

重组内切纤维素酶 Fpendo5A 转化三七总皂苷

李 男, 赵幻希, 李 晶, 王 楠, 于渤海, 越 皓, 于珊珊

(长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 长春 130000)

摘要 从嗜热细菌基因组中克隆到1个新的纤维素酶基因,并在大肠杆菌中进行了高效可溶性表达,粗酶液经镍柱亲和层析进行分离纯化.利用快速分离液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(RRLC/Q-TOF-MS)对重组内切纤维素酶 Fpendo5A 转化三七总皂苷的产物结构进行了鉴定,并进一步阐明其转化机制.结果表明,该酶的最适反应温度和 pH 值分别为 80 °C 和 5.5. Fpendo5A 能够催化三七总皂苷中的主要皂苷成分,即 Ra₁, Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 的侧链糖基的水解反应,但对于不同的皂苷底物, Fpendo5A 选择性催化的侧链糖基类型不同.经鉴定, Fpendo5A 转化 Ra₁, Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 的转化产物分别为 Rb₂, Gyp XVII, CMC₁, F₂ 和 Rh₂.由此可见, Fpendo5A 通过水解 Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 的 C3 位的 β-(1,2)糖苷键分别生成 Gyp XVII, CMC₁, F₂ 和 Rh₂.在转化 Ra₁时, Fpendo5A 通过水解 Ra₁的 C20 位的 α-(1,4)木糖苷键生成 Rb₂.

关键词 三七皂苷;内切纤维素酶;生物转化;液相色谱-质谱联用

中图分类号 O629; Q556

文献标志码 A

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属植物,是我国名贵中药材,也是云南独具特色的中药材资源^[1].三七皂苷是三七中的主要活性物质,三七皂苷对心脑血管系统^[2]、糖尿病^[3]和血液系统^[4]等都具有良好的药理活性.迄今,已从三七的不同部位分离得到 70 余种单体皂苷^[5-9],其中某些皂苷与人参中的某些皂苷化合物结构相同,如人参皂苷 Rb₁,因其首先在人参中被发现,为避免相同结构化合物的重复命名,在三七中此化合物也被命名为人参皂苷 Rb₁.大多数三七皂苷属于达玛烷型皂苷,可分为 20(S)-原人参二醇[20(S)-protopanaxadiol]和 20(S)-原人参三醇[20(S)-peotopanaxatriol]2 种类型.人参皂苷 Ra₁, Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 在三七总皂苷中含量较高,都属于原人参二醇型皂苷.另外,人参皂苷 Ra₁, Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 具有相同的皂苷元结构,且 C3 位均是以 β-(1,2)糖苷键连接 2 个葡萄糖分子,其结构差异在于 C20 位连接的糖残基的种类、数量以及连接方式不同.由于皂苷化合物的结构差异,其药理活性也有很大差别.近期研究表明^[10,11],皂苷化合物可以通过侧链糖基的水解获得结构相似的去糖基化皂苷化合物,其生物利用度及药理活性均获得进一步增强.前文^[12]报道了通过微生物转化人参皂苷 Rb₁, Re 和 Rg₁ 来获得去糖基化皂苷化合物,同时对转化前后皂苷化合物的抗炎活性进行了研究,结果表明,去糖基化后的皂苷化合物在脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 炎症细胞模型和二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型中活性明显高于转化前.另外,Quan 等^[13]对人参皂苷在抗肿瘤活性方面进行了结构与功能关系的探讨,发现其抗肿瘤活性与皂苷侧链糖基的数量呈反比关系,即侧链糖基数量越少的皂苷其抗肿瘤活性越强.因而,通过水解某些皂苷化合物的末端糖基获得药效更好的去糖基化皂苷化合物,为新药的筛选提供候选分子,已经成为目前研究的热点.

糖苷酶是作用于各种糖苷、寡糖、多糖或糖蛋白等使其糖苷键水解的酶的总称.糖苷酶能够催化皂苷化合物的侧链糖基水解,因其具有区域选择性和立体选择性高、产率高、副产物少、无污染和容易工业化生产等优点,是目前工业化制备去糖基化皂苷的首选方法.目前,已有多种用于原人参二醇型皂苷转化的糖苷水解酶被报道,如赵余庆等^[14]利用 β-葡聚糖苷酶和工业酶制剂转化三七茎叶总皂

收稿日期: 2017-05-18. 网络出版日期: 2017-10-10.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 31400682)资助.

联系人简介: 于珊珊,女,博士,助理研究员,主要从事人参皂苷生物转化研究. E-mail: yushanshan001@aliyun.com

越 皓,男,博士,研究员,博士生导师,主要从事中药化学分析研究. E-mail: yuehao001@aliyun.com

昔从而获得化合物 K(C)K. 王儒凤等^[15]利用重组糖苷水解酶, 通过水解三七皂苷 ST-4 的 C20 位糖苷键, 将三七皂苷 ST-4 转化为维纳人参皂苷 R7. 然而, 目前发现的用于转化三七皂苷的酶类数量仍旧十分有限, 并且活性和底物选择性差, 亟待新型糖苷酶的开发和应用.

本文从嗜热细菌基因组中克隆到 1 个新的纤维素酶基因, 利用快速分离液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(RRLC/Q-TOF-MS)对重组内切纤维素酶(Fpendo5A)转化三七总皂苷的产物结构进行鉴定, 并阐明其转化机制. 重组内切纤维素酶 Fpendo5A 能够转化三七总皂苷中的 Ra₁, Rb₁, Rc, Rd 和 Rg₃ 分别生成 Rb₂, Gyp XVII, CMC₁, F₂ 和 Rh₂, 其较高的转化活性及底物选择性为未来应用该酶制备去糖基化皂苷化合物, 开发相关的保健食品和中药奠定基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三七总皂苷(批号: 00812AS, 纯度 98%)购自大连美仑生物技术有限公司; Ra₁, Rb₁, Rc, Rd, Rg₃, Rb₂, Gyp XVII, Rh₂(纯度均>98%)和 F₂(纯度>84%)均购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱纯乙腈和甲醇购自美国 TEDIA 试剂公司; 嗜热细菌 *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078 购自德国 DSMZ 公司; *Escherichia coli* BL21(DE3) CodonPlus 和 pET-28a 质粒均购于 Novagen 公司(中国).

Agilent RRLC 1200 SL-6520 Q-TOF-MS 联用仪(美国 Agilent 公司), 其中 RRLC 1200 SL 配有在线脱气机、二元梯度泵、可控温自动进样系统和智能柱温箱, Q-TOF-MS 配有双喷雾电离源. Synchrons C₁₈反相色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.7 μm; 美国 Thermo 公司).

1.2 重组内切纤维素酶 Fpendo5A 基因的克隆、表达及纯化

从嗜热细菌 *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078 基因组中利用引物(上游 5'-CAGCAGGCTAG-CATGGATCAGTCAGTTGCT-3' 和下游 5'-CAGCAGCTCCAGTTATTCTTTGCTTTCTCCAA-3')进行 Fpendo5A 基因的 PCR 扩增. 将 PCR 产物连接到载体 pET-28a 中, 并转化到大肠杆菌 BL21(DE3) CodonPlus 中用于基因表达, 该基因处于 T7 启动子的控制下且可用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导. 在 2 L 的溶菌肉汤(LB)液体培养基中培养重组菌, 当菌液在波长 600 nm 处的吸光度值(OD₆₀₀)达到 0.6~0.8 时, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)(终浓度为 1 μmol/L)进行诱导, 并于 16 °C 恒温振荡培养箱中诱导过夜, 发酵液经离心后收集菌体, 用于酶的分离纯化.

利用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(20 mmol/L, pH=5.0)重悬菌体, 菌悬液经超声破碎处理后, 高速离心收集上层清液即为粗酶液. 因重组蛋白带有组氨酸标签, 故选择镍柱亲和层析方法进行目的蛋白的分离纯化. 纯化后的重组蛋白利用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 并经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳鉴定样品纯度后, 于-20 °C 保存, 用于酶学性质及转化研究.

1.3 纤维素酶活力测定

采用经典的 Miller 方法^[16]测定纤维素酶的水解活力. 还原糖的定量检测使用 DNS 试剂(3,5-二硝基水杨酸). 酶的水解活力通过测定多糖底物所释放的还原糖量确定.

将含 10 g/L 的纤维素底物[如羧甲基纤维素(CMC)、微晶纤维素(Avicel)、可溶性淀粉、木聚糖、蔗糖、甘露聚糖、半乳甘露聚糖和海藻糖]的缓冲液在 80 °C 水浴中预热 15 min. 加入适量酶液, 与底物溶液充分混合, 在 80 °C 下反应 1~5 min. 终止反应后, 取 500 μL 反应液加入到 1 mL DNS 试剂中, 煮沸 5 min, 流水冷却后, 高速离心, 并补加去离子水稀释至 20 mL, 将测量得到的 529 nm 处的吸光度(A₅₂₉)与葡萄糖标准曲线进行比较, 计算反应产生的还原糖(用相当量的葡萄糖表示)量. 酶活力单位(IU): 将每分钟催化产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 IU.

1.4 底物选择性测定

纤维素酶 Fpendo5A 催化水解其它多糖(如木聚糖、甘露聚糖和半乳甘露聚糖等)的活力也采用 Miller 方法进行测定.

1.5 Fpendo5A 的最适反应温度测定

将纤维素底物 CMC(10 g/L)溶解于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(20 mmol/L, pH=5.5)中, 在

40~90 ℃ 范围内测定不同温度下的酶活力. 每个温度测定 3 组平行数据, 取其平均值. 以温度为横坐标, 对应温度下的酶相对活力为纵坐标, 绘制温度-酶活力曲线.

1.6 Fpendo5A 的最适 pH 测定

在 80 ℃ 下, 将纤维素底物 CMC(10 g/L) 溶解于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH=4.0~8.0) 中, 测定不同 pH 条件下的酶活力. 每个 pH 值测定 3 组平行数据, 取其平均值. 以 pH 值为横坐标, 对应 pH 值下的酶相对活力为纵坐标, 绘制 pH-酶活力曲线.

1.7 分析条件

RRLC 色谱条件: 柱温 35 ℃; 流动相 A 为 0.1% (体积分数) 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈溶液; 二元线性梯度洗脱; 洗脱梯度: 0~2 min, 25%B; 2~6 min, 25%~27%B; 6~10 min, 27%~28%B; 10~15 min, 28%~30%B; 15~17 min, 30%~35%B; 17~24 min, 35%~40%B; 24~29 min, 40%~45%B; 29~37 min, 45%~65%B; 37~42 min, 65%~80%B (以上浓度均为体积分数); 流速 0.3 mL/min; 进样量 5 μ L.

Q-TOF-MS 质谱条件: 电喷雾负离子模式, 质量扫描范围 m/z 100~1500, 干燥气 (N_2) 流量 4 L/min, 干燥气温度 350 ℃, 雾化气压力 255 kPa, 传输毛细管电压 3500 V, 碎裂器电压 200 V, 锥孔电压 65 V, 八级杆射频电压 250 V. 一级质谱采样频率为 2 s. 二级质谱碰撞电压 35 eV, 分辨率 12000.

1.8 Fpendo5A 转化三七总皂苷

配制 1 mg/mL 的三七总皂苷溶液作为底物, 加入一定浓度等体积的酶液, 于 80 ℃ 下反应, 分别在反应进行 0 和 12 h 时取样, 利用等体积的水饱和正丁醇终止反应, 涡旋 2~3 s 后, 于 4 ℃, 10000 r/min 转速下离心 2 min, 静置 10 min, 取等量的上层正丁醇溶液, 于 60 ℃ 水浴蒸干, 收集固体样品, 用色谱级甲醇复溶并定容至 1 mL, 用于 RRLC/Q-TOF-MS 检测.

2 结果与讨论

2.1 Fpendo5A 的最适反应温度和 pH

为了确定 Fpendo5A 的最适反应温度, 考察了 Fpendo5A 在 40~90 ℃ 范围内催化 CMC 底物的活力变化情况. 由图 1(A) 可见, Fpendo5A 的最适反应温度为 80 ℃, 且在 75 和 85 ℃ 下仍然具有较高活性, 在 40 ℃ 时能够保持 30% 以上的活力. 另外, 考察了 Fpendo5A 在 pH=4.0~8.0 范围内催化 CMC 底物的活力变化情况. 由图 1(B) 可见, Fpendo5A 在酸性条件下具有较好的催化活力, 其最适 pH 为 5.5, 在中性条件下可以达到 30% 的活力. 以上分析表明, Fpendo5A 属于酸性嗜热糖苷酶类.

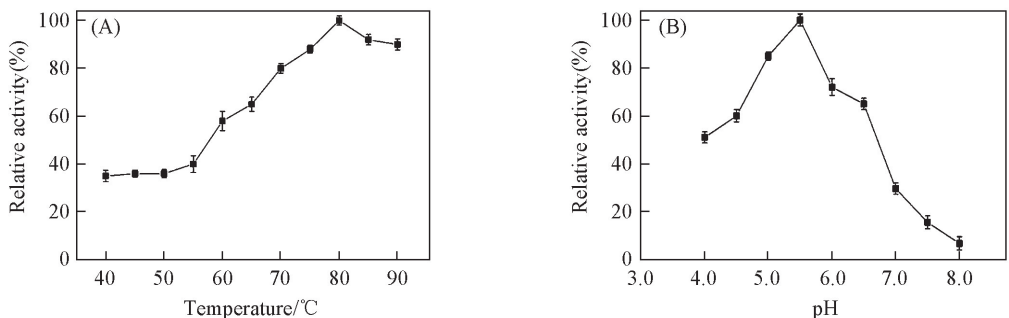


Fig.1 Effects of temperature(A) and pH(B) on the catalytic activity of Fpendo5A

2.2 Fpendo5A 的底物选择性

在 80 ℃, pH=5.5 的最适条件下, 考察了 Fpendo5A 催化不同底物, 包括 CMC、木聚糖、蔗糖和半乳糖甘露聚糖等的水解活力. 结果表明, Fpendo5A 对半乳糖甘露聚糖和 CMC 有较高活力, 其相对活力分别为 100% 和 61%; 对木聚糖和蔗糖仅有微弱的水解活力, 相对活力均为 1%; 未检测到其对可溶性淀粉和海藻糖的水解活力. CMC 是内切纤维素酶的标准底物, 而 Avicel 是外切纤维素酶的标准底物. Fpendo5A 对 CMC 的活力高, 说明其具有内切纤维素酶活力; 而对 Avicel 几乎没有活力, 说明 Fpendo5A 不具有外切纤维素酶活力.

2.3 Fpendo5A 转化三七总皂苷

利用 RRLC/Q-TOF-MS 对 Fpendo5A 转化三七总皂苷的产物进行了结构鉴定, 并分析其转化路径. 通过比较 Fpendo5A 转化三七总皂苷 0 h [图 2(A)] 和 12 h [图 2(B)] 样品的负离子模式总离子流图发现, 共有 10 个峰发生了明显变化, 根据保留时间顺序分别用 1~10 表示每个变化的峰.

在负离子模式下的一级质谱图中, 化合物均含有 $[M-H]^-$ 准分子离子, 由于以 0.1% 甲酸水作为流动相, 谱图中还显示出 $[M+HCOO]^-$ 加合离子, 这为确定化合物的相对分子质量提供了有用的信息.

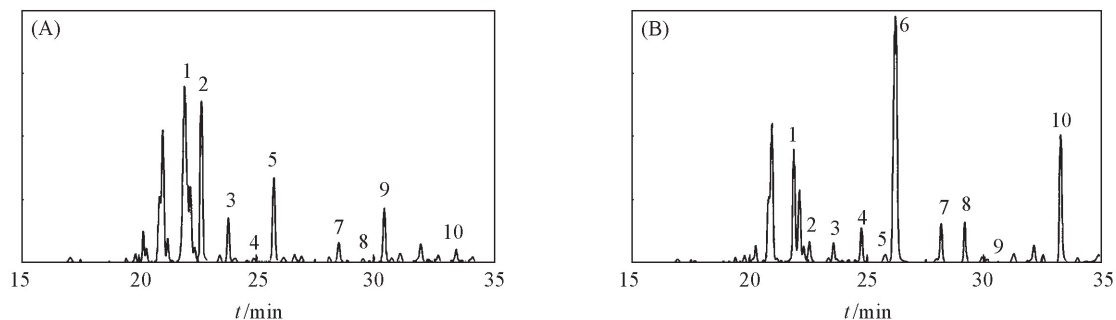


Fig.2 Total ion chromatograms of enzymatic transformation of total notoginsenosides by Fpendo5A in negative-ion mode for 0 h (A) and 12 h (B)

根据负离子模式的二级质谱碎片信息, 对这 10 个变化的峰进一步分析鉴定, 推断其可能的结构式和分子式, 再与对照品及相关文献^[17-22]对照鉴定出对应的化合物, 其保留时间, 一级、二级质谱数据及分析结果见表 1, 测定分子量和理论分子量的偏差均小于 5×10^{-6} . 文中碎片离子的命名是采用 Costello 命名法^[23,24], 在下面的讨论中, 离子的 m/z 值用整数表示.

由 Q-TOF-MS 负离子模式下的准分子离子和二级特征碎片离子信息可知, 峰 1~10 在二级质谱碎裂过程中的裂解方式主要为丢失不同数目和种类的糖基, 从而生成苷元碎片离子 (见图 3).

Table1 Analysis results obtained by RRLC/Q-TOF MS

Peak No.	Compd.	t_R /min	Molecular formula	MS(calcd. mass), m/z	10^6 Error	MS/MS fragment ions of $[M-H]^-$ (mass accuracy $< 5 \times 10^{-6}$)
1	Ra ₁	21.74	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1209.6242 (1209.6274)	2.7	1077.5839 [M-H-Xyl] ⁻ , 945.5418 [M-H-Xyl-Ara(p)] ⁻ , 783.4874 [M-H-Xyl-Ara-Glu] ⁻ , 621.4336 [M-H-Xyl-Ara-GlcGlc] ⁻ , 459.5418 [M-H-Xyl-Ara-GlcGlcGlc] ⁻ , 323.0862 [GlcGlc-H] ⁻
2	Rb ₁	22.67	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107.5957 (1107.5976)	1.7	945.5294 [M-H-Glc] ⁻ , 783.4787 [M-H-GlcGlc] ⁻ , 621.4295 [M-H-GlcGlcGlc] ⁻ , 459.33790 [M-H-GlcGlcGlcGlc] ⁻ , 323.0832 [GlcGlc-H] ⁻
3	Rc	24.01	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5851 (1077.5875)	2.2	945.5193 [M-H-Ara(f)] ⁻ , 783.4760 [M-H-Ara-Glc] ⁻ , 621.4169 [M-H-Ara-GlcGlc] ⁻ , 459.3660 [M-H-Ara-GlcGlcGlc] ⁻
4	Rb ₂	24.93	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5851 (1077.5812)	3.6	945.5348 [M-H-Ara(p)] ⁻ , 783.4898 [M-H-Ara-Glc] ⁻ , 621.4365 [M-H-Ara-GlcGlc] ⁻ , 459.3852 [M-H-Ara-GlcGlcGlc] ⁻
5	Rd	25.76	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.5428 (945.5462)	3.6	783.7832 [M-H-Glc] ⁻ , 621.5318 [M-H-GlcGlc] ⁻ , 459.5767 [M-H-GlcGlcGlc] ⁻ , 323.3125 [GlcGlc-H] ⁻
6	Gyp XVII	26.57	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.5428 (945.5437)	0.95	783.4615 [M-H-Glc] ⁻ , 621.4111 [M-H-GlcGlc] ⁻ , 459.9876 [M-H-GlcGlcGlc] ⁻
7	CMC ₁	28.28	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.5323 (915.5348)	2.7	783.1984 [M-H-Ara(f)] ⁻ , 621.6952 [M-H-Ara-Glc] ⁻ , 459.4832 [M-H-Ara-GlcGlc] ⁻
8	F ₂	29.11	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.4900 (783.4870)	3.8	621.3217 [M-H-Glc] ⁻ , 459.1521 [M-H-GlcGlc] ⁻
9	Rg ₃	30.83	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.4900 (783.4933)	4.2	621.4223 [M-H-Glc] ⁻ , 459.3791 [M-H-GlcGlc] ⁻
10	Rh ₂	33.66	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	621.4372 (621.4347)	4.0	459.3563 [M-H-Glc] ⁻

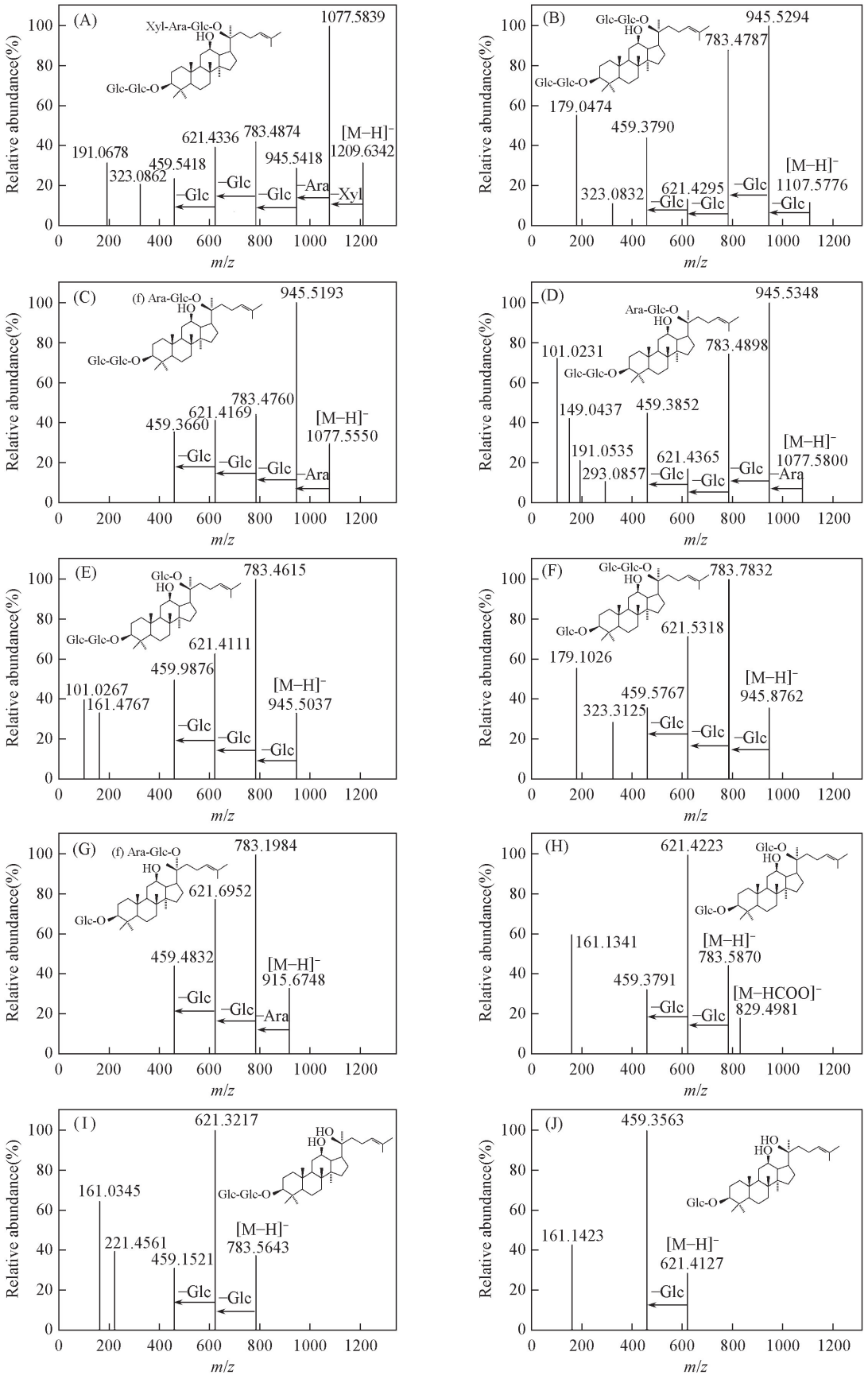


Fig.3 ESI-Q-TOF-MS/MS spectra of ginsenosides in negative-ion mode

(A) Ra₁; (B) Rb₁; (C) Rc; (D) Rb₂; (E) Rd; (F) Gyp XVII; (G) CMC₁; (H) F₂; (I) Rg₃; (J) Rb₂.

以峰1为例,其保留时间为21.74 min,与标准品 Ra_1 的保留时间一致.根据一级质谱图 $[M-H]^-$ 和 $[M+HCOO]^-$ 离子,推测其分子量为1210.在峰1的二级质谱图[图3(A)]中,可以看到162和132的中性丢失,分别对应为六碳糖基(葡萄糖基)和五碳糖基(木糖基或阿拉伯糖基), m/z 1077和945分别为母离子 m/z 1209丢失1分子和2分子五碳糖基的碎片离子, m/z 783, 621和459为母离子丢失2分子五碳糖基的同时分别丢失1, 2和3分子葡萄糖基的碎片离子,其中 m/z 459是原人参二醇型皂苷元的特征碎片离子,表明此化合物为含有2个五碳糖基和3个葡萄糖基的二醇型人参皂苷.参考文献[25]关于 Ra_1 结构分析的报道,结合本实验中的质谱分析结果,推测峰1为人参皂苷 Ra_1 .利用上述分析方法可以推测峰2为人参皂苷 Rb_1 ,峰7为人参皂苷 CMC_1 ,峰10为人参皂苷 Rh_2 .

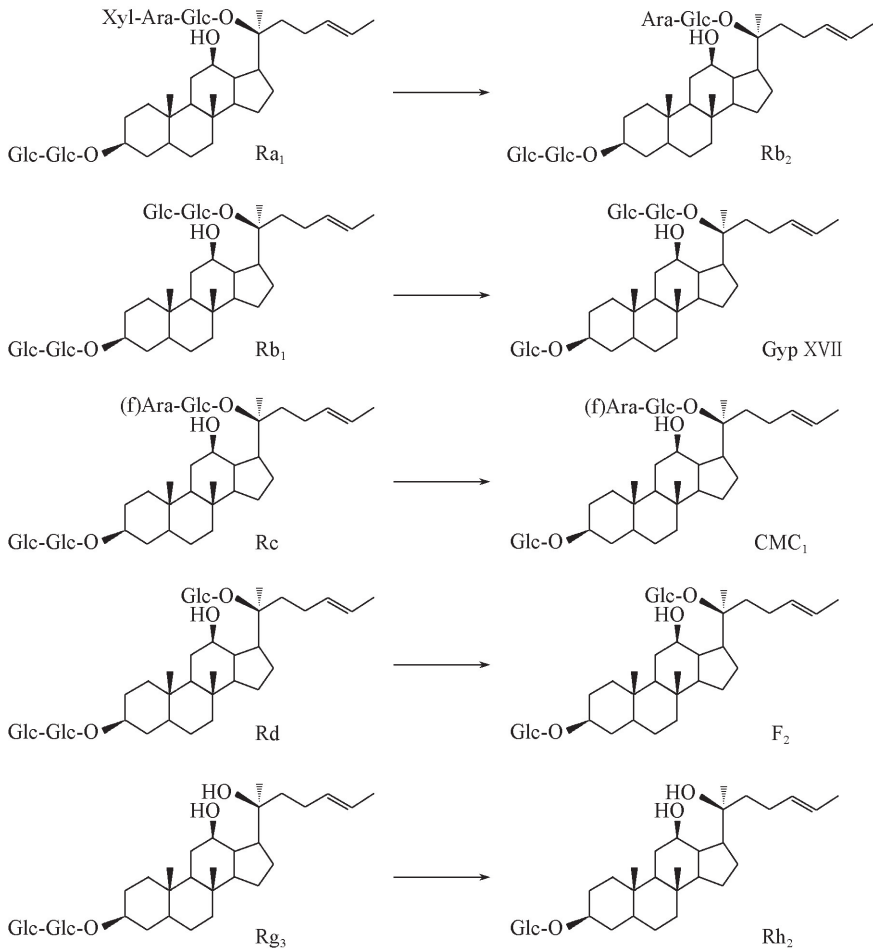
根据一级质谱图推测峰3和4的分子量为1078.它们的二级质谱图[图3(C)和(D)]的碎片离子种类相同,相对丰度存在差异,因此推测峰3和4为同分异构体.在峰3和4的二级质谱图中,均包括 m/z 945, 783, 621和459碎片离子. m/z 945为母离子 m/z 1077丢失1分子五碳糖基的碎片离子, m/z 783, 621和459为母离子丢失1分子五碳糖基的同时分别丢失1, 2和3分子葡萄糖基的碎片离子,其中 m/z 459是原人参二醇型皂苷元的特征碎片离子,因此,峰3和4为含有1个五碳糖基和3个葡萄糖基的二醇型人参皂苷.峰3的保留时间与标准品 Rc 的保留时间一致,为24.01 min.峰4的保留时间与标准品 Rb_2 的保留时间一致,为24.93 min.根据以上分析,可推测峰3和4分别为人参皂苷 Rc 和 Rb_2 .基于与峰3和4相同的分析方法,可推测峰5, 6, 8和9分别为 Rd , Gyp XVII, F_2 和 Rg_3 .

2.4 Fpendo5A转化三七总皂苷的转化机制

通过转化过程的化合物结构鉴定,共发现10种含量发生明显变化的化合物,分别为 Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rb_2 , Gyp XVII, Rd , F_2 , Rg_3 , CMC_1 和 Rh_2 .Fpendo5A转化三七总皂苷12 h后, Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rd 和 Rg_3 的含量降低,表明这5种化合物能够被Fpendo5A转化.而 Rb_2 , Gyp XVII, CMC_1 , F_2 和 Rh_2 的含量升高,基于结构分析发现这5种化合物是去糖基化的转化产物.三七的主要成分为三萜皂苷,与人参皂苷具有相似的结构. Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rd 和 Rg_3 均为二醇型皂苷,结构相似,具有相同的苷元结构且C3位均是以 β -(1,2)糖苷键连接2个葡萄糖分子;其结构差异在于C20位连接的糖残基的种类、数量以及连接方式的不同.人参皂苷 Ra_1 的C20位糖侧链由葡萄糖、阿拉伯糖和木糖组成;人参皂苷 Rb_1 的C20位的糖侧链由2分子葡萄糖组成,其连接方式为 β -(1,6)糖苷键;人参皂苷 Rc 的C20位由1分子呋喃型阿拉伯糖和1分子葡萄糖以 α -(1,6)糖苷键连接而成;人参皂苷 Rd 的C20位只带有1个葡萄糖残基, Rg_3 的C20位无任何糖残基取代.另一方面,转化产物 Rb_2 的C3位糖侧链由2分子葡萄糖组成,而C20位由1分子葡萄糖与1分子吡喃阿拉伯糖以 α -(1,6)糖苷键组成;转化产物 Gyp XVII, CMC_1 , F_2 和 Rh_2 的C3位都只带有1分子葡萄糖,不同之处在于 Gyp XVII的C20位由2分子葡萄糖以 β -(1,6)糖苷键相连接, CMC_1 的C20位由1分子呋喃型阿拉伯糖和1分子葡萄糖以 α -(1,6)糖苷键连接组成, F_2 在C20位仅有1分子葡萄糖, Rh_2 在C20位无任何糖残基取代.

因此,Fpendo5A通过水解 Ra_1 的C20位的 α -(1,4)木糖苷键生成 Rb_2 ;通过水解 Rb_1 的C3位的 β -(1,2)糖苷键生成 Gyp XVII;通过水解 Rc 的C3位的 β -(1,2)糖苷键生成 CMC_1 ;通过水解 Rd 的C3位的 β -(1,2)糖苷键生成 F_2 ;通过水解 Rg_3 的C3位的 β -(1,2)糖苷键生成 Rh_2 .由此可见,Fpendo5A能够催化三七皂苷 Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rd 和 Rg_3 侧链糖基的水解反应,但其催化不同三七皂苷底物的选择性不同.通过以上分析,推测Fpendo5A转化三七皂苷的转化路径为 $Ra_1 \rightarrow Rb_2$, $Rb_1 \rightarrow Gyp$ XVII, $Rc \rightarrow CMC_1$, $Rd \rightarrow F_2$, $Rg_3 \rightarrow Rh_2$ (见Scheme 1).

综上所述,从嗜热细菌基因组中克隆到1个新的纤维素酶基因,并在大肠杆菌中进行了高效可溶性表达.酶学性质研究表明,Fpendo5A为酸性嗜热内切纤维素酶.Fpendo5A能够将三七总皂苷中的主要皂苷成分,即 Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rd 和 Rg_3 分别转化为 Rb_2 , Gyp XVII, CMC_1 , F_2 和 Rh_2 .本研究为酶法转化皂苷类化合物提供了新型酶源,Fpendo5A对于皂苷类底物较高的水解活性及热稳定性使其具有工业化应用的广阔前景.另外,利用酶法转化获得去糖基化皂苷化合物为药物筛选提供了候选分子,同时也为相关药品及保健品的开发研究奠定了基础.



Scheme 1 Transformation pathways of ginsenosides Ra_1 , Rb_1 , Rc , Rd and Rg_3 by Fpendo5A

参 考 文 献

- [1] Wang T., Guo R., Zhou G., Zhou X., Kou Z., Sui F., Li C., Tang L., Wang Z., *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, *188*, 234—258
- [2] Li J., Wang R. F., Yang L., Wang Z. T., *Chin. J. Chin. Mater. Med.*, **2015**, *40*(17), 3480—3487
- [3] Uzayisenga R., Ayeka P. A., Wang Y., *Phytother. Res.*, **2014**, *28*(4), 510—516
- [4] Ng T. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2006**, *28*(8), 1007—1019
- [5] Xie G. X., Ni Y., Su M. M., Zhang Y. Y., Zhao A. H., Gao X. F., Liu Z., Xiao P. G., Jia W., *Metabolomics*, **2008**, *4*, 248—260
- [6] Liu J. H., Wang X., Cai S. Q., Komatsu K., Namba T., *J. Pharm. Sci.*, **2004**, *13*(4), 225—237
- [7] Chen W., Dang Y. J., Zhu C., *Chin. Med-UK*, **2010**, *5*(1), 12—18
- [8] Wang J. R., Yao L. F., Gao W. N., Liu Y., Yick P. W., Liu L., Jiang Z. H., *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, *62*, 9024—9034
- [9] Wang L., Li Z., Zhao X., Liu W., Liu Y., Yang J., Li X., Fan X., Cheng Y., *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **2013**, *6*, 264—269
- [10] Wang J. R., Yao L. F., Zhang R., Xia Y., Ma J., Ho H. M., Hu P., Hu M., Liu L., Jiang Z. H., *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, *62*, 2558—2573
- [11] Kim Y. J., Yamabe N., Choi P., Lee J. W., Ham J., Kang K. S., *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, *61*, 9185—9191
- [12] Yu S. S., Zhou X. L., Li F., Xu C. C., Zheng F., Li J., Zhao H. X., Dai Y. L., Liu S. Y., Feng Y., *Sci. Rep.*, **2016**, *138*(7), 225—237
- [13] Quan K., Liu Q., Wan J. Y., Zhao Y. J., Guo R. Z., Alolga R. N., Li P., Qi L. W., *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 1—7
- [14] Chai R. H., Jiang B. H., Zhao Y. Q., *Modern Chinese Medicine*, **2007**, *12*(9), 14—25 (柴瑞华, 姜彬慧, 赵余庆. 中国现代中药, **2007**, *12*(9), 14—25)
- [15] Wang R. F., Zheng M. M., Cao Y. D., Li H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, *99*, 3433—3442
- [16] Miller G., *Anal. Chem.*, **1959**, *31*, 426—428

- [17] Xu C. C., Yu B. H., Wang H. L., Li J., Liu S. Y., Yu S. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(2), 281—289(许春春, 于渤海, 王红蕾, 李晶, 刘淑莹, 于珊珊. 高等学校化学学报, **2016**, 37(2), 281—289)
- [18] Chen H. Y., Yao C. X., Zhang X. L., *China Pharmacist*, **2017**, 20(3), 460—462(陈红岩, 姚晨旭, 张小龙. 中国药师, **2017**, 20(3), 460—462)
- [19] Dai Y. L., Yu S. S., Zhang Y., Hao Y., Zhong W., Yue H., Liu S. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(7), 1396—1402(戴雨霖, 于珊珊, 张颖, 郝颖, 钟薇, 越皓, 刘淑莹. 高等学校化学学报, **2014**, 35(7), 1396—1402)
- [20] Dai Y. L., Yue H., Sun C. J., Guo Y. L., Zheng F., Li J., Liu S. Y., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(8), 1181—1186(戴雨霖, 越皓, 孙长江, 郭云龙, 郑飞, 李晶, 刘淑莹. 分析化学, **2015**, 43(8), 1181—1186)
- [21] He Y. F., Liu W. L., Su R., Xiu Y., Pei J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2017**, 33(2), 172—178
- [22] Ma Y. H., Liu Y. Y., Wei M. Y., Song F. R., Liu Z. Y., Pi Z. F., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2015**, 31(6), 914—918
- [23] Domon B., Costello C. E., *Glycoconj. J.*, **1988**, 5, 397—409
- [24] Perreault H., Costello C. E., *J. Mass Spectrom.*, **1994**, 29, 720—735
- [25] Lee D. Y., Kim J. K., Shrestha S., Seo K. H., Lee Y. H., Noh H. J., Kim G. S., Kim G. S., Kim Y. B., Kim S. Y., Baek N. I., *Molecules*, **2013**, 18(12), 14849—14861

Transformation of Total Notoginsenosides by Recombinant Endocellulase Fpendo5A[†]

LI Nan, ZHAO Huanxi, LI Jing, WANG Nan, YU Bohao, YUE Hao*, YU Shanshan*
(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China)

Abstract A novel endocellulase(Fpendo5A) was cloned from *Fervidobacterium pennivorans* DSM9078. After being overexpressed and purified from *Escherichia coli*, the enzymatic properties of Fpendo5A were investigated. Also, rapid resolution liquid chromatography coupled with quadruple-time-of-flight mass spectrometry(RRLC/Q-TOF-MS) was performed to investigate the biotransformation process of the total notoginsenosides by Fpendo5A. Fpendo5A exhibited an optimal activity at 80 °C and pH=5.5 and showed the highest activity for carboxymethyl cellulose(CMC), which indicated that Fpendo5A was a thermophilic and acidophilic endocellulase. Also, Fpendo5A showed high biotransformation ability for ginsenoside Ra₁, Rb₁, Rc, Rd and Rg₃, which are the main components in the total notoginsenosides. Ra₁, Rb₁, Rc, Rd and Rg₃ were converted to Rb₂, Gyp XVII, CMC₁, F₂ and Rh₂, respectively by Fpendo5A.

Keywords Notoginsenoside; Endocellulase; Biotransformation; High performance liquid chromatography-mass spectrometry(HPLC-MS)

(Ed.: P, H, D, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.31400682).