

人参皂苷 Rb₁ 转化菌株筛选及转化产物分析李银飞¹, 梁应忠¹, 崔秀明^{1,3}, 邵琳娇¹, 娄灯吉^{*2}, 杨晓艳^{*1,3}

1 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100

3 云南省三七资源可持续发展利用重点实验室, 云南 昆明 650500

李银飞, 梁应忠, 崔秀明, 邵琳娇, 娄灯吉, 杨晓艳. 人参皂苷 Rb₁ 转化菌株筛选及转化产物分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2127-2136.

LI Yinfei, LIANG Yingzhong, CUI Xiuming, SHAO Linjiao, LOU Dengji, YANG Xiaoyan. Screening of a strain for ginsenoside Rb₁ transformation and analysis of its saponin products[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2127-2136.

摘要:【背景】许多微生物能够对皂苷类化合物进行生物转化, 因此, 通过微生物对皂苷类化合物不同位置结构的修饰能获得高活性的皂苷成分。【目的】从分离纯化的菌株中筛选能将人参皂苷 Rb₁ 转化为药理活性较高的稀有人参皂苷。【方法】从三七根际土壤及三七茎中分离纯化了 36 株真菌, 首先利用产 β-葡萄糖苷酶的方法对菌株进行皂苷转化活性初筛, 再以人参皂苷 Rb₁ 为底物进行皂苷转化活性复筛, 通过薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和质谱(mass spectrometry, MS)等方法对转化产物进行分析。【结果】筛选出一株对人参皂苷 Rb₁ 具有较高转化活性的菌株 F17, 通过形态学观察及对内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析, 菌株 F17 被鉴定为拟盘多毛孢属菌(*Pestalotiopsis biciliata*)。P. biciliata 可将人参皂苷 Rb₁ 转化为人参皂苷 Rd、稀有人参皂苷 F₂ 和 C-K, 转化路径为 Rb₁→Rd→F₂→C-K。【结论】本研究为稀有人参皂苷 F₂ 和 C-K 的微生物转化提供了新的菌种来源。

关键词: 人参皂苷 Rb₁; 生物转化; 稀有人参皂苷; β-葡萄糖苷酶; 真菌

资助项目: 云南省自然科学基金(202001AT070050); 国家自然科学基金(32060104)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province (202001AT070050) and the National Natural Science Foundation of China (32060104).

*Corresponding authors. E-mail: LOU Dengji, loudengji@yxnu.edu.cn; YANG Xiaoyan, yangxy@kust.edu.cn

Received: 2022-08-11; Accepted: 2022-10-22; Published online: 2022-12-27

Screening of a strain for ginsenoside Rb₁ transformation and analysis of its saponin products

LI Yinfei¹, LIANG Yingzhong¹, CUI Xiuming^{1,3}, SHAO Linjiao¹, LOU Dengji^{*2},
YANG Xiaoyan^{*1,3}

1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

2 School of Chemistry, Biology and Environment Sciences, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, Yunnan, China

3 Yunnan Provincial Key Laboratory of *Panax notoginseng*, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] Microbial transformation is an important means for structural modification of natural products. Many microorganisms can transform ginsenoside compounds into saponins with high activity by modifying the structure of different positions. [Objective] To screen a strain that can transform ginsenoside Rb₁ into rare ginsenosides with high pharmacological activity. [Methods] A total of 36 fungal strains were isolated from rhizosphere soil and stem of *Panax notoginseng* and purified. Primary screening of saponin transformation activity was performed with β -glucosidase method, followed by a second screening with ginsenoside Rb₁ as substrate. The transformation products were analyzed by TLC, HPLC, and MS. [Results] A strain F17 with high transformation activity of ginsenoside Rb₁ was screened out and it was identified as *Pestalotiopsis biciliata* based on morphological observation and ITS sequence analysis. It can transform ginsenoside Rb₁ into ginsenoside Rd and rare ginsenosides F₂ and C-K through the pathway of Rb₁→Rd→F₂→C-K. [Conclusion] This study provides a new strain for transformation of rare ginsenosides F₂ and C-K.

Keywords: ginsenoside Rb₁; biotransformation; rare ginsenosides; β -glucosidase; fungi

三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen.] 为五加科人参属植物,主要产于云南、广西等地,其药用部位是三七的干燥根及根茎^[1]。三七根中主要的药效成分是皂苷类,其中人参皂苷 Rb₁ 含量较高,而人参皂苷 C-K、F₂ 等含量则很少,或需要从其他含量较高的皂苷转化而来,被称之为稀有人参皂苷^[2-3]。含量较高的皂苷成分(人参皂苷 Rb₁ 等)生物利用度低,需通过水解去除 C-3、C-6 和 C-20 位的糖基生成稀有人参皂苷才能被机体吸收并发挥药理活性^[4]。研究表明,稀有人参皂苷具有更高的药理活性,如稀有人参皂苷 C-K 具有抗结直肠癌、抗炎作用^[5-6];稀有人参皂苷 F₂ 具有抗肥胖、减少脱发等作用^[7-8],但稀

有人参皂苷天然含量极少,不能满足药用需求,因此,如何大量获得稀有人参皂苷一直受到学者关注^[9]。生物转化法是获得稀有人参皂苷的主要手段之一,主要利用微生物菌株或其产生的酶通过水解、脱水、氧化、异构等反应对人参皂苷进行结构修饰,其中最常见的反应是糖苷键的水解,通过水解不同位置的糖苷键对人参皂苷进行结构修饰,从而得到稀有人参皂苷。生物转化法具有反应条件温和、产物稳定、环境污染小、高效转化等优点^[10]。例如, Fu 等^[11]利用从人参中分离出的内生细菌 *Burkholderia* sp. 将人参皂苷 Rb₁ 转化为稀有人参皂苷 Rg₃,转化率达 98%。人参皂苷 Rg₃ 具有抗乳腺癌作用^[12],也是 1949 年

以后我国第一个一类抗癌中药; Liu 等^[13]利用蘑菇 *Schizophyllum commune* 将人参皂苷 Rb₁ 转化为稀有人参皂苷 C-K; Park 等^[14]利用来自 *Arthrobacter chlorophenolicus* 的重组 β -葡萄糖苷酶将人参皂苷 Rb₁ 转化为稀有人参皂苷 F₂, 转化效果较好; Jiang 等^[15]从三七土壤中筛选出 *Aspergillus niger*, 将人参皂苷 Rb₁ 转化为具有抗结直肠癌、抗炎作用的稀有人参皂苷 C-K, 转化率高达 94%。可见通过生物转化的方法可将三七中主要的皂苷成分转化为具有更高药理活性的稀有人参皂苷。本研究以三七中主要的皂苷成分人参皂苷 Rb₁ 为底物, 筛选可对其进行生物转化的菌株, 以期通过生物转化获得药理活性更高的稀有皂苷。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

三七的茎和土壤于 2021 年 9 月采自昆明理工大学三七资源可持续利用重点实验室三七栽培大棚。

1.1.2 培养基

羧甲基纤维素培养基(CMC-Na)参照刘起丽等^[16]的方法配制。马铃薯葡萄糖液体(potato dextrose broth, PDB)培养基(g/L): 马铃薯浸出粉 5.0, 葡萄糖 15.0。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 在 PDB 中增加琼脂 25.0 g/L。

1.1.3 主要试剂和仪器

对照品人参皂苷 Rb₁、C-K、Rd、F₂ (HPLC \geq 98%), 四川省维克奇生物科技有限公司; 甲醇、乙腈, Sigma-Aldrich 科技有限公司; 马铃薯浸出粉、琼脂、羧甲基纤维素、刚果红, 上海源叶生物科技有限公司; 薄层层析硅胶板, 烟台江友硅胶开发有限公司。

Welchrom C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 月旭科技股份有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 高效液相色谱-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 土壤微生物的分离纯化

参照吴秀丽等^[17]的方法, 称取三七根际土壤 20 g 溶于 100 mL 无菌水, 将土样稀释至 10⁻¹–10⁻⁴, 分别取稀释液 100 μ L 涂布在 PDA 固体培养基上。将培养基置于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。重复挑取不同形态的菌落进行平板划线, 直至得到单一菌落即纯化的菌株。将最终纯化的菌株于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 三七茎中微生物的分离纯化

参照郭从亮等^[18]的方法, 将采集的新鲜三七茎用清水洗净, 先用 75% 的乙醇浸泡 1 min, 再用 2% 的次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 最后用无菌水冲洗 4–5 次。用无菌剪刀将消毒处理后的茎剪碎, 并放到含有(0.15 mg/mL)青霉素钾和(0.15 mg/mL)硫酸链霉素的 PDA 培养基中。将培养基置于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养。重复挑取不同形态的菌落进行平板划线, 直至得到单一菌落即纯化的菌株。将最终纯化的菌株于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选

菌株对人参皂苷的转化作用涉及糖苷键的水解, 所以本实验选用含有纤维素的 CMC-Na 培养基来初步筛选产 β -葡萄糖苷酶的菌株^[19]。

参考徐源等^[20]的方法, 选择产透明圈的菌株, 测量并记录透明圈和菌落直径并计算其比值(HC 值), HC 值=透明圈直径(hyaline circle diameter)/菌落直径(colonie diameter)。HC 值越大代表菌株产生 β -葡萄糖苷酶的能力越强。

1.2.4 高效转化人参皂苷 Rb₁ 菌株的筛选

采用产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选法对分离纯化的菌株进行初步筛选会出现假阳性(有些菌会产生分解色素的酶),需要进一步以人参皂苷 Rb₁ 为底物对初筛的菌株进行皂苷转化活性的复筛。

本实验设置了空白对照组和皂苷转化组,分别为接菌空白组(培养基中只添加菌,不添加人参皂苷 Rb₁)、皂苷空白组(培养基中只添加人参皂苷 Rb₁,不添加菌)和皂苷转化组(培养基中既添加人参皂苷 Rb₁,又添加菌),每组设置 3 个重复。

从 1.2.3 中选择 HC 值较大的菌株分别接种到马铃薯液体培养基中,26 °C、160 r/min 摇床培养 3–5 d 后加入底物浓度为 0.05 mg/mL 人参皂苷 Rb₁ (人参皂苷用水溶解配成浓度为 1 mg/mL 的溶液,每瓶加入 1 mL),继续摇床培养 20 d。

产率(%)=转化产物的量(mg)/转化底物的量(mg)×100。

1.2.5 菌株的形态学观察及分子生物学鉴定

将保存在试管斜面上的菌株 F17 取出,在无菌条件下挑取少量菌丝接种于 PDA 培养基上,放置于 25 °C 恒温培养箱中培养 3 d,观察并记录菌株 F17 的形态特征,通过荧光倒置显微镜观察菌丝形态。

菌株送于北京擎科生物科技有限公司进行 ITS 基因序列分析鉴定,将得到的测序结果上传到 NCBI 中进行比对,选择相似性较高的物种,利用 MEGA 7.0 软件通过邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.2.6 转化产物的分析

TLC 检测分析:发酵液采用水饱和正丁醇萃取,分层后取正丁醇层进行 TLC 检测。展开剂为氯仿:甲醇:水体积比 6:3.6:0.2;显色剂为 10%硫酸-乙醇溶液,110 °C 加热至显色。

HPLC 和 MS 分析:Welchrom C18 色谱柱

(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流速 1.0 mL/min;柱温 40 °C;检测波长 203 nm;进样量 20 μ L。洗脱条件见表 1。

2 结果与分析

2.1 微生物分离纯化结果

从三七茎中共分离出 17 株菌,依次标记为 F1–F17。从三七根际土壤中共分离出 19 株菌,依次标记为 S1–S19。

2.2 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选结果

2.2.1 三七茎微生物筛选结果

通过 CMC-Na 培养基对菌株进行初筛,筛选出 15 株能在 CMC-Na 培养基中产生透明圈的菌株,其透明圈和菌落直径如表 2 所示。HC 值=

表 1 高效液相色谱洗脱条件

Table 1 Elution conditions of HPLC

时间	A 水	B 乙腈
Time (min)	A Water (%)	B Acetonitrile (%)
0	80	20
30	80	20
60	55	45
78	25	75
85	0	100

表 2 不同菌株的透明圈直径与菌落直径比

Table 2 Ratio of transparent circle diameter to colony diameter of different strains

菌株编号	透明圈直径	菌落直径	HC 值
Strain No.	Transparent circle diameter (cm)	Colony diameter (cm)	HC value
F1	3.2	2.8	1.14
F2	2.7	2.4	1.13
F5	3.5	2.2	1.59
F6	2.3	1.6	1.43
F10	3.6	1.9	1.89
F11	5.6	5.1	1.09
F16	3.1	3.0	1.03
F17	4.0	3.4	1.17

透明圈直径/菌落直径, HC 值越大代表菌株产生 β-葡萄糖苷酶的能力越强, 所以选择 HC 值较大的菌株进行后期的实验。表 2 只展示 HC 值较大的菌株。

2.2.2 三七土壤微生物筛选结果

通过 CMC-Na 培养基对菌株进行初筛, 筛选出 8 株能在培养基中产生透明圈的菌株, 其透明圈和菌落直径如表 3 所示。HC 值=透明圈直径/菌落直径, HC 值越大代表菌株产生 β-葡萄糖苷酶的能力越强, 所以选择 HC 值较大的菌株进行后期的实验。表 3 只展示 HC 值较大的菌株。

2.3 高效转化人参皂苷 Rb₁ 菌株筛选结果

选择能在 CMC-Na 培养基中产透明圈且 HC 值较大的菌株 S3、S7、S8、S11、S13、F17 进行液体发酵转化实验。与转化底物人参皂苷 Rb₁ 相比, 菌株 S8、S11 和 S13 在薄层色谱板上未出现明显的小极性斑点, 表明这些菌株对皂苷无转化能力。菌株 S7、S3 和 F17 在薄层色谱板上均有小极性斑点出现, 表明具有将人参皂苷 Rb₁ 转化为其他皂苷的能力。与菌株 F17 相比, 菌株 S3、S7 转化产物较为单一, 菌株 F17 能够将人参皂苷 Rb₁ 转化为人参皂苷 Rd、F₂、C-K, 且转化效果较为明显、产物较多, 所以选择菌株 F17 进行后期实验。

表 3 不同菌株的透明圈直径与菌落直径比
Table 3 Ratio of transparent circle diameter to colony diameter of different strains

菌株编号 Strain No.	透明圈直径 Transparent circle diameter (cm)	菌落直径 Colony diameter (cm)	HC 值 HC value
S2	3.9	1.5	2.60
S3	5.6	5.0	1.12
S7	4.3	2.2	1.95
S8	5.0	2.1	2.30
S11	4.2	1.7	2.40
S12	0.0	2.4	0.00
S13	6.0	2.3	2.60
S16	4.6	4.3	1.06

2.4 菌株 F17 对单体皂苷 Rb₁ 的生物转化及路径分析

通过对转化产物的 TLC 连续监测, 发现以人参皂苷 Rb₁ 为底物发酵 15 d 时, 人参皂苷 Rb₁ 部分转化为人参皂苷 Rd; 发酵 20 d 时, 发酵产物中有人参皂苷 F₂、C-K 生成; 随反应时间的增加, 人参皂苷 C-K 的浓度有所增加; 发酵到 25 d 时, 人参皂苷 Rb₁ 几乎被完全转化(图 1)。对转化产物进行 HPLC 分析(图 2), 根据峰面积计算出产物中皂苷的含量、底物及产物含量变化见图 3。HPLC 结果与 TLC 检测结果一致, 产物中皂苷的种类都是人参皂苷 Rd、F₂ 和 C-K。

为探讨菌株 F17 对人参皂苷 Rb₁ 的生物转化路径, 在转化过程中对转化底物及产物进行了动态监测, 并采用 HPLC 和 MS 检测方法对转化产物进行定性及定量分析, 结果如图 3 所示。同时, HPLC (图 2) 及 MS (图 4) 检测结果进一步确定了

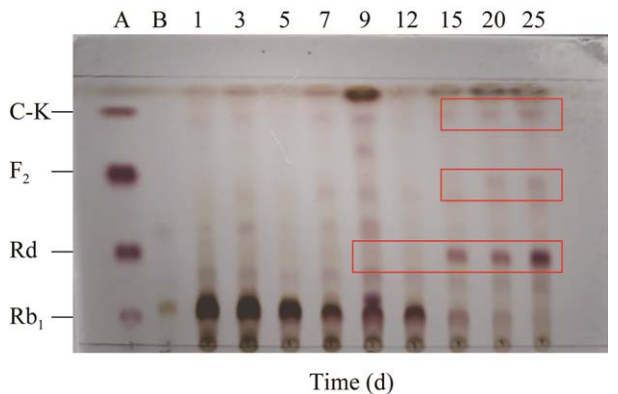


图 1 转化过程中不同转化时间菌株 F17 对人参皂苷 Rb₁ 的 TLC 分析结果 A: 对照品人参皂苷 Rb₁、Rd、F₂ 和 C-K. B: 培养基+菌对照组; 1、3、5、7、9、12、15、20、25 为 F17 菌株在不同培养天数对人参皂苷 Rb₁ 的转化结果
Figure 1 TLC analysis of dynamic change of ginsenoside Rb₁ during biotransformation process by strain F17 at different time. A: Ginsenosides Rb₁, Rd, F₂, C-K. B: The culture liquid of strain F17; The results of ginsenosides Rb₁ by strain F17 at different transformation time (1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25 d).

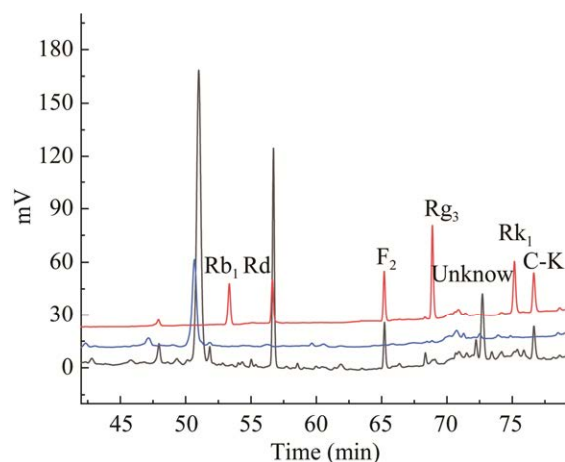


图2 菌株 F17 对人参皂苷 Rb_1 转化产物的 HPLC

图 A: 对照品人参皂苷 Rb_1 、 Rd 、 F_2 、 Rg_3 、 Rk_1 、C-K. B: 菌株+培养基对照组. C: 皂苷转化组

Figure 2 HPLC analysis of transformation products of ginsenoside Rb_1 by strain F17. A: The peaks: ginsenosides Rb_1 , Rd , F_2 , Rg_3 , Rk_1 , C-K. B: The culture liquid of strain F17. C: The converted products of strain F17.

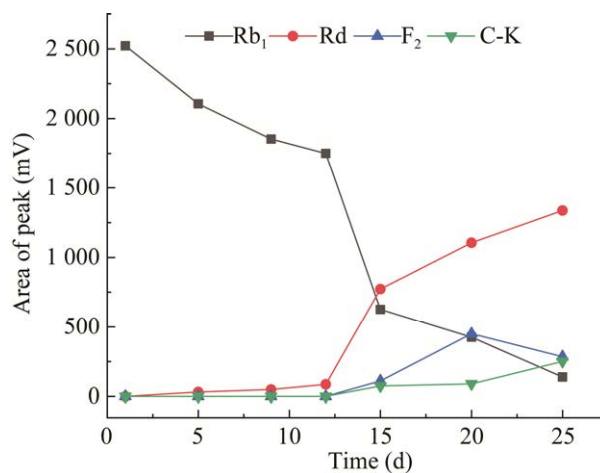


图3 菌株 F17 转化人参皂苷 Rb_1 过程中皂苷成分的含量变化 底物: 人参皂苷 Rb_1 ; 产物: 人参皂苷 Rd 、 F_2 、C-K

Figure 3 Dynamic change of ginsenosides content during biotransformation process by strain F17. Substrates: Ginsenoside Rb_1 ; Products: Ginsenoside Rd , F_2 and C-K.

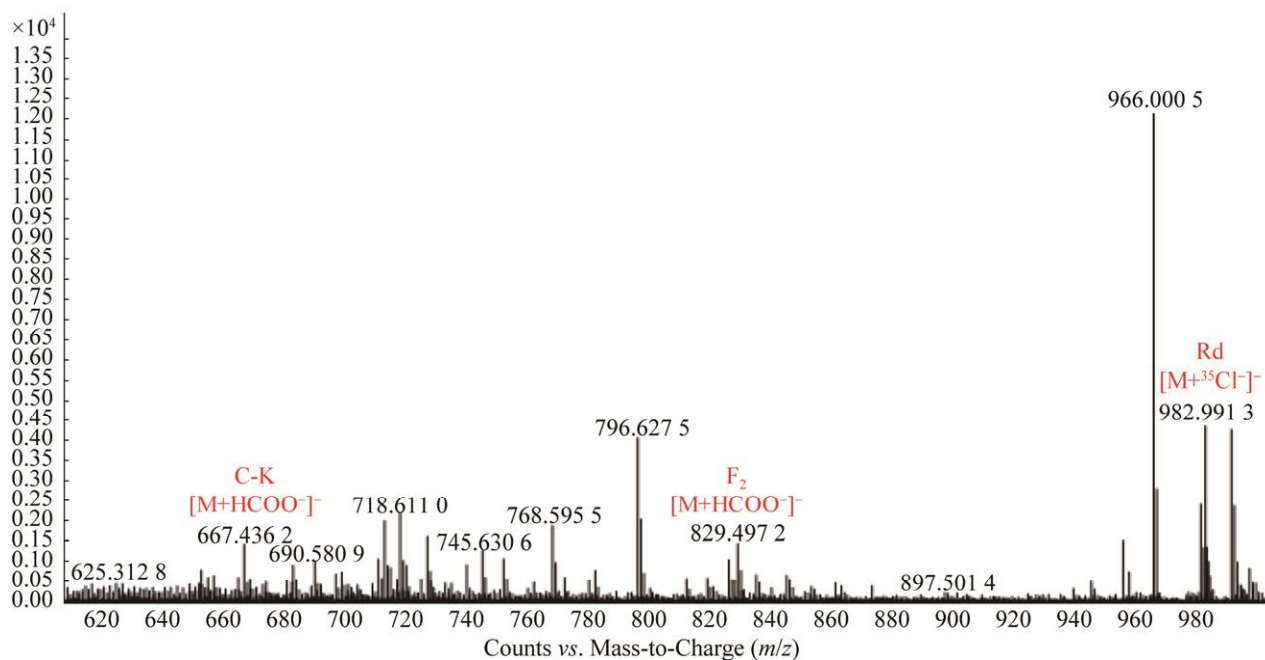


图4 菌株 F17 对人参皂苷 Rb_1 转化产物的 MS 图谱 图中 Rd 、 F_2 和 C-K 为 Rb_1 的转化产物, 对应的峰为转化产物的碎片离子峰

Figure 4 MS analysis of ginsenoside Rb_1 transformed by strain F17. Rd , F_2 and C-K are the transformation products of Rb_1 , and the corresponding peaks are the fragment ion peaks of the transformation products in the figure.

人参皂苷 Rb₁ 的转化产物是人参皂苷 Rd、F₂、C-K。根据图 3 可以得出, 以人参皂苷 Rb₁ 为底物发酵到 12 d 时转化产物中只有人参皂苷 Rd, 可以确定此转化路径为 Rb₁→Rd; 发酵至 20 d 时转化产物中增加了人参皂苷 F₂ 和 C-K, 结合二者的结构特点, 我们初步判断 Rd 的转化途径可能有 2 条, 分别是 Rd→F₂→C-K 和 Rd→F₂ 和 C-K。为了进一步确认人参皂苷 C-K 的由来, 我们以人参皂苷 F₂ 为底物进行转化(图 5), 由图 5 可以确定, 人参皂苷 F₂ 可以转化为 C-K, 推测人参皂苷 F₂ 转化路径为 F₂→C-K。综上可以确定人参皂苷 Rb₁ 转化为人参皂苷 Rd、F₂ 和 CK, 转化路径为 Rb₁→Rd→F₂→C-K。菌株 F17 对人参皂苷 Rb₁ 的可能转化途径见图 6。

2.5 HPLC 检测结果

菌株 F17 以 1 mg 人参皂苷 Rb₁ 为底物进行转化时, 转化产物中产生了新的皂苷成分 Rd、F₂ 和 C-K, 它们的含量分别是 0.53、0.11 和 0.10 mg, 以上三者的产率分别为 53%、11%和 10%。

2.6 菌株 F17 的形态学及分子生物学鉴定结果

菌株 F17 在 PDA 培养基上前期为白色, 后

期中心部分逐渐变为粉红色, 絮状菌丝, 边缘整齐无波浪状, 菌丝浓密, 菌落背面淡黄色(图 7)。对菌株进行 ITS 基因序列测定后, 将测序结果上传到 NCBI 中进行比对, 菌株 F17 与 *Pestalotiopsis* 菌的 ITS 序列的相似性为 100%。利用 MEGA 7.0 软件通过 neighbor-joining 法构建系统发育树, 结果如图 8 所示, 菌株 F17 与 *Pestalotiopsis biciliata*

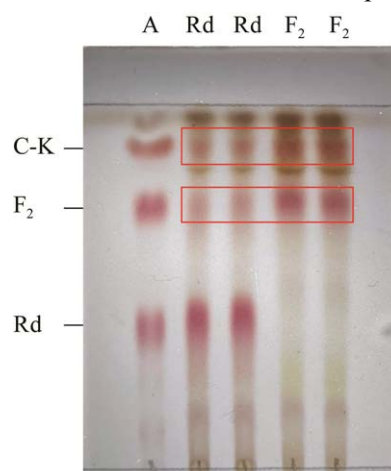


图 5 菌株 F17 对人参皂苷 Rd 和 F₂ 转化结果的 TLC 分析图 A: 人参皂苷对照品

Figure 5 TLC analysis of the transformation of ginsenosides Rd and F₂ by strain F17. A: The ginsenosides Rd, F₂, C-K.

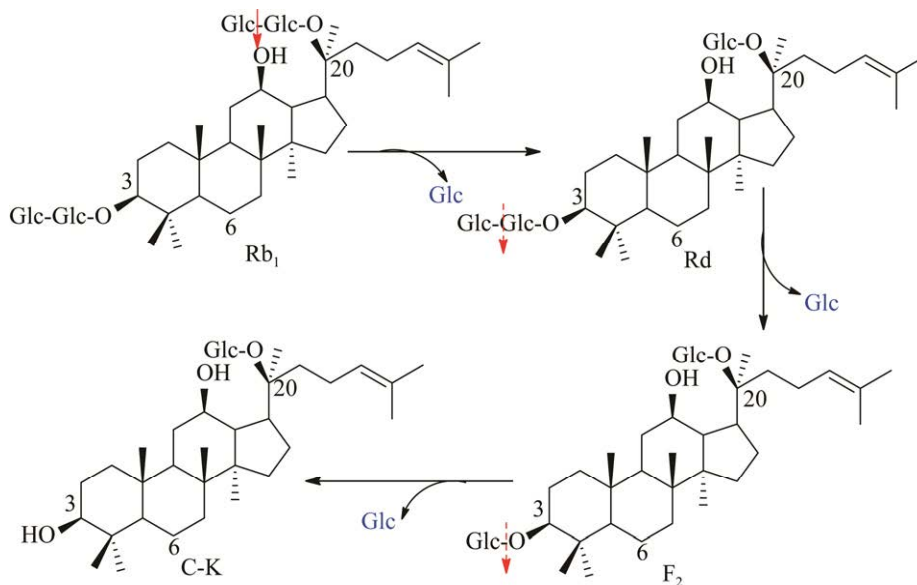


图 6 菌株 F17 对人参皂苷 Rb₁ 进行转化的可能转化路径图

Figure 6 The proposed biotransformation pathway of ginsenosides Rb₁ by strain F17.

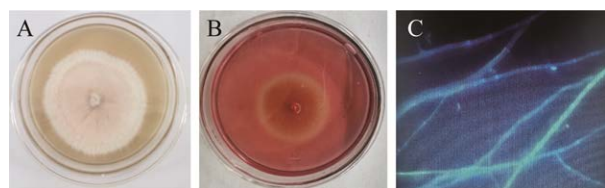


图 7 菌株 F17 的菌落形态特征 A: 菌株 F17 平板菌落形态. B: 菌株 F17 纤维素水解活性测定. C: 菌丝荧光显微图

Figure 7 The morphological characteristics of strain F17. A: The photographs of the colonial morphology of strain F17 on the plate. B: Determination of cellulose hydrolytic activity of strain F17. C: Fluorescence micrograph of mycelium from strain F17.

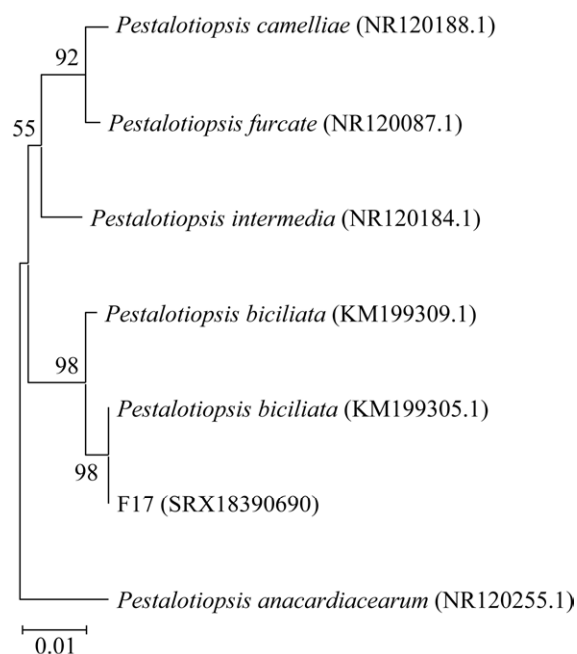


图 8 菌株 F17 基于 18S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内为菌株的 ITS 序列在 GenBank 的登录号; 分支结点处数字为 bootstrap 值; 标尺的数据为进化距离

Figure 8 Phylogenetic tree of strain F17 based on 18S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the ITS sequences of the strain; The numbers on the branches refer to bootstrap values; The scale bar represents sequence divergence.

位于同一分支, 亲缘关系较近, 据此鉴定菌株 F17 为拟盘多毛孢属菌(*Pestalotiopsis biciliata*)。

3 讨论与结论

菌株 F17 能有效地将三七根中含量较高的人参皂苷 Rb_1 转化为三七本身含量少但活性较高的人参皂苷 F_2 、C-K 和人参皂苷 Rd, 转化路径为 $Rb_1 \rightarrow Rd \rightarrow F_2 \rightarrow C-K$, 产率分别为 53%、11%和 10%, 经形态学观察和 ITS 序列分析, 该菌株被鉴定为拟盘多毛孢属菌(*Pestalotiopsis biciliata*)。

对比转化底物及产物的结构特点, 可以看出菌种 *P. biciliata* 既能水解人参皂苷 Rb_1 的 C-20 位上的糖基, 又能水解其 C-3 位上的糖基。在这个过程中, *P. biciliata* 首先水解 C-20 位外侧糖基, 其次水解 C-3 位的外侧糖基, 最后水解 C-3 位的内侧糖基, 但不能进一步水解 C-20 位内侧糖基, 最终产生人参皂苷 Rd、 F_2 和 C-K。因此可利用该菌的这一选择性制备人参皂苷 C-K, 也可以根据不同时间段产生的皂苷含量规律来制备人参皂苷 Rd 和 F_2 。

三七作为我国传统名贵中药具有广阔的应用前景, 稀有人参皂苷是其重要的活性成分, 但其含量极低或需要经过肠道菌转化才能产生。将三七中常见的含量较高的人参皂苷转化为稀有人参皂苷是提高其药理活性和生物利用率的关键。人参皂苷 Rb_1 是三七中含量较高的皂苷成分, 本文首次发现 *P. biciliata* 能对其糖基进行修饰和转化, 从而获得药理活性更高的稀有人参皂苷 C-K 等, 为制备稀有人参皂苷提供了新的菌种来源, 同时为其规模化生产提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] 陈良妮, 陈勇, 刘玟君, 黄周艳, 韩倩. 三七叶总皂苷对中枢神经系统的作用研究进展[J]. 2019(1): 88-92,

107.
CHEN LN, CHEN Y, LIU WJ, HUANG ZY, HAN Q. Research progress on the effects of total Saponins from *Panax notoginseng* leaves on central nervous system[J]. Study on Zhuang Yao Medicine, 2019(1): 88-92, 107 (in Chinese).
- [2] CAO LG, WU H, ZHANG H, ZHAO Q, YIN X, ZHENG DR, LI CW, KIM MJ, KIM P, XUE ZY, WANG Y, LI YH. Highly efficient production of diverse rare ginsenosides using combinatorial biotechnology[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1615-1627.
- [3] 艾强, 雷阳, 张厚才, 薛坤鹏, 金艳蕾. UPLC 法测定三七总皂苷含量[J]. 现代农业科技, 2016(14): 274-275.
AI Q, LEI Y, ZHANG HC, XUE KP, JIN YL. Determination of total saponins in *Panax notoginseng* by UPLC[J]. XianDai NongYe KeJi, 2016(14): 274-275 (in Chinese).
- [4] 刘慧颖, 王承潇, 杨野, 杨晓艳, 崔秀明, 曲媛. 微波辅助降解三七茎叶总皂苷生成人参皂苷 Rg₅ 的工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3245-3251.
LIU HY, WANG CX, YANG Y, YANG XY, CUI XM, QU Y. Optimization of production of ginsenoside Rg₅ by microwave-assistant degradation method of total saponins from stems and leaves of *Panax notoginseng*[J]. Acupuncture Research, 2018, 49(14): 3245-3251 (in Chinese).
- [5] 张丽娜, 明有山, 曲波权, 全艳玲, 丛景香, 吴秀红. 微生物转化人参皂苷 Re 为人参皂苷 Rh₁ 的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(11): 114-117.
ZHANG LN, MING YS, QU BQ, QUAN YL, CONG JX, WU XH. Microbial transformation of ginsenoside Rh₁ from ginsenoside Re[J]. China Brewing, 2017, 36(11): 114-117 (in Chinese).
- [6] 梁志齐, 张京楼, 金海珠, 成乐琴. 人参皂苷 Rg₃ 生物转化法制备 Rh₂[J]. 人参研究, 2018, 30(3): 6-10.
LIANG ZQ, ZHANG JL, JIN HZ, CHENG YQ. Microbiological transformation of ginsenoside Rg₃ into Rh₂[J]. Renshen Yanjiu, 2018, 30(3): 6-10 (in Chinese).
- [7] YANG CS, KO SR, CHO BG, SHIN DM, YUK JM, LI SJ, KIM JM, EVANS RM, JUNG JS, SONG DK, JO EK. The ginsenoside metabolite compound K, a novel agonist of glucocorticoid receptor, induces tolerance to endotoxin-induced lethal shock[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008, 12(5A): 1739-1753.
- [8] WANG CZ, DU GJ, ZHANG ZY, WEN XD, CALWAY T, ZHEN Z, MUSCH MW, BISSONNETTE M, CHANG EB, YUAN CS. Ginsenoside compound K, not Rb₁, possesses potential chemopreventive activities in human colorectal cancer[J]. International Journal of Oncology, 2012, 40(6): 1970-1976.
- [9] 蔡小雨, 闫培生, 高秀君, 陈琪琪, 郭长禄, 刘润东, 梁浩, 张明臣. 人参皂苷生物转化的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(4): 52-60.
CAI XY, YAN PS, GAO XJ, CHEN QQ, GUO CL, LIU RD, LIANG H, ZHANG MC. Research progress of ginsenoside biotransformation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018, 20(4): 52-60 (in Chinese).
- [10] 南博, 游颖, 王雨珊, 王心哲, 李万丛, 王玉华. 微生物法转化人参皂苷的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 196-199.
NAN B, YOU Y, WANG YS, WANG XZ, LI WC, WANG YH. Research progress on microbial transformation of ginsenosides[J]. Food Research and Development, 2017, 38(14): 196-199 (in Chinese).
- [11] FU Y, YIN ZH, YIN CY. Biotransformation of ginsenoside Rb₁ to ginsenoside Rg₃ by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE 17-7 isolated from *Panax ginseng*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(6): 1579-1585.
- [12] YUAN ZG, JIANG H, ZHU XH, LIU XG, LI JH. Ginsenoside Rg₃ promotes cytotoxicity of Paclitaxel through inhibiting NF-KB signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 89: 227-232.
- [13] LIU Z, LI JX, WANG CZ, ZHANG DL, WEN X, RUAN CC, LI Y, YUAN CS. Microbial conversion of protopanaxadiol-type ginsenosides by the edible and medicinal mushroom *Schizophyllum commune*: a green biotransformation strategy[J]. ACS Omega, 2019, 4(8): 13114-13123.
- [14] PARK MK, CUI CH, PARK SC, PARK SK, KIM JK, JUNG MS, JUNG SC, KIM SC, IM WT. Characterization of recombinant β -glucosidase from *Arthrobacter chlorophenolicus* and biotransformation of ginsenosides Rb₁, Rb₂, rc, and rd[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2014, 52(5): 399-406.
- [15] JIANG YY, LI WN, FAN DD. Biotransformation of ginsenoside Rb₁ to ginsenoside CK by strain XD101: a safe bioconversion strategy[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(7): 2110-2127.
- [16] 刘起丽, 张建新, 徐瑞富, 孔凡彬, 黄伟东. 纤维素刚果红培养基筛选产纤维素酶菌株的影响因素研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 279-281.
LIU QL, ZHANG JX, XU RF, KONG FB, HUANG WD. The influence aspects on using cellulose culture medium

- containing Congo red differential medium to screen microorganism producing cellulase[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2007, 16(5): 279-281 (in Chinese).
- [17] 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.
- WU XL, LIU C, CHEN J. Microbial transformation of ginsenoside Re by *Aspergillus niger*[J]. *China Modern Medicine*, 2011, 18(33): 7-9 (in Chinese).
- [18] 郭从亮, 杨晓艳, 陈子明, 武双, 王承潇, 黄璐琦, 崔秀明. 一株植物内生菌 *Coniochaeta* sp.对三七总皂苷中人参皂苷 Rb1 的特异性转化含量测定[J]. *中药材*, 2016, 39(5): 1075-1078.
- GUO CL, YANG XY, CHEN ZM, WU S, WANG CX, HUANG LQ, CUI XM. The content determination of biotransformation of Rb1 in the total saponins of *Panax notoginseng* by a plant endophyte *Coniochaeta* sp.[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2016, 39(5): 1075-1078 (in Chinese).
- [19] 杨力权, 毛金山, 桑鹏, 陈贵元. 1 株产高温糖苷酶菌株的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(4): 18-23.
- YANG LQ, MAO JS, SANG P, CHEN GY. Screening, identification and enzymatic properties of a strain producing thermophilic glucosidase[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(4): 18-23 (in Chinese).
- [20] 徐源, 崔继鹏, 武秋颖, 范永山. 高活性纤维素酶食用菌菌种筛选[J]. *唐山师范学院学报*, 2019, 41(3): 64-66.
- XU Y, CUI JP, WU QY, FAN YS. Screening of edible mushrooms with high cellulase activity[J]. *Journal of Tangshan Teachers College*, 2019, 41(3): 64-66 (in Chinese).