稀有人参皂苷的酶转化研究进展

郭 枫, 刘焕焕, 邱智东, 王伟楠*

长春中医药大学药学院, 长春 130117

摘 要: 人参皂苷是五加科人参属植物的主要活性成分之一。研究表明, 人参皂苷经过体内代谢后生成的稀有皂苷在抗肿瘤、抗炎、抗衰老等方面的药理作用要强于原型皂苷, 因此, 稀有皂苷的制备成为目前人参研究领域的热点内容。人参皂苷的酶转化是稀有人参皂苷制备的主要途径之一, 近些年取得了突破性的进展, 以不同种类的糖苷酶为切入点, 将相关研究内容进行了综述, 分别讨论了不同类型的糖苷酶在稀有皂苷生物转化过程中的应用, 以期对稀有皂苷的大规模开发利用奠定基础。

关键词: 稀有人参皂苷; 酶转化; 糖苷酶

DOI:10.19586/j.2095-2341.2017.0017

Advances in Enzymatic Transformation of Rare Ginsenosides

GUO Feng, LIU Huanhuan, QIU Zhidong, WANG Weinan*

School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Ginsenosides are one of the main active components of the plants, which belong to the genus *Panax* of Araliaceae family. Studies have shown that the pharmacological effects of rare saponins, produced by metabolism *in vivo*, on anti-tumor, anti-inflammatory and anti-aging are stronger than those of the prototype saponins. Therefore, preparation of rare saponins has become a popular topic in the field of ginseng research. Enzymatic transformation of ginsenosides is one of the primary ways for the preparation of rare saponins, in which many breakthroughs have been made recently. In this paper, the results of these studies were reviewed from the perspectives of different glycosidase types as well as their applications in rare saponins biotransformation so that it could lay a solid foundation for the large-scale development and utilization of rare saponins.

Key words: rare ginsenosides; enzymatic transformation; glycosidase

人参(*Panax ginseng* C.A Mayer)为五加科人参属多年生草本植物, 作为我国传统名贵中药材在国内外已被广泛应用^[1]。人参的主要成分包括皂苷、多糖、挥发油和蛋白质等^[2]。现代药理学研究表明, 人参皂苷是人参作用于心脑血管系统、神经系统、免疫系统以及内分泌系统的主要物质基础^[3]。随着相关研究的进一步深入, 研究人员发现, 在人参属植物中含量较低甚至无法检出的稀有皂苷才是人参药材中可被吸收入血的主要活性成分, 如人参皂苷 Rg3、Rh2 和人参皂苷化合物 K(CK)等。与人参药材中含量较高的皂苷相

比, 稀有皂苷在抗肿瘤、调节机体免疫力、保护神经系统等方面的疗效更为显著, 生物利用度更高^[4], 因此具有极高的药用开发价值和广阔的应用空间。然而, 稀有皂苷缺乏稳定的来源, 这是其开发利用的首要难题^[5]。近年来, 各领域的研究者们不断尝试着通过组织培养、化学合成和生物转化等方法为人参皂苷提供新的来源, 虽然取得了一定的进展, 但这些方法仍然存在各自的问题, 限制了其应用^[6]。

然而, 生物转化法制备稀有人参皂苷相较于其他方法仍具有较大优势^[7]。截至目前, 人参皂

收稿日期: 2017-03-21; 接受日期: 2017-03-31

基金项目: 吉林省重大科技攻关项目(20160201001YY)资助。

作者简介: 郭 枫, 硕士研究生, 研究方向为中药学生物转化。E-mail: 1591421587@qq.com。* 通信作者: 王伟楠, 副教授, 博士, 主要从事中药化学研究。E-mail: 306172031@qq.com

苷生物转化主要有两种方式:微生物转化和酶转化。虽然微生物转化法操作相对简单、成本较低,但遗传稳定性和生物安全性存在一定问题;另一方面,酶相对于微生物具有更高的转化效率和更好的专属性^[8]。因此,利用酶转化法生产制备稀有皂苷具有良好的发展前景。本文将以不同类型的酶为切入点,对近年来稀有皂苷的酶转化制备的相关研究加以综述,为其进一步开发利用和扩大药源提供参考。

1 原人参二醇 (protopanaxadiol, PPD) 型皂苷的酶转化

1.1 人参皂苷化合物 K (CK) 的酶转化制备

人参皂苷 CK 是 PPD 型人参皂苷经体内代谢后生成的主要代谢产物,具有较强的抗肿瘤活性^[9]。目前,关于人参皂苷 CK 生物转化的研究报道较多,从整体上看,利用酶转化制备人参皂苷 CK 的效率要高于微生物和细胞,因此,关于人参皂苷 CK 转化酶的挖掘与研究引起了科研人员的广泛关注。能够转化生成人参皂苷 CK 的酶主要来源于两种,一是微生物分泌酶,二是已经商品化的糖苷酶^[10-12]。无论哪种酶,其对转化底物的选择性及催化效率均有所不同。目前已报道的人参皂苷 CK 转化底物包括人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 等^[13,14],其中人参皂苷 Rb1 在自然界中含量较高,成本较低,是人参皂苷 CK 最常用的转化底物^[15]。从结构上看,将人参皂苷 Rb1 转化生成人参皂苷 CK 需要脱掉 3 个糖基,分别是 C3 位的两个葡萄糖基和 C20 位末端的一个葡萄糖基,而不同的糖苷酶催化这 3 个糖苷键水解的难易程度和先后顺序也有所区别,这就形成了不同的转化途径。就人参皂苷 Rb1 而言,其转化生成人参皂苷 CK 的途径主要有两条:人参皂苷 Rb1→Rd→F2→CK 和人参皂苷 Rb1→七叶胆皂苷 XVII→F2→CK^[16,17];同时,人参皂苷 Rb2 也发现了两条转化生成人参皂苷 CK 的途径,分别为:人参皂苷 Rb2→CO→CY→CK 和人参皂苷 Rb2→Rd→F2→CK^[18]。不同的转化途径源于不同转化酶的催化特性,可以根据这些特点来设计不同的转化工程酶,针对特定位点的糖基进行水解,以产生相应的稀有皂苷来满足医药市场的需求^[19]。除了转化途径上的区别,不同酶的转化效率对于人参皂苷

CK 的制备也很重要。酶转化法相对于化学合成法和其他方法的优势主要体现在专属性强和转化效率高两方面,近几年发现的人参皂苷 CK 转化酶,其摩尔转化效率一般高于 80%,从而使产物的背景比较简单,易于将人参皂苷 CK 与其他杂质分离,从而得到高纯度的人参皂苷 CK 产品,这对于人参皂苷 CK 的大规模生产制备及应用开发有着重要的意义^[13,20]。

1.2 人参皂苷 Rg3 的酶转化制备

人参皂苷 Rg3 也是人参中主要的抗肿瘤活性成分,能较好的抑制肿瘤细胞的生长和转移,目前已经开发成为临床使用的一线药物。因为末端糖基相较于苷元直接相连的糖基更易被水解,所以在保持 C3 位所连糖链结构不变的基础上,定向水解 C20 位的糖基生成 Rg3 显得尤为困难^[21]。目前,已有研究者在自然界中筛选出可以用 PPD 型皂苷 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 作为底物转化生成 Rg3 的酶,其转化途径主要为:人参皂苷 Rb1、Rb2→Rd→20(S)-Rg3^[22,23]。在多数情况下,这些水解反应很难保持严格的结构专属性,往往会产生很多非 Rg3 的副产物,但通过酶学研究和分子结构优化,可以实现定向稳定的转化生成人参皂苷 Rg3 的目的。

1.3 其他 PPD 型皂苷的酶转化研究

由于 PPD 型皂苷的糖基主要连接在 C3 位和 C20 位,这两个位置糖苷键的水解难度较低,因此已发现了大量的 PPD 型皂苷转化酶。从近些年的文献报道来看,多数 PPD 型皂苷转化酶来源于微生物,其中一些转化酶的专属性较强,能够特异性水解 PPD 型皂苷的糖苷键,而当以原人参三醇 (PPT) 型皂苷为底物进行转化时,则不能发生糖苷键水解反应^[24];还有一些 PPD 型皂苷水解酶的结构选择性差异较大^[25],这决定了即使转化相同的人参皂苷底物,转化产物也不尽相同。以人参皂苷 Rb1 为例,在结构选择区域不同的催化酶作用下,可转化生成 F2、Rd、Rb2 等不同的稀有皂苷,其中个别反应的摩尔转化率可达到 90% 左右^[26-29]。这种情况的出现取决于相应转化酶功能域的结构,通过对这些结构中的关键氨基酸残基进行深入研究,可以为有目的性的设计合成不同的皂苷转化工程酶提供依据。

2 原人参三醇 (protopanaxatriol, PPT) 型皂苷的酶转化

2.1 人参皂苷 F1 的酶转化制备

虽然 PPT 型人参皂苷与 PPD 型人参皂苷结构较为相似,仅仅是羟基数量和苷键原子连接位置的不同,但其转化酶的活性和专属性却有较大的区别,C6 位的糖苷键相较 C3 位和 C20 位的糖苷键较难被水解。人参皂苷 F1 就是通过水解人参皂苷 Rg1 C6 位糖苷键之后生成的稀有皂苷,由于该反应难度较大,目前相关文献报道较少。虽然已发现一些可以转化人参皂苷 Rg1 生成 F1 的酶,但多数都能同时水解 C6 位和 C20 位的糖苷键,导致 F1 的转化生成效率较低^[30,31]。通过基因调控、重组酶纯化和转化条件的优化等方法可以极大的改善人参皂苷 F1 的转化效率问题,一些研究者通过上述操作将人参皂苷 F1 的转化生成效率提高到 80% 以上,甚至可以将人参皂苷 Rg1 几乎完全转化为稀有皂苷 F1^[32-34]。

2.2 人参皂苷 Rh1 的酶转化制备

稀有皂苷 Rh1 是 PPT 型皂苷中最具代表性的活性成分之一,其转化酶多来源于真菌和细菌,前者研究报道较多。人参皂苷 Rh1 与 F1 是同分异构体,主要的区别在于糖基连接的位置不同,人参皂苷 Rh1 的糖基连接在 C6 位,因此可以通过水解 Rg1 的 C20 位葡萄糖基、Rf 的 C6 位末端葡萄糖基、Rg2 的 C6 位末端鼠李糖基以及 Re 的 C20 位葡萄糖基和 C6 位的末端鼠李糖基来制备。通过实践,研究者们发现人参皂苷 Re 和 Rg2 的 C6 位末端鼠李糖基相较葡萄糖基更难于酶解,因此用于人参皂苷 Rh1 酶转化制备的底物以 Rg1 和 Rf 为主,近几年的相关报道也多是围绕这两种人参皂苷的生物转化展开的^[35-38]。

2.3 其他 PPT 型皂苷的酶转化研究

目前发现的皂苷转化酶以 PPD 型糖苷酶为主,PPT 型糖苷酶则相对较少。已报道的 PPT 型糖苷酶除了可以转化特定底物生成人参皂苷 F1 和 Rh1 之外,还可以转化人参皂苷 Re、R1、Rf 等生成 Rg1 和 Rg2,且酶的选择性较好,转化率较高,具备一定的工业应用价值^[39-41]。然而,有研究发现,某些 PPT 型糖苷酶的催化特性与培养基

中所加金属离子的种类和含量相关,例如,从人参土壤微生物 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 的液体培养基中分离出一种受 Na⁺ 诱导的粗酶,当没有 Na⁺ 存在时该酶催化水解人参皂苷 Rg1 生成 F1,而当反应体系中加入 Na⁺ 时,Rg1 则被定向转化成稀有皂苷 Rh1 和 PPT 昔元,同时在该条件下,该酶还可将 Re 特异性转化为 Rg2,这一发现为人参皂苷转化酶的反应条件优化提供了新的思路^[42]。

3 展望

人参皂苷具有极强的生物活性,其药理作用与化学结构存在必然的联系,因此人参皂苷的结构修饰可以为相关新药和健康产品的开发提供新的来源和途径,是人参研究领域非常热门的一项工作。目前人参皂苷结构修饰的方法主要为化学法和生物法,各有利弊。但从发展趋势来讲,生物合成与转化因其环境友好、专属性强、催化效率高优点被科研人员所看好。酶转化是人参皂苷结构修饰的一种重要途径,目前研究主要集中于糖苷键的水解,通过不同位置糖链结构的变化来改善化合物的生物活性,以满足人们的医药保健需求。目前,可以通过多种途径获得不同的人参皂苷糖苷酶,但很多酶的结构立体选择性不好,催化效率也较低,不能实现工业化的生产,限制了其应用。因此,从自然界中挖掘具有不同底物选择性和催化活性的糖苷酶,以及研究不同糖苷酶对底物的催化机制,对于人参皂苷生物修饰及合成工程酶的开发具有极其重要的作用。本文综述了近几年人参皂苷糖苷酶的发现及活性研究文献,希望借此为相关领域的研究提供一些参考和理论依据,为稀有人参皂苷研究体系的构建提供有力的支撑。

参 考 文 献

- [1] 宋学洲,高文斌,郑毅男,等.人参皂苷生物转化研究最新进展[J].人参研究,2012,24(1):34-39.
- [2] 王士杰,谭会娜,韩凤波.人参皂苷生物转化的研究进展[J].生物技术世界,2016(3):226.
- [3] 石楸鸣.人参皂苷的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(31):2967-2969.
- [4] 何道同,王兵,陈珺明.人参皂苷药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(7):118-121.

- [5] 杨金玲,高丽丽,朱平.人参皂苷生物合成研究进展[J].药学报,2013,48(2):170-178.
- [6] 刘鑫,戴均贵.人参皂苷生物转化的研究新进展[J].人参研究,2010,22(4):19-22.
- [7] 刘媛媛,刘墨祥.人参皂苷生物转化及其产物的活性研究进展[J].山东化工,2015,44(9):62-63.
- [8] 姬庆,郜玉钢,赵岩,等.酶法转化制备人参皂苷单体的研究进展[J].中草药,2014,45(22):3356-3360.
- [9] Yang X D, Yang Y Y, Ouyang D S, *et al.* A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K [J]. *Fitoterapia*, 2015,100:208-220.
- [10] 韩斌青,冯冰,马百平.皂苷的生物转化研究进展[J].中草药,2009,40(10):1664-1668.
- [11] Kim B H, Lee S Y, Cho H J, *et al.* Biotransformation of Korean *Panax ginseng* by pectinex[J]. *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29(12):2472-2478.
- [12] 张阳,林毅.酶法转化二醇型人参皂甙 Rd 及制备稀有人参皂甙 C-K[J].华侨大学学报(自然科学版),2011,32(6):668-671.
- [13] Noh K H, Son J W, Kim H J, *et al.* Ginsenoside compound K production from ginsenoside root extract by a thermostable β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2009,73(2):316-321.
- [14] 李翠翠,庄子瑜,刘廷强,等.转化人参二醇型皂苷为 C-K 的特异人参皂苷糖苷酶的纯化及性质[J].大连工业大学学报,2010,29(1):11-14.
- [15] Yan Q,Zhou X W,Zhou W, *et al.* Purification and properties of a novel β -glucosidase, hydrolyzing ginsenoside Rb1 to CK, from *Paecilomyces bainier* [J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008,18(6):1081-1089.
- [16] Yan Q, Zhou W, Shi X L, *et al.* Biotransformation pathways of ginsenoside Rb1 to compound K by β -glucosidases in fungus *Paecilomyces Bainier* sp. 229 [J]. *Proc. Biochem.*, 2010, 45(9):1550-1556.
- [17] 于兆慧,刘其媛,崔莉,等.蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 Compound K 的研究[J].中华中医药杂志,2015,30(2):412-416.
- [18] 宋建国,肖永坤,王东明,等.人参皂苷 Re 酶转化的 F1 皂苷等产品的分离提纯[J].大连工业大学学报,2012,31(3):157-160.
- [19] Yoo M H, Yeom S J, Park C S, *et al.* Production of aglycon protopanaxadiol via compound K by a thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89(4):1019-1028.
- [20] Kim S H, Min J W, Quan L H, *et al.* Enzymatic transformation of ginsenoside Rb1 by *Lactobacillus pentosus* strain 6105 from Kimchi [J]. *J. Ginseng Res.*, 2012, 36(3):291-297.
- [21] 刘莉,齐滨,胡娜,等.酶法转化人参皂苷的研究[J].长春中医药大学学报,2013,29(4):729-730.
- [22] Ruan C C, Zhang H, Zhang L X, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh1 by recombinant β -glucosidase [J]. *Molecules*, 2009, 14(6):2043-2048.
- [23] Kim J K, Cui C H, Yoon M H, *et al.* Bioconversion of major ginsenosides Rg1 to minor ginsenoside F1 using novel recombinant ginsenoside hydrolyzing glycosidase cloned from *Sanguibacter keddiei* and enzyme characterization [J]. *J. Biotechnol.*, 2012, 161(3):294-301.
- [24] Yu H S, Zhang C Z, Lu M C, *et al.* Purification and characterization of new special ginsenosidase hydrolyzing multi-glycosides of protopanaxadiol ginsenosides, ginsenosidase type I [J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55(2):231-235.
- [25] Hong H, Cui C H, Kim J K, *et al.* Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 and gypenoside XVII into ginsenosides Rd and F2 by recombinant β -glucosidase from *Flavobacterium johnsoniae* [J]. *J. Ginseng Res.*, 2012, 36(4):418-424.
- [26] Cheng L Q, Kim M K, Lee J W, *et al.* Conversion of major ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by *Caulobacter leidyia* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2006, 28(14):1121-1127.
- [27] Luan H, Liu X, Qi X, *et al.* Purification and characterization of a novel stable ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -D-glucosidase from China white jade snail [J]. *Proc. Biochem.*, 2006, 41(9):1974-1980.
- [28] Zhao L G, Xie J C, Pei J J, *et al.* Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb1 to Rd [J]. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2013, 95:62-69.
- [29] 赵雪焜,胡彦波,孟凡琳.酶法转化原人参二醇型皂苷为稀有人参皂苷 CK 的研究[J].食品工业科技,2013,34(14):205-208.
- [30] Wu L P, Jin Y, Yin C R, *et al.* Co-transformation of *Panax* major ginsenosides Rb1 and Rg1 to minor ginsenosides CK and F1 by *Cladosporium cladosporioides* [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 39(4):521-527.
- [31] 侯耀达,费立坤,尹成日.微生物转化人参根总皂苷为稀有皂苷 CK 和 Rh1[J].延边大学农学报,2011,33(2):108-111.
- [32] Kim Y S, Yoo M H, Lee G W, *et al.* Ginsenoside F1 production from ginsenoside Rg1 by a purified β -glucosidase from *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2011,33(12):2457-2461.
- [33] 赵文倩.人参皂苷 Rg1 的生物转化与关键酶的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,硕士学位论文,2008.
- [34] Quan L H, Wang C, Jin Y, *et al.* Isolation and characterization of novel ginsenoside hydrolyzing glycosidase from *Microbacterium esteraromaticum* that transforms ginsenoside Rb2 to rare ginsenoside 20(S)-Rg3 [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 104(1):129-137.
- [35] 张琪,赵文倩,孟飞,等.固定化 β -葡萄糖苷酶制备人参皂苷 F1 的研究[J].中国抗生素杂志,2012,37(1):49-55.
- [36] Quan L H, Min J W, Yang D U, *et al.* Enzymatic biotransfor-

- mation of ginsenoside Rb1 to 20(S)-Rg3 by recombinant β -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012, 94(2): 377-384.
- [37] Yu H S, Gong J M, Zhang C Z, et al.. Purification and characterization on ginsenoside- α -L-rhamnosidase [J]. Chem. Pharm. Bull., 2002, 50(2): 175-178.
- [38] 孙斯宜,宋建国,鱼红闪,等. *Arthrobacter* sp. No.3 细菌酶转化三醇类人参皂苷 Rg1 生成 Rh1 的反应条件[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(1):1-4.
- [39] Liu L, Gu L J, Zhang D L, et al.. Microbial conversion of rare ginsenoside Rf to 20(S)-protopanaxatriol by *Aspergillus niger* [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 2010, 74(1): 96-100.
- [40] Wang D M, Song J G, Liu C Y. A novel ginsenosidase from an *Aspergillus* strain hydrolyzing 6-O-glycosides of protopanaxatriol-type ginsenosides, named ginsenosidase type IV [J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2011, 21(10): 1057-1063.
- [41] 周义发,原野,胡彦波,等. 组合酶法生物转化制备稀有人参皂苷[A].见:2015年中国酶工程与糖生物工程学术研讨会[C].北京:中国微生物学会酶工程专业委员会,2015,61.
- [42] 成乐琴,金瑜真,梁德春.微生物酶催化制备人参皂苷 20(S)-Rg2,20(S)-Rh1 和 20(S)-PPT [J].高等学校化学学报,2011,32(1): 67-73.