

灰绿曲霉对绞股蓝皂苷的微生物转化及其生物活性

陈良华¹ 翁梦婷² 秦江² 沈瑞池¹ 陈清西² 明艳林^{1,3*}

(1.福建省亚热带植物研究所 福建省亚热带植物生理生化重点实验室 福建 厦门 361006;
2.厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361102; 3.厦门华侨亚热带植物引种园 福建 厦门 361002)

摘要: 以福建绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino] 为材料 经乙醇提取和正丁醇萃取获得绞股蓝皂苷 利用灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*) 微生物转化绞股蓝皂苷 通过测定绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物的抗癌、抗酪氨酸酶和抗氧化活性 比较绞股蓝皂苷经微生物转化修饰前后生物活性的差异. 结果表明: 灰绿曲霉转化产物对肝癌细胞 SMMC7721 有体外抑制作用 半抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 91.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而绞股蓝皂苷抗癌效果不强; 绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶活力具有较强的抑制作用 IC_{50} 为 0.14 mg/mL 其抑制作用属于可逆抑制 抑制类型为混合型抑制作用 而灰绿曲霉转化产物抗蘑菇酪氨酸酶活性较弱; 绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物分别在 0.2 和 2 mg/mL 质量浓度下对 DNA 氧化损伤有保护作用. 研究结果说明绞股蓝皂苷经微生物修饰后 抗癌效果增强 对蘑菇酪氨酸酶抑制作用和 DNA 氧化损伤保护作用减弱. 该研究结果可为利用微生物转化法筛选抗癌绞股蓝皂苷奠定基础.

关键词: 福建绞股蓝; 微生物转化; 酪氨酸酶抑制; 抗肝癌; 抗氧化

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016)05-0775-06

绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino] 为葫芦科绞股蓝属植物. 绞股蓝全世界共有 14 个种 2 个变种, 我国是绞股蓝分布和分化中心^[1]. 绞股蓝的化学成分研究始于 20 世纪 70 年代, 目前已分离到的主要绞股蓝皂苷 (gypenoside) 已达到 169 种^[2]. 绞股蓝皂苷与人参皂苷具有达玛烷型结构的类似的主骨架, 属于四环三萜皂苷, 所以绞股蓝皂苷的抗肿瘤^[3]、降血脂血糖^[4]、保肝护肝^[5]和防止衰老^[6]等药理作用与人参皂苷相似.

微生物转化技术是天然产物结构修饰和筛选新先导化合物的有效途径. Ko 等^[7]利用来源于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的半乳糖苷酶和青霉菌 (*Penicillium* sp.) 的乳糖酶粗酶液水解大量三醇型皂苷混合物产生皂苷 Rg2 和 Rh1. 利用微生物转化修饰皂苷的侧链基团, 生成低毒高活性的新型三萜皂苷或苷元成为皂苷相关研究的热点, 目前对人参皂苷^[8]、三七皂苷^[9]和甘草皂苷^[10]等经微生物转化进行结构改造取得较大进展, 但绞股蓝皂苷微生物转化研究报道甚少. 朴香兰等^[11]

研究表明保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 对绞股蓝提取物的微生物转化产物比原绞股蓝提取物具有更强的抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的作用, 说明保加利亚乳杆菌能够使绞股蓝提取物成分发生转化. 本课题组前期研究报道^[12]利用黑曲霉 (*A. niger*) 和构巢曲霉 (*A. nidulans*) 两种真菌对福建绞股蓝皂苷进行微生物转化 转化产物对肝癌细胞 SMMC7721 和 Bel7402 增殖具有抑制作用. 本研究采用灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*) 对绞股蓝皂苷进行微生物转化, 测定灰绿曲霉转化产物和原绞股蓝皂苷的抗癌、抗酪氨酸酶和抗氧化等生物活性 比较绞股蓝皂苷经微生物转化修饰后的活性变化情况 为绞股蓝皂苷结构修饰和应用奠定基础.

1 实验部分

1.1 材料和仪器

福建绞股蓝于秋季采集自福建南靖产区, 灰绿曲霉为厦门大学生命科学学院龙敏南教授课题组惠赠.

收稿日期: 2016-03-08 录用日期: 2016-06-02

基金项目: 国家自然科学基金(81274149); 厦门市科技创新项目(3502Z20132009 3502Z20154083); 厦门市对台科技合作项目(3502Z20141041)

* 通信作者: xmyanlin@gmail.com

引文格式: 陈良华, 翁梦婷, 秦江, 等. 灰绿曲霉对绞股蓝皂苷的微生物转化及其生物活性[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 775-780.

Citation: CHEN L H, WENG M T, QIN J, et al. Microbial transformation of gypenoside from *Gynostemma pentaphyllum* by *Aspergillus glaucus* and its biological activities[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(5): 775-780. (in Chinese)



肝癌细胞 SMMC7721 购自中国科学院上海生命科学研究生物化学与细胞生物学研究所; 新生牛血清购自 HyClone 公司, 蘑菇酪氨酸酶 (mushroom tyrosinase)、L-多巴(L-DOPA)、胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐(MTT) 购自 Sigma 公司, pBKS 载体购自上海生工生物工程有限公司; HP₂₀ 大孔吸附树脂购自日本三菱化学株式会社; 其他试剂为国产分析纯, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水。

转化培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 3 g/L, 酵母膏 3 g/L, 磷酸氢二钾 8 g/L, 氯化钙 5 g/L, 吐温 80 2 mL, 七水合硫酸镁 4 g/L, 四水合硫酸锰 3 g/L。

旋转蒸发仪购自 Eyela 公司, 酶标仪 (MULTISKAN MK3) 和 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司, 高效液相色谱 (HPLC) 购自美国 Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 绞股蓝皂苷提取

绞股蓝皂苷的提取参考文献 [13] 方法: 用高速粉碎机粉碎绞股蓝样品, 称取 50 g 绞股蓝研磨粉, 以 45% (体积分数, 下同) 乙醇为提取溶剂, 溶剂用量为 20 倍量, 在 70 °C 水浴中加热提取 12 h; 提取液过滤并减压浓缩成浸膏状, 获得绞股蓝乙醇提取物; 将浸膏用适量蒸馏水溶解成悬浮液, 移置梨形分液漏斗中并用正丁醇萃取 3 次, 萃取液减压浓缩获得绞股蓝皂苷, 制备的绞股蓝皂苷作为灰绿曲霉微生物转化底物。

1.2.2 皂苷微生物转化

经马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 固体培养基培养活化的灰绿曲霉菌种, 用接种环接入含有 50 mL 马铃薯液体培养基中, 置于 30 °C、160 r/min 摇床里培养, 培养至长出真菌孢子, 用于微生物转化。

灭菌后的转化培养基, 接入 2% (体积分数) 活化培养的真菌孢子, 在 37 °C、230 r/min 控温摇床上培养 48 h 后, 加入 5% (质量分数) 绞股蓝皂苷底物进行转化; 继续在 37 °C、230 r/min 控温摇床上培养 3 d 后, 菌液用 8 层纱布过滤取上清液, 菌体再用 100 mL 水清洗 3 次, 收集转化菌液; 过滤的菌液上样于已预处理的 HP₂₀ 大孔吸附树脂柱, 蒸馏水冲洗后用 95% 乙醇溶液洗脱, 洗脱液浓缩干燥获得灰绿曲霉转化产物。

1.2.3 HPLC 分析

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm×4.6 mm), 柱温 25 °C, 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mL/min; 样品用 0.45 μm 的滤膜过滤, 进样量为 20 μL; 流动相为水/乙腈, 梯度洗脱条件为: 0~8 min, 20% (体积分数, 下同) 乙腈; 8~20 min, 20%~35% 乙

腈; 20~35 min, 35%~70% 乙腈; 35~40 min, 70% 乙腈; 40~50 min, 70%~100% 乙腈; 50~60 min, 100% 乙腈; 60~70 min, 100%~20% 乙腈。

1.2.4 对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的活力测定及其动力学研究

酶的活力测定及效应物对酶活力抑制作用的研究参考文献 [14]。在 3 mL pH 6.8 的测活体系中 (含 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS), 0.5 mmol/L L-DOPA 底物), 加入 100 μL 含不同浓度效应物的二甲亚砜 (DMSO) 溶液, 加入终质量浓度为 3.33 μg/mL 的蘑菇酪氨酸酶。以 DMSO 为空白对照, 测定波长为 475 nm 处的吸光度 (OD) 随时间的变化, 从直线的斜率求得酶活力, 按产物消光系数 ϵ 为 3 700 L/(mol·cm) 进行计算。以酶的相对剩余活力对效应物浓度作图, 求得效应物的半抑制质量浓度 (IC_{50}), 改变加入的酶量和效应物浓度, 得到一组相对剩余活力随酶量变化的相关曲线, 判断效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制作用机理, 改变底物和效应物浓度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断效应物对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型, 求出抑制常数 K_I 和 K_{IS} 。

1.2.5 MTT 法测定抗肝癌活性

将不同质量浓度 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 μg/mL) 的效应物作用于肝癌细胞 72 h 后, MTT 法测定效应物对肝癌细胞增殖抑制作用。取对数生长期细胞 0.25% (质量分数) 胰酶消化, 按 5×10^4 mL⁻¹ 的细胞浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 置于 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 24 h 后, 吸去细胞培养液; 分别加入 100 μL 的 DMSO (对照组) 和含效应物的样品液 (给药组), 每组 3 个重复, 共培养 72 h 后吸去培养液; 每孔加入 200 μL 0.5 mg/mL MTT, 再孵育 4 h, 吸去上清液, 加入 200 μL DMSO 振荡 10 min, 在酶标仪上测量 570 nm 处 OD。细胞抑制率 = $(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{给药组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 对 DNA 氧化性损伤的保护作用测定

在离心管中加入不同浓度的效应物 2 μL, 再依次加入 0.5 μL pBKS 载体、3 μL PBS (pH 7.4, 50 mmol/L)、3 μL 2 mmol/L FeSO₄, 最后再加入 4 μL 30% (体积分数) H₂O₂, 然后在 37 °C 下孵育 30 min, 孵育后立即点样电泳。0.8% (质量分数) 琼脂糖凝胶以 TAE 电泳缓冲液 (40 mmol/L Tris, 20 mmol/L 乙酸钠, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)) 配制, 电泳 1.5 h, 1 μg/mL 溴化吡啶染色 30 min, 于凝胶成像系统中观察拍照。

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析结果

利用 HPLC 对比分析绞股蓝皂苷底物和灰绿曲霉转化产物成分差异。对比图 1(a) 和 (b) 可知: 灰绿曲霉转化产物比转化前的绞股蓝皂苷色谱峰数量增多, 产生的色谱峰保留时间也较长, 说明经灰绿曲霉转化后产物中产生新的极性低的皂苷衍生物。转化前后成分发生明显变化。该结果表明灰绿曲霉对绞股蓝皂苷具有很强的生物转化能力, 微生物利用自身分泌的丰富酶系修饰绞股蓝皂苷侧链结构基团, 将皂苷底物转化生成丰富的次生代谢产物。

2.2 对肝癌细胞 SMMC7721 体外抑制作用

利用 MTT 法测定不同质量浓度的绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物作用 72 h 后, 对肝癌细胞 SMMC7721 的体外抑制作用。从图 2 可以看出: 绞股蓝皂苷对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制作用很弱, 在质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞的抑制率仅达 14.89%; 灰绿曲霉转化产物对肝癌细胞 SMMC7721 有较强的体外抑制作用, 且抑制作用具有浓度依赖性, 随质量浓度增大抑制率增强, IC_{50} 为 91.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明绞股蓝皂苷经灰绿曲霉转化后, 转化产物对肝癌细胞 SMMC7721 具有更强的抑制作用, 转化后产生具有抗癌活性的皂苷衍生物。

2.3 对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用和作用机理

利用 *L*-DOPA 速率氧化法测定绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用。结果如图 3(a) 和 (b) 所示: 绞股蓝皂苷在 0~0.667 mg/mL 的质量浓度范围内对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性具有较强

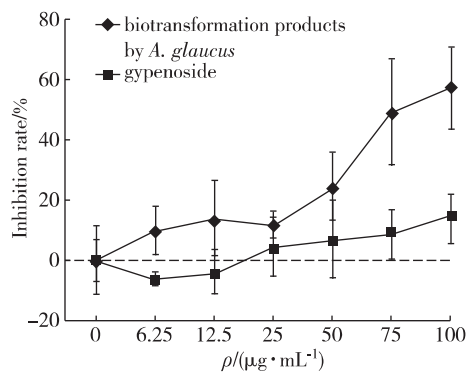


图2 效应物对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制作用
Fig. 2 Inhibition effect of effector on the growth of hepatocellular carcinoma cells SMMC7721

的抑制作用, 其 IC_{50} 为 0.14 mg/mL , 而在该质量浓度范围内灰绿曲霉转化产物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性抑制较弱, 最大质量浓度下其抑制率不超过 50%, 绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶抑制活性强于灰绿曲霉转化产物。该结果表明微生物修饰绞股蓝皂苷侧链糖基, 修饰后皂苷糖基数量减少, 影响皂苷与蘑菇酪氨酸酶结合, 从而导致对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用减弱。

为探讨绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用机理, 固定酶底物 *L*-DOPA 浓度, 改变加入的蘑菇酪氨酸酶的酶量, 测定在不同浓度的绞股蓝皂苷下, 对蘑菇酪氨酸酶催化 *L*-DOPA 氧化的活力。以酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线如图 3(c) 所示。随着绞股蓝皂苷浓度的增大, 直线斜率降低, 说明绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用属于可逆抑制。在测活体系中, 固定加入的蘑菇酪氨酸酶的浓度, 通过改变底物 *L*-DOPA 的浓度, 测定不同浓度的效应物对蘑菇酪氨酸酶的催化活力的影响。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 取 $1/v$ 对 $1/\rho_s$ 作图, 得到一组相交于第二

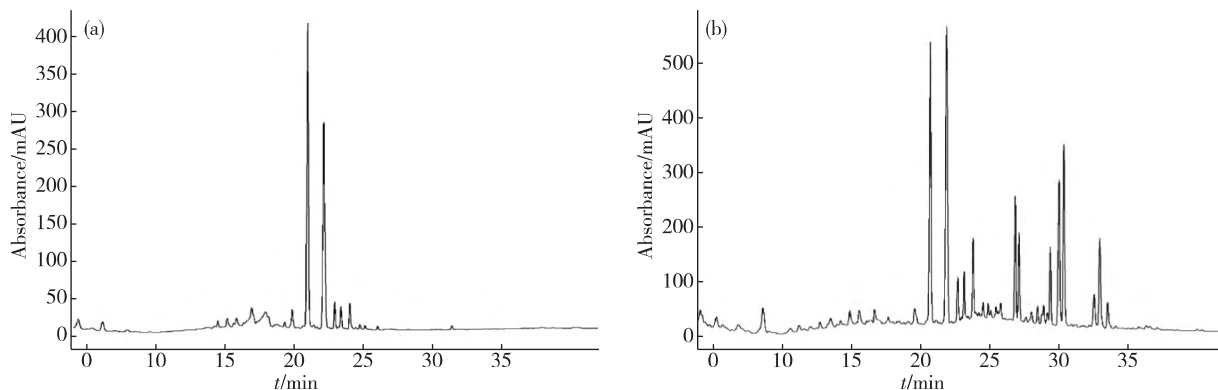


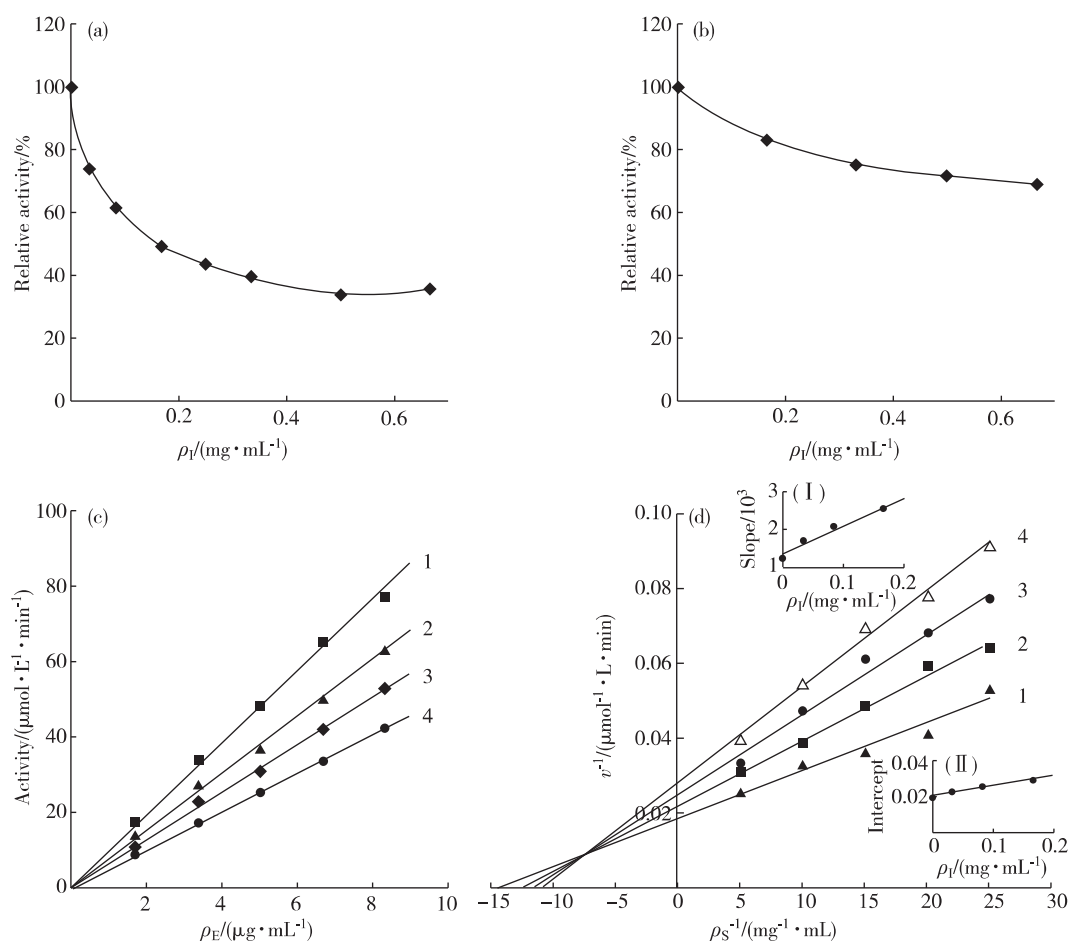
图1 绞股蓝皂苷(a)和灰绿曲霉转化产物(b)的HPLC谱图
Fig. 1 HPLC chromatography of gypenoside (a) and biotransformation products by *A. glaucus* (b)

象限的直线如图 3(d) 所示,米氏常数(K_m) 随效应物浓度的增大而变大,酶促反应的最大速度(V_m) 则随效应物浓度的增大而下降,因此判定绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶的抑制类型属于混合型抑制.二次作图以双倒数的斜率(插图(I)) 和纵轴截距(插图(II)) 对效应物浓度作图,分别计算得出绞股蓝皂苷对游离酶的抑制常数(K_i) 为 0.192 mg/mL 和对酶-底物络合物的抑制常数(K_{is}) 为 0.364 mg/mL. K_{is} 大于 K_i 说明其对酶-底物络合物的紧密程度要高于对游离酶的结合程度.

2.4 对 DNA 氧化性损伤的保护作用

以 pBKS DNA 作为 DNA 模板,利用 H_2O_2 在反应体系中产生羟自由基等方式作用 DNA 链.检测绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物对 DNA 氧化断裂的保护作用.结果如图 4 所示:未处理的 pBKS DNA 主要以超螺旋状(如泳道 5 的下部条带) 和开环状(如泳道 5 的上

部条带) 存在.经氧化损伤后转化为线状(如泳道 4 的中部条带) 和开环状(如泳道 4 的上部条带).加入抗氧化剂可以阻止或减少超螺旋的氧化断裂.随抗氧化剂浓度增大,超螺旋状 DNA 逐渐增多,保护作用不断增强.抗氧化剂活性足够强时,可完全保护 DNA 损伤.绞股蓝皂苷为 0.2 mg/mL 时对 DNA 氧化损伤表现出保护作用;为 2 mg/mL 时即可对 DNA 有明显保护作用,超螺旋条带明显增加;为 20 mg/mL 时基本完全保护 DNA 氧化损伤.灰绿曲霉转化产物为 2 mg/mL 时对 DNA 氧化损伤有保护作用,为 20 mg/mL 时基本完全保护 DNA 氧化损伤作用.这表明绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物对 DNA 氧化损伤有保护作用,但转化底物绞股蓝皂苷比灰绿曲霉转化产物保护作用更强.



(a) 绞股蓝皂苷; (b) 灰绿曲霉转化产物; (c) 绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制机理; (d) 绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制类型和抑制常数的测定; 图中直线 1~4 对应的绞股蓝皂苷质量浓度分别为 0, 0.033, 0.083, 0.167 mg/mL.

图 3 绞股蓝皂苷对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用和动力学机理

Fig. 3 The inhibitory effect and kinetic mechanism of gypenoside on mushroom tyrosinase

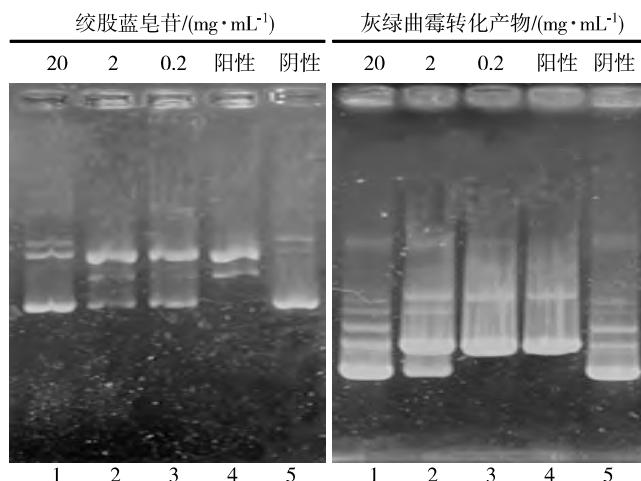


图4 绞股蓝皂苷和灰绿曲霉转化产物对 H₂O₂ 诱导的 pBKS DNA 氧化损伤的保护作用
Fig. 4 Protective effect of gypenoside and biotransformation products by *A. glaucus* against H₂O₂ induced pBKS DNA damage

3 讨论

药代动力学研究证明, 苷类成分在肠道内难以吸收, 生物利用度低, 肠内滞留时间较长, 在人体内难以直接发挥药效, 它们需通过肠内微生物转化或代谢为苷元发挥药效。1992年 Kobashi 等^[15] 研究提出植物苷一般只起前体药物的作用, 只有当植物皂苷经过肠道细菌的去糖基化作用后, 才最终代谢成为有活性的物质。

微生物转化法能有效地改变皂苷的糖链结构, 提高其生理活性。早期所用的微生物主要是肠道厌氧菌, 但肠道厌氧菌培养条件苛刻、培养基成本高, 目前多数采用药食兼用真菌或从植物根系土壤获取的共生菌。对含皂苷材料的微生物转化研究主要以原材料的总皂苷或单体皂苷为转化底物, 转化后原材料中低糖链皂苷含量提高, 或者产生植物本身不含有的新皂苷, 该领域研究最多的是人参皂苷。Chen 等^[16] 用伞枝犁头霉 (*Absidia corymbifera*) AS 3. 3387 转化原人参二醇, 得到 5 个代谢产物, 其中 7 β -羟基-20(S)-人参三醇和 7-氧-20(S)-人参三醇为新化合物, 并显示出对前列腺癌细胞 DU-145 和 PC-3 更强的抑制作用。Gao 等^[17] 从土壤中分离到一株真菌 *P. oxalicum* sp.68, 能将原人参二醇皂苷转化成系列活性代谢产物。从其发酵液中分离到 β -葡萄糖苷酶, 将人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc 和 Rd 转化为活性更高的人参皂苷化合物-K, Rb1 转化成化合物-K, 最高产量可达 87. 7%。本研究在前期稀有人参

皂苷 IH901 酶法转化^[18] 和绞股蓝真菌转化^[12] 研究基础上, 利用灰绿曲霉对绞股蓝皂苷微生物转化, 探讨转化产物与原绞股蓝皂苷生物活性变化情况, 为绞股蓝皂苷结构改造从中筛选有效成分提供途径。

灰绿曲霉与绞股蓝皂苷共培养后, 通过对比转化前后 HPLC 谱图, 表明转化产物中产生与原绞股蓝皂苷完全不同的次生代谢产物。利用微生物发酵法转化含苷类物质的中药是模仿人体肠道菌微生物转化苷的过程。微生物降解苷类物质生成的糖可作为营养物质进行自我繁殖, 微生物以苷类物质的降解糖为碳源, 诱导产生出用于分解该种苷类的酶。微生物在发酵过程中可以分泌几十种胞外酶, 这些丰富而强大的酶系是使共培养的中药发生化学反应的物质基础, 分泌的酶系可将中药成分分解转化形成新成分。生物活性测定表明灰绿曲霉转化产物比原绞股蓝皂苷对肝癌细胞 SMMC7721 具有更强的抑制作用, 但对蘑菇酪氨酸酶抑制作用和 DNA 氧化损伤保护作用比原绞股蓝皂苷弱。皂苷的药效作用与其侧链糖基有直接关系, 结构中不同的侧链糖基和糖基数量都有不同的药理活性。一般来说皂苷侧链糖基少的低糖链皂苷及苷元比侧链糖基多的细胞毒性活性强^[19]。综上所述, 灰绿曲霉对绞股蓝皂苷微生物转化, 产生具有抗癌作用的有效成分。对绞股蓝皂苷的微生物转化条件如样品加入量、发酵时间、pH 值和温度等参数进行优化, 从而提高转化效率和产物产量; 对转化产物活性物质跟踪分离纯化, 明确转化产物的化学结构, 以及对绞股蓝皂苷转化途径研究是今后的研究方向。

参考文献:

- [1] RAZMOVSKI-NAUMOVSKI V, HUANG T H W, TRAN V H, et al. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Phytochemistry Review*, 2005, 4 (2/3): 197-219.
- [2] JI H K, YONG N H. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(11/12): 1453-1459.
- [3] LU K W, TSAI M L, CHEN J C, et al. Gypenosides inhibited invasion and migration of human tongue cancer SCC4 cells through down-regulation of NF- κ B and matrix metalloproteinase-9 [J]. *Anticancer Research*, 2008, 28 (2A): 1093-1099.
- [4] YEO J, KANG Y J, JEON S M, et al. Potential hypoglycemic effect of an ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2008, 11(4): 709-716.

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

- [5] 陈几香, 张建国, 张莉, 等. 绞股蓝总皂苷保肝作用实验研究[J]. 中国药业, 2007, 16(13): 7-8.
- [6] 刘国辉, 姚丹丹, 卢佳怡, 等. 绞股蓝对D-半乳糖所致亚急性衰老大鼠下丘脑的抗衰老作用及其机制研究[J]. 医学理论与实践, 2006, 19(5): 497-499.
- [7] KO S R, CHOI K J, SUZUKI K, et al. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg2, Rh1, and F1 [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51(4): 404-408.
- [8] CHI H, KIM D H, JI G E. Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(11): 2102-2105.
- [9] ZHOU W, YAN Q, LI J Y, et al. Biotransformation of *Panax notoginseng* saponins into ginsenoside compound K production by *Paecilomyces bainier* sp.229 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(3): 699-706.
- [10] 何晨, 霍蕾, 王建芳, 等. 甘草的微生物转化[J]. 天然产物分离, 2005, 3(6): 1-4.
- [11] 朴香兰, 刘慧敏, 乌日图. 保加利亚乳杆菌对绞股蓝成分的转化[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 149-153.
- [12] 陈良华, 郑志忠, 明艳林, 等. 福建绞股蓝真菌转化及其产物抗癌活性研究[J]. 亚热带植物科学, 2014, 43(3): 192-196.
- [13] 张慧丽, 宋有涛, 辛如, 等. 超声提取绞股蓝总皂苷及抗氧化作用的研究[J]. 辽宁大学学报, 2006, 33(4): 346-348.
- [14] 陈良华, 刘轩, 明艳林, 等. 叶下珠提取物对酪氨酸酶的抑制和抗氧化作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2012, 51(3): 410-414.
- [15] KOBASHI K, AKAO T. Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides [J]. Bioscience Microflora, 1997, 16: 1-7.
- [16] CHEN G T, YANG M, NONG S J, et al. Microbial transformation of 20-(S)-protopanaxadiol by *Absidia corymbifera*. Cytotoxic activity of the metabolites against human prostate cancer cells [J]. Fitoterapia, 2013, 84(9): 6-10.
- [17] GAO J, XU W J, FANG Q, et al. Efficient biotransformation for preparation of pharmaceutically active ginsenoside compound K by *Penicillium oxalicum* sp.68 [J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 139-149.
- [18] 童庆宣, 陈良华, 明艳林, 等. 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.
- [19] LIU J H, YU B Y. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds [J]. Current Organic Chemistry, 2010, 14(14): 1400-1406.

Microbial Transformation of Gypenoside from *Gynostemma pentaphyllum* by *Aspergillus glaucus* and Its Biological Activities

CHEN Lianghua¹, WENG Mengting², QIN Jiang²,
SHEN Ruichi¹, CHEN Qingxi², MING Yanlin^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Fujian Province for Physiology and Biochemistry of Subtropical Plant, Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 3. Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

Abstract: *Gynostemma pentaphyllum* in Fujian Province was used as the material in this research. Gypenoside was extracted with ethanol and *n*-butyl alcohol. Gypenoside was microbially transformed by *Aspergillus glaucus*. The abilities of anticancer, anti-tyrosinase and anti-oxidation in gypenoside and transformation products were measured in our study. The difference of bioactivity between gypenoside and microbially transformed gypenoside was compared. The result showed that the products of transformation by *A. glaucus* affected the growth of hepatocellular carcinoma cells SMMC7721 with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 91.66 $\mu\text{g/mL}$, but the anticancer activity of gypenoside was very weak. Gypenoside had strong inhibition to the mushroom tyrosinase. The value of IC_{50} was 0.14 mg/mL. Moreover, the products of transformation by *A. glaucus* showed little anti-tyrosinase activity. The kinesis study showed that the inhibition of gypenoside to mushroom tyrosinase was reversible and inhibition types were mixed. Gypenoside exhibited the active protective effect on H_2O_2 -induced oxidative-stress damage at the concentration of 0.2 mg/mL, and the products of transformation by *A. glaucus* were at 2 mg/mL. This research indicated that the anticancer effect of gypenoside modified by microorganisms was enhanced, but the activity of anti-tyrosinase and H_2O_2 -induced oxidative-stress damage became weakened. This study laid the foundation of screening anticancer gypenoside by means of microbial transformation.

Key words: Fujian *Gynostemma pentaphyllum*; microbial transformation; tyrosinase inhibition; anticancer; antioxidant

<http://jxmu.xmu.edu.cn>