

文章编号: 1004-4353(2014)04-0314-06

人参总皂苷的发酵及其产物的抗癌活性研究

崔磊, 金护定, 尹成日*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要: 从土壤中分离得到 14 种 β -葡萄糖苷酶高产菌株, 其中菌株 YS2 能够有效地将人参茎叶总皂苷和人参提取物中的人参皂苷转化为稀有人参皂苷 Rg3; 菌株 YS2 和 YS7 的人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞具有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 180 $\mu\text{g/mL}$ 和 170 $\mu\text{g/mL}$. 根据 ITS 序列构建的系统发育树, 确定菌株 YS2 为链格孢属(*Alternaria*).

关键词: β -葡萄糖苷酶; 人参茎叶总皂苷; 菌株 YS2; 抗癌活性

中图分类号: Q815

文献标识码: A

Fermentation of ginseng total saponins and anticancer activity of fermentation products

CUI Lei, JIN Huding, YIN Chengri*

(Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules
(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: A total of 14 isolates of high-yield β -glycosidase microorganisms were isolated from soil. Among these isolates, strain YS2 shows a strong ability to convert total saponins of ginseng stems and leaves and ginseng extracts to minor ginsenoside Rg3. Fermented ginseng products by strain YS2 and YS7 could strongly inhibit the growth of colon 26-M3.1 cells and the IC_{50} values are 180 $\mu\text{g/mL}$ and 170 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Phylogenetic tree analysis based on ITS sequences show that the strain YS2 belongs to the genus *Alternaria*.

Key words: β -glucosidase; total saponins of ginseng stems and leaves; strain YS2; anticancer activity

0 引言

人参皂苷(ginsenosides GS)是人参生理活性的主要物质基础,也是人参成分中最有效的药用成分. 目前,已经从人参中分离出约 50 种人参皂苷成分^[1]. 药理研究表明,人参皂苷普遍具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、改善记忆力^[4]、抗疲劳^[5]、保护神经^[6]等药理作用. 人参皂苷 Rg3 最初从红参中分离得到^[7],它主要作用于细胞增殖周期的 G2/M 期,具有诱导肿瘤细胞凋亡,选择性抑制肿瘤细胞

黏附和浸润,抑制肿瘤新生血管的形成,增强机体免疫力等作用;但这些皂苷天然含量极低,如 Rg3 在白参中的含量仅为 0.000 3%,在红参中的含量约为 0.03%,因此从人参中直接提取这些稀有皂苷较为困难.

目前,制备人参皂苷主要采用在人参中对含量较高的 Rb1、Rb2、Rc、Rd 等主皂苷(major ginsenosides)分子的糖基进行选择性的水解的方法,其中微生物转化法具有条件温和、选择性强、无污染

收稿日期: 2014-07-26

* 通信作者: 尹成日(1963—),男,博士,教授,研究方向为发酵工程.

等优点^[8].侯耀达等^[9]利用从林下参根部土壤中分离得到的菌株 GS1-33 将人参根总皂苷转化为人参稀有皂苷 C-K 和 Rh1.白龙律等^[10]利用一种扩展青霉(*Penicillium expansum*)GY-06 将人参皂苷 Rb1 转化为 Rg3.本文利用从土壤中优选的人参皂苷生物转化高效菌株,对人参茎叶总皂苷及人参提取物进行微生物转化,并考察了其人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的抑制作用.

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品采集于长白山园参、移山参根部土壤以及长白山温泉土样.

1.2 试剂

人参茎叶总皂苷和人参皂苷购于成都思科华生物技术有限公司,人参购于延吉市参茸市场,薄层层析板 Silica gel 60-F254 购于德国 Merck 公司,营养琼脂、R₂A 琼脂、YM 琼脂和 MRS 琼脂培养基购于 Sigma 公司,实验中所用化学试剂均为分析纯.

1.3 仪器

仪器有:立式电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-30KB,上海申安医疗器械);生物安全柜(BSC-1300 II A/B3);pH 计(雷磁 PHS-3C 型);电子天平(JA5003 型,上海良平仪器仪表有限公司);高速离心机(MCD-2000 HSIANGTAI);液相色谱仪(LC-6A,日本岛津);振荡培养箱(HZQ-C,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);分析天平(Sartorius BT 224 S);ALT 试剂盒、AST 试剂盒(购于南京建成生物工程研究所);SP-4430 全制动生化分析仪(日本 ARKRAY 公司);PCR 仪(TC-512,英国 Techne 公司);光学显微镜(BX61 Olymps Cooperation Made In Japan);酶标仪(FLx 800,基因有限公司);MALDI-TOF-MS (Voyager DE-STR,日本导津).

1.4 微生物的分离筛选

将采集的土样利用十倍稀释法进行稀释,将稀释液分别接种到营养琼脂、R₂A、YM 琼脂和 MRS 琼脂培养基上,在 30 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d,随后挑取单个菌落传代;重复以上操作数次,得到纯培养的菌株^[11].根据七叶苷显色原

理^[12],七叶苷被 β-葡萄糖苷酶水解后生成葡萄糖和 6,7-二羟香豆素(七叶苷元),七叶苷元遇到铁离子生成黑色物质.把分离出的单一菌株涂在由七叶苷修饰的 R₂A 琼脂(E-R₂A)培养基上培养,琼脂培养基成分包括 R₂A 琼脂 15.2 g,七叶苷 1.0 g,柠檬酸铁 0.5 g.观察培养基的颜色变化,变成黑色的即为具有 β-葡萄糖苷酶活性的菌株,且颜色越黑,活性越强.

1.5 人参茎叶总皂苷的微生物转化

配制 pH 7.0 的液体培养基,加入 10 g/L 的人参茎叶总皂苷,然后分装在 250 mL 三角瓶中,每瓶 50 mL;高压灭菌,冷却至室温后,接种 5 mL 产 β-葡萄糖苷酶的菌株培养液,放置于 30 ℃、150 r/min 振荡培养器中发酵.每隔 2 d 取样品,连续取 5 次,离心后取上清液,然后用 TLC 和 HPLC 测定发酵过程中人参皂苷的变化.液体培养基成分为: NH₄Cl (0.5 g/L), KH₂PO₄ (0.5 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0.25 g/L), 酵母膏 (1 g/L).

1.6 人参提取物的微生物转化

取 25 g 鲜参(或 5 g 干参)加入 250 mL 蒸馏水,用保鲜膜密封后置于恒温培养箱中,24 h 后过滤得到人参提取物.将提取物用 1 mol/L HCl 处理,得到酸处理后的人参提取物.然后,利用产 β-葡萄糖苷酶菌株分别对人参提取物和酸处理后的人参提取物进行发酵,得到两种人参发酵物.

1.7 薄层色谱法(TLC 法)测定人参皂苷

将人参稀有皂苷 Rg3 和 Rh2 的标准品配成混合标准品醇溶液.将样品与标准品溶液在 TLC 板上同时展开,展开剂为体积比为 10 : 5 : 1 的氯仿、甲醇、水混合液,吹干后用 10% (体积比)的硫酸乙醇溶液显色,并与标准品 R_f 值比对,以此检验稀有皂苷 Rg3 和 Rh2 是否生成.

1.8 高效液相色谱法(HPLC 法)测定人参皂苷

高效液相色谱仪 HP 1100,UV 检测器,色谱柱采用 BDS HYPERSIL C18 柱 (250 mm × 4.6 mm),检测波长为 203 nm,流速为 0.8 mL/min,柱温为 30 ℃,流动相为 0.001% 甲酸-乙腈溶液,梯度洗脱(条件如表 1).

表 1 高效液相色谱梯度洗脱条件

t/min	A (乙腈)/%	B (0.001%甲酸)/%
0	25	75
5	25	75
10	25	75
15	53	47
35	45	55
45	45	55
60	60	40

1.9 人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的抑制作用

选取菌株 YS2、YS5、YS7 和 YS8 对人参提取物和酸处理后的人参提取物进行发酵转化,发酵 8 d 后,将发酵液离心,灭菌,冻干成粉末得到人参发酵物.取对数生长期细胞,消化后接种细胞于 96 孔板中,加入不同浓度的人参发酵物培养.加入噻唑蓝(MTT)溶液孵育后,用酶标仪测定吸光度,根据公式:细胞存活率/%=(实验孔测定值/对照孔测定值)×100,计算结肠癌 colon26-M3.1 细胞存活率^[13],并计算 50%细胞存活率时的发酵物的浓度(IC₅₀).

1.10 菌株的形态学观察及 ITS 测序

在光学显微镜下观察菌株 YS2 菌体的大小、形态及孢子形态.采用氯化苄法^[14]提取 YS2 菌株基因组总 DNA,使用 nested-PCR 扩增 ITS 序列^[15].先用引物 NSA3 (5'-AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A-3')和 NLC2 (5'-GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C-3')进行 PCR 扩增.PCR 反应体系(25 μL)为:2X Taq PCR MasterMix (TIANGEN) 12.5 μL, MgCl₂ (25 mM) 1 μL,引物为 NSA3 (5 μM)和 NLC2 (5 μM)各 1 μL, DNA 模板 1 μL,超纯水 8.5 μL. PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 20 个循环;72 ℃ 15 min.采用 PCR 纯化试剂盒(Bioneer 公司)纯化 PCR 产物,送上海英骏生物技术有限公司进行测序.

将测得的基因序列通过 Blast 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)与 GenBank 中核酸数据库进行对比分析,相似的序列进行多重匹配排列分析(clustalx 1.83)^[16].用 Mega 4.0^[17]分析软件中的 Neighbor Joining 方法^[18]构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 微生物的分离与筛选

从采集的长白山土壤样品中共分离得到 256 种菌株,且筛选出 102 种产 β-葡萄糖苷酶的菌株.在其中挑选出 14 种 β-葡萄糖苷酶高产菌株(编号为 YS1-YS14)进行人参茎叶总皂苷和人参提取物的微生物转化实验.

2.2 人参茎叶总皂苷和人参提取物中人参皂苷的含量分析

用 HPLC 分析人参茎叶总皂苷水溶液 10 g/L,其主要成分及含量见表 2.人参提取物中人参皂苷的含量见表 3.由表 3 可知,鲜参和干参提取物中均含有较高含量的 Rb1、Rb2 和 Rd,且干参中人参皂苷的含量比鲜参高.

表 2 人参茎叶总皂苷中人参皂苷含量

	μg/mL				
样品	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Rg3
人参茎叶总皂苷	285.9	508.9	253.6	393.3	ND

注:ND 表示未检出.

表 3 人参提取物中人参皂苷含量

	μg/mL				
样品	Rb1	Rb2	Rd	Rg3	Rh2
干参	115.2	131.9	39.3	ND	ND
鲜参	438.6	275.7	32.2	ND	ND

注:干参(5 g)和鲜参(25 g)分别浸泡在 250 mL 蒸馏水中,置于 85 ℃恒温箱中,24 h 后过滤;ND 表示未检出.

2.3 人参茎叶总皂苷的微生物转化

在 14 种高产 β-葡萄糖苷酶的菌株中,YS2、YS12、YS13 和 YS14 菌株对人参茎叶总皂苷具有较好的转化作用,其中菌株 YS2 的转化效果最好.利用菌株 YS2 发酵人参茎叶总皂苷的产物为稀有人参皂苷 Rg3(图 1),并且发酵 2 d 后 Rg3 的产率达到最高值(见表 4).利用 MALDI-TOF-MS 进一步确定发酵产物 Rg3(分子量 785.02),在负离子模式下,分子离子峰([M+³⁵Cl]⁻=818.1)与同位素峰([M+³⁷Cl]⁻=820.1)的峰高比值为 3:1,由此可知产物的分子量与 Rg3 吻合(见图 2).

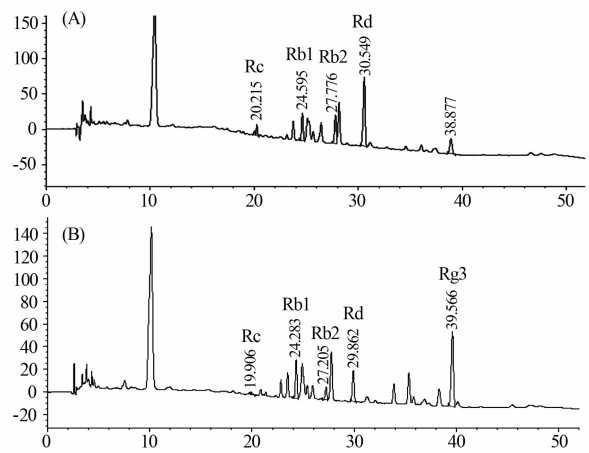


图 1 菌株 YS2 发酵人参茎叶总皂苷的 HPLC 谱图:
(A)为发酵前;(B)为发酵 2 d 后

样品	μg/mL					
	Rg1	Rc	Rb1	Rb2	Rd	Rg3
Blank	1 736.3	253.6	285.9	508.9	393.3	0
YS2-2d	1 470.5	17.1	108.2	147.5	102.1	544.1
YS2-4d	1 278.7	0	104.9	0	0	336.1
YS2-5d	1 243.6	40.7	107.1	0	0	267.7
YS2-6d	1 237.6	0	198.5	0	0	230.9

注:YS2-2d 代表利用菌株 YS2 发酵 2 d,其他同.

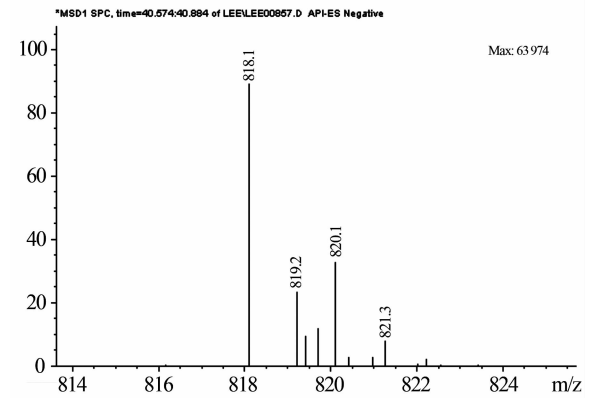


图 2 发酵产物的 MALDI-TOF-MS 谱图

2.4 人参提取物的微生物转化

本文对人参发酵采取了直接发酵和酸处理后发酵的两种方法. 发酵前的人参提取物中主要含有人参皂苷 Rb1、Rb2 和 Rd,未含有稀有人参皂苷 Rg3 和 Rh2 (见表 3). 菌株 YS2、YS5、YS7 和 YS8 均能将人参中的 Rb1、Rb2、Rd 转化为稀有人参皂苷 Rg3,其中菌株 YS2 的转化率最高,并且菌株 YS2、YS7 和 YS8 对酸处理后的人参显示

出更高的转化率(见表 5).

菌种	发酵前		直接发酵		酸处理后发酵	
	Rg3	Rh2	Rg3	Rh2	Rg3	Rh2
YS2	—	—	++	—	+++	—
YS5	—	—	+	—	+	—
YS7	—	—	+	—	++	—
YS8	—	—	+	—	++	—

注:“—”表示未检出,“+”表示少量,“++”表示较多,“+++”表示大量.

2.5 人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的抑制作用

IC₅₀ 值可以用来衡量药物诱导凋亡的能力,即诱导能力越强,该数值越低. 菌株 YS2、YS5、YS7 和 YS8 的人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞均有较强的抑制作用,其 IC₅₀ 值如表 6 所示. 从表 6 中可以看出:菌株 YS2 和 YS7 的人参发酵物(酸处理后发酵)对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的 IC₅₀ 值分别为 180 μg/mL 和 170 μg/mL,具有很强的抑制活性(文献值为 730 μg/mL)^[13];其次是菌株 YS8 的人参发酵物(IC₅₀ 值为 220 μg/mL);其余发酵产物的抑制作用相对弱一些. 分析表明,人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的抑制活性直接与人参发酵物中稀有人参皂苷 Rg3 的含量有关.

表 6 人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞的抑制浓度 (IC ₅₀)				μg/mL
菌种	IC ₅₀	菌种	IC ₅₀	
YS2-1	1 700	YS7-1	650	
YS2-2	180	YS7-2	170	
YS5-1	450	YS8-1	220	
YS5-2	580	YS8-2	600	

注:YS2-1 代表菌株 YS2 的人参发酵物,YS2-2 代表酸水解后的人参发酵物,其他同.

2.6 菌株 YS2 的形态学观察及其 ITS 测序鉴定

菌株 YS2 在 PDA 培养基上生长旺盛,呈丝状、白色(见图 3). 菌丝细长,分隔,分枝,淡色;分生孢子梗由菌丝顶端生成或从菌丝侧壁产生,直立,不分枝(见图 4).

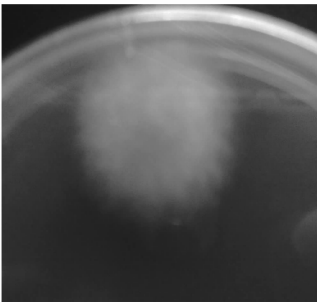


图 3 YS2 菌 PDA 培养基上的菌落

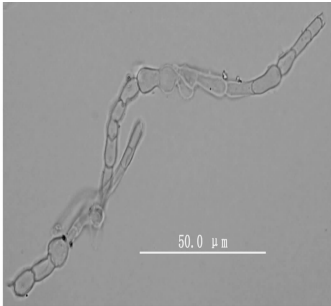


图 4 YS2 菌的分生孢子

菌株 YS2 的 ITS 序列如下:

>YS2_NLB4_1
CTCCTGGTCTGCTGGGATAAAGCATGCAA
TTATGCTTTCAACGAGGATGCCTAGTAAG
CGCGTGTCATCAGCATGGTTTGATTACGT
CCCTGACCTTTGTACACACCGCCGTCGCT
ACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCCT
TCGGCTGCTCGAGGAGGTTGGCAAGACCA
CCTCAAGCCGAAAGTTCGTCAAACCTCGG
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA
AGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGA
TCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGG
AACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAAT
TATTCACCCTTGCTTTTGGCGTACTTCTT
GTTTCCTTGGTGGGTTCGCCACCACTAG
GACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAA
TCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTG

TTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTT
GCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCT
TTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGG
CAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC
ACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTC
TAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTTCAACTT
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC
TGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
AAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGT
AACGGCGAGGAAGCTTCTTTTTTTTCGAA
TTTGA

菌株 YS2 的 ITS 序列测定和系统发育分析结果表明(图 5),该菌株归属于链格孢属(*Alternaria*).

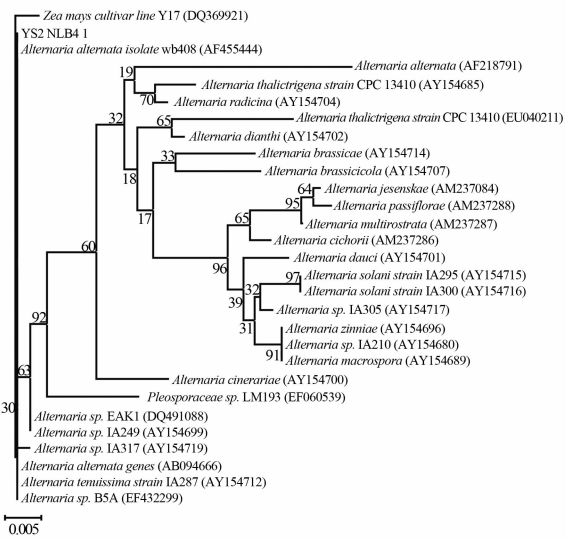


图 5 菌株 YS2 的无根系统发育树

3 结论

本文利用 β -葡萄糖苷酶高产菌株将人参茎叶总皂苷和人参提取物中的人参皂苷转化为稀有人参皂苷 Rg3,研究表明,经酸处理后的人参显示出更高的转化率.菌株 YS2 和 YS7 的人参发酵物对结肠癌 colon26-M3.1 细胞具有很强的抑制作用,其 IC_{50} 值分别为 $180\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $170\text{ }\mu\text{g/mL}$.经形态学观察和 ITS 序列分析,确定菌株 YS2 为链格孢属(*Alternaria*).本研究对利用微生物转化法提高人参的生物活性和制备抗肿瘤稀有人参皂苷均具有一定的意义.

参考文献:

- [1] Cheng L Q, Na J R, Bang M H, et al. Conversion of major ginsenoside Rb1 to 20(S)-ginsenoside Rg3 by *Microbacterium* sp. GS514[J]. *Phytochemistry*, 2008,69(1):218-224.
- [2] 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 keddieii* and enzyme characterization[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012,161(3):294-301.
- [3] Wei X J, Su F, Su X Y, et al. Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice[J]. *Fitoterapia*, 2012,83(4):636-642.
- [4] Liu X, Qiao L R, Xie D, et al. Microbial transformation of ginsenoside-Rg1 by *Absidia coerulea* and the reversal activity of the metabolites towards multi-drug resistant tumor cells[J]. *Fitoterapia*, 2011,82(8):1313-1317.
- [5] Leung K W, Yung K K, Mak N K, et al. Angio-modulatory and neurological effects of ginsenosides [J]. *Curr Med Chem*, 2007,14(12):1371-1380.
- [6] Tang W Y, Zhang Y, Gao J, et al. The anti-fatigue effect of 20(R)-ginsenoside Rg3 in mice by intranasally administration[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012,31(11):2024-2027.
- [7] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention [J]. *Biochem Pharm*, 2010, 80(7):947-954.
- [8] Zhao X S, Gao L, Wang J, et al. A novel ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum* [J]. *Process Biochemistry*, 2009,44(10):612-618.
- [9] 侯耀达,费丽坤,尹成日.微生物转化人参根总皂苷为稀有人参皂苷 C-K 和 Rh1[J].延边大学农学学报,2011,33(2):108-111.
- [10] 白龙律,臧蕴霞,尹成日.微生物转化人参皂苷 Rb1 为 Rg3 的研究[J].延边大学学报:自然科学版,2009,35(2):141-144.
- [11] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms (Tenth edition) [M]. Upper Saddle River: Pearson Education Inc, 2003: 107-110.
- [12] Wu L P, Jin Y, Yin C R, et al. Co-transformation of Panax major ginsenosides Rb1 and Rg1 to minor ginsenosides C-K and F1 by *Cladosporium cladosporioides* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012,39(4):521-527.
- [13] Fu Y, Yin Z H, Wu L P, et al. Fermentation of ginseng extracts by *Penicillium simplicissimum* GS33 and anti-ovarian cancer activity of fermented products[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014,30(3):1019-1025.
- [14] 张莉莉,张芩花,史剑斐,等.利用氯化苳提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析[J].大连轻工业学院学报,2000,19(1):36-39.
- [15] Martin K J, Rygielwicz P T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts[J]. *BMC Microbiology*, 2005,5:28-38.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL _X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Reseach*, 1997,25(24):4876-4882.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007,24(8):1596-1599.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4):406-425.