



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117126830 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 28

(21) 申请号 202310809585.0

(22) 申请日 2023.07.04

(71) 申请人 三蚁科技(广州)有限公司

地址 510800 广东省广州市花都区凤凰南路56号A9栋2、3层

(72) 发明人 王东明 肖永坤 刘春莹

(74) 专利代理机构 北京中仟知识产权代理事务所(普通合伙) 11825

专利代理师 于丽娟

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

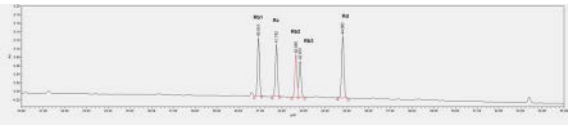
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种人参皂苷糖苷酶的制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,包括配制基础培养基、接种菌种、培养、初次诱导、二次诱导以及提取步骤;所述接种菌种:采用的菌种为米曲霉。所述初次诱导:向培养基中加入的甘油、PPD皂苷,培养3-4d。所述二次诱导:向培养基中加入PPT皂苷,培养3-4d。本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶,对人参皂苷元、糖基位置及糖基种类不具有选择性,能同时水解二醇类和三醇类人参皂苷。



1. 一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:包括配制基础培养基、接种菌种、培养、初次诱导、二次诱导以及提取步骤;所述接种菌种:采用的菌种为米曲霉。

2. 根据权利要求1所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述培养:于25-30℃、常压条件下培养,培养时间为3-4d。

3. 根据权利要求1所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述初次诱导:向培养基中加入的甘油、PPD皂苷,培养3-4d。

4. 根据权利要求3所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述甘油的加入量为基础培养基质量的0.1-0.2%;所述PPD皂苷的加入量为基础培养基质量的0.1-1%。

5. 根据权利要求3所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述PPD皂苷由人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd按照(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1)的比例混合而成。

6. 根据权利要求1所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述二次诱导:向培养基中加入PPT皂苷,培养3-4d。

7. 根据权利要求6所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述PPT皂苷的加入量为基础培养基质量的0.1-1%。

8. 根据权利要求6所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述PPT皂苷由人参皂苷R1、Re、Rg1按照(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1)的比例混合而成。

9. 根据权利要求1所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:所述配制基础培养基:包括以下质量百分含量的组分:0.8-1.2%蛋白胨、0.1-1%葡萄糖、0.1-0.3% ZnCl_2 ,水补足余量。

10. 根据权利要求1所述的一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,其特征在于:制备的一种人参皂苷糖苷酶,对人参皂苷元、糖基位置及糖基种类不具有选择性,能同时水解二醇类和三醇类人参皂苷。

一种人参皂苷糖苷酶的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人参皂苷糖苷酶,以及一种人参皂苷糖苷酶的制备方法。

背景技术

[0002] 天然产物是人类获取功能性原料的巨大宝库,动物植物微生物都是天然产物的来源,起药效的是其中的活性成分。然而活性成分的天然结构并不是活性最高的结构,它们往往以前体药物的形式存在,需要在生物体内代谢成次级代谢产物后才发挥出功效。例如,人参的活性成分人参皂苷,根据苷元结构的不同,人参皂苷可以分为包括二醇和三醇两大类在内的达玛烷型皂苷以及少量的齐墩果酸型皂苷。天然的人参皂苷含有3-4个糖基(二醇类皂苷由Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd,三醇类皂苷有R1、Re、Rg1),只有被代谢成低糖基的次级人参皂苷后才被吸收利用。因此,制备低糖基的皂苷就成为近些年的研究热点。传统的物理化学法能转化天然皂苷制备次级皂苷,但是能制备的皂苷种类有限,副产物多,环境污染大,过程难以控制,分离难度大,生物转化法以其环境友好、专一性强等优点成为人参皂苷结构改造的趋势。

[0003] 以往发现的人参皂苷糖苷酶具有一种酶只能识别一种底物、水解一种糖苷键的特点,这类酶虽然专一性强,但是对底物要求高,必须用单一底物才能完成转化,应用成本很高。

[0004] 本团队为了能低成本制备稀有人参皂苷,曾开发了一系列新型酶,例如对苷元有选择性对糖基位置和糖基种类没有选择性的人参皂苷酶I型、对苷元和糖基位置有选择性对糖基种类没有选择性的人参皂苷酶II型、对苷元和糖基位置有选择性对糖基种类没有选择性的人参皂苷酶III型、对苷元和糖基位置有选择性对糖基种类没有选择性的人参皂苷酶IV型,这些酶能水解不同的底物,生成相同的产物,因此更适合制备次级皂苷。

[0005] 但是这些酶对苷元均具有选择性,也就是说应用期间必须针对产物分别制备各种酶才能进行转化,底物中二醇类皂苷和三醇类皂苷也需要分离开。如果能有一种酶可以对苷元也没有专一性,会进一步的降低转化条件及成本。

[0006] 基于上述问题,本团队开发出了一种方法,可以诱导微生物产生对人参皂苷元没有选择性的新型酶,可以对二醇和三醇类皂苷同时进行转化。

发明内容

[0007] 针对以上技术问题,本发明提供一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,并要达到以下发明目的:制备一种人参皂苷糖苷酶,对人参皂苷元没有选择性,可以对二醇和三醇类皂苷同时进行转化。

[0008] 为实现以上发明目的,本发明采用以下技术方案:

一种人参皂苷糖苷酶的制备方法,步骤如下:

步骤1、配制基础培养基

基础培养基包括以下质量百分含量的组分:0.8-1.2%蛋白胨、0.1-1%葡萄糖、0.1-

0.3% ZnCl_2 , 水补足余量。

[0009] 步骤2、接种菌种

向基础培养基中接入菌种, 菌种为米曲霉。接种量为1-9%。

[0010] 步骤3、培养

接种完成后, 于25-30℃、常压条件下培养, 并通入无菌空气, 无菌空气通入量为0.5-1.5 m^3 /小时; 培养3-4d。

[0011] 步骤4、初次诱导

向培养基中加入的甘油、PPD皂苷(二醇类人参皂苷), 培养3-4d。

[0012] 所述甘油的加入量为基础培养基质量的0.1-0.2%; 所述PPD皂苷的加入量为基础培养基质量的0.1-1%, 所述PPD皂苷由人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd按照(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1)的比例混合而成。

[0013] 步骤5、二次诱导

向培养基中加入PPT皂苷(三醇类人参皂苷), 培养3-4d。

[0014] 所述PPT皂苷的加入量为基础培养基质量的0.1-1%, 所述PPT皂苷由人参皂苷R1、Re、Rg1按照(0.2-1):(0.2-1):(0.2-1)的比例混合而成。

[0015] 步骤6、提取

将培养液离心除去菌体后, 保留液相。向液相中加入食用乙醇, 静置3h后离心或者过滤, 收集沉淀, 获得一种人参皂苷糖苷酶。

[0016] 所述食用乙醇: 乙醇含量为95%(体积分数), 加入量为液相质量的3-4倍;

离心除去菌体, 加入, 离心或过滤收集沉淀得酶蛋白。

[0017] 本发明采用的菌种也可以为酱油曲霉、黑曲霉、土曲霉、乳酸菌中的一种。

[0018] 本发明具有以下有益效果:

(1) 本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶, 对人参皂苷元、糖基位置及糖基种类不具有选择性, 能同时酶解二醇类和三醇类人参皂苷; 酶解转化率约100%。

[0019] (2) 本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶用于酶解PPD皂苷, 可通过控制反应时间来获得不同的中间产物, 当反应进行2h时, 反应液取样检测发现产物中有GYP17、C0、CMc1、CMx1和Rd; 当反应进行5h时, 反应液取样检测发现产物中有GYP75、CY、CMc、CMx、F2、R-Rg3、S-Rg3; 当反应进行24h时, 反应液取样检测发现产物中有CK、R-Rh2、S-Rh2; 当反应进行48h时, 反应产物只有R型和S型两种苷元。

[0020] (3) 本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶用于酶解PPT皂苷, 可通过控制反应时间来获得不同的中间产物, 当反应进行5h时, 反应液取样检测发现产物中有Rg1、R-Rg2、S-Rg2; 当反应进行24h时, 反应液取样检测发现产物中有F1、R-Rh1、S-Rh1; 当反应进行48h时, 反应产物中只有R型和S型两种苷元。

附图说明

[0021] 附图1为实施例2中酶解前PPD皂苷的HPLC图谱检测结果;

附图2为实施例2中酶解前PPT皂苷的HPLC图谱检测结果;

附图3为实施例2中PPD皂苷溶液经酶解反应后产物的HPLC图谱检测结果;

附图4为实施例2中PPT皂苷溶液经酶解反应后产物的HPLC图谱检测结果;

附图5为实施例2中S-PPD和R-PPD的分子结构式；
附图6为实施例2中S-PPT和R-PPT的分子结构式；
附图7为实施例2中PPD皂苷酶解反应过程中分子转化机理图；
附图8为实施例2中PPT皂苷酶解反应过程中分子转化机理图。

具体实施方式

[0022] 实施例1一种人参皂苷糖苷酶的制备方法

步骤1、配制基础培养基

1L基础培养基由以下组分组成：10g蛋白胨、5g葡萄糖、2gZnCl₂、983g水。

[0023] 将上述基础培养基组分按比例混合，制备成混合溶解；经121℃灭菌20min，降温至25℃，制得基础培养基，备用。

[0024] 步骤2、接种菌种

向基础培养基中接入菌种，菌种为米曲霉，拉丁学名：*Aspergillus oryzae*，菌种保藏号：CGMCC 3.13904。接种量为8%。

[0025] 步骤3、培养

接种完成后，于28℃、常压条件下培养，并通入无菌空气，无菌空气通入量为1m³/小时；培养3d。

[0026] 步骤4、初次诱导

培养3d后，向培养基中加入1g甘油、1gPPD皂苷（二醇类人参皂苷），继续培养3d。

[0027] 所述PPD皂苷由人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd按照0.5:1:0.2:1:0.5的比例混合而成。

[0028] 步骤5、二次诱导

培养3d后，向培养基中加入1gPPT皂苷（三醇类人参皂苷），培养3d，培养过程中根据水分损失情况适量补充无菌水。

[0029] 所述PPT皂苷由人参皂苷R1、Re、Rg1按照0.2: 1:0.5的比例混合而成。

[0030] 步骤6、提取

将培养液离心除去菌体后，保留液相。向离心后的液相中加入3.5L 95%（体积分数）的食用乙醇。静置3h后离心，收集沉淀，即酶蛋白（一种人参皂苷糖苷酶）。

[0031] 经检测，共得到8.3g酶蛋白。

[0032] 实施例2 酶蛋白性能检测实验

步骤1、制备PPD皂苷溶液

将0.4g PPD皂苷（二醇类人参皂苷）与20mL pH5.0的0.02M醋酸-醋酸钠缓冲液混合，溶解，得PPD皂苷溶液。

[0033] 对PPD皂苷溶液进行HPLC检测，HPLC图谱如图1所示。

[0034] 由HPLC图谱可见，PPD皂苷含有Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd。

[0035] 其中Rb1含有4个糖基，分别是在20号碳位上的两个葡萄糖基和在3号碳位上的两个葡萄糖基；Rb2含有4个糖基，分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基、一个吡喃阿拉伯糖基，和在3号碳位上的两个葡萄糖基；Rb3含有4个糖基，分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基、一个木糖基，和在3号碳位上的两个葡萄糖基；Rc含有4个糖基，分别是在20号碳位上的

一个葡萄糖基、一个呋喃阿拉伯糖基,和在3号碳位上的两个葡萄糖基;Rd含有3个糖基,分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基和在3号碳位上的两个葡萄糖基。

[0036] 步骤2、制备PPT皂苷溶液

将0.4g PPT皂苷与20mL pH5.0的0.02M醋酸-醋酸钠缓冲液混合,溶解,得PPT皂苷溶液。

[0037] 对PPT皂苷溶液进行HPLC检测, HPLC图谱如图2所示。

[0038] 由HPLC图谱可见, PPT皂苷含有R1、Re、Rg1。

[0039] 其中R1含有3个糖基,分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基和在6号碳位上的一个木糖基、一个葡萄糖基;Re含有3个糖基,分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基和在6号碳位上的一个鼠李糖基、一个葡萄糖基;Rg1含有2个糖基,分别是在20号碳位上的一个葡萄糖基和在6号碳位上的一个葡萄糖基。

[0040] 步骤3、配制酶液

将实施例1制备的8.3g酶蛋白,用500mL pH5.0的0.02M醋酸-醋酸钠缓冲液溶解,得酶液。

[0041] 步骤4、反应

(1)取10mL步骤3制备的酶液与10mL PPD皂苷溶液混合,于45℃反应48h。反应结束后,向反应液中加入80mL乙醇,静置1h后离心并收集上清液。将上清液用HPLC检测, HPLC图谱如图3所示。

[0042] 从图3中可以看出,底物Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd均已不见,只有产物PPD苷元,即二醇类人参皂苷完全被转化成苷元,包括S-PPD和R-PPD,底物Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd完全转化为苷元,转化率几乎100%。说明本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶,对二醇类人参皂苷的糖基位置及糖基种类不具有选择性。

[0043] 另外,在反应过程中进行实时跟踪监测,发现在不同的反应时间得到的产物是不同的,当反应进行2h时,反应液取样检测发现产物中有GYP17、CO、CMc1、CMx1和Rd;当反应进行5h时,反应液取样检测发现产物中有GYP75、CY、CMc、CMx、F2、R-Rg3、S-Rg3;当反应进行24h时,反应液取样检测发现产物中有CK、R-Rh2、S-Rh2;当反应进行48h时,反应产物只有R型和S型两种苷元。

[0044] 根据上述跟踪监测结果以及皂苷的结构,可推理PPD皂苷酶解反应过程中分子转化机理如附图7所示。

[0045] (2)取10mL酶液与10mL PPT皂苷溶液混合,于45℃反应48h,反应结束后加入80mL乙醇,静置1h后离心并收集上清液用HPLC检测, HPLC图谱如图4所示。

[0046] 从图4中可以看出,底物R1、Re、Rg1均已不见,只有产物PPT苷元,即三醇类人参皂苷,包括S-PPT和R-PPT, R1、Re、Rg1均完全被转化成苷元,转化率几乎100%。说明本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶,对三醇类人参皂苷的糖基位置及糖基种类不具有选择性。

[0047] 另外,在反应过程中进行实时跟踪监测,发现在不同的反应时间得到的产物是不同的,当反应进行5h时,反应液取样检测发现产物中有Rg1、R-Rg2、S-Rg2;当反应进行24h时,反应液取样检测发现产物中有F1、R-Rh1、S-Rh1;当反应进行48h时,反应产物中只有R型和S型两种苷元。

[0048] 根据跟踪监测结果以及皂苷的结构,可推理PPT皂苷酶解反应过程中分子转化机

理如附图8所示。

[0049] 综合图3-4可见,本发明制备的一种人参皂苷糖苷酶,对人参皂苷元、糖基位置及糖基种类不具有选择性,能同时水解二醇类和三醇类人参皂苷。

[0050] 本发明中所述的HPLC检测的控制条件如下:

检测波长203nm。流动相乙腈(A)-水(B):0-20min,20%A,20-31min,20%-32%A,31-40min,32%-43%A,40-47min,43%-100%A。柱温35℃。

[0051] 除特殊说明的外,本发明所述的比例均为质量比,所述的百分数均为质量百分数。

[0052] 显然的是,在本发明的构思下,可以变化的具体实施方式还有很多,在此,应该声明,在本发明的发明构思下所做出的任何改变都将落入本发明的保护范围内。

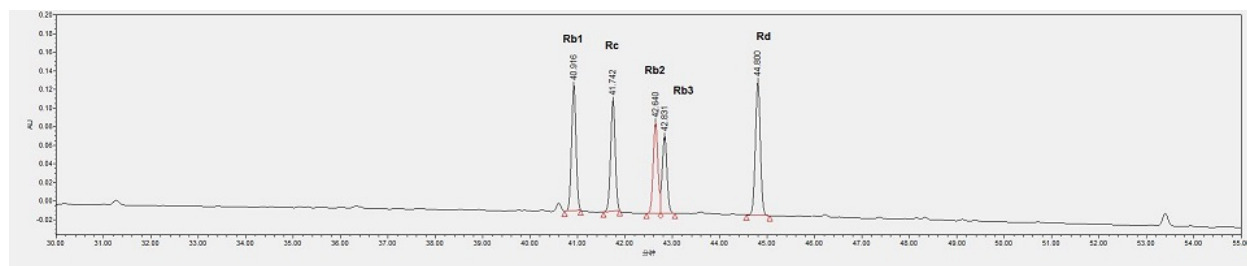


图 1

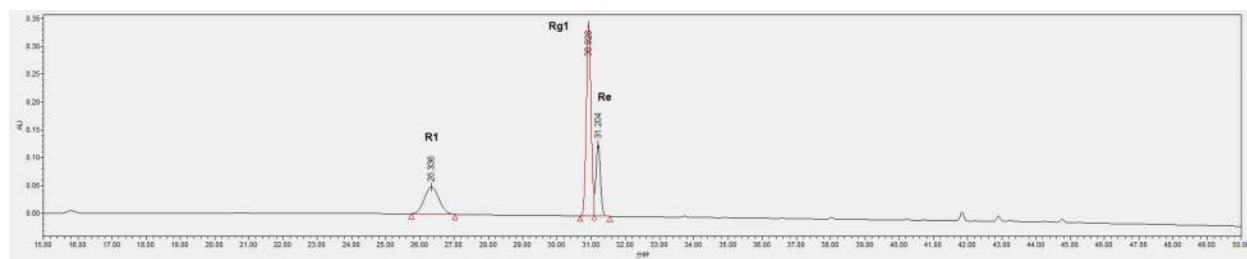


图 2

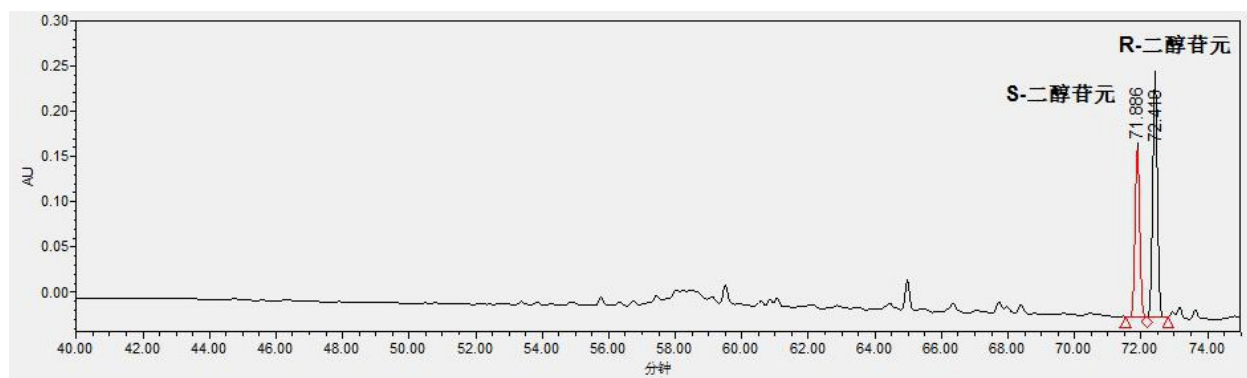


图 3

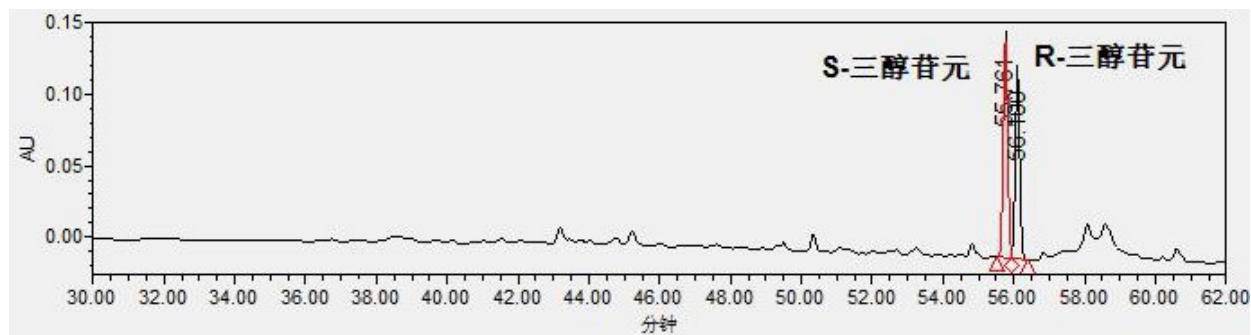


图 4

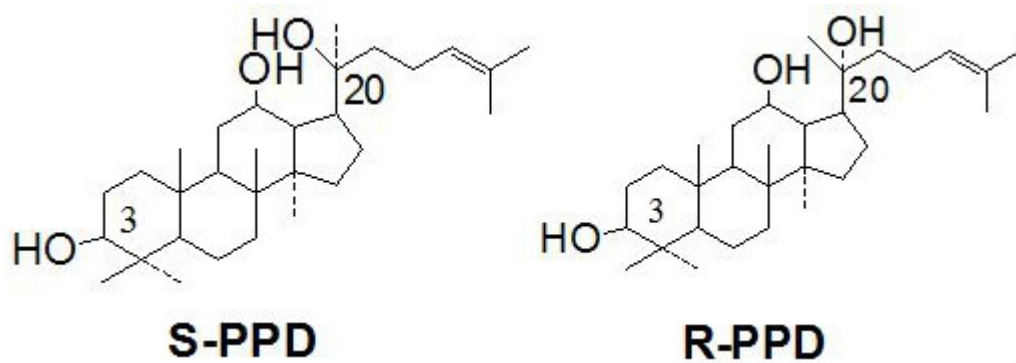


图 5

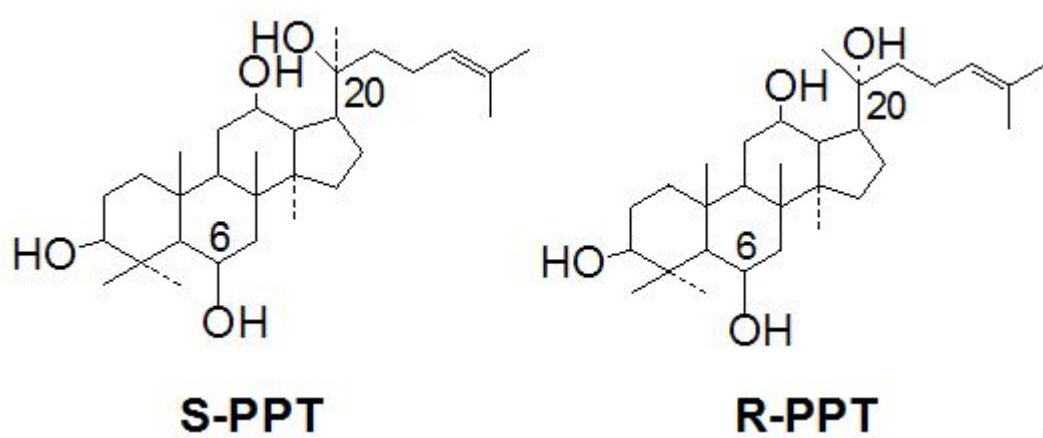


图 6

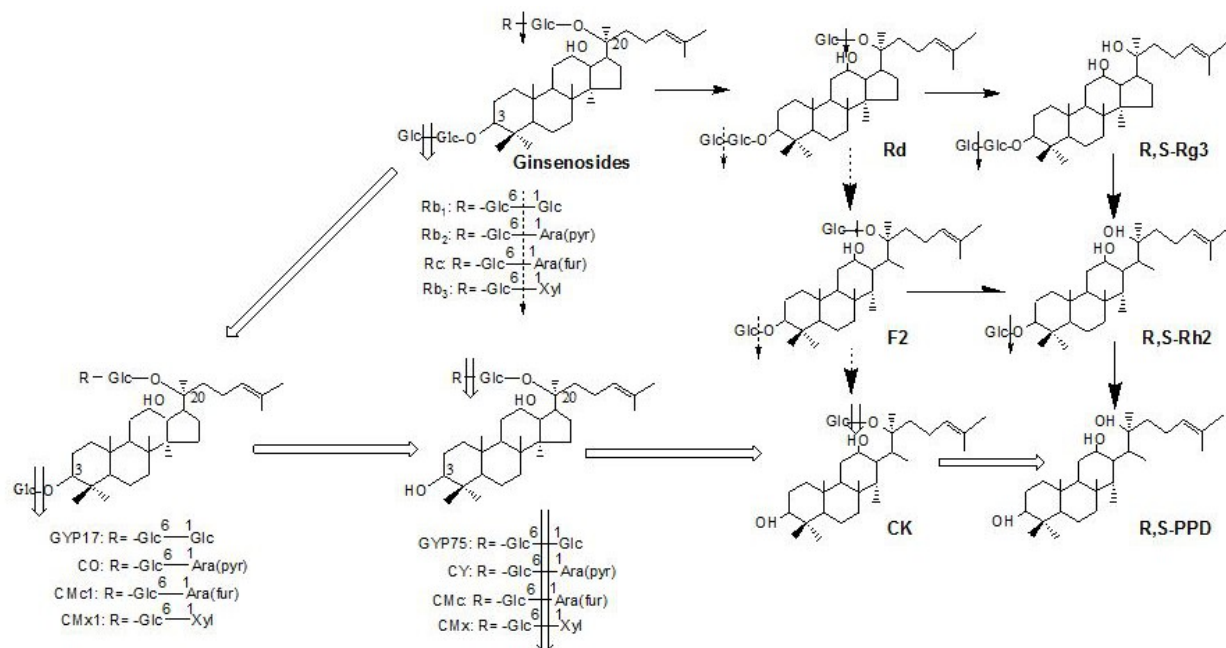


图 7

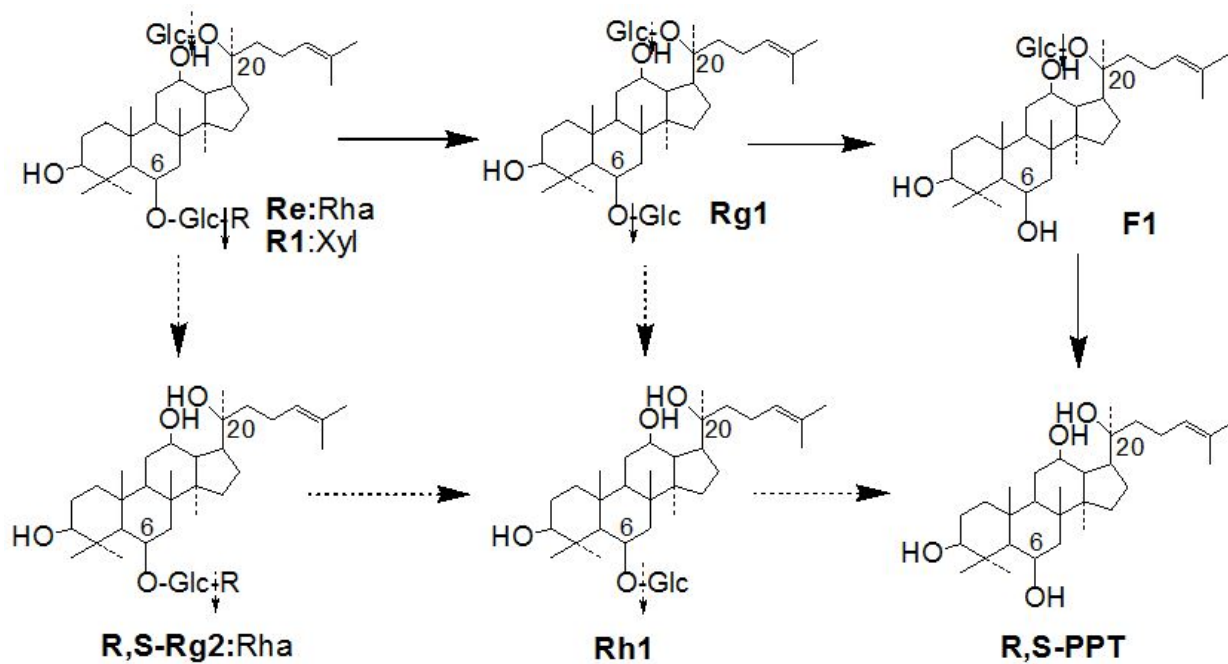


图 8