

文章编号:2095-6002(2013)01-0001-08

引用格式:金凤燮,鱼红闪,孙长凯,等.天然活性成分生物转化的微生物、特异酶及其应用.食品科学技术学报,2013,31(1):1-8.

JIN Feng-xie, YU Hong-shan, SUN Chang-kai, et al. Natural Product Biotransformation Using Microorganisms and New Enzymes. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(1):1-8.

天然活性成分生物转化的微生物、特异酶及其应用

金凤燮¹, 鱼红闪¹, 孙长凯², 芦明春¹, 刘春莹¹, 张春枝¹, 徐龙权¹

(1.大连工业大学生物工程学院,辽宁大连 116034;2.大连医科大学脑疾病研究所,辽宁大连 116044)

摘要:介绍了天然活性成分生物转化的微生物、特异酶以及其应用.中草药等植物中含有的主要天然活性成分,人体难吸收、活性低.为了得到易吸收、高活性的天然有效成分,筛选了一批新微生物,发现一批新型特异的天然成分转化酶;研究了生物转化制备高活性天然成分单体、异构体混合物组、活性中草药制备.

关键词:天然活性成分;生物转化;天然成分转化酶;新微生物;人参皂苷酶

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

我国中草药植物有万余种,但其中少部分只用于药,大部分用于公众营养和保健食品,用于化妆品以及日用化学制品——牙膏甚至色素和墨水等.这些植物的天然活性成分种类繁多,超过6万余种,可归纳为几大类:配糖体类(包括三萜皂苷和甾醇皂苷)、黄酮类、醌类、苯丙素类、生物碱类、鞣质、酯类等^[1].但是这些植物主要的天然成分与化学药不同,化学药口服后直接吸收,起药效;而大部分主要的天然成分人体难吸收、活性低,口服后在消化系统内转化为另一种高活性结构,吸收起功效;而且人体内这种转化很弱,大部分很难利用^[2-3].因此,在体外改变低活性、难吸收的天然成分,制备高活性、易吸收的有效成分,对公众营养食品、功能食品和化妆品、日化产品以及中草药行业技术升级意义巨大.

改变植物天然活性成分结构,生物转化是有效的方法.然而,其种类繁多,结构复杂,现有的微生物和酶解决不了中草药天然成分的生物转化,必须开发许多新微生物和新酶类,才能解决天然成分

转化制备易吸收、高活性成分的问题.

为此,为了得到易吸收、高活性的天然有效成分,本文筛选一批新微生物,发现一批新型特异的天然成分转化酶,研究了其特性和应用开发.

1 天然产物生物转化的新微生物筛选和分类鉴定

为了得到易吸收、高活性的天然有效成分,从土壤、人参地、森林地,筛选一批新微生物,确认新筛选菌的产酶和天然成分的转化功能,其中有用的菌进行分类鉴定,确定其新微生物的属名和种名.

1.1 新微生物筛选

土壤中的大部分微生物处于休眠状态、或者目的微生物数量很低,因此本文采用两种方法筛选微生物:富集培养4~5代后分离单菌落;另一种方法是,将土壤样品稀释、涂铺在低营养的培养皿的固体培养基上、长时间培养(培养1~3个月)方法,得到单菌落.为了保险起见,所得到的单菌落在培养皿的固体培养基重新分离单菌落,测定其16S rRNA

收稿日期:2012-09-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470055,20476017);辽宁高校特异酶创新团队项目(2007T006,2009T009,LT2010009);国家科技重大专项(2012ZX09503001-002).

作者简介:金凤燮,男,教授,博士生导师,主要从事发酵与轻工生物技术方面的研究.

基因序列,与在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的基因库(GenBank)上所登录的已知菌比较;共筛选了与已知菌的 16S rRNA 基因序列同源性 90% 以下的菌有 25 种,90%~95% 的有 43 种,95%~97% 的 50 种,97%~98% 的 50 种的新筛选菌。

一般地来说,16S rRNA 基因序列同源性(相似度)为 95% 以下的菌,直接能确定为新属(new genus)微生物,同源性在 95%~97% 的菌,直接能确定为新种(new species),同源性 97%~99% 的菌,借助分子杂交判断是否新菌,碱基序列与已知菌基本不配对的为新菌。

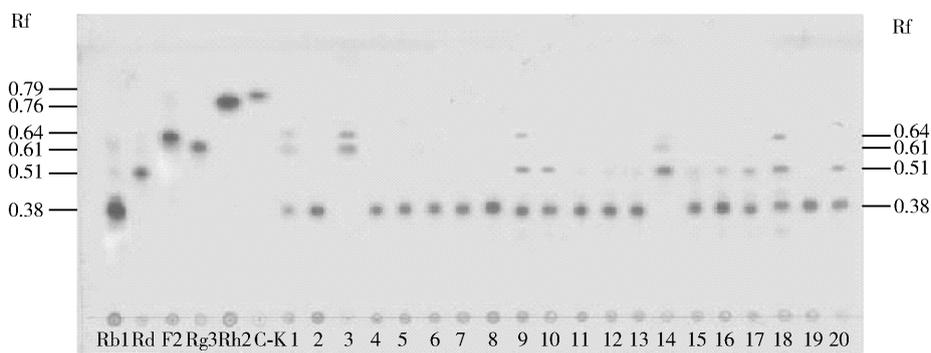
因此,筛选了 16S rRNA 基因与已知菌相差较

大的百余种菌,为筛选天然成分转化酶,提供新微生物资源。

1.2 新筛选菌生物转化产酶功能的确认

上述新筛选微生物,随培养基不同、诱导物不同,所产的天然成分转化酶的种类也不同。上述新筛选的菌种中,选择 16S rRNA 基因同源性在 GenBank 库中所登录的已知菌相差较大的,如下 20 种菌株,研究了产中草药组分水解酶的功能。

如 20 种菌株分别在 1% 的 Trypton/L,0.5% 的酵母膏,1% 的 NaCl 和 0.02% 的人参提取物的培养基中培养,与人参皂苷 Rb1 反应。其结果如 TLC 图 1。



注:Rb1、Rd、F2、Rg3、Rh2、C-K 为标准品;1~20 为从 1~20 号菌培养液与皂苷 Rb1 的反应。

图 1 20 种菌株发酵液对人参皂苷 Rb1 的水解

Fig. 1 Twenty kinds of strains on hydrolysis of ginsenoside Rb1

从图 1 中可以看到:1,3,9,10,14,18 号菌,明显水解人参皂苷 Rb1;而且 15,16,17,20 号菌也水解人参皂苷 Rb1,说明这些菌,都产人参皂苷酶。

相同的方法,改变菌和培养基、产酶诱导物的方法,可以确认其他新菌的天然成分转化功能的产酶菌。其中选择有特色、有用的菌,进行分类鉴定,确定新菌。

1.3 有用菌的分类鉴定

上述新筛选菌中,选择高产中草药成分酶的有用菌,按照国际上规定的新菌分类鉴定方法,确定其微生物属和种;发表在国际微生物协会新菌刊物 *Int. J. Syst. Evol. Microb* (IJSEM) 等国际微生物学刊物上,填补国际微生物学的新微生物。

例如,作者课题组与韩国 KAIST 的林完泽博士,共同研究了从人参土壤中分离筛选的新细菌 Gsoil 085^T 进行分类鉴定。该菌的种系分析中提取 DNA,其 16S rRNA 基因用 PCR 方法扩充、分离提纯

其 16S rRNA 基因,其 16S rRNA 基因序列用 SeqMan software (DNASTAR) 测定的;结果是 1463 个碱基对组成;与基因库(GenBank):利用 BLAST 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上登录的菌上登录的已知菌比较,该菌属于细菌门(phylum Bacteroidetes)的‘Flexibacteraceae’科;相近的 *Emticicia oligotrophica* GPTSA100-15 菌比较,16S rRNA 的同源性只有 94.6%;与‘Flexibacteraceae’科的其他菌相比较,16S rRNA 的同源性为 83.0% 以下;DNA 分子杂交结果,在 16S rRNA 基因水平上 3.0% 的基因序列不相同;在全基因水平上涉及 70% 序列不相同。该菌 16S rRNA 基因序列,在基因库中查找新菌种所对应的系统生物学位置,制作“邻近菌的种系发生树”‘Neighbour-joining phylogenetic tree’,在上述基础上研究了该菌的分类学形态和生化特性。

该菌 DNA 的 G + C 含量为 40.5%,革兰氏阴性(Gram negative),绝对好氧(strictly aerobic),不运

动,不利用很多糖;细胞脂肪酸组成不同于相近的 *Emticicia oligotrophica* GPTSA100-15 菌是新的 *Emticicia* 属中一个新种,命名为 *Emticicia ginsengisoli* sp. nov. . 新发现的菌确定其属名和种名,刊登在国际微生物协会新菌刊物 *Int J Syst Evol Microb* 等国际微生物学刊物上,增添国际微生物学的新菌。

本课题组分类鉴定的新菌为:*Emticicia ginsengisoli* sp. nov. 菌(*Int J Syst Evol Microb*, 2008, 58, 1100-1105);*Kaistia granuli* sp. Nov. 菌(*Int J Syst Evol Microb*, 2007, 57: 2280-2283);*Hymenobacter daecheongensis* sp. nov. 菌(*Int J Syst Evol Microb*, 2009, 59, 331-335);*Spirosoma panaciterrae* sp. nov. 菌(*Int J Syst Evol Microb*, 2009, 59, 1183-1187);*Terrabacter ginsenosidimutans* sp. nov. 菌(*Appl Environ Microb*, 2010, 76, 5827-5836);*Phycoccus ginsenosidimutans* sp. nov. 菌(*Int J Syst Evol Microb*, 2011, 61, 524-528);*Mucilagibacter composti* sp. nov. 菌(*J Microb*, 2011, 49, 393-398);*Ramlibacter ginsenosidimutans* sp. nov. 菌(*J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22: 311-315)等;不仅增添国际微生物新菌,为筛选天然成分转化酶,提供一批新微生物资源。

2 特异的天然成分转化酶及其特性

上述新微生物和重要的已知菌发酵,用离子交换柱、凝胶柱、分子筛等的分离方法,分离纯化得到纯的酶蛋白,其纯酶与各种天然活性成分的

单体分别反应,确定酶的催化反应,研究该酶的其他特性,然后与国际上已公布的酶相比较,确定是否为新酶。由此,发现了一批新的特异性天然活性成分转化酶。

2.1 特异的人参、薯蓣、白头翁等皂苷酶

用上述方法,发现了一批皂苷酶;其中4种人参皂苷酶 I、II、III、IV 型,其酶分别如下。

人参皂苷糖苷酶 I 型^[4],能水解人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 的(第3碳)3-O-的 β -(1 \rightarrow 6)-葡萄糖苷键;水解(第20碳)20-O-位置的 β -(1 \rightarrow 6)-葡萄糖苷键、 α -(1 \rightarrow 6)-阿拉伯糖苷键、 β -(1 \rightarrow 6)-木糖苷键和3-碳(3-O-)上的 β -(1 \rightarrow 2)-葡萄糖苷键等多种糖基,生成 F2;F2 进一步水解成 C-K 以及皂苷元(PPD),其催化反应如图2。

人参皂苷糖苷酶 II 型^[5],能水解人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 的20-O-位置的 β -(1 \rightarrow 6)-葡萄糖苷键、 α -(1 \rightarrow 6)-阿拉伯糖苷键、 β -(1 \rightarrow 6)-木糖苷键等多种糖基,生成 Rd 和 Rg3 皂苷。

人参皂苷糖苷酶 III 型^[6],能水解人参二醇类皂苷的3-O-位置的糖基。来源于霉菌的酶水解 Rd 的3-O-糖苷,生成 C-K;基因重组酶 III 型(新发现菌 *T ginsenosidimutans* sp. nov. 的 *bgpA* 基因,克隆到 *E. coli* 细胞中表达的得到的酶,736 个氨基酸残基,分子量 81 kDa),水解3-O-位置的糖基:水解 Rb1 皂苷3-O-位置的糖基、逐步生成 Gyp17 \rightarrow Gyp75;同样, Rb2 变成 C-O \rightarrow C-Y;Rc 变成 C-MeI \rightarrow C-Mc;水解 Rd 的3-O-糖基,逐步变成 F2 \rightarrow C-K 皂苷,如图3。

人参皂苷酶 IV 型^[7-8],能水解人参三醇类皂苷

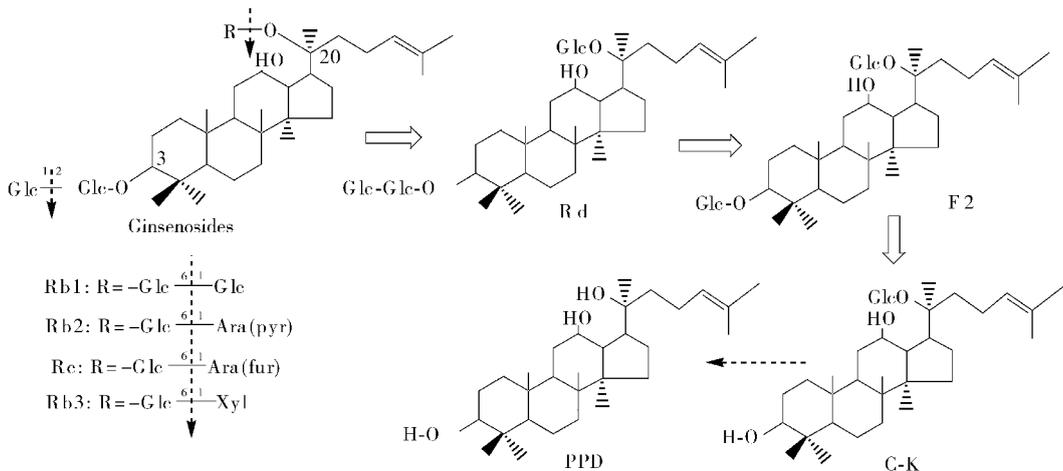


图2 人参皂苷糖苷酶 I 型催化反应

Fig. 2 Catalytic reaction of ginsenoside glucosidase I type

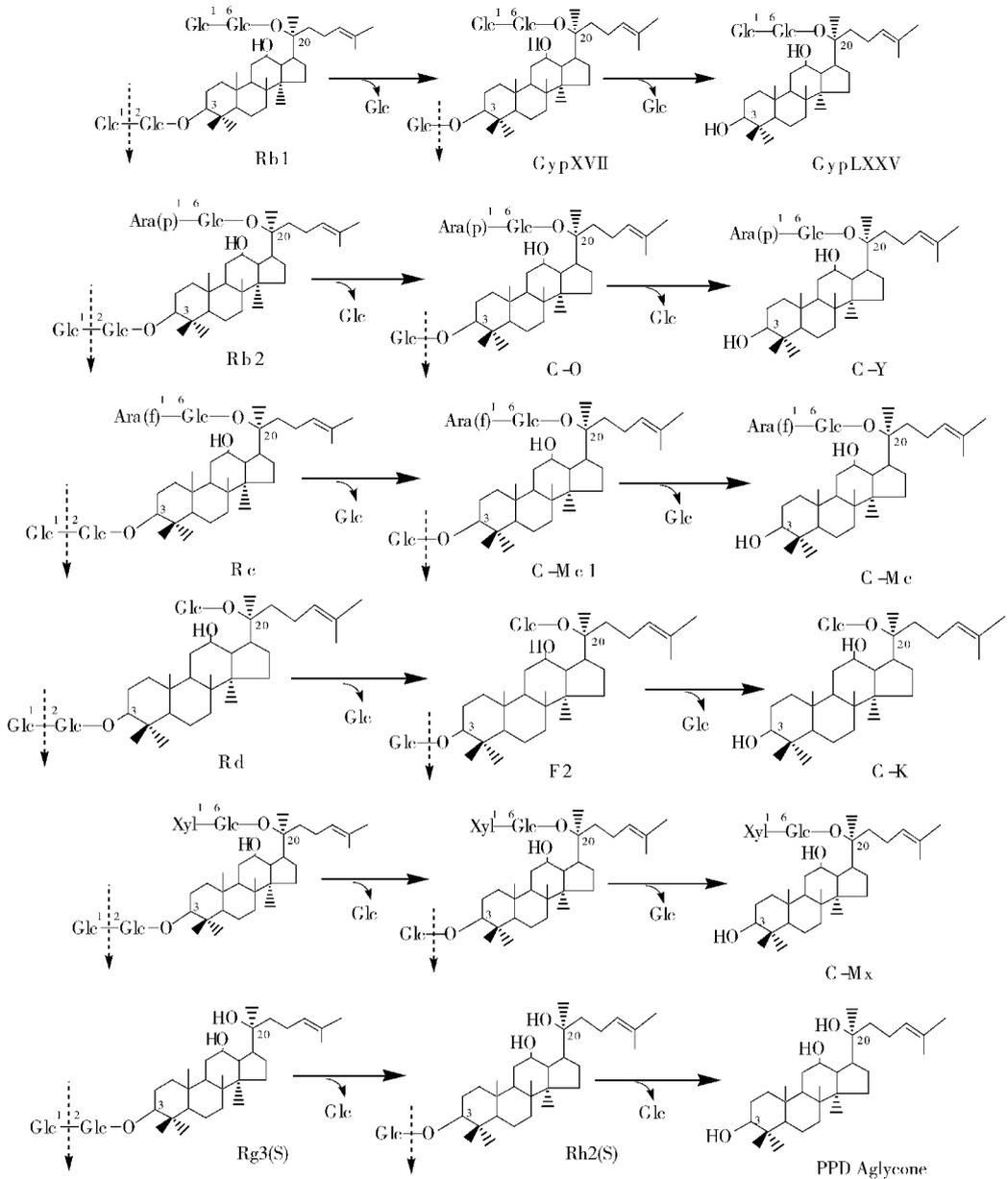


图3 人参皂苷糖苷酶 III 型催化反应

Fig. 3 Catalytic reaction of ginsenoside glucosidase III type

Re、R1、Rf、Rg2 皂苷的 6-O-位置上的多种糖基,如图 4。

归纳人参皂苷酶特性,人参皂苷 I 型酶水解人参皂苷第 3 碳、第 20 碳上的糖基;人参皂苷 II 型酶水解人参皂苷第 20 碳上的多种糖基;人参皂苷 III 型酶水解人参皂苷第 3 碳上的糖基;人参皂苷 IV 型酶水解人参皂苷第 6 碳上的多种糖基,是新酶。

用上述方法,也发现一些其他皂苷酶:薯蓣(穿山龙)甾醇皂苷酶^[9],能水解薯蓣皂苷 3-碳(3-O-)

上的 α -(1 \rightarrow 2)-鼠李糖苷键、 α -(1 \rightarrow 4)-鼠李糖苷键和 β -葡萄糖苷键,其催化反应如图 5 所示。

柴胡皂苷酶^[10],能水解柴胡皂苷的 3-O-上的多种糖基;白头翁皂苷酶,能水解白头翁皂苷的 3-O-和 28-O-上多种糖基;还有黄芪、朱砂根和大豆皂苷酶等。

上述皂苷酶的催化反应共性为,对苷元种类和糖基位置选择性高,对糖基种类(葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖等种类)选择性低,能水解葡

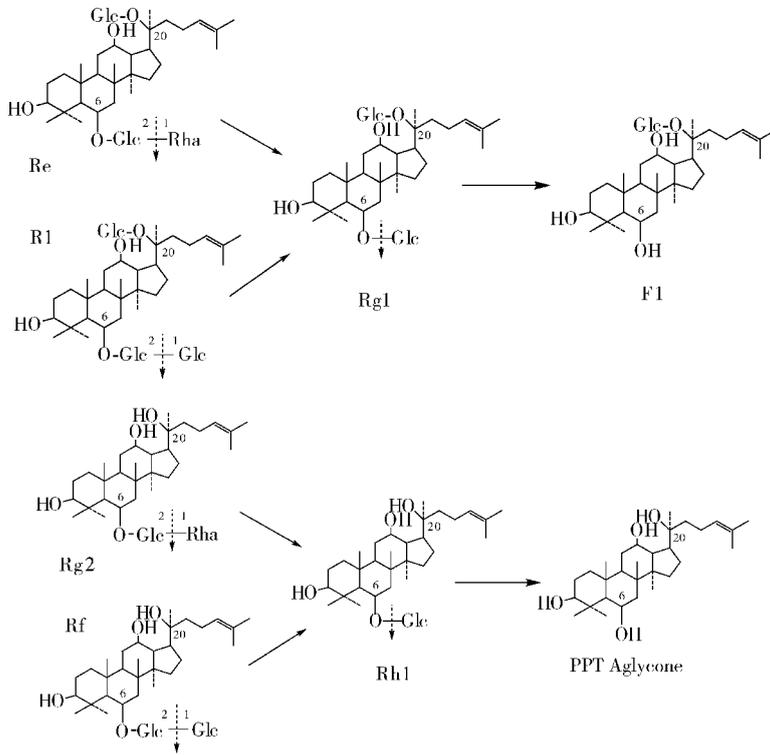


图4 人参皂苷糖苷酶 IV 型催化反应

Fig. 4 Catalytic reaction of ginsenoside glucosidase IV type

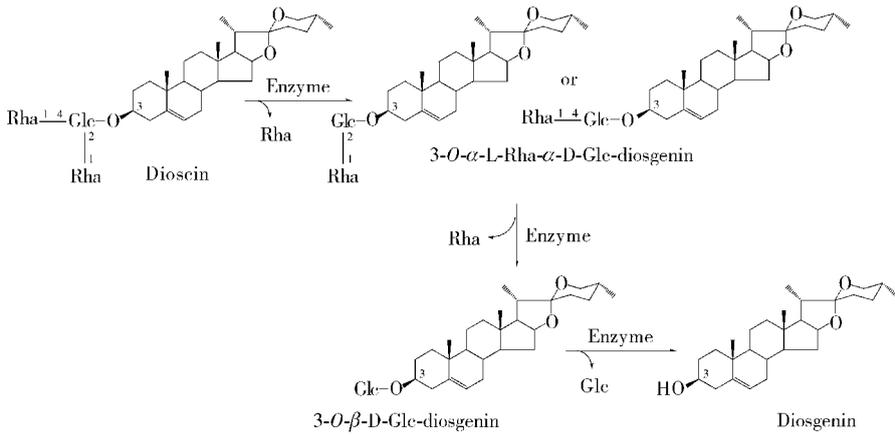


图5 薯蓣(穿山龙)甾醇皂苷酶催化反应

Fig. 5 Enzyme-catalyzed reactions of Yam (dioscorea) sterol saponins

葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖等多种糖基；这与国际酶学上的160余种糖苷酶“一种酶水解一种糖基（糖苷键）”（NC-IUBMB in <http://www.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>）的普遍规律所不同，是一类特异性的新苷酶，增添了国际酶学的一批新的皂苷酶^[11]。

2.2 其他天然活性成分转化酶

用上述方法发现一些其他天然成分转化酶：水解芦丁转化为异槲皮素和槲皮素的芦丁苷酶^[12]，黄芩苷转化为抗艾滋病毒的黄芩苷酶，大豆异黄酮的苷酶，红景天苷酶水解和合成酶^[13]，丹酚酸B转化为丹参素和低聚丹酚酸的丹酚酸酶，制备高活性淫羊藿苷的淫羊藿苷酶；其中大豆异黄酮的苷酶的催

化反应如图6.

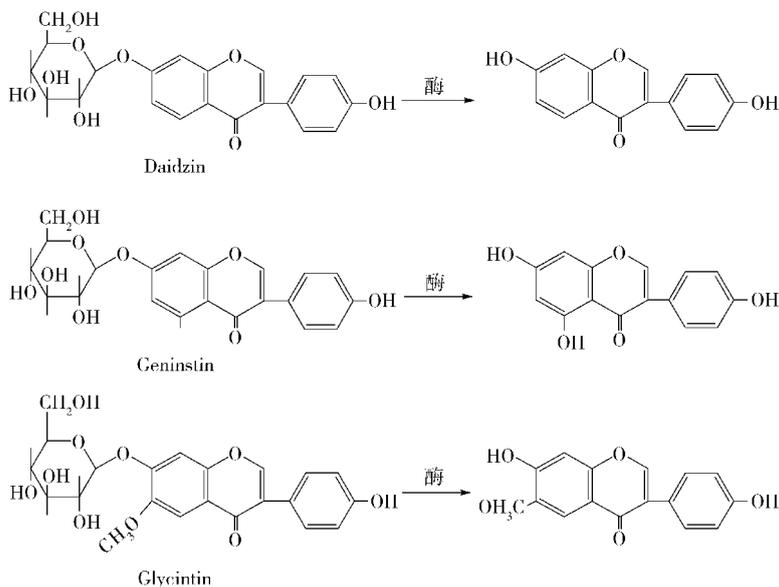


图6 大豆异黄酮苷酶催化反应

Fig. 6 Catalytic reaction of soy isoflavones glycosidase

以上筛选了一批新的特异的天然成分转化酶,为活性低、难吸收的天然成分转化为高活性的有效成分,提供了一批新酶。

3 特异的天然成分转化酶应用

为了上述新的天然成分转化酶的应用,育种了一些天然成分转化酶的生产菌;发现其酶在普通酶(淀粉、蛋白酶)发酵条件下不产,只有在发酵环境和营养恶劣条件下才产酶;建立了贫营养极端发酵法、生产天然成分转化酶类的方法。建立了从植物中提取天然成分转化酶方法。发现上述新酶抗有机溶剂;建立了酶生产中,用无毒有机溶剂沉淀酶方法,分离酶和产物;建立酶不用固定化、重复使用方法。在此基础上,利用天然成分转化酶生产了高活性天然活性成分;生产了高活性单体成分、高活性组分、高活性成分含量高的中草药和提取物;研究开发了高活性成分的公众营养食品、功能食品和化妆品。

1) 酶转化法生产高活性单体成分:如酶转化法生产高活性单体皂苷 C-K 和 F1 的制备。人参皂苷 C-K (Compound-K) 在天然的人参中并不存在,是原人参二醇类皂苷 (Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 等) 在人肠道内代谢的末端产物,是人体吸收的结构,具有抗突变、抗过敏、抗搔痒、抗败血病、抗糖尿病、抗癌、增强机

体免疫力等作用,对保健食品、化妆品、人参药物意

义很大,但是尚无产业化大量生产。同样,F1 皂苷在天然的人参中并不存在,是原人参三醇类皂苷 (Re、R1、Rg1 等) 在人肠道内代谢的产物,人体易吸收、具有保肝、益智等药理和保健功能,其结构如图7。

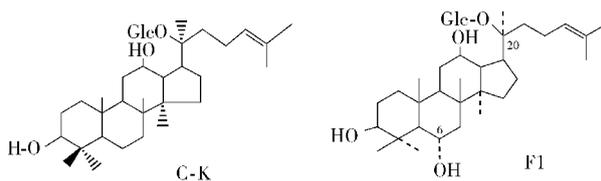


图7 人参皂苷 C-K 和 F1 的结构

Fig. 7 Structure of ginsenoside C-K and F1

利用新发现的人参皂苷酶 I 型^[4]和 IV 型^[5],分别转化生产高活性 C-K 和 F1 皂苷;其转化率为 70% ~ 90%;酶不用固定化,反应后,重复使用,酶的回收率为 70% ~ 80%。

2) 生物转化法制备 4 种异构体的 Rg2 组、Rg3 组、Rh1 组等红参稀有皂苷群:如, Rg2 组等由 20 (S)-Rg2、20 (R)-Rg2、Rg6 和 Rg4 (F4) 等 4 种异构体皂苷组成, Rg2 组皂苷的结构与组成,如图 8。

红参稀有皂苷 Rg2 组, Rg3 组, Rh1 组等,由于四种异构体皂苷协同作用而比单体皂苷活性高,水中的溶解度高,更适合于开发人参制品、公众营养食

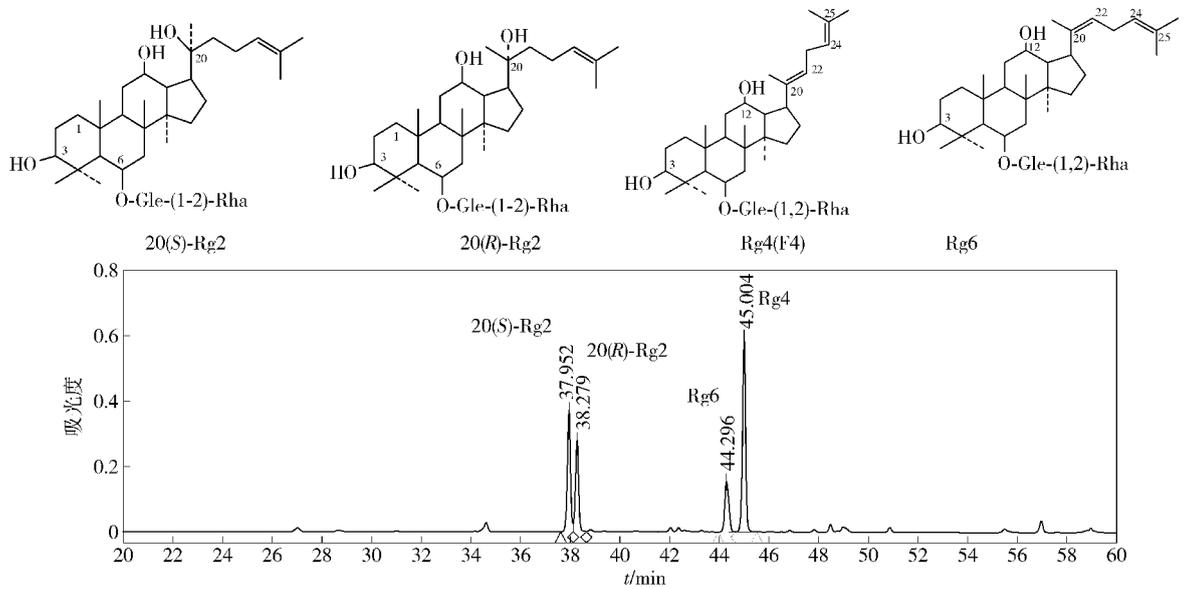


图8 Rg2组产品皂苷结构与组成的HPLC

Fig. 8 Rg2 group saponins structure and HPLC of composition

品、化妆品和人参药物。如红参稀有皂苷 Rg3 组, 20(S)-Rg3、20(R)-Rg3、Rk1 和 Rg5 等 4 种异构体协同作用, 比 Rg3 皂苷单体, 抗癌、抗血栓、调节胰岛素活性提高较大。

本课题组与企业联合, 利用生物转化法分别生产, 4 种异构体含量 90% 以上的 Rg3 组, Rg2 组, Rh1 组等; 开发其应用, 用于公众营养食品、人参制品、化妆品等添加剂。生物酶转化法, 也生产了高活性白头翁皂苷组、高活性大豆异黄酮等, 正开发其制品。

3) 利用中草药植物本身含有的自身酶作用, 在中药加工过程中发挥自身酶的作用, 制备高活性有效成分含量高的中药或者提取物——活性中药。也就是说, 中药加工过程中, 有目的地发挥自身酶作用, 提高活性有效成分的含量, 改变了传统的中药加工的炮制和煎制等、传统的盲目性的加工方法。

如人参植物中含有人参自身皂苷酶^[14-15], 在传统红参加工过程中激活人参自身皂苷酶, 制备活性红参; 其活性红参中的稀有皂苷 Rg3, Rg5, Rh2, Rh3, Rg2, Rg4, Rh1, Rh4 含量比传统红参提高十几倍, 同时人参中部分上火成分 Re, Rg1 含量, 降低到西洋参水平。

同样, 也制备了高活性成分含量高的黄芩、丹参等提取物, 提取了高活性大豆异黄酮混合物。开发了其公众营养食品、功能化妆品。

总之, 为了得到易吸收、高活性的天然有效成分, 本文筛选了一批新微生物, 发现了一批新型特异的天然成分转化酶, 开发了一批高活性的有效天然成分、高活性异构体混合物和活性中药, 也开发了一些制品, 也正在拓宽研发范围。

参考文献:

- [1] 金凤燮. 天然产物生物转化[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 6-33.
- [2] Kobashi K. Glycosides are natural products-evidence using germ-free and gnotobiotic rats associated with a human intestinal bacterium [J]. J Trad Med, 1998, 15: 1-13.
- [3] Tawab M A, Bahr U, Karas M, et al. Degradation of ginsenoside in humans after oral administration [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31: 1065-1071.
- [4] Yu H, Zhang C, Liu M, et al. Purification and characterization of ginsenosidase hydrolyzing multi-glycosides of protopanaxadiol ginsenoside, Ginsenoside Type I [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55: 231-235.
- [5] Yu H, Liu Q, Zhang C, et al. A new ginsenosidase from Aspergillus strain hydrolyzing 20-O-multi-glycoside of PPD ginsenoside [J]. Process Biochem, 2009, 44: 772-775.
- [6] Jin X, Yu H, Wang M, et al. Kinetics of a cloned spe-

- cial ginsenosidase hydrolyzing 3-O-glucoside of multi-protopanaxadiol-type ginsenosides, named ginsenosidase type III [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22: 343–351.
- [7] Wang D, Yu H, Song J, et al. A novel ginsenosidase from an *Aspergillus* strain hydrolyzing 6-O-multi-glycosides of protopanaxatriol-type ginsenosides, named ginsenosidase type IV [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21: 1057–1063.
- [8] Wang D, Yu H, Song J, et al. Enzyme kinetics of ginsenosidase type IV hydrolyzing 6-O-multi-glycosides of protopanaxatriol type ginsenosides [J]. *Process Biochem*, 2012, 47: 133–138.
- [9] Fu Y, Yu H, Tang S, et al. New dioscin-glycosidase hydrolyzing multi-glycosides of dioscin from absidia strain [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(6): 1011–1017.
- [10] Fu Yaoyao, An Jiayan, Yu Hongshan, et al. Purification and Characterization of new special saikosaponin-glycosidase [J]. *Chemical Journal of Chinese University*, 2010, 31(6): 1152–1157.
- [11] Jin Fengxie, Yu Hongshan, Fu Yaoyao, et al. Biotransformation of ginsenosides (ginseng saponins) [J]. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*, 2012(增刊): 33–44.
- [12] Liu T, Yu H, Zhang C, et al. *Aspergillus niger* DLFCC-90 rhamnaside hydrolase, a new type of flavonoid glycoside hydrolase [J]. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(13): 4752–4754.
- [13] Zhang C, Yu H, Lu M, et al. Enzyme synthesis of salidoside: purification and characterization of saldodosidase from *Aspergillus niger* [J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 3143–3147.
- [14] Zhang C, Yu H, Bao Y, et al. Purification and characterization of ginsenoside- β -glucosidase from ginseng [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49: 795–798.
- [15] Zhang C, Yu H, Bao Y, et al. Purification and characterization of ginsenoside- α -arabiofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng* [J]. *Process Biochem*, 2002, 37: 793–798.

Natural Product Biotransformation Using Microorganisms and New Enzymes

JIN Feng-xie¹, YU Hong-shan¹, SUN Chang-kai², LU Ming-chun¹,
LIU Chun-ying¹, ZHANG Chun-zhi¹, XU Long-quan¹

(1. College Biotechnology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. Institute for Brain Disorders, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Main compounds of the herbs have the characteristics of low activity and are hard to be absorbed by bodies. To obtain more active and easy-absorbing natural products, the new microorganisms and special-new-enzymes relating natural product biotransformation were developed. Using the new enzymes and microorganisms, the new more-active and easy-absorbing natural products, and new kinds of herbs containing higher-active-compounds were developed.

Key words: natural active products; biotransformation; natural product enzyme; new microorganism; ginsenosidase

(责任编辑:李 宁)