

## 研究报告

# 柔毛淫羊藿黄酮类成分转化菌株的筛选及其对朝藿定 C 的生物转化作用

冯一帆<sup>1</sup>, 郑仁林<sup>1,2</sup>, 唐志康<sup>1,2</sup>, 陈平<sup>1,2</sup>, 张德全<sup>1,2</sup>, 袁小红<sup>1,2\*</sup>

1 西南科技大学 生命科学与农林学院, 四川 绵阳 621010

2 阿坝州西科道地中药材产业技术创新中心, 四川 阿坝州 623000

冯一帆, 郑仁林, 唐志康, 陈平, 张德全, 袁小红. 柔毛淫羊藿黄酮类成分转化菌株的筛选及其对朝藿定 C 的生物转化作用[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 115-133.

FENG Yifan, ZHENG Renlin, TANG Zhikang, CHEN Ping, ZHANG Dequan, YUAN Xiaohong. Screening of a strain for biotransformation of flavonoids in *Epimedium pubescens* and evaluation of its biotransformation effect on epimedin C[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 115-133.

**摘要:** 【背景】柔毛淫羊藿(*Epimedium pubescens* Maxim.)是传统药用植物, 其药用成分主要为黄酮类化合物。部分黄酮类成分因糖基化程度较高导致生物利用度受限。生物转化技术可定向制备低糖基黄酮, 是提升活性成分成药性的潜在策略。【目的】筛选高效转化朝藿定 C 生成淫羊藿苷的功能菌株, 解析其关键酶系特性, 并通过微生物驯化提升底物耐受性及转化效率。【方法】采用生境特异性采样策略, 从淫羊藿根际土壤和叶际微生物群落中筛选菌株。通过薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)-HPLC 联用技术建立转化产物监测体系; 结合 16S rRNA 基因系统发育分析和糖苷酶活性解析, 鉴定功能菌株分类地位及其功能酶类。采用单因素试验优化粗酶反应体系(温度、pH、底物浓度、酶活力浓度); 以梯度胁迫法(0.01–0.12 g/mL 水提液)进行六轮定向驯化, 评估菌株适应性进化效果。【结果】分离获得芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) MY202402-3, 其粗酶液中  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(18.7 U/mL)与  $\beta$ -葡萄糖苷酶(3.3 U/mL)活性显著; 在含 0.01 g/mL 水提液的培养基中, 朝藿定 C 平均转化率与宝藿苷 I 平均生成率分别为 88.10%与 21.13%。粗酶最适反应条件为 50 °C、pH 7.5、底物浓度 1.2 mg/mL、酶活 10 U/mL, 2 h 内朝藿定 C 转化率达 95.20%, 淫羊藿苷纯度 96.78%。经浓度梯度驯化后, 菌株在 0.10 g/mL 水提液中朝藿定 C 转化率提升至 90.93%, 0.08 g/mL 体系中宝藿苷 I 生成率达 26.96%。【结论】本研究采用的微生物筛选与驯化相结合的策略显著提高了朝藿定 C 的生物转化效率, 为提升中药提取物中活性成分的生物利用度提供了参考; 浓度依赖性优化

资助项目: 四川省科学技术厅重点研发计划(24ZDYF1657); 绵阳科技城人才计划引才项目(202401004)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Science and Technology Department of Sichuan Province (24ZDYF1657) and the Talent Recruitment Foundation of Mianyang Science and Technology City Talent Program (202401004).

\*Corresponding author. E-mail: 419225263@qq.com

Received: 2025-05-19; Accepted: 2025-06-13; Published online: 2025-07-04

进一步展示了其在工业应用中的可扩展潜力；菌株 MY202402-3 是芽孢杆菌属被报道用于淫羊藿黄酮类成分转化的菌株，扩大了芽孢杆菌属的应用。

关键词：生物转化；微生物；朝藿定 C；淫羊藿苷；宝藿苷I；高效液相色谱法

## Screening of a strain for biotransformation of flavonoids in *Epimedium pubescens* and evaluation of its biotransformation effect on epimedin C

FENG Yifan<sup>1</sup>, ZHENG Renlin<sup>1,2</sup>, TANG Zhikang<sup>1,2</sup>, CHEN Ping<sup>1,2</sup>, ZHANG Dequan<sup>1,2</sup>, YUAN Xiaohong<sup>1,2\*</sup>

1 College of Life Sciences and Agri-forestry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

2 Aba-SWUST Industrial Technology Innovation Center of Genuine Medicinal Materials, Aba 623000, Sichuan, China

**Abstract:** **[Background]** *Epimedium pubescens* Maxim., a traditional medicinal plant, contains flavonoids as its primary bioactive constituents. The bioavailability of certain highly glycosylated flavonoids is limited due to high glycosylation. Biotransformation enables directional preparation of low-glycosylated flavonoids, representing a potential strategy to enhance the druggability of active components. **[Objective]** To screen functional strains capable of efficiently converting epimedin C to icariin, characterize their key enzyme systems, and improve substrate tolerance/conversion efficiency through microbial domestication. **[Methods]** We isolated strains from the rhizosphere microbiota and the phyllosphere microbiota of *Epimedium* by habitat-specific sampling. A thin layer chromatography (TLC)-HPLC system was established for the monitoring of transformation products. The phylogenetic analysis (16S rRNA gene) and glycosidase activity profiling were employed to identify the strain and functional enzymes, respectively. Single-factor experiments were conducted to optimize the crude enzyme reaction parameters (temperature, pH, substrate concentration, and enzyme activity). Six rounds of gradient stress domestication (0.01–0.12 g/mL aqueous extract of *Epimedium*) were implemented to evaluate the adaptive evolution of the strain. **[Results]** *Bacillus* sp. MY202402-3 was isolated, with its crude enzymes demonstrating notable  $\alpha$ -L-rhamnosidase (18.7 U/mL) and  $\beta$ -glucosidase (3.3 U/mL) activities. In the medium containing 0.01 g/mL aqueous extract, the average epimedin C conversion rate and the average baohuoside I yield reached 88.10% and 21.13%, respectively. The optimal reaction conditions of the crude enzyme were 50 °C, pH 7.5, 1.2 mg/mL substrate, and 10 U/mL enzyme, under which the epimedin C conversion rate and the icariin purity reached 95.20% and 96.78%, respectively, within 2 h. Post-domestication, the conversion rate improved to 90.93% in the medium containing 0.10 g/mL aqueous extract, and the baohuoside I yield reached 26.96% in the system containing 0.08 g/mL aqueous extract of *Epimedium*. **[Conclusion]** The integrated microbial screening-domestication strategy significantly enhances epimedin C biotransformation efficiency, providing insights for improving the bioavailability of herbal extracts. Concentration-dependent optimization

demonstrates scalable industrial potential. As the *Bacillus* strain reported for *Epimedium* flavonoid transformation, MY202402-3 expands the application scope of *Bacillus*.

**Keywords:** biotransformation; microorganisms; epimedin C; icariin; baohuoside I; HPLC

药材淫羊藿为传统补益类中药，其性味辛甘温，走肝肾二经。据参考文献[1]记载，淫羊藿为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornu* Maxim.)、箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* Maxim.)、柔毛淫羊藿(*Epimedium pubescens* Maxim.)或朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai.)的干燥叶，主要含有黄酮、多糖等生物活性成分<sup>[2]</sup>。

现代药理学研究表明，淫羊藿总黄酮具有多系统调节作用，包括改善心血管功能、增强免疫应答、调节内分泌平衡、促进生殖健康及调控骨代谢活性<sup>[3]</sup>。同时，淫羊藿还有抗肿瘤等药理活性<sup>[4]</sup>，其活性成分主要集中在 C-8 位含有异戊烯基取代的黄酮类化合物<sup>[5]</sup>。淫羊藿代表性成分为淫羊藿苷，其对生殖系统、神经系统等有一定作用，用于治疗多种疾病<sup>[6]</sup>；此外，宝藿苷I有抗肿瘤、改善认知功能障碍、脑缺血再灌注损伤保护、神经保护等药理作用<sup>[7]</sup>。淫羊藿糖基取代呈现规律性特征：R<sub>1</sub> 位点主要连接单糖基团，以鼠李糖和葡萄糖最为常见；R<sub>2</sub> 位点则倾向形成二糖结构(图 1)，其中鼠李糖占据核心位置，其余糖基的取代频率依次为葡萄糖、木糖和半乳糖。

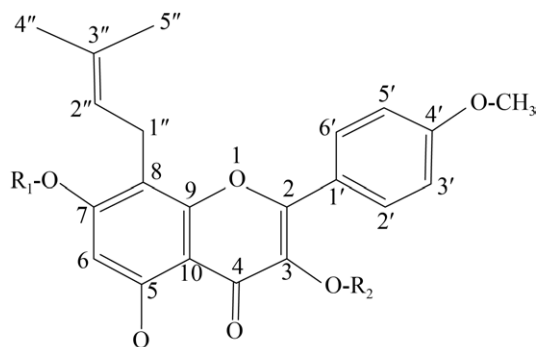


图 1 淫羊藿黄酮类骨架结构

Figure 1 *Epimedium* flavonoids skeleton structure.

近年来，天然产物转化策略主要包括化学水解<sup>[8]</sup>、酶解法<sup>[9]</sup>及微生物转化<sup>[10]</sup>三类。化学水解虽反应速率快，但存在条件剧烈(高温、强酸/碱)、选择性差(糖苷键非特异性断裂)及环境污染等问题；酶解法虽特异性高，却面临酶源有限、稳定性差及成本高昂的瓶颈。相比之下，微生物转化技术因兼具环境友好性(常温常压、无有毒试剂)、底物广谱性(利用菌株内多酶协同作用)及工艺经济性(菌体可重复利用)，逐渐成为天然产物转化的研究热点。如何通过绿色高效的技术手段将淫羊藿中多糖基黄酮类成分转化为低糖基黄酮类成分，已成为提升其临床应用价值的关键科学问题。微生物转化法能温和、高效地制备低糖基淫羊藿黄酮类成分(产物得率高、副产物少)，兼具环境友好和低能耗优势，对提升该类成分的生物利用度及工业化生产具有重要潜力<sup>[10-13]</sup>。

目前已有研究报道，利用真菌子囊霉(*Hormoconis resiniae*)和角孢拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana* var. *angulispora*)对淫羊藿苷进行生物转化，分别以 98%和 92%的产率得到淫羊藿次苷 II 和淫羊藿苷元<sup>[14]</sup>，但多数生物转化需依赖复杂的分离酶<sup>[15]</sup>或基因工程<sup>[16]</sup>改造。主要的淫羊藿黄酮类成分的微生物转化途径及产物见图 2。此外，传统工艺多采用“提取-纯化-转化”分步操作，导致流程冗长、物料损耗，严重制约了其工业化应用。

本研究以淫羊藿提取液为基础制备选择培养基，对比不同生境土壤及叶片样品中微生物转化朝藿定 C 的能力，并筛选优势生境中的目标微生物，通过平板筛选法分离目标菌株，在选择培养基中培养，利用薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)定性结合 HPLC 定量分析朝藿定 C 的转化效率。分离菌液中的关键酶，构建酶催化体系验证其转化能力，优化反应温

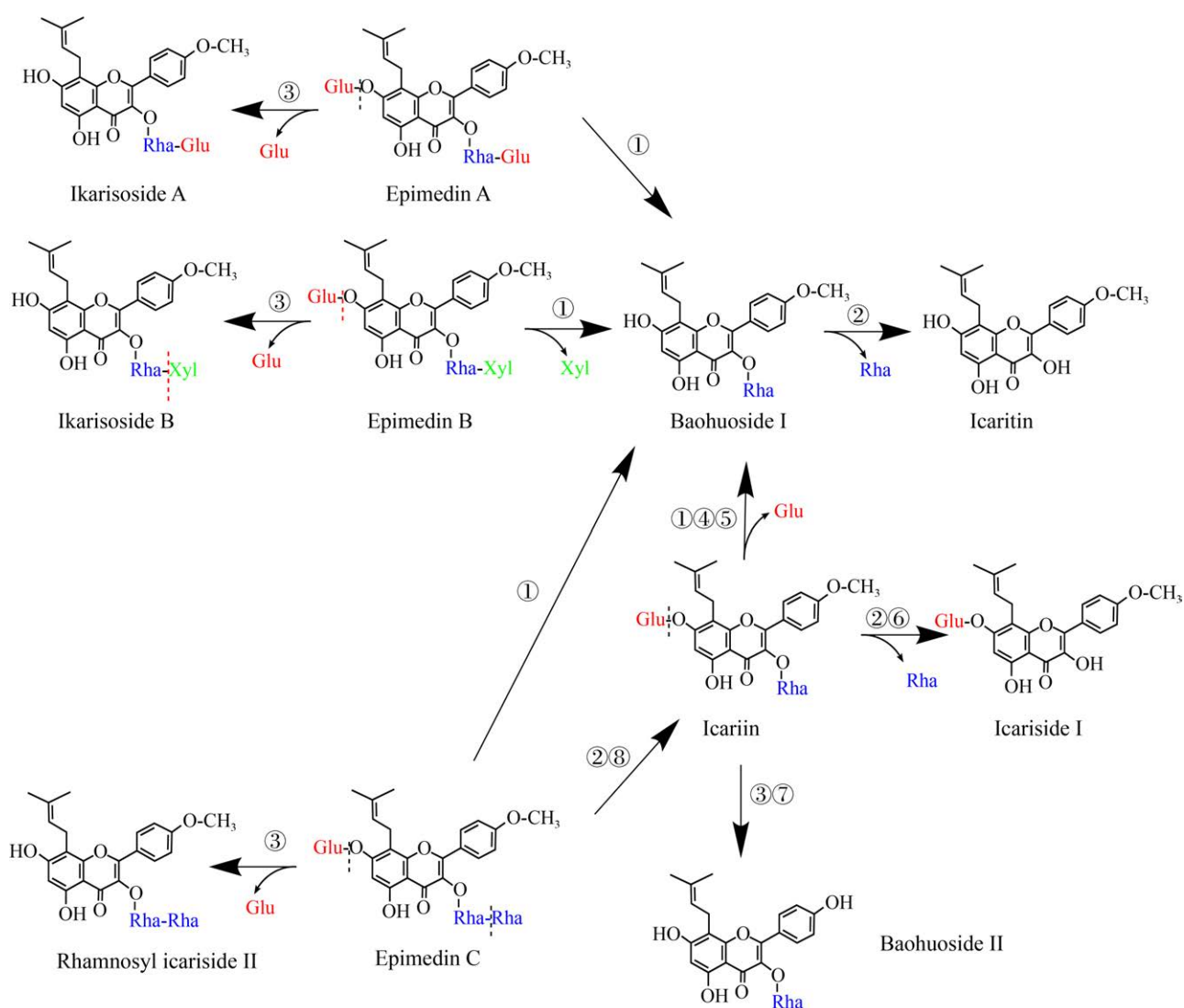


图 2 淫羊藿黄酮类成分的微生物转化途径及产物 ①: 小鼠肠道菌、肠道酶<sup>[17]</sup>; ②: 嗜热网球菌 DSM3960<sup>[15]</sup>; ③: 短刺小克银汉霉菌<sup>[18]</sup>; ④: 链球菌 MRG-ICA-B、肠球菌 MRG-ICA-E、布劳特氏菌 MRG-PMF-1<sup>[19]</sup>; ⑤: 绿色木霉<sup>[20]</sup>; ⑥: 柱孢梨头霉菌 E9r<sup>[21]</sup>; ⑦: 平菇发酵液<sup>[22]</sup>; ⑧: 甘草桑树细胞悬浮液<sup>[23]</sup>。Glu: 葡萄糖; Rha: 鼠李糖; Xyl: 木糖。

Figure 2 Microbial transformation pathways and products of *Epimedium* flavonoids. ①: Mouse intestinal bacteria and enzymes<sup>[17]</sup>; ②: *Thermophilum pendens* DSM3960<sup>[15]</sup>; ③: *Cunninghamella blakesleeana*<sup>[18]</sup>; ④: *Streptococcus* sp. MRG-ICA-B, *Enterococcus* sp. MRG-ICA-E, and *Blautia* sp. MRG-PMF-1<sup>[19]</sup>; ⑤: *Trichoderma viride*<sup>[20]</sup>; ⑥: *Absidia* sp. E9r<sup>[21]</sup>; ⑦: *Pleurotus ostreatus*<sup>[22]</sup>; ⑧: *Glycyrrhiza* and *Morus alba* cell suspensions<sup>[23]</sup>. Glu: Glucose; Rha: Rhamnose; Xyl: Xylose.

度、pH、酶活力浓度、底物浓度, 通过 HPLC 监测转化率, 并验证确定转化率和产物纯度; 优化转化朝藿定 C 菌株的培养条件。预期可为

淫羊藿资源的高值化开发提供理论支撑与技术范例, 对推动中药现代化与国际化进程具有重要科学意义与应用前景。

# 1 材料与方 法

## 1.1 样 品

柔毛淫羊藿药材于 2024 年采自西南科技大学淫羊藿种植基地,经唐志康教授鉴定为小檗科淫羊藿属植物柔毛淫羊藿(*Epimedium pubescens*)的叶。

2024 年 2 月在四川省 3 个典型区域采集土壤及腐叶样品。人工种植区:绵阳市西南科技大学淫羊藿种植基地(104°41'41.06"E, 31°32'29.22"N, 海拔 495 m),避开施肥区采集种植区及周边腐叶。自然分布区:成都市青城山后山(103°28'46.33"E, 30°54'59.47"N, 海拔 930 m),采集青城山淫羊藿(*Epimedium qingchengshanense*)植株周边腐叶。对照区:绵阳市千佛山林地(104°14'31.20"E, 31°44'34.22"N, 海拔 2 219 m),采集无淫羊藿分布的腐叶。

采样方法:采用五点取样法采集表层土壤(0–20 cm)和地表腐殖层落叶(每点 200 g),土壤混合后四分法缩分至 500 g。所有样品无菌包装,标注采样信息后 4 °C 暂存,24 h 内转移至 –80 °C 保存。

阳性对照菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LP-202301 由西南科技大学生命科学与农林学院提供。该革兰氏阳性杆菌保藏于 MRS 斜面培养基,实验前经 MRS 液体培养基 37 °C 厌氧活化 48 h。

## 1.2 培 养 基

MRS 肉汤、MRS 琼脂、牛肉膏蛋白胨培养基(beef extract peptone medium, BPM)、马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)和马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;选择性培养基(g/L):蛋白胨 1.0–5.0, 酵母提取物 0.5–2.0,  $K_2HPO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $CaCl_2$  0.01,  $FeSO_4$  0.001, 鼠李糖 0.01–0.1, 以 0.01 g/mL 淫羊藿水提液配制(pH 自然)。

所有培养基经 121 °C 灭菌 20 min, 灭菌后

经 HPLC 验证淫羊藿水提液中 5 种黄酮类成分(朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I)含量无显著变化( $P>0.05$ )。

## 1.3 主要试剂和仪器

朝藿定 A 对照品、朝藿定 B 对照品、朝藿定 C 对照品、淫羊藿苷对照品和宝藿苷 I 对照品,成都曼思特生物科技有限公司;对硝基苯基- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, pNPR),南京都莱生物技术有限公司;4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG)、对硝基苯酚(p-nitrophenol, pNP),上海源叶生物科技有限公司;乙腈,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;乙酸乙酯、甲醇和乙醇,成都市科隆化学品有限公司;0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.3),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

高效液相色谱仪和 C18 色谱柱,安捷伦科技(中国)有限公司;超声波清洗器,昆山禾创超声有限公司;全自动高压灭菌锅, Tomy Digital Biology 公司;三用紫外分析仪,上海宝山顾村电光仪器厂;旋转蒸发器,广州市授科仪器科技有限公司;紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;酶标分析仪,南京德铁生物技术有限公司。

## 1.4 HPLC 法测定淫羊藿黄酮类成分的含量

色谱柱: Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈(A)-纯水(B)梯度洗脱(0–15 min, 乙腈 10%–25%; 15–35 min, 乙腈 25%; 35–60 min, 乙腈 25%–71%); 流速 1.0 mL/min; 柱温为室温; 进样量 10  $\mu$ L; 检测波长 270 nm。

对照品溶液制备: 分别精密称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,得到对照品溶液。分别吸取 200  $\mu$ L 并混合均匀,过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,即得混合对照品溶液。

菌液供试品溶液制备: 取 5.0 mL 实验菌液,

加稀乙醇溶解后转移至 10 mL 容量瓶, 定容至刻度, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤即得供试品溶液。

叶片供试品溶液制备: 取淫羊藿干燥叶片, 去杂洗净, 60  $^{\circ}\text{C}$  烘干粉碎, 过三号筛。精密称取 0.2 g 粉末置 50 mL 具塞锥形瓶, 加 20 mL 稀乙醇, 密封称重。40  $^{\circ}\text{C}$  超声 1 h (功率 400 W, 频率 50 kHz), 冷却至室温后称重, 失重用稀乙醇补足, 摇匀经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤即得。

水提液供试品溶液的制备: 精密称取同一批次粉碎的 5.0 g 粉末, 按 1:15 的固液比, 95  $^{\circ}\text{C}$  条件下水浴回流提取 1.5 h, 冷却抽滤, 即得提取液, 提取 3 次, 记录提取液体体积, 调整浓度至 0.01 g/mL 即得。

## 1.5 转化朝藿定 C 和淫羊藿苷微生物筛选

### 1.5.1 菌悬液制备

准确称取 1.0 g 土壤样品, 过 10 目筛去除杂质; 叶片样品剪成 1 cm $\times$ 1 cm 组织块。将样品与 2 颗 5 mm 灭菌玻璃珠共同置于 250 mL 灭菌锥形瓶中, 加入 9 mL 预冷(4  $^{\circ}\text{C}$ )的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.3)。先于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 40 kHz 超声处理 15 min, 再于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡 1 h, 使微生物脱离表面。静置沉淀后取上清作为菌悬液。另设等量 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.3)作为空白对照。植物乳杆菌悬液浓度通过  $OD_{600}$  标定, 使其与其余菌悬液光密度值一致。

### 1.5.2 不同生境菌群对朝藿定 C 和宝藿苷 I 的影响

以青城山原生境土壤、叶片样品(实验组 A)和淫羊藿人工栽培土壤、叶片样品(实验组 B)为研究对象, 制备菌悬液后, 初次按 10% 接种量接入选择培养基; 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 7 d 后, 取 10% 菌液转接至蛋白胨等成分梯度递减的选择培养基中, 每个梯度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 7 d; 如此重复, 待培养基蛋白胨等成分降至中间梯度时, 定时取样; 同步设置阳性对照(植物乳杆菌)和对照区组(千佛山生境样品)。用 HPLC 检测朝藿定 C 转化率和宝藿苷 I 生成量,

根据转化效率筛选最优生境用于复筛。

### 1.5.3 最优生境土壤和叶片微生物筛选富集培养

实验采用 2 种基础培养基(BPM 和 PDB), 分别与选择性培养基按照不同体积比进行混合配制。具体配比包括常规培养基组(BPM 或 PDB 与选择性培养基比例为 5:0)、水提液培养基组(BPM 或 PDB 与选择性培养基比例为 0:5), 以及两者之间的 4 种梯度混合比例的混合组(BPM 或 PDB 与选择性培养基比例为 4:1、3:2、2:3、1:4)。取最优生境菌群经中间梯度培养的菌液, 按 10% 接种量接种至 10 mL 筛选富集培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 7 d。随后梯度递减选择培养基中蛋白胨等至最低梯度, 每梯度取 10% 菌液转接培养 7 d, 获得优化培养基及终筛菌液。将终筛菌液梯度稀释( $10^{-5}$ – $10^{-7}$ )后, 取 100  $\mu\text{L}$  涂布于含 2% 琼脂的优化培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 计数。挑取优势菌落纯化、扩大培养后, 菌悬液与 30% 丙三醇等体积混合,  $-20^{\circ}\text{C}$  保藏。

### 1.6 菌株分离纯化、形态观察及 16S rRNA 基因测序与系统发育树的构建

取 500  $\mu\text{L}$  菌液加入 10 mL 优化选择培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养后采用 TLC 法定时分析转化情况(展开剂为乙酸乙酯:丁酮:甲醇:水=8:7:1:1, 体积比), 280 nm 紫外显色并与标品对比。根据 TLC 结果筛选出能将朝藿定 C 转化为淫羊藿苷及淫羊藿苷转化为宝藿苷 I 的菌株, 将其命名为 MY202402。利用光学显微镜观察菌体形态并拍照。真菌的鉴定参照文献[24]; 细菌的鉴定采用革兰氏染色法: (1) 将菌液涂布于载玻片, 干燥固定; (2) 结晶紫染色 1–2 min, 蒸馏水冲洗至无色; (3) 碘液覆盖 1 min, 水洗后 95% 乙醇脱色 30 s; (4) 番红染色 2 min, 水洗晾干, 油镜观察记录结果。将菌株 MY202402 单菌落送至北京擎科生物科技股份有限公司, 提取基因组 DNA 并进行 16S rRNA 基因 Sanger 测序。获得双向测序结果后, 使用 DNAMAN9 拼接与校正序列, 随后通过 NCBI

BLAST 比对 16S rRNA 基因数据库, 下载相似性>98%的参考序列。采用 MEGA 11 的 MAFFT 模块进行多序列比对, 邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树(bootstrap=1 000 次, 节点支持率≥70%为有效分支)。最终将校正后的序列提交至 GenBank 获取登录号。

## 1.7 HPLC 法测定淫羊藿黄酮类成分变化情况

将供试菌液按 5%接种量接种至 10 mL 优化选择培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 7 d。分别取 0 d (空白培养基)及培养 1、3、5、7 d 的样品, 采用 HPLC 法测定朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷I含量, 计算朝藿定 C 转化率和宝藿苷I生成率; 同时用分光光度法监测菌体生长。转化率和生成率计算见公式(1)-(3):

$$\text{物质的量: } C_B = m/M \quad (1)$$

公式(1)中:  $m$  代表物质的质量, 单位是  $\mu\text{g}$ ;  $M$  代表物质的分子量, 单位是  $\text{g/mol}$ 。

$$\text{朝藿定 C 转化率} = (C_0 - C_t) / C_0 \quad (2)$$

公式(2)中:  $C_0$  代表朝藿定 C 初始物质的量(第 0 天), 单位是  $\mu\text{mol}$ ;  $C_t$  代表第  $t$  天物质的量, 单位是  $\mu\text{mol}$ 。

$$\text{宝藿苷I生成率} = (B_t - B_0) / (C_0 + I_0) \quad (3)$$

公式(3)中:  $B_t$  代表宝藿苷I第  $t$  天物质的量, 单位是  $\mu\text{mol}$ ;  $B_0$  代表宝藿苷I初始物质的量(第 0 天), 单位是  $\mu\text{mol}$ ;  $I_0$  代表淫羊藿苷初始物质的量(第 0 天)单位是  $\mu\text{mol}$ 。

## 1.8 菌株酶特性

### 1.8.1 粗酶液的制备与酶活性测定

将目标菌株接种于优化选择培养基中, 在 30 °C、200 r/min 振荡培养至朝藿定 C 转化率峰值时间, 4 °C、8 000×g 离心 10 min 收集菌体, 经预冷的 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.3)洗涤 3 次后, 按 1:5 比例重悬于相同缓冲液中, 冰浴条件下超声破碎(功率 300 W, 工作 3 s, 间隔 5 s) 15 min, 37 °C 孵育 30 min 后于 4 °C、12 000×g 离心 20 min, 收集上清液分装并于 -80 °C 保存

备用。采用 96 孔板微孔反应体系, 将 50  $\mu\text{L}$  粗酶液与 50  $\mu\text{L}$  5 mmol/L 底物溶液(pNPG 或 pNPR)于 37 °C 恒温孵育 10 min, 加入 100  $\mu\text{L}$  1 mol/L 碳酸钠终止反应并稳定显色产物 pNP 的醌式结构。终止后静置 2 min 显色, 于酶标仪 405 nm 波长测定 pNP 特征吸收峰。计算公式如(4)和(5)所示, 其中公式(4)为本实验采用的 pNP 显色法计算式; 公式(5)为酶活力通用定义。

$$\text{酶活力浓度(U/mL)} =$$

$$(\Delta A_{405} \times D \times 200) / (18.5 \times 10 \times 0.05) \quad (4)$$

公式(4)中: 18.5 代表 pNP 在碱性条件下的摩尔消光系数, 单位为  $\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$ ;  $D$  代表样品稀释倍数; 200 代表总反应体积, 单位为  $\mu\text{L}$ ; 0.05 代表酶液体积, 单位为  $\text{mL}$ 。

$$\text{酶活力浓度(U/mL)} = (\Delta C \times V) / (t \times v) \quad (5)$$

公式(5)中:  $\Delta C$  代表单位时间内底物浓度变化, 单位为  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ;  $V$  代表反应体系总体积, 单位是  $\text{mL}$ ;  $t$  代表反应时间, 单位是  $\text{h}$ ;  $v$  代表酶液体积, 单位是  $\text{mL}$ 。

### 1.8.2 酶生物转化条件优化

系统考察温度、pH、酶活力浓度及底物浓度对酶催化朝藿定 C 生物转化效率的影响, 并优化工艺参数。温度实验在 pH 7.0 的 50 mmol/L PBS、酶活力 20 U/mL、底物 0.4 mg/mL 条件下, 于 40–60 °C 范围内设置 5 个梯度, 每间隔 5 °C 为一个梯度, 分别进行 2 h 反应; 随后在固定温度 50 °C 条件下, 利用不同缓冲体系(柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液 pH 3.0–6.0 与 PBS pH 7.0–8.0) 结合 100 mmol/L NaCl 维持离子强度, 探究 pH 6.0–8.0 范围内对转化效率的影响, 其中每间隔 0.5 为 1 个梯度; 进一步考察酶活力浓度(2、5、10、20、40 U/mL)和底物浓度(0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 mg/mL)的优化时, 分别在 pH 7.0、50 °C 恒定条件下进行实验; 检测均通过 HPLC 法定量分析转化率; 在优化条件下反应 2 h, 以 TLC 与 HPLC 法结合测定朝藿定 C 转化率和淫羊藿苷纯度。

## 1.9 优化菌株培养条件

### 1.9.1 温度和 pH 对朝藿定 C 生物转化的影响

温度实验中,将活化菌种以 5%接种量接入优化选择培养基,分别在 25、30、37 °C 条件下 200 r/min 振荡培养 7 d;采用 HPLC 法检测朝藿定 C 和宝藿昔 I 含量变化,计算转化率以评估温度效应,确定最适发酵温度。基于最佳温度,进一步考察初始 pH (6.0、7.0、8.0)对转化效率的影响:将等量菌悬液接种至 pH 调节后的培养基中,在相同温度及转速下培养 7 d,定期取样过滤后分析目标成分含量,结合转化率确定最优 pH 范围。

### 1.9.2 驯化浓度高适应性菌株

将供试菌液按 5%接种量接种于含 0.02 g/mL 淫羊藿水提液的优化选择培养基(10 mL)中,30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 获得第 1 代菌液;随后以 5%接种量依次转接至淫羊藿水提液浓度递增(0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 g/mL)的优化选择培养基中进行梯度驯化,采用 HPLC 法监测不同时间点(0、1、3、5 d)朝藿定 C、淫羊藿昔和宝藿昔 I 的含量变化并计算转化率和生成率,最终选取最优菌液经梯度稀释、固体培养基分离后,接种至斜面培养基 4 °C 保藏。

### 1.10 数据的处理与分析

所有数据均采用 Excel 2016、Origin 2022、IBM SPSS Statistics 24 和 GraphPad Prism 9 进行处理、分析和绘图。所有实验均独立重复 3 次,用 one-way ANOVA 进行数据比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 淫羊藿黄酮类成分 HPLC 分析及水提工艺优化

经考察,各成分的校准曲线均呈现优异的线性特征,其回归方程及相关系数分别为:朝藿定 A ( $Y=15.918X+0.2355$ ,  $R^2=0.9996$ )、朝藿定 B ( $Y=19.745X+18.760$ ,  $R^2=0.9991$ )、朝藿定 C

( $Y=21.532X+24.662$ ,  $R^2=0.9995$ )、淫羊藿昔 ( $Y=29.707X+31.321$ ,  $R^2=0.9998$ ) 和宝藿昔 I ( $Y=23.017X-11.662$ ,  $R^2=0.9998$ )。各成分的线性范围依次为 5.18–166、5.77–185、5.00–160、3.12–200、3.75–120  $\mu\text{g/mL}$ 。色谱分离结果显示,朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿昔和宝藿昔 I 这 5 种成分的平均保留时间分别为 13.144、15.488、17.187、21.313、45.066 min,各峰分离良好,满足定量分析要求。根据回归方程计算叶片各黄酮类成分含量,朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿昔、宝藿昔 I 的含量平均分别为 0.67%、0.61%、0.92%、1.78%、0.50%。前 4 种黄酮总量为 3.99%,所以该叶片黄酮类成分含量符合参考文献[1]规定。使用冷凝回流法提取,通过单因素试验和正交设计试验得到淫羊藿水提液,测得 5 种主要黄酮类成分含量分别为 (0.402 $\pm$ 0.007)%、(0.504 $\pm$ 0.008)%、(0.787 $\pm$ 0.003)%、(1.362 $\pm$ 0.012)%、(0.213 $\pm$ 0.004)%。图 3 为 5 种淫羊藿黄酮类成分的 HPLC 色谱图,通过与标准品保留时间比对可进行定性分析。

### 2.2 不同生境菌群对朝藿定 C 和宝藿昔 I 的影响结果

实验结果表明,各组朝藿定 C 含量均随时间递减,其中实验组 B 的下降速度显著快于实验组 A 和对照组(对照区及阳性对照);同时,宝藿昔 I 含量随时间上升,以实验组 B 的增幅最大,其次为实验组 A,对照组最低。上述结果提示,实验组 B 对朝藿定 C (图 4A)的代谢及宝藿昔 I (图 4B)的积累作用均最为突出,所以选择实验组 B (淫羊藿人工栽培土壤和叶片样品)进行复筛。

### 2.3 最优生境土壤和叶片微生物富集培养结果

平板计数分析表明,选择培养基对微生物生长具有促进作用,其中水提液组的微生物生长状况优于混合组,而混合组又优于常规培养基组(图 5)。此外,叶片样品中的微生物数量明显多于土壤样品(图 5)。

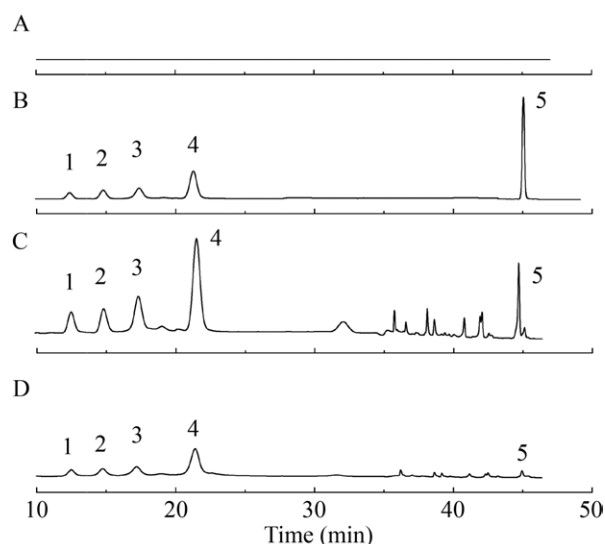


图3 淫羊藿黄酮类成分高效液相色谱图 A: 空白对照组; B: 混合对照品; C: 叶片供试品; D: 水提液供试品。1: 朝藿定 A; 2: 朝藿定 B; 3: 朝藿定 C; 4: 淫羊藿苷; 5: 宝藿苷 I。

Figure 3 HPLC chromatogram of flavonoid components in *Epimedium*. A: Blank control group; B: Mixed reference substance; C: Leaf test; D: Water extract test. 1: Epimedin A; 2: Epimedin B; 3: Epimedin C; 4: Icariin; 5: Baohuoside I.

## 2.4 菌种鉴定结果

### 2.4.1 菌株形态观察及镜检结果

通过分离纯化培养 2.3 节中叶片样本中的微生物并进行 TLC 鉴定, 获得 2 株功能性菌株 MY202402-1 和 MY202402-3。菌株 MY202402-3 在培养 7 d 后(图 6)淫羊藿苷显色加深, 宝藿苷 I 出现显色, 表现出转化能力; 而菌株 MY202402-1 需 14 d 以上转化(图 6), 所以不考虑深入研究。菌落形态观察显示(图 7), 菌株 MY202402-1 呈白色绒毛状, 丝状交织, 结合较牢固, 不易挑起(图 7A), 显微观察呈清晰小颗粒状(图 7B), 可能为曲霉属(*Aspergillus*)或青霉属(*Penicillium*)菌种; 菌株 MY202402-3 为乳白色圆形菌落(图 7C), 革兰氏阳性短杆状(图 7D)。对照植物乳杆菌呈圆形、乳白色、边缘整齐(图 7E), 革兰氏阳性细长杆状, 无芽孢和鞭毛(图 7F)。

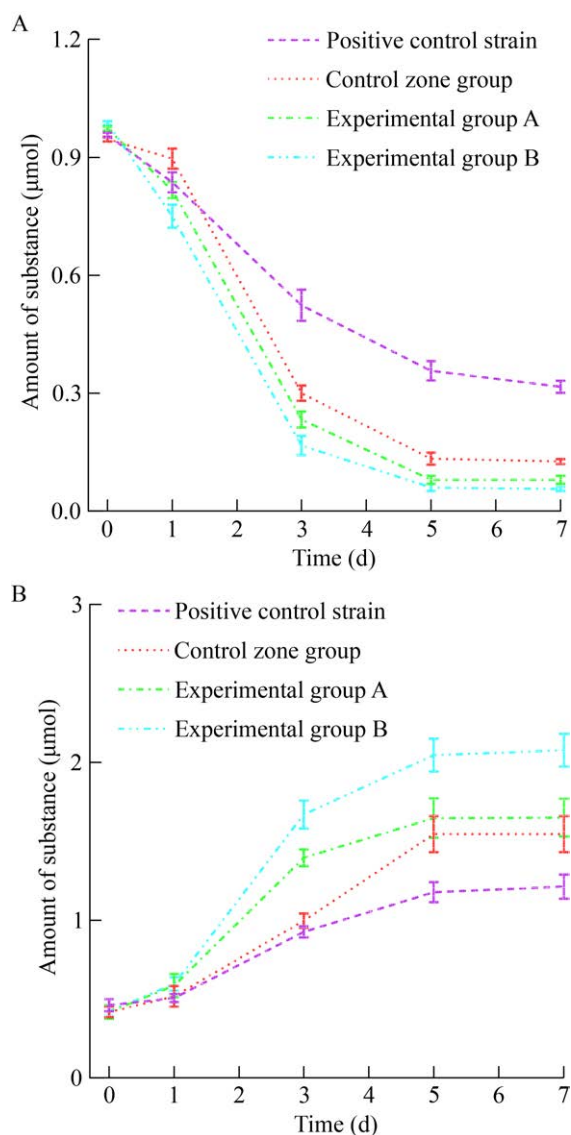


图4 不同生境菌群对朝藿定 C (A)和宝藿苷 I (B)的影响

Figure 4 Effects of microbial communities from different habitats on epimedin C (A) and baohuoside I (B).

### 2.4.2 16S rRNA 基因序列测定与系统发育树构建结果

将菌株 MY202402-3 的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI, GenBank 登录号为 PV277992。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析表明, 该菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*) (图 8), 命名为 *Bacillus* sp. MY202402-3。

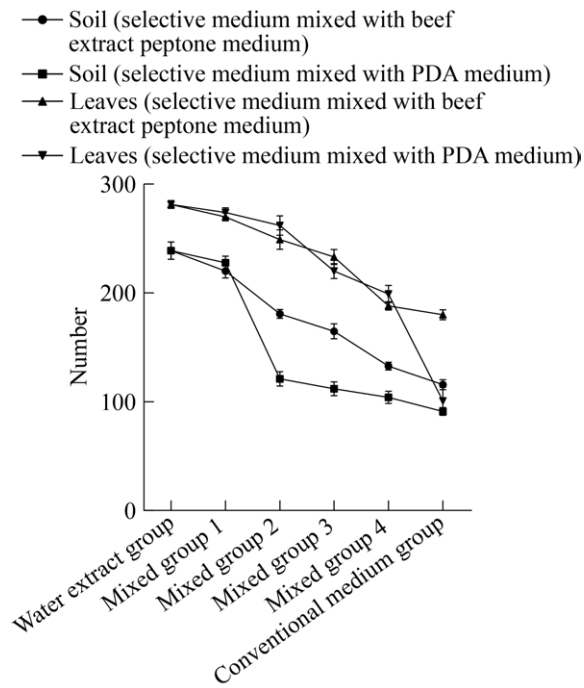


图5 筛选富集培养基菌落计数( $n=3$ )  
Figure 5 Colony counting on selective enrichment media ( $n=3$ ).

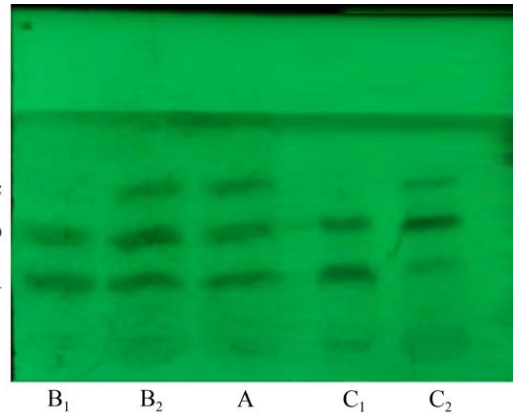


图6 供试菌液薄层分析图 A: 标准品; B<sub>1</sub>: 初始 MY202402-1; B<sub>2</sub>: 培养后 MY202402-1; C<sub>1</sub>: 初始 MY202402-3; C<sub>2</sub>: 培养后 MY202402-3。a: 朝藜定 C; b: 淫羊藿苷; c 为宝藜苷 I。

Figure 6 Thin layer analysis diagram of test bacteria liquid. A: Standard; B<sub>1</sub>: Initial MY202402-1; B<sub>2</sub>: Post-culture MY202402-1; C<sub>1</sub>: Initial MY202402-3; C<sub>2</sub>: Post-culture MY202402-3. a: Epimedinin C; b: Icaritin; c: Baohuoside I.

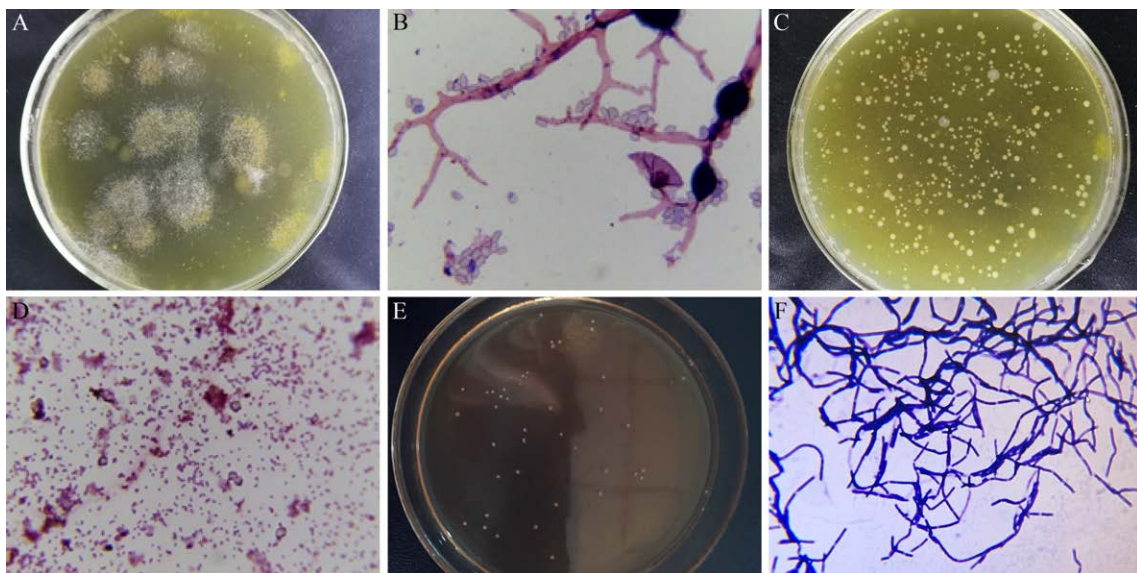


图7 菌株的形态学特征 A-B: 菌株 MY202402-1 的菌落形态、染色镜检; C-D: 菌株 MY202402-3 的菌落形态、染色镜检; E-F: 植物乳酸杆菌的菌落形态、染色镜检。镜检时目镜 10 倍物镜 100 倍观察。  
Figure 7 Morphological characteristics of bacterial strains. A-B: Colony morphology of strain MY202402-1 and Gram-staining microscopy; C-D: Colony morphology of strain MY202402-3 and Gram-staining microscopy; E-F: Colony morphology of *Lactobacillus plantarum* and Gram-staining microscopy. Microscopic observations were performed at 10× ocular and 100× objective magnification.

## 2.5 菌株生长曲线及 HPLC 测定供试液中淫羊藿黄酮含量

菌株 MY202402-3 的生长曲线(图 9)显示其具有较短的延滞期和较长的对数生长期,表明该菌能快速适应淫羊藿水提液环境并高效繁殖。稳定期  $OD_{600}$  值较高但增长缓慢,提示营养消耗殆尽。如图 10 所示,培养过程中朝藿定 C 被快速转化(第 5 天转化率达 88.10%),淫羊藿苷先积累后消耗,而宝藿苷 I 持续增加至稳定(第 5 天生成率 21.13%)。培养前、后淫羊藿黄酮类成分典型色谱图见图 11。

## 2.6 酶生物转化条件优化结果

根据酶反应特异性分析,确定粗酶中主要含有  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶,测得两者

的酶活力浓度分别为 18.7 U/mL 和 3.3 U/mL。由于  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活力浓度较低,本研究将重点探究粗酶中的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。通过系统考察温度、pH、酶活力浓度和底物浓度等因素,确定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶生物转化朝藿定 C 的最适条件。

如图 12A 所示,在 40 °C 时,朝藿定 C 的转化率较低,50 °C 时达到峰值,表明该温度下酶活性最优,而 55 °C 时转化率下降,说明 50 °C 为最适温度。pH 实验显示,pH 6.0 时转化率较低,pH 7.5 时达到峰值,pH 8.0 时下降(图 12B),表明中性偏碱环境更利于酶催化,但过高 pH 会降低酶稳定性。酶浓度实验中,2 U/mL 时转化率较低,5–10 U/mL 时显著提升,20–40 U/mL

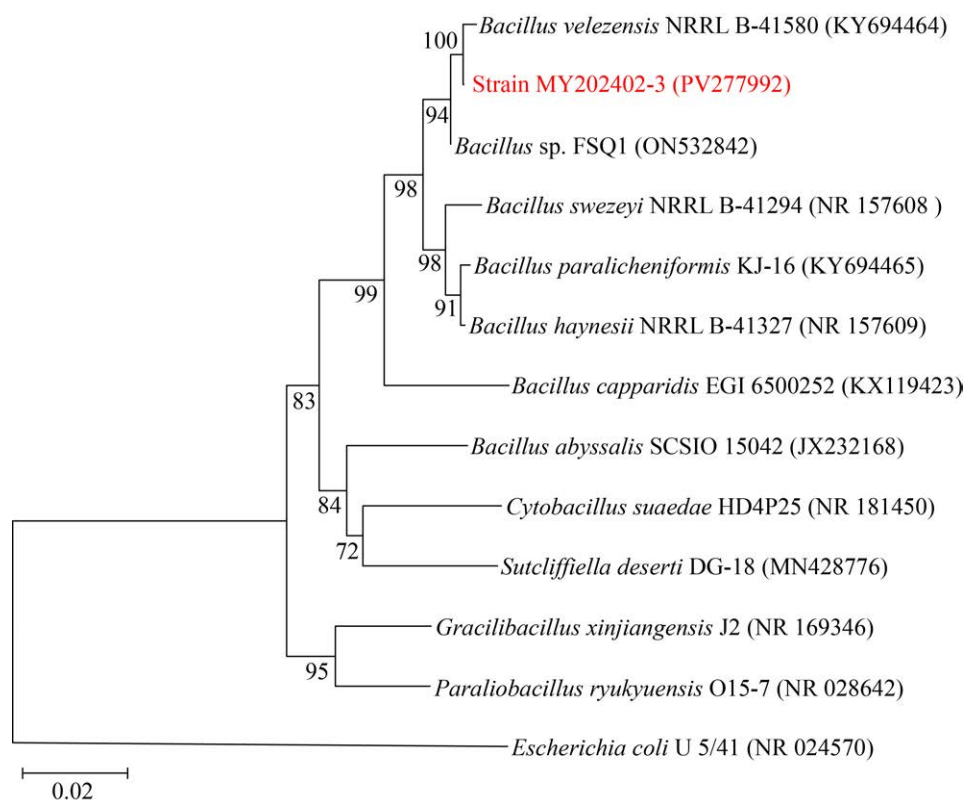


图 8 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 MY202402-3 的系统发育树 括号内的序号为 GenBank 登录号;节点处的数字为 bootstrap 支持度;标尺表示物种间差异数值的单位长度。

Figure 8 Phylogenetic tree of strain MY202402-3 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the GenBank login number; The number at the node is the bootstrap support; The scale represents the unit length of species differences.

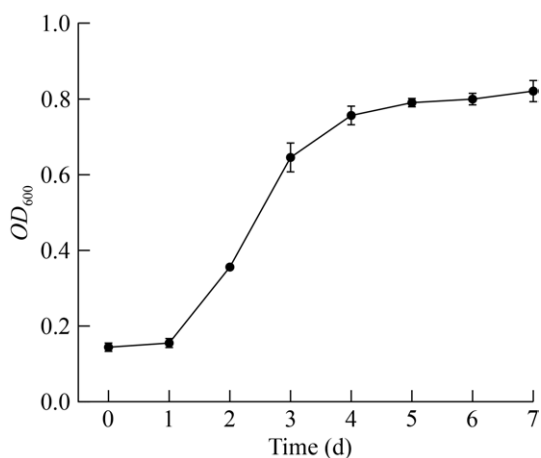


图9 菌株 MY202402-3 的生长曲线( $n=3$ )  
Figure 9 Growth curve of strain MY202402-3 ( $n=3$ ).

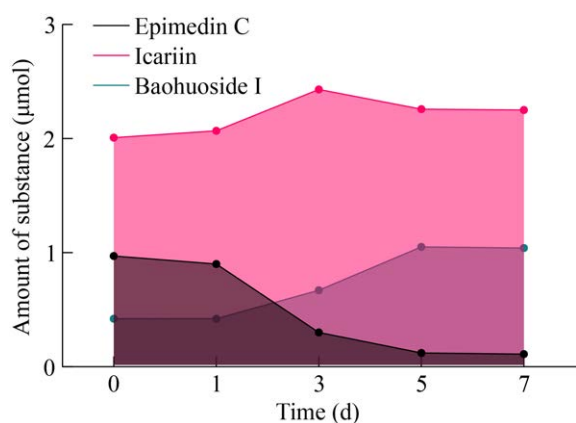


图10 不同培养时间下测定淫羊藿黄酮类成分物质的量

Figure 10 Determination of the amount of flavonoids in *Epimedium* under different culture days.

时趋于平衡(图 12C), 说明 10 U/mL 即可满足催化需求, 更高浓度虽维持高效转化但可能造成浪费。底物浓度实验表明, 0.1 mg/mL 时转化率最高, 0.2 mg/mL 时略有下降, 0.4 mg/mL 达到动态平衡, 而 0.8–1.2 mg/mL 时转化率回升(图 12D)。综合考虑转化效率与产物量, 最终优化条件为 50 °C、pH 7.5、酶浓度 10 U/mL、底物浓度 1.2 mg/mL。

在最优条件下, 经 2 h 酶促转化后, TLC 分析显示(图 13), 底物朝藿定 C 的含量随反应

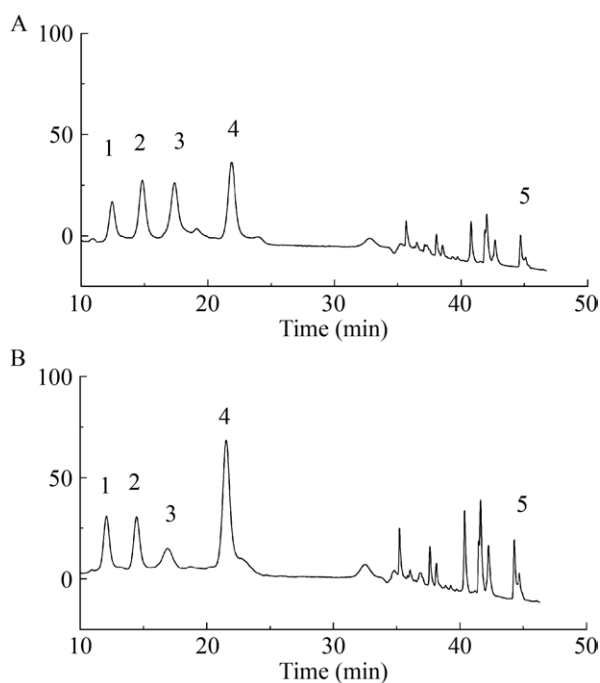


图11 培养前(A)、后(B)淫羊藿黄酮类成分的高效液相色谱图 1: 朝藿定 A; 2: 朝藿定 B; 3: 朝藿定 C; 4: 淫羊藿苷; 5: 宝藿苷I。

Figure 11 HPLC chromatograms of *Epimedium* flavonoids before (A) and after (B) cultivation. 1: Epimedin A; 2: Epimedin B; 3: Epimedin C; 4: Icariin; 5: Baohuoside I.

时间减少, 而产物淫羊藿苷的含量增加。高效液相色谱分析进一步证实, 反应初始阶段(0 h)仅检测到朝藿定 C (图 14A), 转化后体系中主要存在淫羊藿苷(图 14B), 仅残留微量朝藿定 C 未转化, 朝藿定 C 转化率 95.20%, 淫羊藿苷纯度 96.78%。

## 2.7 菌株优化结果

实验结果表明, 朝藿定 C 的含量随时间呈现先缓慢下降后快速降低最终趋于稳定的动态变化特征, 其中 30 °C 和 37 °C 条件下的转化率高于 25 °C, 并且 37 °C 表现出最优的转化效率(图 15A); 而宝藿苷I的含量变化则呈现初期稳定、中期快速累积、后期趋于平稳的趋势, 其生成速率随温度升高而递增, 37 °C 时达到最高累积水平(图 15B)。在 pH 条件优化实验中, pH 7.0 时

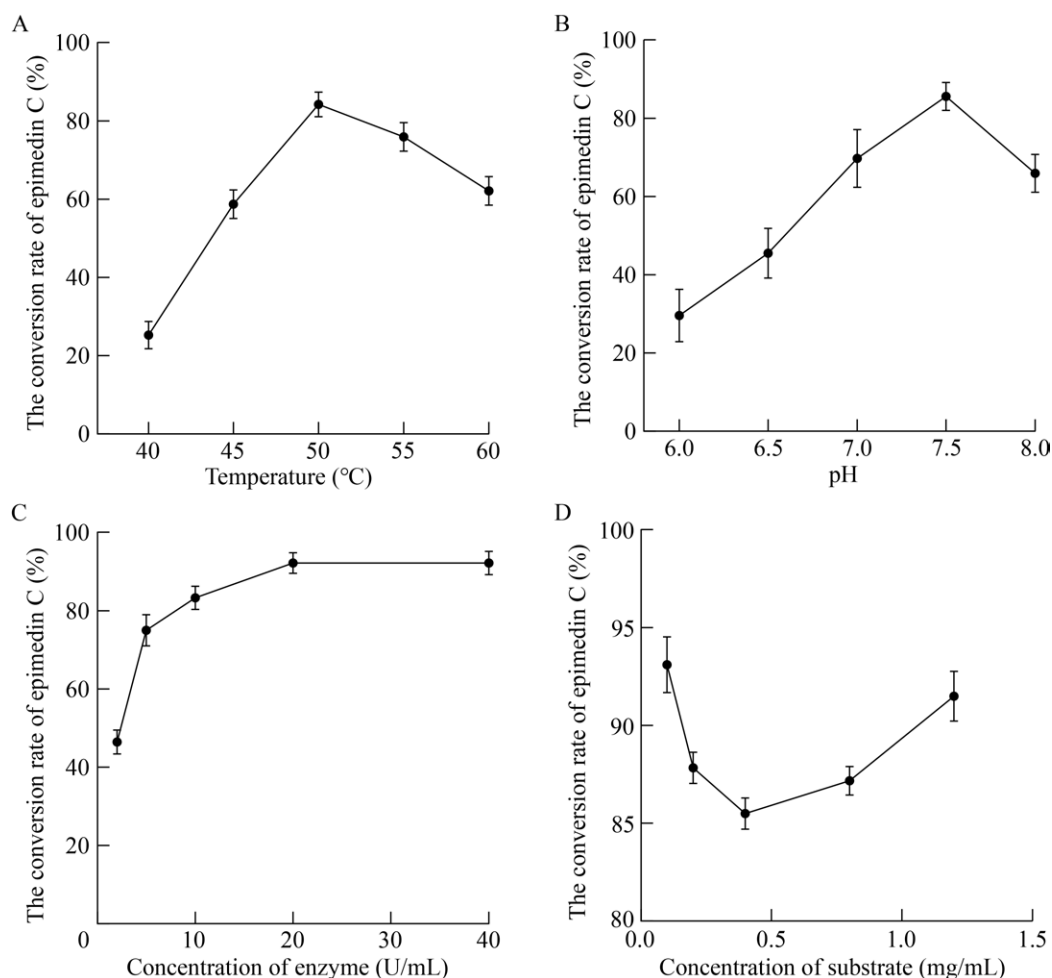


图 12 酶生物转化条件优化结果 A: 温度对酶催化朝藿定 C 的影响; B: pH 对酶催化朝藿定 C 的影响; C: 酶活力浓度对酶催化朝藿定 C 的影响; D: 底物浓度对酶催化朝藿定 C 的影响( $n=3$ )。

Figure 12 Optimization results of enzymatic biotransformation conditions. A: Effect of temperature on enzymatic conversion of epimedidin C; B: Effect of pH on enzymatic conversion of epimedidin C; C: Effect of enzyme activity concentration on enzymatic conversion of epimedidin C; D: Effect of substrate concentration on enzymatic conversion of epimedidin C ( $n=3$ ).

朝藿定 C 的转化率(图 15C)和宝藿昔 I (图 15D) 的生成率均达到最大值。另外, 碱性条件(pH 8.0)下转化效率虽有所降低但仍保持一定活性, 而酸性环境(pH 6.0)则表现出更显著的抑制作用。综合温度与 pH 实验结果, 37 °C 和 pH 7.0 被确认为该生物转化体系的最适条件。

## 2.8 微生物的驯化

通过微生物驯化, 朝藿定 C 转化为淫羊藿苷的转化率主要受时间影响, 其次为浓度(图 16A)。

培养 1 d 时转化率较低, 3 d 显著提升至 69.26%–74.77%, 5–7 d 达 90% 以上, 表明培养 5 d 反应趋近平衡。低浓度(0.01–0.04 g/mL)转化率增长缓慢, 而中高浓度(0.06–0.10 g/mL)在培养 1–3 d 时显著提升, 但 0.12 g/mL 在培养 3 d 时降至 72.91%。最优条件为: 快速反应选 0.10 g/mL、培养 3 d (>75% 转化率), 高转化率选 0.06–0.10 g/mL、培养 5 d (>90%), 其中在条件为 0.10 g/mL、培养 5 d, 转化率达峰值 90.93%。

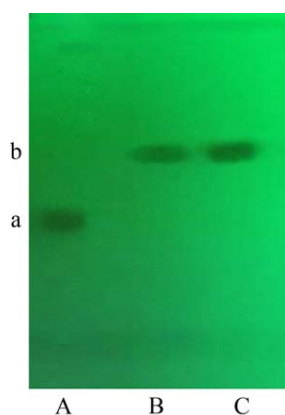


图 13 酶生物转化朝藿定 C 的薄层色谱图 A: 初始反应样品; B: 反应后样品; C: 淫羊藿苷标准品; a: 朝藿定 C; b: 淫羊藿苷。

Figure 13 Thin layer chromatography (TLC) of enzymatic biotransformation of epimedin C. A: Initial reaction sample; B: Post-reaction sample; C: Icariin reference standard; a: Epimedin C; b: Icariin.

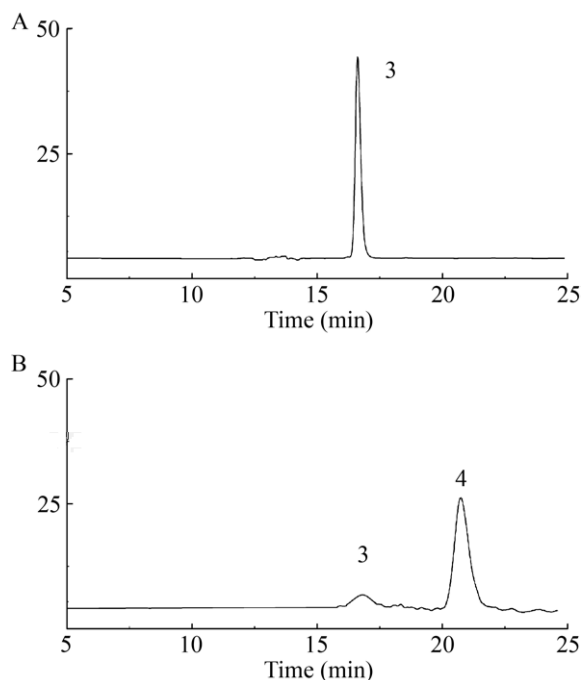


图 14 酶生物转化朝藿定 C 的高效液相色谱图 A: 初始反应样品; B: 反应后样品。3: 朝藿定 C; 4: 淫羊藿苷。

Figure 14 HPLC chromatogram of enzymatic biotransformation products of epimedin C. A: Initial reaction sample; B: Post-reaction sample. 3: Epimedin C; 4: Icariin.

在驯化过程中, 宝藿昔I的生成率随培养时间和浓度增加而提升(图 16B)。培养 1 d 时生成率极低(0.12%–0.83%), 3 d 显著提高至 8.43%–11.67%, 5–7 d 达 21.22%–26.96%, 5 d 后进入平台期。低浓度(0.01–0.08 g/mL)下生成率随浓度增加显著提升, 而高浓度(0.08–0.12 g/mL)增速放缓甚至下降, 表明 0.08 g/mL 为最佳驯化浓度。最优培养条件为 0.08 g/mL、培养 5 d, 生成率达峰值 26.96%, 延长驯化时间无显著提升。

### 3 讨论

目前, 生物转化技术广泛用于天然化合物的结构修饰和合成<sup>[25]</sup>, 而该技术可有效提升淫羊藿高价值黄酮含量<sup>[26]</sup>。研究发现, 朝藿定 A、B 等和淫羊藿苷在柔毛淫羊藿中含量较高<sup>[27]</sup>, 因此选择该药材作为生物转化研究基础, 研究通过初筛与定性分析、定量优化转化效率, 并模拟工业化高负荷环境逐步增加底物浓度, 驯化出耐受高浓度黄酮苷的菌株。

本研究以淫羊藿水提液为底物构建生物转化体系, 通过优化菌株筛选条件建立以黄酮类成分为主要碳源的选择性培养环境, 通过重复筛选并梯度降低蛋白胨等外源营养含量, 促使微生物逐步适应并利用黄酮代谢产物作为主要碳源。采用水提液作为转化底物不仅能直接用于生物转化而且显著降低生产成本, 其富含的天然辅酶等还可为微生物提供必需的生长因子, 在维持菌体生长的同时持续诱导相关酶系的表达, 从而有效提升黄酮类成分的转化效率。

研究表明, 土壤和叶际微生物具有多样性, 并且功能菌株降解能力强<sup>[28–30]</sup>。已有研究报告<sup>[31]</sup>, 从朝鲜淫羊藿叶片分离的内生菌环状垫壳孢菌(*Ilyonectria cyclaminicola*)可用于淫羊藿药渣转化, 以及从土壤筛选得到的菌株罗河杆菌属(*Rhodanobacter* sp.) GS3054 用于水解淫羊藿苷<sup>[32]</sup>, 因此本研究选择土壤和叶际微生物作为功能菌株的筛选来源。实验显示, 人工栽培土壤微生物对朝藿定 C 和宝藿昔I的转化效率高

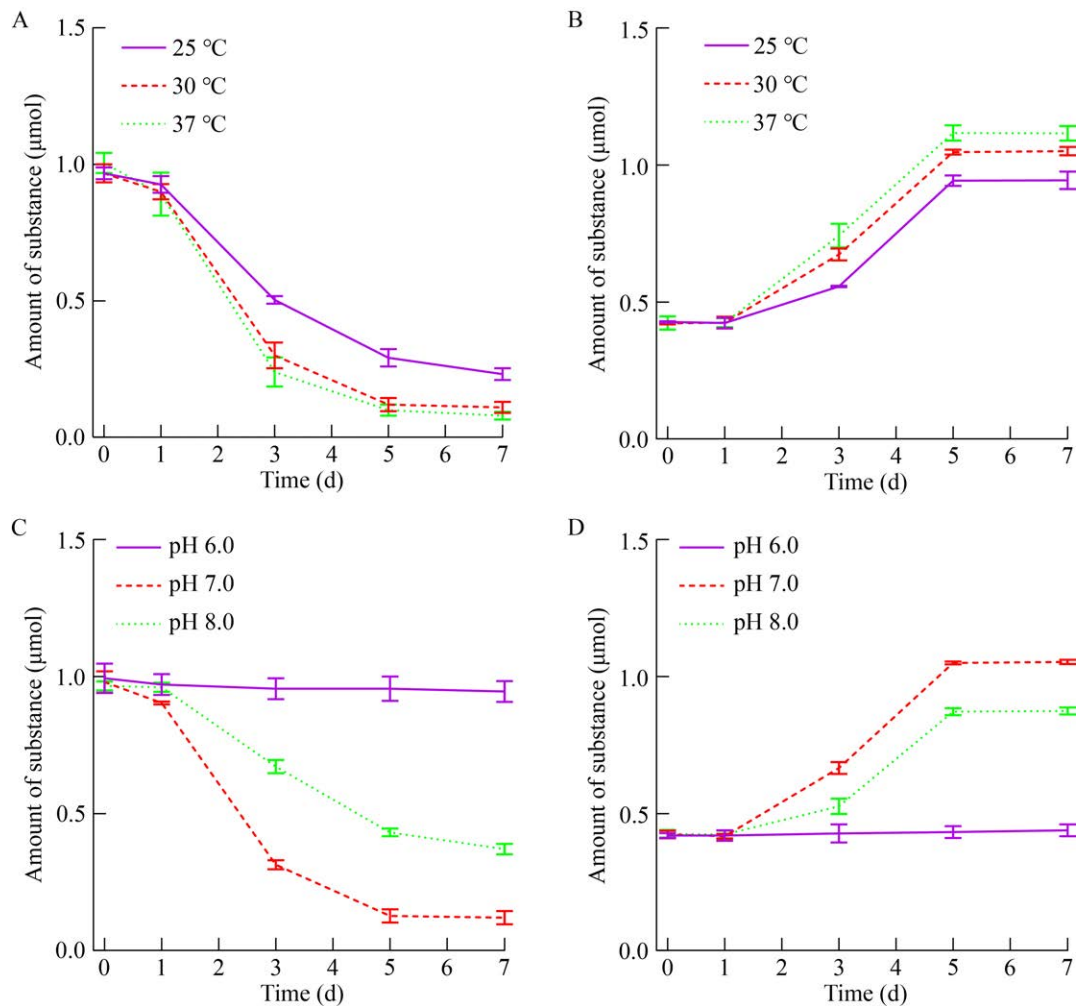


图 15 不同温度和 pH 对菌株的影响 A: 不同温度对菌株转化朝藿定 C 的影响; B: 不同温度对菌株生成宝藿苷 I 的影响; C: 不同 pH 对菌株转化朝藿定 C 的影响; D: 不同 pH 对菌株生成宝藿苷 I 的影响 ( $n=3$ )。

Figure 15 Effects of temperature and pH on strain performance. A: Temperature effect on epimedinin C conversion by the strain; B: Temperature effect on baohuoside I production by the strain; C: pH effect on epimedinin C conversion by the strain; D: pH effect on baohuoside I production by the strain ( $n=3$ ).

于原生境土壤(图 4), 推测因原生境菌群复杂性降低了功能菌株的选择性, 而栽培土壤通过管理措施优化了功能菌株的富集。原生境土壤转化效率仍高于对照区, 表明淫羊藿根际效应可能富集了功能微生物; 对照区优于阳性对照, 提示土壤-植物微生物生态系统的微生物互作比单一菌株具有更高效的黄酮代谢网络。此外, 叶片微生物数量显著多于土壤, 可能因凋落叶片更适宜转化黄酮的微生物生长, 利于功能菌株筛

选(图 5)。采用分光光度法监测菌体生长, 并结合朝藿定 C 消耗量评估菌株代谢能力。由于淫羊藿苷在转化过程中动态变化(既是朝藿定 C 代谢产物, 又是宝藿苷 I 前体), 故仅计算朝藿定 C 转化率和宝藿苷 I 生成率, 以评估菌株转化效率。

本研究通过微生物的筛选与驯化, 成功获得可高效转化朝藿定 C 的微生物菌株 *Bacillus* sp. MY202402-3 (图 8)。相较于已报道的淫羊

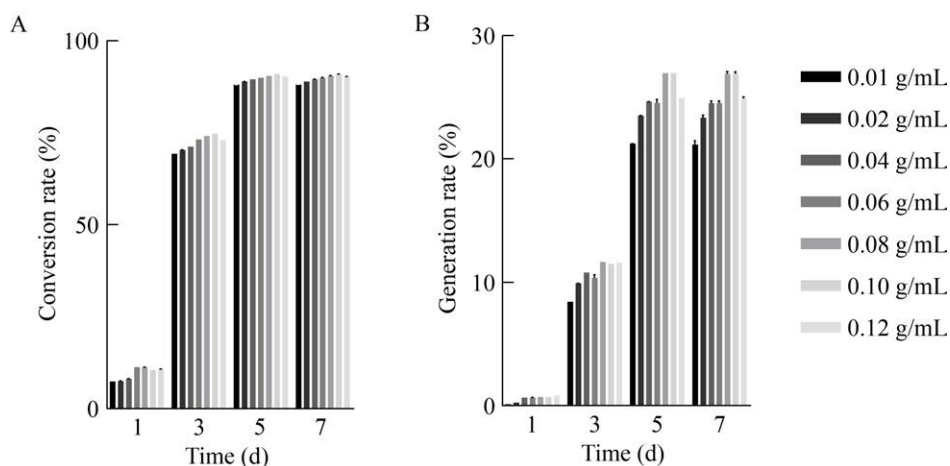


图 16 不同时间不同浓度对朝藿定 C 转化率(A)和宝藿苷I生成率(B)的影响

Figure 16 Effects of incubation time and concentration on conversion rate of epimedinin C (A) and the production rate of baohuoside I (B).

藜黄酮转化菌株, 该菌株在工业化应用方面展现出显著优势。实验数据显示, 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 在发酵 13、37、61 h 时对朝藿定 C 的转化率分别为 8.37%、17.67%、15.81%<sup>[33]</sup>, 而驯化后的菌株 MY202402-3 在 24 h 和 72 h 的转化率分别达到 11.28% 和 74.08%, 最终转化率可达 90.93%, 尽管其转化率略低于工程菌株法夫驹形氏酵母 (*Komagataella phaffii*) GS115 (92.30%)<sup>[34]</sup>, 但本菌株无需基因改造即可实现高效转化, 更具工业化应用价值, 有望成为淫羊藜黄酮工业化生物转化的理想候选菌株。芽孢杆菌具有独特的生理特性(耐高温等)和高度可塑的代谢网络<sup>[35]</sup>, 其优异的转化效率可能源于底物特异性酶系的高效性和单层细胞膜结构有利于外源蛋白质的分泌调控<sup>[36]</sup>。研究表明, 芽孢杆菌能够分泌蛋白酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶等<sup>[37]</sup>, 也有研究筛选得到具有  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和肽酶的芽孢杆菌<sup>[38]</sup>; 它们可特异性地转化一些活性物质和基团, 例如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) ATCC 6633 对肉桂中三萜类化合物可以起糖基化作用<sup>[39-40]</sup>, 阿氏芽孢杆菌 (*Bacillus aryabhattai*) 可以对酚类化合物进行生物转化<sup>[41]</sup>。研究证实  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶对淫羊藜黄酮类成分 C-3 位鼠李糖苷具有选择性, 可将朝藿定 C 水

解为淫羊藜苷,  $\beta$ -葡萄糖苷酶对 C-7 位葡萄糖基具有特异性及高效性, 可将淫羊藜苷水解为宝藿苷 I<sup>[34,42-43]</sup>, 因此菌株 MY202402-3 可进行朝藿定 C 的转化和宝藿苷 I 的生成。

然而, 本研究仍存在一定局限性, 在对比不同生境转化能力时, 为保持初始接种密度一致, 单菌落为其他组别的菌悬液  $OD_{600}$  的平均值, 但单菌体系与复杂菌群的代谢差异不可避免; 微生物发酵条件优化不足, 并且菌株生长速率可能影响朝藿定 C 转化和宝藿苷 I 生成, 进一步制约工业化应用; 产物特异性有待提升, 宝藿苷 I 生成率过低, 可能与菌株对 C-7 位葡萄糖基的水解能力不足有关。综上所述, 本研究通过微生物筛选与驯化策略, 成功实现了淫羊藜水提液中黄酮类成分的高效转化, 为工业化生产提供了低成本、高兼容性的技术路径。未来研究可通过优化培养策略(如采用两阶段培养)或靶向代谢工程改造(如过表达内源  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因)进一步提升其转化效率, 这些特性使该菌株在功能性食品和药物开发领域具有广阔的应用前景。

## 4 结论

本研究成功分离并鉴定了一株能够将朝藿

定 C 转化为淫羊藿苷和宝藿苷I的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) MY202402-3。该菌株在柔毛淫羊藿水提液中表现出良好的生长和转化活性,经驯化后在 0.10 g/mL 水提液中朝藿定 C 转化率提升至 90.93%, 0.08 g/mL 体系中宝藿苷I生成率达 26.96%,为淫羊藿苷和宝藿苷I等高价黄酮类成分的生产奠定了基础。

### 作者贡献声明

冯一帆: 数据收集, 数据分析, 撰写文章; 郑仁林: 提供资源, 结果分析; 唐志康: 提供资源, 药材鉴定; 陈平: 研究指导, 修改文章; 张德全: 获取基金, 调研执行; 袁小红: 研究指导, 修改文章, 提供资源, 数据收集与监管。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### REFERENCES

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340-342. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume I, 2020 Edition)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 340-342 (in Chinese).
- [2] 龚华乾, 高敏, 柴艺汇, 苗得庆, 吴雍真, 李倩, 陈云志. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2021, 38(4): 75-78. GONG HQ, GAO M, CHAI YH, MIAO DQ, WU YZ, LI Q, CHEN YZ. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Epimedium*[J]. Journal of Hubei Minzu University (Medical Edition), 2021, 38(4): 75-78 (in Chinese).
- [3] 何丽君, 江金井, 陈豪, 章靓, 郑婉玉, 徐榕青, 黄南龙. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(2): 17-20. HE LJ, JIANG JJ, CHEN H, ZHANG L, ZHENG WY, XU RQ, HUANG NL. A review on pharmacological effects and clinical application of *Herba Epimedii*[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2020, 12(2): 17-20 (in Chinese).
- [4] 周晓洁, 姚辛敏, 周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2022, 50(11): 112-115. ZHOU XJ, YAO XM, ZHOU YY. Research progress on pharmacological effects of *Epimedium*[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2022, 50(11): 112-115 (in Chinese).
- [5] 韩冰, 沈彤, 鞠建华, 杨峻山. 淫羊藿属植物化学成分研究概况[J]. 国外医药(植物药分册), 2003, 18(4): 151-153. HAN B, SHEN T, JU JH, YANG JS. Research overview on chemical constituents of *Epimedium* species[J]. World Phytomedicines (Plant Medicine Section), 2003, 18(4): 151-153 (in Chinese).
- [6] 王义翠, 彭慧霞, 夏子岚, 贾玉雪, 刘延鑫. 淫羊藿苷药理作用及应用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 182-186. WANG YC, PENG HX, XIA ZL, JIA YX, LIU YX. Research progress on pharmacological effect and application of icariin[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2023, 41(6): 182-186 (in Chinese).
- [7] 廖天龙, 楚雪桐, 杨小平. 淫羊藿次苷I通过 Akt 信号通路上调 Bmi1 促进小鼠精原干细胞增殖[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2023, 20(1): 13-17. LIAO TL, CHU XT, YANG XP. Mechanism of icariin I promoting proliferation of mouse spermatogenic stem cells[J]. Journal of Hunan Normal University (Medical Sciences), 2023, 20(1): 13-17 (in Chinese).
- [8] 董维维, 王先恒, 张益蓉, 石宗琴, 何芋岐, 赵长阔. 淫羊藿苷在不同质子酸催化下的选择性水解反应研究[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(9): 2254-2259. DONG WW, WANG XH, ZHANG YR, SHI ZQ, HE YQ, ZHAO CK. Study on the selective hydrolysis of icariin under different protonic acid condition[J]. Chemical Research and Application, 2022, 34(9): 2254-2259 (in Chinese).
- [9] 陈旺, 张月, 张宇航, 冯自立, 袁洪超.  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解朝藿定 C 制备淫羊藿苷工艺研究[J]. 中成药, 2023, 45(8): 2472-2476. CHEN W, ZHANG Y, ZHANG YH, FENG ZL, YUAN HC. Preparation process for icariin by hydrolysis of epimedin C with  $\alpha$ -L-rhamnosidase[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(8): 2472-2476 (in Chinese).
- [10] 张羽飞, 吴洪, 姜忠义. 生物转化中药化学成分的研究进展[J]. 生物加工过程, 2005, 3(3): 29-32. ZHANG YF, WU H, JIANG ZY. Progress in biotransformation of chemical composition from traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2005, 3(3): 29-32 (in Chinese).
- [11] HIDALGO D, SANCHEZ R, LALALEO L, BONFILL M, CORCHETE P, PALAZON J. Biotechnological production of pharmaceuticals and biopharmaceuticals in plant cell and organ cultures[J]. Current Medicinal Chemistry, 2018, 25(30): 3577-3596.
- [12] GIRI A, DHINGRA V, GIRI CC, SINGH A, WARD OP, NARASU ML. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(3): 175-199.
- [13] RAMACHANDRA RAO S, RAVISHANKAR GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances, 2002, 20(2): 101-153.
- [14] HAN FB, KIM JH, LEE IS. Microbial transformation of icariin and its derivatives[J]. Natural Product Research, 2022, 36(16): 4103-4113.
- [15] ZHANG SS, LUO J, DONG YR, WANG ZZ, XIAO W, ZHAO LG. Biotransformation of the total flavonoid extract of *Epimedium* into icaritin by two thermostable glycosidases from *Dictyoglomus thermophilum* DSM3960[J]. Process Biochemistry, 2021, 105: 8-18.

- [16] 裴雯雯, 曾艳, 刘娟娟, 张建刚, 王敏, 孙媛霞.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的桔草芽孢杆菌表达、酶学性质分析及其在宝藜苷I制备中的应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 133-140.
- PEI WW, ZENG Y, LIU JJ, ZHANG JG, WANG M, SUN YX. Expression of recombinant  $\beta$ -glucosidase in *Bacillus subtilis* and its enzymatic characterization and application in preparation of icariside II[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 133-140 (in Chinese).
- [17] ZHOU J, CHEN Y, WANG Y, GAO X, QU D, LIU CY. A comparative study on the metabolism of *Epimedium koreanum* Nakai-prenylated flavonoids in rats by an intestinal enzyme (lactase phlorizin hydrolase) and intestinal flora[J]. Molecules, 2013, 19(1): 177-203.
- [18] XIN XL, FAN GJ, SUN Z, ZHANG N, LI Y, LAN R, CHEN L, DONG PP. Biotransformation of major flavonoid glycosides in herb epimedii by the fungus *Cunninghamella blakesleana*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 122: 141-146.
- [19] WU HL, KIM M, HAN J. Icarin metabolism by human intestinal microflora[J]. Molecules, 2016, 21(9): 1158.
- [20] CHENG T, YANG J, ZHANG T, YANG YS, DING Y. Optimized biotransformation of icariin into icariside II by  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma viride* using central composite design method[J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 5936947.
- [21] 杨宇, 韩冰, 金凤燮, 鱼红闪. 淫羊藿苷糖苷酶的纯化及其酶学性质的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 31-34.
- YANG Y, HAN B, JIN FX, YU HS. Purification of icariin-glycosidase and its enzymatic characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(1): 31-34 (in Chinese).
- [22] 单金津. 药食用真菌对基料中小分子化学成分的影响研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- SHAN JJ. Effects of medicinal and edible fungi on small molecular chemical constituents in substrates[D]. Guiyang: Guizhou University, 2015 (in Chinese).
- [23] ZHANG DW, TAO XY, CHEN RD, YU LY, DAI JG. Regio-selective deglycosylation of icariin by cell suspension cultures of *Glycyrrhiza uralensis* and *Morus alba*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2015, 17(6): 656-661.
- [24] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- WEI JC. Fungi Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese).
- [25] 巩金妹, 郭树仁, 张延勇. 生物转化在中药上的应用及其反应类型研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(2): 145-148.
- GONG JM, GUO SR, ZHANG YY. Application of biotransformation in traditional Chinese medicine and research progress on its reaction types[J]. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009, 4(2): 145-148 (in Chinese).
- [26] ZHANG XL, TANG BL, WEN SJ, WANG YT, PAN CX, QU LB, YIN YL, WEI YJ. Advancements in the biotransformation and biosynthesis of the primary active flavonoids derived from *Epimedium*[J]. Molecules, 2023, 28(20): 7173.
- [27] 边帅杰, 康忠禹, 赵大庆, 毛英民, 闫福源, 齐滨, 刘莉. 基于UHPLC-Q Exactive Orbitrap/MS结合多元统计方法分析不同基原淫羊藿化学成分的差异[J]. 中药材, 2024, 47(1): 106-110.
- LIAN SJ, KANG ZY, ZHAO DQ, MAO YM, YAN FY, QI B, LIU L. Analysis of chemical composition differences in *Epimedium* species from different origins using UHPLC-Q Exactive Orbitrap/MS combined with multivariate statistical methods[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2024, 47(1): 106-110 (in Chinese).
- [28] LIU HW, CARVALHAIS LC, CRAWFORD M, SINGH E, DENNIS PG, PIETERSE CMJ, SCHENK PM. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2552.
- [29] 毛贵珠, 章晔敏, 邵一凡, 熊妍妍, 陈小娥, 方旭波. 产壳聚糖酶土壤微生物的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(10): 1913-1917.
- MAO GZ, ZHANG YM, SHAO YF, XIONG YY, CHEN XE, FANG XB. Screening and identification of chitosanase-producing microorganisms from soil and optimization of the fermentation conditions[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(10): 1913-1917 (in Chinese).
- [30] 韩梅, 焦如珍, 董玉红. 卧龙自然保护区落叶阔叶林土壤微生物分布规律及功能菌的筛选[J]. 林业科学, 2013, 49(10): 113-117.
- HAN M, JIAO RZ, DONG YH. Distribution pattern of microbes in the deciduous broad-leaved forest soil and screening of functional bacteria in Wolong nature reserve[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(10): 113-117 (in Chinese).
- [31] 郭俊杰, 夏宁, 庄鑫, 陈佳雯, 胡星, 闫莉, 刘玉翠, 肖井雷. 内生菌 *Ilyonectria cyclaminicola* 固态发酵对淫羊藿药渣功效成分的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 428-431.
- GUO JJ, XIA N, ZHUANG X, CHEN JW, HU X, YAN L, LIU YC, XIAO JL. Effects of solid-state fermentation by endophytic fungus *Ilyonectria cyclaminicola* on functional components of *Epimedium* residues[J]. Journal of Li-shizhen Traditional Chinese Medicine, 2023, 34(2): 428-431 (in Chinese).
- [32] 徐金丽, 姜晓野, 鱼红闪, 安东善, 柳青梅, 任皖泽, 金凤燮. 水解淫羊藿苷糖基的土壤细菌筛选[J]. 大连轻工业学院学报, 2007, 26(4): 302-305.
- XU JL, JIANG XY, YU HS, AN DS, LIU QM, REN WZ, JIN FX. Screening of icariin glycosidase-secreting strains from soil[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2007, 26(4): 302-305 (in Chinese).
- [33] 谢炎福, 押辉远, 张新雨, 樊悦君, 赵冰, 王瑞鸽, 杨紫怡. 植物乳杆菌对淫羊藿黄酮苷类成分的转化作用[J]. 中国酿造, 2022, 41(12): 103-109.
- XIE YF, YA HY, ZHANG XY, FAN YJ, ZHAO B, WANG RG, YANG ZY. Biotransformation of flavonoid glycosides in *Epimedium* by *Lactobacillus plantarum*[J]. China Brewing, 2022, 41(12): 103-109 (in Chinese).
- [34] ZHANG SS, LU CN, CAO SP, LI Q, WU GW, ZHAO LG. Efficient production of icariin and baohuoside I from *Epimedium Folium* flavonoids by fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase hydrolysing regioselectively the terminal rhamnose of epimedin C[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 107.

- [35] 韩钟烧, 霍毅欣, 郭淑元. 芽孢杆菌耐受胁迫条件的机制及工业应用[J/OL]. 生物技术通报, 2024: 1-15. (2024-06-19). <https://link.cnki.net/doi/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0183>.
- HAN ZR, HUO YX, GUO SY. Mechanism and industrial application of *Bacillus* tolerance to stress conditions[J/OL]. Biotechnology Bulletin, 2024: 1-15. (2024-06-19). <https://link.cnki.net/doi/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0183> (in Chinese).
- [36] POPP PF, BENJEDIA A, STRAHL H, BERTEAU O, MASCHER T. The eptide YydF intrinsically triggers the cell envelope stress response of *Bacillus subtilis* and causes severe membrane perturbations[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 151.
- [37] RAI AK, SANJUKTA S, CHOURASIA R, BHAT I, BHARDWAJ PK, SAHOO D. Production of bioactive hydrolysate using protease,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* spp. isolated from kinema[J]. Bioresource Technology, 2017, 235: 358-365.
- [38] 任思雨, 刘少茹, 王舒蔚, 王克焕, 王玮, 谢天, 刘姝, 房耀维. 产  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶细菌 *Bacillus velezensis* 的筛选及酶学性质研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(2): 106-112.
- REN SY, LIU SR, WANG SW, WANG KH, WANG W, XIE T, LIU S, FANG YW. Screening and enzyme properties study of  $\alpha$ -L-rhamnosidase producing marine bacterium *Bacillus velezensis*[J]. China Food Additives, 2020, 31(2): 106-112 (in Chinese).
- [39] VARBANETS LD, MATSELIUK OV, GUDZENKO OV, NIDIALKOVA NA, ZELENA PP, YUMINA YV, STEPURA LG, SCHEPELEVICH VV, VOYCHUK SI. Screening of  $\alpha$ -L-rhamnosidases and peptidases among *Actinobacterium* and *Bacilli*[J]. Mikrobiolohichnyi Zhurnal, 2016, 78(3): 26-35.
- [40] CHANG TS, CHIANG CM, SIAO YY, WU JY. Sequential biotransformation of anticin K by *Bacillus subtilis* ATCC 6633[J]. Catalysts, 2018, 8(9): 349.
- [41] PAZ A, COSTA-TRIGO I, TUGORES F, MÍGUEZ M, deLa MONTAÑA J, DOMÍNGUEZ JM. Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhatai*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(10): 1671-1679.
- [42] XIA Q, XU DJ, HUANG ZG, LIU JJ, WANG XQ, WANG X, LIU SQ. Preparation of icariside II from icariin by enzymatic hydrolysis method[J]. Fitoterapia, 2010, 81(5): 437-442.
- [43] LYU YB, ZENG WZ, DU GC, CHEN J, ZHOU JW. Efficient bioconversion of epimedine C to icariin by a glycosidase from *Aspergillus nidulans*[J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121612.