(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102657331 A
(43)申请公布日 2012.09.12

(21)申请号 201210131031.1

(22)申请日 2012.05.02

(71)申请人 金光洙
地址 133002 吉林省延边朝鲜族自治州延吉市公园街799号
申请人 李英姬

(72)发明人 金光洙 潘元丽 李英姬

(74)专利代理机构 延边科友专利商标代理有限公司 22104
代理人 柳明哲

(51)Int.Cl.
A23L 1/29(2006.01)
A23L 1/20(2006.01)
A23L 2/38(2006.01)

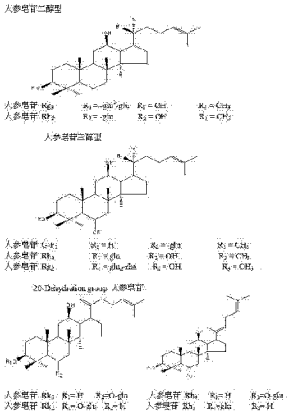
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54)发明名称

用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参、发酵人参纳豆及其提取物的应用

(57)摘要

本发明公开了一种用枯草芽孢杆菌发酵后得到发酵人参，通过将人参原材料粉碎、用水湿润，喷入枯草芽孢杆菌菌液，培养24-72小时得到生物转化发酵人参；人参原材料为鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种；所述的枯草芽孢杆菌为可以将人参皂苷成分代谢生成生物转体的任一枯草牙孢杆菌，得到的生物转化发酵人参提高特征性稀有人参含量，含量比例比发酵前相比分别大于2-10倍以上。本发明还公开了一种人参和大豆通过枯草芽孢杆菌发酵后得到发酵人参纳豆。本发明还公开了用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，经提取所得到提取物在制备发酵人参饮料、发酵人参颗粒剂或发酵人参胶囊剂中的应用。



CN 102657331 A

1. 一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，通过将人参原材料粉碎、用人参原料20%-100%重量的水湿润，喷入人参原料5-20%重量的枯草芽孢杆菌菌液，在25-45℃、相对湿度40-95%下培养24-72小时，得到生物转化发酵人参；

其中所述的人参原材料为鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种；

所述的枯草芽孢杆菌为可以将人参皂苷成分代谢生成生物转体的任一枯草牙孢杆菌。

2. 根据权利要求1所述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其特征是所述的生物转化发酵人参产物含有至少一种以上的下述成分：人参皂苷Rg3、Rg_6、20(S)-Rh_1、人参皂苷PK_3、20(S)-Rf、RO。

3. 根据权利要求1所述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其特征是所述的枯草牙孢杆菌为Bacillus subtils IFO 3007、Bacillus natto Sawamura 06或Bacillus vatto Sawamura IFO 3339。

4. 根据权利要求1所述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其特征在于所述的生物转化发酵人参进一步提取或纯化，得到提取物或纯化物：

提取过程：在所述的生物转化发酵人参中加入溶剂进行提取，所述的溶剂为水、乙醇、甲醇，提取过程中，水为温浸其它有溶剂回流提取；纯化过程：经过上述提取过程所得的提取物，用大孔吸附树脂精制和纯化得到转化人参总皂苷，洗脱溶剂为50-75%乙醇。

5. 一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参纳豆，通过将人参原材料粉碎成粉末，然后将人参粉末和蒸煮后的熟豆混合，喷入人参原料5-20%重量的枯草芽孢杆菌菌液，在25-45℃、相对湿度40-95%下培养24-72小时，得到生物转化发酵人参纳豆；

其中所述的人参原材料为鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种；

所述的枯草芽孢杆菌为可以将人参皂苷成分代谢生成生物转体的任一枯草牙孢杆菌。

6. 根据权利要求5所述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参纳豆，其特征在于所述的生物转化发酵人参纳豆冷藏24小时以上，然后取出进行冷冻干燥，粉碎，过40-80目筛，制得成品。

7. 如权利要求4所述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，经提取或纯化所得到提取物或纯化物在制备发酵人参饮料、发酵人参颗粒剂或发酵人参胶囊剂中的应用。

用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参、发酵人参纳豆及其提取物的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用枯草牙孢杆菌对人参进行发酵所制备的人参的枯草芽孢杆菌发酵产物，用枯草芽孢杆菌对人参和大豆同时发酵所制备的发酵人参纳豆，以及对人参的枯草芽孢杆菌发酵产物进行提取所得的提取物的应用。

背景技术

[0002] 人参为五加科人参属草本植物人参 (Panaxginsongc.A.Meyer) 的干燥根，人参的主要成分为人参皂苷，已经从人参属植物中分离出 50 多种人参皂苷单体化合物，具有抗肿瘤，抗疲劳，抗衰老，抗休克，抗病毒和抗炎症，抗感染，抗组织损伤，抗神经细胞凋亡，抗应激物质代谢，促智，治疗老年痴呆，改善心脏功能，降血糖，增强机体适应性，缓解吗啡类药物的成瘾性，减肥等功效。人参皂苷 Rb_1 和 Rg_1 在天然植物中含量较高，而 Rg_3、Rh_2、compand K 等含量甚微。许多药理研究表明，稀有人参皂苷(如 Rh_1、Rh_2、Rg_3、Rb_3 等) 药效更为珍贵，在某些难治性疾病如肿瘤治疗方面显示独特的疗效。因此，如何获得大量的稀有人参皂苷并将其开发成新型抗肿瘤药物成为现代药学研究的重点。

[0003] 人们服用人参及人参制剂后，人参皂苷类在体内完成分解、吸收、分布等代谢全过程而发挥功效。但是惊奇的发现人参皂苷几乎不被人体所吸收，口服的人参皂苷不被胃液及肝脏酶分解。因此，利用微生物转化法对人参皂苷进行生物转化制备代谢产物稀有人参皂苷，成为人们研究的热点。近年来取得了不少有意义的成果，对转化机制的研究也取得不少进展，如人参皂苷在体内菌群的作用下可代谢为具有抗变态反应活性的 compand K。目前，国内外报道的关于微生物转化人参中人参皂苷的文献，主要是针对人参中稀有皂苷的转化，但多数都停留在试验阶段，没有真正用于大量生产。因此，找出一种能有效提高稀有人参皂苷含量的微生物转化方法，并应用于工业化生产，对医药产业的发展具有重大意义。另外人参不同途径发酵后的生成产物及其人参皂苷含量的改变也成为研究热点。如何将人参中含量较高的皂苷转化为含量较低的皂苷，或药用价值低的皂苷转化为药用价值高的皂苷，是发酵人参研究的热门课题。现在对人参的研究主要部位是人参根茎，发酵菌种大多数是以真菌为发酵菌株，部分研究选用肠道正常菌群，也有以大型药食兼用真菌做发酵菌株。发酵因条件、发酵微生物和人参不同，产物成分也会有所不同。例如：山参和圆参皂苷组成区别很大，山参含有 C-K、Rh_1 和 Rh_2 等稀有皂苷，而圆参中则没有。从现在研究人参发酵结果看，大多数是将稀有人参皂苷含量提高，部分转化为其他人参皂苷，也有部分是发酵后产生了抑菌物质，导致发酵液药理活性发生改变等。比如，将人参皂苷 Re 转化成人参皂苷 Rg_1，人参皂苷 Rc 转化成人参皂苷 Rd，人参皂苷 Rg_3 转化成人参皂苷 Rh_2，和人参皂苷 Rb_1 转化成人参皂苷 F_2 等。发酵可以产生人参皂苷糖苷酶，因此某些含量较高的单体皂苷，经过发酵后产生生理活性更高、应用价值更大的小分子单体皂苷。因此如果能筛选到具有转化人参中原有的人参皂苷为生理活性更高、应用价值更大的小分子皂苷的微生物菌株或分解皂苷糖苷键的糖苷酶，并且应用于工业生产可以提高活性皂苷得率、降低企业生产成本，对于工

业生产将会产生较大的经济效益。

[0004] 从很久以前人们就开始研究人参发酵酒、人参发酵饮料和果汁，如：乳酸发酵人参，枸杞人参发酵酒等并也取得了很好效果。随着人们对人参的研究深入，发现其某些人参皂苷成分具有抗肿瘤作用，但其量少或者在天然人参中没有，因此人们开始关注于这些微少成分，其多数是在微生物对人参作用后产生的代谢产物，最终引发人们研究人参的微生物转化。作为人参主要活性成分的人参皂苷在体内和体外均可以发生生物转化。体外转化化学法，反应条件不好控制，不可避免产生同分异构体、羟基化等副产物；微生物转化法成本低，副产物少，应用广泛。为将转化人参皂苷实现生产应用，确定各种高活性代谢物质的生理代谢途径，筛选可以专一性转化的高产菌种，优化方案，寻找合适的工业生产条件，对于大规模生产稀有人参皂苷或提高皂苷产量及其临床应用具有重大意义。当然，这需要做大量的工作，需要我们不断地去努力。就目前的研究形势来说，利用微生物转化法生产高活性人参皂苷的方法，还不是十分成熟，存在很多难以解决的问题。如转化产物复杂、生产得率低、人参皂苷及其转化产物难以分离纯化等。

目前，人参的应用主要有下述几个形式：人工栽培后干燥所得的白干参形式、和通过在98～100℃条件下对人参进行加热所得的红参的形式，或通过更高稳定条件下对人参进行加热所得的上等红参的形式。近几年人参市场对人参需求的结构有了很大的变化，由未加工的人参制品转向加工人参，其中市场需求增加最多是红参和发酵人参。

发明内容

[0005] 本发明的目的是人参将通过枯草芽孢杆菌发酵后得到发酵人参，即得到生物转化人参皂苷组合物并提高特征性稀有人参含量。

[0006] 本发明的另一目的是人参和大豆通过枯草芽孢杆菌发酵后得到发酵人参纳豆，即生物转化人参皂苷和大豆发酵后得到的纳豆成分相互掺入的组合物。

[0007] 本发明的另一目的是用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，经提取所得到提取物在制备发酵人参饮料、发酵人参颗粒剂或发酵人参胶囊剂中的应用。

[0008] 为实现上述目的，本发明提供的技术方案是：

一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，通过将人参原材料粉碎、用人参原料20%-100%重量的水湿润，喷入人参原料5-20%重量的枯草芽孢杆菌菌液，在25-45℃、相对湿度40-95%下培养24-72小时，得到生物转化发酵人参；其中所述的人参原材料为鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种；所述的枯草芽孢杆菌为可以将人参皂苷成分代谢生成生物转体的任一枯草牙孢杆菌。

[0009] 上述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其中所述的生物转化发酵人参产物含有至少一种以上的下述成分：人参皂苷Rg3、Rg_6、20(S)-Rh_1、人参皂苷PK_3、20(S)-Rf、RO。其中人参皂苷PK_3，Rg_6，20(S)-Rh_1在薄层鉴别中与人参相区别，即人参经过微生物发酵后产生了原来人参中没有的PK3和Rg6，另外可以看出通过发酵后含量明显增加的20(R)-Rh_1。

[0010] 上述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其中所述的枯草牙孢杆菌为Bacillus subtils IFO 3007、Bacillus natto Sawamura 06或Bacillus vatto Sawamura IFO 3339。

[0011] 上述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，其中所述的生物转化发酵人参进一

步提取或纯化，得到提取物或纯化物：提取过程是在所述的生物转化发酵人参中加入溶剂进行提取，所述的溶剂为水、乙醇、甲醇，提取过程中，水为温浸其它有溶剂回流提取；纯化过程是经过上述提取过程所得的提取物，用大孔吸附树脂精制和纯化得到转化人参总皂苷，洗脱溶剂为 50-75% 乙醇。

[0012] 一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参纳豆，通过将人参原材料粉碎成粉末，然后将人参粉末和蒸煮后的熟豆混合，喷入人参原料 5-20% 重量的枯草芽孢杆菌菌液，在 25-45℃、相对湿度 40-95% 下培养 24-72 小时，得到生物转化发酵人参纳豆；其中所述的人参原材料为鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种；所述的枯草芽孢杆菌为可以将人参皂苷成分代谢生成生物转体的任一枯草牙孢杆菌。

[0013] 上述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参纳豆，其中所述的生物转化发酵人参纳豆冷藏 24 小时以上，然后取出进行冷冻干燥，粉碎，过 40-80 目筛，制得成品。

[0014] 上述的一种用枯草芽孢杆菌发酵的发酵人参，经提取或纯化所得到提取物或纯化物在制备发酵人参饮料、发酵人参颗粒剂或发酵人参胶囊剂中的应用。

[0015] 本发明枯草芽孢杆菌菌液配制方法制备是已经公开的技术。其使用枯草芽孢杆菌发酵人参的主要理论依据：纳豆是大豆通过枯草芽孢杆菌发酵而生产的一种人们喜欢乐吃的普通食品，同时也具有很强的保健作用和生物活性，包括抗癌，防癌、降血糖、降血压、抗氧化、抗血栓形成和溶解血栓、防治骨质疏松症及整肠等作用。这主要是大豆经过枯草芽孢杆菌发酵时大豆中原有的物质引起生物转化而产生活性物质的结果，纳豆中的主要活性物质为大豆皂苷、异黄酮类及多肽类等。纳豆菌是纳豆中筛选出的杆菌属于枯草芽孢杆菌属，为需氧型革兰氏阳性菌。枯草芽孢属的重要特点是能够分泌各种胞外酶，包括蛋白酶、淀粉酶、谷氨酸转肽酶 (GTP)、脂肪酶、果聚糖蔗糖酶和植酸酶，纳豆菌分泌的酶比其他枯草芽孢杆菌分泌同样活性的酶高几十倍。纳豆菌具有芽孢，胃环境中均能保持高度的稳定性，在肠胃道中不增殖，只在肠道上段迅速发育转变成具有新陈代谢作用的营养型细胞。因此从作用机制，枯草芽孢杆菌可以对蛋白质、糖类及由糖和苷元结合形成的苷类物质可以进行生物转化产生小分子代谢物质。大豆中的化学成分和人参中的化学成分其类型基本一致，主要成分为皂苷和黄酮类，而主要有效成分也是皂苷类和黄酮类，这种理念成为用枯草芽孢杆菌发酵人参的主要理论依据。前期的研究结果确实证明了本发明人的研究假设和研究目的。从发酵结果中看出人参经过枯草芽孢杆菌发酵后成分有了很大的转化，不仅产生了新的物质而且稀有人参皂苷的含量大大增加了，这本身就大大提高了人参的应用价值和药理活性。

[0016] 用枯草芽孢杆菌转化的人参，人参皂苷 Rg3、Rg_6、20(S)-Rh_1、人参皂苷 PK_3、20(S)-Rf、RO。其中人参皂苷 PK_3，Rg_6，20(S)-Rh_1 在薄层鉴别中与人参相区别，即人参经过微生物发酵后产生了原来人参中没有的 PK3 和 Rg6，另外可以看出通过发酵后含量明显增加的 20(R)-Rh_1。化合物的结构用 TLC、高效液相、1H-NMR、13C-NMR、H-H 相关谱、HSQC、HMBC、NOESY 证明，同时与对照品相对照核实。其中 TLC 图谱见附录图 2。

[0017] 本发明在对人参原材料进行发酵，其中所使用的枯草芽孢杆菌能够对人参皂苷成分进行生物转化，人参的枯草芽孢杆菌的发酵产物，其中人参皂苷 Rg_3，Rh_1 和人参皂苷 20(S)-Rf、RO 含量比例比发酵前相比明显增加 (TLC 中定量以后斑点面积的比较)，其中人参皂苷 PK_3，Rg_6，是人参经过微生物发酵后产生的原来人参中没有的成分，具体效果看图 1

中的枯草芽孢杆菌发酵人参中转化的人参皂苷、图 2 中的用枯草杆菌发酵前人参和发酵后人参的 TLC 比较。本发明首先对人参发酵前后的化学成分做了薄层鉴别，如图 3 和 4，初步发现人参发酵前后化学成分有明显的区别。经过进一步分离，确定了人参皂苷经生物转化后变化的皂苷成分为 PK_3，Rg_6，20(S)-Rh_1。图 3 和 4 的结论是两批发酵人参的皂苷成分基本一致，人参发酵前后化学成分有明显区别，其中 1、2 和 3 为主要的三个不同组分，即人参皂苷生物转化后的化学成分有所变化，有待于做进一步分离、结构鉴定和含量研究。如图 5，PK_3，Rg_6，20(S)-Rh_1 它们为薄层鉴别中区别部分化合物，即人参经过微生物发酵后产生了原来人参中没有的 PK3 和 Rg6，另外可以看出 20(S)-Rh_1 的含量增高，以上都是属于人参皂苷生物转化后的变化。

附图说明

[0018] 图 1 为枯草芽孢杆菌发酵人参中转化的人参皂苷。

[0019] 图 2 为用枯草杆菌发酵前人参和发酵后人参的 TLC 比较，其中 a 表示用枯草杆菌发酵前人参；b 表示经过枯草芽孢杆菌发酵后的发酵人参。

[0020] 图 3 为人参发酵前后的化学成分做了薄层鉴别图，其中 a：发酵人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 50%；b：发酵人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 75%；c：发酵人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 50%+75%；(预实验部分) d：同批人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 75%；展开剂：氯仿：甲醇：水 =2：1：0.1；显色剂：10% 硫酸 - 甲醇。

[0021] 图 4 为人参发酵前后的化学成分做了薄层鉴别图，其中 a：发酵人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 50%+75%；(预实验部分) b：发酵人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 75%；c：同批人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 75%；d：不同批人参乙醇提取物大孔吸附树脂洗脱部分 75%。

[0022] 图 5 为人参发酵前后的化学成分做了薄层鉴别图，其中 1：元参；2：发酵人参；3：PK3；4：20(S)-Rh1；5：Rg6；6：20(R)-Rg3；7：三七皂苷 R2；8：Rg1。展开剂：氯仿：甲醇：水 =7：2：0.3；显色剂：10% 硫酸 - 甲醇。

具体实施方式

[0023] 实施例 1

发酵人参制备。取人参原材料：鲜人参、干人参、红参、白参、尾参、人参叶中的任一种或多种，对其切片、粉碎、用人参原料 20%-100% 重量的水湿润，喷入人参原料 5-20% 重量的枯草芽孢杆菌菌液，枯草牙孢杆菌优选 Bacillus subtils IFO 3007、Bacillus natto Sawamura 06 或 Bacillus vatto Sawamura IFO 3339，在 25-45℃、相对湿度 40-95% 下培养 24-72 小时，得到生物转化发酵人参，生物转化发酵人参产物含有至少一种以上的下述成分：人参皂苷 Rg_2、Rg_3、Rh_1、Rh_2、人参皂苷 G-F_1、CK、F_2。

[0024] 实施例 2

将人参 100g 切片、粉碎，过 40 ～ 80 目筛，用人参原料 20%-100% 重量的水湿润，喷入人参原料 5-20% 重量的枯草芽孢杆菌菌液，培养 48 小时，培养物干燥，用 75%-95% 乙醇水溶液回流提取二次每次 2-3 小时，回收乙醇得乙醇提取物，乙醇提取物通过 D101 大孔吸附树脂，用 75% 乙醇洗脱得转化人能总皂苷。

[0025] 实施例 3

将鲜人参 100g 细切，捣碎并灭菌，喷入枯草芽孢杆菌菌液，培养 48 小时，培养物干燥，用 75% 乙醇提取，回收乙醇得乙醇提取物，乙醇提取物通过 D101 大孔吸附树脂，用 75% 乙醇洗脱得转化人能总皂苷。

[0026] 实施例 4

取精选后的黄豆 100g 用水浸泡 10-24 小时；然后在 100℃以上的温度下蒸煮 20-60 分钟，蒸煮后的熟豆冷却至 20-40℃时；将蒸煮后的熟豆和人参粉末 5g 混合均匀，喷入纳豆菌液，在温度 35-45℃、相对湿度 50-90% 条件下发酵培养 24-48 小时；将发酵好、产生较多的透明粘丝的发酵人参纳豆置于 0-10℃冷藏室内冷藏 24 小时以上；取出，进行冷冻干燥，粉碎，过 40-80 目筛，得发酵人参纳豆成品。

[0027] 实施例 5

向果糖 0.5-5%、葡萄糖 0.5-10% 中加入蒸馏水 30-80ml 水，加热至 95℃，缓缓冷却至 70℃，其溶液中加入柠檬酸 0.1-0.2%、柠檬酸钠 0.1-2% 和苯甲酸钠 0.1-0-2% 搅拌溶解。在此溶液中加发酵人参提取物强烈搅拌使之溶解，待冷却后加蒸馏水至 100ml，制备含有 250mg 生物转化发酵人参提取物的 100ml 饮料组合物。

[0028] 实施例 6

向糖粉 1-5g、糊精 5-15g 的混合物中加发酵人参提取物用 70% 乙醇制成软材，挤压过 12 目筛，制成湿颗粒，干燥、整粒，制备含有 3g 生物转化发酵人参提取物的 20g 颗粒剂。

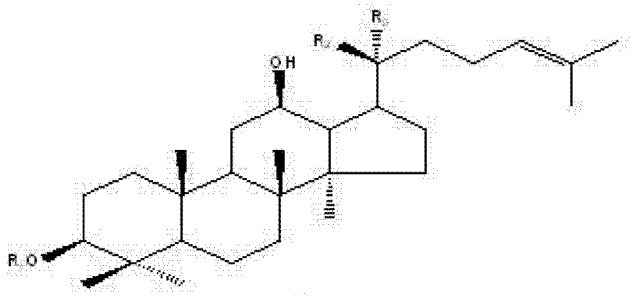
[0029] 实施例 7

乳糖 175g，甘露醇 75，交联聚乙烯吡咯烷酮 25，硬脂酸镁 5，发酵人参提取物，混合均匀，95％的乙醇作润湿剂制软材，24 目筛制粒，湿颗粒于 60℃条件下进行干燥。用 24 目筛整粒，加入硬脂酸镁混匀，用压片，即得分散片，制备含有生物转化发酵人参提取物每 g 颗粒剂中含有 50mg。

[0030] 实施例 8

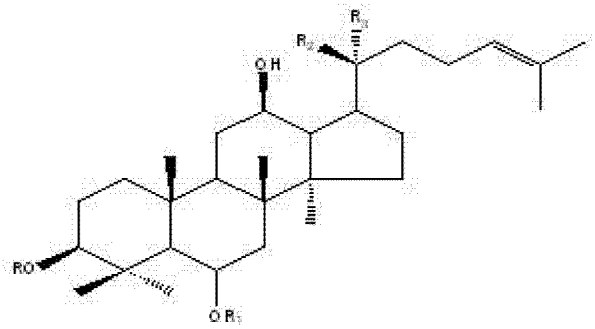
取聚乙二醇 -400 212g，丙三醇 11g，聚乙二醇 -600 17g，混合均匀，制得软胶囊基质，该基质中加入枯草杆菌发酵人参中提取、纯化的转化人参总皂苷制备软胶囊。每粒胶囊中含有转化人参总皂苷 5mg。

人参皂苷二醇型



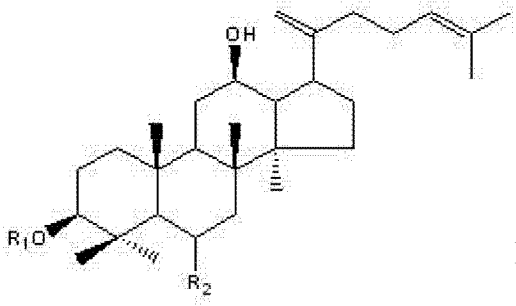
人参皂苷 Rg_3 R_1 = -glu[2]-glu R_2 = OH R_3 = CH_3
人参皂苷 Rh_2 R_1 = -glu R_2 = OH R_3 = CH_3

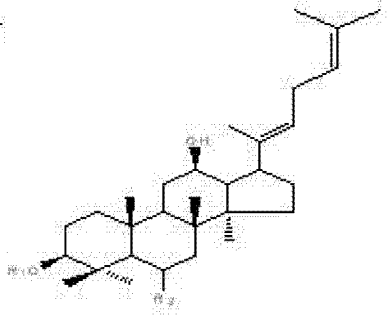
人参皂苷三醇型



人参皂苷 G-F_1 R_1 = H R_2 = -glu R_3 = CH_3
人参皂苷 Rh_1 R_1 = glu R_2 = OH R_3 = CH_3
人参皂苷 Rg_2 R_1 = glu$_2$-rha R_2 = OH R_3 = CH_3

20-Dehydration group 人参皂苷





人参皂苷 Rk_3 R_1= H R_2=O-glu 人参皂苷 Rh_4 R_1= H R_2=O-glu
人参皂苷 Rk_2 R_1= O-glu R_2= H 人参皂苷 Rh_3 R_1=glu R_2= H

图 1

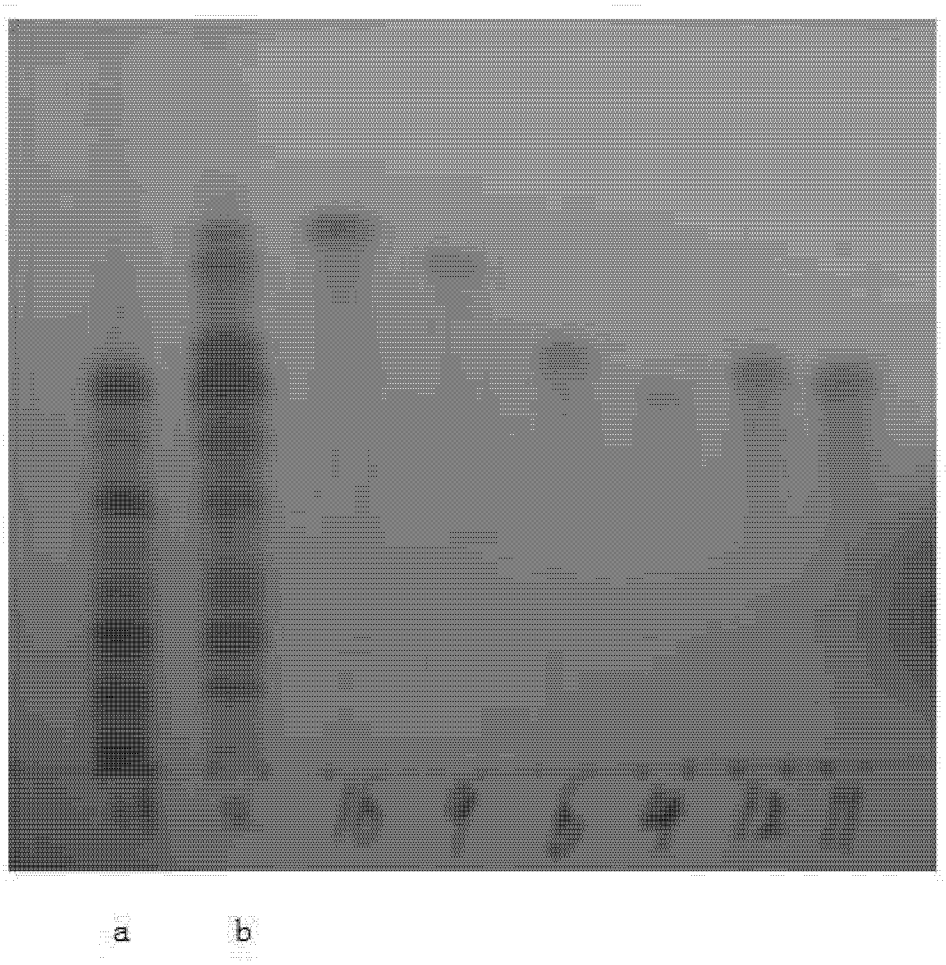


图 2

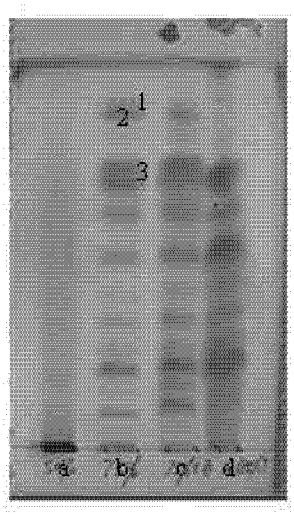


图 3

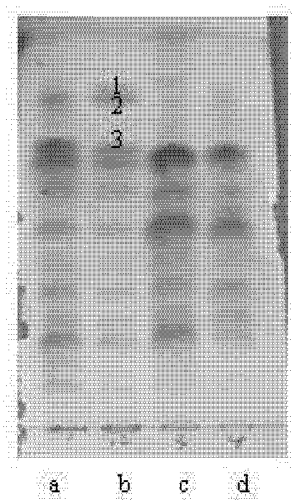


图 4

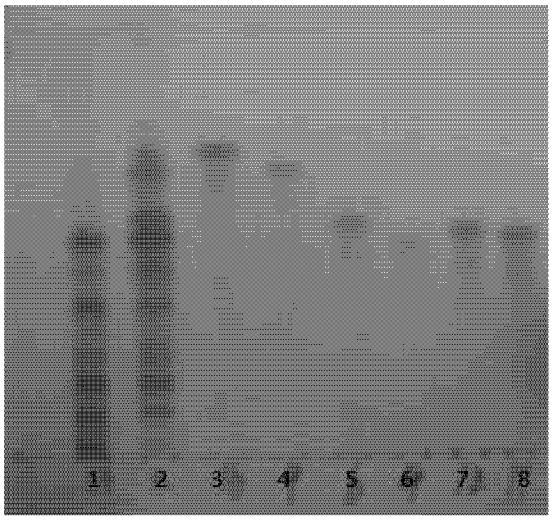


图 5