



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1479787 B

(45) 授权公告日 2013.07.10

(21) 申请号 00820112.9

C12P 19/00(2006.01)

(22) 申请日 2000.12.29

审查员 李肖蕖

(85) PCT申请进入国家阶段日
2003.06.27

(86) PCT申请的申请数据
PCT/CN2000/000744 2000.12.29

(87) PCT申请的公布数据
W002/53722 ZH 2002.07.11

(73) 专利权人 金凤燮
地址 中国辽宁省大连市甘井子区轻工苑 1
号

(72) 发明人 金凤燮 鱼红闪

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 林晓红

(51) Int. Cl.
C12N 9/24(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图4页

(54) 发明名称
水解人参皂甙糖基的人参皂甙糖苷酶及其应用

(57) 摘要
本发明涉及水解人参中含量较高的皂甙糖基以制备生理活性高的稀有皂甙的人参皂甙糖苷酶(Ginsenoside glycosidase),所述的人参皂甙糖苷酶来源于微生物培养物、人参植物、杏仁、麦麸、麦芽和动物肝等,根据水解人参皂甙糖基反应的差别,本发明的人参皂甙糖苷酶至少分为人参皂甙糖苷酶 I、人参皂甙糖苷酶 II、人参皂甙糖苷酶 III 和人参皂甙- α -鼠李糖苷酶。本发明还涉及所述人参皂甙糖苷酶在制备人参稀有皂甙和稀有皂甙含量高的人参制品中的应用。

1. 人参皂甙糖苷酶：水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc 人参二醇类皂甙的第 3 碳原子 (3-C) 和第 20 碳原子 (20-C) 的 β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键，生成 Rd、F₂ 和 Rg₃，进一步水解成 Rh₂ 和 C-K，进一步水解成皂甙元的人参皂甙糖苷酶 I；

水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc 的第 20 碳原子 (20-C) 的 β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键，生成 Rd，进一步水解成 Rg₃ 的人参皂甙糖苷酶 II；

水解人参皂甙的第 3 碳原子上的双葡萄糖基和甙元之间的糖苷键，将 Rd 变成 C-K 的人参皂甙糖苷酶 III；

水解人参三醇类皂甙 Re、Rg₂ 的第 6 碳上的 α-鼠李糖苷键，变成 Rg₁ 和 Rh₁ 的人参皂甙-α-鼠李糖苷酶；

所述酶水解原人参二醇类皂甙和原人参三醇类皂甙糖基，生成 C-K、Rh₁、Rh₂、Rg₂、Rg₃、F₂、Rg₁、Rd 人参皂甙和皂甙元，

所述的人参皂甙糖苷酶来源于霉菌、细菌、酵母或担子菌的微生物培养物，或来源于人参植物、杏仁、麦麸、麦芽或动物肝提取物，并通过如下方法制得：

以液态或者固态培养所述微生物，其中固态培养之后用缓冲液浸出、离心除渣得酶液；液态培养后，离心除渣得酶液；或者将人参植物或动物肝破碎，用缓冲液浸出，离心除渣得酶液；或者将麦麸、麦芽和杏仁用缓冲液浸出，离心除渣得酶液；

上述酶液任选地包括加入硫酸铵或者乙醇而沉淀酶蛋白，再用缓冲液溶解，除渣得到所述人参皂甙糖苷酶的浓缩液；其中所述缓冲液为醋酸、磷酸或 Tris 缓冲液，缓冲液的浓度为 0.001-1M，pH 为 2-11；

上述人参皂甙糖苷酶的浓缩液用酶蛋白分离中常用的离子交换柱或者分子筛方法分离得到酶蛋白、电泳法检测酶蛋白纯度和分子量；其中电泳单点的、确定分子量的单一蛋白的流份与人参皂甙反应，其中：

能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc 人参二醇类皂甙的第 3 碳原子 (3-C) 和第 20 碳原子 (20-C) 的 β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键，生成 Rd、F₂ 和 Rg₃，进一步水解成 Rh₂ 和 C-K，进一步水解成皂甙元的纯酶蛋白为人参皂甙糖苷酶 I；

能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc 的第 20 碳原子 (20-C) 的 β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键，生成 Rd、进一步水解成 Rg₃ 的纯酶蛋白为人参皂甙糖苷酶 II；

能水解人参皂甙的第 3 碳原子上的双葡萄糖基和甙元之间的糖苷键，将 Rd 变成 C-K 的纯酶蛋白为人参皂甙糖苷酶 III；

能水解人参三醇类皂甙 Re、Rg₂ 的第 6 碳上的 α-鼠李糖苷键，变成 Rg₁ 和 Rh₁ 的纯酶蛋白为人参皂甙-α-鼠李糖苷酶，

其中

- 1) 黑曲霉产人参皂甙糖苷酶 I、II、III 酶；
- 2) 米曲霉产人参皂甙糖苷酶 I、II、III 酶和人参皂甙-α-鼠李糖苷酶；
- 3) 细菌产人参皂甙糖苷酶 I 酶；
- 4) 酵母菌、链霉菌和担子菌，分别产人参皂甙糖苷酶 I 酶；
- 5) 人参植物中含有人参皂甙糖苷酶 I 和 III 酶；
- 6) 麦麸中含有人参皂甙糖苷酶 I 酶；
- 7) 麦芽、动物肝和杏仁中分别含有人参皂甙糖苷酶 I 和 II 酶；

上述四种人参皂甙糖苷酶在温度为 5-70℃、pH 为 2-11 条件下与相应的人参皂甙进行反应,生成相应的稀有皂甙。

2. 权利要求 1 所述的人参皂甙糖苷酶,其中所述人参皂甙糖苷酶 I、II、III 酶来自黑曲霉。

3. 权利要求 1 所述的人参皂甙糖苷酶,其中所述人参皂甙糖苷酶 I、II、III 酶和人参皂甙- α -鼠李糖苷酶来自米曲霉。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的人参皂甙糖苷酶在制备人参稀有皂甙中的应用。

5. 权利要求 1-3 任一项所述的人参皂甙糖苷酶在处理人参混合皂甙以制备人参稀有皂甙含量较高的混合皂甙中的应用。

6. 权利要求 1-3 任一项所述的人参皂甙糖苷酶在处理人参粉以制备人参稀有皂甙含量较高的人参制品中的应用。

水解人参皂甙糖基的人参皂甙糖苷酶及其应用

发明领域

[0001] 本发明涉及水解人参中含量较高的皂甙糖基以制备生理活性高的稀有皂甙的人参皂甙糖苷酶。本发明还涉及所述人参皂甙糖苷酶的用途。

[0002] 发明背景

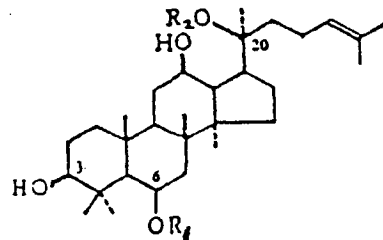
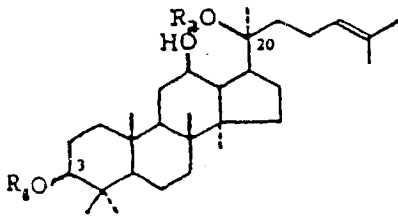
[0003] 人参是已有几千年历史的中草药材,是滋补强壮的药材。常用的药用人参是人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)、美国参 (*panaxquinquefolium* L.)、三七参 (*Panax natoginseng*)、竹节参 (*Panax japonicus*) 和其他人参属 (*Panax* genus) 植物。

[0004] 人参植物中最重要的有效成分是人参皂甙,已发现的人参皂甙已有 30 余种。人参皂甙可分为三种类型:原人参二醇类皂甙 (Protopanaxdiol Type ginsenoside, PPD)、原人参三醇类皂甙 (Protopanaxtriol Type ginsenoside, PPT) 和齐墩果酸类皂甙。人参皂甙 Ra₁, Ra₂, Ra₃, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, F₂, Rg₃, Rg₅, Rh₂, 和 Rh₃ 是原人参二醇类皂甙;人参皂甙 Re, Rg₁, Rg₂, Rg₄, Rh₁, Rh₄ 是原人参三醇类皂甙;Ro 等皂甙是人参齐墩果酸类皂甙。其中,人参皂甙 Ra₁, Ra₂, Ra₃, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, F₂, Re, Rg₁ 是达玛 20(S)-皂甙 (Dammarane 20(S)-saponins),人参皂甙 Rg₃, Rg₂, Rg₂, Rh₁ 具有 20(S) 和 20(R) 异构体。主要的人参皂甙化学结构如下:

[0005] 原人参二醇类皂甙

原人参三醇类皂甙

[0006]



[0007]		R ₁	R ₂		R ₁	R ₂
[0008]	Rb ₁	-glc ² -glc	-glc ⁶ -glc	Re	-glc ² -rha	-glc
[0009]	Rb ₂	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara(pyr)	Rg ₁	-glc	-glc
[0010]	Rc	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara(fur)	Rg ₂	-glc ² -rha	H(20-S 和
[0011]	20-R)					
[0012]	Rd	-glc ² -glc	-glc	Rh ₁	-glc	H(20-S 和
[0013]	20-R)					
[0014]	F ₂	-glc	-glc			
[0015]	Rg ₃	-glc ² -glc	H(20-S 和 20-R)			
[0016]	Rh ₂	-glc	H(20-S 和 20-R)			
[0017]	C-KH	-glc				

[0018] 在人参中含量较高的皂甙是 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁ 等皂甙,而 Rg₃、Rg₂、Rg₅、Rh₂、Rh₁、Rh₃ 和 Rh₄ 等皂甙是只有在野山参和红参中存在的稀有皂甙。这些稀有皂甙往往具有较高的生理活性:如 Rh₂、Rh₁ 和 Rg₃ 皂甙具有很强的抗癌作用,但无副作用。Rg₃ 和 Rg₂ 等

具有较好的软化血管的作用。这些稀有皂甙对现代医学和保健食品意义很大。但是,这些稀有皂甙从红参和野山参中提取很困难的,因为这些红参和野山参原料贵,稀有皂甙含量只有十万分之几,因此,从红参和野山参中提取稀有皂甙是不大可能的。

[0019] 曾经有人尝试过用化学方法合成人参稀有皂甙 Rh₂,但收率很低(刘维差等:沈阳药学院学报,1,14(1988));也有人提出过酸碱处理人参皂甙制备稀有皂甙(N. Kondo et. al. :Chem. Pharm. Bull.,21,2702(1973)),但其反应选择性差、收率低。日本学者研究过人参皂甙在人体肠道内的代谢变化(M. Kanaoka et. al. :J. Tradional medicinen,11,241(1994))。

[0020] 迄今为止,大量制备稀有皂甙的种种尝试均未获得令人满意的结果,因此仍需要一种新的大量制备稀有皂甙的新措施。而本发明人从微生物、人参植物、麦麸、杏仁、麦芽和动物肝中发现了能水解人参皂甙糖基的新酶类,用这种人参皂甙酶处理人参中含量较高的 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁ 等皂甙,可大量地制备各种稀有皂甙。

[0021] 因此,本发明的一个目的是提供一类新的能水解人参皂甙糖基而制备稀有皂甙的酶,本文中命名为人参皂甙糖苷酶(Ginsenoside-glycosidases)。

[0022] 本发明的再一目的是提供所述人参皂甙糖苷酶的用途。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明涉及一种新的能水解人参皂甙糖基而制备稀有皂甙的酶,命名为人参皂甙糖苷酶(Ginsenoside-glycosidases)。本发明的酶存在于微生物、人参植物、麦麸、杏仁、麦芽和动物肝中,用这种人参皂甙糖苷酶处理人参中含量较高的 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re、Rg₁ 和其他容易得到的皂甙 Rg₂ 和 Rg₃ 等皂甙,可制备稀有皂甙 Rh₁、Rh₂、C-K、Rg₂、Rg₃、F₂、Rg₁、Rd 以及甙元和其异构体皂甙,从而能大量地得到红参和野山参的稀有皂甙成分和其他稀有皂甙。

[0025] 本发明的人参皂甙糖苷酶根据水解人参皂甙糖基反应的差别共分为四种类型,即人参皂甙糖苷酶 I、人参皂甙糖苷酶 II、人参皂甙糖苷酶 III 和人参皂甙- α -鼠李糖苷酶,其中:

[0026] 人参皂甙糖苷酶 I 能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 的 β -葡萄糖苷键、 β -木糖苷键、 α -阿拉伯糖苷键;

[0027] 人参皂甙糖苷酶 II 能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 的第 20 碳原子 20-C 的 β -葡萄糖苷键、 β -木糖苷键、 α -阿拉伯糖苷键生成 Rd 皂甙;

[0028] 人参皂甙糖苷酶 III 能水解人参皂甙的第 3 碳原子上的双葡萄糖基和皂甙元之间的糖苷键;

[0029] 人参皂甙- α -鼠李糖苷酶能水解人参皂甙 Re 和 Rg₂ 的第 6 碳上的 α -鼠李糖苷键,分别生成 Rg₁ 和 Rh₁ 皂甙。

[0030] 利用这四种酶的混合物或者单个酶来处理人参中含量较高的 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁ 等皂甙糖基,可制备各种稀有皂甙。

[0031] 本发明还涉及所述本发明的人参皂甙糖苷酶的用途,例如用于处理人参中含量较高的皂甙和其他容易得到的人参皂甙等以制备稀有、有用的皂甙;处理人参混合总皂甙,制备稀有皂甙含量较高的人参混合皂甙;处理人参粉制备稀有皂甙含量较高的人参制品。

[0032] 本发明的人参皂甙糖苷酶与传统的以纤维素、半纤维素等多糖类基础的纤维素酶

和半纤维素酶是不一样的;纤维素酶和半纤维素酶只能水解纤维素和半纤维素等多糖类的糖苷键,而本发明的人参皂甙糖苷酶能水解人参达玛皂甙元配糖体的糖苷键。例如, β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)能水解纤维素和纤维二糖的 β -葡萄糖苷键,不能水解人参皂甙第三碳原子的 β -葡萄糖苷键。其原因是,传统的纤维素和半纤维素酶水解糖类糖苷键;但是本发明的人参皂甙糖苷酶能水解具有30个碳原子的皂甙元配糖体的糖苷键。

[0033] 本发明的详细描述

[0034] 本发明的人参皂甙糖苷酶类经过提纯酶蛋白、特性研究之后发现,根据水解糖基反应至少有四种不同的酶类:即人参皂甙糖苷酶 I、人参皂甙糖苷酶 II、人参皂甙糖苷酶 III 和人参皂甙- α -鼠李糖苷酶等:人参皂甙糖苷酶 I 能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 的 β -葡萄糖苷键、 β -木糖苷键、 α -阿拉伯糖苷键;人参皂甙糖苷酶 II 能水解人参皂甙 Ra、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 的第20碳原子20-C的 β -葡萄糖苷键、 β -木糖苷键、 α -阿拉伯糖苷键生成 Rd 皂甙;人参皂甙糖苷酶 III 能水解人参皂甙的第3碳原子上的双葡萄糖基和皂甙元之间的糖苷键,使 Rd 皂甙变成 C-K;人参皂甙- α -鼠李糖苷酶能水解人参皂甙 Re 和 Rg₂ 的第6碳上的 α -鼠李糖苷键,分别生成 Rg₁ 和 Rh₁ 皂甙。

[0035] 本发明的人参皂甙糖苷酶可以用于:处理人参中含量较高的皂甙和其他容易得到的人参皂甙等,制备稀有、有用的皂甙;处理人参混合总皂甙,制备稀有皂甙含量较高的人参混合皂甙;处理人参粉制备稀有皂甙含量较高的人参制品。

[0036] 本发明的人参皂甙糖苷酶类可来源于微生物培养、人参植物、杏仁、麦麸、杏仁、麦芽和动物肝等。所述的微生物包括细菌、链霉菌、酵母、曲霉和担子菌等。微生物培养制备酶时,可以加入人参浸出物或者人参粉方法提高产酶量;微生物可以液态或者固态培养;固态培养之后用缓冲液浸出、离心除渣得酶液;液态培养后、离心除渣得酶液。人参植物和动物肝破碎、用缓冲液浸出、离心除渣得酶液。麦麸、麦芽和脱脂杏仁用缓冲液浸出、离心除渣得酶液。这些酶液可以加入硫酸铵或者酒精的方法沉淀酶蛋白、再用缓冲液溶解、除渣得到皂甙糖苷酶得浓缩液。

[0037] 根据酶的来源不同而本发明的人参皂甙糖苷酶所包括的四种酶类含量不一样。

[0038] 本发明的这些皂甙糖苷酶可直接处理皂甙,制备稀有皂甙;根据目的产物的不同、可用提纯后的酶,也可以用不提纯的酶。这些酶的反应条件是 pH 2~11,温度 5~70°C。皂甙浓度为 0.001%~20%。酶反应底物是所有原人参二醇类和原人参三醇类皂甙;酶反应产物是包括所有部分或者全部皂甙糖基改变后生成的皂甙次生产物,如 Rh₁、Rh₂、C-K、Rg₂、Rg₃、F₂、Rg₁、Rd 等皂甙、以及甙元和酶反应过程中产生的异构体皂甙。

[0039] 以下通过附图和实施例更详细地描述本发明,其中:

[0040] 图 1 示出本发明的人参皂甙糖苷酶 I 水解原人参二醇类皂甙的机理。

[0041] 图 2 示出本发明的人参皂甙糖苷酶 II 水解原人参二醇类皂甙的机理。

[0042] 图 3 示出本发明的人参皂甙糖苷酶 III 水解人参皂甙的机理。

[0043] 图 4 示出本发明的人参皂甙- α -鼠李糖苷酶的水解机理。

[0044] 图 5 示出了 20(S)-和 20(R)-型人参皂甙的结构图。

[0045] 实施例 1 微生物人参皂甙糖苷酶的制备

[0046] 1、黑曲霉的人参皂甙糖苷酶

[0047] 菌种是黑曲霉 *Aspergillus niger* FFCCDL-48g(FFCCDL,大连轻工业学院菌种保

藏所)。

[0048] 1-1、酶的制备

[0049] 将含 3% (重量) 麦麸水提取物和 1% (重量) 人参根水提取物的液体培养基 220 毫升放入于 1000 毫升三角瓶中, 接种所述黑曲霉菌种, 共接种 10 个三角瓶。在 30℃ 摇床培养 54 小时, 离心除菌, 从 10 个三角瓶中得到约 2000 毫升上清液。然后, 在上清液中边搅拌加入硫酸铵的粉末到饱和度 65%, 在 4℃ 放置过夜, 离心收集蛋白质沉淀。沉淀中加入 80 毫升的蒸馏水装入到透析袋中, 对 0.01M 和 pH 5 的醋酸缓冲液透析。离心除去非溶解物, 用 0.01M 和 pH 5 的醋酸缓冲液调整, 得到 200 毫升粗酶液, 用于人参皂甙糖基的水解和酶蛋白的提纯。酶液可重复制备。

[0050] 1-2、黑曲霉酶液对人参皂甙的水解

[0051] 将 100mg 人参皂甙 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 和 10mg 人参皂甙 Rg₃ 分别溶于 10ml 的 0.01M 和 pH5.0 醋酸缓冲液中, 分别加入 10ml 粗酶液, 在 30℃ 反应 18 小时, 然后加入 10ml 正丁醇终止反应, 产物皂甙转入正丁醇层。用薄层层析 (TLC) 法检测 (Merck, 60-F254 硅胶板; 展开剂为氯仿: 甲醇: 水 = 70 : 30 : 5)。用 ShimadzuTLC 扫描仪 CS-930 检测的 TLC 结果如下表 1 所示。

[0052] 表 1 表明: 黑曲霉所产的酶能水解原二醇类人参皂甙 (PPD, Protopanaxdiol type ginsenoside) 的糖基, 水解程度高达 90% 以上; Rg₃ 等水解成 Rh₂ 皂甙的转化率高达 50% 以上; 酶反应主要产物是人参皂甙 F₂, C-K, Rh₂ 和皂甙元。该酶对人参皂甙 Ra₁, Ra₂ 和 Ra₃ 的水解反应、与 Rb₁ 皂甙酶反应类似。

[0053] 从上述试验得知, 黑曲霉的人参皂甙糖苷酶至少具有以下酶活性: 具有水解 PPD 皂甙第三碳位上 β-(1 → 2)-D- 葡萄糖基的活性和水解皂甙元上的 β-D- 葡萄糖苷键的活性; 具有水解第二十碳位上 β-(1 → 6)-D- 葡萄糖苷键、α-(1 → 6)-L- 阿拉伯糖苷键和 β-(1 → 6)-D- 木糖苷键的活性。

[0054] 表 1、黑曲霉的人参皂甙糖苷酶对不同原人参二醇类皂甙糖基的水解

[0055]

酶底物 皂甙	酶反应后皂甙产物的比例 (%)								
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Rg ₃	F ₂	Rh ₂	C-K	皂甙元
Rb ₁	1			10		63	5	16	5
Rb ₂		7		13		57	3	17	3
Rc			8	12		58	2	15	5
Rd				15		50	5	25	5
Rg ₃					30		53		17

[0056] 在 pH 5.0, 30℃ 酶反应 18 小时; 酶对 Ra₁、Ra₂、Ra₃ 皂甙的水解结果 (未示出) 和 Rb₁ 结果相似

[0057] 这种人参皂甙糖苷酶的生成受到人参提取物或者人参皂甙的诱导: 如果培养基中加诱导物——人参提取物或者皂甙, 产酶增高; 如果不加诱导物, 人参皂甙糖苷酶的产量下降。

[0058] 1-3、黑曲霉人参皂甙糖苷酶的性质

[0059] 为了弄清黑曲霉的人参皂甙糖苷酶性质, 试验了温度, pH 值, 金属离子以及反应时间对酶反应的影响。

[0060] 温度对酶反应的影响:

[0061] 温度对酶水解原人参二醇类人参皂甙糖基的影响, 用 100 毫克 Rb_1 皂甙, 按 1-2 的条件试验; 其结果如表 2 所示:

[0062] 表 2、温度对黑曲霉的酶水解人参皂甙 Rb_1 的影响

[0063]

温 度 (°C)	反应后的产物比例 (%)						
	Rb_1	Rd	Rg_3	F_2	Rh_2	C-K	皂甙元
20	25	50	-	15	-	10	-
30	1	10	-	63	5	16	5
40	-	5	-	50	6	34	5
50	-	5	-	40	4	42	4
60	30	50	-	10	2	6	2
70	82	18	-	-	-	-	-

[0064] 反应条件: Rb_1 浓度, 0.5%; 在 pH 5.0, 酶反应 18 小时

[0065] 表 2 表明: 在温度 30 ~ 60°C 之间, 酶水解 Rb_1 皂甙较好; 在温度 30 ~ 50°C 之间, 产物人参皂甙 F_2 和 C-K 的产量较高; 在 20 ~ 50°C 内, 随着温度的升高, 水解产物人参皂甙 C-K 的产量也越高。由表 2 可知, 若想得到较多的 F_2 , 酶反应温度必须控制在 30 ~ 40°C。若想得到较多的人参皂甙 C-K, 酶反应温度必须控制在 40 ~ 50°C。当酶反应温度为 20 和 60°C 时, 会获得较多的人参皂甙 Rd。而人参皂甙 Rg_3 , Rh_2 和皂甙元的产量较低。温度对酶水解人参皂甙 Ra, Rb_2 , Rc 和 Rd 的影响与水解人参皂甙 Rb_1 反应类似。

[0066] pH 值对酶反应的影响: pH 值对皂甙酶水解人参皂甙 Rb_1 的影响见表 3。

[0067] 表 3、pH 对黑曲霉的酶水解人参皂甙 Rb_1 的影响

[0068]

酶 反 应 pH	酶反应产物 (%)						
	Rb_1	Rd	Rg_3	F_2	Rh_2	C-K	皂甙元
3.0	2	20	-	30	8	40	10
4.0	1	10	-	43	7	39	5
5.0	-	10	-	63	5	16	5
6.0	-	15	-	56	4	21	4
7.0	10	41	2	41	2	6	2
8.0	20	45	3	36	-	6	-

[0069] 酶反应 Rb_1 浓度 0.5%, 在 30°C 酶反应 18 小时

[0070] 表 3 的结果表明: 在 pH 4 ~ 7 之间人参皂甙 F_2 的产量较高; 而且, pH 值越低人参皂甙 C-K, Rh_2 和皂甙元的产量越高。pH 值对酶水解人参皂甙 Ra, Rb_2 , Rc 和 Rd 的影响与水解 Rb_1 类似。

[0071] 反应时间的影响: 反应时间对酶水解原人参二醇类皂甙的影响见表 4。

[0072] 表 4、反应时间对酶水解人参皂甙 Rb₁ 的影响

[0073]

酶反应时间 (小时)	酶反应产物皂甙 (%)						
	Rb ₁	Rd	Rg ₃	F ₂	Rh ₂	C-K	皂甙元
1	38	62	-	-	-	-	-
4	12	72	-	10	-	-	-
8	8	51	-	38	-	2	-
12	6	30	-	54	2	6	2
18	-	10	-	63	5	16	5
24	-	8	-	60	4	24	4
30	-	5	2	40	6	44	3
36	-	2	3	30	7	52	6

[0074] 酶反应 Rb₁ 浓度 0.5%，酶反应在 pH5 和 30℃

[0075] 由表 4 可知：在反应的初始阶段，人参皂甙 Rb₁ 第 20 碳位的葡萄糖基被水解，转化为 Rd，随着反应时间延长的逐渐增加，Rd 的产量也越来越少，F₂ 和 C-K 含量增高；当反应时间达到 12~24 小时时，人参皂甙 F₂ 的产量多；人参皂甙 C-K、Rh₂ 和皂甙元的产量随着反应时间的增加。反应时间对酶水解人参皂甙 Ra、Rb₂、Rc 和 Rd 的影响，同水解 Rb₁ 的结果类似。

[0076] 金属离子对酶反应的影响：金属离子对酶水解原二醇类人参皂甙的影响见表 5。

[0077] 表 5、金属离子对酶水解人参皂甙 Rb₁ 的影响

[0078]

金属离子 (mM)		酶反应产物皂甙 (%)						
		Rb ₁	Rd	Rg ₃	F ₂	Rh ₂	C-K	皂甙元
无离子		-	10	-	63	5	16	2
Ca ⁺⁺	50	-	4	-	65	7	20	4
	100	-	-	-	67	7	21	5
Mg ⁺⁺	50	-	6	-	65	7	17	5
	100	-	-	-	67	8	21	4
Cu ⁺⁺	100	30	30	-	30	-	10	-
Pb ⁺⁺	100	70	20	-	9	-	1	-

[0079] Rb₁ 浓度, 0.5% ;酶反应在 pH5.0 和 30℃ 反应 18 小时

[0080] 表 5 的实验结果表明 :Ca⁺⁺ 和 Mg⁺⁺ 能轻微的加快酶水解人参皂甙 Rb₁ 的速度, Cu⁺⁺ 和 Pb⁺⁺ 等金属离子抑制酶反应。金属离子对酶水解人参皂甙 Ra, Rb₂, Rc 和 Rd 的影响与 Rb₁ 的结果类似。

[0081] 1-4、黑曲霉菌酶的提纯

[0082] 由黑曲霉制得的上述酶液 10ml 上 DEAE-纤维素 DE-52 柱 (Φ1.5×6.7cm, Pharmacia) 吸附酶蛋白。然后用 0.02M、pH5 的醋酸缓冲液和 NaCl 配成的梯度液 (0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6M) 梯度洗脱。

[0083] DEAE-纤维素柱上洗脱的第 36 和 54 管流分在聚丙烯酰胺凝胶 SDS 电泳 (李建武等:生物化学试验原理和方法,北京大学出版社, p82-100(1997)) 上呈现单点,其酶对人参皂甙的水解作用结果如表 6 和 7 所示。

[0084] 表 6 第 36 管的酶 (人参皂甙糖苷酶 I) 对人参皂甙的水解作用

[0085]

酶反应 底物皂甙	酶反应产物皂甙比例 (%)										
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Rg ₃	Rg ₂	F ₂	Rh ₂	Rh ₁	C-K	皂甙元
Rb ₁	-			8			38	1		49	2
Rb ₂		-		9			35	1		54	1
Rc			-	8			36	2		52	2
Rd							50			25	5
Rg ₃					40			57			3
F ₂							30	3		62	5
Rh ₂								89			10
C-K										97	3
Rg ₂						100					

[0086] Rb₁, Rb₂, Rc 和 Rd 的浓度, 0.5% ;Rg₃, F₂, Rh₂, C-K 和 Rg₂, 0.05% ;在 pH5.0、30℃ 反应 18 小时 ;Ra 类皂甙反应与 Rb₁ 结果相似。

[0087] DEAE-纤维素柱上洗脱的第 36 管流分,即用 0.12M NaCl 梯度洗脱的第 36 管流分,经过冻干,作聚丙烯酰胺 SDS 电泳为单点,其分子量为 51,000,因此其酶是纯酶,命名为人参皂甙糖苷酶 I,其酶活性,如表 6 所示。

[0088] 从表 6 中可以看出,第 36 管流分的酶 (即人参皂甙糖苷酶 I) 能水解 Rb₁ 皂甙的第 20 碳原子上的 20-Cβ-(1→6)-D-葡萄糖苷键,也能水解 Rc 和 Rb₂ 皂甙的 20-Cα-(1→6)-L-阿拉伯糖苷键,能水解 Ra 类皂甙的 20-C 的 β-(1→6)-D-木糖苷键;也能水解二醇类皂甙,如 Ra 皂甙类、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd 和 Rg₃ 上第 3-C 上的 β-(1→2)-D-葡萄糖苷键;也对二醇类的 3-C 皂甙元上的 β-D-葡萄糖基和 20-C 的皂甙元 β 葡萄糖基也有轻微的水解作用。人参皂甙糖苷酶 I 的水解机理如图 1 所示。人参皂甙糖苷酶 I 也能略水解对硝基苯酚基-β-葡萄糖苷、β-木糖苷、α-阿拉伯糖苷、β-半乳糖苷;但不能水解硝基苯酚基-α-鼠李糖苷。

[0089] 人参皂甙糖苷酶 II :DEAE-纤维素柱上洗脱的第 54 管流分、即 0.18M 的 NaCl 洗脱的流分第 54 管,经过冻干,作 SDS 电泳为单点,其分子量为 90,000,所对应的酶被命名为人参皂甙糖苷酶 II,它只能水解 Rb₁ 的 20-Cβ-(1→6)-葡萄糖苷键、Ra 类皂甙 β-(1→6)-木糖苷键和 Rb₂, Rc 的 20-Cα-(1→6)-阿拉伯糖苷键,并将它们转化为 Rd;轻微水解 Rd 皂甙生成 Rg₃;不水解人参皂甙的原人参二醇类皂甙的 3-C 的 β-(1→2)-葡萄糖苷键。人参皂甙糖苷酶 II 反应机理,如图 2 所示。

[0090] 人参皂甙糖苷酶 III 是用高效液相蛋白制备色谱仪 (BioRad) 提纯的:分离柱为 Bio-Scale Q;每试管收集量为 2 毫升。将上述 1-1 方法制备的黑曲霉菌酶液 1 毫升上样,然后用 25mM 和 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液、含 0.5M 的 NaCl 的 25mM 和 pH7.4 的 Tri-HCl 缓冲

液梯度洗脱；第 18 管的酶液在 SDS 电泳上单点，说明是纯酶，命名为人参皂甙糖苷酶 III。该酶能水解皂甙元 3-C 双葡萄糖基，使 Rd 和 Rg₃ 皂甙各变成 C-K 和皂甙元，其反应机理如图 3 所示。

[0091] 小结上述的黑曲霉菌的三种类型人参皂甙糖苷酶的性质如表 7 所示。

[0092] 表 7、从黑曲霉菌制得三种人参葡萄糖苷酶性质

[0093]

人参皂甙糖苷酶的类型	最适温度 (°C)	最适 pH	酶分子量	能水解的皂甙糖苷键
人参皂甙糖苷酶 I	30-40	4-6	51,000	20-C β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键 3-C β-葡萄糖苷键
人参皂甙糖苷酶 II	30-40	5-7	90,000	20-C β-葡萄糖苷键、β-木糖苷键、α-阿拉伯糖苷键
人参皂甙糖苷酶 III	30-45	4-5	34,000	3-C 皂甙元-β-双葡萄糖苷键

[0094] 1-5、人参皂甙糖苷酶与纤维素 β-葡萄糖苷酶的差异

[0095] 为了观察本发明的人参皂甙糖苷酶和已知的外切纤维素酶之间的差异，人参皂甙糖苷酶和已知的纤维素 β-葡萄糖苷酶 (EC3. 2. 1. 21) 相比较，以 0.5% 的人参皂甙 Rb₁ 和 Rd 为底物在 pH5. 0、30°C 反应 18 小时；结果如表 8 所示。

[0096] 从梭菌属 (*Chlostridun thermocopiriae*) 制得的纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 21)，以及从芽孢杆菌属 (*Bacillus sp. AX*) 制得的纤维素 β-葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 21) 等三个纤维素-β-葡萄糖苷酶不能水解任何人参皂甙糖苷键；只有杏仁纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC3. 2. 1. 21) 能轻微水解 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 上的第 20-C 的糖基生成 Rd 皂甙，不能水解第 3-C 上的葡萄糖基，这与人参皂甙糖苷酶 II 相似，然而人参皂甙酶 II 轻微地水解 Rd，这是与杏仁纤维素-β-葡萄糖苷酶的区别点。因此，纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 21) 性质和人参皂甙糖苷酶 I 有完全不一样的区别。

[0097] 从梭菌属 (*Chlostridun thermocopiriae*) 制得的外切纤维素酶 (纤维二糖生成酶)，以纤维二糖为单位切割纤维糊精，但不能水解皂甙 Rd 的 3-C 的二糖键，与人参皂甙糖苷酶 III 截然不同。从而证明了：本发明的人参皂甙糖苷酶类是与传统的纤维素-β-葡萄糖苷酶和纤维二糖生成酶不同类型的酶。

[0098]

表 8、人参皂甙葡萄糖苷酶于其他类似酶的比较

酶的种类	酶反应底物	酶反应产物皂甙比例 (%)										
		Rb ₁	Rd	Rg ₃	Rg ₂	F ₂	Rh ₂	Rh ₁	C-K	皂甙元		
人参皂甙糖苷酶 I	Rb ₁	-	8			38	1		49	2		
	Rd					50			25	5		
人参皂甙糖苷酶 II	Rb ₁	-	90	5								
	Rd		90	5								
人参皂甙糖苷酶 III 杏仁纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)	Rd		61						36	3		
	Rb ₁	90	10									
梭菌和芽孢杆菌纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)	Rd	100	-			-						
	Rb ₁	100	-			-						
梭菌纤维素纤维二糖生成酶	Rd	100	-			-						
	Rb ₁	100	-			-						

Rb₁ 和 Rd 的浓度, 0.5 %; 在 pH5.0、30°C 酶反应 18 小时。

[0099] 2、米曲霉菌的人参皂甙糖苷酶

[0100] 2-1 酶的制备

[0101] 在 1000 毫升三角瓶中装入 220 毫升 1% (重量) 人参水浸出物和 3% (重量) 麦麸浸出物的培养基, 用米曲霉 *Aspergillus oryzae* FFCCDL-39g (大连轻工业学院菌种保藏所) 接种 10 个这样的三角瓶, 在 30°C 摇床培养 64 小时。离心除菌, 从 10 个三角瓶中得到

约 2000 毫升上清液。然后,在上清液中边搅拌加入硫酸铵的粉末到饱和度 65%,在 4℃放置过夜,离心收集蛋白质沉淀。沉淀中加入 80 毫升的蒸馏水装入到透析袋中,在 0.01M 和 pH 5 的醋酸缓冲液中透析,离心除去非溶解物,用 0.01M 和 pH 5 的醋酸缓冲液调整,得到 200 毫升粗酶液,可用于皂甙水解和酶的提纯。酶液可重复制备。

[0102] 将 100mg 的人参皂甙 Rb₁、Rb₂、Rc、Re、Rd 和 10mg 的人参皂甙 Rg₃ 和 Rg₂ 与 10ml 的 0.01M, pH5 的醋酸缓冲液混合后,加入上述米曲霉菌的 10ml 粗酶液在 30℃下反应 18 小时。然后加入 10ml 正丁醇混合、静置两小时,用 TLC 检测正丁醇层的成分(薄层层析:60-F₂₅₄ 硅胶板(Merck);溶剂为氯仿:甲醇:水=70:30:5),用 TLC 检测仪 CS-930(日本岛津公司)检测板上皂甙含量如表 9 所示:

[0103]

表 9、米曲霉菌的酶对不同的人参皂甙的水解结果 (%)

酶反应底物 皂甙	酶反应后的皂甙 (%)												
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rg ₃	Rg ₂	Rg ₁	F ₂	Rh ₂	Rh ₁	C-K	皂甙元
Rb ₁	-			20					38			45	2
Rb ₂		-		18					35			54	3
Rc			-	19					30			56	5
Rd				25		1			40			29	5
Rg ₃						45				50			5
Re					20						2		5
Rg ₂							32				75		3

在 pH 5.0 和 30 °C 酶反应 18 小时

[0104] 从表 9 中可以看到：米曲霉的人参皂甙糖苷酶水解原人参二醇类皂甙糖基的酶性质，如反应 pH 值，温度和反应时间都与黑曲霉的酶相似。唯一不同的是，从黑曲霉制得的酶不能水解皂甙 Re 和 Rg₂ 的 6-C 的 α -(1 → 2)-L-鼠李糖苷键，而来自米曲霉菌的人参皂甙糖苷酶能水解并生成 Rg₁ 和 Rh₁ 皂甙。由此证明了米曲霉的人参皂甙糖苷酶不仅含有黑曲霉的酶的人参皂甙糖苷酶 I、人参皂甙糖苷酶 II、人参皂甙糖苷酶 III 等酶的活性，又具有人参皂甙 α -(1 → 2)-L-鼠李糖苷酶即人参皂甙 α -鼠李糖苷酶的活性。

[0105] 2-2、人参皂甙 α -鼠李糖苷酶的提纯及性质的研究

[0106] 为了研究 *A. oryzae* 的人参皂甙- α -鼠李糖苷酶的性质,用 BioRed 蛋白层析制备仪 (Biologic Medium Pressure Chromatography) 从米曲霉的酶分离提纯了人参皂甙- α -鼠李糖苷酶。分离柱 Bio-Scale Q2 (BioRad); 酶液进样量为 1ml; 流动相速度 1 毫升/分钟; 流动相为 25mM、pH8.2 Tris-HCl 缓冲液和 25mM、pH8.2 Tris-HCl+0.5M NaCl 缓冲液梯度洗脱。每管收集量为 2 毫升/管。

[0107] 所收集的洗脱液分别测定酶活,结果在第 16 管流分有人参皂甙- α -鼠李糖苷酶活性,其人参皂甙- α -鼠李糖苷酶在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上为电泳单点,其分子量是 53,000,说明第 16 管流分酶是提纯的酶。

[0108] 纯化后的人参皂甙- α -鼠李糖苷酶能水解人参皂甙 Re 和 Rg₂ 的 6-C (第 6 碳位上) 的 α -L-鼠李糖苷键,分别生成 Rg₁ 和 Rh₁。其酶反应活力较高的 pH 为 4~7 (最适 pH 为 5); 酶反应活力较高的温度是 30~50℃ (最适温度为 40℃)。纯化的人参皂甙- α -鼠李糖苷酶只水解原人参三醇类皂甙 (PPT) 6-C 中的 α -L-鼠李糖苷键,不水解人参皂甙中其它糖苷键。人参皂甙 α -L-鼠李糖苷酶水解 Re 和 Rg₂ 皂甙的机理如图 4 所示。

[0109] 3、细菌的人参皂甙糖苷酶

[0110] 含 0.5% (重量) 人参水浸出物、1% (重量) 麦麸水浸出物和 0.3% (重量) 胰蛋白胍、pH7.2 的培养基中接高温好氧菌 *Bacillus* sp. JF (Fengxie Jin et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 36, 415-424, 1990), 在 60℃ 下通风搅拌培养 36 小时。离心除菌,取上清液 1000 毫升,加 3000 毫升 95% 乙醇使酶沉淀,4℃ 下保存过夜,离心收集沉淀。然后,将此酶蛋白沉淀溶于 50 毫升的 0.01M、pH5 的醋酸缓冲溶液,离心除不溶物,即得到粗酶液。

[0111] 取 10ml 酶液与 10ml 0.5% Rd 的醋酸缓冲溶液 (含 20% 乙醇) 70℃ 下反应 16 小时。TLC 检测结果表明:60% 的 Rd 转化为人参皂甙 F₂, 说明细菌人参皂甙糖苷酶能水解人参皂甙 Rd 第三碳位上 β -(1→2)-葡萄糖苷键。该酶也能水解人参皂甙 Rg₃ 的 β -(1→2)-葡萄糖苷键,变成 Rh₂ 皂甙。

[0112] 该酶的最适反应温度 70℃, 最适 pH6.0。

[0113] 4、来源于酵母的人参皂甙糖苷酶

[0114] 在含 2% (重量) 人参水浸出物和 8% (重量) 麦芽汁的培养基上,30℃ 摇床培养假丝酵母 *Candida* sp. FFCCDL-2g (大连轻工业学院菌种保藏所) 56 小时,离心取上清 500ml,加 (NH₄)₂SO₄ 粉末至饱和度为 65%,4℃ 保存过夜,离心收集沉淀,在 0.01M pH5 的醋酸缓冲溶液中透析,离心除去杂质,得到 25 毫升酶液。

[0115] 取 10ml 酶液与 10ml 0.5% Rd 的醋酸缓冲溶液 60℃ 下反应 12 小时。TLC 检测结果表明:73% 的 Rd 转化为人参皂甙 F₂, 说明该酶能水解人参皂甙 Rd 的 3-C (第三碳位) 上的 β -(1→2)-葡萄糖苷键。该酶也能水解人参皂甙 Rg₃ 的 β -(1→2)-葡萄糖苷键,变成 Rh₂ 皂甙。

[0116] 该酶的最适反应温度为 45℃, 最适 pH 为 5.5。

[0117] 5、链霉菌的人参皂甙糖苷酶

[0118] 含 1% (重量) 人参水浸出物,3% (重量) 麦麸水浸出物的产酶培养基中接链霉菌 *Streptomyces* sp. FFCCDL-2g (大连轻工业学院菌种保藏所),在 30℃ 下培养菌种 48 小时,离心取上清液 300 毫升,加 (NH₄)₂SO₄ 粉末至饱和度为 70% 使酶沉淀,4℃ 下保存过夜,离心收集沉淀。在 0.01M、pH5 的醋酸缓冲溶液中透析,除去杂质,得到 15 毫升酶液。

[0119] 取 10ml 酶液与 10 毫升 1% Rd 的醋酸缓冲溶液 (含 20%乙醇) 50℃下反应 20 小时。TLC 检测结果表明:50%的 Rd 转化为人参皂甙 F₂, 说明链霉菌酶能水解人参皂甙 Rd 第三碳位上 β-(1 → 2)-葡萄糖苷键。该酶最适反应温度 50℃, 最适 pH5.5。

[0120] 6、担子菌的人参皂甙糖苷酶

[0121] 将担子菌 Tremella sp. FFCDDL-12g 菌株 (大连轻工业学院菌种保藏所) 在含有 125g 人参粉, 374g 麦麸和 500 毫升水的固体培养基中培养 5 到 7 天。然后把 0.01M, pH5.0 的醋酸缓冲溶液 2500 毫升加入到固体培养基中静置 2 小时。离心去除不溶物后, 得约 2000 毫升浸出液; 加 (NH₄)₂SO₄ 粉末到浸出液中, 搅拌使硫酸铵的饱和度达到 70%, 在 4℃静置过夜, 离心收集蛋白, 在 0.01M 的 pH5 的醋酸缓冲液下透析。然后用 0.01M、pH5 醋酸缓冲液稀释至 150 毫升, 除去不溶物, 即得到酶液。

[0122] 把从担子菌得到的酶液 10 毫升与 10 毫升 1%的 Rb₁ 溶液 (0.01M、pH5 的醋酸缓冲液含 20%乙醇) 混合, 在 40℃反应 20 小时。反应完毕后, 用 TLC 检测产物。人参皂甙 Rb₁ 反应生成 25%的 Rd, 40%的 F₂ 和 35%的 C-K。这些结果证明:这种酶可以酶解 3 碳位上的 β-葡萄糖苷键, 及 20 碳位上的葡糖苷键。反应的最佳温度是 50℃, 最佳 pH 值是 5.5。

[0123] 从以上实验可得出如下结论:微生物如细菌、链霉菌、酵母、霉菌和担子菌等均产人参皂甙糖苷酶; 这些菌类生成人参皂甙糖苷酶时, 加入人参提取物会提高产酶量。本发明的人参皂甙糖苷酶类与传统的纤维素酶 (纤维素-β-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)、纤维二糖生成酶) 在酶反应性质方面不同。本发明的人参皂甙糖苷酶根据酶水解皂甙糖基反应而至少分为四种类型: 即人参皂甙糖苷酶 I, 人参皂甙糖苷酶 II, 人参皂甙糖苷酶 III 和人参皂甙-α-鼠李糖苷酶。

[0124] 实施例 2 人参植物的人参皂甙糖苷酶

[0125] 将 200g 新鲜的人参根粉碎, 加 600 毫升 0.02M、pH5 的醋酸缓冲液, 在 40℃下浸 2 小时, 过滤得到上清液。在上清液中加入 (NH₄)₂SO₄ 缓慢加入至 70%饱和, 在 4℃下过夜, 离心收集蛋白沉淀。将蛋白沉淀溶于 15 毫升的蒸馏水中, 在 0.02M 的 Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液中透析, 离心去除不溶物后, 将体积调整到 20 毫升。

[0126] 将 5 毫升的酶液在 DEAE-纤维素 DE-25 柱 (Whatman, φ1.4×6.7cm) 吸附后, 用 0.02M、pH7.4 的 Tris-HCl 中含有 KCl 浓度 0.06、0.12、0.18 和 0.24M 的溶液, 对吸附酶的柱进行梯度洗脱。洗脱后检测各个流分对皂甙酶解, 结果第 37 管流分的酶可以水解皂甙 Rd 的第 3 碳位上的双糖和皂甙元之间的葡萄糖苷键, 将 Rd 转化为 C-K; 第 52 管流分酶可以水解 Rd 皂甙第 3 碳位上的 β-(1 → 2) 葡萄糖苷键、将 Rd 转化为 F₂, 也可以水解 Rb 和 Rc 皂甙第 20 碳位上的糖苷键, 将 Rb 和 Rc 转化为 F₂。结果如表 10。

[0127] 表 10、从人参植物提纯的酶对人参皂甙的水解

[0128]

洗脱流 分管号	酶反应 底物	酶反应后的皂甙比例 (%)					
		Rd	Rg ₃	F ₂	C-K	Rh ₂	皂甙元
52	Rb ₁	30		70			
	Rb ₂	35		65			
	Rc	45		55			
	Rd	60		40			
37	Rd	45			55		

[0129] 皂甙底物浓度, 0.5%; 在 pH 5.0、50°C 反应 18 小时。

[0130] 从表 10 中可见, DEAE-纤维素柱洗脱得到的第 52 管流分的酶可以水解 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 皂甙第 20 碳位上的糖苷键, 也可以水解 3 碳位上的 β-(1 → 2) 葡萄糖苷键。第 52 管流分的酶在 SDS 聚丙烯酰胺电泳上为单点, 分子量为 59,000。所以第 52 管流分的酶是人参皂甙糖苷酶 I 类型。但是, 和从黑曲霉制得的人参皂甙糖苷酶 I 相比较, 人参植物的人参皂甙糖苷酶 I 类型的分子量略大, 不水解皂甙元直接结合的糖苷键。提纯后的流分第 37 管的酶可以水解皂甙 Rd 第 3 碳位的双糖与皂甙元之间的糖苷键, 生成 C-K 皂甙, 它属于人参皂甙糖苷酶 III 类型。

[0131] 钙离子对两种酶都有促进作用, 而铜离子对两种酶有抑制作用, 提纯后酶的特性如下表 11 所示:

[0132] 表 11、人参植物提纯的两种人参皂甙糖苷酶的性质

[0133]

酶的类型	酶活力高的温度 (°C)	酶活力高的 pH	酶分子量	流分号
人参皂甙糖苷酶 I	60	4-6	59,000	52
人参皂甙糖苷酶 III	45-55	4-5	36,000	37

[0134] 实施例 3 从麦麸提取的人参皂甙糖苷酶

[0135] 3-1、酶的提取

[0136] 500g 麦麸中加入 2500 毫升 0.02M、pH5 的醋酸缓冲液, 在 40 °C 提取 2 小时, 过滤得上清液约 2000 毫升。上清液缓慢搅拌加入 (NH₄)₂SO₄ 至 70% 饱和度, 在 4°C 下过夜, 离心收集蛋白沉淀。将其蛋白沉淀溶于 80ml 蒸馏水中, 在 0.02M、pH5.0 的醋酸缓冲液中透析。离心去除不溶物后, 调整体积至 200ml, 即为酶液。

[0137] 3-2、酶的性质

[0138] 将 10 毫升的上述酶液与 10 毫升 1% 皂甙底物的醋酸缓冲液混合, 在 40°C 下反应 20 小时; 然后, TLC 检测产物, 结果如表 12 所示:

[0139] 表 12、由麦麸皂甙糖苷酶对皂甙的水解作用

[0140]

酶底物 皂甙	酶反应后的皂甙产物比例 (%)					
	Rd	Rg ₃	F ₂	C-K	Rh ₂	皂甙元
Rb ₁	40		55			
Rb ₂	45		50			
Rc	43		55			
Rd	60		40			

[0141] 皂甙底物, 0.5% ; pH, 5.0、40℃酶反应 20 小时

[0142] 从表中可以看出, 麦麸酶可以水解皂甙 Rd 第 3 碳位的葡萄糖苷键, 变成 F₂; 也可以水解 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 第 20 碳、第 3 碳位上的糖苷键, 生成 F₂。

[0143] 该酶最适 pH 值是 5.0 ; 最佳反应温度是 40℃; 二价铁离子和镁离子可激活酶, 二价铜离子抑制酶活性。

[0144] 实施例 4 其他来源的人参皂甙糖苷酶

[0145] 4-1、麦芽 : 将 200 克麦芽粉碎, 加入 1000 毫升 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液常温下浸出 2 小时, 过滤除渣, 上清液中加入 3 倍体积的乙醇, 静止过夜, 收集沉淀。沉淀中加入 50 毫升 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液, 除去不溶物, 得到酶液。酶液 10 毫升与 10 毫升 1% 的 Rb₁ 溶液 (0.01M、pH5 的醋酸缓冲液含 20% 乙醇) 混合, 在 40℃ 反应 20 小时, 用 TLC 检测产物。结果, 95% 以上的人参皂甙 Rb₁ 水解成 Rd, F₂、C-K 和 Rg₃ 等皂甙。这些结果证明 : 这种酶可以酶解人参皂甙第 3 碳位上的 β-葡萄糖苷, 及 20 碳位上的糖苷键。

[0146] 4-2、动物肝脏 : 100 克牛肝破碎, 加入 300 毫升 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液常温下浸出 2 小时, 离心除渣, 加 (NH₄)₂SO₄ 粉末至饱和度为 70% 使酶沉淀, 4℃ 下保存过夜, 离心收集沉淀。在 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液中透析, 除去杂质, 得到 15 毫升酶液。取 10ml 酶液与 10 毫升 1% Rb₁ 的醋酸缓冲溶液 (含 20% 乙醇) 40℃ 下反应 20 小时。TLC 检测结果表明 : 50% 的 Rb₁ 转化为低糖的人参皂甙, 说明动物肝中含有人参皂甙糖苷酶。

[0147] 4-3、植物种子 - 杏仁 : 脱脂后的 100 克杏仁粉碎, 加入 300 毫升 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液常温下浸出 2 小时, 离心除渣, 加 (NH₄)₂SO₄ 粉末至饱和度为 60% 使酶沉淀, 4℃ 下保存过夜, 离心收集沉淀。在 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液中透析, 除去杂质, 得到 30 毫升酶液。取 10ml 酶液与 10 毫升 1% Rb₁ 的醋酸缓冲溶液 (含 20% 乙醇) 50℃ 下反应 14 小时。TLC 检测结果表明 : 40% 的 Rb₁ 转化为低糖的人参皂甙, 说明杏仁中含有人参皂甙糖苷酶。

[0148] 实施例 5 用人参皂甙糖苷酶制备稀有皂甙含量较高的人参混合皂甙和人参制品

[0149] 5-1、制备稀有皂甙含量较高的人参混合皂甙

[0150] 人参混合皂甙 4 克溶解在 100 毫升的 0.01M、pH5 的醋酸缓冲液中, 再加入 100 毫升实施例 1 的 1-2 部分制得的米曲霉酶液, 在 30℃ 反应 4 小时, 用 100 毫升水饱和正丁醇萃取两次, 合并正丁醇减压蒸干, 处理可得 2.3 克皂甙。用 TLC 和 HPLC 分析结果, 稀有皂甙 Rg₃、Rg₂、Rh₂、Rh₁ 的含量提高了几十倍。

[0151] 5-2、制备稀有皂甙含量较高的人参制品

[0152] 人参 4 克中加入 8 毫升 10% 乙醇, 利用人参自身皂甙酶 ; 或者 4 毫升 20% 乙醇, 再加入 4 毫升实施例 1 的 1-2 部分制得的米曲霉酶液 ; 在 30℃ 反应 12 小时, 减压蒸干, 即得稀有皂甙含量较高的人参制品。经过 TLC 和 HPLC 分析结果, Rg₃、Rg₂、Rh₂、Rh₁ 的含量提高

了几十倍。

[0153] 5-3、酶反应所得皂甙分离与分子的化学结构

[0154] 从原人参二醇类皂甙经酶反应产生的皂甙 Rd、Rg₃、F₂、Rh₂、C-K 以及二醇皂甙元，由原人参三醇类皂甙经酶反应产生的 Rg₁、Rg₂、Rh₁ 以及三醇皂甙元，用硅胶柱不同比例的氯仿和甲醇洗脱方法（张书臣主编：中国人参，上海科技教育出版社，1992，p108-110），分离制备皂甙产物的单体，再经结晶方法，制得纯净的酶反应人参皂甙产物。

[0155] 用高效液相色谱法，拆分人参皂甙 Rg₃、Rg₂、Rh₂、Rh₁ 的 20(S) 和 20(R) 的异构体。高效液相色谱仪的型号是 Waters Model-520（来源？），检测波长为 203nm，柱为 C-18 柱（中国科学院大连化学物理研究所生产）；流动相为乙腈：乙醇 = 6：4。

[0156] 分离提纯得到酶反应产物的各皂甙单体的化学结构是用核磁共振（NMR）和质谱法测得的。所使用核磁共振仪器为 Bruker DRX400，溶剂为吡啶-d₅。质谱仪为 JEOL DX400，方法为快速原子冲击法（FAB-MS）。

[0157] 所测的得酶反应产物人参皂甙 Rd、Rg₃、F₂、Rh₂、C-K、Rg₁、Rg₂、Rh₁ 和皂甙元的质谱、¹H-NMR、¹³C-NMR 谱图和现有技术中的文献（J. H. Park 等：A new processed ginseng with fortified activity in Advances in Ginseng Research-Proceedings of the 7th International Symposium on Ginseng, Sep 22-25, 1998, p146-159；Tanak O., Kasai R.：(1984), Saponins of ginseng and related plants in Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (Herz W., Griesebach H., Kirby G. W., Tamm Ch., eds), Vol. 46, p1-65.) 上的谱图一样；其 ¹³C-NMR 谱图的数据，如表 13 所示。表 13 中所示的人参皂甙的结构说明，酶反应产生的人参皂甙 Rd、F₂、C-K 和 Rg₁ 皂甙都是 20(S)-构型皂甙；但是酶反应产生的 Rg₃、Rg₂、Rh₂ 和 Rh₁ 皂甙有 20(S)-构型和 20(R)-构型。以上结果都证明：酶反应生成人参皂甙 Rd、F₂、C-K 和 Rg₁ 的过程主要产生 20(S)-人参皂甙。可是，对 Rg₃、Rg₂、Rh₂ 和 Rh₁ 的酶解生成 20(S) 和 20(R)-人参皂甙的混合物。20(S)-和 20(R)-型人参皂甙的结构图见图 5。

[0158] 表 13、酶反应产生的人参皂甙 ¹³C-NMR 谱图的化学变为 (Shifts)

[0159]

碳原子 序号	原人参二醇类皂甙(PPD)								原人参三醇类皂甙(PPT)					
	Rd	20(S) -Rg3	20(R) -Rg3	F2	C-K	20(S) -Rh ₂	20(R) -Rh ₂	皂甙 元	Rg1	20(S) -Rg2	20(R) -Rg2	20(S) -Rh1	20(R) -Rh1	皂甙 元
1	39.2	39.4	39.5	39.1	39.2	39.3	39.4	39.0	39.5	39.4	39.6	39.3	39.6	39.2
2	26.7	27.3	27.3	26.9	26.9	27.3	27.0	28.0	27.7	28.0	27.9	27.9	27.8	28.1
3	88.6	88.9	88.9	88.9	88.9	89.0	89.0	78.6	78.7	78.4	78.4	78.6	78.5	78.4
4	39.6	40.3	39.7	39.7	39.7	40.2	39.9	39.6	40.1	40.2	40.2	40.3	40.3	40.2
5	56.4	56.8	56.4	56.4	56.4	56.6	56.6	56.4	61.3	60.8	61.5	61.4	61.2	61.7
6	18.4	18.7	18.5	18.4	18.4	18.6	18.7	18.7	77.8	74.8	76.9	78.0	77.9	67.6
7	35.3	36.1	35.6	35.1	35.2	36.1	35.4	35.3	44.9	45.6	45.0	45.2	45.0	47.4
8	40.0	39.2	39.5	40.0	40.0	37.2	40.3	40.0	41.0	41.0	41.0	41.1	41.0	41.0
9	50.2	50.7	50.1	50.2	50.2	50.6	50.6	50.4	49.9	50.1	50.1	50.2	50.1	50.1
10	36.9	39.9	36.9	37.0	37.0	39.9	37.2	37.2	39.5	30.6	39.6	39.6	39.6	39.3
11	30.7	32.2	32.1	30.8	30.8	32.3	32.3	31.7	30.8	30.6	32.0	32.0	32.0	31.9
12	70.2	71.2	70.9	70.1	70.1	71.2	71.1	70.8	70.3	70.3	70.9	71.0	70.9	70.9
13	49.4	48.9	49.2	49.4	49.4	48.8	49.3	48.5	48.9	50.6	48.7	48.2	48.7	48.1
14	51.4	51.9	51.8	51.4	51.4	51.9	52.0	51.6	51.3	51.3	51.6	51.5	51.6	51.6
15	30.8	31.6	31.4	30.9	30.9	31.5	31.7	31.8	30.6	30.6	31.6	31.8	31.6	31.3
16	26.7	26.9	26.6	26.6	26.6	26.9	26.9	26.8	26.4	26.5	26.6	27.1	26.6	26.8
17	51.6	54.9	50.6	51.8	51.8	55.0	50.9	54.6	51.5	54.0	50.4	54.7	50.4	54.6
18	16.3	16.7	16.6	16.3	16.3	17.0	16.1	16.3	17.4	17.4	17.3	17.3	17.3	17.5
19	15.9	16.4	15.8	15.9	15.9	16.6	16.6	15.9	17.4	17.4	17.6	17.6	17.6	17.4
20	83.7	73.2	73.0	83.3	83.3	73.1	73.2	72.9	83.3	73.2	73.0	73.0	73.0	72.9
21	22.4	26.9	22.0	22.4	22.3	27.0	22.9	26.9	22.3	26.5	22.6	26.8	22.6	26.9
22	36.0	35.5	43.3	36.1	36.1	25.3	43.5	36.0	35.9	35.8	43.1	35.8	43.1	35.7
23	23.2	23.2	22.8	23.2	23.2	23.2	22.8	22.9	23.2	23.0	22.6	22.9	22.6	22.8
24	125.9	126.5	126.1	125.9	125.9	126.5	126.3	126.2	125.8	125.9	125.9	126.3	125.9	126.3
25	130.9	130.8	130.8	130.9	130.8	130.9	130.9	130.6	130.9	130.9	130.6	130.6	130.6	130.6
26	25.8	25.8	25.6	25.7	25.7	26.0	26.0	25.8	25.8	25.7	25.8	25.8	25.8	25.8
27	17.8	17.7	17.7	17.7	17.7	17.8	17.9	17.6	17.7	17.6	17.6	17.6	17.6	17.7
28	28.0	28.3	28.1	28.2	28.2	28.3	28.4	28.5	31.6	32.0	31.6	31.7	31.6	32.0
29	16.5	16.1	16.2	16.3	16.3	16.0	16.8	16.3	16.2	17.3	16.3	16.4	16.3	16.7
30	17.3	17.3	17.2	17.3	17.3	17.2	17.5	17.0	17.2	17.3	17.0	16.9	17.0	17.0
3-C Glc									6-C Glc					
1'	105.0	103.4	103.7	106.9		107.1	107.1		105.6	102.4	102.0	105.7	105.8	
2'	83.4	83.4	83.5	75.7		75.8	76.0		75.4	79.1	79.3	75.5	75.4	
3'	78.2	78.2	78.2	79.2		78.7	78.9		80.0	80.0	80.0	80.0	75.6	
4'	71.6	71.6	71.6	71.6		72.2	72.1		71.6	71.6	72.9	71.9	71.7	
5'	78.0	78.0	78.0	78.1		78.0	78.4		79.4	79.4	78.4	79.5	79.5	
6'	62.7	62.7	62.7	62.8		62.3	63.3		62.9	62.9	63.3	63.1	62.9	
Glc										Rha-	Rha-			
1''	105.8	105.8	105.6							102.5	102.4			
2''	77.0	76.9	76.9							72.8	72.9			
3''	79.1	78.5	78.5							72.8	72.8			
4''	71.6	71.9	71.7							74.6	74.6			
5''	78.1	78.1	78.1							69.9	69.9			
6''	62.7	62.7	62.7							19.2	19.2			
20-C Glc														
1'	98.1			98.2	98.3				98.1					
2'	75.0			75.1	75.1				74.8					
3'	78.1			78.7	78.7				78.8					
4'	71.6			71.3	71.5				71.4					
5'	78.1			78.2	78.1				77.8					
6'	62.7			62.7	62.7				62.9					

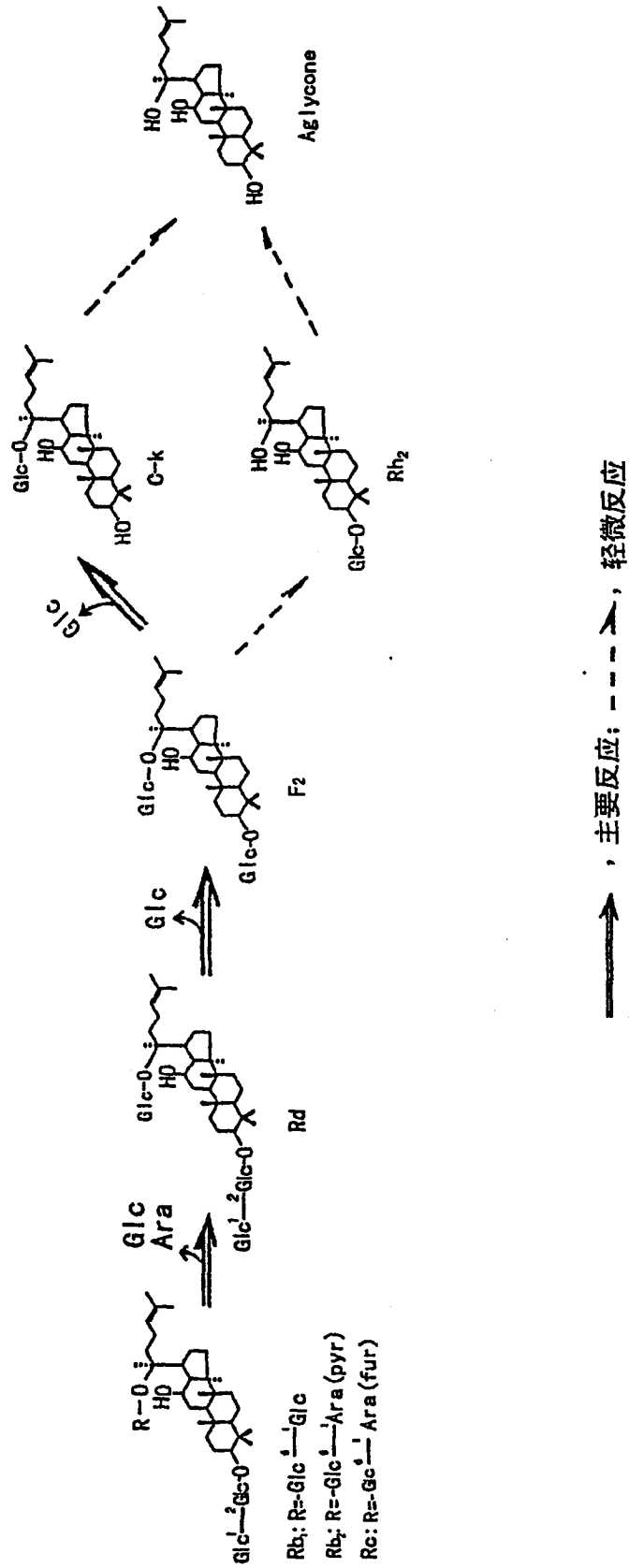


图 1 人参皂甙糖苷酶 I 水解原人参二醇类皂甙的机理

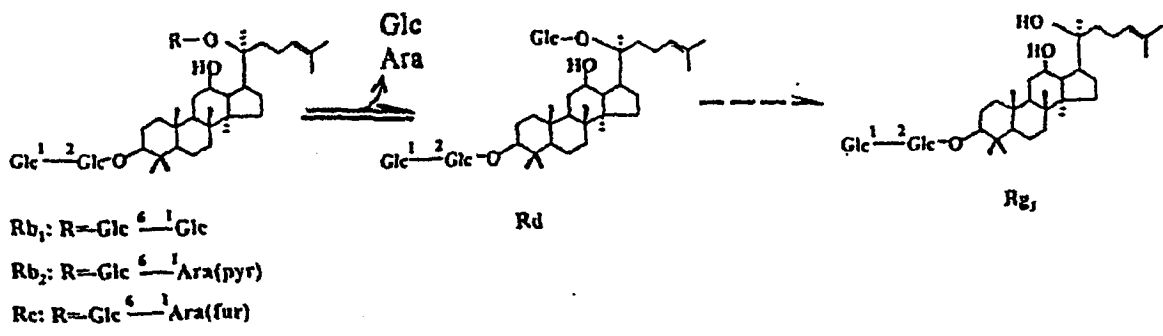


图 2 人参皂甙糖苷酶 II 水解原人参二醇类皂甙的机理

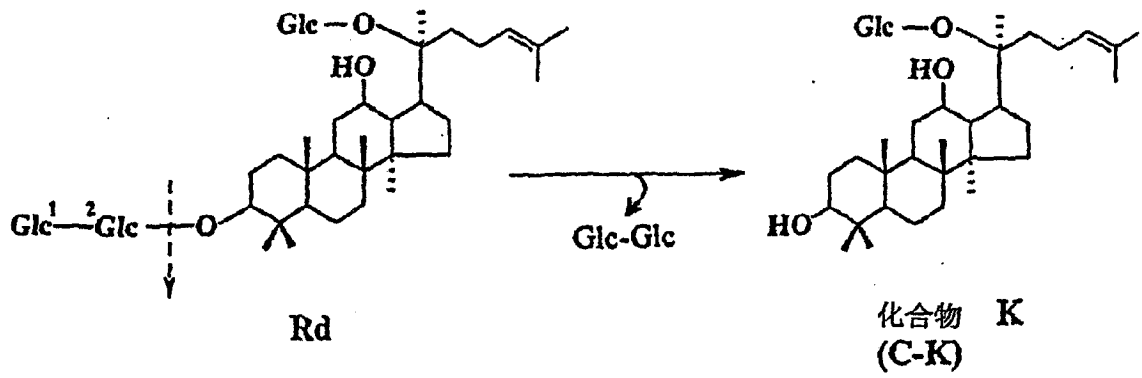


图 3 人参皂甙糖苷酶 III 水解人参皂甙的机理

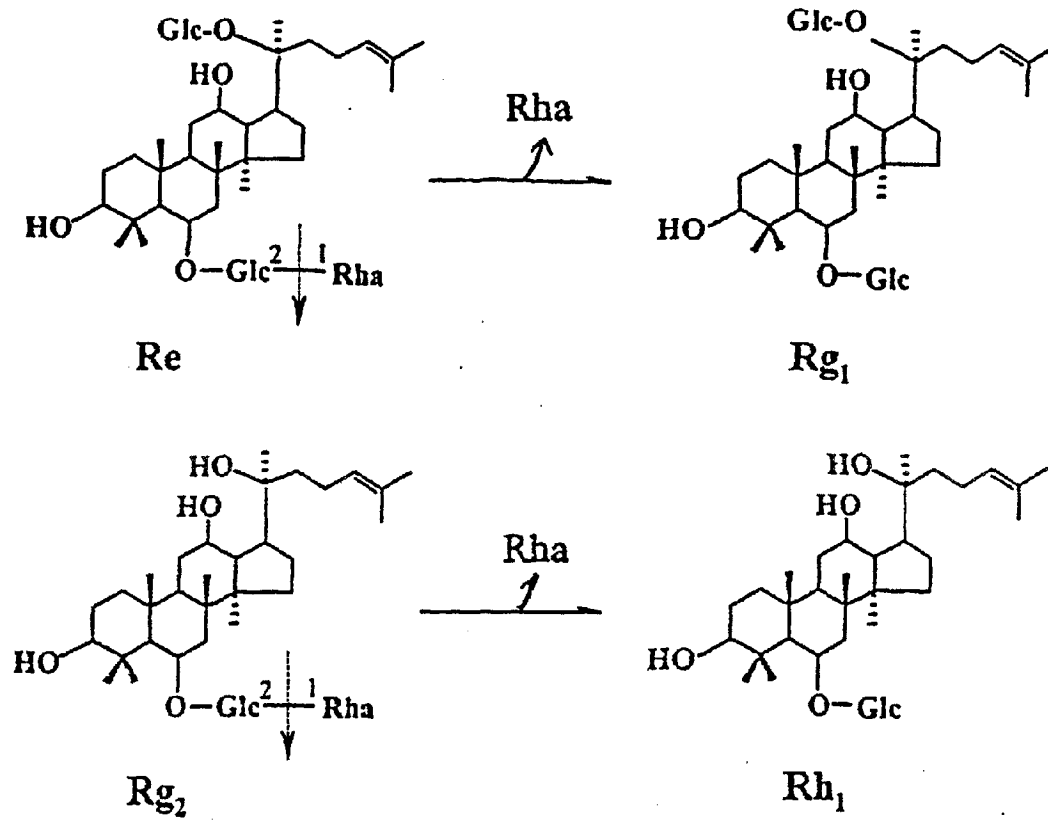
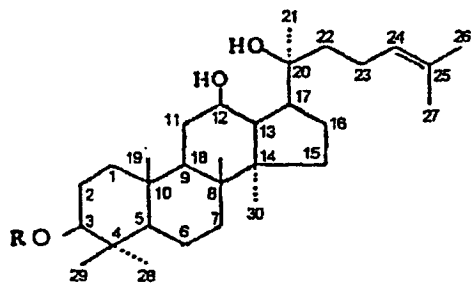


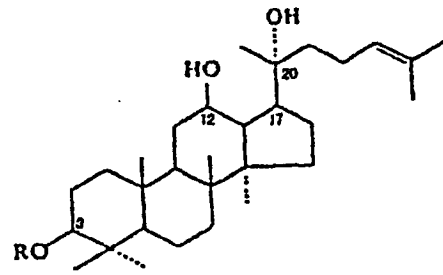
图4 人参皂甙 α -鼠李糖苷酶反应机理



20(S)

R_{g3}: R, β-Glc-(1→2)-β-Glc

R_{h2}: R, β-Glc



20(R)

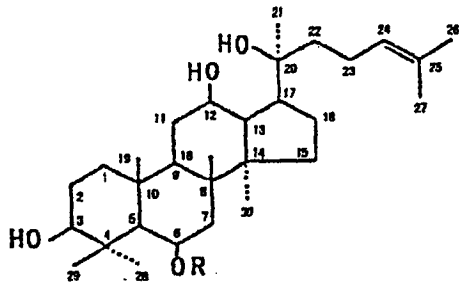
R_{g3}: R, β-Glc-(1→2)-β-Glc

R_{h2}: R, β-Glc

20(S)

R_{g2}: R, α-Rha-(1→2)-β-Glc

R_{h1}: R, β-Glc



20(R)

R_{g2}: R, α-Rha-(1→2)-β-Glc

R_{h1}: R, β-Glc

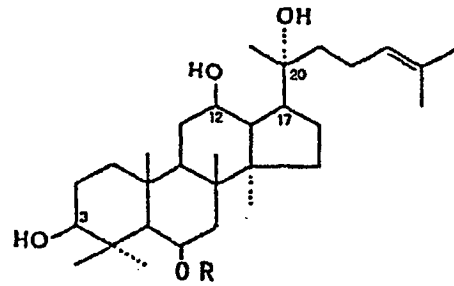


图 520(S)-和 20(R)-型皂甙结构图