。见表 1。

表 1 接种量对生物转化的影响

Table 1 Effect of inoculation amount on microbial transformation

接种量	产率	
	化合物 1	化合物 2
2%	7.21	8.36
5%	8.54	9.93
7%	9.22	12.48
10%	10.73	16.24
15%	10.10	15.82
20%	8.91	13.79

2.5.2 底物浓度对生物转化的影响 考察了

0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mmol·L⁻¹ 等 4 个不同底物浓度对转化的影响。可见, 增加底物的质量浓度, 虽然转化的绝对量有所提高, 但化合物 1 和化合物 2 的产率均持续降低。底物浓度为 0.25 mmol·L⁻¹ 时, 转化产物的产率最大。见表 2。

表 2 底物浓度对生物转化的影响

Table 2 Effect of substrate concentration on microbial transformation

底物浓度 /mmol·L ⁻¹	产率/%	
	化合物 1	化合物 2
0.25	10.28	14.74
0.5	8.14	9.83
1.0	6.72	7.51
2.0	4.36	4.97

2.5.3 转化时间对生物转化的影响 考察了转化 1, 2, 3, 4, 5, 6 d 对 20(S)-原人参二醇生物转化的影响。试验结果表明, 转化 4 d 时化合物 1 的产率达到最大值, 化合物 2 的产率在 5 d 时达到最大值, 见图 2。

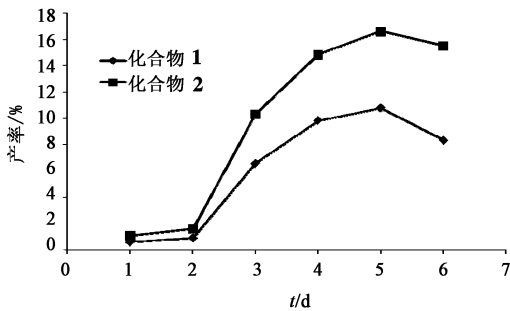


图 2 转化时间对生物转化的影响

Fig. 2 Effect of fermentation time on microbial transformation

2.5.4 温度对生物转化的影响 温度是影响微生物生命活动的重要因素, 对于微生物生长代谢过程中的各种生化反应都具有显著影响。研究表明, 总状毛霉适宜的生长代谢温度为 25 ~ 32 ℃。本试验考察了 25, 28, 30, 32 ℃ 等 4 个不同培养温度对生物转化的影响。由表 3 可知, 当培养温度为 28 ℃ 时, 化合物 1 和化合物 2 的产率均最高。见表 3。

2.5.5 加样时间对生物转化的影响 考察了 4 个不同加样时间对产率的影响, 结果显示, 转接后 48 h 加样, 化合物 1 和 2 的产率最大, 见表 4。

2.5.6 摇床转速对生物转化的影响 溶解氧浓度也是影响绝大多数微生物生长代谢的重要因素。在摇瓶培养条件下, 摇床转速是决定氧溶解与传递水平的关键。本试验选择转速分别为 120, 150, 180,

表 3 温度对生物转化的影响

Table 3 Effect of temperature on microbial transformation

培养温度 /℃	产率/%	
	化合物 1	化合物 2
25	6.72	9.68
28	9.86	15.67
30	8.16	13.41
32	7.57	9.63

表 4 加样时间对生物转化的影响

Table 4 Effect of addition time on microbial transformation

加样时间 /h	产率/%	
	化合物 1	化合物 2
12	0	0
24	3.76	3.53
36	5.94	7.81
48	8.97	14.52

200, 220 r·min⁻¹, 考察了不同的摇床转速对生物转化的影响。由表 5 可见, 当摇床转速从 120 r·min⁻¹ 增加至 150 r·min⁻¹ 时, 化合物 1 和化合物 2 的产率均提高; 此后, 随着转速的继续增加, 产率又有所下降。综合考虑选择 150 r·min⁻¹ 作为优化的摇床转速。

表 5 摇床转速对生物转化的影响

Table 5 Effect of shaking speed on microbial transformation

摇床转速 /r·min ⁻¹	产率/%	
	化合物 1	化合物 2
120	9.58	14.87
150	11.04	16.98
180	10.26	16.47
200	9.83	14.52
220	8.13	10.75

2.6 培养条件优化综合验证实验 根据上述优化实验的结果, 选取各试验确定的最优条件, 即以 10% 的接种量接种入转化培养基, 48 h 后加入底物, 底物浓度为 0.25 mmol·L⁻¹, 于 28 ℃, 150 r·min⁻¹ 转化 5 d, 进行优化工艺的验证试验, 重复 3 次。化合物 1 和化合物 2 的产率分别为 15.81%, 24.45%, 16.12%, 23.58%, 14.35%, 25.63%。结果表明经过转化工艺的优化, 总状毛霉转化 20(S)-原人参二醇获得化合物 1 和 2 的产率均获得了较显著的提高。

3 讨论

本试验以构建高效的微生物转化体系为目标,提高总状毛霉转化20(S)-原人参二醇获得过氧衍生物的能力。以2种过氧衍生物[20(S)-原人参二醇为25,26-烯-24(R)过氧羟基-20(S)-原人参二醇和23,24-烯-25过氧羟基-20(S)-原人参二醇]的产率为指标,对可能的影响因素进行了考察,获得了优化的转化工艺。在此工艺条件下,经过3次实验验证,总状毛霉转化20(S)-原人参二醇获得上述2个过氧衍生物的产率分别提高了约2.5,3倍。

实验结果还表明底物浓度与加样时间是影响生物转化的关键因素,其中底物质量浓度由基础条件的 $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,2种过氧衍生物的产率分别下降了约21%和33%,并随着底物质量浓度的继续增加而进一步降低,这说明转化体系的转化能力有限;而加样时间的影响更为显著,当加样时间为转种后12 h时,均未见上述2种过氧衍生物的生成,这说明总状毛霉的转化能力与其生长状况密切相关,菌种转接后带菌株生长旺盛是再加入底物转化效果较好。

微生物对底物的转化是一个动态过程,转化时间对产率的影响一般都较大,化合物1和化合物2的产率在加样后48~72 h增加较快,随后增加缓慢,产率在第5天达到最大值,达到最大值后由于营养物质消耗,菌种生长状态发生变化,可能将产物进一步转化为其他物质,产率达到最大值后不断减小。因此转化时间控制在4~5 d较好。同时,接种量,培养温度与摇床转速对过氧衍生物的生成都有一定程度的影响。

[参考文献]

[1] Zhao J M, Li N, Zhang H, et al. Novel dammarane-type sapogenins from *Panax ginseng* berry and their biological activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(3):1027-1031.

[2] 徐晓军,石淑文,汤永民,等. 人参皂昔 Rh₂ 抗白血病多药耐药细胞 K562/VCR 作用研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(7):1131-1135.

[3] Lee S Y, Kim G T, Roh S H, et al. Proteomic analysis of the anti-cancer effect of 20S-ginsenoside Rg₃ in

human colon cancer cell lines [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2009, 73(4):811-816.

[4] Dong H, Bai L P, Wai W V K, et al. The *in vitro* structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives [J]. *Molecules*, 2011, 16:10619-10630.

[5] Liu G Y, Bu X, Yan H, et al. 20(S)-protopanaxadiol-induced programmed cell death in glioma cells through caspase-dependent and-independent pathways [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(2):259-264.

[6] Zhu G Y, Li Y W, Tse A K W, et al. 20(S)-protopanaxadiol, a metabolite of ginsenosides, induced cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668:88-98.

[7] 金鑫,张振海,孙娥,等. 原人参二醇脂质立方液晶纳米粒在大鼠体内的药动学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2):263-268.

[8] 刘娜,朴虎日,李宁,等. 原人参二醇及其衍生物的化学于抗癌活性研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2008, 18(5):384-388.

[9] 刘继华,刘金平,卢丹,等. 20(S)-原人参二醇氨基酸衍生物的合成 [J]. *中国现代应用药学*, 2010, 27(10):916-920.

[10] 刘雅飞,崔玉娜,赵余庆. 基于抗肿瘤活性的达玛烷型人参皂昔(元)结构修饰 [J]. *中草药*, 2013, 44(9):1203-1210.

[11] Zhao Y, Wang W, Han L, et al. Isolation, structural determination, and evaluation of the biological activity of 20(S)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol [20(S)-25-OCH₃-PPD] a novel natural product from *Panax notoginseng* [J]. *Med Chem*, 2007, 3(1):51-60.

[12] Wang W, Wang H, Rayburn E R, et al. 20(S)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol, a novel natural product for prostate cancer therapy: activity *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of action [J]. *Brit J Cancer*, 2008, 98(4):792-802.

[13] Wang W, Rayburn E R, Hang J, et al. Anti-lung cancer effects of novel ginsenoside 25-OCH₃-PPD [J]. *Lung Cancer*, 2009, 65(3):306-331.

[责任编辑 邹晓翠]