

苦丁茶冬青总皂苷生物转化工艺的优化

赵 越¹, 焦连庆^{1,2*}, 田义新^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012)

摘要: 目的 优化苦丁茶冬青总皂苷生物转化工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以初始 pH 值、发酵温度、发酵时间为影响因素, 苦丁皂苷 E 转移率、苦丁皂苷 D 含有量为评价指标, 正交试验优化生物转化工艺。**结果** 最佳条件为初始 pH 值 6.0, 发酵温度 25 ℃, 发酵时间 7 d, 摇床转速 120 r/min, 苦丁皂苷 E 转移率 55.52%, 苦丁皂苷 D 含有量 13.39%, 纯度≥95%。**结论** 该方法简便稳定, 成本低廉, 可用于生物转化苦丁茶冬青总皂苷。

关键词: 苦丁茶冬青; 总皂苷; 生物转化; 正交试验

中图分类号: TQ92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)04-0835-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.013

Biotransformation optimization for *Ilex kudingcha* total saponins

ZHAO Yue¹, JIAO Lian-qing^{1,2*}, TIAN Yi-xin^{1*}

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Institute for Plant Chemistry, Jinlin Provincial Academy for Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China)

KEY WORDS: *Ilex kudincha* C. J. Tseng; total saponins; biotransformation; orthogonal test

苦丁茶冬青 *Ilex kudincha* C. J. Tseng 是冬青科冬青属乔木植物^[1], 化学成分丰富^[2], 其中三萜皂苷类是其主要活性物质^[3]。研究表明, 苦丁皂苷 D 为苦丁茶冬青降血脂和抗动脉粥样硬化的主要有效成分, 其作用强度与他汀类药物相当, 既可单独使用, 也可与后者联合使用以减毒增效, 同时还有降低甘油三酯、抗氧化等作用^[4]。但该成分含有量较低、结构复杂, 化学合成难以成功, 故采用生物转化法提高其含有量是一种切实可行的方法。

生物转化的本质是利用生物体所产生的酶对外源化合物进行酶催化反应^[5-6], 它具备专一性强、反应条件温和、副产物少、不造成环境污染等优势^[7-9]。黑曲霉作为益生菌, 具有生长旺盛、发酵周期短、不产生毒素的特点, 被美国 FDA 认证为安全菌种 (GRAS), 可产生 β-葡萄糖苷酶, 是重要的发酵工业菌株^[10-12]。本实验利用黑曲霉对苦丁茶冬青总皂苷进行生物转化以得到含有量较高的

苦丁皂苷 D, 并对该工艺进行优化, 为该成分的工业化生产提供新途径。

1 材料

1.1 试药 苦丁茶冬青干燥叶产于海南, 经吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为正品。黑曲霉 *Aspergillus niger* 冻干粉购自北京北纳创联生物技术研究院。苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 对照品均由实验室自制, 含有量≥98%。硅胶 (100~200 目) 购自青岛海洋化工有限公司; 薄层预制板 (RF-G254)、ODS 柱层析填料 (40~60 μm) 购自德国 Merck 公司。乙腈、甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 BT-25S 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司); FW100 型高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); HH-6 型数显恒温水浴锅 (常州中捷实验仪器制造有限公司); UV-1801 型紫外分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司); BXM-30R 型压力蒸汽灭菌器 (浙江赛德仪器设备有限公司);

收稿日期: 2017-07-03

作者简介: 赵 越 (1993—), 女, 硕士生。E-mail: 1025636482@qq.com

* 通信作者: 焦连庆, 博士, 主任药师, 从事天然药物化学及代谢研究。E-mail: jllq51@tom.com
田义新, 博士, 教授, 从事中药材栽培研究。E-mail: y. x. tian2003@163.com

SW-CJ-1D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);LRH-150 型生化培养箱(上海印溪仪器仪表有限公司);CHA-S 型双数显往复气浴振荡器(金坛市城东新瑞仪器厂);LC-20A 型分析型、LC-10A 型半制备型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.3 培养基 种子培养基和发酵培养基,均采用改良马丁琼脂培养基。

2 方法

2.1 总皂苷提取 取苦丁茶冬青干燥叶 500 g,粉碎,过 60 目筛,10 BV 70% 乙醇浸提 3 次,每次 5 d,合并提取液,减压浓缩成浸膏,依次以石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取。

2.2 总皂苷含有量测定 采用香草醛-高氯酸法^[13]。精密称取苦丁皂苷 D 2 mg,甲醇定容于 10 mL 量瓶中,配制 0.2 mg/mL 对照品溶液,精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 于 10 mL 具塞试管中,60 ℃ 水浴挥干溶剂,依次加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL,60 ℃ 水浴加热 15 min,取出,冰浴冷却 5 min,迅速加入冰醋酸 5 mL,摇匀,以试剂作为空白,在 550 nm 波长处用紫外分光光度计测定吸光度,绘制标准曲线。取 1 mg/mL 供试品溶液 0.1 mL,置于 10 mL 具塞试管中,测定吸光度,计算总皂苷含有量。

2.3 黑曲霉活化 在超净工作台中,以沾有 70% 酒精的棉花擦拭冻干管外管,齿轮划破,移入 300 μ L 无菌水,充分振荡溶解以制成菌悬液,在改良马丁琼脂培养基中均匀涂布 50 μ L 菌悬液,28 ℃ 生化培养箱中培养 5~7 d,备用。

2.4 转化方法 总皂苷溶于无菌水中,制成 2 mg/mL 贮备液,置于冰箱中备用。在超净工作台中,用打孔器在改良马丁琼脂培养基中取直径 4 mm 的黑曲霉菌饼 1 块,接入到改良马丁液体培养基中(100 mL 三角瓶装 15 mL 培养基),复气浴振荡器中培养 1 d(28 ℃、120 r/min),无菌条件下加入 2 mg/mL 贮备液 5 mL,相同条件下继续培养 7 d。培养结束后,用水饱和正丁醇萃取发酵产物,取正丁醇层减压浓缩,即得发酵产物。

2.5 检测方法

2.5.1 色谱条件 WondaCract ODS-2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m);流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min,85% B;10~40 min,50% B;40~55 min,40% B);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 210 nm;柱温 35 ℃;进样量 20 μ L。

2.5.2 对照品溶液制备 精密称取苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 对照品各 5 mg,甲醇定容于 10 mL 量瓶中,即得(质量浓度 0.5 mg/mL)。

2.5.3 供试品溶液制备 精密称取总皂苷及其发酵产物各 10 mg,甲醇定容于 10 mL 量瓶中,即得(质量浓度 1 mg/mL)。

2.6 生物转化工艺优化 通过单因素试验,对初始 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、发酵温度(20、25、30、35、40 ℃)、发酵时间(3、5、7、9、11 d)、摇床转速(80、100、120、140、160 r/min)进行优化,平行 3 次,取平均值。然后,设计 3 因素 3 水平正交试验,对初始 pH 值、发酵温度、发酵时间进行优化。

2.7 苦丁皂苷 D 分离纯化 将总皂苷发酵产物经硅胶柱色谱(100~200 目)、二氯甲烷-甲醇(12.5:1 \rightarrow 8:1 \rightarrow 6:1 \rightarrow 4:1)梯度洗脱,根据 TLC 检测和硫酸显色反应合并相同流份。然后,收集 8:1 流份并经 ODS 柱,甲醇-水梯度洗脱,半制备型 HPLC 进行分离纯化。

3 结果

3.1 总皂苷提取与含有量测定 共得到总皂苷 54 g,得率 10.8%。以苦丁皂苷 D 对照品质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得回归方程为 $A = 0.020\ 4X + 0.006\ 8$ ($r = 0.999\ 2$),在 0.039 8~0.199 mg 范围内线性关系良好,并测得总皂苷含有量为 56.47%。

3.2 转化产物含有量 按“2.5”项下方法测定,色谱图见图 1,苦丁皂苷 E 转移率 54.51%,转化后苦丁皂苷 D 含有量 12.42%,是转化前(3.87%)的 3.2 倍。

3.3 生物转化工艺优化

3.3.1 初始 pH 值 按“2.4”项下方法转化,灭菌前调节初始 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,其他条件不变,从总皂苷接种到培养基中开始培养 7 d 后收集发酵产物,测定苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 含有量,结果见图 2。由图可知,当初始 pH 值为 6.0 时,苦丁皂苷 E 转移率为 55.06%;苦丁皂苷 D 含有量最高,为 13.15%,故选择最佳初始 pH 值为 6.0。

3.3.2 发酵温度 按“2.4”项下方法转化,选择最佳初始 pH 值,发酵温度 20、25、30、35、40 ℃,其他条件不变,从总皂苷接种到培养基中开始培养 7 d 后收集发酵产物,测定苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 含有量,结果见图 3。由图可知,当发

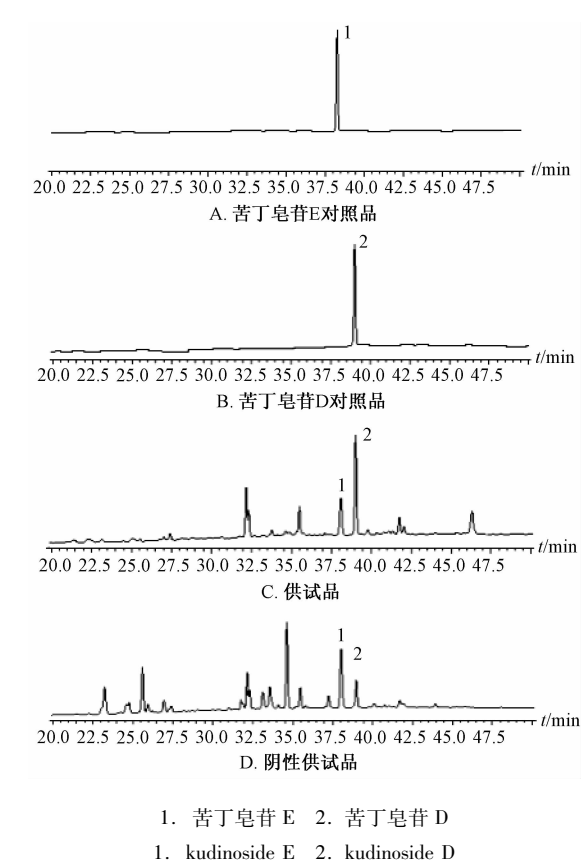


图 1 各成分 HPLC 色谱图

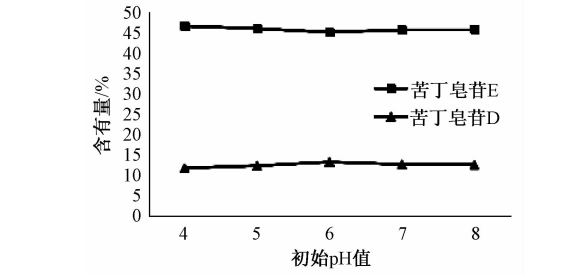


图 2 不同初始 pH 值对生物转化的影响

Fig. 2 Effects of different initial pH values on biotransformation

酵温度为 25 ℃ 时，苦丁皂苷 E 转移率为 55.27% ；苦丁皂苷 D 含有量最高，为 13.37%，故选择最佳发酵温度为 25 ℃。

3.3.3 发酵时间 按“2.4”项下方法转化，选择最佳初始 pH 值、发酵温度，其他条件不变，从总皂苷接种到培养基中开始培养 3、5、7、9、11 d 后收集发酵产物，测定苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 含有量，结果见图 4。由图可知，当发酵时间为 7 d 时，苦丁皂苷 E 转移率为 55.53% ；苦丁皂苷 D 含有量最高，为 13.42%，故选择最佳发酵时间为 7 d。

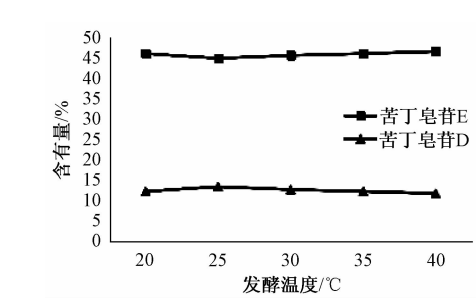


图 3 不同发酵温度对生物转化的影响
Fig. 3 Effects of different fermentation temperature on biotransformation

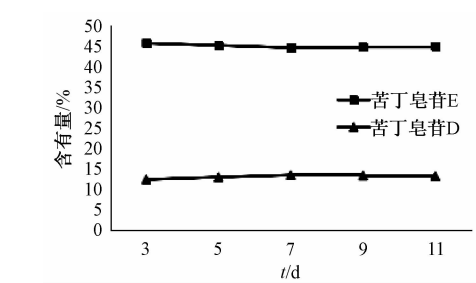


图 4 不同发酵时间对生物转化的影响
Fig. 4 Effects of different fermentation time on biotransformation

3.3.4 摇床转速 按“2.4”项下方法转化，选择最佳初始 pH 值、发酵温度、发酵时间，摇床转速 80、100、120、140、160 r/min，其他条件不变，从总皂苷接种到培养基中开始培养 7 d 后收集发酵产物，测定苦丁皂苷 E、苦丁皂苷 D 含有量，结果见图 5。由图可知，当摇床转速为 120 r/min 时，苦丁皂苷 E 转移率为 55.50% ；苦丁皂苷 D 含有量最高，为 13.40%，故选择最佳摇床转速为 120 r/min。

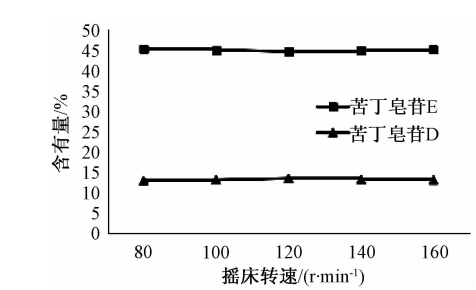


图 5 不同摇床转速对生物转化的影响
Fig. 5 Effects of different shaking speeds on biotransformation

3.3.5 正交试验 在单因素试验基础上，选择初始 pH 值、发酵温度、发酵时间作为影响因素，设计 3 因素 3 水平试验，结果见表 1，方差分析见表 2。由此可知，各因素对转化率的影响程度依次为

B > A > C, 发酵温度具有极显著性影响 ($P < 0.01$), 初始 pH 值具有显著性影响 ($P < 0.05$), 发酵时间无显著性影响 ($P > 0.05$), 最优生物转化条件为 A₂B₁C₂, 即初始 pH 值 6.0, 发酵温度 25 ℃, 发酵时间 7 d。

表 1 试验设计与结果

Tab. 1 Design and results of tests						
试验号	A 初始 pH 值	B 发酵温度/℃	C 发酵时间/d	D 空白	苦丁皂苷 E 转移率/%	苦丁皂苷 D/%
1	5.0	25	5	—	54.98	12.88
2	5.0	30	7	—	54.55	12.46
3	5.0	35	9	—	53.79	11.45
4	6.0	25	7	—	55.52	13.39
5	6.0	30	9	—	55.32	13.23
6	6.0	35	5	—	54.14	11.91
7	7.0	25	9	—	55.03	13.03
8	7.0	30	5	—	55.24	12.54
9	7.0	35	7	—	53.94	11.59

表 2 方差分析

Tab. 2 Analysis of variance				
来源	离均差平方和	均方	F 值	P 值
A	1.02	0.51	30.07	<0.05
B	6.10	3.05	182.69	<0.01
C	0.05	0.02	1.37	—
误差	0.14	0.07	—	—

注: $F_{0.05(22)} = 19.000$, $F_{0.01(22)} = 99.000$

3.3.6 验证试验 按照最优生物转化工艺进行 3 批验证试验, 测得苦丁皂苷 E 转化率分别为 55.48%、55.51%、55.56%, 平均 55.52%; 苦丁皂苷 D 含有量分别为 13.35%、13.38%、13.43%, 平均 13.39%, 表明工艺稳定可靠。

3.4 苦丁皂苷 D 分离纯化 按“3.3.5”项下方法制备发酵产物, 利用硅胶柱、ODS 柱、半制备型 HPLC 等分离得到苦丁皂苷 D。再精密称取 10 mg, 甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 在“2.5”项色谱条件下测定, 色谱图见图 6, 可见只检测到 1 个主吸收峰, 外标法显示其纯度 ≥95%。

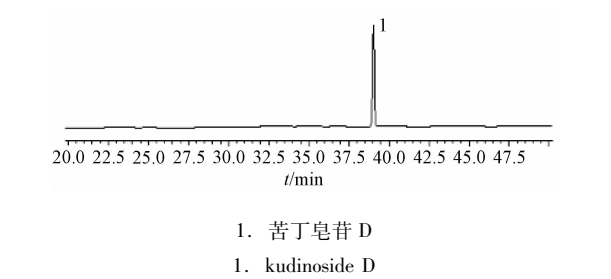


图 6 苦丁皂苷 D HPLC 色谱图
Fig. 6 HPLC chromatogram of kudinoside D

¹H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) 中有 7 个甲

基质子信号, 分别为 0.85、0.90、1.07、1.24、1.41、1.55、1.71 (s, 3H)。C-3 位连氧次甲基质子信号 3.32 (dd, $J = 11.7, 4.4$ Hz), 一对烯质子信号 5.79 (dd, $J = 10.6, 1.9$ Hz)、7.53 (dd, $J = 10.5, 3.1$ Hz), 3 个糖 (Ara、Rha、Glc) 端基质子信号 4.90 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H)、5.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H)、6.20 (s, 1H)。

¹³C-NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) 中有 47 个碳信号, C-28 羰基碳信号 175.34, C-11、C-12 位和 C-13、C-18 位共轭双键碳信号分别为 127.31、128.55 和 140.85、135.12, 3 个糖端基碳信号 104.99 (3-Ara-1)、104.92 (Glc-1)、102.11 (Rha-1)。具体数据如下: 16.56 (C-24), 16.62 (C-26), 18.47 (C-6), 18.61 (C-25), 18.61 (Rha-6), 18.75 (C-27), 19.62 (C-30), 23.84 (C-29), 25.97 (C-15), 26.44 (C-2), 26.58 (C-16), 27.86 (C-23), 28.67 (C-21), 33.04 (C-7), 33.04 (C-22), 36.74 (C-10), 38.52 (C-1), 39.79 (C-4), 42.30 (C-8), 42.33 (C-14), 43.93 (C-17), 55.46 (C-5), 54.66 (C-9), 62.69 (Glc-6), 65.09 (3-Ara-5), 68.43 (3-Ara-4), 70.18 (Rha-5), 71.60 (Glc-4), 72.62 (Rha-3), 72.69 (Rha-2), 74.08 (Rha-4), 74.25 (C-19), 74.91 (3-Ara-2), 75.11 (Glc-2), 78.42 (Glc-3), 78.75 (Glc-5), 82.47 (3-Ara-3), 86.04 (C-20), 88.30 (C-3), 102.1 (Rha-1), 104.9 (Glc-1), 105.0 (3-Ara-1), 127.3 (C-11), 128.5 (C-12), 135.1 (C-18), 140.8 (C-13), 175.3 (C-28)。

以上¹H-NMR、¹³C-NMR 数据与文献报道一致^[14], 故鉴定该化合物为苦丁皂苷 D。

4 讨论与结论

本研究以获得较高含有量的苦丁皂苷 D 为目的, 利用黑曲霉转化处理苦丁茶冬青总皂苷, 并发现苦丁皂苷 E 与苦丁皂苷 D 结构相似, 差别在于 C₂₈ 位点处所连接的葡萄糖苷数目不同, 因此可利用黑曲霉发酵产 β-葡萄糖苷酶水解苦丁皂苷 E C₂₈ 位点外侧的葡萄糖苷, 能获得药理活性更高的苦丁皂苷 D。同时, 苦丁皂苷 D 的结构与 α-苦丁内酯、冬青苦丁皂苷 D、苦丁皂苷 J^[15]、冬青苦丁皂苷 P^[16] 相似, 而苦丁皂苷 D 作为上述总皂苷转化过程的中间产物, 有着极为重要的作用, 具有很高的研究价值。本实验选择黑曲霉对苦丁茶冬青总皂苷进行发酵, 利用菌株产胞外 β-葡萄糖苷酶水解总

皂苷葡萄糖苷的特性，通过酶催化反应得到产物苦丁皂苷 D，并使其含有量显著提高，但对于黑曲霉产酶的酶催化活性、底物反应特异性及其转化机制还有待进一步研究。

然后，通过单因素、正交试验对黑曲霉转化苦丁茶冬青总皂苷工艺进行优化，得到最佳初始 pH 值为 6.0。黑曲霉在发酵过程中会代谢出含有较多 H⁺ 的物质，培养液 pH 值会下降，菌株所产生的 β -葡萄糖苷酶活性会随着 pH 值的变化而变化，黑曲霉所产生大多数酶的最适宜 pH 值为 4.5 左右；最佳发酵温度为 25℃。随着温度升高，细胞新陈代谢加快，生长比较迅速，有利于化合物生成，但进一步升高时细胞中的蛋白质、核酸等大分子会受到不可逆的破坏，导致副反应物产生；最佳发酵时间 7 d。时间过短，培养基中 β -葡萄糖苷酶含有量较低，而时间过长时培养基营养消耗殆尽，不利于转化；最佳摇床转速 120 r/min。转速过低，溶氧少，菌体生长缓慢，造成空孢较多，而转速过高时溶氧多，菌体生长过快，造成菌体变异、自溶。同时，测得苦丁皂苷 D 平均含有量为 13.39%，表明该方法可提高其转化率和生物利用度。

接着，通过硅胶柱、ODS 柱、半制备型 HPLC 等对发酵产物中的苦丁皂苷 D 进行纯化，并对其进行 HPLC、NMR 检测，测得纯度 $\geq 95\%$ ，而且产物得率高，质量稳定可靠，可为中药现代化研究开辟新方向。

参考文献：

[1] 王 新, 陆慧宁, 林少琨. 苦丁茶冬青叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 366-370.

[2] 杨 滔, 谭庆龙, 朱锦萍, 等. HPLC 法同时测定苦丁茶冬青中 7 个三萜皂苷成分的量[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1052-1055.

[3] 杨 滔. 苦丁茶冬青化学成分及其抗血小板聚集活性研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[4] 屠鹏飞, 姜 勇, 郑 姣, 等. 苦丁茶皂苷 D 的制药用途: 中国, CN103381173A[P]. 2013-11-06.

[5] 马百平, 冯 冰, 黄鸿志, 等. 中药及其成分的生物转化[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2010, 12(2): 150-154.

[6] 牛红军, 王 芃, 杨官娥. 微生物转化技术在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 346-349.

[7] 刘庆鑫, 李慧梁, 柳润辉. 微生物转化在天然产物研究中的应用[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5): 321-325.

[8] 朱立俏. 中药化学成分的微生物转化研究概述[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(1): 79-82.

[9] 李 洋, 邱智东, 王伟楠. 中药生物转化技术研究进展[J]. 中国酿造, 2015, 34(7): 15-19.

[10] 刘晓霓, 谢 立, 刘 芳, 等. 益生菌生物转化中药研究现状[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 928-930.

[11] 张 熙, 韩双艳. 黑曲霉发酵产酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(1): 13-16.

[12] 刘 莹, 张 箐, 田成旺, 等. 黑曲霉菌对獐牙菜苦苷的生物转化工艺优化[J]. 中草药, 2011, 42(2): 257-261.

[13] 秦 勇. 苦丁茶总皂苷提取纯化工艺研究[D]. 长沙: 湖南中医学院, 2002.

[14] Ouyang M A, Yang C R, Chen Z L, *et al.* Triterpenes and triterpenoid glycosides from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 871-877.

[15] Zuo W J, Dai H F, Chen J, *et al.* Triterpenes and triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(16): 1835-1840.

[16] Tang L, Jiang Y, Tian X M, *et al.* Triterpene saponins from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(6): 554-561.