

真菌 β -葡萄糖苷酶在转化人参皂苷单体中的应用进展

朱大伟, 王宇*, 李玉花*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 人参皂苷是一类具有抗疲劳及提高免疫力等功能的固醇类化合物, 其中含量极少的稀有人参皂苷 Rg₃、Rh₂ 等还具有抗癌的功效, 是主要活性成分, 拥有广阔的应用前景。研究发现真菌可以产生能够水解人参皂苷糖基的 β -葡萄糖苷酶, 可以有效水解人参皂苷的糖基, 将大量的常见皂苷转化为稀有皂苷, 是大量获得稀有人参皂苷的新途径。本文对人参皂苷合成途径、糖基分布及数量与抗肿瘤的效果、 β -葡萄糖苷酶的性质及其催化人参皂苷单体转换的规律进行了综述。相信随着现代分子生物学技术和酶工程的发展, 工业上大规模获得稀有人参皂苷将有望实现。

关键词: 人参皂苷; β -葡萄糖苷酶; 真菌; 糖基修饰

中图分类号: Q946.93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.026

Review on Conversion of Ginsenoside by Fungal β -D-Glucosidase

ZHU Da-wei, WANG Yu*, LI Yu-hua*

College of life science, Northeast Forestry University, Harbin150040, China

Abstract: Ginsenosides, the main pharmacologically active natural compounds in ginseng (*Panax ginseng*), have multiple medical effects such as anti-oxidative, anti-cancer, antiaging and other health-improving activities. Rh₂ and Rg₃ are rare ginsenosides which represent promising candidates for cancer prevention and therapy and have low toxicity. Recent research showed that β -D-glucosidase from fungi can convert major ginsenosides into rare ginsenosides via the hydrolyses of glucoside. In this review, the pathway of biosynthesizing ginsenosides, anti-cancer activities of different classes of ginsenosides were summarized and recent works on functional characterization of β -D-glucosidase were highlighted. These breakthroughs provided an inexpensive and efficient industrial platform for the manufacture of ginsenosides for clinical applications.

Key words: ginsenoside; β -D-glucosidase; fungi; glycosylation modification

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 在传统中医中作为珍贵的药材已有 5000 多年的历史。19 世纪末, 在中国工作的英国外科医生 Smith FP 和 Stuart GA 第一次向西方国家介绍了人参的药用价值。之后越来越多的中外学者对人参的生理特性、药用价值、培育繁殖技术进行了研究。现代研究发现, 人参中的主要药效成分为人参皂苷, 具有调节内分泌、增强免疫力、抗疲劳和抗衰老等功能, 特别是含量非常低的稀有人参皂苷具有抗癌、抗肿瘤活性, 并对多种肿瘤细胞具有明显杀伤效果。人参皂苷虽具有良好的药用和保健效果, 但由于人参生产占用山坡林地和耕地, 存在连作障碍、生长周期长、种植成本高等

限制, 而且稀有人参皂苷在天然人参中的含量极低。如何利用较低成本获得更多的稀有人参皂苷单体以及让这类人参皂苷单体更好的被人体吸收以发挥治疗和保健效果是当前的研究热点。目前人工获得稀有人参皂苷的主要手段大致分为加热、酸水解、碱水解及催化酶法。基于酸、碱水解和加热的化学水解法, 反应剧烈且副产物多, 不利于人参皂苷的大量回收和纯化。利用糖苷酶进行生物水解较化学反应而言, 具有反应条件温和、反应后处理简单、污染小、成本低等优点。

β -葡萄糖苷酶作为一种天然的酶制剂可以高效水解芳香基或烷基与糖基原子团之间的糖苷键, 在纤维素分解、大豆异黄酮转化、色素生产和食品工业等领域中有着广泛的应用。 β -葡萄糖苷酶可以水解人参皂苷骨架上的糖基, 从而得到糖基修饰较少的稀有人参皂苷。目前研究者从真菌中分离出多种针

收稿日期: 2016-12-13 接受日期: 2017-03-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2572016BA06); 黑龙江省应用技术与开发计划 (GY2016ZB0097); 国家林业局 948 项目 (2014-4-60)

* 通信作者 E-mail: lyhshen@126.com

对不同种人参皂苷具有水解作用的 β -葡萄糖苷酶,根据其作用底物与水解糖苷键的位置不同,成功获得多种稀有人参皂苷单体。本文针对能够水解人参皂苷的真菌类 β -葡萄糖苷酶的性质、种类及其相应催化位点进行了总结,同时分析了不同种类 β -葡萄糖苷酶酶切糖基的能力和效率及其来源,并对人参皂苷糖基数量对提高免疫力和抗肿瘤效果,以及 β -葡萄糖苷酶的催化位点与不同位点糖基水解规律进行了分析,以期对相关研究者提供参考。

1 人参皂苷合成代谢及药理活性

1.1 人参皂苷的生物合成途径

目前已在人参中发现了150多种天然人参皂苷单体^[1]。根据糖苷配基骨架的不同,可以将人参皂苷分为两大类:达玛烷型和齐墩果烷型。达玛烷型皂苷又可以分为三种:原人参二醇型(PPD)、原人参三醇型(PPT)以及拟人参皂苷(图1)。原人参二醇型皂苷类固醇骨架的C3或C20位 β -OH附近发生糖基化修饰,例如人参皂苷Rg₃、Rh₂、Ra₃、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc和Rd等;原人参三醇的糖基化发生在C6

或C20位 β -OH附近,例如Re、Rf、Rg₁、Rg₂、Rh₁、F₁等;拟人参皂苷在C20位有一个含氧五元环,大多数拟人参皂苷存在于其他人参属物种,如西洋参、竹节参、*Panax vietnamensi*等(表1)。人参皂苷主要通过甲羟戊酸(MVA)途径产生,在此途径中以法尼基焦磷酸(IPP)为底物,在牻牛儿苗焦磷酸(GPS)、法尼基焦磷酸合成酶(FPS)、鲨烯合成酶(SQS)和鲨烯环氧酶(SE)的催化下合成重要的中间产物2,3-环氧角鲨烯^[2,3]。一部分2,3-环氧角鲨烯在达玛烷二醇合成酶(DS)的催化下生成达玛烷二醇,并在不同的细胞色素P450的羟基化作用下形成原人参二醇(PPD)和原人参三醇(PPT),最后在糖基转移酶(GTs)的修饰下形成不同类型的人参皂苷单体。另一部分2,3-环氧角鲨烯在 β -香树素合酶(AS)等酶的催化下最终生成齐墩果酸。天然的人参皂苷由亲水性的羟基和亲脂性的甾体基团两部分组成,人参皂苷骨架上不同的位置拥有不同数量的羟基造成各单体之间物理化学性质及生物活性上存在着差异^[4]。

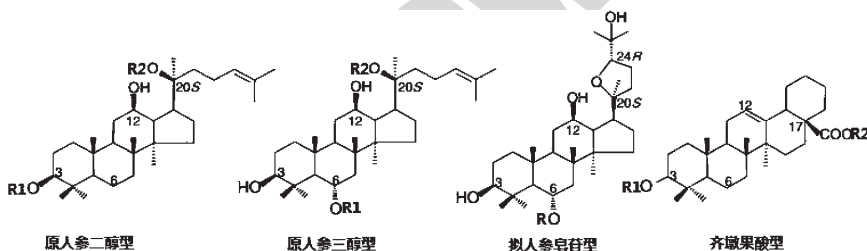


图1 四种类型人参皂苷骨架的结构示意图

Fig. 1 Structures of the four main types ginsenoside

表1 人参皂苷化学结构

Table 1 Chemical structures of ginsenosides

类型 Type	人参皂苷 Ginsenoside	R1	R2
原人参二醇型 Protopanaxadiol type	Rb ₁	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc-(6→1)-Glc
	Rb ₂	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc-(6→1)-Arap
	Rc	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc-(6→1)-Araf
	Rd	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc
	Rg ₃	-Glc-(2→1)-Glc	-H
	Rh ₂	-Glc	-H
	F2	-Glc	-Glc
	CK	-H	-Glc
原人参三醇型 Protopanaxatriol type	Re	-Glc-(2→1) Rha	-Glc

类型 Type	人参皂苷 Ginsenoside	R1	R2
齐墩果酸型 Oleanane type	Rf	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc
	Rg ₁	-Glc	-Glc
	Rg ₂	-Glc-(2→1) Rha	-Glc
	Rh ₁	-Glc	-H
	F1	-H	-Glc
	Ro	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc
	Roa	-Glc-(2→1)-Glc	-Glc-(6→1)-Glc

1.2 人参皂苷的糖基代谢及对药理活性的影响

1.2.1 人参皂苷的药理活性

人参作为一种名贵中药材,具有复杂的药理活性,人参皂苷作为主要的药理活性物质已经得到证明,目前已经大量的研究证明人参皂苷具有抑制肿瘤细胞生长、降血糖、抗疲劳、抗衰老、调节免疫系统和神经系统的作用。金建生等发现人参皂苷单体 Rg₁ 可以通过上调周期调控因子 CDK4 并下调周期调控因子 p16 的表达,从而发挥其抗 t-BHP 诱导的 WI-38 细胞衰老作用^[5];人参皂苷 CK 可以激活 AMPK 对 2 型糖尿病糖异生信号通路调控,抑制糖异生关键酶 PEPCK 和 G6Pase 的表达,并对核转录因子 PGC-1 α 、FOXO1、HNF4 α 的蛋白表达有抑制作用,通过这种调控机制可以有效抑制肝脏过度糖异生,减少内源性葡萄糖的生成^[6];郭志廷等发现人参皂苷单体 Rh₂ 可以显著提高小鼠 NK 细胞的杀伤活性,增强巨噬细胞的代谢功能,并能明显促进 T 细胞分泌 IFN- γ 及腹腔巨噬细胞 TNF- α 的分泌^[7]。此外还发现人参皂苷单体 Rg₃ 可显著增强 NK 细胞的吞噬活性,并能增加小鼠血清溶血素含量和抗体生成细胞的数量,从而增强小鼠的体液免疫功能^[8]。在人参皂苷的诸多药理活性中,人参皂苷对多种肿瘤细胞的杀伤抑制作用,及其提高药物对癌细胞敏感性的作用,成为近年来人参药用研究的热点。

1.2.2 人参皂苷糖基数量对提高免疫力和抗肿瘤效果的影响

在人参及其他人参属的植物中,糖基化修饰程度高的人参皂苷单体占总皂苷的比例较高,如人参皂苷单体 Rb₁、Rb₂、Rc 等占了皂苷总量的 50% 以上,而被称为稀有人参皂苷的 Rh₂、Rg₃ 等只占人参干重的 0.001% 和 0.015%^[9]。人参皂苷抗癌活性不但受人参皂苷苷元和 C20 位绝对构型的影响,还与糖基化修饰程度之间存在密切联系,抗癌活性的

强弱与糖基的数量有显著的相关性。拥有四个或更多的糖基的人参皂苷并没有抗癌的活性,例如 Rb₁、Rc^[10,11]。而像 Rd 这种有 3 个糖基修饰的皂苷,具有相对较弱的抗癌活性^[12]。相比之下有一或两个糖基的 Rh₂、Rg₃ 以及没有糖基修饰的原人参二醇对多种肿瘤细胞具有抑制作用。研究发现,人参皂苷单体 Rg₃ 可以通过减少肿瘤细胞对纤维粘连蛋白和层粘连蛋白的粘附、抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达和肿瘤新生血管的形成、降低肿瘤细胞内的 Ca²⁺ 离子浓度,从而起到抑制肿瘤生长和转移的作用^[13]。Rh₂ 与 Rg₃ 虽然只有一个糖基的差异,但前者对不同肿瘤细胞的抑制能力是后者的 5~16 倍^[14]。人参皂苷单体 Rh₂ 对多种癌症细胞具有特异性的抑制效果, Kim YS 等研究发现人参皂苷单体 Rh₂ 可诱导人骨髓白血病细胞 HL-60 再分化为正常的粒细胞,并通过上调蛋白激酶 C 的表达水平使细胞分裂停留在 G1 期或 S 期,从而抑制肿瘤生长。人参皂苷化合物 K (CK) 可以增加抗肿瘤药物对肿瘤细胞的杀伤作用并能诱导黑色素瘤细胞的凋亡,对经肿瘤坏死因子 α 诱导后的人体星形胶质细胞间黏附分子 1 的表达具有较强的抑制作用^[15,16]。综上所述,人参皂苷骨架侧链糖基越少,其抗癌活性就越强,糖基增多反而抑制了其抗癌活性。

前期实验发现动物对人参皂苷的消化是水解糖基的过程,直接摄入人参皂苷单体 Rh₂ 与体外模拟消化的产物不同, Rh₂ 很难被模拟消化液分解,仅被轻微的氧化^[17-19]。经研究发现人参皂苷主要是通过人类肠道细菌水解糖基后被人体吸收的。原人参二醇型皂苷 (Rb₁、Rb₂、Rc 和 Rd) 可以通过肠道细菌水解为能被人体吸收的化合物 K (CK)^[20]。另外有研究发现人参皂苷 Rb₁ 被人体肠道内的细菌逐步水解为原人参二醇^[21]。Kim 等发现人参皂苷单体 Re 可以被肠道细菌水解为 Rh₁, 而 Bea 等研究发现

人参皂苷单体 Re 的代谢产物中除了 Rh₁ 外还有人参皂苷单体 F1 的存在^[22,23]。由此可以看出同种人参皂苷在肠道菌群的作用下,其代谢产物的种类重现性较差。不同物种的肠道菌群组成有所不同,从而导致其代谢产物不同,但是相同物种由于个体之间的差异,也会导致代谢产物出现差异^[24]。目前在肠道细菌中发现了以 β -葡萄糖苷酶为代表的多种可以水解人参皂苷的水解酶类,正是由于这些水解酶的作用使得人参皂苷可以在消化道内分解代谢。

2 β -葡萄糖苷酶

2.1 β -葡萄糖苷酶的性质及应用

β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase, EC3. 2. 1. 21)可以有效水解芳香基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键,也能够水解人参皂苷苷元与糖配基之间的糖苷键,属于纤维素酶类,也被称为纤维二糖酶或龙胆二糖酶。 β -葡萄糖苷酶相对分子量一般在 40 ~ 250

kD 之间,最适 pH 一般在 5 ~ 7 左右,偏酸性,反应温度在 40 ~ 110 °C 之间均有分布。 β -葡萄糖苷酶不但是参与生物体糖代谢,维持生物体正常生理活动的重要酶类,还是一种来源广泛、价格低廉的风味酶制剂,在果汁、茶叶等饮品加工业中有广泛的应用。此外 β -葡萄糖苷酶对多种黄酮类物质有很好的水解作用,可以高效地水解大豆异黄酮,得到具有提高人体免疫力功能的异黄酮苷元。

2.2 β -葡萄糖苷酶的分类及催化

根据氨基酸序列的不同,可以将 β -葡萄糖苷酶归属于糖苷酶家族一和三。第一家族中的 β -葡萄糖苷酶主要来源于细菌、植物和哺乳动物,而来自真菌的 β -葡萄糖苷酶属于第三家族^[25]。由于结构和组成的不同,不同来源的 β -葡萄糖苷酶在相对分子量上有很大差异。带有羧基基团的酸性氨基酸,在 β -葡萄糖苷酶行使催化功能过程中起着重要的作用,酶的亲核催化中心和酸碱催化中心都含有酸性

A			
<i>Ara.thaliana</i>	BGL01_ARATH	183 VKFWTTI NEAIFITIGGYNDGNSPPGRC-----PVYILENGKTMNQDLEL---- 417	
<i>Ara.thaliana</i>	BGL09_ARATH	177 VKLWTTI NEATIFAIGSYDQGTAPPGHC-----PVYILENGMPMVRDSTL---- 407	
<i>Ory.satviva</i>	BGL07_ORYSJ	196 VKHWFTFN EPRIVALLGYDQGTNPPKRC-----TVVITENGMDQPAN--LSRDQ 427	
<i>Ory.satviva</i>	BGL06_ORYSJ	194 VDQFVLI NEPTVEVATKIMAEKRLKGEE-----PVYITENGMDSSNNPFISIKD 442	
<i>Clo.thermocellum</i>	BGLA_CLOTH	151 VPI WFTHN EPGVSVLLGHFLG-----NIVISNGAAFKDEL-G-SNG 368	
<i>Pae.polymyxa</i>	BGLB_PAEPO	152 I NWWNTINE PYCASILGYGTG-----LPILITENGAAMRDEL--VNG 368	
<i>Pha.chryso sporium</i>	BGL1A_PHACH	162 VQNWITFNE PWVIVSMGYNGIFAPGHV-----PVYVTENGFPVKGENDLPEVEQ 380	
<i>Ent.agglomerans</i>	BGLA_ENTAG	169 VKHWI TLN EPHTVAIQYDAGLQAPGRC-----PVIITENGAGFEGEDQL-TNG 392	
<i>Ole.europaea</i>	BGLC_OLEEU	203 VKYWI TLN EPWSFTVQGYVAGAFPPNRG-----VIYITENGVDEVNDKSKTSTE 448	
<i>Agrobacterium sp.</i>	BGLS_AGRSA	156 L DAVATFN EPWCVAVLSHLYG-----ECYITENGCACYNMGV--ENG 371	
		**	***
B			
<i>Bac.ovatus</i>	BGH3B_BACO	1262 HFAPFLAAVRQG-ALSVMVNSGVDNGLPFHANRELLTEWLKEDLNWDGLIVT WADINNL 321	
<i>Klu.marxianus</i>	BGLS_KLUMA	173 YLEPFLAVKHANPVCIMTAYNKVNGDHCQSQSKLLDILDRDEWKWDGMLMS WFGTYTT 232	
<i>Sac.fibuligera</i>	BGL1_SACFI	243 YLWPFADSVRAG-VGSVMCSYNRVNNTYACENSYMMNHLLKEELGFQGFVVS WGAQLSG 302	
<i>Sac.fibuligera</i>	BGL2_SACFI	217 YLWPFADSVRAG-VGSVMCSYNRVNNTYACENSYMMNHLLKEELGFQGFVVS WAAQMSG 276	
<i>Asp.kawachii</i>	BGLA_ASPKW	228 YLWPFADAIRAG-AGAVMCSYNQINNSYGCNSYTLNKLKLAELGFQGFVMS WAAHAG 287	
<i>Asp.flavus</i>	BGLG_ASPFN	252 YLPAYKAAIDEG-CEMVMTAFNTVDGIPATGNKWLMLNGLLKEELGFQGFVMS WGGTHSG 311	
<i>Mag.oryzae</i>	CEL3A_MAGO7	299 YLWPFADAVRAN-VASVMCSYNKINGSWACENEHAMRDLRGEWGFQGFVMS WGAVKEM 258	
<i>Mag.oryzae</i>	CEL3B_MAGO7	226 YMWPFMDSVKAGAASAMCSYQRVNNTYACMNSKLMNGLLKEELGFQGFVMS WNAVHT- 285	
<i>Eme.nidulans</i>	BGLB_EMENI	178 -YLKPFIEAIKESNPLAVMTAYNIVNGTHADSNFLRLDVLRGWGWKGLVMS WGGTNST 237	
<i>Geo.stearothermophilus</i>	A0A023CNR4_GEOSE	247 YLWPFANAARAK-VASVMCSYQRLNGSYACQNSKVLQKLLKDELGFQGFVMS WNAQHTT 306	

图 2 糖苷酶第一、三家族的 β -葡萄糖苷酶多序列比对图

Fig. 2 Multiple sequence alignment of glycosyl hydrolase 1,3 family β -glucosidase

注:A:糖苷酶第一家族 β -葡萄糖苷酶催化位点, *Arabidopsis thaliana*, BGL01_ARATH, Q3ECW8; *Arabidopsis thaliana*, BGL09_ARATH, Q9STP4; *Oryza sativa* subsp. Japonica, BGL07_ORYSJ, Q75I93; *Oryza sativa* subsp. Japonica, BGL06_ORYSJ, Q8L7J2; *Clostridium thermocellum* (strain ATCC 27405 / DSM 1237 / NBRC 103400 / NCIMB 10682 / NRRL B-4536 / VPI 7372, BGLA_CLOTH), P26208; *Paenibacillus polymyxa*, BGLB_PAEPO, P22505; *Phanerochaete chryso sporium*, BGL1A_PHACH, 25BW5; *Enterobacter agglomerans*, BGLA_ENTAG, Q59437; *Olea europaea*, BGLC_OLEEU, Q8GVD0; *Agrobacterium sp.* (strain ATCC 21400), BGLS_AGRSA, P12614, 数据来源 <http://www.uniprot.org/>。B:糖苷酶第三家族 β -葡萄糖苷酶催化位点, *Bacteroides ovatus* (strain ATCC 8483 / DSM 1896 / JCM 5824 / NCTC 11153), BGH3B_BACO1, A7LXU3; *Kluyveromyces marxianus*, BGLS_KLUMA, P07337; *Saccharomycopsis fibuligera*, BGL1_SACFI, P22506; *Saccharomycopsis fibuligera*, BGL2_SACFI, P22507; *Aspergillus kawachii*, BGLA_ASPKW, P87076; *Aspergillus flavus*, BGLG_ASPFN, B8NMR5; *Magnaporthe oryzae* (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958), CEL3A_MAGO7, G4N45; *Magnaporthe oryzae* (strain 70-15 / ATCC MYA-4617 / FGSC 8958), CEL3B_MAGO7, G4N7Z0; *Emericella nidulans* (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139), BGLB_EMENI, Q5BFG8; *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621, A0A023CNR4_GEOSE, A0A023CNR4, 数据来源 <http://www.uniprot.org/>。

氨基酸天冬氨酸和谷氨酸。从催化功能上来看,糖苷酶第一家族中的 β -葡萄糖苷酶在其 β 折叠股中靠近N端的谷氨酸起酸碱催化作用,另一个谷氨酸起亲核催化作用。在第三家族的成员中,起催化作用的是天冬氨酸^[26-28],如图2所示。

人参中含量较高的人参皂苷单体例如Rb₁、Rc等糖基化程度高,然而相比较于稀有人参皂苷单体药用价值小,且不利于转化和吸收。利用 β -葡萄糖苷酶水解常见人参皂苷单体的糖苷键获得稀有人参皂苷单体的方法已经得到了验证,目前已经发现的能够转化人参皂苷的 β -葡萄糖苷酶在两个家族中均有分布,如家族三的Bgl1(XM001398779)^[29]、BglBX10(ABQ06406)^[30]、Bgp3(JN603821)^[31]等;家族一的 β -Glucosidase(ABF52736)^[32]、 β -Glucosidase(YP145326)^[33]、BglAch(ACL38420)^[34]等,但以家族三的 β -葡萄糖苷酶为主。同时在自然界和哺乳动物消化道中也分离出了多种能够分泌具有水解人参皂苷功能的葡萄糖苷酶的细菌,如*Lactobacillus rhamnosus* GG、*Paenibacillus mucilaginosus*、*Microbacterium esteraromaticum*、*Thermus caldophilus* GK24等^[35-38]。但目前发现的能够表达人参皂苷水解酶的细菌种类并不多而且酶的水解特异性不高,并不能满足专一且高效转化人参皂苷单体的要求。相对于细菌来说,真菌来源的 β -葡萄糖苷酶种类多且分布广泛,近年来受到了研究者的普遍关注。

3 真菌及 β -葡萄糖苷酶对人参皂苷单体的转化

3.1 真菌侵染与人参皂苷的关系

人参皂苷在人参抵御根际致病菌中的作用尚不明确,人参根际土壤中真菌种类复杂,除链格孢属(*Alternaria*)、柱孢霉属(*Cylindrosporium*)等致病菌外,还有木霉属(*Trichoderma*)、青霉属(*Penicillium*)等非致病菌。早期研究发现皂苷可以影响真菌细胞膜甾醇复合物的合成,损坏细胞膜完整性,从而影响真菌形态转化,含有皂苷类物质的植物往往能比不含皂苷的植物抵抗更多的病原菌侵染^[39,40]。但近期研究发现一些致病菌可以利用人参皂苷促进其自身生长。Lina F等发现当真菌致病菌*Pythium irregulare*在含有人参皂苷的培养基中培养时,生物量明显增加,进一步分析发现*Pythium irregulare*可以通过分泌胞外糖苷酶转化原人参二醇皂苷混合物得到人参皂苷F2单体,而这种转化方式在非致病性的木

霉菌中并未出现^[41]。Zhao XS等在研究致病菌*Cylindrocarpon destructans*时同样发现PPD型人参皂苷可以显著促进菌体生长,随后的酶功能分析发现*Cylindrocarpon destructans*的胞外糖苷酶活性可以连续水解PPD型皂苷C3和C20位的末端糖基,最终产物中同样有人参皂苷F2的存在,而这种对致病菌的生长促进作用在非致病菌的研究中并没被发现^[42]。

3.2 真菌 β -葡萄糖苷酶转化人参皂苷

从目前研究的结果来看从真菌中获得的水解人参皂苷的酶的种类要远远多于其他物种。通过对真菌与人参皂苷之间的相互作用可以看出,人参皂苷无论是作为真菌生长促进因子还是宿主识别因子都离不开真菌糖苷酶的作用。目前研究者已从多种真菌中分离出了能够水解人参皂苷糖基的 β -葡萄糖苷酶,其中在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中发现了多种可以水解人参皂苷不同位置糖基的水解酶。Chang KH等从黑曲霉KCCM 11239中纯化出能水解Rb₁C20位置的 β -(1 \rightarrow 6)-糖基的 β -葡萄糖苷酶,得到人参皂苷单体Rd和Rg₅;此酶也可以水解C3位置的 β -(1 \rightarrow 2)-糖基得到为F2^[43]。Ruan CC等从黑曲霉中分离出了的 β -葡萄糖苷酶基因bgl1,将该编码基因转入酿酒酵母表达,纯化后可将原人参三醇型皂苷Rf转化为Rh₁^[29]。CY Liu从黑曲霉g.848中纯化出一种75 kDa的酶可以水解人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rc在C20和C3位置的糖基得到化合物K(CK)^[44]。也有研究者从青霉属的真菌中得到了能够水解人参皂苷的 β -葡萄糖苷酶,Fu Y等从大量人参根际微生物中筛选出了能够水解多种人参皂苷的*Penicillium simplicissimum* GS33菌株,对人参皂苷C3C6和C20位的糖基都有水解作用^[45]。Gao J等从土壤分离出的青霉属真菌*Penicillium oxalicum* sp.68分泌的葡萄糖苷酶可以将原人参二醇型皂苷转化为化合物K(CK),转化途径为:Rb₁ \rightarrow Rd \rightarrow F₂ \rightarrow Compound K,Rb₂ \rightarrow CO \rightarrow CY \rightarrow Compound K,Rc \rightarrow Mb \rightarrow Mc \rightarrow Compound K,Rd \rightarrow F₂ \rightarrow Compound K^[46]。除了曲霉属、青霉属等真菌外,研究人员还从一些植物致病菌中分离出多种对人参皂苷有水解作用的 β -葡萄糖苷酶,例如Zhao XS等从番茄的致病菌*Cladosporium fulvum*中分离出的 β -葡萄糖苷酶(G-II)能特异性地水解人参皂苷单体Rb₁的C20位的 β -(1-6)-糖苷来获得Rd,但不会水解皂苷骨架其他位置的糖基^[47]。Kim YS等从镰孢菌*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*中纯化得到大小为85 kDa的

β -葡萄糖苷酶,可以高效水解人参皂苷 Rg_1 为 F_1 ^[48]。吴秀丽等从人参根际土壤分离的疣孢漆斑菌可以分泌能够水解人参皂苷 Rg_3 的 β -葡萄糖苷酶,将 Rg_3 转化为原人参二醇^[49],如表 2 所示。

表 2 来源真菌的 β -葡萄糖苷酶转化不同人参皂苷以及主要产物

Table 2 Transformation of ginsenoside fungi and main products

种属 Species	底物 Substrate	产物 Product	水解位置 Hydrolysis position	参考文献 Reference
<i>Armillaria mellea</i>	Rb ₁	Rd、F ₂ 、CK	C3 β -糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[50]
<i>Aspergillus niger</i>	Rf	Rh ₁ 、PPD	C6 β -糖苷键	[51]
<i>Aspergillus niger</i>	Rb ₁	Rd、F ₂ 、CK	C3 β -糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[52]
<i>Aspergillus niger</i>	Re	Rg ₁ 、F ₁	C6 β -糖苷键 C6 α -(1 \rightarrow 2)-糖苷键	[53]
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	Rf	Rh ₁	C6 β -糖苷键	[29]
<i>Aspergillus niger</i> sp. J7	Rb ₁	CK	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键	[54]
<i>Aspergillus niger</i> g. 848	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc	Rd、F ₂ 、CK	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键	[44]
<i>Aspergillus niger</i> KCCM 11239	Rb ₁	Rd、Rg ₃ 、F ₂	C3 β -(1 \rightarrow 2)-糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[43]
<i>Aspergillus versicolor</i> LFJ1403	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[35]
<i>Absidia glauca</i> Hagem SR105	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[55]
<i>Alternaria alternata</i> SRS-10	Re	Rg ₁	C6 α -糖苷键	[56]
<i>Cladosporium cladosporioides</i> GH21	Rb ₁ 、Rg ₁	CK、F ₁	C3 β -糖苷键 C6 β -糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[57]
<i>Cladosporium fulvum</i>	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[58]
<i>Esteya vermicola</i> CNU120806	Rg ₃	Rh ₂	C3 β -(1 \rightarrow 2)-糖苷键	[59]
<i>Fusarium moniliforme</i> var. subglutinans	Rg ₁	F ₁	C6 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[48]
<i>Fusarium sacchari</i>	Rb ₁ 、Rb ₃ 、Rc	CK	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键	[60]
<i>Myrothecium verrucaria</i> SYP2353	Rg ₃	Rh ₂ 、PPD	C3 β -(1 \rightarrow 2)-糖苷键	[49]
<i>Paecilomyces bainier</i> 229-7	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[61]
<i>Paecilomyces hepiali</i>	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[62]
<i>Paecilomyces militaris</i> Liang	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[62]
<i>Penicillium oxalicum</i> sp. 68	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc	CK、Rd、F ₂	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键	[63]
<i>Penicillium simplicissimum</i> GS33	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc、Rd	F ₂ 、Rg ₃ 、CK	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键 C20 α -(1 \rightarrow 2)-糖苷键	[45]
<i>Penicillium sclerotiorum</i> 2246	Rg ₁	F ₁	C6 β -糖苷键	[64,65]
<i>Penicillium dipodomycicola</i> 2367	Rg ₁	F ₁	C6 β -糖苷键	[64,65]
<i>Pythium irregulare</i>	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc	CK	C3 β -糖苷键 C20 β -糖苷键	[41]
<i>Pythium irregulare</i>	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc、Rd、gypenoside XVII	F ₂	C3 β -(1 \rightarrow 2)-糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[66]
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> IFO15499	Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc	CK	C3 β -糖苷键 C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键 C20 α -(1 \rightarrow 2)-糖苷键 ^[67]	[67]
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuill. SR87	Rb ₁	Rd	C20 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键	[55]

此外也有一些研究者发现有的真菌转化人参皂苷后获得的产物复杂且不易分离。例如: Chen GT、Yang M 等筛选出一批能够水解原人参二醇型皂苷的真菌如 *Rhizopusstolonifer* (3. 822)、*Curvularia lunata* (3. 1109)、*Absidia coerulea* (AS 3. 3389)、*Acremonium strictum*(AS 3. 2058) 等,这些真菌能分解人参皂苷 Rb₁ 后得到种类繁多的代谢产物,如化合物 XVII、25-hydroxy-20(S)-ginsenoside-Rh₁ 等异构体

混合物^[68-70]。除了真菌之外,也有研究者还从其他物种中分离出能够水解人参皂苷的 β -葡萄糖苷酶,如 Luan HW 等从中国白玉蜗牛中分离出一种特异性水解人参皂苷 C20 位 β -(1 \rightarrow 6)-糖苷键的 β -葡萄糖苷酶,可以将人参皂苷单体 Rb₁ 转化为 Rd^[71]。由此可见能够水解人参皂苷的 β -葡萄糖苷酶不仅存在于微生物中,也存在于其他物种中,但此类研究相对较少。

4 展望

近些年来,随着医学观念的转变和技术手段的更新,传统中医的现代化应用越来越受到研究者的关注。人参皂苷作为一种天然的抗癌活性物质,具有较高的研究价值和广阔的市场前景。目前,通过大型生物反应器大量培养人参不定根可以得到稳定的人参皂苷来源,提取不定根总皂苷进行 HPLC 检测后发现,其中原人参三醇型皂苷 Rg₁、Re、Rf;及原人参二醇型皂苷 Rb₁、Rb₂、Rd 的含量较高,但这些人参皂苷富含糖基利用价值较低。如何利用现有的人参资源获得具有更高经济及药用价值的稀有人参皂苷 Rh₂、CK 等,是目前笔者研究的主要方向。

对人参皂苷合成途径及代谢规律的研究发现,可以利用两种方式体外获得稀有人参皂苷单体。一种方法是基于目前已获得的大量人参不定根,对不定根中提取的大量的多糖基人参皂苷进行酶水解作用,通过此种方法可充分利用不定根中已有的人参皂苷单体,并且反应条件较为温和、实验操作简单、反应条件易摸索、设备投入量少。但利用酶水解方法获得稀有人参皂苷的方法是以得到特异且高效的水解酶为前提的。如前文所述,目前已有很多研究者对此类酶进行了筛选,并获得了许多有利用价值的 β -葡萄糖苷酶,但分离的多数糖苷酶水解糖基的特异性不高,多以粗酶为主,无法达到工业生产的要求。对于解决酶催化的专一性问题除了继续在自然界中进行筛选及菌株诱变的方法外,还可以直接通过对 β -葡萄糖苷酶编码序列进行改造,获得突变蛋白,改变酶的催化效率和特异性,以提高稀有人参皂苷转化率,这也是将来稀有人参皂苷单体制备的新方向。另一种获得稀有人参皂苷单体的方法是基于合成生物学的发展,通过改造模式生物来获得生产人参皂苷的真菌或细菌。由于真核生物酵母中存在天然的甲羟戊酸(MVA)途径,目前已有许多学者构建了可以生产人参皂苷单体的酵母菌,如 Wang 等通过改造酿酒酵母的甲羟戊酸途径,最终获得了能够产生人参皂苷单体 Rh₂ 和 Rg₃ 的菌株,产量达到 1.45 和 3.49 μ mol/g DCW,此产量远远高于天然人参中的含量^[72]。这种利用微生物工程获得动植物次生代谢产物方法,越来越受到研究者的关注,也是目前合成生物学的热点研究。但在菌株改造过程中基因的整合方式、启动子和终止子的选择、如何充分利用反应底物以及工程菌构建成功后的发酵条件优化,都是研究者需要考虑的问题。

参考文献

- Christensen LP. Chapter 1 Ginsenosides; Chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res*, 2008, 55(55):1-99.
- Xing ZB(邢朝斌), *et al.* Biosynthesis of triterpenoid saponin. *Chem Life(生命的化学)*, 2005, 25:420-422.
- Zhang CB(张长波), *et al.* Plant terpenoid natural metabolism pathways and their syntheses. *Plant Physiol Commun(植物生理学报)*, 2007, 43:779-786.
- Nag SA, *et al.* Ginsenosides as anticancer agents: *In vitro* and *in vivo* activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Frontiers Pharmacol*, 2012, 3:25.
- Jin JS(金建生), *et al.* Antiaging effect of ginsenoside Rg₁ is related with the expression of p16, cyclin D1 and CDK4. *Chin J Clin Pharmacol Therapeutics(中国临床药理学与治疗学)*, 2004, 9(1):29-34.
- Li W(李伟). Hypoglycemic effect of ginsenoside Compound K on type 2 diabetic mellitus and regulation of hepatic gluconeogenesis. Changchun: Jilin University(吉林大学), MSc. 2012.
- Guo Z(郭志廷). Immunological regulation and mechanisms of ginsenoside with molecular modification. Changchun: Jilin University(吉林大学), MSc. 2006.
- Zhang ZM(张仲苗), *et al.* Effect of Rg₃ on immune function of mice. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2004, 20(6):4-6.
- Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci*, 2001, 16 Suppl(6):S28-S37.
- Chong Z, *et al.* The mitochondrial pathway is involved in American ginseng-induced apoptosis of SW-480 colon cancer cells. *Oncol Reports*, 2009, 21:577-584.
- Kim HS, *et al.* Effects of ginsenosides Rg₃ and Rh₂ on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharmacol Res*, 2004, 27:429-435.
- Yang ZG, *et al.* Ginsenoside Rd from *Panax notoginseng* cytotoxic towards HeLa cancer cells and induces apoptosis. *Chem Biodivers*, 2006, 3:187-197.
- Tao HQ, *et al.* Clinical study of inhibition of Rg₃ on angiogenesis of human gastric carcinoma. *World Chin J Digestol*, 2002, 10:1218-1219.
- Wang W, *et al.* *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007, 59:589-601.
- Choi K, *et al.* Ginsenosides compound K and Rh 2 inhibit tumor necrosis factor- α -induced activation of the NF- κ B and

- JNK pathways in human astroglial cells. *Neurosci Lett*, 2007, 421;37-41.
- 16 Wakabayashi C, *et al.* An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246:725-730.
- 17 Karikura M, *et al.* Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of Ginseng saponins. VII. comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₁ and-Rb₂ in the digestive tract of rats. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39: 2357-2361.
- 18 Karikura M, *et al.* Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb₂ in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39:400-404.
- 19 Han BH, *et al.* Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions. *Planta Med*, 1982, 44:146-149.
- 20 Park J, *et al.* Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Phytochem Rev*, 2005, 4: 159-175.
- 21 Kobashi K, *et al.* Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides. *Biosci Microflora*, 1997, 16(1): 1-7.
- 22 Bae EA, *et al.* Metabolism of ginsenoside Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28:1903-1908.
- 23 Kim YS, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rb₁, crocin, amygdalin, geniposide, puerarin, ginsenoside Re, hesperidin, poncirin, glycyrrhizin, and baicalin by human fecal microflora and its relation to cytotoxicity against tumor cells. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18:1109-1114.
- 24 Fan L (范利荣), *et al.* Advances in studies on metabolism and biotransformation of ginsenosides *in vitro*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36:2021-2026.
- 25 Henrissat B, *et al.* New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993, 293:781-788.
- 26 Tull D, *et al.* Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a "retaining" exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *J Biol Chem*, 1991, 266:15621-15625.
- 27 Hakulinen N, *et al.* The crystal structure of beta-glucosidase from *Bacillus circulans* sp. alkalophilus; ability to form long polymeric assemblies. *J Structural Biol*, 2000, 129:69-79.
- 28 Fukuda K, *et al.* Identification of essential ionizable groups and evaluation of subsite affinities in the active site of beta-D-glucosidase F1 from a *Streptomyces* sp. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66:2060-2067.
- 29 Ruan CG, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh₁ by recombinant β -glucosidase. *Molecules*, 2009, 14:2043-2048.
- 30 Kim JK, *et al.* Mass production of the ginsenoside Rg₃ (S) through the combinative use of two glycosidehydrolases. *Food Chem*, 2013, 141:1369-1377.
- 31 Quan LH, *et al.* Enzymatic transformation of the major ginsenoside Rb₂ to minor compound Y and compound K by a ginsenoside-hydrolyzing β -glycosidase from *Microbacterium esteraromaticum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39:1557-1562.
- 32 Shin KC, *et al.* Characterization of a novel recombinant β -glucosidase from *Sphingopyxis alaskensis* that specifically hydrolyzes the outer glucose at the C-3 position in protopanaxadiol-type ginsenosides. *J Biotechnol*, 2014, 172:30-37.
- 33 Shin KC, *et al.* Highly selective hydrolysis for the outer glucose at the C-20 position in ginsenosides by β -glucosidase from *Thermus thermophilus* and its application to the production of ginsenoside F₂ from ginsenoside XVII. *Biotechnol Lett*, 2014, 36:1287-1293.
- 34 Park MK, *et al.* Characterization of recombinant beta-glucosidase from *Arthrobacter chlorophenolicus* and biotransformation of ginsenosides Rb-1, Rb-2, Rc, and Rd. *J Microbiol*, 2014, 52:399-406.
- 35 Quan LH, *et al.* Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb₁ to 20 (S)-Rg₃ by recombinant β -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 60:3776-3781.
- 36 Son JW, *et al.* Ginsenoside Rd production from the major ginsenoside Rb(1) by beta-glucosidase from *Thermus caldophilus*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30:713-716.
- 37 Li L, *et al.* Production of ginsenoside F₂ by using *Lactococcus lactis* with enhanced expression of β -glucosidase gene from *Paenibacillus mucilaginosus*. *J Agric Food Chem*, 2016, 64:2506-2512.
- 38 Ku S, *et al.* Whole-cell biocatalysis for producing ginsenoside Rd from Rb₁ using *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26:1206-1215.
- 39 Morrissey JP, *et al.* Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Molecul Biol Rev*, 1999, 63:708-724.
- 40 Sung WS, *et al.* *In vitro* candidacidal action of Korean red ginseng saponins against *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31:139-142.
- 41 Yousef LF, *et al.* *In vitro* metabolism of ginsenosides by the ginseng root pathogen *Pythium irregulare*. *Phytochemistry*, 2006, 67:1740-1749.
- 42 Zhao X, *et al.* Fungal sensitivity to and enzymatic deglycosylation of ginsenosides. *Phytochemistry*, 2012, 78(2):65-71.
- 43 Chang KH, *et al.* Purification and characterization of a gin-

- senoside Rb₁-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239. *Int J Molecul Sci*, 2012, 13: 12140-12152.
- 44 Liu CY, *et al.* Preparation of minor ginsenosides C-Mc, C-Y, F₂, and C-K from *American ginseng* PPD-ginsenoside using special ginsenosidase type-I from *Aspergillus niger* g. 848. *J Ginseng Res*, 2014, 58: 221-229.
- 45 Fu Y, *et al.* Fermentation of ginseng extracts by *Penicillium simplicissimum* GS33 and anti-ovarian cancer activity of fermented products. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 30: 1019-1025.
- 46 Lin F, *et al.* Efficient biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by isolated *Aspergillus versicolor*, excreting β -glucosidase in the spore production phase of solid culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108: 1117-1127.
- 47 Zhao X, *et al.* A novel ginsenoside Rb 1-hydrolyzing β -d-glucosidase from *Cladosporium fulvum*. *Proc Biochem*, 2009, 44: 612-618.
- 48 Ys K, *et al.* Ginsenoside F1 production from ginsenoside Rg₁ by a purified β -glucosidase from *Fusarium moniliforme* var. subglutinans. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 2457-2461.
- 49 Wu XL(吴秀丽), *et al.* Fungal biotransformation of ginsenoside Rg₃. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2008, 48: 1181-1185.
- 50 Upadhyaya J, *et al.* Enzymatic formation of compound-K from ginsenoside Rb₁ by enzyme preparation from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *J Ginseng Res*, 2016, 55: 105-112.
- 51 Liu L, *et al.* Microbial conversion of rare ginsenoside Rf to 20(S)-protopanaxatriol by *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74: 96-100.
- 52 Hu JN, *et al.* Optimization of ginsenosides hydrolyzing beta-glucosidase production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 1870-1874.
- 53 Yu W, *et al.* Production of ginsenoside F1 using commercial enzyme Cellulase KN. *J Ginseng Res*, 2016, 40: 121-126.
- 54 Zhao TJ(赵天蛟). Biotransformation of Ginsenoside Rb₁ by *Aspergillus niger* sp. J7. Changchun: Northeast Normal University(东北师范大学), MSc. 2013.
- 55 Zhang W(张薇), *et al.* Screening of the active fungal strains with high specificity to biotransform ginsenoside Rb₁ into Rd. *Mycosystema*(菌物学报), 2011, 30: 305-311.
- 56 Wu XL(吴秀丽), *et al.* Identification of the active strain of ginsenoside Re. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2011, 39: 22321-22322.
- 57 Wu L, *et al.* Co-transformation of *Panax* major ginsenosides Rb₁ and Rg₂ to minor ginsenosides C-K and F₂ by *Cladosporium cladosporioides*. *J Ind Microbiol*, 2012, 39: 521-527.
- 58 Zhao X, *et al.* Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *J Ind Microbiol*, 2009, 36: 721-726.
- 59 Wang CY, *et al.* High infectivity of an endoparasitic fungus strain, *Esteya vermicola*, against nematodes. *J Microbiol*, 2008, 46: 380-389.
- 60 Hou J, *et al.* Microbial transformation of ginsenoside Rg₃ to ginsenoside Rh₂ by *Esteya vermicola* CNU120806. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 1807-1811.
- 61 Ye L, *et al.* Biotransformation of ginsenoside Rb₁ to ginsenoside Rd by highly substrate-tolerant *Paecilomyces bainier* 229-7. *Biores Technol*, 2010, 101: 7872-7876.
- 62 Wu YY(武阳阳). A study on *Panax notoginseng* fermentation by *Cordyceps* spp. Kunming: Kunming University of Science and Technology(昆明理工大学), MSc. 2013.
- 63 Gao J, *et al.* Efficient biotransformation for preparation of pharmaceutically active ginsenoside Compound K by *Penicillium oxalicum* sp. 68. *Annal Microbiol*, 2013, 63: 139-149.
- 64 Zhang Q(张琪), *et al.* Identification of two strains with the ability of transforming ginsenoside Rg₁ to ginsenoside F1. *Chin J Antibiotics*(中国抗生素杂志), 2010, 35: 395-398.
- 65 Wu XL(吴秀丽), *et al.* Transformation of ginsenoside Rg₁ to ginsenoside F1 specific by the fungi strains EST-I and EST-II. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008, 25(1): 73-76.
- 66 Andreea NM, *et al.* Partial purification and characterization of three ginsenoside-metabolizing beta-glucosidases from *Pythium irregulare*. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1948-1957.
- 67 Peng Z, *et al.* Diversity of cultivable β -glycosidase-producing micro-organisms isolated from the soil of a ginseng field and their ginsenosides-hydrolysing activity. *Lett Appl Microbiol*, 2014, 58: 138-144.
- 68 Dong A, *et al.* Microbial transformation of ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 339-344.
- 69 Chen CT, *et al.* Microbial transformation of 20(S)-Protopanaxatriol-type saponins by *Absidia coerulea*. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1203-1206.
- 70 Chen GT, *et al.* Microbial transformation of ginsenoside Rb(1) by *Acremonium strictum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77: 1345-1350.
- 71 Luan H, *et al.* Purification and characterization of a novel stable ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from China white jade snail. *Proc Biochem*, 2006, 41: 1974-1980.
- 72 Wang P, *et al.* Production of bioactive ginsenosides Rh₂ and Rg₃ by metabolically engineered yeasts. *Metabolic Eng*, 2015, 29: 97-105.