

# 皂苷体外生物转化水解反应的研究进展

穆丽华<sup>1</sup>, 刘屏<sup>1\*</sup>, 张静<sup>2</sup><sup>1</sup>中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853; <sup>2</sup>山西中医学院中药学院, 太原 030024

**摘要:**皂苷(Saponin)是苷元为三萜或螺旋甾烷类的一类较复杂的糖苷类化合物。皂苷分子中糖链的结构与其生物活性密切相关,皂苷中糖链结构的复杂性给糖基的选择性水解研究带来了许多困难。生物转化是利用各种酶体系对天然活性化合物进行合成与结构修饰。利用生物转化技术能对皂苷完成一些有机合成难以进行的水解反应,得到更具新药开发价值的目标化合物。本文综述近几年微生物和游离酶转化技术对皂苷水解反应的研究进展,为皂苷生物转化研究的发展提供方向。

**关键词:**生物转化;水解反应;皂苷;微生物;酶

中图分类号:R932

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.01.027

## Review on Hydrolysis Biotransformation Studies of Triterpenoid Saponins

MU Li-hua<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;<sup>2</sup>Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

**Abstract:** Saponin is a kind of complex compounds with triterpenoid or spiral aglycones and sugar chains. The biological activities of saponins are closely related to their sugar chains and it is difficult to selectively hydrolysis the sugar chains by chemical methods. Biotransformations are chemical reactions catalyzed by cells, organs or enzymes, and may be used for specific conversions of complex substrates. Some leading compounds which are difficult to be synthesized by organic hydrolysis can be obtained using biotransformation technology. In order to provide a basic view on the development of biological transformation of saponins, this article reviewed the hydrolysis biotransformation of saponins reported in recent years.

**Key words:** biotransformation; hydrolysis; saponins; microorganism; enzyme

皂苷(Saponin)是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,主要分布于陆地高等植物中,也少量存在于海星和海参等海洋生物中。许多中草药如人参、远志、桔梗、甘草、知母和柴胡等的主要有效成分都含有皂苷。有些皂苷还具有抗菌、解热、镇静、抗癌等有价值的生物活性。苷元为螺旋甾烷类(C-27甾体化合物)的皂苷称为甾体皂苷,主要存在于薯蓣科、百合科和玄参科等。分子中不含羧基,呈中性。燕麦皂苷D和薯蓣皂苷为常见的甾体皂苷。苷元为三萜类的皂苷称为三萜皂苷,主要存在于五加科、豆科、远志科及葫芦科等,其种类比甾体皂苷多,分布也更为广泛。大部分三萜皂苷呈酸性,少数呈中性。皂苷根据苷元连接糖链数目的不同,可分

为单糖链皂苷、双糖链皂苷及三糖链皂苷。在一些皂苷的糖链上,还通过酯键连有其他基团。近年来,通过大量研究发现,皂苷分子中糖链的结构与其生物活性密切相关<sup>[1]</sup>。皂苷中的糖链一般较短(2~7个糖基),其糖基的组成也比较简单,但糖基与糖基之间的连接位置变化多样。因此皂苷中糖链结构的复杂性给糖基的选择性水解研究带来了许多困难。通过物理法和化学法水解皂苷糖苷键,水解条件剧烈,不易控制,反应副产物多,而且排放大量有机溶剂、酸和碱等污染物,对环境造成很大危害。为了避免破坏生态环境,且得到可持续利用的资源,许多研究者通过生物转化途径改变皂苷的糖链结构。体外生物转化也称体外生物催化,是指利用植物离体培养细胞或器官、动物、微生物及其细胞器等对外源化合物进行结构修饰而获得有价值产物的生理生化反应,其本质是利用生物体系本身所产生的酶在体外对外源化合物进行酶催化反应,它具有反应选择性

强(位置选择性和立体选择性)、反应条件温和、副产物少、不造成环境污染和后处理简单等优点。生物转化既可产生新的化合物,又可改造已有的化合物,增加目标产物的产量以及克服化学合成的缺点。本文通过论述近几年微生物和游离酶转化技术对皂苷进行水解反应的研究进展,探讨其生物转化研究的发展方向。

## 1 三萜皂苷

### 1.1 人参皂苷

人参皂苷是人参中的主要活性成分,迄今为止,已经分离并确定结构的人参皂苷约有 60 余种。研究表明,量较少的一些人参皂苷具有较高的药理活性,如人参皂苷 Rh<sub>2</sub>、C-K 具有很好的抗肿瘤作用。人参皂苷苷元的抗肿瘤活性最强,其抗肿瘤活性随着糖基数目的增多而依次减弱,即:苷元 > 单糖苷 > 二糖苷 > 三糖苷 > 四糖苷<sup>[2]</sup>。人参皂苷在体内代谢规律研究发现绝大多数人参皂苷在胃肠道中吸收较差,脱去糖基的次级苷和苷元具有更强的药理活性和更高的生物利用度<sup>[3-5]</sup>。因此,人参皂苷糖基的体外生物转化水解成为近几年研究的热点。如将人参二醇类皂苷转化成 Rh<sub>2</sub>,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 转化成 Rd,人参皂苷 Re 转化成 Rg<sub>1</sub>,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 转化成 F2 等<sup>[6-10]</sup>。以麦麸为培养基从腐化米霉菌 *Absidia* sp. 中提取出的  $\beta$ -葡萄糖苷酶能水解人参皂苷 Rb<sub>1</sub> C-20 位末端的一个  $\beta$ -葡萄糖基,生成 R<sub>d</sub>。从腐化米霉菌 *Absidia* sp. 39 中提取的人参皂苷- $\alpha$ -鼠李糖苷酶对人参皂苷 R<sub>e</sub> 进行转化生成 Rg<sub>1</sub>,转化率达到 56%<sup>[11]</sup>。Liu 等<sup>[12]</sup>利用从黑曲霉中得到的粗糖苷酶转化 Rg<sub>3</sub>(R) 为 PPD(S,R),转化率高达 100%;转化 R<sub>f</sub> 为 20(S)-PPT,转化率为 90.4%<sup>[13]</sup>。Liu QM 等<sup>[14]</sup>从 *Leuconostoc* sp. strain 22-3 中分离得到一种新的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖酶,该酶浓度在 10  $\mu$ g/mL 时,20 min 之内能将 0.1% 的人参皂苷 Re 完全转化成人参皂苷 Rd,并对该酶进行了克隆、表达和结构研究。成乐琴等<sup>[15]</sup>以微生物 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 的培养液中分离的粗酶为催化剂水解人参皂苷 Re 和 Rg<sub>1</sub>,并考察了反应体系中无机盐 NaCl 的存在与否是否影响人参皂苷 Re, Rg<sub>1</sub> 与粗酶液的反应结果人参皂苷与粗酶液直接反应时,人参皂苷 Re 不发生反应,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 通过 C6 所连  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖的选择性水解转化成人参皂苷 F1。而该反应在无机盐 NaCl 存在下进行时,人参皂苷

Re 通过对 C20 所连  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖的选择性水解定向转化为 20(S)-人参皂苷 Rg<sub>2</sub>;人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 定向转化成 20(S)-人参皂苷 Rh1 以及 20(S)-原人参三醇(PPT)。表明 NaCl 的加入激活了 C20 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酶的活性,这对定向合成不同次级人参皂苷具有重要意义。

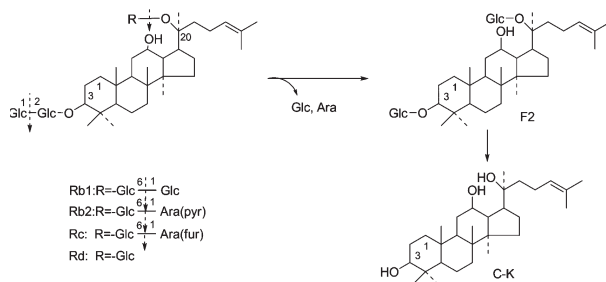


图 1 二醇型人参皂苷水解生成 C-K 的生物转化过程

Fig. 1 Proposed biotransformation pathway for compound C-K from PPD ginsenosides

人参皂苷 C-K 是非天然的人参皂苷,由于人参皂苷四环三萜母核结构上 C-3 位和 C-20 位糖苷键的特异性,酸或碱水解方法是行不通的,人参皂苷 C-K 只能由温和的生物转化方法获得。目前用于制备人参皂苷 C-K 的酶主要是工业酶制剂,国外主要采用柚苷酶、果胶酶、纤维素酶及乳糖酶转化二醇型人参皂苷混合物来制备人参皂苷 C-K(图 1)<sup>[16,17]</sup>。国内学者利用  $\beta$ -葡聚糖苷酶对三七茎叶总皂苷进行转化也取得了较好的转化效果<sup>[18]</sup>。复旦大学药学院从野山参土样分离筛选到了高转化活性菌株 *Paecilomyces bainier* sp. 229,并选用价廉易得的二醇型三七茎叶总皂苷作为底物,通过菌种诱变和发酵工艺优化,转化率达到 80% 以上,并已扩大到工业生产规模。Bae 等<sup>[19]</sup>从肠道菌群中分离出可以将人参皂苷转化成 Compound K 的乳酸菌,还通过肠道菌 *Bacteroides* sp.、*Eubacterium* sp.、*Bifidobacterium* sp. 将 Rg<sub>3</sub> 转化为 Rh<sub>2</sub> PPD<sup>[20]</sup>。陈娇娇等<sup>[21]</sup>发现由 *Absidia* sp. G8r 菌产生的人参皂苷糖苷酶 Glc8 转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 生成人参皂苷 C-K。李翠翠等<sup>[22]</sup>从 *Aspergillus* sp. g848p 中分离得到一种分子质量为 74ku 的人参皂苷糖苷酶,该酶可以把人参二醇类皂苷 PPD 转化为人参皂苷 C-K。Noh 等<sup>[23]</sup>将从 *Sulfolobus solfataricus* 中克隆到的  $\beta$ -糖苷酶基因转入大肠杆菌,得到的重组酶能将人参根提取物转化为 Compound K,转化率为 80.5%。Yoo 等<sup>[24]</sup>将从火球菌属的 *Pyrococcus furiosus* 中克隆的  $\beta$ -糖苷酶

基因转入大肠杆菌,得到的重组酶将人参根提取物首先转化成 Compound K,转化率为 79.5%,转然后化成昔元 PPD,转化率为 100%,昔元的产量可达 1.8 g/L。赵雪淞等<sup>[25]</sup>从卵形胞霉的培养液中纯化出一种能够高效转化原人参二醇型皂苷为稀有人参皂苷 C-K 的糖苷酶 GE-I。该酶转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、R<sub>c</sub> 的途径分别为: Rbt→Rd→F<sub>2</sub>→C→K, Rh<sub>2</sub>→C→O→C→Y→C→K, R<sub>c</sub>→Mb→Mc→C→K。Quan LH 等<sup>[26]</sup>从人参种植土壤小细菌属种分离得到一种葡萄糖苷酶 (bgp3), 并克隆和确认了改酶的结构, bgp3 能将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 水解成 compound K, 水解途径为 Rb<sub>1</sub>→Rd→compound K。韩国学者 Kim B 等<sup>[27]</sup>找到制备人参皂苷 C-K 的新途径, 利用从食物

中提取一种果胶酶直接对人参进行转化, 此法对转化条件要求低, 可以用于大规模工业化生产。最近十几年, 以人参二醇系皂苷及人参三醇系皂苷为原料进行生物转化的研究已获得了许多有意义的成果, 对转化机制的研究亦取得了不少进展。有文献报道菌株对原人参二醇型皂苷和原人参三醇型皂苷具有较强的选择性。菌体生长所分泌的酶系对二醇系皂苷有分解的功能, 对三醇系皂苷分解功能极弱, 并可以产生人参皂苷 C-K。由此推测: 真菌酶体系中的水解酶对人参皂苷 C-20 位的葡萄糖有特异的立体选择性, 而对 C-6 位的葡萄糖则立体选择性较低。人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 是红参中特征性成分之一, 也是一种生物活性较高的稀有皂苷。

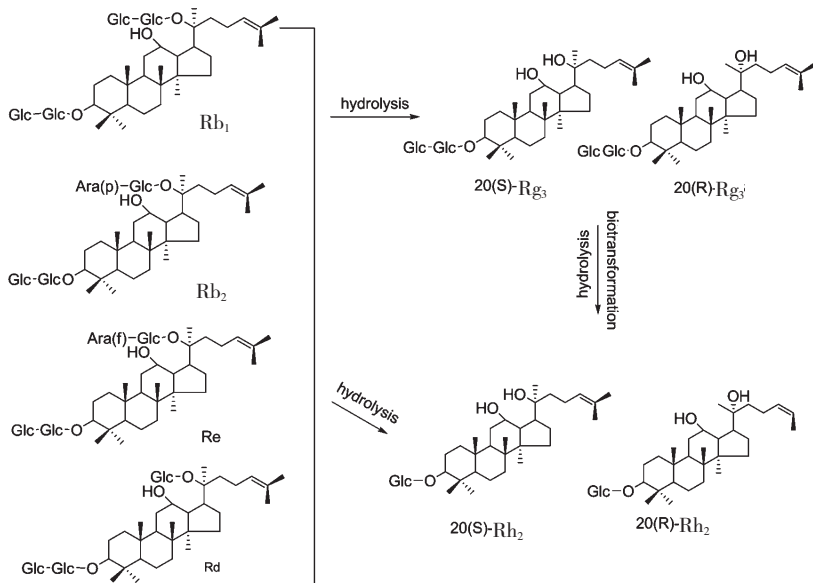


图2 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可能生物转化路线

Fig. 2 Possible biotransformation pathway of ginsenoside Rh<sub>2</sub>

近年来, 微生物及酶水解转化法以其独特优势成为制备人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的理想方法 (图 2)。佟心等<sup>[28]</sup>利用活化的德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) 接种到 MRS 培养基, 加入人参总皂苷, 转化得到人参皂苷 Rh<sub>2</sub>。该专利制备转化率高, 可用于人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 大量制备。吕国忠等<sup>[29]</sup>发现一种人参致病真菌双孢柱孢菌 (*Cylindrocarpon didymium*), 该菌具有转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rd 为人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的能力。Su JH 等<sup>[30]</sup>从 *Fusarium proliferatum* ECU204 中纯化出新的 β-糖苷酶能够将人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 水解为人参皂苷 Rh<sub>2</sub>。宋兆辉等<sup>[31]</sup>在 2009 年申请了一项人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 提取物

及制备方法专利将人参总皂苷溶于 pH5 左右的缓冲液, 加 β-葡萄糖苷酶反应得到人参皂苷 Rh<sub>2</sub>。Hou J 等<sup>[32]</sup>通过 *Esteya vermicola* CNU 120806 的无细胞提取液将人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 转化为 Rh<sub>2</sub>, 并考察了 pH, 温度和底物浓度对转化率的影响。

## 1.2 甘草皂苷

甘草皂苷是甘草中主要的生理活性成分其基本结构是由一个齐墩果烷型五环三萜在第 3 位连接 2 分子的葡萄糖醛酸构成的。研究表明皂苷上的糖链对其生理功能有重要影响, 去除部分糖基往往能改变或提高其生理功能<sup>[33]</sup>。如去除甘草皂苷 C3 位最末端一分子的 β-葡萄糖醛基, 可得到单葡萄糖醛

酸基甘草皂苷 (mono- $\beta$ -glucuronide-glycyrrhizin,

GAMG), 甘草皂苷生物转化水解作用路线见图 3。

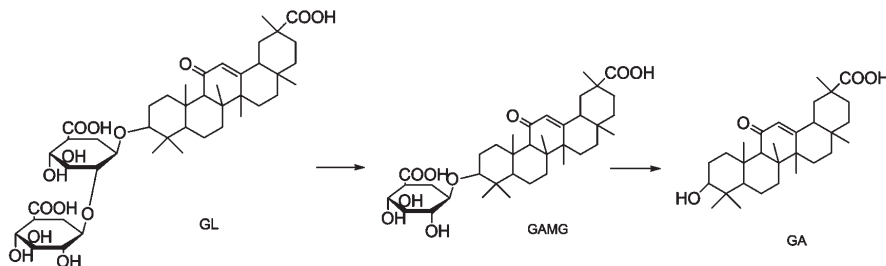


图 3 甘草皂苷生物转化水解作用可能路线

Fig. 3 Possible biotransformation pathway of glycyrrhizin

鱼红闪筛选出一种 *Aspergillus* sp. 48 菌株, 具有将甘草皂苷水解为 GAMG 的酶活力, 转化率达 10% 左右<sup>[34]</sup>。王云<sup>[35]</sup> 筛选发现一株绿色木霉 *Trichoderma viride* 能够高效转化甘草酸生成 GAMG, 转化率达到 90%。吴少杰等利用米曲霉 39 和黑曲霉 UV-48 两种菌株将甘草皂苷转化为单葡萄糖醛酸基皂苷元, 但转化率还较低<sup>[36]</sup>。冯世江<sup>[37]</sup> 通过建立一种生物催化剂高效筛选的方法, 筛选到能够以甘草酸为唯一碳源的 65 株菌株, 其中一株真菌经初步鉴定后命名为 *Penicillium* sp. Li-3, 其表达的葡萄糖苷酸酶具有高度底物特异性, 能定向水解甘草酸后生成 GAMG, 而几乎没有副产物甘草次酸的生成。陈永强筛选到的一株产  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶的黄曲霉 HC-12, 可水解甘草酸为甘草次酸, 转化率较高, 产物单一。利用长春花植物细胞悬浮培养也能将甘草皂苷 C3 位的二分子葡萄糖醛基水解, 生成甘草次酸 (甘草皂苷元)<sup>[38]</sup>。王小艳筛选到 3 株能表达  $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酶的真菌, 发现其在催化同一底物甘草酸时却表现出了不同的催化特性。据目前国内外研究报告,  $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酶的表达多存在于人体、老鼠和大肠杆菌中, 在真菌和植物中却未见该酶的表达。

### 1.3 大豆皂苷

大豆皂苷具有多种生理活性。许多研究表明大豆皂苷所带的糖分子数目越少, 其豆腥味越弱, 而生理活性越高。利用某些微生物体内的酶体系去除大豆皂苷的部分糖基, 不仅去除了豆制品的豆腥味, 而且还产生抗氧化、调血脂等特殊功效。田晶等利用 8 种霉菌菌株对 7 种大豆皂苷糖苷键的水解能力进行探讨, 筛选得到 *Aspergillus oryzae* 39s、*Aspergillus niger* 848s 和 *Aspergillus oryzae* slows 3 种菌株所产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较高, 均对大豆皂苷的糖基有水解作用, 使其转化成低糖基皂苷及苷元<sup>[39]</sup>。采用

*Aspergillus niger* 848s 和 *Aspergillus oryzae* 42s 菌株制曲 (与实际酱油发酵工艺中所用菌株相同) 研究发现, 两种菌株所产的糖苷类酶中, 除有水解大豆皂苷的水解酶外, 还有能连接上糖基的酶-糖基转移酶<sup>[40]</sup>。说明大豆皂苷在制曲过程中的变化机制与酶解作用相同, 都是在水解酶的作用下将大豆皂苷的糖基水解或在糖基转移酶的作用下得到糖基增加的皂苷。徐龙权筛选到 3 株对大豆皂苷水解活性较高的菌株, 分别是 *Aspergillus niger* 848s、*A. niger* 48s 和 *A. oryzae* 39s, 通过提取其粗酶进行转化, 确定了大豆皂苷水解的最佳时间为 12 h, 最佳 pH 值为 5。日本学者<sup>[41]</sup> 筛选到一株菌 *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta* PF 1225 能够水解大豆皂苷, 结果显示该菌株不仅可以水解大豆皂苷 C-3 位连接的鼠李糖、葡萄糖和半乳糖, 还可以水解其内端的葡萄糖醛酸, 通过对相关菌株米曲霉 *Aspergillus oryzae* PF1224 和布氏正青霉 *Eupenicillium brefeldianum* PF 1226 中分离得到的具有相同活性的水解酶进行基因改造, 阐明了这些酶的编码基因的基本结构, 探讨了其水解大豆皂苷和甘草皂苷 C-3 位的糖链的底物特异性比例为 1:1.5。这对于研究皂苷的选择性水解有重要价值。

### 1.4 其他三萜皂苷

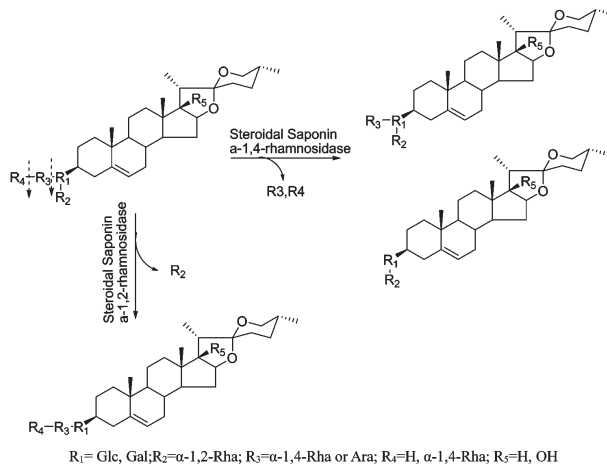
富瑶瑶<sup>[42]</sup> 发现一株菌 sp. c42 可将柴胡皂苷水解成低糖基柴胡皂苷, 确定了酶的最佳反应时间为 24 h, 最佳 pH 值为 5。毛羽<sup>[43]</sup> 利用黄芪诱导的腐化米霉菌 *Absida* sp. A3r 所产酶液能较好地水解黄芪总皂苷成为糖基较少的皂苷, 确定了酶的最佳反应时间为 24 h, 最佳 pH 值为 6。隋玉辉<sup>[44]</sup> 通过菌种筛选首次发现长柄链格孢霉 *Alternaria longipes* 3. 2875 对百两金皂苷 (ardisiacrispin) A 和 B 的 C-3 位的糖链末端葡萄糖基有选择性水解作用, 为齐墩



果烷三萜皂苷去糖基衍生物的制备提供了依据。一枝黄花皂苷 I 为 C3 位连有一分子葡萄糖和 C28 位连有 4 分子不同单糖的五环三萜类皂苷,可抑制酵母菌如白色念珠菌的生长,并有一定的细胞毒性作用。罗汉果皂苷 V 是一种最为理想的天然甜味剂产品,提取分离高罗汉果皂苷 V 含量的产品是近年来国内外对罗汉果的研究热点。Chiu CH 等<sup>[45]</sup>从发芽酵母菌中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶对罗汉果皂苷 V 进行水解反应,得到罗汉果皂苷 III E,进一步筛选了 16 种突变体缺陷的葡萄糖酶或葡萄糖酶基因,结果表明 Exg1 是启动罗汉果皂苷 V 水解反应的主要酶, KRE6 基因的缺失能提高罗汉果皂苷 III E 的产率。

Gerd 等<sup>[46]</sup>利用柚苷酶将一枝黄花皂苷 I 的 C28 末端的鼠李糖水解。在相同条件下,利用商品  $\beta$ -葡萄糖苷酶、纤维素酶和桔皮苷酶均不能水解一枝黄花皂苷 I 的糖基,因此这些酶具有很强特异性。还发现,可以利用  $\beta$ -葡萄糖苷酶的粗酶先水解其 C3 位的葡萄糖基,再用柚苷酶将其 C28 位末端的鼠李糖水解;但是,相反的转化顺序,即先用柚苷酶,再用  $\beta$ -葡萄糖苷酶却得不到相同的转化产物。因此,酶的水解特异性和水解得到的终极产物不仅依赖于酶的类型还依赖于酶联合使用时的顺序。

## 2 甾体皂苷



$R_1 = \text{Glc, Gal}; R_2 = \alpha\text{-}1,2\text{-Rha}; R_3 = \alpha\text{-}1,4\text{-Rha or Ara}; R_4 = \text{H, } \alpha\text{-}1,4\text{-Rha}; R_5 = \text{H, OH}$

图4 甾体皂苷- $\alpha$ -1,4-糖苷酶和甾体皂苷- $\alpha$ -1,2-糖苷酶对甾体皂苷的不同水解途径

Fig. 4 Different hydrolysis pathways of steroidal saponin by  $\alpha$ -1,4-rhamnosidase and  $\alpha$ -1,2-rhamnosidase

甾体皂苷的糖基种类,主要由葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖、呋糖和阿拉伯糖等,糖链通常连接在螺甾皂苷的 C-3 位、呋甾皂苷的 C-3 和 C-26 位,亦有连在 C-1、C-6、C-12 和 C-24 等位置。近年来,大量研究发现,甾体皂苷分子中糖链的糖基种类及连接位置对其生物活性具有重要意义。国内的科研人员对甾体皂苷中的薯蓣皂苷的糖基水解进行了比较系统的研究。金凤燮申请了酶法水解薯蓣类皂苷基制备低糖基薯蓣皂苷的方法的专利。该方法主要是利用胞外发酵液中提取酶来水解皂苷。王元好,刘冰和 Qiang 等研究者分别从 *Absidia* sp. D38b 菌、sp. s00c 菌和猪肝脏一种量很高且水解能力很强的穿山龙薯蓣皂苷酶,该酶只能水解穿山龙薯蓣皂苷的鼠李糖基<sup>[47]</sup>。陶媛媛<sup>[48]</sup>从麦麸中提取得到穿山龙薯蓣皂苷酶,结果表明该酶不仅能水解穿山龙薯蓣皂苷的  $\alpha$ -鼠李糖基表现出相对专一性。王红英<sup>[49]</sup>

发现来源于羊肝的一种  $\alpha$ -L-鼠李糖糖苷酶对穿山龙薯蓣皂苷的  $\alpha$ -鼠李糖基具有高度专一性,该酶不仅能识别其糖苷键的类型,而且还能识别皂苷元的结构。赵玉婷筛选到曲霉属 *Aspergillus* sp. 和交链孢属 *Alternaria* sp. 两个菌株可水解薯蓣皂苷得到皂苷元。He 等<sup>[50]</sup>通过 29 株微生物筛选,发现青霉菌 *Penicillium melinii* 可将原薯蓣皂苷转化为 7 个转化产物,其中 3 个为水解产物,3 个为加糖产物。该菌对皂苷 C-3 位的鼠李糖基、C-26 位葡萄糖基均没有选择性。Quan 等<sup>[51]</sup>发现米曲霉 *Aspergillus oryzae* 可以选择性水解呋甾皂苷 C-3 位糖链的 1,2 连接的鼠李糖,但是不水解 C-26 位葡萄糖,同时生成相应的螺甾及去羟基产物。冯冰等<sup>[52-54]</sup>发现新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 中的糖苷酶能特异性水解甾体皂苷 C-3 位糖链中  $\alpha$ -1,2 连接的末端鼠李糖基,但是该酶明确不水解  $\alpha$ -1,4 鼠李糖和其他糖基,具有高

度的底物专一性和严格的位置选择性,且活性较高,产物单一。他们又从黑曲霉(*Aspergillus niger*)中得到甾体皂苷- $\alpha$ -1,4-糖苷酶,该酶能特异性水解甾体皂苷 C-3 位糖链中  $\alpha$ -1,4 连接的末端鼠李糖基(图 4)。赵阳<sup>[55]</sup>等利用果胶酶 Pectinex BE XXL 对 Dichotomin 的生物转化,结果表明 PBX 具有多种水解活性,得到的 9 个产物丰富了甾体皂苷化合物库,同时活性筛选为进一步的药理研究提供了支持。Zhu Y<sup>[56]</sup>等用从 *Trichoderma reesei* 中纯化得到的四种水解酶,对甾体皂苷 progracillin 进行水解反应,结果 E2 和 E3 能将 C-3 末端鼠李糖和葡萄糖分步水解掉,E1-E4 可以逐步清除 C-26 糖基和 C-3 末端糖基,该水解模式可用于甾体皂苷到皂苷元的生物转化就机制研究。

### 3 展望

生物转化是一门以有机化学为主与生物学密切交叉的前沿学科,它涉及到微生物学、生物化学、生物化工、遗传学、化学及化工等诸多领域。人们对天然产物生物转化的研究目前还多集中于生物催化的生物、植物细胞及其酶的筛选上,对生物转化的机制、酶的分离及酶的性质研究还不够,生物转化的底物选择性、立体选择性的深入的规律性研究也较少,目前很难达到有目的地进行定向转化。

生物转化的水解反应是生物转化中常见的反应,目前国内外对人参皂苷和薯蓣皂苷水解反应研究较多,大豆皂苷和甘草皂苷水解生物转化也有一定的研究,但是对齐墩果烷型五环三萜皂苷的研究相对较少。具有水解作用的酶多具有很强的特异性,酶的水解得到的终极产物不仅依赖于酶的类型还依赖于酶联合使用时的顺序,同时水解过程中盐的存在与否也会影响水解反应的顺序和效率,因此生物转化水解反应是个复杂的过程。随着生物技术的日趋成熟,酶工程和基因工程研究的深入,应用微生物及其酶对天然产物的结构修饰已经从微生物的纯培养到混合培养、从关键酶的分离纯化到利用基因工程对关键酶结构的改造,其目的就是要高效、稳定地合成目标化合物。虽然目前大部分生物转化水解反应还停留在初级的新反应筛选和发现上,但生物转化的水解作用不可忽视。通过优化反应条件、诱变菌株、提纯重要的酶、克隆酶的基因等手段,充分发挥生物转化的长处,相信生物转化的水解技术将在植物药物的研发中发挥重要作用。

### 参考文献

- 1 Zhao Y, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities. *Planta Med*, 2009, 75:356-363.
- 2 Dou DQ (窦德强), et al. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16:151-156.
- 3 Kobashi K. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of ginsenosides. *Biosci Microflora*, 1997, 16:1-7.
- 4 Hasegawa H. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials; metabolic activation of ginsenoside deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95:153-157.
- 5 Wang YZ, et al. Improvement of memory in mice and increase of hippocampal excitability in rats by ginsenoside Rg<sub>1</sub>'s metabolites ginsenoside Rh<sub>1</sub> and protopanaxatriol. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109:504-510.
- 6 Chen GLQ, et al. Conversion of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenoside F2 by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28:1121-1127.
- 7 Xue LL (薛丽莉), et al. Analysis of enzymatic hydrolyzed ginsenoside. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2007, 26:1-4.
- 8 Wu XL (吴秀丽), et al. Transformation of ginsenoside Rg<sub>1</sub> to ginsenoside F1 specific by the fungi strains EST-I and EST-II. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008, 25:73-76.
- 9 Wu XL (吴秀丽), et al. Fungal biotransformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub>. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2008, 48:1181-1185.
- 10 Lv D (吕迪), et al. Purification of rare ginsenoside Rh3 from enzyme reaction. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2005, 24:182-185.
- 11 Han BQ (韩斌青), et al. Advances in studies on biotransformation of saponins. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:1664-1668.
- 12 Liu L, et al. Enzymatic preparation of 20(S,R)-protopanaxadiol by transformation of 20(S,R)-Rg<sub>3</sub> from black ginseng. *Phytochemistry*, 2010, 71:1514-1520.
- 13 Liu L, et al. Microbial conversion of rare ginsenoside R<sub>f</sub> to 20(S)-protopanaxatriol by *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74:96-100.
- 14 Liu QM, et al. Bioconversion of ginsenoside R<sub>c</sub> into R<sub>d</sub> by a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, Abf22-3 from *Leuconostoc* sp. 22-3; cloning, expression, and enzyme characterization. *An-*

- tonie Van Leeuwenhoek. 2013, 103:747-754.
- 15 Cheng LQ (成乐琴), et al. Enzyme-catalyzed preparation of 20(S)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>, 20(S)-ginsenoside Rh<sub>1</sub> and 20(S)-PPT. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2011, 01:67-73.
  - 16 Jang IS, et al. Preparing compound K and ginsenoside F1 from saponin of ginseng comprises dissolving purified saponin of ginseng in an aqueous solvent and adding naringinase and/or pectinase into the saponin solution; KR, 2003037005-A, 2003-05-12.
  - 17 Cho BG, et al. Preparing ginsenoside compound K using cellulase or lactase composition yao; KR, 2003043168-A, 2003-06-02.
  - 18 Jiang BH (姜彬慧), et al. Optimization of enzymatic translation for preparation ginsenoside compound K in total saponins of *Panax notoginseng*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35:986-988.
  - 19 Bae EA, et al. Metabolism of ginsenoside R(c) by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25:743-747.
  - 20 Bae EA, et al. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg<sub>3</sub> by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25:58-63.
  - 21 Chen JJ (陈娇娇), et al. Characterization of ginsenoside glycosidase from *Absidia* sp. G8r. *J Dalian Polytech Univ* (大连工业大学学报), 2011, 01:13-17.
  - 22 Li CC (李翠翠), et al. Purification and characterization of the special ginsenosidase transforming protopanaxadiol ginsenosides into ginsenoside C-K. *J Dalian Polytech Univ* (大连工业大学学报), 2010, 29:11-14.
  - 23 Noh KH, et al. Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73:316-321.
  - 24 Yoo MH, et al. Production of aglycon protopanaxadiol via compound K by a thermostable beta-glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89:1019-1028.
  - 25 Zhao XS (赵雪淞), et al. Enzymatic transformation of protopanaxadiol type saponins to minor ginsenoside C-K. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 14:205-208.
  - 26 Quan LH, et al. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to compound K by recombinant beta-glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*. *J Agric Food Chem*, 2012, 60:3776-3781.
  - 27 Kim B, et al. Biotransformation of Korean *Panax ginseng* by Pectinex. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29:2472-2478.
  - 28 Tong X (佟心), Chen KQ (陈凯千). Method for preparing ginsenoside Rh<sub>2</sub> (一种人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的制备方法). CN 201110006593. 9, 2011-08-17.
  - 29 Lv GZ (吕国忠), et al. Cyindrocarpon didymium and method for preparing ginsenoside Rh<sub>2</sub> by using same (双胞柱孢菌及利用其制备人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的方法). CN 201110120780. X, 2011-10-26.
  - 30 Su JH, et al. Properties of a novel beta-glucosidase from *Fusarium proliferatum* ECU204 conveys ginsenoside Rg<sub>3</sub> into Rh<sub>2</sub>. *J Mol Catal B:Enzym*, 2009, 57:278-283.
  - 31 Song ZH (宋兆辉), et al. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> extractive and preparation method thereof (一种人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 提取物及制备方法). CN200910228463. 2, 2011-05-18.
  - 32 Hou J, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub> to ginsenoside Rh<sub>2</sub> by *Esteya vermicola* CNU 120806. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28:1807-1811.
  - 33 Kimura S. The revelation of toxicity which is caused by poisonous substances derived from foodstuffs and its modification under nutritional conditions. *Yukugaku Zasshi*, 1998, 104:423-423.
  - 34 Yu HS. Enzyme hydrolysis of saponin-sugar side and its reaction. Guangzhou: South China University of Technology, PhD. 1999.
  - 35 Wang Y (王云). Bio-transformation of glycyrrhizin to mono-beta-glucuronide-glycyrrhizin by microorganism. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2005, 11:146-155.
  - 36 Wu SJ (吴少杰), et al. Study on biotransformation of glycyrrhizin. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34:516-518.
  - 37 Feng SJ (冯世江), et al. Screening of producing glucuronidase strain and its enzymatic characteristics. *J Chem Eng Chin Univ* (高校化学工程学报), 2007, 6:977-982.
  - 38 Shihara K, et al. Biotransformation using plant cultured cells. *J Mol Catal B:Enzym*, 2003, 23:145-170.
  - 39 Tian J (田晶), et al. Study on enzymatic hydrolysis of soybean saponin sugar-moietyce. *Food Sci* (食品科学), 2001, 4:14-17.
  - 40 Tian J (田晶), et al. Comparison between enzyme hydrolysis of soybean saponin and its change in soy sauce koji making. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2001, 2:112-115.
  - 41 Watanabe M, et al. Cloning and characterization of saponin hydrolases from *Aspergillus oryzae* and *Eupenicillium bref eldianum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69:2178-2185.
  - 42 Fu YY (富瑶瑶), et al. Production and properties of saikosaponin-glycosidase. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2007, 26:136-139.
  - 43 Mao Y (毛羽), et al. Screening of microbial strains produced

- by astrogaloside glycosidase and its optimal condition for enzyme hydrolysis. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2005, 24; 19-21.
- 44 Sui YH (隋玉辉), *et al.* 长柄链格孢对百两金皂苷的生物转化. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2008, 39; 990-993.
- 45 Chiu CH, *et al.* Biotransformation of mogrosides from *Siraitia grosvenorii* Swingle by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2013, 61; 7127-7134.
- 46 Cerd B, *et al.* Enzymatic hydrolysis of the cytotoxic triterpenoid glycoside virgaureasaponin I. *Phytochemistry*, 1998, 49; 153-156.
- 47 Qian S, *et al.* Characterizaion of dioscin- $\alpha$ -L-rhamnosidase from pig liver. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53; 911-914.
- 48 Tao YY (陶媛媛), *et al.* Purification and characterization of dioscin-glycosidase from wheat bran. *J Dalian Instit Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2007, 26; 120-123.
- 49 Wang HY (王红英), *et al.* Isolation and kinetic properties of dioscin- $\alpha$ -L-rhamnosidase from Sheep Liver. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2007, 28; 663-667.
- 50 He XJ, *et al.* Bioconversion of methyl protodioscin by *Penicillium linii* cells. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 38; 400-406.
- 51 Quan B, *et al.* The microbiological transformation protodioscin by *Aspergillus oryzae*. *Chin J Nat Med*, 2006, 4; 377-381.
- 52 Feng B, *et al.* The microbiological transformation of steroidal saponins by *Curvularia lunata*. *Tetrahedron*, 2005, 61; 11758-11763.
- 53 Feng B, *et al.* The substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*. *Tetrahedron*, 2007, 63; 6796-6812.
- 54 Feng B, *et al.* Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76; 1329-1338.
- 55 Zhao Y (赵阳), *et al.* Biotransformation of dichotomin by Pectinex BE XXL. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009, 7; 381-389.
- 56 Zhu Y, *et al.* Investigation on the mechanisms for biotransformation of saponins to diosgenin. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 1; 143-152.

(上接第 111 页)

- 22 Wu YX (吴雨蹊). Advances on effective compositions of Seabuckthorn. *Fujian Agric* (福建农业), 2014, 8; 158-159.
- 23 Gao JM (高景明), Zhang AL (张鞍灵), Li YS (李芸生), *et al.* Research progress of Seabuckthorn flavonoid chemistry. *Hippophae* (沙棘), 1998, 11(2); 34-40.
- 24 Ercisli S, Orhan E, Ozdemir O. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*H. rhamnoides* L.) fruits grown in Turkey. *Sci Hort*, 2007, 115; 27-33.
- 25 Sabir S M, Maqsood H, Hayat M *et al.* Elemental and nutritional analysis of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*) fruits of Pakistani origin. *J Med Food*, 2005, 8; 518-522.
- 26 Raffo A, Paoletti F, Antonelli M. Changes in sugar, organic acid, flavonol, and carotenoid composition during ripening of fruits of three seabuckthorn (*H. rhamnoides* L.) cultivars. *Eur Food Res Technol*, 2010, 219; 360-368.
- 27 Stobdan T, Chaurasia OP, Korekar G.. Attributes of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) to meet nutritional requirements in high altitude. *Defence Sci J*, 2010, 60; 226-230.
- 28 Zhao BL (赵保路), Chen WC (陈惟昌). Physiological significance and properties of NO $\cdot$ . *Progr Biochem Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 1993, 20; 409-411.
- 29 Yang ZG, Li HR, Wang LY, *et al.* Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* and their nitric oxide production inhibitory and DPPH radical scavenging activities. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55; 15-18.
- 30 Varshneya C, Kant V, Mehta M. Total phenolic contents and free radical scavenging activities of different extracts of seabuckthorn (*H. rhamnoides*) pomace without seeds. *Int J Food Sci Nutr*, 2012, 63; 153-159.
- 31 Rop O, Balík J, Rezníček V, *et al.* Chemical characteristics offruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars. *Czech J Food Sci*, 2011, 29; 65-73.
- 32 Papuc C, Diaconescu C, Nicorescu V. Antioxidant activity of sea buckthorn (*H. rhamnoides*) extracts compared with common additives. *Rom Biotech Lett*, 2008, 13; 4049-4053.