

文章编号: 1004-4353(2016)02-0177-04

乳酸菌对人参皂苷 Rb1 的生物转化研究

邵淇, 陈贺, 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: 从酸奶、酸菜汁、辣白菜、水果中分离得到 5 种乳酸菌(L1-L5), 并利用分离得到的乳酸菌进行人参皂苷 Rb1 的生物转化. 结果表明, 除了菌株 L2 外, 其他 4 种乳酸菌均能将人参皂苷 Rb1 转化为稀有人参皂苷 F2 或 C-K. 经鉴定, 菌株 L1 为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*), 菌株 L5 为植物乳球菌(*Lactococcus plantarum*), 其他 3 种均为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*).

关键词: 乳酸菌; 人参皂苷; 稀有人参皂苷; 生物转化

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A

Biotransformation of ginsenoside Rb1 by lactic acid bacteria

SHAO Qi, CHEN He, YIN Chengri*

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

Abstract: Five species of lactic acid bacteria (L1-L5) were isolated from yoghurt, Chinese sauerkraut's juice, kimchi and fruits, and these lactic acid bacteria were used for the biotransformation of ginsenoside Rb1. The experimental results show that, these lactic acid bacteria can convert ginsenoside Rb1 to minor ginsenoside F2 or C-K, with the exception of strain L2. The identification results show strain L1 is *Lactobacillus fermentum*, strain L5 is *Lactococcus plantarum*, and other strains is *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: lactic acid bacteria; ginsenosides; minor ginsenoside; biotransformation

0 引言

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科多年生植物人参的根, 是传统名贵中药. 人参皂苷是人参的主要活性成分, 其中含量较少的稀有人参皂苷(minor ginsenosides)具有极高的药用价值和应用前景. 例如, 稀有人参皂苷 Compound K (C-K)在抗肿瘤、抗炎、抗糖尿病、抗血栓形成、抗老化和保肝^[1-2]等方面具有很好的作用; 因此, 获得大量、高纯度的稀有人参皂苷具有重要的科学意义和应用价值. 稀有人参皂苷能够从人参中含量较高的 Rb1、Rb2、Rc、Rd 等主皂苷(major gin-

senosides)转化得到^[3]. 目前, 转化人参皂苷的方法主要有加热、酸水解、碱水解和生物转化法等, 其中化学转化法存在选择性差、副产物多、易造成环境污染等缺点^[4-5], 而酶或微生物介导的生物转化法具有选择性高、条件温和、环境友好等优点^[6]. 付玉等^[7]利用青霉菌(*Penicillium simplicissimum*)将人参提取物中的人参主皂苷转化为稀有人参皂苷 F2、Rg3 和 C-K, 且转化效果十分可观. Yan Qin 等^[8]利用一种拟青霉菌(*Paecilomycesbainier* sp.)将人参皂苷 Rb1 转化为稀有人参皂苷 C-K. 陈旻等^[9]利用植物乳杆菌将人参总皂苷转化为人参皂苷 Rd. Bai 等^[10]利用植物乳杆

收稿日期: 2016-03-22

* 通信作者: 尹成日(1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物生物转化.

菌将人参皂苷 Rb1 转化为人参皂苷 Rd. Kim 等^[11]利用植物乳杆菌 M1 进行发酵将总人参皂苷转化为人参皂苷 Rg1、Rg5、Rk1、C-K、Rh1、Rg2.

乳酸菌(lactic acid bacteria)是一类通过发酵碳水化合物而产生大量乳酸的革兰氏阳性球菌或杆菌的统称. 乳酸菌的分布十分广泛,从动物肠道、食品、物品及少数临床药品中都可以分离得到. 由于乳酸菌具有安全性高,生长速度快,代谢机制较明确,副产物少等特点^[12],近年来日益引起人们的重视. 研究表明,乳酸菌能够产生 β -葡萄糖苷酶,可应用于人参皂苷的生物转化^[13]. 本文从酸奶、酸菜汁、辣白菜、水果中分离得到 5 种乳酸菌,考察了乳酸菌对人参皂苷 Rb1 的转化能力,同时利用 MIDI 微生物鉴定系统对这 5 种乳酸菌进行了鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

酸奶、酸菜、辣白菜以及新鲜水果购于超市;人参皂苷 Rb1、Rd、F2、C-K、PPD 标准品购于成都思科华生物技术有限公司;薄层色谱(TLC)板购于德国 Merck 公司;其他化学试剂均为分析纯.

1.2 仪器与设备

BSC-1300 II A/B3 型生物安全柜,新加坡艺思高科技有限公司生产;SPX-250B-Z 型生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司生产;LDZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器,立德泰勃科技仪器有限公司生产;光学显微镜,OLMPUS;HZQ-C 型空气浴振荡器,常州华冠仪器制造有限公司生产;Agilent HP 1100 型高效液相色谱仪,Agilent 公司生产;MIDI 微生物鉴定系统,MIDI 公司生产.

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程 将酸菜汁、辣白菜汁、酸奶和浸泡水果的溶液用十倍稀释法逐级稀释后,利用含碳酸钙的 MRS 培养基分离得乳酸菌,并对其进行纯化. 对纯化后的乳酸菌进行显微镜检测和 MIDI 微生物鉴定系统分析,确定乳酸菌的种类. 利用分离、纯化得到的乳酸菌对人参皂苷进行转化,然后再用 TLC 板检测其是否有预期产物,最后用高效液相色谱(HPLC)分析转化效率.

1.3.2 菌株的分离与纯化 利用十倍稀释法逐级稀释样品,然后取一定量的稀释液加入到含碳酸钙的 MRS 培养基上;采用涂布平板法将菌液在培养基上涂布均匀,密封,在 37 ℃ 厌氧条件下培养 48 h. 待菌体生长到对数生长期时,挑选有溶钙圈现象,菌落呈圆形,大小中等,有凸起,呈微白色,湿润且边缘整齐的单一菌落,利用划线法将选取的菌落接种到新的 MRS 培养基上,多次重复,直至得到单一的菌株.

含碳酸钙的 MRS 成分:胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母提取物 5 g,葡萄糖 20 g,磷酸氢二钾 5 g,柠檬酸铵 2 g,乙酸钠 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g,吐温-80 1 mL,硫酸锰 0.25 g,碳酸钙 20 g,琼脂粉 20 g,去离子水 1 000 mL, pH 6.2~6.4.

1.3.3 菌株的鉴定 1) 显微镜检测. 取分离、纯化好的菌落进行涂片固定,用草酸铵结晶紫进行初染约 1 min;无菌水冲洗后加碘液媒染约 1 min,水洗,再加 95%乙醇进行脱色,最后用细的番红染色液复染 1 min,待干后在显微镜下进行观察.

2) MIDI 微生物鉴定系统分析. 色谱柱为 Agilent 19091B-102E. 气相色谱各项参数条件均由 MIDI Sherlock 程序设置调用. 采用 MIDI 微生物鉴定系统对分离得到的菌株进行鉴定,鉴定结果相似度应大于 0.5. MIDI 鉴定系统推荐的菌种鉴定结果要求:供试菌株鉴定的第一选择相似指数 SI(similarity index)范围在 0.520~0.882 之间,且第一选择和第二选择 SI 差值应在 0.124 以上. 满足以上可确定菌株为第一选项所列的菌株.

1.4 人参皂苷的生物转化

将人参皂苷 Rb1 加水配成 1.0 g/L 的溶液,每次取 0.03 mL 加入无菌 1.5 mL 离心管中,然后向其中加入 0.03 mL 的 LL 培养基(胰蛋白胨 1.0 g,酵母提取物 0.5 g,氯化钠 1.0 g,琼脂 1.5 g 溶解在 100 mL 无菌蒸馏水中),将分离得到的乳酸菌密封,放置于 30 ℃、150 r/min 空气浴振荡器中发酵 7 d. 终止反应后加入水饱和的正丁醇溶液,8 000 r/min 离心 10 min,取上层清液用于 TLC 和 HPLC 分析,并与空白进行对照,以此确定乳酸菌对人参皂苷的转化能力.

1.5 TLC 分析

用玻璃点样毛细管吸取一定量的样品及人参

皂苷标准品,在展开剂中展开,展至规定距离后取出;挥干溶剂,喷洒显色剂(80% H₂SO₄-乙醇溶液),105℃显色 10 min. 通过与标准品比对 R_f 值初步判断样品中人参皂苷的成分.

1.6 HPLC 分析

将样品与标准品溶剂挥干,然后加入色谱纯甲醇溶解,以此作为 HPLC 分析的样品. 色谱条件:色谱柱 BDS HYPERSIL C18(250 mm×4.6 mm);检测波长 203 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 25℃;流动相为水和乙腈. 洗脱梯度如表 1.

表 1 高效液相色谱流动相洗脱梯度条件

t/min	0	13	33	38	45	55	60	63
A(水)/%	77	77	54	32	32	90	0	77
B(乙腈)/%	23	23	46	68	68	10	100	23

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离

从酸奶、酸菜、辣白菜、水果中采用溶钙圈法分离出了 5 种乳酸菌,分别记为 L1-L5,分离效果如图 1. 由于乳酸菌在培养过程中产生的乳酸可将周围环境中的不溶性碳酸钙溶解成乳酸钙,因此乳酸菌的周围会形成透明圈,即溶钙圈.

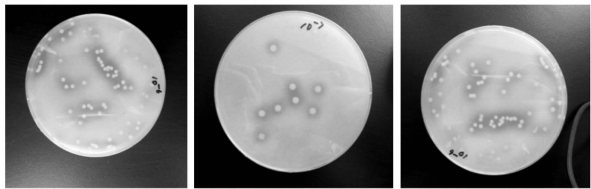


图 1 溶钙圈法分离乳酸菌

2.2 菌种鉴定

通过对单一菌落的观察可发现,菌落形态为乳白色,圆形,边缘整齐,湿润,易挑起,略带酸味. 对分离得到的乳酸菌进行显微镜检查可知,被染色的菌株呈紫色,菌体为细长杆状,无荚膜及鞭毛,排列成双、单、短链状,是革兰氏阳性菌,有些菌株呈多形性,也有些菌株两端染色较深,与乳酸菌个体形态相符.

采用 MIDI 微生物鉴定系统分析表明,菌株 L1 属于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),L5

属于植物乳球菌(*Lactococcus plantarum*),其他 3 株都属于植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*). 鉴定结果相似度大于 0.5,符合鉴定结果要求.

2.3 菌株对人参皂苷的转化

利用分离得到的 5 种乳酸菌以人参皂苷 Rb1 为底物进行生物转化,其 TLC 分析结果如图 2 所示. 图 2 表明:菌株 L1 能将人参皂苷 Rb1 完全转化为稀有人参皂苷 F2,同时有其他未知的人参皂苷产生;菌株 L2 对人参皂苷 Rb1 无转化效果;人参单体皂苷 Rb1 经菌株 L3 的生物转化后有极少量的稀有人参皂苷 F2 产生,说明菌株 L3 对人参皂苷的转化作用较弱;菌株 L4 和 L5 都可以将人参皂苷 Rb1 转化为稀有人参皂苷 C-K,同时在菌株 L5 的作用下有少量的抗肿瘤活性物质原人参二醇(PPD)产生. 由此可知,菌株 L1、L3、L4、L5 对人参皂苷 Rb1 均具有较强的转化能力.

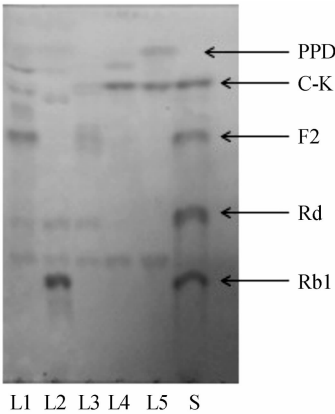


图 2 L1-L5 对单体皂苷 Rb1 的转化结果(S 为标准品)

菌株 L1 和 L5 对人参皂苷 Rb1 进行生物转化的 HPLC 分析结果如图 3 所示. 图 3 表明:菌株 L1 可将底物人参皂苷 Rb1 完全转化为稀有人参皂苷 F2,这与 TLC 测试结果相符;菌株 L5 也可以将人参皂苷 Rb1 完全转化,生成稀有人参皂苷 F2 和 C-K,并有少量的抗肿瘤活性物质原人参二醇(PPD)产生. 通过 HPLC 对比可知,人参皂苷 Rb1 经菌株 L1 生物转化得到的稀有人参皂苷 F2 含量比菌株 L5 的高,其原因是菌株 L5 将部分稀有人参皂苷 F2 转化为抗肿瘤活性物质原人参二醇(PPD)而导致其含量下降. 由于 L5 生物转化产生的稀有人参皂苷 F2 含量相对较少,所以未在 TLC 中显现.

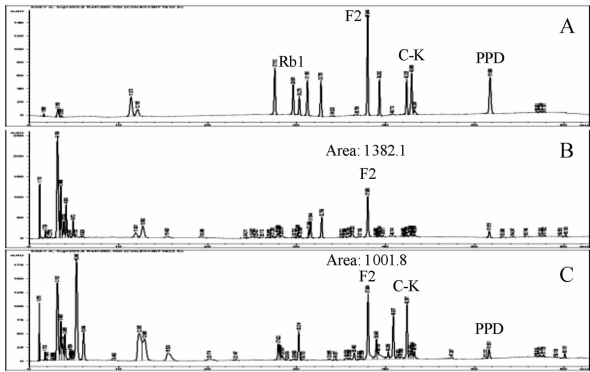


图 3 人参皂苷混合标准品(A)、L1(B)和 L5(C)对 Rb1 转化后的 HPLC 图

3 结论

本文从酸奶、酸菜汁、辣白菜和水果中分离得到 5 种乳酸菌(L1-L5),除了菌株 L2 外,其他菌株对 Rb1 均有生物转化能力.用 MIDI 微生物鉴定系统分析表明,菌株 L1 为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),L5 为植物乳球菌(*Lactococcus plantarum*),其他 3 种菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*).利用乳酸菌将人参皂苷转化为稀有皂苷是今后进一步的研究工作.

参考文献:

[1] Law C K, Kwok H H, Poon P Y, et al. Ginsenoside compound K induces apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via activation of apoptosis-inducing factor[J]. Chin Med, 2014,9(1):11.

[2] Park J S, Shin J A, Jung J S, et al. Antiinflammatory mechanism of compound K in activated microglia and its neuroprotective effect on experimental stroke in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 341(1):59-67.

[3] 侯耀达,费立坤,尹成日.微生物转化人参总皂苷为稀有皂苷 C-K 和 Rh1[J]. 延边大学学报(自然科学版),2011,37(2):108-111.

[4] Keum Y S, Park K K, Lee J M, et al. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol

extract of heat-processed ginseng[J]. Cancer Lett, 2000,150(1):41-48.

[5] Zhao X, Wang J, Li J, et al. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb1 to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulviafulva*)[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(5):721-726.

[6] Yang X D, Yang Y Y, Ouyang D S, et al. A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K[J]. Fitoterapia, 2015,100: 208-220.

[7] 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.

[8] Yan Q, Zhou W, Shi X L, et al. Biotransformation pathways of ginsenoside Rb1 to compound K by β -glucosidases in fungus *Paecilomyces bainier* sp. 229 [J]. Process Biochemistry, 2010, 45 (9): 1550-1556.

[9] 陈旻,王义,孙亮,等.植物乳杆菌发酵转化人参皂苷的研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1435-1440.

[10] Bai Y P, Ganzle M G. Conversion of ginsenosides by *Lactobacillus plantarum* studied by liquid chromatography coupled to quadrupole trap mass spectrometry[J]. Food Research International, 2015, 76(3):709-718.

[11] Kim B G, Choi S Y, Kim M R, et al. Changes of ginsenosides in Korean red ginseng (*Panax ginseng*) fermented by *Lactobacillus plantarum* M1 [J]. Process Biochemistry, 2010, 45 (8): 1319-1324.

[12] Kleerebezemab M, Hols P, Hugenholtz J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000,26(9/10):840-848.

[13] Kim S H, Min J W, Quan L H, et al. Enzymatic transformation of ginsenoside Rb1 by *Lactobacillus pentosus* strain 6105 from kimchi[J]. Journal of Ginseng Research, 2012,36(3):291-297.