

## 酶法转化制备人参皂苷单体的研究进展

姬庆, 郜玉钢\*, 赵岩, 何忠梅, 臧埔, 张连学\*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

**摘要:** 人参皂苷具有抗肿瘤、抗病毒、延缓衰老、增强免疫等多种药理活性, 但不同皂苷单体在药材及其提取物中量不同, 其药理活性亦有差异, 量低而药理活性强的皂苷单体需大量制备, 以满足医疗和科研需要。如何定向提高人参皂苷单体的量, 酶法制备是解决该问题的关键技术, 且利用该法有效定向获得人参皂苷单体进行了大量研究。就酶法转化制备人参皂苷单体进行综述, 为人参皂苷单体的进一步开发利用提供理论依据和参考。

**关键词:** 酶法; 人参皂苷; 生物转化; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rg<sub>3</sub>

**中图分类号:** R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)22-3356-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.026

## Research progress on enzymatic conversion for preparing individual ginsenosides

Ji Qing, GAO Yu-gang, ZHAO Yan, HE Zhong-mei, ZANG Pu, ZHANG Lian-xue

College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China

**Abstract:** Ginsenosides have antitumor, antiviral, anti-aging, immune enhancement, and other pharmacological activities, but the contents of different individual ginsenosides in herbs and their extracts are different and their pharmacological activities are different. A lot of individual ginsenosides with low contents and strong pharmacological activities are required and prepared to meet the medicinal and scientific needs. To directly improve the contents of individual ginsenosides, enzymatic preparation is a key technology. The extensive research was conducted to obtain the effective individual ginsenosides directly by enzymatic conversion. In this paper, the enzymatic conversion for preparing individual ginsenosides is reviewed to provide a theoretical basis and reference for the further development and utilization of individual ginsenosides.

**Key words:** enzymatic method; ginsenosides; biotransformation; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Rg<sub>3</sub>

人参 *Panax ginseng* C. A. Meryer 为五加科多年生草本植物, 人参皂苷为人参的主要活性成分, 是由苷元和糖相连而成的糖苷类化合物, 其属于萜类化合物, 根据苷元不同, 可将其分为 4 种类型: 原人参二醇型、原人参三醇型、齐墩果酸型和奥克梯隆型<sup>[1]</sup>。目前, 从人参属植物中发现的人参皂苷已经超过 180 种, 其中 150 余种为天然人参皂苷, 而研究较多的约有 60 余种<sup>[2-3]</sup>。同时, 人参皂苷的 NMR 标准图谱也已建立, 其系统地阐述了人参皂苷的结构式、结构特征、NMR 谱特征等, 为人参皂苷单体鉴定提供了参考<sup>[4]</sup>。人参皂苷具有抗肿瘤、抗病毒、延缓衰老、增强免疫

等多种药理活性, 但不同皂苷单体在药材及提取物中量不同, 其药理活性亦有差异, 量低而药理活性强的皂苷单体需大量制备, 以满足医疗和科研需要。如何定向提高人参皂苷单体的量, 酶法转化进行制备是解决该问题的关键技术, 研究人员就有效定向获得人参皂苷单体进行了大量研究。人参皂苷转化制备的方法主要有化学法<sup>[5]</sup>、微生物转化法和酶法, 由于酶法具有条件温和、反应周期短、专属性强等特点, 该法已成为人参皂苷制备及提高其量的重要方法。本文就酶法转化制备人参皂苷单体进行综述, 为人参皂苷单体的进一步开发利用提供理论依据和参考。

收稿日期: 2014-05-09

**基金项目:** 吉林省基础科研项目(20130102075JC); 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B010602); 国家科技重大专项子课题(2012ZX09304006); 吉林省科技厅重点项目(20110228); 吉林省科技条件与平台建设计划(20112101); 吉林省现代农业产业技术体系建设项目(201218)

**作者简介:** 姬庆(1989—), 女, 研究生, 研究方向为药理学。E-mail: jiqing198942@163.com

\***通信作者** 郜玉钢, 男, 教授, 博士, 研究方向为生药学。E-mail: gaoyugang\_2006@163.com

张连学, 男, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药学。E-mail: zlxbooksea@163.com

## 1 人参皂苷单体主要制备方法的原理及特点

### 1.1 化学转化法

化学转化法指用化学催化剂对皂苷糖基进行水解的方法, 其主要包括酸水解法、碱裂解法、重氮甲烷裂解等, 尤以酸水解法使用最多; 酸水解过程操作简单, 但选择性不高、专一性差, 并且转化率低<sup>[6]</sup>。化学法制备人参皂苷有时条件比较剧烈, 而且可能含有对人体有害的有机溶剂等, 但该法转化制备稀有人参皂苷效果较好。如刘志辉等<sup>[7]</sup>用醋酸水解制备人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 工艺优选的实验中, 证实此法是制备人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 的可行方法, 且该法省时、省力、简便。

### 1.2 微生物转化法

微生物转化法是通过微生物整体细胞或产生的酶将复杂的底物进行结构修饰, 也就是利用微生物代谢过程中产生的某个或某一系列的酶对底物(或外源化合物)进行催化反应, 使一种化合物转变成更有经济价值的产物<sup>[8]</sup>。微生物由于培养简单、种类繁多, 且微生物转化法成本低, 副产物少, 应用较广泛<sup>[9]</sup>。成乐琴等<sup>[10]</sup>应用此法使人参皂苷 Re 定向转化为 20 (S)-人参皂苷 Rg<sub>2</sub>, 使人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 定向转化成 20 (S)-人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 以及 20 (S)-原人参三醇。吴秀丽等<sup>[11]</sup>从长白山人参根际土壤中分离各类真菌菌株 68 株, 其中 3 株真菌对人参皂苷 Re 具有转化作用, 而黑曲霉 *Aspergillus niger* 的转化活性也较强, 转化产物为人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub> 和 Rh<sub>1</sub>。

### 1.3 酶法转化法

酶法是通过提取生物体内或者分泌的生物酶,

水解人参皂苷糖基侧链, 生产人参皂苷的方法<sup>[12]</sup>。该法反应条件温和、专一性好、不破坏皂苷母核结构、副产物少, 从而成为更具潜力的转化制备人参皂苷单体的方法。Quan 等<sup>[13]</sup>从人参土壤中分离出一株菌株 *Microbacterium esteraromaticum*, 并从该菌中得到一种 β-葡萄糖苷酶, 使用此酶转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 得到人参皂苷 Rg<sub>3</sub>。

## 2 酶法转化制备人参皂苷单体

酶法转化制备人参皂苷的相关进展见表 1。由表 1 可知, 酶法转化制备的产物专一性较强, 通过酶法可以得到一些稀有人参皂苷单体或原来量较低的人参皂苷, 同时, 人参皂苷单体的量也显著增加, 提高了人参皂苷转化效率, 为研究人参皂苷单体的工业化生产提供了新的路径。此外, 酶法转化制备人参皂苷单体相对于其他转化方法, 其转化酶专一性强、生产周期短, 易得到目标人参皂苷单体, 有利于分离纯化, 较化学法减少了有害试剂的产生, 更利于环保; 较微生物法更易得到高纯度的人参皂苷单体。人参皂苷转化酶的来源也很广泛, 可直接从菌中提取分离而得, 突破了稀有人参皂苷转化酶来源有限的难题。同时, 可以采用基因工程技术使人参皂苷转化酶发生定点突变, 改变酶蛋白分子的结构, 提高酶活力, 对人参皂苷的转化效率有很好的提高。还可运用基因重组技术获得高表达糖苷酶的基因工程菌, 通过短周期发酵得到糖苷酶的方法, 从而进行人参皂苷单体的定向转化。

表 1 酶法转化制备人参皂苷单体实例

Table 1 Examples of enzymatic conversion for preparing individual ginsenosides

人参皂苷转化底物	酶种类	人参皂苷单体转化产物	参考文献
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	重组 β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	13
人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	CNU120806-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	14
人参皂苷 Rb <sub>1</sub> 、Rc、Rd	β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	15
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rd	16-17
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	葡萄糖耐 β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rd	18
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	新 β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rd	19
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rd	20
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>1</sub> 水解酶	人参皂苷 Rd	21
PPT 型皂苷混合物	β-半乳糖苷酶、乳糖酶	人参皂苷 Rg <sub>2</sub> 、Rh <sub>1</sub> 、F <sub>1</sub>	22
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	人参皂苷糖苷酶	人参皂苷 Rh <sub>1</sub>	23
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 F <sub>2</sub>	24
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	β-葡萄糖苷酶	人参皂苷 CK	25

续表 1

人参皂苷转化底物	酶种类	人参皂苷单体转化产物	参考文献
三七叶总皂苷	$\beta$ -葡萄糖苷酶	人参皂苷 CK	26
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	$\beta$ -葡萄糖苷酶	人参皂苷 CK	27
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	LacS 耐热酶	人参皂苷 CK	28
人参皂苷 Rd	蜗牛酶	人参皂苷 CK	29
原人参二醇皂苷	柚苷酶	人参皂苷 CK	30
原人参二醇型皂苷	糖苷酶 GE-I	人参皂苷 CK	31
二醇组皂苷	蜗牛酶	人参皂苷 IH901	32
人参皂苷 Rg <sub>3</sub> (R)	粗糖苷酶	PPD (S, R)	33
人参根提取物	重组 $\beta$ -糖苷酶	Compound K	34-35
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	重组 $\beta$ -糖苷酶	人参皂苷 F <sub>1</sub>	36
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	固定化 $\beta$ -葡萄糖苷酶	人参皂苷 F <sub>1</sub>	37
人参二醇组皂苷	湿热酶	人参皂苷 Rg <sub>3</sub> 和 Compound K	38
人参皂苷 Re	人参皂苷- $\alpha$ -鼠李糖苷酶	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	39
人参二醇类皂苷	人参皂苷糖苷酶	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	40
人参二醇类皂苷	人参皂苷酶	人参皂苷 Rh <sub>3</sub>	41
人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	皂苷糖基水解酶	稀有皂苷 Rh <sub>2</sub>	42
人参皂苷 Rf	$\beta$ -葡萄糖苷酶	人参皂苷 Rh <sub>1</sub>	43
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	人参皂苷糖苷酶	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	44
人参皂苷 Rb <sub>2</sub>	人参皂苷糖苷酶	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	45

### 3 酶法转化制备人参皂苷单体需注意的问题

虽然酶法转化制备人参皂苷单体具有专一性强、时间短、过程简单及产物较易分离等诸多优点,但有的微生物在生产酶的过程中,存在工序繁多、耗时长等不足,甚至产量也不理想,因此,如何高效率的从微生物中获得转化制备人参皂苷单体的酶是解决问题的关键;同时,人参皂苷转化酶成本高、不易大规模生产也限制了酶法在制备人参皂苷单体的应用;还有一些人参皂苷转化酶在分离的过程中,其活性难以保持,影响目标人参皂苷单体的制备,也是在用酶法转化制备人参皂苷单体的过程中要注意的问题。

### 4 结语及展望

酶法转化制备人参皂苷单体的突出优点在于其底物高选择性、高效性、高专一性。化学转化法相对于酶法操作简便,但其副产物较多,易对环境造成污染。微生物转化法相对酶法制备人参皂苷成本较低,但同样会面临菌种退化以及产物纯化难等方面的问题。微生物法和化学法转化制备人参皂苷单体在大规模的生产上仍具有优势,酶转化法制备人参皂苷单体由于成本问题受到了限制,亟待解决。

制备人参皂苷单体的产业化;如何优化酶的存储条件、保持酶的活性;如何筛选更多种类转化制备人参皂苷单体的酶和优化酶法转化制备人参皂苷工艺,必将成为今后研究的热点。

### 参考文献

- [1] 徐静,贾力,赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [2] Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytoedicine-ginseng (I): Etymology, pharmaco-gnosy, phytochemistry, market and regulations [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(19): 2475-2484.
- [3] Christensen L P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 55: 1-99.
- [4] 李平亚. 人参皂苷 NMR 标准图谱 [M]. 北京: 北京工业出版社, 2012.
- [5] 杨宁, 杨世林, 赵余庆. 稀有人参皂苷糖苷化合成方法的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 574-582.
- [6] 徐传莲, 付建国. 人参皂苷生物转化研究进展 [A] // 中国生物化学与分子生物学会. 中国生物化学与分子生物学会农业生物化学与分子生物学会第六次学术

- 交流会论文集 [C]. 上海: 生命的化学杂志社, 2004.
- [7] 刘志辉, 李琳, 钱芳. 醋酸水解三七总皂苷制备人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 工艺的优选 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11): 881-884.
- [8] 赵方允, 陈自宏, 虞泓. 微生物转化人参皂苷研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(3): 216-219.
- [9] 李学, 臧埔, 张连学, 等. 微生物转化法制备人参皂苷 Compound K 的研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 323-327.
- [10] 成乐琴, 金瑜真, 梁德春. 微生物酶催化制备人参皂苷 20 (S)-Rg<sub>2</sub>, 20 (S)-Rh<sub>1</sub> 和 20 (S)-PPT [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(1): 67-73.
- [11] 吴秀丽, 刘成, 陈靖. 黑曲霉 *Aspergillus niger* 对人参皂苷 Re 的微生物转化 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(33): 7-9.
- [12] 孙亮, 张美萍, 王义. 人参皂苷生物转化及固体发酵工艺研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 395-399.
- [13] Quan L H, Min J W, Jin Y, et al. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to 20 (S)-Rg<sub>3</sub> by recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(2): 377-384.
- [14] Hou J G, Xue J J, Wang C Y, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub> to ginsenoside Rh<sub>2</sub> by *Esteya vermicola* CNU 120806 [J]. *World Microbiol Biotech*, 2012, 28(4): 1807-1811.
- [15] 金东史, 崔允植, 鱼红闪, 等. 酶法制备人参皂甙 Rh<sub>2</sub> 的研究 [J]. 大连轻工业学院学报, 2001, 20(2): 99-104.
- [16] Luan H, Liu X, Qi X, et al. Purification and characterization of a novel stable ginsenoside Rb<sub>1</sub>-hydrolyzing  $\beta$ -D-glucosidase from China white jade snail [J]. *Process Biochem*, 2006, 41(9): 1974-1980.
- [17] Zhao X S, Wang J, Li J, et al. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) [J]. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(5): 721-726.
- [18] Zhao L G, Xie J C, Zhang X S, et al. Over expression and characterization of a glucose-tolerant-glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to Rd [J]. *J Mole Cataly B: Enzym*, 2013, 95: 62-69.
- [19] Zhao X S, Gao L, Wang J, et al. A novel ginsenoside Rb<sub>1</sub>-hydrolyzing  $\beta$ -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum* [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(6): 612-618.
- [20] 周超群, 史训龙, 李继扬, 等. 人参皂苷 Rd 高产突变株 *Paecilomyces bainier* sp 229-7 的生长特性和生物转化 [J]. 复旦学报, 2010, 37(1): 59-67.
- [21] 刘欣, 崔昱, 杨凌, 等. 蜗牛酶中一种人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 水解酶的分离纯化 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 929-933.
- [22] Ko S R, Choi K J, Suzuki K, et al. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, and F<sub>1</sub> [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(4): 404-408.
- [23] 孙斯宜, 鱼红闪, 金凤燮, 等. *Arthrobacter* sp. No. 3 细菌酶转化三醇类人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 生成 Rh<sub>1</sub> 的反应条件 [J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(1): 1-4.
- [24] Cheng L Q, Kim M K, Lee J W, et al. Conversion of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenoside F<sub>2</sub> by *Caulobacter leidyia* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(14): 1121-1127.
- [25] Qin Y, Zhou X W, Zhou W, et al. Purification and properties of a novel  $\beta$ -glucosidase, hydrolyzing ginsenoside Rb<sub>1</sub> to C-K, from *Paecilomyces Bainier* [J]. *Microb Biotechnol*, 2008, 18(6): 1081-1089.
- [26] 姜彬慧, 韩颖, 赵余庆, 等. 酶转化三七总皂苷制备人参皂苷 CK 的工艺优化 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 986-988.
- [27] Yan Q, Zhou U W, Shi X L, et al. Biotransformation pathways of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to compound K by  $\beta$ -glucosidases in fungus *Paecilomyces Bainier* sp. 229 [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(9): 1550-1556.
- [28] 张道军. 高活性人参皂苷催化酶的筛选 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2013.
- [29] 张阳, 林毅. 酶法转化二醇型人参皂甙 Rd 及制备稀有人参皂甙 CK [J]. 华侨大学学报, 2011, 32(6): 668-671.
- [30] 韩斌青, 冯冰, 马百平. 皂苷的生物转化研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1664-1668.
- [31] 赵雪淞, 胡彦波, 孟凡琳. 酶法转化原人参二醇型皂苷为稀有人参皂甙 C-K 的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 205-208.
- [32] 童庆宣, 陈良华, 明艳林. 稀有人参皂苷 IH901 酶法转化与制备研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1039-1044.
- [33] Liu L, Zhu X M, Wang Q J, et al. Enzymatic preparation of 20 (S, R)-protopanaxadiol by transformation of 20 (S, R)-Rg<sub>3</sub> from black ginseng [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(13): 1514-1520.
- [34] Noh K H, Son J W, Kim H J, et al. Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(2): 316-321.

- [35] Yoo M H, Yeom S J, Park C S, *et al.* Production of aglyconprotopanaxadiol via compound K by a thermostable  $\beta$ -glycosidase from *Pyrococcus furiosus* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(4): 1019-1028.
- [36] Kim J K, Cui C H, Yoon M H, *et al.* Bioconversion of major ginsenosides Rg<sub>1</sub> to minor ginsenoside F<sub>1</sub> using novel recombinant ginsenoside hydrolyzing glycosidase cloned from *Sanguibacter keddiei* and enzyme characterization [J]. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 294-301.
- [37] 张琪, 赵文倩, 孟飞, 等. 固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶制备人参皂苷 F<sub>1</sub> 的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(1): 49-55.
- [38] 刘莉, 齐滨, 胡娜, 等. 酶法转化人参皂苷的研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(4): 729-730.
- [39] 蒋磊, 赵寿经, 李然. 酶法转化人参皂苷 Re 为 Rg<sub>1</sub> 的研究 [J]. 特产研究, 2006, 28(2): 28-31.
- [40] 于小溪, 姜晓野, 王岩, 等. 把人参二醇类皂苷转化为 Rg<sub>3</sub> 的特种人参皂苷糖苷酶生成的细菌筛选 [J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(2): 97-101.
- [41] 吕迪, 王亮, 朱靖博, 等. 酶解产物人参稀有皂苷 Rh<sub>3</sub> 的制备与分离 [J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(3): 182-185.
- [42] 张春枝. 人参皂苷糖基水解酶的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2002.
- [43] Ruan C C, Zhang H, Zhang L X, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh<sub>1</sub> by recombinant  $\beta$ -glucosidase [J]. *Molecules*, 2009, 14(6): 2043-2048.
- [44] 张妍, 金凤燮, 鱼红闪. GS0202 菌产人参皂苷糖苷酶的酶性质研究 [J]. 食品与工业发酵, 2009, 35(4): 16-19.
- [45] Quan L H, Wang C, Yang J, *et al.* Isolation and characterization of novel ginsenoside-hydrolyzing glycosidase from *Microbacterium esteraromaticum* that transforms ginsenoside Rb<sub>2</sub> to rare ginsenoside 20 (S)-Rg<sub>3</sub> [J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 2013, 104(1): 129-137.