



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113403230 A

(43) 申请公布日 2021.09.17

(21) 申请号 202110693619.5

C12P 33/20 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.22

C12R 1/01 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M2021498 2021.05.07

(71) 申请人 中南民族大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区民族大道708号

(72) 发明人 张鹏 田佳琳 许棵 李春艳

黄琪雅 郑娟 王杨洋 林兰瑾

李浩东

(74) 专利代理机构 武汉诚儒知识产权代理事务

所(普通合伙) 42265

代理人 刘天钰

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

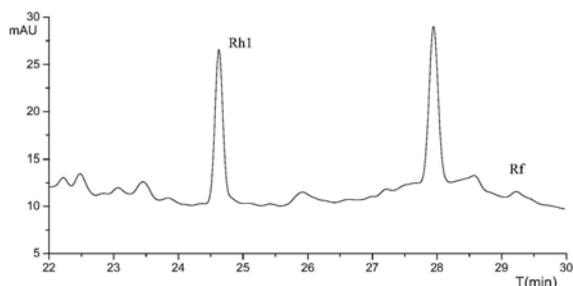
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一株转化人参皂苷Rf为Rh1的拉恩氏菌HGS-393菌株及用途

(57) 摘要

本发明提供了一株将原型人参皂苷Rf转化至稀有人参皂苷Rh1的拉恩氏菌HGS-393菌株,该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国,武汉,武汉大学;邮编430072,保藏日期为2021年5月7日,保藏编号为:CCTCC NO:M2021498;该菌株的16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。上述拉恩氏菌HGS-393菌株能够用于发酵转化制备稀有人参皂苷Rh1。



1. 一株转化人参皂苷Rf为Rh1的拉恩氏菌属 (*Rahnella* sp.) HGS-393菌株,该菌株保藏编号为:CCTCC NO:M2021498,该菌株的16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 权利要求1所述拉恩氏菌属HGS-393菌株的用途,其特征在于:用于发酵转化制备人参皂苷Rh1。

## 一株转化人参皂苷Rf为Rh1的拉恩氏菌HGS-393菌株及用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种拉恩氏菌菌株,该菌株可将人参皂苷Rf转化至人参皂苷Rh1,属于微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 人参(*Panax ginseng*)是我国传统中药材。人参皂苷(Ginsenoside)是人参的主要活性药用成分,具有抗肿瘤、抗氧化、保护心血管系统和神经系统等诸多生理和药理活性,被广泛应用于药物和保健品的开发。

[0003] 人参皂苷分为原型人参皂苷和稀有人参皂苷。原型人参皂苷是指直接从人参中提取的含量丰富的人参皂苷,包括Rf、Ra、Rb1等。稀有人参皂苷是指原型人参皂苷经过代谢转化后形成的生物活性更强的人参皂苷成分,在人参属植物中含量很低或不含,包括Rh1、Rg3、C-K、Rh2等。

[0004] 稀有人参皂苷相较于原型人参皂苷,表现为更显著的生物活性和药理活性。其中稀有人参皂苷Rh1对阿兹海默症、动脉粥样硬化、类风湿关节炎等疾病的防治有良好作用,并作为抗肿瘤辅助制剂在临床上广泛应用。

[0005] 稀有人参皂苷通常由原型人参皂苷转化后获得,转化方法包括物理法、化学法和微生物转化法等。物理法和化学法在转化过程中容易破坏苷元结构,且转化率低、反应剧烈、副产物多。而微生物转化法具有转化效率高、特异性强、能耗低、无污染等优势。

### 发明内容

[0006] 本发明解决了背景技术中的问题,提供了一株转化人参皂苷Rf为Rh1的拉恩氏菌属(*Rahnella* sp.)HGS-393菌株,该菌株可以将人参皂苷Rf转化至人参皂苷Rh1,转化率高。

[0007] 本发明人筛选到一株新型菌株,该菌株被命名为HGS-393,为一种拉恩氏菌属(*Rahnella* sp.)菌株,该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国,武汉,武汉大学;邮编430072,保藏日期为2021年5月7日,保藏编号为:CCTCC NO:M2021498;该菌株的16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 上述拉恩氏菌HGS-393菌株能够用于发酵转化制备人参皂苷Rh1。

[0009] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:本发明所提供的拉恩氏菌属HGS-393菌株能够将原型人参皂苷Rf转化至稀有人参皂苷Rh1;该菌株转化生产人参皂苷Rh1的成本低、反应快、转化率高,发酵20h的原型人参皂苷Rf转化至稀有人参皂苷Rh1的转化效率高达59.62%。该菌株转化生产人参皂苷Rh1反应中,目标产物明确,其他杂质干扰较小,更易制备人参皂苷Rh1,在大量发酵生产Rh1过程中存在明显的优势。

### 附图说明

[0010] 图1为拉恩氏菌HGS-393菌株的发酵转化前发酵液中人参皂苷Rf和人参皂苷Rh1的HPLC检测图;

[0011] 图2为拉恩氏菌HGS-393菌株的发酵转化后发酵液中人参皂苷Rf和人参皂苷Rh1的HPLC检测图；

[0012] 图3为拉恩氏菌HGS-393菌株的发酵转化后发酵液中人参皂苷Rf的LC-MS单通道定向检测图；

[0013] 图4为拉恩氏菌HGS-393菌株的发酵转化后发酵液中人参皂苷Rh1的LC-MS单通道定向检测图。

### 具体实施方式

[0014] 下面结合具体实施例对本发明做详细具体的说明,但是本发明的保护范围并不局限于以下实施例。

[0015] 菌株的分离、培养

[0016] 本实施例中将采自长白山的5年生新鲜野山参的0.5g根组织用75%乙醇表面消毒20min,无菌水清洗3-5次后,放入事先灭菌备用的研钵中,加5mL无菌水研磨成悬浊液,均匀涂布在LA培养基平板上,于37℃恒温培养箱中倒置培养3~5d,用牙签挑取平板上长出的细菌至新的LA平板并进行反复纯化,直至得到单菌落。

[0017] 将单克隆细菌挑取至装有600μL LB液体培养基的1.5mL EP管中,37℃、190r/min摇床培养1d后,加入等体积的50%甘油,混匀后于-80℃超低温冰箱中保存,每个菌株至少保存3份。

[0018] 菌株的筛选

[0019] 将保存的菌种取10μL接种到10mL LB液体培养基中,于37℃恒温摇床180r/min活化培养24h后,按照5%转接量至100mL LB液体培养基(装液量100mL/250mL)进行发酵,37℃、180r/min摇床培养至 $OD_{600}=0.8$ 时,添加人参皂苷Rf至终浓度为30mg/L。经过20h发酵培养后,收集发酵液。

[0020] 对各菌株发酵液样品进行HPLC检测,将其与标准品人参皂苷Rf以及Rh1的HPLC谱图和数据进行比对,确定菌株是否能够将Rf定向转化为Rh1。并根据相应人参皂苷的标准曲线,计算目标菌株对Rf的转化效率。

[0021] 经过以上检测后筛选得到一株能够将人参皂苷Rf转化至人参皂苷Rh1的人参内生菌,将其命名为HGS-393菌株。该菌株发酵20h的人参皂苷Rf转化至人参皂苷Rh1的转化效率为59.62%,发酵转化前发酵液HPLC检测如图1所示;发酵转化后发酵液HPLC检测如图2所示。

[0022] 申请人将HGS-393菌株发酵转化后的发酵液采用LC-MS单通道定向检测,检测结果如图3和图4所示,进一步确定HGS-393菌株能够将人参皂苷Rf转化至人参皂苷Rh1。

[0023] 测序及序列比对、分析

[0024] 将该菌株送某生物技术有限公司测序,该菌株的16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。测序结果在GenBank核酸数据库中进行Blast相似性分析,经Blast序列比对及进化树分析,确定其为拉恩氏菌属(*Rahnella* sp.)。

[0025] 菌株的保藏:

[0026] 将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心,地址:中国,武汉,武汉大学;邮编430072,保藏日期为2021年5月7日,保藏编号为:CCTCC NO:M2021498。

## 序列表

<110>	中南民族大学	
<120>	一株转化人参皂昔Rf为Rh1的拉恩氏菌HGS-393菌株及用途	
<160>	1	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	1436	
<212>	DNA	
<213>	拉恩氏菌属 ( <i>Rahnella</i> sp.)	
<400>	1	
	ttggggcagc taccatgcag tcgagcggca gcggaaagta gcttgctact ttgccggcga	60
	gcggcggacg ggtgagtaat gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa	120
	acggtagcta ataccgcatg acctcgaaag agcaaagtgg gggatcttcg gacctcacgc	180
	catcggatgt gcccagatgg gattagctag taggtgaggt aatggctcac ctaggcgacg	240
	atcccctagct ggtctgagag gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc	300
	ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatgggcgc aagcctgatg cagccatgcc	360
	gcgtgtgtga agaaggcctt agggttgtaa agcactttca gcgaggagga aggcatacata	420
	cttaatacgt gtggtgattg acgttactcg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag	480
	cagccgcggt aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg	540
	caggcggttt gttaagtcag atgtgaaatc cccgcgctta acgtgggaac tgcatttgaa	600
	actggcaagc tagagtcttg tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaatgcgt	660
	agagatctgg aggaataccg gtggcgaagg cggccccctg gacaaagact gacgctcagg	720
	tgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag atacctggt agtccacgct gtaaacgatg	780
	tcgacttgga ggttgtgcc ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcgtt aagtcgaccg	840
	cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg	900
	gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctactct tgacatccac	960
	ggaattcgcc agagatggct tagtgcttc gggaaccgtg agacaggtgc tgcatggctg	1020
	tcgtcagctc gtgtgtgaa atgttgggtt aagtcccga acgagcga cccttatcct	1080
	ttgttgccag cgagtcatgt cggaactca aaggagactg ccggtgataa accggaggaa	1140
	ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat	1200
	ggcatataca aagagaagcg aactcgcgag agcaagcgga cctcataaag tatgtcgtag	1260
	tccgattgg agtctgcaac tcgactccat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtagatca	1320
	gaatgctacg gtgaatacgt tcccgggect tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt	1380
	gggttgcaaa agaagtaggt agcttaacct tcgggagggc gctaccactg gatcct	1436

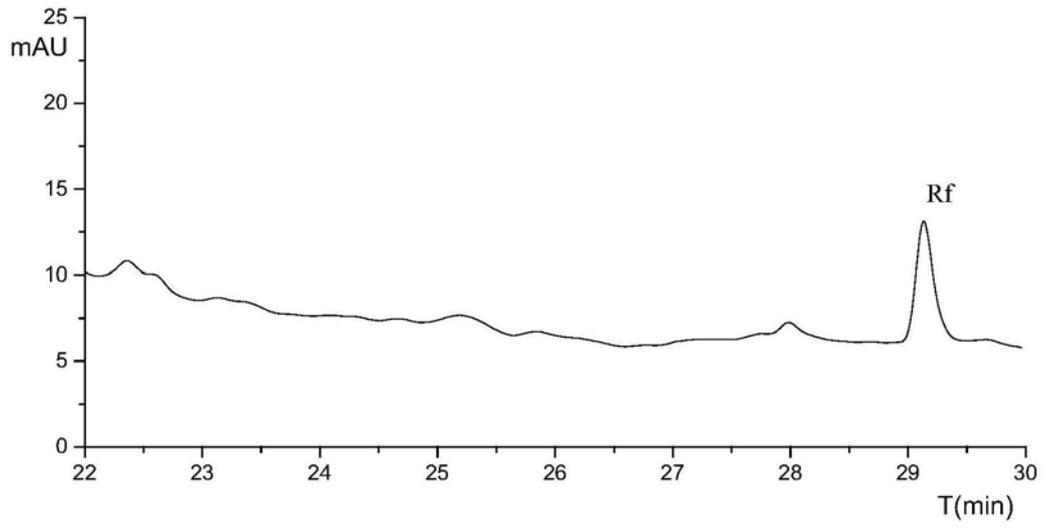


图1

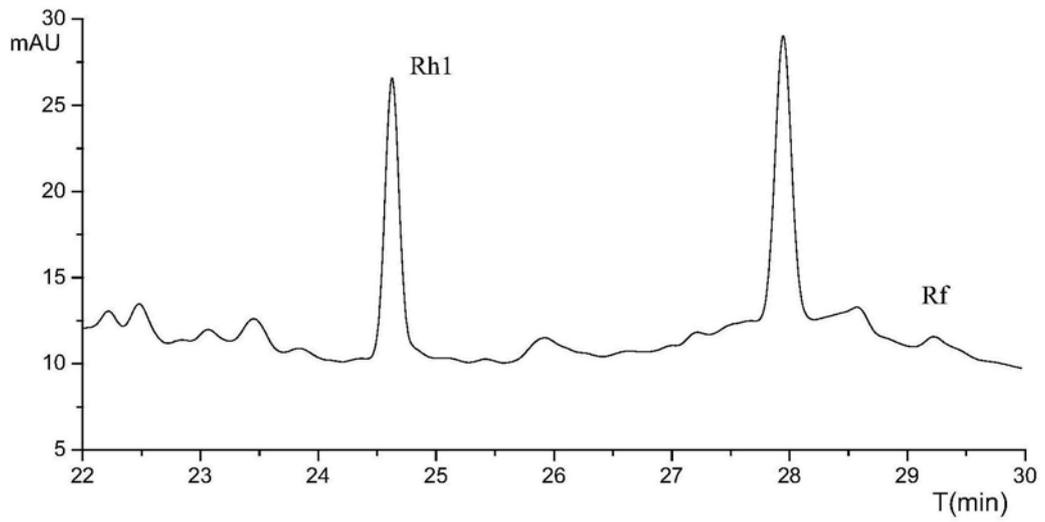


图2

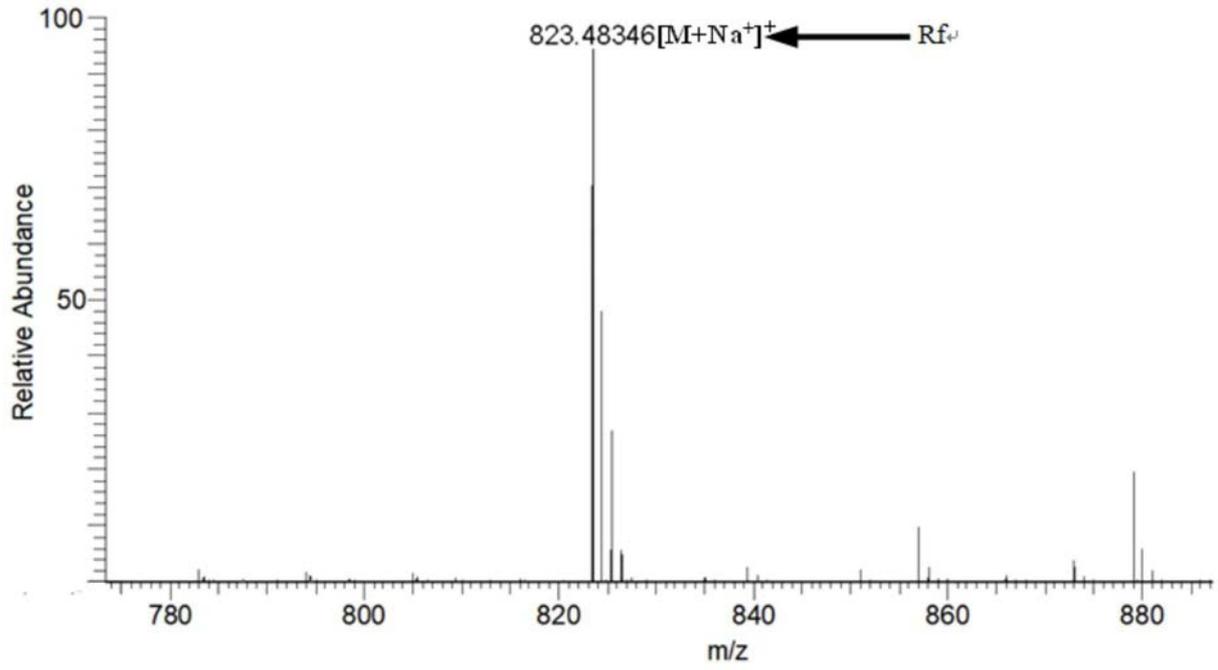


图3

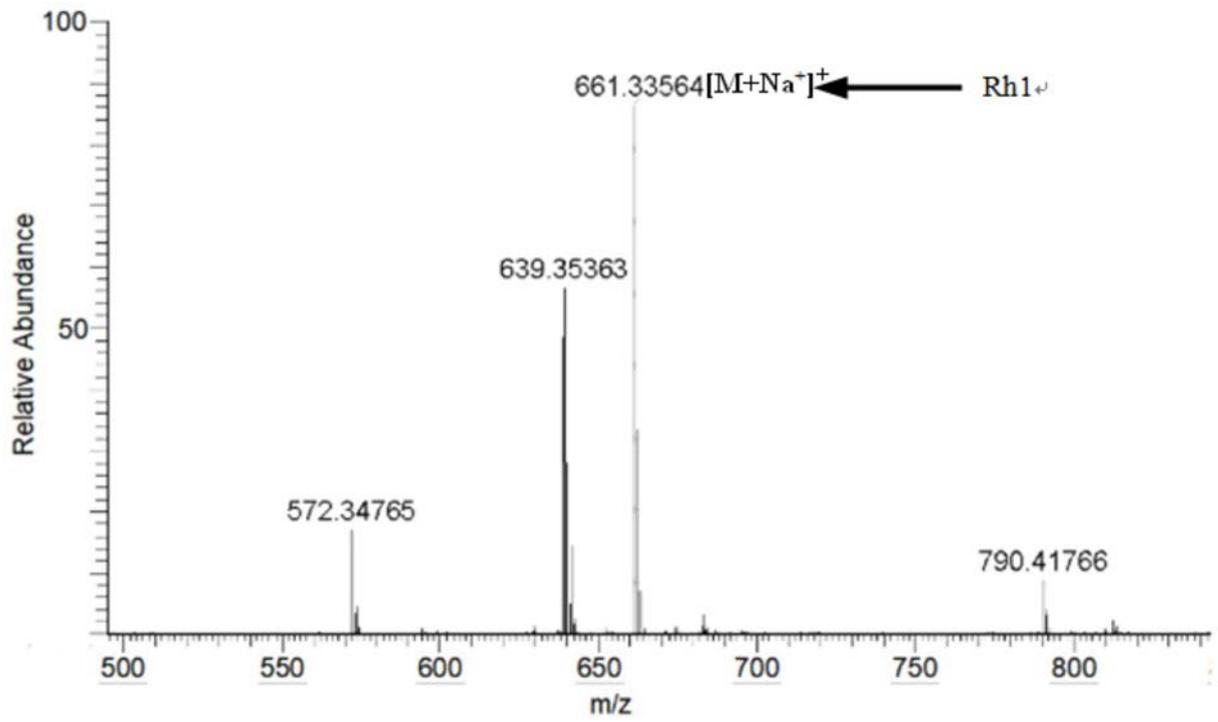


图4