

# 五环三萜类化合物微生物转化研究进展

赵子璇,李春峰,杨洪旺,刘桂艳\*

北京理工大学生命学院分子医学与生物治疗重点实验室,北京 100081

**摘要:**五环三萜类化合物是自然界中含量较多、分布较广的一类重要天然有机化合物,具有抗肿瘤、抗糖尿病、抗病毒、抗氧化、抗菌等多种生物活性。通过微生物转化技术对其进行结构改造和修饰,为生物活性筛选提供更多结构新颖的先导化合物,进而为研发出生物活性更强的五环三萜类新药奠定基础。本文对五环三萜类化合物的3种结构类型(齐墩果烷型、乌苏烷型和羽扇豆烷型)中最具代表的5个化合物,即齐墩果酸、甘草酸、甘草次酸、熊果酸和白桦脂酸在近10年微生物转化研究成果上进行综述,为天然产物生物转化研究和新药开发提供参考。

**关键词:**微生物转化;五环三萜;天然产物;构效关系

中图分类号:R931

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)8-1415-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.8.017

## Advances in microbial transformation of pentacyclic triterpenes

ZHAO Zi-xuan, LI Chun-feng, YANG Hong-wang, LIU Gui-yang\*

Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, School of Life Sciences, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

**Abstract:** Pentacyclic triterpenoids are an important class of natural organic compounds that are abundant and widely distributed in nature, with a variety of biological activities such as anti-tumour, anti-diabetic, anti-viral, anti-oxidant and anti-bacterial. Structural modification of pentacyclic triterpenoids by biotransformation technology can provide more lead compounds with novel structures for bioactivity screening, and thus lay the foundation for the development of new pentacyclic triterpenoids with greater bioactivity. In this paper, the five most representative compounds of the three structural types of pentacyclic triterpenoids (oleanane-type, ursane-type and lupinane-type), namely oleanolic acid, glycyrrhetic acid, glycyrrhizic acid, ursolic acid and betulinic acid, are reviewed in the last 10 years of biotransformation research results to provide reference for natural product biotransformation research and new drug development.

**Key words:** microbial transformation; pentacyclic triterpene; natural products; structure-activity relationship

生物转化(bioconversion 或 biotransformation)是指在生物自身的作用或者体内活性酶的催化作用下,外源化合物发生了一定的生物化学反应,导致其结构发生变化,从而产生有价值的化合物的过程,又被称为生物催化(biocatalysis)。1864年,巴斯德发现醋酸杆菌能使乙醇转化为乙酸,从此拉开了人类开创微生物转化技术的序幕。20世纪50年代,研究人员利用黑曲霉(*Rhizopus nigricans*)将黄体酮转化为 $11\alpha$ -羟基黄体酮,是生物转化史上的重要里程碑<sup>[1]</sup>。

生物转化相对于化学转化,具有绿色环保、高效的催化效率、温和的反应条件、简单的后续处理等优

点,往往可以实现糖基化反应等化学转化中不易实现的转化,达到增强生物活性、降低毒性、提高生物利用度等目的。特别是生物转化具有较高的区域选择性和立体选择性,也有较多的反应类型,如氧化反应、还原反应、水解反应、缩合反应、羟基化反应、胺化反应、环化反应、酰化反应、脱羧化、甲基化与去甲基化反应和脱氢反应等等,更易得到结构新颖的化合物,为新药开发提供更有价值的先导化合物。然而,在种类繁多的微生物中筛选有效转化的菌株就目前而言仍然是一个巨大的挑战。

五环三萜类化合物主要存在于陆地高等植物中,分为3种结构类型,即乌苏烷型、齐墩果烷型和羽扇豆烷型。研究报道该类化合物具有抗癌、抗糖尿病、抗病毒、抗菌和抗氧化等多种生物活性<sup>[2]</sup>。

收稿日期:2021-06-18 接受日期:2021-07-01

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0500206)

\*通信作者 Tel:86-10-68918158;E-mail:gyliu@bit.edu.cn

虽然很多药材中含有五环三萜类化合物,但往往存在含量偏低、活性低或者毒性大的局限。通过生物转化,可以把五环三萜类化合物转化为高活性低毒性的更有价值的有效成分或者结构新颖的先导化合物,为进一步结构改造和新药开发奠定基础。

## 1 五环三萜类化合物生物转化

### 1.1 齐墩果烷型

#### 1.1.1 齐墩果酸

齐墩果酸(oleanolic acid, OA, **1**),又被称为土当归酸,其化学名为 $3\beta$ -hydroxy-olean-12-en-28-oic acid,其化学分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ ,分子量为456.70。齐墩果酸不仅具有三萜酸常见的抗肿瘤、抗糖尿病和抗炎等药理活性,还可以抗口腔病原菌、调血脂、抗肥胖<sup>[3]</sup>、保护血管<sup>[4]</sup>、保护神经、抗肝脂肪病变和纤维化<sup>[5]</sup>等。

齐墩果酸在亚麻刺盘孢霉(*Colletotrichum lini* AS3.448, **a**)<sup>[6]</sup>作用下C15位发生了羟基化反应,生成 $15\alpha$ -hydroxyl-oleanolic acid(**2**),相同的反应类型在粉红单端孢霉(*Trichothecium roseum*, **g**)<sup>[7]</sup>和蝇卷霉(*Circinella muscae* AS 3.2695, **i**)<sup>[8]</sup>也有报道。在长柄链格孢菌(*Alternaria longipes*, **b**)<sup>[9]</sup>中发生了C2位和C19位的羟基化反应,C3位和C28位的糖基化反应,同时,母核骨架齐墩果烷变为熊果烷,C19位增添了甲基,共生成了6种化合物: $2\alpha, 3\alpha, 19\alpha$ -tri-hydroxy-ursolic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**)、 $2\alpha, 3\beta, 19\alpha$ -tri-hydroxy-ursolic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**4**)、oleanolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**5**)、oleanolic acid-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**)、3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-oleanolic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**7**)和 $2\alpha, 3\beta, 19\alpha$ -tri-hydroxy-oleanolic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**)。化合物**5**在赭曲霉(*Aspergillus ochraceus* CICC 40330, **h**)<sup>[10]</sup>中也有发现。在阿达青霉(*Penicillium adametzi*, **c**)<sup>[9]</sup>中,发生了C7和C21位羟基化反应和C28位的糖基化反应,生成 $21\beta$ -hydroxyl oleanolic acid (**9**)、 $7\alpha, 21\beta$ -di-hydroxyl oleanolic acid (**10**)和 $21\beta$ -hydroxyl oleanolic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**11**)。化合物**6, 9, 10**和**11**对宫颈癌细胞(Hela)的杀伤活性强于齐墩果酸。在鲁氏毛霉(*Mucor rouxii* NRRL 1894, **d**)<sup>[11]</sup>中,齐墩果酸也发生了C7和C21位羟基化反应,转化生成 $3\beta, 7\beta, 21\beta$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid

(**12**),C3位发生羧基化反应生成 $7\beta$ -hydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**13**)、 $21\beta$ -hydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**14**)和 $7\beta, 21\beta$ -dihydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**15**)。其中,化合物**14**可以抑制牙龈卟啉单胞菌的活性。Zhu等<sup>[10]</sup>发现在灰色链霉菌(*Streptomyces griseus* ATCC 13273, **e**)中,齐墩果酸的C29位的甲基被氧化成羧基,生成 $3\beta$ -dihydroxy-olean-12-en-28,29-dioic acid (**16**),同时C24位发生羟基化生成 $3\beta, 24$ -dihydroxy-olean-12-en-28,29-dioic acid (**17**)。Martinez等<sup>[12]</sup>发现在米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei* CECT 2749, **f**)中齐墩果酸主要发生羟基化反应,集中在C1、C7和C30位上,生成 $3\beta, 30$ -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**18**)、 $3\beta, 7\beta, 30$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**19**)和 $1\beta, 3\beta, 30$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**20**)。在粉红单端孢霉(**g**)<sup>[7]</sup>中发生了C7位、C15位羟基化和C3位羧基化,生成 $15\alpha$ -hydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**21**)和 $7\beta, 15\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**22**)。在蝇卷霉(**i**)<sup>[8]</sup>中齐墩果酸C7、C15和C21位上发生羟基化,C3位发生羧基化和C28位发生糖基化生成已有化合物**5, 10, 11, 12**和**13**以及新化合物 $7\beta, 15\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-olean-12-en-28-oic acid (**23**)、 $3\beta, 7\beta, 15\alpha$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**24**)和 $3\beta, 7\beta, 15\alpha$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**25**),生成的9种化合物均能抑制NO产生,其中化合物**23, 24**和**25**对NO的抑制作用大于阳性对照。由此可见,C7位羟基化和C28位糖基化得到的化合物的抗炎活性强于在C21位羟基化。Xu等<sup>[13]</sup>研究了串联全细胞生物转化技术,先在华根霉(*Rhizopus chinensis* CICC 40335, **j**)中转化齐墩果酸生成化合物**12**,接着通过枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 6633, **k**)在化合物**12**的C3位增加了糖基,生成 $3$ -O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $7\beta, 21\beta$ -dihydroxy-oleanolic acid (**26**)。化合物**12**在灰色链霉菌(**e**)中C29位发生了羟基化和羧酸化,生成新化合物 $3\beta, 7\beta, 21\beta, 29$ -tetra-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**27**)和 $3\beta, 7\beta, 21\beta$ -tri-hydroxy-olean-12-en-28,29-dioic acid (**28**),其中,化合物**28**具有显著神经保护作用<sup>[13]</sup>。齐墩果酸生物转化途径及其衍生物化学结构见图1。

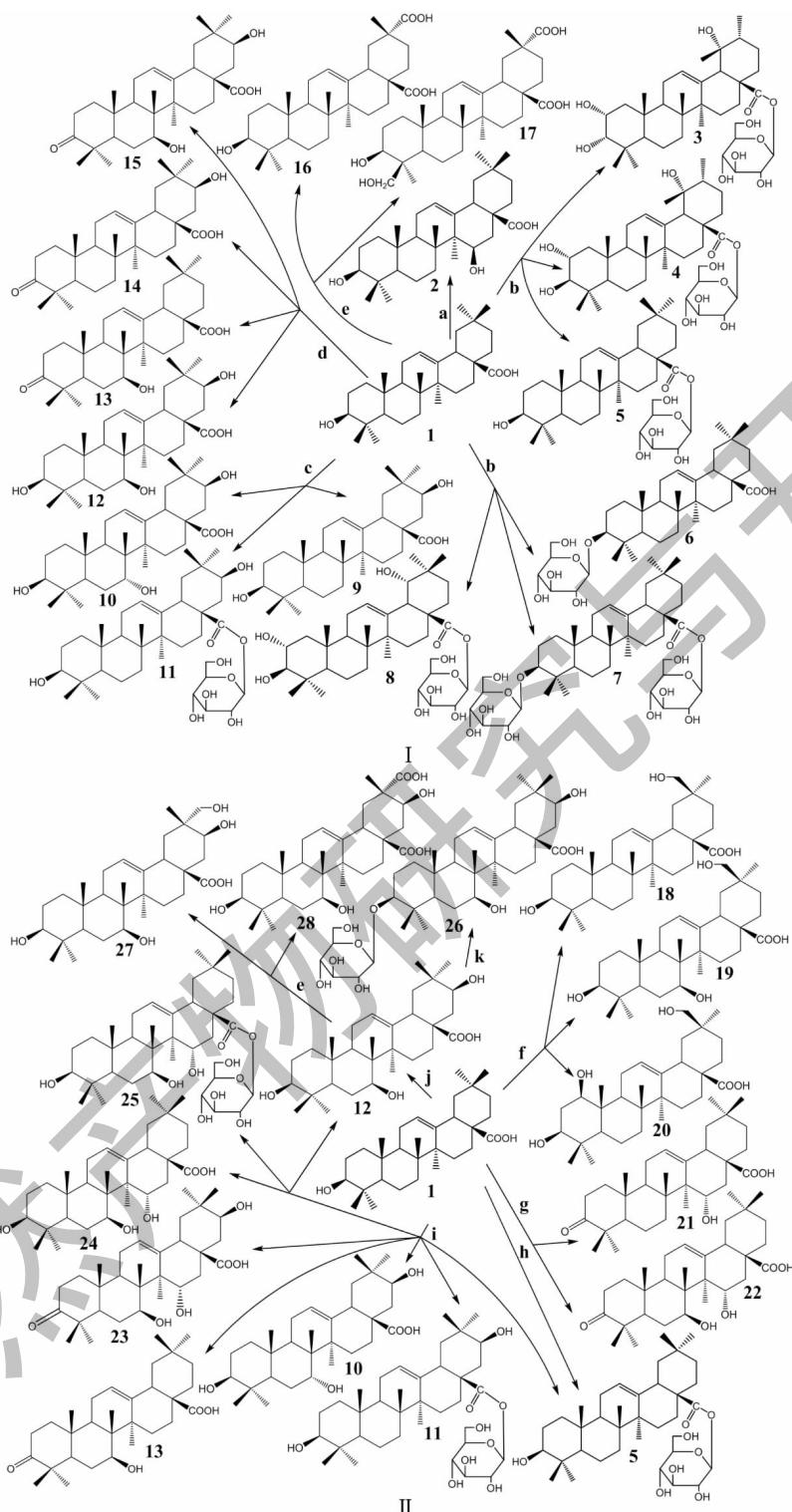


图1 齐墩果酸的生物转化途径及其衍生物化学结构

Fig. 1 Biotransformation pathway of oleanolic acid and chemical structure of oleanolic acid derivatives

### 1.1.2 甘草酸

甘草酸(glycyrrhetic acid, GL, 29),又被称为甘草甜素,其化学名为 $3\beta$ -glcA1-2glcA-11-oxo-urs-12-

en-30-oic acid, 化学分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$ , 分子量822.93。甘草酸不仅是一种天然的食品甜味剂,还具有多种药效活性,如:抗炎、抗过敏、抗病毒、抗哮

喘以及增强免疫功能等,在临幊上用于治疗肝炎、气管炎、胃溃疡和皮肤病等疾病<sup>[14]</sup>,尤其可以作为一种辅助治疗手段,减轻新型冠状病毒(COVID-19)重症患者的炎症反应<sup>[15]</sup>。甘草酸带有两分子葡萄糖醛酸,极性大,不易被透膜吸收,生物利用度低,可以通过水解掉葡萄糖醛酸来提高生物利用度。然而化学方法转化对两个糖苷键水解选择性不强<sup>[16]</sup>,但在生物转化领域上,通过 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷酶作用于糖苷键,可以水解掉一个或两个葡萄糖醛酸,生成单葡萄糖醛酸甘草次酸(3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide, GAMG, 30)或甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA, 31)。

笔者所在课题组<sup>[17]</sup>发现甘草酸在土曲霉(*Aspergillus terreus* Li-20, w)中既可以转化生成单葡萄糖醛酸甘草次酸也可以生成甘草次酸;在焦曲霉(*Aspergillus ustus* Li-62, p)中只转化生成甘草次酸;在产紫青霉(*Penicillium purpurogenum* Li-3, l)中只转化生成单葡萄糖醛酸甘草次酸;在最近的研究中

发现,我们发现褐红篮状菌(*Talaromyces pinophilus* Li-93, v)<sup>[18]</sup>能够转化甘草酸生成单葡萄糖醛酸甘草次酸,并分离其中的 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷酶,将其编号为TpGUS79A。也有学者研究报道在黑曲霉(*Aspergillus* sp: CPCC480386, m)<sup>[19]</sup>、球毛壳菌(*Chaetomium globosum*, n)<sup>[20]</sup>、蓝状菌(*Talaromyces* sp. 02, o)<sup>[21]</sup>中转化甘草酸只生成单葡萄糖醛酸基甘草次酸,其中最高转化产率达98.68%。在大肠杆菌(*Escherichia coli* MTCC 1652, q)<sup>[22]</sup>、米曲霉(*Aspergillus oryzae*, r)<sup>[23]</sup>、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*, s)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, t)和鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, u)<sup>[24]</sup>转化甘草酸只生成甘草次酸,最高转化产率达到76.7%。由此看来,不同微生物来源的 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷酶的对糖苷键具有选择性水解作用,但导致选择性水解的原因还有待进一步研究。甘草酸的生物转化途径及其衍生物化学结构见图2。

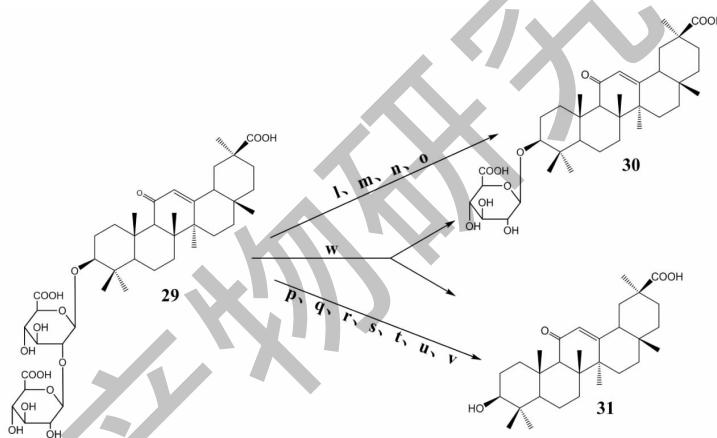


图2 甘草酸的生物转化途径及其衍生物结构

Fig. 2 Biotransformation pathway of glycyrrhizic acid and chemical structure of glycyrrhizic acid derivatives

### 1.1.3 甘草次酸

C7位羟基化是甘草次酸生物转化中最常见的反应类型,在新月弯孢霉(*Curvaria crescent* KA-91, x)<sup>[25]</sup>、华根霉(*Rhizopus chinensis* CICC 40335, j)<sup>[13]</sup>、短刺小克银汉霉(*Cunninghamella blakesleeana* CGMCC 3.970, y)<sup>[26]</sup>、刺孢小克银汉霉(*Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a, z)<sup>[27]</sup>、无根根霉(*Rhizopus arrhizus* AS 3.2893, A)<sup>[28]</sup>和蝇卷霉(i)<sup>[28]</sup>中均有7 $\beta$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid(32)生成。在无根根霉(A)<sup>[28]</sup>和多型孢毛霉(*Mucor polymorphosporus*, B)<sup>[29]</sup>中可以生成异构体7 $\alpha$ -hydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid(33)。另外,在多型孢毛霉

(B)<sup>[29]</sup>中,甘草次酸的C3位发生羰基化反应,C6、C7、C24和C27位发生羟基化反应生成6 $\beta$ ,7 $\beta$ -di-hydroxyglycyrrhetic acid(34)、27-hydroxyglycyrrhetic-acid(35)、24-hydroxyglycyrrhetic acid(36)和3-oxo-7 $\beta$ -hydroxyglycyrrhetic acid(37)。在刺孢小克银汉霉(z)<sup>[27]</sup>中,甘草次酸的C1和C15位发生羟基化反应,C7和C27位酯化成环,生成15 $\alpha$ -hydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid(38)、15 $\alpha$ -hydroxy-18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid(39)、13 $\beta$ -hydroxy-7 $\alpha$ ,27-oxy-12-dihydro-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid(40)和1 $\alpha$ -hydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid(41)。在假柱孢梨头霉(*Absidia pseudo cylinderospora* ATCC24169, C)<sup>[27]</sup>中,C7和C15位

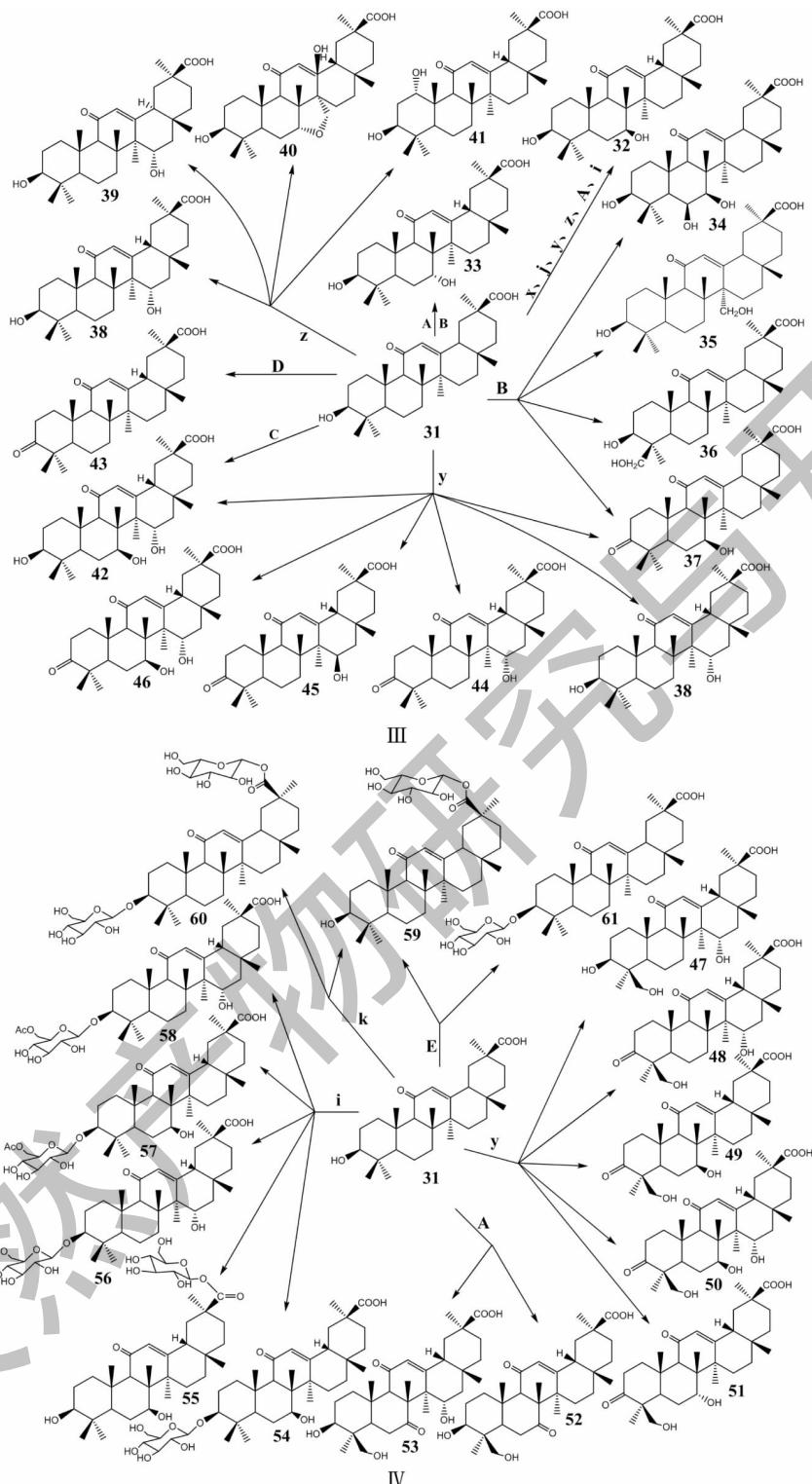


图3 甘草次酸的生物转化途径及其衍生物结构

Fig. 3 Biotransformation pathway of glycyrrhetic acid and chemical structure of glycyrrhetic acid derivatives

发生羟基化反应生成  $7\beta, 15\alpha$ -dihydroxy- $18\beta$ -glycyrrhetic acid(42)。在绿色粘帚霉(*Gliocladium viride* ATCC 10097, D)<sup>[27]</sup>中, C3 位发生羰基化反应生成

3-oxo- $18\beta$ -glycyrrhetic acid(43)。在短刺小克银汉霉(y)<sup>[26,30]</sup>中甘草次酸的 C3 位羰基化, C7 和 C15 位羟基化生成 3-oxo- $15\alpha$ -hydroxy- $18\beta$ -glycyrrhetic acid

acid (**44**)、3-oxo-15 $\beta$ -hydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (**45**)、3-oxo-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (**46**)、化合物 **37**、**38** 和 **42**。后又发现在短刺小克银汉霉 (**y**)<sup>[31]</sup> 中, C24 位也能发生羟基化反应生成 15 $\alpha$ ,24-dihydroxyglycyrrhetic acid (**47**)、3-oxo-15 $\alpha$ ,24-dihydroxyglycyrrhetic acid (**48**)、3-oxo-7 $\beta$ ,24-dihydroxyglycyrrhetic acid (**49**)、3-oxo-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,24-trihydroxy-glycyrrhetic acid (**50**) 和 3-oxo-7 $\alpha$ ,24-dihydroxyglycyrrhetic acid (**51**)。Fan 等<sup>[28]</sup> 在无根根霉 (**A**) 中转化甘草次酸的 C7 位羰基化和 C15 位羟基化生成 7-oxo-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (**52**) 和 7-oxo-15 $\alpha$ -hydroxy-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (**53**)。在蝇卷霉 (**i**)<sup>[28]</sup> 中, C7 和 C15 位发生羟基化反应, C3 和 C30 位发生糖基化反应, 生成 7 $\beta$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid-3-O- $\beta$ -D-glucoside (**54**)、7 $\beta$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid-30-O- $\beta$ -D-glucoside (**55**) 和 15 $\alpha$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid-3-O- $\beta$ -D-glucoside (**56**)。另外, C3 位连接的葡萄糖羟基还可以发生乙酰化反应生成 7 $\beta$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid-3-O- $\beta$ -D-6'-O-acetyl-glucoside (**57**) 和 15 $\alpha$ -hydroxyl-18 $\beta$ -glycyrrhetic acid-3-O- $\beta$ -D-6'-O-acetyl-glucoside (**58**)。枯草芽孢杆菌 (**k**)<sup>[13,32]</sup> 可转化甘草次酸的 C3 和 C30 位发生糖基化反应, 生成 30-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl glycyrrhetic acid (**59**) 和 3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) glycyrrhetic acid-30-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**60**)。笔者所在课题组<sup>[33]</sup> 进一步将枯草芽孢杆菌中 UGT 酶在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, **E**) 中重组表达, 生成 GA-3-O- $\beta$ -D-glucoside (**61**) 和 GA-30-O- $\beta$ -D-glucoside (**59**), 并证明对乳腺癌细胞 (MCF-7) 和人肝癌细胞 (HepG2) 的细胞毒活性比 GA 和 GL 高, 化合物 **61** 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抗菌活性比 GA 高。甘草次酸的生物转化途径及其衍生物化学结构见图 3。

## 1.2 乌苏烷型

熊果酸 (ursolic acid, UA, **62**), 又名乌索酸、乌苏酸<sup>[34]</sup>, 其化学名 3 $\beta$ -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, 化学分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 分子量为 456.71。熊果酸在抗癌、抗糖尿病中均起重要作用, 被誉为抗癌治疗中最有希望的药物<sup>[35]</sup>。熊果酸衍生物的开发不仅可以弥补熊果酸低溶解性、低渗透性的不足, 还可以提高口服利用度<sup>[36]</sup>。

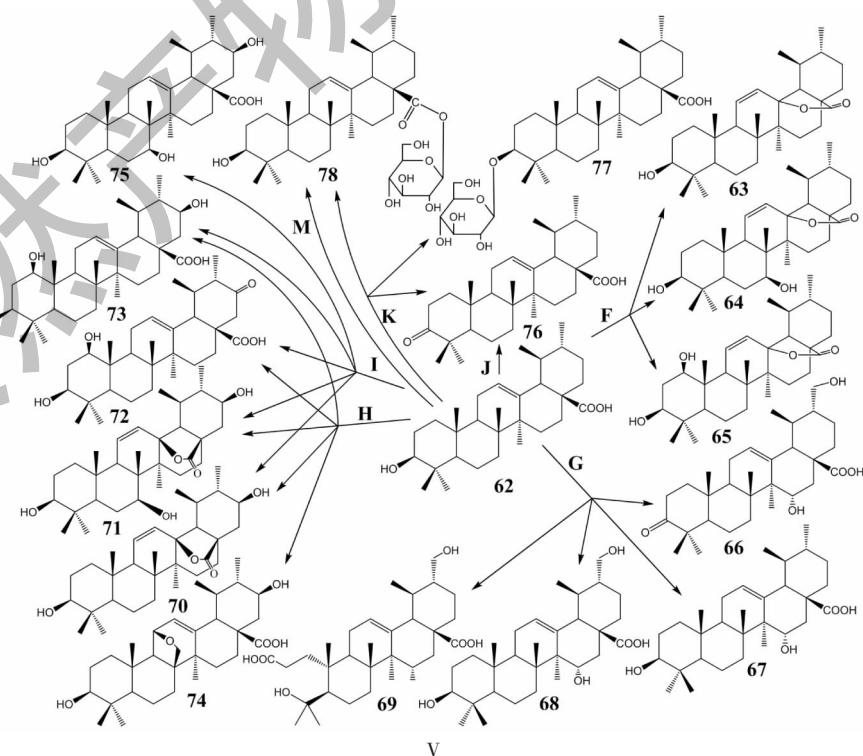
在深黄伞形霉 (*Umbelopsis isabelline*, **F**)<sup>[37]</sup> 中, 熊果酸的 C1 位和 C7 位发生羟基化反应, C11 位和 C12 位发生脱氢氧化反应, C13 位和 C28 位发生酯化反应生成 3 种化合物: 3 $\beta$ -hydroxy-urs-11-en-28, 13-lactone (**63**)、3 $\beta$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-urs-11-en-28, 13-lactone (**64**) 和 1 $\beta$ , 3 $\beta$ -dihydroxy-urs-11-en-28, 13-lactone (**65**); 在小孢拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis microspora*, **G**)<sup>[38]</sup> 中, 熊果酸的 C4 位、C15 位和 C30 位发生羟基化反应, C3 位发生羰基化反应生成 3-oxo-15 $\alpha$ , 30-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**66**)、3 $\beta$ , 15 $\alpha$ -dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**67**) 和 3 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 30-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**68**), C3 位也会发生羧化反应生成 3, 4-seco-ursan-4, 30-dihydroxy-12-en-3, 28-dioic acid (**69**) 4 种化合物。Huang 等<sup>[39]</sup> 在此基础上发现在总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum* AS 3.264, **H**) 中 C21 位也可以发生羟基化和羰基化反应, C11 位、C26 位发生环氧化反应, 共生成 5 种化合物: 3 $\beta$ , 21 $\beta$ -dihydroxy-urs-11-en-28-oic acid-13-lactone (**70**)、3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 21 $\beta$ -trihydroxy-urs-11-en-28-oic acid-13-lactone (**71**)、1 $\beta$ , 3 $\beta$ -dihydroxy-urs-12-en-21-one-28-oic acid (**72**)、1 $\beta$ , 3 $\beta$ , 21 $\beta$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**73**) 和 11, 26-epoxy-3 $\beta$ , 21 $\beta$ -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**74**), 其中, 化合物 **72** 对蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 有抑制活性。付少彬等<sup>[40]</sup> 在总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum* CG-MCC 3.2500, **I**) 发现生成了新化合物 3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 21 $\beta$ -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (**75**)。研究表明, 在链格孢菌 (*Alternaria alternata* AS 3.577, **J**)<sup>[41]</sup>、梅林青霉 (*Penicillium melinii* AS3.4474, **K**)<sup>[42]</sup> 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* CGMCC 1.1741, **L**)<sup>[43]</sup> 中改变了 C3 位结构, 发生羰基化反应生成 3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (**76**), 在梅林青霉 (**K**)<sup>[42]</sup> 中还发生了 C3 位和 C28 位糖基化得到 3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖熊果酸酯 (**77**) 和 28-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖熊果酸酯 (**78**), 在巨大芽孢杆菌 (**L**)<sup>[43]</sup> 中, C1 位、C11 位发生羟化反应, C13 位、C28 位发生酯化反应, C28 发生糖基化反应, 得到 1 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (**79**)、1 $\beta$ , 3 $\beta$ , 11 $\alpha$ -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**80**)、1 $\beta$ , 11 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**81**) 和 1 $\beta$ -hydroxy-3-oxo-urs-12-en-28, 13-lactone (**82**), 这些衍生物对一氧化氮

的抑制作用强于 UA<sup>[43]</sup>。在长柄链格孢菌(*Alternaria longipes* AS3.2875, M)<sup>[44]</sup>中, C28 位糖基化得到化合物 78, 后续 Zhang 等<sup>[45]</sup>在同一菌株种发现 C3 位糖基化和羰基化, C2 位和 C21 位羟基化, 得到了化合物 77、3-carbonyl-ursolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester(83)、2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxy ursolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (84)、3 $\beta$ , 21 $\beta$ -dihydroxy ursolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (85) 和 3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-ursolic acid 28-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) ester(86)。在灰色链霉菌(*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* 4.18, N)<sup>[46]</sup>和链格孢菌(*Alternaria alternata* ATCC 34509, O)<sup>[47]</sup>中 C2 位发生羟基化生成科罗索酸(87)。另外在链格孢菌(O)中, C23 位、C24 位也会发生羟基化, C28 位羧酸被还原成羟甲基, 生成 urs-12-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,28-triol (88)、3 $\beta$ , 23-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid(89)、2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23,24-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (90)、2 $\alpha$ ,3 $\beta$ , 23,24-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (91)、3 $\beta$ , 28-dihydroxy-12-ursene (92)、urs-12-en-3 $\beta$ -ol (93) 和 urs-12-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (94), 其中化合物 87、90 和 91 对乳腺癌(MCF-7、MDA-MB-231)、结肠癌(Caco-2)和肝癌(HepG2)细胞抗增殖活性增强<sup>[47]</sup>。粉红粘帚霉(*Gliocladium roseum* CGMCC 3.3657, P)<sup>[48]</sup>催化

熊果酸 C21 位羟基化和羰基化, C3 位和 C28 位酯化和羧酸化, C4 和 C23 脱氢氧化, 生成 21-oxo, A-homo-3 $\alpha$ -oxa-urs-12-en-3-one-28-oic acid (95)、21-oxo-3,4-seco-ursan-4(23),12-dien-3,28-dioic acid(96)、21 $\beta$ -hydroxyl-A-homo-3 $\alpha$ -oxa-urs-12-en-3-one-28-oic acid (97)、21 $\beta$ -hydroxyl-3,4-seco-ursan-4(23),12-dien-3,28-dioic acid(98), 并证明 C21 的酮基可能有助于阻止丙型肝炎病毒的入侵。Zhang 等<sup>[49]</sup>利用刺囊毛霉(*Mucor spinosus* AS 3.3450, Q)使 C7 位和 C21 位羟基化, C28 位羧酸的羟基被甲基化, C3 位糖基化得到化合物 75、3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-ursolic acid-28-etha-none(99) 和 3 $\beta$ ,21 $\beta$ -dihydroxy-ursolic acid-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside(100)。与 UA 相比, 化合物 99 对 HeLa 细胞、K562 细胞和 KB 细胞株具有更强的细胞毒活性。熊果酸的生物转化途径及其衍生物结构见图 4。

### 1.3 羽扇豆烷型

白桦脂酸(betulinic acid, BA, 101), 也叫桦木酸, 其化学名为 3 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid, 其化学分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 分子量为 456.7。白桦脂酸也具有抗癌、抗炎和抗氧化等方面的活性。与其他五环三萜类化合物相比, 白桦脂酸在抑制黑色素瘤和抗艾滋病毒方面上发挥着举足轻重的作用。



续图 4(Continued Fig.4)

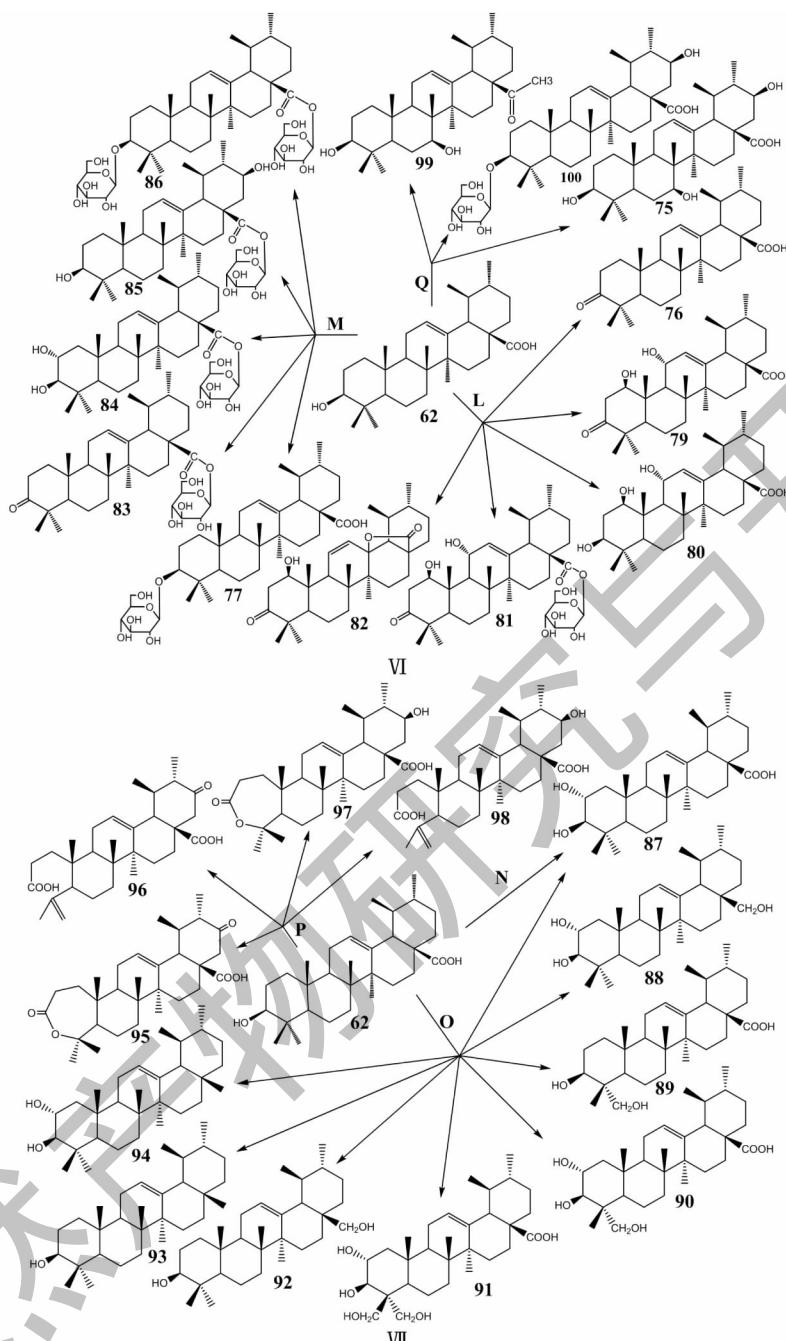


图4 熊果酸的生物转化途径及其衍生物结构

Fig. 4 Biotransformation pathway of ursolic acid and chemical structure of ursolic acid derivatives

用。白桦脂酸衍生物的抗 HIV 临床实验也已经进行到Ⅱ期阶段,美国癌症研究所 NCI 已将其列入快速研发规划项目(RAID)<sup>[50]</sup>。白桦脂酸已成为研发新药方面最具潜力的先导化合物之一。

Goswami 等<sup>[51]</sup>发现白桦脂酸在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* SC1644, R; *Bacillus megaterium* SC6394, S)、脆弱链霉菌(*Streptomyces fragilis*

SC16401, T)、雅致小克银汉霉(*Cunninghamella elegans* SC16025, U)、土曲霉(*Aspergillus terreus* SC16513, V)改变了原有结构。在芽孢杆菌(R)<sup>[51]</sup>中,C7、C15、C23位发生羟基化,C3发生羰基化,生成3种衍生物:3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -trihydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid(102)、3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,23-tetrahydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid(103)和7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-

*lup-20(29)en-28-oic acid (104)*。在芽孢杆菌(S)<sup>[51]</sup>中,C15、C23位未发生变化,C30位结构既会发生羟基化反应,也会发生羰基化反应,生成3,30-dioxo-lup-20(29)en-28-oic acid (105)、7 $\beta$ -hydroxy-3,7-dioxo-lup-20(29)en-28-oic acid (106)和3-oxo-30-hydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid (107)。在脆弱链霉菌(T)<sup>[51]</sup>中,C2位结构改变,转化生成2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,7 $\beta$ -trihydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid (108)、2-oxo-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid (109)和3-oxo-7 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid (110)。在雅致小克银汉霉(U)<sup>[51]</sup>中,C25位发生羟基化反应,生成3 $\beta$ ,25-dihydroxy-lup-20(29)en-28-oic acid (111)。在土曲霉(V)<sup>[51]</sup>中,白桦脂酸A环发生裂解,C3位发生羧酸化,C4位发生羟基化和脱氢反应,生成4-hydroxy-3,4-seco-lup-20(29)-en-3,28-dioic acid (112)和3,4-seco-lup-20(29),4(23)-dien-3,28-dioic acid (113)。Wang等<sup>[52]</sup>也研究了枯草芽孢杆菌(k)中白桦脂酸的生物转化反应,在C3、C28位连接了糖基,同时C23位也发生了羟基化反应,生成28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl betulinic acid (114)、3-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-betulinic acid-28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (115)、23-hydroxy-betulinic acid (116)和23-hydroxy-28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl betulinic acid (117),化合物117抑制促凝活性强于BA。在解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* FJ18,W)<sup>[53]</sup>中,白桦脂酸C28位发生糖基化反应,生成3 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid 28-O-(4-oxy-4-oxobutanoic acid-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl) ester (118)和28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oate (119),C28位引入糖基对A375、Hela、U251、SH-SY5Y和MCF-7的细胞毒活性均强于BA,但4-oxy-4-oxobutanoic acid的引入却稍微降低了细胞毒活性。在蝇卷霉(i)<sup>[54]</sup>中,C7、C15、C21位发生羟基化反应,C3和C21位发生羰基化反应,生成化合物102、104和3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,21 $\beta$ -tetrahydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (120)、3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,21 $\beta$ -trihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (121)、3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-21-oxo-lup-20(29)-en-28-oic acid (122)、7 $\beta$ ,21 $\beta$ -dihydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oic acid (123)和3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (124)。在刺孢小克银汉霉(y)<sup>[54]</sup>中,C1、C7、C21和C26位发生羟基化反应,生成化合物121、化合物124、1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,26-trihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid

(125)、1 $\beta$ ,3 $\beta$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (126),另外C1位同时发生了乙酰化反应,生成3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-1-O-acetyl-lup-20(29)-en-28-oic acid (127)。化合物102、120、121、122、124、125、126和127均对NO有抗炎活性,且化合物120、121和126对NO的抗炎活性强于BA。白桦脂酸的生物转化途径及其衍生物结构见图5。

## 2 总结及展望

从上述研究中不难看出,微生物转化可以将天然有机化合物转化成多种多样的衍生物,能够为生物活性筛选提供更多结构新颖的化合物,进而开发新药。能够进行生物转化的微生物种类繁多,其中真菌用于五环三萜类化合物生物转化研究最多,尤其是霉菌,反应类型包括羟基化、羰基化、水解、羧酸化、糖基化、还原、脱氢氧化和乙酰化等多种类型。在真菌中,羟基化反应最常发生在C7、C15和C21位上,在C1、C2、C23、C24和C30位上也有较多转化,少数转化发生在C4、C5、C6、C13、C19、C25、C26和C29位上。羰基化反应最常发生在C3和C21位上,少数发生在C2和C24位上。酯化反应在C13和C28位最常发生,在C7和C27位也有发现。脱氢反应最常见于C11位,在C4、C5和C23位上偶有发生。羧酸化在C3、C29和C30位上也非常常见。C3、C28和C30位是连接葡萄糖的常见位点,最易发生水解反应和糖基化反应。利用细菌转化五环三萜类化合物的研究报道略少于真菌,研究报道最多的是杆菌,主要有羟基化、羰基化、糖基化、水解和酯化反应等反应类型,能实现C2、C1、C7、C15、C23和C30位羟基化和C3位羰基化,以及真菌中未能实现的C11位羟基化和C7、C30位的羰基化。除此之外,C11和C26位发生环氧化,A环C2和C3位发生裂解,C1位发生乙酰化,C28位羧酸被还原成羟甲基等反应类型也不断被报道发现。

生物转化的目的是能够将底物转化成活性更强的化合物。有些转化反应增强了对肿瘤细胞细胞毒活性,如在C2、C7和C21位羟基化<sup>[47]</sup>,C28位甲基化<sup>[49]</sup>,C3糖基化<sup>[9]</sup>,C28位单糖基化<sup>[53]</sup>,这些转化生成的产物为抗肿瘤药物活性筛选和研究提供了物质基础。另外,在C28位单糖基化可降低血液促凝作用,为心血管疾病提供先导化合物<sup>[52]</sup>。有些转化反应可以增强抗炎活性<sup>[55]</sup>,如在C3位羰基化<sup>[43]</sup>,C1位乙酰化,C1、C7、C15、C21和C24位羟基化<sup>[31,54]</sup>和C3、C28和C30位糖基化<sup>[8,28]</sup>。有些转化

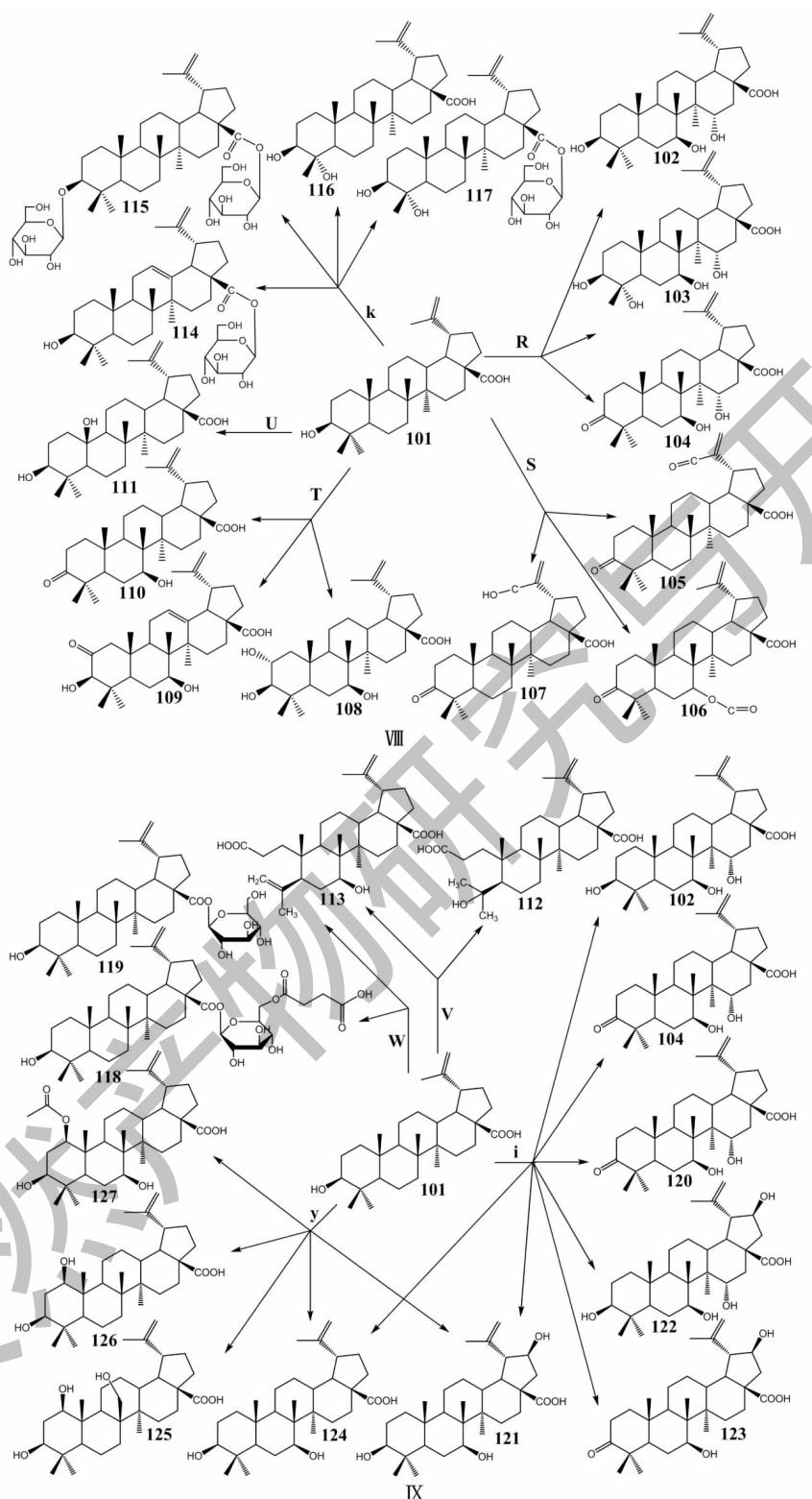


图 5 白桦脂酸的生物转化途径及其衍生物结构

Fig. 5 Biotransformation pathway of betulinic acid and chemical structure of betulinic acid derivatives

反应增强了抗菌活性,如在 C28 位和 C3 位糖基化<sup>[45]</sup>,C3 位羰基化和 C21 位羟基化<sup>[11]</sup>,其生成的

衍生物具有开发抗菌药物的潜能。C29 位羧酸化有神经保护的潜力<sup>[13]</sup>。随着五环三萜类化合物生物

转化技术的研究,大量活性物质被发现,这些新的转化产物不断在为临床应用提供新的先导化合物或药效物质。微生物种类众多,如何通过筛选生物转化活性菌株,使五环三萜类化合物创造新的活性价值还需要进一步深入研究。

近年来酶工程、细胞和酶的固定化、基因工程、发酵工程、代谢组学、蛋白质组学等的飞速发展,有望把多种基因整合于同一工程菌种同时完成多部转化反应,使微生物转化在药物合成上具有更美好的前景。

## 参考文献

- 1 Liu QX, et al. Application of microbial transformation in natural products research[J]. *J Pharm Pract(药学实践杂志)*, 2012, 30:321-325.
- 2 Shah SA, et al. Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15;12027-12060.
- 3 Zhang MF, et al. Research progress on lipidemic regulation and antiobesity effects of oleanolic acid and ursolic acid[J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2015, 38:90-97.
- 4 Zhang MF, et al. Research progress on vascular pharmacologic effects of oleanolic and ursolic acids[J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2017, 40;1510-1519.
- 5 Zhang MF, et al. Research advances on effects of ursolic acid and oleanolic acid against hepatic steatosis and fibrosis[J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2017, 40;270-278.
- 6 Sun H, et al. Preparation and crystal structure of 15 $\alpha$ -hydroxy-oleanolic acid [J]. *Chin J Struct Chem*, 2010, 29: 1798-1801.
- 7 Ting G, et al. Microbial transformation of oleanolic acid by *Trichothecium roseum*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16: 383-386.
- 8 Yan SS, et al. Microbial hydroxylation and glycosidation of oleanolic acid by *Circinella muscae* and their anti-inflammatory activities[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33:1849-1855.
- 9 Liu DL, et al. Biotransformation of oleanolic acid by *Alternaria longipes* and *Penicillium adametzi*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13:160-167.
- 10 Zhu YY, et al. New approaches to the structural modification of olean-type pentacyclic triterpenes via microbial oxidation and glycosylation[J]. *Tetrahedron*, 2011, 67:4206-4211.
- 11 Capel CS, et al. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens[J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2011, 38:1493-1498.
- 12 Martinez A, et al. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 94: 229-237.
- 13 Xu SH, et al. Application of tandem biotransformation for biosynthesis of new pentacyclic triterpenoid derivatives with neuroprotective effect[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(4):126947.
- 14 Lu DQ, et al. Research progress in biotransformation for biological active constituents from natural *glycyrrhiza* medicines [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2012, 23:454-456.
- 15 Ge FJ, et al. Glycyrrhetic acid:a potential drug against COVID-19[J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 2021, 56: 1211-1216.
- 16 Liu MQ. Selection of catalytic enzymes for the reaction of GL to GAMG[J]. *Yunnan Chem Technol(云南化工)*, 2018, 45(10):128-129.
- 17 Wang C, et al. Isolation and characterization of three fungi with the potential of transforming glycyrrhizin [J]. *World J Microb Biot*, 2013, 29:781-788.
- 18 Xu YH, et al. A novel  $\beta$ -Glucuronidase from *Talaromyces pinophilus* Li-93 precisely hydrolyzes glycyrrhizin into glycyrrhetic acid 3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(19):e00755-18.
- 19 Liu YS. Biotransformation and purification of glycyrrhetic acid monoglucuronide[D]. *Univ Sci Technol Liaoning(辽宁科技大学)*, 2014.
- 20 Wu WT. Biosynthesis of glycyrrhetic acid 3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide by the endophytic fungi from dong-xiang wild rice[D]. *Jiangxi Sci Technol Norm Univ(江西科技师范大学)*, 2016.
- 21 Guo LC, et al. Screening strains for biosynthesis of glycyrrhetic acid monoglucuronide and the optimization of fermentation process[J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2017, 38(16):88-94.
- 22 Ahmad M, et al. Alginate immobilization of *Escherichia coli* MTCC 1652 whole cells for bioconversion of glycyrrhizinic acid and into 18- $\beta$  glycyrrhetic acid[J]. *Pak J Biol Sci*, 2013, 16:2046-2049.
- 23 Su L, et al. Screening and identify of the glycyrrhizic acid microbial transformation and optimization of fermentation conditions for glycyrrhetic acid by microorganism[J]. *Hubei Agr Sci(湖北农业科学)*, 2017, 56:1918-1923.
- 24 Yuan TJ, et al. *Lactobacillus murinus* improved the bioavailability of orally administered glycyrrhizic acid in rats[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:597.
- 25 He ZJ, et al. Study on the transformation of glycyrrhetic acid by *Curvularia lunata* KA-91[J]. *Pharm Biotechnol(药物生物技术)*, 2011, 18:238-241.
- 26 Qin YJ, et al. Biotransformation of glycyrrhetic acid by

- Cunninghamella blakesleeana*[J]. Chin J Nat Med,2010,8:373-381.
- 27 Maatooq GT, et al. Bioactive microbial metabolites from glycyrrhetic acid[J]. Phytochemistry. 2010,71:262-270.
- 28 Fan BY, et al. Anti-Inflammatory 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid derivatives produced by biocatalysis[J]. Planta Med, 2019, 85(1):56-61.
- 29 Xiu LX, et al. Structural determination of two new triterpenoids biotransformed from glycyrrhetic acid by *Mucor polymorphosporus*[J]. Magn Reson Chem, 2010,48:164-167.
- 30 Ma Y, et al. Microbial transformation of glycyrrhetic acid by *Cunninghamella blakesleeana*[J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志),2015,40:4212-4217.
- 31 Ma Y, et al. Microbial transformation of glycyrrhetic acid and potent neural anti-inflammatory activity of the metabolites[J]. Chin Chem Lett, 2017,28:1200-1204.
- 32 Shen PP, et al. Microbial transformation of glycyrrhetic acid derivatives by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus megaterium* CGMCC 1. 1741 [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(11):115465.
- 33 Ahmad N, et al. Novel catalytic glycosylation of glycyrrhetic acid by UDP-glycosyltransferases from *Bacillus subtilis*[J]. Biochem Eng J,2020,162(15):107723.
- 34 Xiang RQ, et al. Advances in anti-tumor effects of ursolic acid and its derivatives [J]. J Phram Res (药学研究), 2019,38(2):63-69.
- 35 Meng QG, et al. Development on the synthesis and activities of ursolic acid derivatives [J]. J Jining Med Univ(济宁医学院学报),2017,40:245-250.
- 36 Zhang MF, et al. Research advance on pharmacokinetics of ursolic acid[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2018,41: 169-173.
- 37 Fu SB, et al. Biotransformation of ursolic acid by an endophytic fungus from medicinal plant *Huperzia serrata* [J]. Chem Pharm Bull,2011,59:1180-1182.
- 38 Fu SB, et al. Multihydroxylation of ursolic acid by *Pestalotiopsis microspora* isolated from the medicinal plant *Huperzia serrata*[J]. Fitoterapia,2011,82:1057-1061.
- 39 Huang FX, et al. Microbial transformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum*(Cohn) Schroter AS 3. 264[J]. Phytochemistry,2012,82:56-60.
- 40 Fu SB, et al. Biotransformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3. 2500 and anti-HCV activity [J]. Fitoterapia,2013,86:123-128.
- 41 Li QY, et al. Biotransformation of ursolic acid by *Alternaria alternata*[J]. J Logistics Univ PAP:Med Sci(武警后勤学院学报:医学版),2012,21:978-979.
- 42 Zhu TL, et al. Microbial transformation of ursolic acid using *Penicillium melinii*[ J ]. Chin Tradit Herb Drugs( 中草药 ), 2014,45:476-479.
- 43 Zhang C, et al. New derivatives of ursolic acid through the biotransformation by *Bacillus megaterium* CGMCC 1. 1741 as inhibitors on nitric oxide production [ J ]. Bioorg Med Chem Lett,2017,27:2575-2578.
- 44 Yan HJ, et al. Optimization of biotransformation of ursolic acid by *Alternaria longipes*[ J ]. Chin J Chin Mater Med( 中国中药杂志 ),2012,37:2280-2285.
- 45 Zhang CX, et al. Biotransformation of ursolic acid by *Alternaria longipes* AS3. 2875[J]. Nat Prod Res,2018,32(5):536-543.
- 46 Fu SB, et al. Biocatalytic synthesis of the anti-diabetes agent-corosolic acid by whole cells of microorganisms [ J ]. J Chin Chem SOC-Taip,2015,62:871-874.
- 47 Wang YH, et al. Substrate specificity for the 2 $\alpha$ -hydroxylation of ursolic acid by *Alternaria alternata* and the antitumor activities of those metabolites[J]. J Mol Catal B Enzym,2012, 83:51-56.
- 48 Fu SB, et al. Biocatalysis of ursolic acid by the fungus *Gliocladium roseum* CGMCC 3. 3657 and resulting anti-HCV activity[J]. Rsc Adv,2018,8:16400-16405.
- 49 Zhang SS, et al. Three new triterpenoids transformed from ursolic acid by *Mucor spinosus* AS3. 3450 and their cytotoxicity [ J ]. Phytochem Lett,2019,32:33-37.
- 50 Zhou YM, et al. Review on preparation technology and pharmacological activity of betulinic acid[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发),2016,28:978-985.
- 51 Goswami A, et al. Microbial transformations of betulinic and betulonic acids[J]. J Mol Catal B Enzym,2015,117:45-53.
- 52 Wang WW, et al. Microbial hydroxylation and glycosylation of pentacyclic triterpenes as inhibitors on tissue factor pro-coagulant activity [ J ]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27: 1026-1030.
- 53 Li HW, et al. Biotransformation of betulinic acid from *Nelumbinis Rhizoma* and cytotoxicity determination of the fermentation products against cancer cell lines [ J ]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med( 南京中医药大学学报 ),2017,33:144-149.
- 54 Chen C, et al. Biotransformation of betulinic acid by *Circinella muscae* and *Cunninghamella echinulata* to discover anti-inflammatory derivatives [ J ]. Phytochemistry , 2020 , 182: 112608.
- 55 Xu HB, et al. Effect of 11 traditional Chinese medicine extracts on nitric oxide production by LPS-activated RAW 264. 7 cells[J]. Cent South Pharm( 中南药学 ),2018,16(1): 72-75.