



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101537024 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 13

(21) 申请号 200810010680. X

C12R 1/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 03. 17

审查员 林景瑞

(73) 专利权人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
103 号

(72) 发明人 赵余庆 韩颖 姜彬慧 胡筱敏

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限公司 21207

代理人 李宇彤

(51) Int. Cl.

A61K 36/258 (2006. 01)

A61K 36/424 (2006. 01)

C12N 1/20 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法

(57) 摘要

本发明公开了一株甘蔗镰孢 (*Fusarium sacchari*) 及用其制备抗癌活性有效部位和成分的方法, 同时提供了一种从栽培人参的土壤中筛选菌株的方法。一株甘蔗镰孢制备抗癌活性成分的方法是用甘蔗镰孢酵解人参属植物总皂苷大量制备抗癌活性有效部位, 其酵解温度为 25-45℃, pH 值 5.0-7.0, 酵解时间 2h-15d, 转化液为水溶液, 人参属植物总皂苷与甘蔗镰孢的比例为 4 : 1-8 : 1; 收集过程是将反应产物过滤去除菌体后, 注入到 D101 大孔吸附树脂柱内, 用水冲洗至无色, 再用乙醇梯度冲洗树脂柱, 将 80-90% 乙醇洗脱液浓缩, 挥发至干, 即可获得有效部位, 收率 60-80%。该方法简单方便、安全可靠、成本低。

1. 一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法,其特征在于:转化方法如下:

将甘蔗镰孢接种到含有人参属植物总皂苷的溶液中,在酵解温度 25-45℃, pH 值 5.0-7.0, 酵解时间 2h-15d, 转化液为水溶液,总皂苷与微生物菌株甘蔗镰孢的比例为 4:1-8:1 的条件下,将反应产物去除微生物后注入到 D101 大孔吸附树脂柱内,用水冲洗至无色,再用乙醇梯度冲洗树脂柱;将 80-90% 乙醇洗脱液浓缩,挥发至干,获得转化总产物,即可获得有效部位,收率 70-90%。

2. 根据权利要求 1 所述的一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法,其特征在于:所述的一株甘蔗镰孢是通过如下方法培育而成的:

(1) 土壤微生物富集法分离微生物

a、微生物的富集:利用无菌器皿取栽培人参的土样 1g,加入 10mL 无菌生理盐水,震荡片刻,制成土壤悬液,取 1mL 悬液分别放入盛有 25mL 富集培养基 1 的三角瓶中,生化培养箱中 28-30℃,48h;

b、菌株的初筛:用稀释平板涂布法将富集培养基 1 中生长的微生物分别接入到初筛培养基 2 中,每种稀释浓度接 3 个平行样,接种量为 0.2mL,将接种后的平面皿先正置于 28-30℃的培养箱中 24h,后在倒置于培养箱中培养 3-4 天;

(2) 土壤液稀释法分离微生物

菌株的初筛:用稀释平板分离法将不同浓度的土壤稀释液分别接入到初筛培养基 2 中,每种稀释浓度接 3 个平行样,接种量为 1mL,将接种后的平面皿倒置于 28-30℃的培养箱培养 3-4 天;

(3) 菌种的分离、纯化培养

将初筛平板上的单菌落进行分离、纯化用平板划线分离法将各个单菌落分别接种于分离培养基 3 中,倒置于 28-30℃的培养箱培养 3-4 天,待菌株生长比较旺盛时,再将分离、纯化获得纯菌株接入液体分离培养基 4 中,30℃、160r/min 摇床中培养 2-3 天;

(4) 菌种的复筛

将液体分离培养基 4 中生长的菌体分别转移到复筛培养基 5 中,30℃、160r/min 摇床中培养 2-3 天,观察菌体的生长情况及对三七皂苷的转化作用,选择生长情况及对三七皂苷的转化作用,选择生长情况良好且具有较高的转化作用的菌株作为实验菌,将其命名为 G,进一步经中科院微生物所对纯菌株进行鉴定,该菌株为甘蔗镰孢,甘蔗镰孢菌落在 PDA 培养基上,25℃ 7 天直径 86mm,质地绒毡状,白色,无渗出液;菌落反面浅紫色,菌落在 SNA 培养基上,25℃ 7 天直径 78mm,质地薄绒毡状,无渗出液;菌落反面无色,小型分生孢子聚集成头状,0-1 隔,短杆状或弯月形,5.5-19×1.8-3.2 μm;大型分生孢子细,多为 3 隔,一端钝圆,一端较尖,35-40×3.0-4.1 μm;

所述的富集培养基 1 组成为葡萄糖 4.0g,三七茎叶皂苷 6.0g, KH_2PO_4 1.0g, CMC 10.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g,青霉素 G 纳 0.1g,蒸馏水 1000mL;初筛培养基 2 组成为牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,琼脂 20.0g,蒸馏水 1000mL, pH 7.6;分离培养基 3 组成为牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,琼脂 20.0g,蒸馏水 1000mL, pH 7.6;分离培养基 4 组成为牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,蒸馏水 1000mL, pH 7.6;复筛培养基 5 组成为三七茎叶皂苷 5.0g,蛋白胨 3.0g, $\text{KH}_2 \cdot \text{PO}_4$ 1.0g, NaCl 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g,蒸馏水

1000mL, pH 7.6。

3. 根据权利要求2所述的一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法,其特征在于:菌种生长于实验中常用的马丁氏培养基、PDA培养基。

4. 根据权利要求1所述的一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法,其特征在于:通过醇解天然三七茎叶皂苷,直接获得抗癌有效部位,且抑瘤率高达75.7%。

一株甘蔗镰孢转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位的方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及微生物技术领域，公开了由微生物转化（水解）人参属植物总皂苷，转化总产物作为抗癌有效部位的方法。特别是涉及一株甘蔗镰孢 (*Fusarium sacchari*)，转化人参属植物总皂苷制备抗癌有效部位和成分的方法。该有效部位的组成以人参皂苷 C-K、Mx 和 Mc 为主，三种皂苷在转化总产物中的总含量在 60% 以上，且抑瘤率达 70%。

背景技术：

[0002] 癌症是残害人类生命的世界第二大疾病，死亡率仅次于心脑血管疾病，是人类死亡的最主要因素之一。在全世界 60 亿人口中，目前约有各类癌症患者 3500 万。1997 年发达国家的癌症发病人口为 400 万人，其中美国 100 ~ 150 万人、欧洲 100 万人、日本 40 万人。癌症造成的死亡人数每年全世界约有 630 万人，据国际权威调查机构统计，到 2020 年癌症死亡人数将翻一番，达到 1000 万人以上。由于化学、病毒、物理辐射等各种致癌因素逐渐增多，我国的癌症发病率也逐年上升。据国家卫生部卫生统计信息中心报道，1999 年全国城市恶性肿瘤患病率男性为 169.58 人 / 万人、女性为 110.05 人 / 万人、大城市中患病率为 148.90 人 / 万人、中小城市为 110.70 人 / 万人。若按我国 13 亿人口计算，每年恶性肿瘤的新发病例为 180 万。

[0003] 人参皂苷是人参、西洋参、三七等五加科人参属植物的主要活性成分，人参皂苷中的 Rh₁、-Rh₂、C-K、PPD 和 PPT 为人参、西洋参、三七等五加科人参属植物中存在的微量稀有次生皂苷。研究表明这些稀有人参皂苷均具有显著的抗肿瘤活性。

[0004] 早在 1979 年日本学者 Odashima 等人就发现人参皂苷 Rh₂ 能抑制肺癌细胞 3LL（小鼠）、莫里斯肝细胞（兔子）、BA-16 恶性肿瘤（小鼠）和 HELA 细胞（人）的增殖，并证明人参皂苷能引起癌细胞向正常细胞转化。1991 年，日本学者 Kikuchi 等报道，给裸鼠口服人参皂苷 Rh₂ 可明显抑制人类卵巢癌细胞 (Human ovarian cancer cells HRA) 的增生，小鼠的生存率显著上升。1996 年夏丽娟利用体外实验方法研究了 -Rh₂ 对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的分化诱导作用，结果表明：-Rh₂ 在 10 μg·mL⁻¹ 的浓度下对 B16 细胞有较强的分化诱导作用，表现为黑色素生成能力明显增加；形态向上皮样细胞分化；细胞呈网状结构；黑色素颗粒增多，生长变缓慢。Kim 等的研究也显示，人参皂苷 Rh₂ 和 -Rh₃ 能诱导 HL-60 细胞向粒细胞的分化，可使 HL-60 细胞阻断在 G1/S 期。由 -Rh₂ 引起的 HL-60 细胞的分化可使蛋白酶激活剂 C (PKC) 的活性增加。同年 Park 等报道，人参皂苷 Rh₁ 和 -Rh₂ 对人纤维肉瘤细胞的增殖有明显抑制作用，与世界公认的最有效的抗 HRA 药 CDDP (Cis-diamminedichloroplatinum) 相比，-Rh₂ 抑制肿瘤生长的作用与 CDDP 相似，但没有副作用，而 CDDP 却有明显的副作用。-Rh₂ 还有较强的增加自然杀伤癌细胞活性的能力，并能显著延长生命，这些特性在使用 CDDP 时并没有发现。

[0005] 1995-1996 年，日本学者 Kitagawa 等报道，人参皂苷 Rg₃ 可以抑制由 Bomesin 所致大鼠肠癌腹腔内转移的作用。Azuma 等报道了人参皂苷 Rg₃、-Rb₂ 在体内、体外均对 B16-BL6

肿瘤细胞在肺部的转移有抑制作用。国内学者富力、鲁岐通过多年的研究,改进了从红参中提取人参皂苷 20(R)-Rg₃ 的方法,首次实现了工业化生产,经过由中国中医研究院广安门医院牵头,大连医科大学附属第一医院、南京八一医院全军肿瘤中心等 8 家大单位符合 GCP 要求的为中心临床研究,现已获得国家一类新药证书,正式药名为参一胶囊。研究机理表明,-Rg₃ 在肿瘤转移中可抑制肿瘤增值生长、着床、浸润、粘附以及新生血管形成等五个关键环节。

[0006] 另据研究表明,C-K 无论在体内、体外均具有良好的抑制癌细胞生长作用和抗转移作用,无论对实体或流体癌细胞株均有显著效果,如:抗浸润和转移作用,利用多种体内外转移模型如路易斯肺癌细胞 LLC、人纤维肉瘤 HT1080、小鼠黑色素瘤 B16 细胞的易转移亚型 B16-F10 细胞等研究 C-K 对肿瘤细胞浸润和转移的影响,结果发现:C-K 虽不直接抑制肿瘤块形成,但具有明显的抗转移作用;诱导肿瘤细胞凋亡作用,C-K 在与 B16-BL6 和 LLC 两种肿瘤细胞共同孵育时,15min 后即出现在肿瘤细胞的核内,24h 之内诱导出现形态学上的细胞凋亡表现;抗肿瘤血管新生作用,研究表明:无毒剂量的 C-K 即可抑制 CM-L5 所致的 HSE 细胞的增殖和管腔形成活性,并对肿瘤诱导的心血管形成产生抑制;抗致突变和预防癌变作用,C-K 有抗苯并芘诱导的致突变作用,其作用具备药理学的量效关系。此外,C-K 还可降低苯并芘引起中国仓鼠肺纤维母细胞 (Chinese hamster lung fibroblast cells CHL) 的染色体畸变,说明 C-K 可以作为突变预防剂。

[0007] Wakabayashi 报道,-Rg₁,-Re 及其肠道细菌代谢物 20(S)-PPT 口服后具有很强的抗肿瘤细胞转移活性。

[0008] 人参次生稀有皂苷 -Rg₃、-Rh₂ 和 C-K 具有显著的抗肿瘤活性,但作为天然药物人参、西洋参、三七等发挥药效活性的物质基础,它们在天然植物中的含量极低。例如:-Rg₃ 在白参中的含量仅为 0.0003%,在红参中的含量约为 0.03%;而 -Rh₂ 在红参中含量仅为 0.001%、人参茎叶中的 -Rh₂ 含量较红参高 10 倍、西洋参茎叶中分离得到 -Rh₂ 含量为 0.001%-0.0043%。C-K 在天然人参中并不存在,为人参皂苷的微生物代谢产物,在三七中的含量仅为 0.032%。因此,如何提高这些微量次生活性皂苷的含量,是目前天然药物领域中的研究热点。

[0009] 天然活性成分的生物转化是利用生物体系包括微生物和动物、植物细胞或酶对外源性底物进行结构修饰,是当今研究的热点。利用生物转化方法可以实现将含量较高的天然皂苷转化为具有特殊活性的、价值更大的微量次级皂苷,并使其含量提高数百倍;再利用现代吸附、提取技术对酶转化产物进行富集提取与分离纯化,为进一步开发、研制新药奠定了基础。

[0010] 天然植物三七茎叶中含有极强的抗肿瘤活性成分人参皂苷 C-K,但 C-K 在天然人参中并不存在,为人参皂苷的微生物代谢产物,在三七中的含量仅为 0.032%。因此,如何提高这些微量次生活性皂苷的含量,是目前天然药物领域中的研究热点。但由于含量甚微,限制其在抗肿瘤领域的应用。以往,国内外学者研究表明人参皂苷 C-K 是人参二醇组皂苷的体内肠道菌群的代谢产物,具有明显的抗肿瘤作用。1972 年日本学者 Isao 及其同事在鉴定二醇组人参皂苷苷元结构时首次发现了它,他们应用微生物发酵时产生的糖苷酶水解人参皂苷制备苷元时发现:人参中的人参皂苷 -Rb₁、-Rb₂ 和 -Rc 等皂苷成分均通过 C-K 这种物质转变为苷元 20(S)-PPD。于是,将其命名为 20(S)-原人参二醇 20-O-β-D-吡喃葡萄

糖苷 [20(S)-protoPana-xadiol 20-O- β -D-glucopyranoside]。1983 年, Yoshio TAKINO 的研究组在监测 Rb₁ 胃肠道药代谢时发现 Rb₁ 等天然二醇型人参皂苷吸收率极低, Rb₁ 在从胃移行到大肠的过程中出现消减和分解, 并产生未知代谢物, 但是限于当时的分析检测能力和对相关知识的认识, 他们未能确证未知代谢物就是 C-K。与此同时, 日本学者小桥恭一的研究组开始利用成熟起来的厌氧菌培养技术, 探索肠道厌氧菌与摄入肠道中的天然药物成分的代谢关系。他所领导的课题组发现许多天然糖苷类化合物并不能被胃肠道直接吸收, 而是通过肠道菌的作用、转化为其次生代谢物后方可吸收入血, 并因此提出天然前药的概念, 相继发表了多篇文章。1990 年, Yoshio TAKINO 研究组对 Rb₂ 在大鼠肠道内的代谢和动力学进行研究。他们在研究中使用了桔皮苷酶的酶解产物作为对照, 终于在大鼠肠道内发现了 C-K。并于次年, 比较了 Rb₁ 和 Rb₂ 在大鼠肠道内的代谢变化, 发现两者均转变为 C-K。这一结果的发表立即得到小桥研究组的回应, 后者用人肠道菌群的体外厌氧培养证实了 Rb₁ 也以同一代谢路径转化为 C-K 和少量原人参二醇。此后, 天然人参皂苷和 C-K 的代谢关系不断获得新的证实, 小桥研究组检测到人口服红参后血浆中有明显的 C-K 的吸收。最具有说服力的研究是, 小桥研究组将人的 Rb₁ 代谢肠道菌株植入无菌大鼠, 形成息生动物 gotobiotic animal 模型, 口服 Rb₁ 后检测其与无菌动物血浆中 C-K 浓度的差异, 证实了 Rb₁ 是一个“天然前药”, C-K 是 Rb₁ 发挥真正活性作用的实体。C-K 的药用开发和机制研究由此全面展开。

[0011] 而就天然植物资源来说, 某种植物中除少数活性成分外, 大部分都是低活性成分, 但这些成分往往都是生源关系相近或者结构类似。以人参中的单体皂苷为例, 如 -Rb、-Re、-Rg、-Rh, 它们分子结构的母核是相同的, 都是相对稳定的达玛烷型四环三萜皂苷, 不同的是它们在母核的特定位置上连接的支链糖 (葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖等) 不同, 或支链上糖的数量不同, 或羟基与糖链的连接位置不同, 再者就是它们的空间立体构型不同 (空间立体旋转构型), 总之, 它们的结构都是十分相近的。但由于支链的不同, 它们所具有的药理活性也完全不同。-Rb₁、-Rb₂、-Rc、-Rd 和 -Re 等由于支链上连接的糖太多, 使得分子量庞大, 药理活性很低; 而 -Rg₃、-Rh₂ 和 -Rh₁ 等, 支链上的葡萄糖较少, 但却被证实是具有不同药理活性的小分子活性物质。因此, 只要能把分子量很大的低活性皂苷支链上的糖水解掉, 尽量减少糖的个数, 或者改变皂苷的空间构型, 都能得到预期的高活性皂苷。

[0012] 目前常用的水解皂苷的方法有酸水解法、碱水解法和生物转化法。但是酸碱水解法可以使皂苷水解, 但是它们的水解条件都十分剧烈, 不易控制, 而且由于在水解过程中能使皂苷元发生脱水、环合、双键位移、取代基位移、构型转化等变化, 使水解的副产物增多, 目标产物很难得到。更重要的是这两种方法从原料到反应过程均向环境中排放了大量的有机溶剂、酸和碱等污染物, 对环境造成很大程度上的危害; 而且酸和碱对操作人员本身也会有腐蚀性的伤害, 所以需要寻找新的转化技术和方法, 即能更有效的将低活性、高含量的植物皂苷转化成高活性、天然含量低的单体皂苷, 又能做到不给环境造成负担的转化技术和方法, 这是提高天然药物利用率、实行清洁生产、使中药走向世界, 建立绿色中药产业的必由之路。

[0013] 生物转化 (Biotransformation 或 Bioconversion) 是利用生物体系将加入到反应系统中的外源有机底物某一特定部位或功能基团进行特异性的结构修饰以获得有价值的不同化学产物的工艺。这里的生物转化强调的是外源底物与产物之间通过一步反应完成,

其实质是一种酶的催化反应。由于植物细胞内含有催化氧化、还原、羟基化、乙酰化、酯化、葡萄糖基化、异构化、甲基化、去甲基化、环氧化等反应的酶类,因此它们具有将外源底物转化成有用化合物的能力。生物转化的区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低、公害少,且能完成一些化学合成难以进行的反应,受到有机化学家、药物化学家和微生物学家们的极大重视。生物转化的范围很广,几乎包括各种类型的化学反应,如水解、缩合、酰基转移、氧化还原等等。因此利用生物对植物皂苷进行转化既克服了传统酸、碱水解方法的缺陷,又减少了污染物的产生,符合从末端治理向源头控制转化的新型现代生产模式,因而越来越受到重视,生物转化法已成为当前的研究热点。

[0014] 由于微生物本身来源于自然,转化活性较高,而且生产成本低廉,仅为直接用工业化酶转化的 1/100,甚至更低。菌株一旦分离、纯化后还可以永久使用、保藏。此法在生产过程中对操作人员完全无害,整个过程从原料到产物,对环境都不会造成污染,而且反应后剩余的菌体残液,经过重新培养,仍然可以作为反应物再次进行实验,因此这种具有革命性的创新生产工艺,完全符合 21 世纪的新型环保理念,是当之无愧的“绿色工艺”。

[0015] 微生物的生物转化反应,实际上就是利用一种或几种微生物含有的一种或几种酶的专一催化功能,对用作底物的某个有机化合物的分子结构的特定位置作用,使其转化成结构相似的更有价值的新化合物。随着当代生物技术的发展,将固相醇(固定化细胞)、酶膜反应器、溶剂工程、原生质体及其融合、诱变和基因重组等新技术引入酶催化反应体系,不仅可使微生物转化的效率成倍增长,而且可使整个生产过程连续、自动化,为微生物转化应用于有机合成展现了广阔的前景。

[0016] 微生物转化的应用,开始于 50 年代甾体药物的临床应用之后,但是在 30 年代就已发现微生物具有转化某些化合物的能力。近年来,由于国内外学者的重视,微生物转化技术也有了新的突破,例如:蛋白饲料的生产、以再生纤维素为底物生物转化生产木糖醇等,都已成为当今的热点。

[0017] 目前,国内外学者对植物皂苷进行生物转化的研究主要集中在三个方面,一是利用菌种库储存的菌株对植物皂苷进行微生物转化;二是利用肠内菌对单体皂苷进行代谢转化;三是利用酶对植物皂苷进行转化。

[0018] 长春中医学院的马吉胜等人用购自中国科学院微生物菌种保藏中心的 10 种真菌分别对 $-Rb_1$ 和人参二醇系皂苷(PDS)进行生物转化,结果表明其中 6 种真菌经转化后有代谢活性,并随时间的延长,相继有四种代谢产物出现,分别为 $-Rd$ 、 $C-K$ 、 PPD 和 $-Rg_3$ 。北京大学的董阿玲等人曾用购买的几种单菌株对人参中的单体皂苷 Rb_1 、 $-Rb_3$ 和 Rd 等进行生物转化,研究发现,经菌株转化后的人参皂苷都发生了不同程度的转化。

[0019] 利用肠内菌对单体皂苷进行代谢的研究目前较为广泛。肠内菌群对具有苷键的药物进行水解是因为糖类化合物是肠道内细菌重要的碳源。近年来,我国和日本学者对肠内菌代谢研究证明,人参皂苷 Rb_1 和 $-Rg_1$ 被人大鼠口服后在肠道中肠内菌的作用下,可被转化成多种代谢产物, $-Rb_1$ 在肠内菌的作用下代谢模式为 $-Rb_1 \rightarrow -Rd \rightarrow F_2 \rightarrow C-K \rightarrow PPD$, $-Rg_1$ 在肠内菌的作用下代谢模式为 $-Rg_1 \rightarrow -Rh_1/F_1 \rightarrow$ 原人参三醇(PPT)。长春中医学院的陈昕等人在 1999 年就对人参皂苷 Rb_1 的肠内菌代谢进行了研究,结果表明 $-Rb_1$ 被离体培养的人肠内菌代谢,随时间的延长,相继出现 4 种代谢产物,其 R_f 值分别与标准品 $-Rd$ 、 $-Rg_3$ 、 $-Rh_2$ 、 PPD 值相同;而 $-Rb_1$ 被大鼠肠内菌代谢后的代谢产物与离体培养的人肠内菌对 $-Rb_1$ 的代谢

产物相同,但是,大鼠肠内菌对-Rb₁代谢48小时后的代谢产物中已经检测不到-Rd和-Rg₃,只有-Rh₂和PPD。2000年王毅等人对人参皂苷Rg₁的肠内菌代谢进行研究,发现在人体内-Rg₁被肠内菌代谢为-Rh₁及PPT,-Rh₁被吸收入血,并由尿液排除体外;而-Rg₁被大鼠肠内菌群代谢为-Rh₁,F₁及PPT。

[0020] 酶法转化植物皂苷是近几年才发展起来的新技术。大连轻工学院的赵立亚等人用从储存菌株中分离的粗酶液对人参总皂苷进行转化,结果显示酶法能够改变人参二醇皂苷的糖基,-Rh₂和-Rg₃皂苷的第20碳上的羟基容易失去水形成-Rh₃和-Rg₅,-Rh₁是由人参二醇类皂苷混有的少量的-Re、-Rg₁生成的,并且酶法的反应产物中主要产物为人参皂苷Rh₂,副产物为人参皂苷Rg₃、-Rg₅、-Rh₁、-Rh₃和人参二醇类皂苷元。金凤燮等人进行了利用人参皂苷糖基酶制备人参皂苷Rh₂的研究,并申请了专利。刘珂利用酶法将人参总皂苷进行生物转化并得到了C-K,酶解过程如下:总皂苷→二醇组皂苷→加酶进行生物转化→C-K。另外,田晶等人发现用酶法还可以改变大豆皂苷的糖基,水解皂苷变成低糖皂苷产物及苷元。鱼红闪等人还对用酶法改变甘草苷糖醛酸基提高其甜度进行了研究。

[0021] 人参皂苷抗肿瘤活性成分的研究

[0022] 人参皂苷是人参、西洋参、三七等五加科人参属植物的主要活性成分,人参皂苷中的Rh₁、-Rh₂、C-K、PPD和PPT为人参、西洋参、三七等五加科人参属植物中存在的微量稀有次生皂苷。研究表明这些稀有人参皂苷均具有显著的抗肿瘤活性。

[0023] 人参果是植物人参的成熟果实,色泽鲜红,内有两颗半圆形种子。在采集人参的过程中,种子与果实同时采集,种子用于繁殖后代,果浆往往作为废物丢掉,既污染了环境又占用土地。后经学者研究证实,在人参果实的果皮和果肉中含有的人参果苷,除与人参根中的有效成分-人参皂苷具有相似的作用外,还有其独特的作用。经我国药学专家检测,人参果肉中的人参皂苷含量是人参根的4倍,含人参皂苷Re为人参根的30倍,20(R)-Rg₃、20(R)-Rh₂的含量明显高于红参和人参茎叶中-Rh₂的含量。因此,对人参果的开发和利用引起了国内外学者的广泛重视。目前,已从人参果中分离鉴定出人参皂苷Rb₁、-Rb₂、-Rc、-Rd、-Re、-Rg₁、20(S)-Rg₂、20(R)-Rg₂、20(R)-Rg₃、20(S)-Rh₁、20(R)-Rh₁、20(R)-Rh₂和20(R)-原人参三醇、胡萝卜苷、β-谷甾醇等成分。

[0024] 我们在前人研究的基础上对人参果化学成分进行了研究,并比较了人参果和西洋参果皂苷提取物中具有抗肿瘤活性的人参皂苷Rg₃、20(R)-人参皂苷Rg₃和人参皂苷Rh₂的含量,为进一步开发利用人参果这一廉价的药用资源提供理论依据,同时也为研发天然的抗癌新药打下基础。

发明内容:

[0025] 本发明提供了一种从栽培人参的土壤中筛选出一株甘蔗镰孢(*Fusarium sacchari*)(保藏日期:2006年04月26日,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏编号:1704),及其酵解人参属植物总皂苷,转化总产物经菌体过滤、D101大孔吸附树脂纯化后,作为抗癌有效部位的方法。本发明能够将人参属植物包括人参、三七、西洋参等植物的根、茎叶和果实中提取纯化的总皂苷,经甘蔗镰孢转化(水解),转化总产物可直接作为抗癌有效部位。

[0026] 本发明提供了一种甘蔗镰孢酵解人参属总皂苷转化总产物作为抗癌有效部位的

方法。并且提供了一种从栽培人参的土壤中筛选菌株的方法。

[0027] 本发明甘蔗镰孢醇解人参属总皂苷制备抗癌有效部位的方法中,菌株培养条件粗旷,可生长于实验中常用的马丁氏培养基、PDA 培养基等;醇解温度 25-45℃,pH 值 5.0-7.0,醇解时间 2h-15d,转化(水解)液为水溶液。

[0028] 本发明用微生物转化醇解(亦称水解)人参属总皂苷制备抗癌有效部位的方法中,人参皂苷与甘蔗镰孢的比例为 4-8:1,以 6:1 最为经济;一般来说,水解 15d 即可,总皂苷中的多糖苷几乎全部被转化,再延长水解时间,转化总产物成分基本不再变化,因此,无需加长水解时间。

[0029] 本发明甘蔗镰孢醇解人参属总皂苷制备抗癌有效部位的方法中,可以通过醇解天然三七叶皂苷,得到活性极高的抗癌有效部位。

[0030] 本发明用微生物转化(水解)人参属总皂苷制备抗癌有效部位的方法中,收集过程是反应产物去除微生物后注入到大孔吸附树脂柱内,用水冲洗至无色,再用乙醇梯度冲洗树脂柱。将 80-90%乙醇洗脱液浓缩,挥发至干,即可获得有效部位,收率 70-90%。

[0031] 实施以上操作过程,本发明所提供的甘蔗镰孢还可以用于醇解其他糖苷类化合物如包括人参、三七、西洋参、绞股蓝等植物的根、茎叶和果实中提取纯化的总皂苷(茎叶/果总皂苷)、苦瓜苷、胡芦巴苷、芍药苷、柴胡皂苷、黄芩苷、黄芪苷、去羟子苷等,制备相应的微生物醇解产物。本发明所用的甘蔗镰孢是将其转入含有三七叶皂苷的培养基中,经传代培养、驯化、筛选得到的能够醇解人参属总皂苷的稀有活性菌株。

[0032] 甘蔗镰孢菌落在 PDA 培养基上,25℃ 7 天直径 86mm,质地绒毡状,白色,无渗出液;菌落反面浅紫色。菌落在 SNA 培养基上,25℃ 7 天直径 78mm,质地薄绒毡状,无渗出液;菌落反面无色。小型分生孢子聚集成头状,0-1 隔,短杆状或弯月形,5.5-19×1.8-3.2 μm;大型分生孢子细,多为 3 隔,一端钝圆,一端较尖,35-40×3.0-4.1 μm。

[0033] 本发明的优点是:采用环境友好型技术——生物转化技术,为利用各种人参属总皂苷制备抗癌活性有效部位提供了一种稀有的高活性微生物菌株甘蔗镰孢。且转化总产物即可作为抗癌活性有效部位,具有很高的抑瘤率,整个转化及有效的部位制备过程方法简便、安全可靠、成本低、产物回收率高,无需进行转化产物的分离,同时减少了污染物的排放和对生态环境的破坏。使用本方法制备的抗癌有效部位的转化率为 40%-80%,收率 70-95%。

附图说明:

[0034] 图 1 为甘蔗镰孢的显微特征

[0035] 图 2 为三七叶皂苷经甘蔗镰孢转化前 HPLC 图谱

[0036] 图 3 为三七叶皂苷经甘蔗镰孢转化后 HPLC 图谱

具体实施方式:

[0037] 一、微生物菌株甘蔗镰孢的分离与纯化过程

[0038] (一)、土壤微生物富集法分离微生物

[0039] (1) 微生物的富集:利用无菌器皿取栽培人参的土样 1g,加入 10mL 无菌生理盐水,震荡片刻,制成土壤悬液,取 1mL 悬液分别放入盛有 25mL 富集培养基 1 的三角瓶中。生化

培养箱中 28-30℃, 48h。

[0040] (2) 菌株的初筛: 用稀释平板涂布法将富集培养基 1 中生长的微生物分别接入到初筛培养基 2 中, 每种稀释浓度接 3 个平行样, 接种量为 0.2mL。将接种后的平面皿先正置于 28-30℃ 的培养箱中 24h, 后在倒置于培养箱中培养 3-4 天。

[0041] (二)、土壤液稀释法分离微生物

[0042] 菌株的初筛: 用稀释平板分离法将不同浓度的土壤稀释液分别接入到初筛培养基 2 中, 每种稀释浓度接 3 个平行样, 接种量为 1mL。将接种后的平面皿倒置于 28-30℃ 的培养箱培养 3-4 天。

[0043] (三)、菌种的分离、纯化培养

[0044] 将初筛平板上的单菌落进行分离、纯化(编号)。用平板划线分离法将各个单菌落分别接种于分离培养基 3 中, 倒置于 28-30℃ 的培养箱培养 3-4 天。待菌株生长比较旺盛时, 再将分离、纯化获得纯菌株接入液体分离培养基 4 中, 28-30℃、160r/min 摇床中培养 2-3 天。

[0045] (四)、菌种的复筛

[0046] 将液体分离培养基 4 中生长的菌体分别转移到复筛培养基 5 中, 30℃、160r/min 摇床中培养 2-3 天, 观察菌体的生长情况及对三七皂苷的转化作用。选择生长情况良好且具用较高转化作用的菌株作为实验菌, 将其命名为 G, 进一步经中科院微生物所鉴定该纯菌株为甘蔗镰孢。

[0047] 将以上复筛后的微生物分别接种于液体接种培养基 6 中, 接种量均为 2%, 接种后于 30℃、160r/min 摇床中培养, 待菌株生长比较旺盛时, 加入转化培养基 8, 并随时间的增加观察三七叶皂苷成分的含量变化。

[0048] 一部分纯化后的微生物接种于固体接种培养基 7 中, 4℃ 冰箱保存。

[0049] 表 1 筛选与培养 A8 时使用的培养基

[0050]

培养基名称	培养基的成分	培养基的用途	备注
富集培养基 1	葡萄糖 4.0g, 三七茎叶皂苷 6.0g, KH_2PO_4 1.0g, CMC 10.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 青霉素 G 钠 0.1g, 蒸馏水 1000mL, 灭菌。	微生物的富集	4℃ 冰箱保存
初筛培养基 2	牛肉膏 5.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 5.0g, 琼脂 20.0g, 蒸馏水 1000mL, pH7.6。灭菌后, 倒斜面或平板。	初步筛选微生物	混匀
分离培养基 3	牛肉膏 5.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 5.0g, 琼脂 20.0g, 蒸馏水 1000mL, pH7.6。灭菌后, 倒斜面或平板。	分离纯化微生物	划线分离

液体分离培养基 4	牛肉膏 5.0g, 蛋白胨 10.0g, NaCl 5.0g, 蒸馏水 1000mL, pH7.6, 灭菌。	增加分离纯化微生物的数量	4℃冰箱保存
复筛培养基 5	三七茎叶皂苷 5.0g, 蛋白胨 3.0g, KH_2PO_4 1.0g, NaCl 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 蒸馏水 1000mL, pH7.6, 灭菌。	进一步筛选微生物	4℃冰箱保存
液体接种培养基 6	称取 16.5g 马丁培养基, 加入 1000mL 蒸馏水溶解, 自然 pH, 灭菌。	制备种子液	现用现配
固体(斜面或平板)接种	液体接种培养基 10 中加入 2-3% 的琼脂, 灭菌后, 倒斜面或平板。	菌种保存	3 个月传代一次
培养基 7			
液体转化培养基 8	称量三七茎叶总皂苷 50g, 加入蒸馏水 1000mL, 超声混匀, 使三七茎叶总皂苷的浓度为 50mg/mL。	对底物进行转化	现用现配

[0051] 二、甘蔗镰孢最佳培养条件的确定

[0052] 目测甘蔗镰孢的生长情况, 包括菌落生长状况, 出现孢子时间及孢子颜色变化等。定量挑取菌株甘蔗镰孢接入到液体霉菌培养基中, 分别在不同的温度 (15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃)、不同的培养基初始 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、不同的摇床转数条件下 ($120\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $140\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $160\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $180\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $200\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养不同时间 (1h、4h、8h、24h、48h、72h、96h、120h), 观察菌落的生长状况、菌体分裂速度、孢子出现及颜色的变化情况。每组试验为 3 个平行样。由上述单条件试验确定菌株 m_{14} 的最佳培养时间为 72h、最佳培养温度为 30℃、最佳摇床转数为 $160\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、最佳培养基的初始 pH 值为 5, 该菌株属于偏酸性菌。

[0053] 三、最佳转化条件的确定

[0054] 甘蔗镰孢转化人参皂苷生成 C-K 的时间选择 1-15d, 转化温度 15、20、25、30、35、40℃, 摇床转速 120 、 140 、 160 、 180 、 $200\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 转化 pH 值 4.0、5.0、自然 pH 值 ($\text{pH} = 5.5$)、6.0、7.0、8.0。根据 TLC 检测表明, 甘蔗镰孢的最佳转化时间为 13d、最佳转化温度为 30℃、最佳摇床转数为 $160\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、最佳转化 pH 值为自然 pH 值。转化率为 20-60%。

[0055] 实施例 1

[0056] 甘蔗镰孢对三七茎叶皂苷的转化

[0057] 将在最佳培养条件下培养的甘蔗镰孢接种到含有 2g 三七茎叶皂苷 (含量 > 80%) 的水溶液中, 在温度 30℃、摇床转数为 $160\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、自然 pH 值条件下转化 (水解)。3d 后开始取样。TLC 的结果表明: 三七茎叶皂苷中的多糖苷 Rb_1 、 Rb_3 和 Rc 等含量明显减少, 13d 后, 产物中的多糖苷几乎全部被转化, 将菌体过滤后, 注入到 D101 大孔吸附树脂柱内,

用水冲洗至无色,再用乙醇梯度冲洗树脂柱。将 80-90%乙醇洗脱液浓缩,挥发至干,得到转化产物 1.18g。

[0058] 实施例 2

[0059] 甘蔗镰孢对人参果苷的转化

[0060] 将在最佳培养条件下培养的甘蔗镰孢接种到含有 2g 人参果苷 (含量 > 70%) 的水溶液中,在温度 30℃、摇床转数为 160r·min⁻¹、自然 pH 值条件下转化 (水解)。转化 13d 后,虑除菌体,注入到 D101 大孔吸附树脂柱内,用水冲洗至无色,再用乙醇梯度冲洗树脂柱。将 80-90%乙醇洗脱液浓缩,挥发至干,得到转化产物 1.04g。

[0061] 实施例 3

[0062] 甘蔗镰孢对西洋参皂苷的转化

[0063] 将在最佳培养条件下培养的甘蔗镰孢接种到含有 2g 西洋参皂苷 (含量 > 90%) 的水溶液中,在温度 30℃、摇床转数为 160r·min⁻¹、自然 pH 值条件下转化 (水解)。转化 13d 后,虑除菌体,注入到 D101 大孔吸附树脂柱内,用水冲洗至无色,再用乙醇梯度冲洗树脂柱。将 80-90%乙醇洗脱液浓缩,挥发至干,得到转化产物 1.14g。

[0064] 实施例 4

[0065] 转化总产物的抗肿瘤活性实验

[0066] 以甘蔗镰孢转化三七叶皂苷的总产物按如上方法处理后作为该活性实验的抗癌有效部位。本实验共分 4 组,一组为对照组,其余三组分别为转化总产物组、中药对照组 Rg₃ 和西药对照组紫杉醇,三组药品均用二甲基亚砜:聚乙二醇 400:双蒸馏水 (1:4:5, v/v) 混合溶液溶解。每组 10 只小鼠,并在小鼠腋下接入 S180 肉瘤,3d 后给药,给药 12 天后处死小鼠,取瘤,抑瘤情况如下表。

[0067]

化合物	给药剂量	抑瘤率
	mg/kg	%
转化总产物	20	75.7
人参皂苷 Rg ₃	20	58.5
紫杉醇	20	55.3

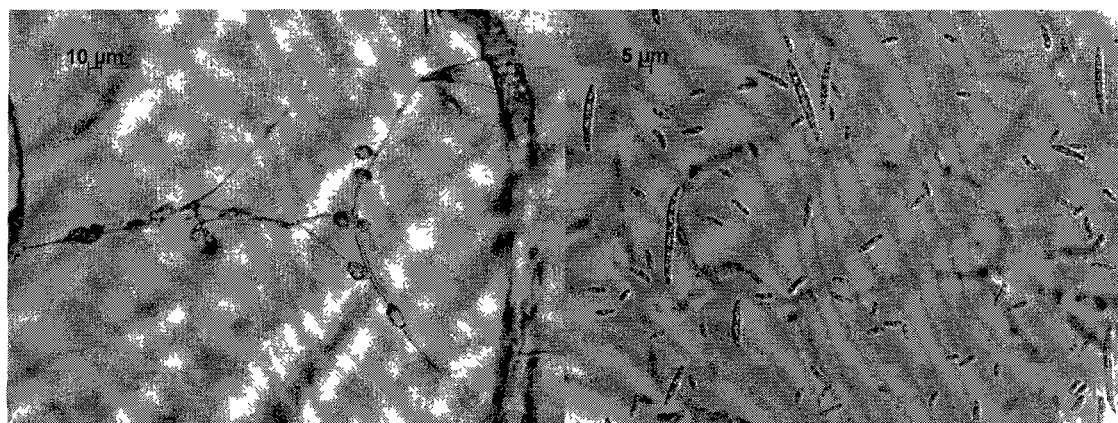


图 1

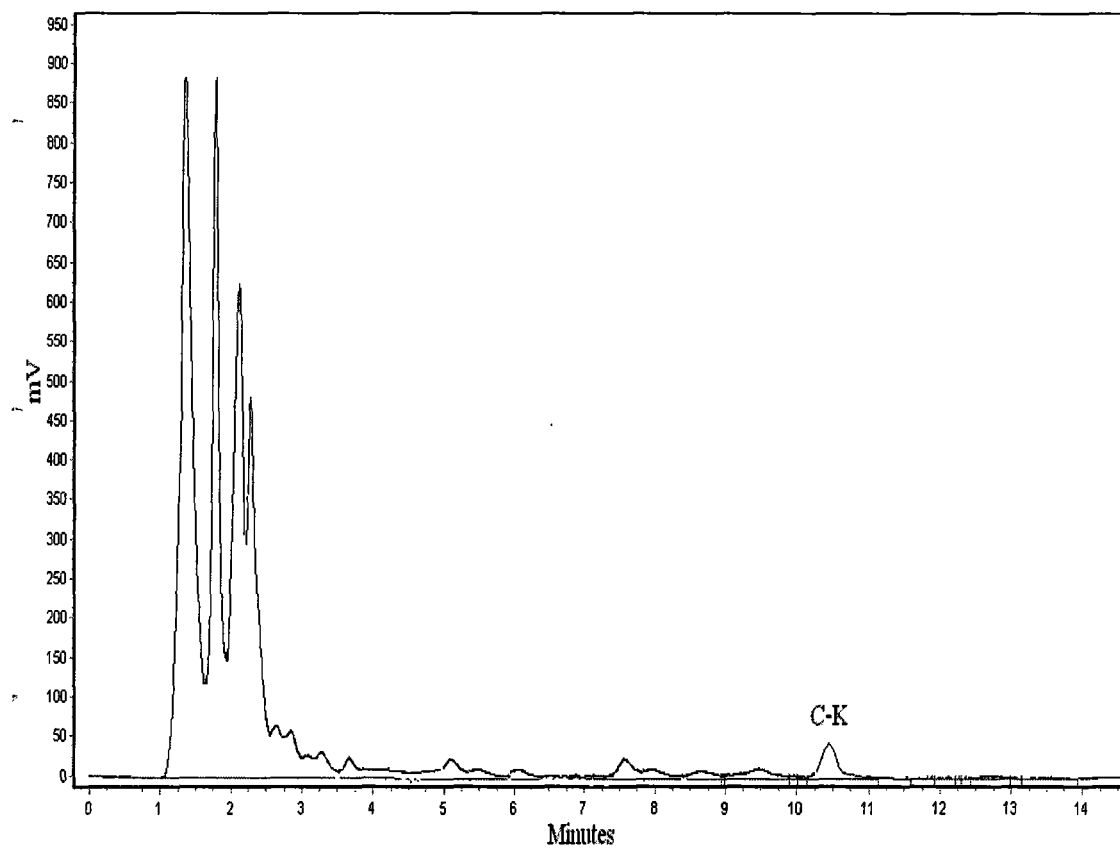


图 2

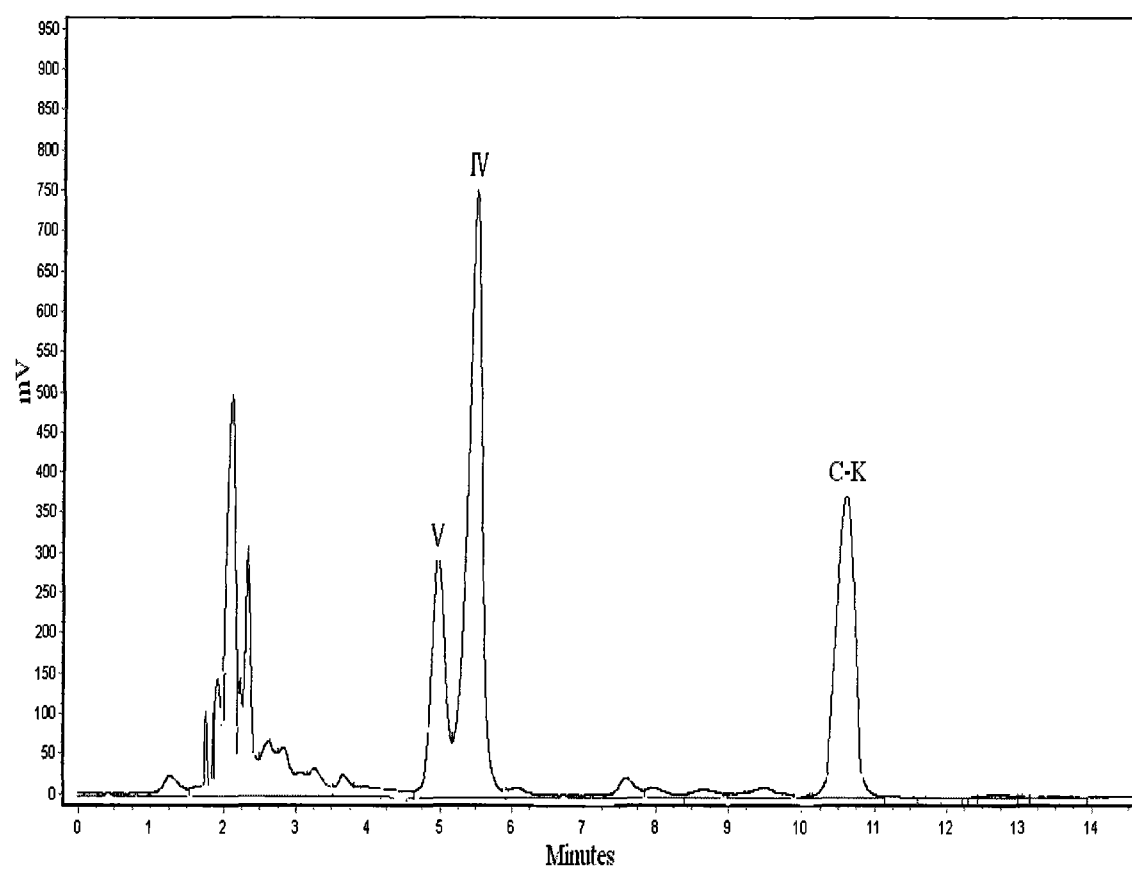


图 3