

· 综 述 ·

## 人参皂苷单体定向转化的生物催化及应用进展

李伟娜<sup>1,2</sup>, 蒋云云<sup>1,2</sup>, 刘彦楠<sup>1,2</sup>, 李春英<sup>1,2</sup>, 范代娣<sup>1,2</sup>

1 西北大学 化工学院 陕西省可降解生物医用材料重点实验室, 陕西 西安 710069

2 西北大学 化工学院 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心, 陕西 西安 710069

李伟娜, 蒋云云, 刘彦楠, 等. 人参皂苷单体定向转化的生物催化及应用进展. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1590-1606.

Li WN, Jiang YY, Liu YN, et al. Biocatalytic strategies in producing ginsenoside by glycosidase -a review. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1590-1606.

**摘 要:** 人参是我国传统中药, 药效显著、应用广泛。通过定向修饰与转化人参皂苷糖基可产生高抗癌活性稀有参皂苷。传统化学法由于制备工艺极其复杂、成本过高, 不能应用于临床, 微生物及其酶系转化成为解决该瓶颈问题的最可行手段。有关全细胞催化、糖苷酶重组表达、固定化及其催化分子识别机制和溶剂工程的生物转化已有大量综述报道, 但尚无在人参皂苷转化应用中的系统研究。文中通过对人参皂苷单体生物转化理论和应用研究最新进展的回顾, 结合目前广泛采用的生物催化方法的讨论, 系统梳理归纳了能够改善产物专一性、提高催化效率, 且具有工业应用前景的人参皂苷单体定向转化方法。基于酶分子设计以及离子液体溶剂工程, 对人参皂苷单体抗癌药物和食品、保健品市场的开发、规模化制备进行了展望。

**关键词:** 人参皂苷, 生物催化, 全细胞转化, 酶法转化, 离子液体

## Biocatalytic strategies in producing ginsenoside by glycosidase-a review

Weina Li<sup>1,2</sup>, Yunyun Jiang<sup>1,2</sup>, Yannan Liu<sup>1,2</sup>, Chunying Li<sup>1,2</sup>, and Daidi Fan<sup>1,2</sup>

1 Shaanxi Key Laboratory of Degradable Biomedical Materials, School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2 Shaanxi R&D Center of Biomaterials and Fermentation Engineering, College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

**Abstract:** *Panax ginseng* is a traditional Chinese medicine with significant pharmaceutical effects and wide application. Through orientational modification and transformation of ginsenoside glycosyl, rare ginsenosides with high antitumor activities can be generated. Traditional chemical methods cannot be applied in clinic. because of extremely complex preparation technologies and very high cost Transformations using microorganisms and their enzymatic systems provide the

**Received:** January 31, 2019; **Accepted:** April 2, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21576160), National Natural Science Foundation of China Young Scientists Fund (No. 21706211), Postdoctoral Science Foundation of China (No. 2015M582698).

**Corresponding author:** Daidi Fan. Tel/Fax: +86-29-88303360; E-mail: fandaidi66@126.com

国家自然科学基金 (No. 21576160), 国家自然科学基金青年科学基金 (No. 21706211), 博士后科学基金 (No. 2015M582698) 资助。

网络出版时间: 2019-04-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190411.0856.002.html>

most feasible methods for solving the main problems. At present, the key problems in enzymatic synthesis of ginsenosides include low specific enzyme activities, identity of enzymes involved in the enzymatic synthesis, and their catalytic mechanisms, as well as nonsystematic studies on structural bioinformatics; specificity of enzymatic hydrolysis for saponin glycosyl has been rarely studied. Many reviews have been reported on glycosidase molecular recognition, immobilization, and biotransformation in ionic liquids (ILs), whereas ginsenoside transformation and application have not been systematically studied. To evaluate theoretical and applied studies on ginsenoside-oriented biotransformation, by reviewing the latest developments in related fields and evaluating the widely applied biocatalytic strategy, this review aims to evaluate the ginsenoside-oriented transformation method with improved product specificity, increased biocatalytic efficiency, and industrial application prospect based on the designed transformations of enzyme and solvent engineering of ILs. Therefore, useful theoretical and experimental evidence can be obtained for the development of ginsenoside anticancer drugs, large-scale preparation, and clinical applications in cancer therapy.

**Keywords:** ginsenosides, biocatalysis, whole cell conversion, enzyme conversion, ionic liquids

肿瘤是全球致死率最高的恶性疾病, 危害人类的生命与健康<sup>[1]</sup>。目前临床上肿瘤治疗药物很多来源于植物, 如紫杉醇、雷公藤甲素等, 而现代药理学研究表明, 来源于人参 *Panax ginseng*、西洋参 *American ginseng* 和三七 *Panax notoginseng* 中的重要次级代谢产物人参皂苷具显著抗癌效果, 而尤以稀有人参皂苷及苷元的抗肿瘤、保护神经系统、保肝护肝等药理活性最为显著<sup>[2]</sup>。而人参皂苷、次级皂苷和皂苷元等成分在人参属植物中含量较少, 体内转化量和生物利用度极低, 须通过体外总皂苷降解获得。

通过多种技术手段去除骨架结构达玛烷四环三萜支链上所连糖基, 定向获得人参皂苷单体成为研究的热点<sup>[3]</sup>。已经通过酸或热处理方法转化并分离出 289 种纯人参皂苷单体<sup>[4]</sup>。由国家药品监督管理局 (SFDA) 批准上市的抗癌新药参一胶囊 (人参皂苷 Rg3), 成为我国首个实现人参皂苷工业化生产的一类中药单体抗癌药物。国家 SFDA 唯一认可的人参皂苷 Rh2 产品今幸胶囊, 纯度 98% 的 20(S)-Rh2 经极其复杂的大孔树脂吸附、硅胶柱层析分离提取工艺获得, 每斤价格高达 100 多万人民币<sup>[5]</sup>。

基于微生物及其酶的生物催化由于反应特异性高、条件温和、副产物少、后处理简单成为

解决其瓶颈问题的最可行手段。原人参萜二醇 (Protopanaxadiol, PPD) 型及原人参萜三醇 (Protopanaxatriol, PPT) 型皂苷通过细胞转化或发酵以不同的水解途径转化为去糖基化 (Deglycosylation) 的人参皂苷<sup>[6]</sup>。实质为糖苷水解酶 (Glycoside hydrolase, GH) 对其侧链糖基 (以 1-4 分子的 D-葡萄糖、L-阿拉伯吡喃糖苷、L-阿拉伯呋喃糖苷、D-木糖和/或 L-鼠李糖等组成) 的特异性水解<sup>[7]</sup>。金凤燮课题组从微生物培养物、植物提取物得到人参皂苷糖苷酶 (纤维素酶和糖苷酶新亚类), 并依据底物糖基连接位置和内、外侧糖残基水解特异性进行了分类<sup>[8]</sup>。Shin 等<sup>[7]</sup>对不同来源人参皂苷 GH 归属、分子量、最适反应 pH、温度、比活等生化特性进行了总结。

微生物、酶法转化相比化学法在持续性、选择性和再生等方面的优势如表 1 所示。相比化学法, 微生物及其酶的生物转化仅存在溶剂耐受性和转化率方面的不足; 相比微生物法, 酶法主要存在成本和再生等问题<sup>[9]</sup>。本文综合人参皂苷生物转化最新进展的回顾, 及目前广泛采用的生物催化方法的讨论, 认为基于蛋白质工程的酶分子改造和绿色溶剂工程 (以离子液体为主) 的催化体系构建, 在高效、定向转化人参皂苷单体方面有广阔的工业应用前景。

表 1 不同催化方法的特点和选择

Table 1 Selected key characteristics of different types of catalysis

Characteristics	Catalysis		
	Chemical	Enzymatic	Whole-cell
Sustainability	Low	High	High
Cost	High	High	Low
Selectivity	Good	High	High
Self-replication	No	No	Yes
Solvent tolerance	High	Good	Low

## 1 人参皂苷糖基代谢及对药理活性的影响

通常人参根可直接口服，或以粉末或提取物通过能量饮料、茶和功能性补充剂食用。然而，口服人参对主要人参皂苷的吸收来说是无效的<sup>[20]</sup>。因为糖基化人参皂苷在肠道中的生物利用率非常低（比如 Rb1 为 0.1%–4.4%；Rb2 为 3.7%），且容易通过胆道或泌尿系统排出<sup>[11-12]</sup>，需要通过肠道微生物群对其药物代谢动力学特性的改变来逆转低生物利用度，最终被位于肠壁的天然微生物群降解为真正容易被吸收并发挥生物活性作用的稀有人参皂苷（Rg2、Rg3、Compound K 等）和苷元<sup>[13]</sup>。

稀有人参皂苷单体及其衍生物能够调控癌细胞炎症、氧化应激、血管生成、转移信号路径，单独或者结合其他药材治疗癌症<sup>[2]</sup>。基于糖基数量、位置和糖配基类型、双键位置和立体选择性，Quan 等<sup>[14]</sup>通过酸转化快速制备了 23 种稀有人参皂苷，并基于它们对 6 种癌细胞（包括 HCT-116、HepG2、MCF-7、Hela、PANC-1 和 A549）的细胞毒性作用分析了其皂苷结构-药理活性关系。Wei 等<sup>[15]</sup>研究脂肪酸酯化法修饰 Rh2，在体内抗肿瘤活性不变的同时，二辛酰酯(D-Rh2)体外对肝细胞系 QSG-7701 毒性相比亲本 Rh2 显著降低。D-Rh2 可能通过刺激淋巴细胞对肿瘤细胞产生细胞毒性而间接影响肿瘤生长，较低副作用的

D-Rh2 可用作抗肿瘤候选药物。

天然化合物人参皂苷的体外修饰与转化增加了人参皂苷结构多样性。为深入研发高抗癌活性药物的应用，本课题组在前期的研究工作中通过酸转化、柱分离制备了一系列稀有皂苷及其组合物，通过抗肿瘤活性分析及初步临床观察，发现 PPD 型人参皂苷双键异构体 Rk1 和 Rg5（即 Rg3 C-20 处脱羟基产物）因抗癌活性优异而极具开发潜力。皂苷单体杀伤肿瘤细胞作用的强度与苷元类型、糖链长短及 C-20 立体异构有关，改造单体结构可增强抗肿瘤活性<sup>[6,14,16]</sup>。

以酸水解、高温等改变皂苷结构的化学法，均存在价格高、选择性差、副产物多等问题，工业化生产不易实现，多数单体分子结构和抗肿瘤活性的构效关系仍不能被完全阐明<sup>[14]</sup>。通过微生物及其酶系的生物催化，由于反应特异性高、条件温和、副产物少、后处理简单，适于稀有人参皂苷 Compound K、Rg3 及其衍生物等转化制备。生物转化修饰结构已涉及羟基化、环氧化、甲基化、异构化、酯化、水解、醇和酮之间的氧化还原、脱氢等多种反应类型<sup>[17]</sup>。而人参皂苷结构修饰主要在于对特定位点的糖基进行水解，通过不同位置糖链结构的变化来改善化合物的生物活性。

## 2 菌体及酶法转化人参皂苷单体

生物催化剂应用形式（即细胞悬浮液、无细胞提取物和纯化酶）一般取决于下游加工及菌体固有特性<sup>[18]</sup>（图 1）。细胞为酶提供了天然环境并防止蛋白构象变化，多种胞内、胞外酶的产生取决于生长条件和细胞发育状况。全细胞催化有利于节约人力、生产成本、维护成本。微生物多样性是菌体对各类自然条件（例如温度、pH、压力和盐）长期适应的结果，极端微生物在实验室条件下通常很难生长。除常规的富集培养，还可通过宏基因组 (Metagenome) DNA 库筛选或序列

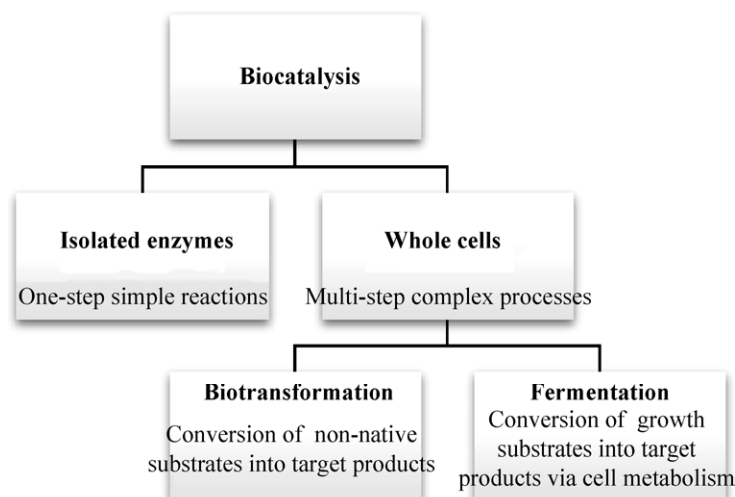


图 1 由分离酶或全细胞进行生物催化的比较 (改编自参考文献[18])

Fig. 1 Biocatalysis is carried out by isolated enzymes or by whole cells<sup>[18]</sup>. In the latter case, non-native (biotransformation) or native (fermentation) substrates can be used.

搜索发现新的功能基因,再结合适当的克隆载体和宿主获得工程菌<sup>[19]</sup>。酶较全细胞对一步反应更有优势,负责生命过程所有必需代谢反应的催化,一般反应条件温和,pH、温度范围有限,体外仅在最佳 pH 和温度条件下发挥作用。纯酶反应特异性更高,而酶的分离和纯化过程耗时费钱。

## 2.1 菌体/全细胞催化

微生物能够通过全细胞或发酵以不同代谢途径对人参皂苷进行去糖基化 (Deglycosylation)<sup>[6]</sup>。例如,以人参皂苷 Rb1 为底物转化生产 Compound K (已证明具诸如抗癌、抗炎、抗过敏、抗糖尿病、抗血管生成、抗衰老、神经保护和保肝作用等生物学功效<sup>[20]</sup>),枝孢霉菌 *Cladosporium cladosporioides*<sup>[21]</sup> 兼具两条水解途径: Rb1→G17→F2→Compound K→和 Rb1→Rd→F2→Compound K; 叶森金杆菌 *Chryseobacterium yeoncheonense* 和人体肠道菌群<sup>[22]</sup> 兼具 3 条水解途径: Rb1→F2→Compound K、Rb1→G17→G75→Compound K 或 Rb1→G17→F2→Compound K。

肠道菌群中的乳酸杆菌 *Lactobacillus* 和双歧杆菌属 *Bifidobacterium* spp.可合成对人参皂苷去糖基化所必需的多种糖苷酶 (EC 3.2.1),包括 β-

葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.2)、纤维素酶 (EC 3.2.1.4)、β-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)、α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (EC 3.2.1.55)、α-L-阿拉伯糖苷酶 (无 EC 编号) 和 β-木糖苷酶 (EC 3.2.1.37)<sup>[10,23]</sup>。肠道微生物组成及其糖苷酶活性对人参皂苷 CK、Re 等的代谢调控有重要作用<sup>[24]</sup>。而以人参皂苷为碳源进行的肠道细菌体外厌氧培养转化,存在培养基昂贵、产率低的问题<sup>[10]</sup>。

人参栽培土壤中可以分离用于人参皂苷转化的真菌<sup>[9]</sup>。曲霉属含 β-葡萄糖苷酶约 250 种,在食品和饮料领域应用了 1 500 年,其中黑曲霉 *Aspergillus niger* 和米曲霉 *A. oryzae* 列为美国 FDA 通常被认为是安全的 (GRAS) 名单<sup>[25-26]</sup>。Lin 等<sup>[27]</sup>直接使用杂色曲霉 *Aspergillus versicolor* 产孢子阶段分泌于固体培养物中的胞外 β-葡萄糖苷酶进行人参皂苷 Rb1 到 Rd 的转化。孢子悬浮系统从摇瓶放大至 2 L 时的最大生物转化率 85% (W/W)。因培养基便宜且生长较快,该类土壤真菌的转化较肠道细菌更经济可行,被指定为 GRAS 的土壤微生物能应用于食品领域。

预计到 2021 年益生菌市场总量增长至 580 亿美元<sup>[28]</sup>。以益生菌修饰人参皂苷糖基结构,有助

于其保健品特性的强化和规范。Ku 等<sup>[10,29]</sup>分别用长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum* RD47 和鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG 将人参皂苷 Rb2、Rc 和 Rb1 水解为人参皂苷 Rd。作为牛奶、蔬菜等食物发酵剂的乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 在稀有人参皂苷的转化应用方面, Park 等<sup>[30]</sup>首次通过食品级明串珠菌 *Leuconostocs* 和乳酸杆菌 *Lactobacilli* 全细胞转化生产 Compound K。Huq 等<sup>[31]</sup>以 LAB 在经济可食用培养基 (有 20 g/L 萝卜, 20 g/L 葡萄糖和 10 g/L 酵母提取物) 上经 7 d

发酵后, 人参皂苷 Rb1 可转化 Rg3, 而 MRS 培养基中只能转化到 Rd。作为表达外源基因高效生产酶蛋白的 GRAS 宿主, Li 等<sup>[32]</sup>通过强化密码子, 在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 中表达克隆自胶质类芽孢杆菌 *Paenibacillus mucilaginosus* 的重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 转化人参皂苷 Rb1 和 Rd 为 F2。

在三萜合成途径构建方面, 以酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 为代表的微生物工程已被广泛用于人参皂苷的转化<sup>[33-34]</sup> (表 2)。经鉴定 Cyt P450 酶 (CYP716A47) 参与达玛烷型人参

表2 微生物基因工程菌全细胞催化转化人参皂苷

Table 2 Production of ginsenoside in genetically engineered microorganisms by whole cell biocatalysis

Strategies	Microbial hosts	Introduced gene and source	Type of ginsenosides	Amount of ginsenosides produced	Reference
Biosynthetic pathway constituted	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CYP716A47 and PgDDS from <i>P. ginseng</i>	Galactose $\rightarrow\rightarrow$ Protopanaxadiol	/	[35]
		PgDDS and PgPPDS genes from <i>P. ginseng</i> , NADPH-cytochrome P450 reductase gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtCPR1)	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Dammareniol-II $\rightarrow$ Protopanaxadiol	8.40 mg/g dry cell weight (DCW) protopanaxadiol (1 189 mg/L), together with 10.94 mg/g DCW dammareniol-II (1 548 mg/L)	[36]
		PPDS modified through transmembrane domain truncation of <i>P. ginseng</i> +ATR1 of <i>Arabidopsis thaliana</i>	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Protopanaxadiol	1 436.6 mg/L	[37]
		UGTPg45 and UGTPg29 from <i>P. ginseng</i> +PPD-producing chassis	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Protopanaxadiol $\rightarrow$ Rh2 $\rightarrow$ Rg3	3.49 $\mu$ mol/g DCW	[39]
		UGTPg1/UGTPg100 from <i>P. ginseng</i> +PPD-producing chassis (PgDDS+ CYP716A47+CYP716A53v2+PgCPR1 of <i>P. ginseng</i> )	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Rh1, Glucose $\rightarrow\rightarrow$ F1	F1 and Rh1 measured as 42.1 mg/L and 92.8 mg/L, respectively	[40]
		Semi-rationally designed UGT51 from <i>S. cerevisiae</i> +PPD-producing chassis	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Rh2	2.90 mg/g dry cell weight DCW, ~300 mg/L	[41]
		<i>Pichia pastoris</i>	Self-assembly of ERG1 from <i>P. pastoris</i> and PgDDS from <i>P. ginseng</i>	Glucose $\rightarrow\rightarrow$ Dammareniol-II	0.1 mg/g DCW
<i>Escherichia coli</i>	SS, SE and CPR from <i>S. cerevisiae</i> +SE from <i>Methylococcus capsulatus</i> +CPR from <i>Arabidopsis thaliana</i>	Isopentenyl pyrophosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) $\rightarrow$ Dammareniol-II	8.63 mg/L	[43]	
Ectopic expression	<i>S. cerevisiae</i>	UGT genes from <i>P. notoginseng</i> , <i>Medicago sativa</i> , and <i>Bacillus subtilis</i>	20(R)PPD $\rightarrow$ Compound K $\rightarrow$ 20(R)F2	0.06 mg/L	[44]
	<i>S. cerevisiae</i>	UGTPg71A29, from <i>P. ginseng</i>	Rh1 $\rightarrow$ Rg1, Rd $\rightarrow$ Rb1	/	[45]

“ $\rightarrow$ ” represents one-step reaction; “ $\rightarrow\rightarrow$ ” represents more than one-step reactions; “/” represents data not mentioned.

皂苷前体达玛烯二醇-II C-12 位羟基化, Han 等<sup>[35]</sup>通过在 *S. cerevisiae* 中 CYP716A47 和达玛烯二醇合酶基因 (PgDDS) 的共表达, 不添加达玛烯二醇-II 即可产生 PPD。Dai 等<sup>[36]</sup>在 *S. cerevisiae* 中引入达玛烯二醇-II 合成酶、PPD 合成酶基因以及拟南芥 NADPH-细胞色素 P450 还原酶 (ATR1) 基因, 并通过过量表达截短 (Truncation) 的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、法呢基二磷酸合成酶、角鲨烯合成酶和 2,3-氧化角鲨烯合成酶基因, 以及提高 PPD 合酶活性的密码子优化, 最后通过双相萃取发酵获得 8.40 mg/g DCW PPD (1 189 mg/L)。Zhao 等<sup>[37]</sup>通过引入人参达玛烯二醇-II 合成酶、人参细胞色素 P450 型 PPD 合成酶 (PPDS) 和拟南芥 ATR1 基因, 在 *S. cerevisiae* 中构建了 PPD 的生物合成途径, 经细胞色素 P450 氧化系统优化, 在 5 L 生物反应器中补料分批发酵, PPD 产量达到 1 436.6 mg/L。

通过在微生物底盘细胞中重构与优化天然化合物的生物合成途径, 实现目标化合物的从头合成。被首次表征的用于植物四环三萜底物糖基化的 UDP-糖基转移酶 (UGT) UGTPg1, 转移葡萄糖基部分到 PPD 的 C-20S-OH 得到 Compound K, 是经一锅反应由简单糖生物合成 Compound K 成功的关键<sup>[38]</sup>。Wang 等<sup>[39]</sup>从人参中克隆并鉴定了两种 UGT 基因: UGTPg45 和 UGTPg29, 结合产 PPD 的酵母底盘细胞, 成功构建了由葡萄糖生产 Rh2 和 Rg3 的酵母细胞工厂。Wei 等<sup>[40]</sup>证明从人参分离的新型 UGT 基因 UGTPg100 和 UGTPg101 可特异糖基化 PPT 的 C6-OH 分别产生人参皂苷 Rh1、F1, 在酵母底盘细胞中构建了 F1 和 Rh1 的合成途径。Zhuang 等<sup>[41]</sup>将用于 PPD 到人参皂苷 Rh2 转化的微生物糖基转移酶 UGT51 通过半理性设计, 将突变糖基转移酶基因引入酵母并经代谢工程进一步优化后, 在 5 L 生物反应器中补料分批发酵, Rh2 产量达到约 300 mg/L。

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 与 *S. cerevisiae* 遗传操作相似且外源蛋白表达量更高, Zhao 等<sup>[42]</sup>通过在 *P. pastoris* 中自组装达玛烯二醇-II 合酶和角鲨烯环氧酶促使达玛烯二醇-II 产量增加 2.1 倍。Li 等<sup>[43]</sup>通过在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中重建 2,3-氧化角鲨烯衍生的三萜类化合物生物合成途径, 成功构建产达玛烯二醇-II 的 *E. coli* 底盘, 达玛烯二醇-II 异源生物合成, 发酵 48 h 产率为 8.63 mg/L。但是这些工作目前还仅限于达玛烷型人参皂苷前体达玛烯二醇-II 的合成, 尚未真正意义上实现合成人参皂苷。

通过外源生物合成途径重建的工程菌直接从人参皂苷为底物合成稀有人参皂苷。Yu 等<sup>[44]</sup>通过尿苷二磷酸糖基转移酶 (UTG) 基因工程化大肠杆菌分别由 20(R)-PPD 和 20(R)-PPT 转化生产 20(R)-Compound K 和 20(R)-F1。Lu 等<sup>[45]</sup>鉴定了参与人参皂苷 Rg1 和 Rb1 生物合成的 UDP-糖基转移酶, 并实现了 *S. cerevisiae* 中的全细胞催化。

## 2.2 酶催化

微生物的代谢易受环境影响, 转化人参皂苷的选择性差、产率低, 参与反应的酶未确定。酶促转化由于操作方法简单且反应特异性强, 被认为是结构修饰和代谢研究的有用工具。优化微生物产酶条件, 实现生物量和产酶之间的平衡, 尤以最大限度缩短处理时间、降低成本的重组酶转化最为显著<sup>[46]</sup>。

在 *E. coli* 中过表达各种重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶以酶解糖基化的人参皂苷。Cui 等<sup>[47]</sup>用重组酶在 10 L 发酵罐转化 20 mg/mL Re 得到 113 g 色谱纯 (84.0 $\pm$ 1.1)% 的 Rg2 (S), 首次实现 100 g 级 Rg2 (S) 酶法生产。Kim 等<sup>[48]</sup>补料分批培养强化表达  $\beta$ -D-糖苷酶和  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的 *E. coli*, 通过立体专一酶的级联转化, 由人参叶提取物获得人参皂苷 Compound K。Shin 等<sup>[49]</sup>将能完全转化所有 PPD 型皂苷为 Compound K 的  $\beta$ -糖苷酶在

*E. coli* 重组表达, 可将丢弃人参叶的 PPD 型皂苷转化为 Compound K。Xie 等<sup>[50]</sup>过表达来自嗜热酶  $\alpha$ -丙氨酸呋喃糖苷酶, 85 °C、pH 5.0、1 h 内转化 25 g/L Rc 为 21.8 g/L Rd, Rd 产率为 21 800 mg/(L·h)。Quan 等<sup>[51]</sup>首次报道了高热稳定性重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶分别将人参皂苷 Re 和 Rg1 转化为人参皂苷 Rg2 和 Rh1, 在酶浓度 1.36 U/mL、85 °C、pH 5.5、1 h 内转化 10 g/L 人参皂苷 Re 为 8.02 g/L Rg2, 2 g/L 人参皂苷 Rg1 为 1.56 g/L Rh1。

*E. coli* 重组酶转化人参皂苷可能应用于医药或制药行业。然而在食品 (尤其营养保健品) 行业中, *E. coli* 常被认为是不可食用细菌<sup>[52]</sup>。为提高用于人参皂苷微生物转化的糖苷酶产量, 有必要在以下方面进一步改善: 1) 开发广泛的食品级宿主; 2) 提高细胞生物量和酶产量; 3) 确定用于酶诱导的最佳培养基组分<sup>[53]</sup>。

益生菌适合食品级糖基化酶的生产, 其 MRS 培养基价格也仅为 *E. coli* 的 3 倍。以含外源基因重组质粒的益生菌系统替代 *E. coli*, Youn 等<sup>[54]</sup>在双歧杆菌 *B. bifidum* 中表达克隆自动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis* 的重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶以转化人参皂苷 Rb1 和 Rb2。由于转基因应用于食品工业引发的争议, 又转向以经典发酵法生产糖苷水解酶, 筛选新的益生菌菌株并优化细胞培养条件。来源于蘑菇真菌 *Armillaria mellea* 的菌丝体酶制剂 (菌体培养 2 周, 25 °C, 经酶提取、硫酸铵沉淀、透析、冻干) 转化 Rb1 到 Compound K, 最适培养条件为 72–96 h、pH 4.0–4.5、温度 45–55 °C<sup>[55]</sup>。对于 20 mg 花费达 163.2 美元的 98% F1, 除了仅停留在确定微生物酶转化能力的小规模实验, Wang 等<sup>[56]</sup>首次报道了以 GRAS 微生物食品级的商业酶 Cellulase KN 在 48 h 内完成对 Re 和 Rg1 (源自 10 mg/mL PPTGM) 至 F1 的 10 g 级转化。

除了水解人参皂苷的糖基, 微生物也能转化

产生高生物活性的人参皂苷化学衍生物。Zhou 等<sup>[57]</sup>以拟青霉 *Paecilomyces bainier* sp. 229 对人参皂苷 Rb1 的 6 L 发酵中, 通过反复硅胶柱层析和高压液相色谱分离纯化出 3-酮衍生物和两种新的脱氢代谢物。不同类别的酶能选择性修饰天然化合物的复杂反应性官能团而产生一系列衍生物, Teng 等<sup>[58]</sup>以乙酸乙烯酯作为乙酰基供体, 在有机溶剂中通过来自南极假丝酵母 *Candida Antarctica* (Novozym 435) 脂肪酶区域选择性地酰化人参皂苷, 得到单酰基人参皂苷。Gebhardt 等<sup>[59]</sup>通过来自牛初乳的  $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶和 Novozym 435 脂肪酶的催化, 制备获得了人参皂苷 Rb1 的一系列特异性衍生物。

### 2.3 糖苷酶固定化

相对于游离酶, 固定化酶为适于工业化应用的主要形式。基于吸附、包埋、交联、共价结合的酶的固定化方法的选择, 以考察固定化酶操作稳定性为主, 综合考虑工业放大时的技术可行性和固定化过程中涉及的酶、载体及试剂的费用。而提高时空产率高效酶反应器的开发, 进一步推动了固定化酶技术在生物转化领域中的应用。而应用于人参皂苷转化的酶固定化报道仅有 3 篇。Zhang 等<sup>[60]</sup>以交联-包埋法 (交联 3 h, 戊二醛浓度 0.1%, 海藻酸钠浓度 1%, CaCl<sub>2</sub> 浓度 2%) 固定化酶转化人参皂苷 Rg1 为 F1, 3.76 U/g 固定化酶载体, 0.2 mg/mL 底物, 40 °C 转化 2 d, 4 次平均转化率为 80.49%。Yu 等<sup>[61]</sup>以 SiO<sub>2</sub> 吸附蜗牛酶然后结合交联-包埋法 (海藻酸钠质量浓度 2%, CaCl<sub>2</sub> 质量浓度 2%, SiO<sub>2</sub> 与蜗牛酶质量比为 1:1) 制备微球固定化蜗牛酶, 转化人参皂苷 Rb1 为 Compound K, 55 °C, 1.0 mg/mL 底物, 转化 36 h, 5 次平均转化率为 36.79%。为解决酶与载体吸附力弱、与底物接触面积有限的问题, Yuan 等<sup>[62]</sup>将纤维素酶固定在用聚乙烯亚胺和戊二醛活化的角叉菜胶珠表面, 转化人参皂苷 Rb1

为  $R_d$ ，同时测定了反应动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ ，在连续使用 5 次后，固定化酶可以保持初始活性的 60%。

Graebin 等<sup>[63]</sup>特别关注了糖苷酶家族 GH1 和 GH3 中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的固定化方法。物理吸附、离子交换、疏水作用等增强了固定化体系酶的灵活性，相应载体包括土壤胶体颗粒、离子交换树脂、磁性  $Fe_3O_4$  纳米颗粒等。尤其丝瓜蔬菜海绵<sup>[64]</sup>、含氧化铁的细小土壤胶粒<sup>[65]</sup>等天然可降解、成本低廉载体的使用大大减少了化学载体丢弃时涉及的成本和环境问题。包埋固定化可改善酶的热稳定性、最佳使用温度和储存稳定性，但机械强度较低且酶渗漏导致固定化成本增加<sup>[66]</sup>。关于其相对活性和包封率，因纳米级聚合物材料（聚氨酯、乳胶和硅胶）代替传统藻酸盐珠的应用得到改善<sup>[67]</sup>。共价固定化可提高酶制剂稳定性，载体包括最常用壳聚糖及其他海绵、咖啡渣、硅胶、 $SiO_2$  纳米颗粒、环氧树脂活化 Eupergit C、胺琼脂糖凝胶等。

吸附或包埋固定  $\beta$ -葡萄糖苷酶由于酶逐渐释放导致催化剂半衰期有限；经化学反应的共价固定化引起酶活损失<sup>[68]</sup>。为克服这些问题，Mateo 等<sup>[69]</sup>研究了酶物理聚集再交联（交联酶聚集体，CLEAs）制备固体生物催化剂的方法。通过形成纳米尺度 CLEAs 将  $\beta$ -葡萄糖苷酶固定于二氧化硅泡沫。高酶载量 CLEAs 在更广泛的温度和 pH 范围保持活性，且比游离酶  $K_m$  低，可使用多达 10 个循环，残余活性超过 85%<sup>[68]</sup>。近来 GH1 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶结构的解析有助于定点固定化工作的展开。经定点诱变后，酶与载体进行固定化，稳定性提高的同时获得产物抑制降低，活性、专一性提高等优势特性<sup>[63]</sup>。而基于重组 DNA 的新酶设计经过微生物的遗传修饰，验证食品安全性的同时，也应充分考虑酶及其载体释放到加工系统可能带来的安全隐患<sup>[70]</sup>。

### 3 糖苷酶转化分子机制的探究

为解决微生物发酵及自身酶系对人参皂苷糖苷键催化存在的专一性差、效率低等问题，基于酶高级结构、分子识别机制改造酶结构，并通过基因工程菌表达以高效转化目的人参皂苷单体。Mak 等<sup>[71]</sup>综合基因组挖掘 (Integrative genomic mining approach) 结合生物信息和分子建模采掘序列数据库 (Mine sequence databases)，使酶对目标反应专一性提高 100 倍，催化效率提高了 75 倍。因此除了针对特定产物挖掘专一性的新酶，研究工作还应集中在基于催化分子机制的酶分子改造。

糖苷酶家族活性结构域拓扑学构象有 3 种：口袋式 (Pocket)、裂隙 (Cleft 或 Groove)、隧道 (Tunnel)<sup>[72]</sup>。基于构效关系水解酶定向转化与分子识别的报道较多<sup>[73-75]</sup>。基于高分辨高葡萄糖耐受  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (Bgl6) 和三重突变体 M3(随机诱变提高热稳定性)的晶体结构，Pang 等<sup>[75]</sup>发现 Bgl6 形成的额外通道可作为葡萄糖二级结合位点，有助于葡萄糖耐量；三重突变增强酶内的疏水相互作用，可能是 M3 热稳定性增强的原因。Zhang 等<sup>[76]</sup>基于活性位点比对和量子化学计算出化学必需的相互作用，以验证催化机理假说揭示糖苷水解酶结构与功能的关系。

关于糖苷酶转化皂苷的催化机制的研究，如图 2 所示，人粪便 *B. longum* GH3 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 BIBG3 经克隆、结构分析，发现 BIBG3 络合 D-葡萄糖的独特环状结构可参与底物结合口袋的形成，通过和底物的分子对接揭示了口袋的结合方式，找到关键酶活突变位点 R484 和 H642<sup>[77]</sup>。而酶分子设计改造的报道迄今仅有 3 篇。Park 等<sup>[78]</sup>分离出具广泛底物谱  $\beta$ -GH 并测定其晶体结构，基于产物特性、底物对接，以在三萜类化合物特定糖基化位点优先水解聚糖的方式，重新设计了酶底物结合裂隙。使对 Rb1 的催化效率提高 4-7 倍，促



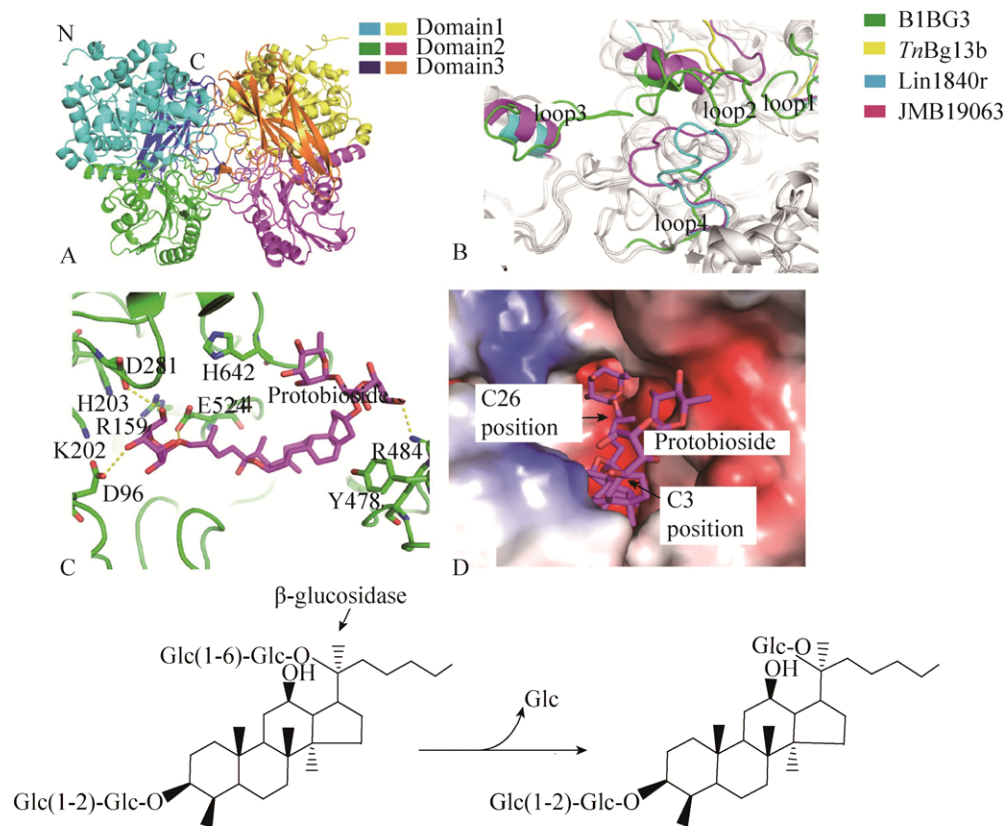


图2 BIBG整体结构及其催化Rb1反应活性位点几何结构分析(改编自参考文献[77])

Fig. 2 Schematic diagram of functional and structural characterization of a  $\beta$ -glucosidase involved in saponin metabolism from intestinal bacteria<sup>[77]</sup>. (A) Overall structure of BIBG and structural analysis on its active site geometry for transfer reaction of ginsenoside Rb1. (B) Structural comparison with other GH3 family members. (C) Compound protobioside (magenta) was docked to the active pocket of BIBG3. (D) Stereoview of the pocket with a van der Waals surface representation of BIBG3 with protobioside: glucose.

进 PPD 型底物 Rb1、Rb2 和 Rb3 (Rc) 经过 F2 到 C-K 的继续转化 (图 3)。Choi 等<sup>[79]</sup>通过同源建模、分子对接、序列比对, 确定参与  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性的候选残基; 经定点突变得到的 L213A $\beta$ -糖苷酶变体具有野生型没有的  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性, 促进 Rc 进一步水解转化为 Rd, 转化率比野生型酶高 1.5 倍 (图 4)。在酵母底盘细胞重构与人参皂苷的生物合成途径优化方面, Zhuang 等<sup>[41]</sup>通过同源建模、分子动力学和突变研究了 UGT 的催化分子机制<sup>[40-41,45]</sup>。且经半理性设计的 UGT51 对 PPD 到 Rh2 的催化效率提高了约 1 800 倍。

蛋白质工程是提高酶对特定人参皂苷糖苷水

解活性的有用工具。多种不同来源具人参皂苷转化活性的微生物糖苷酶 (尤其  $\beta$ -葡萄糖苷酶) 晶体结构已经被解析<sup>[7]</sup>, 因此可通过同源建模、分子对接设计、突变以改造酶分子, 改善底物特异性和催化效率, 产生高纯度的各种特殊三萜类化合物, 实现目的人参皂苷专一、高效的酶法转化。

#### 4 离子液体对生物催化性能的改善

不同于分子组成的传统液体溶剂, 大多常温下呈液态盐 (由特定的有机阳离子与无机或有机阴离子构成) 的离子液体 (Ionic liquids, ILs), 具饱和蒸气压低、不可燃、亲疏水、可设计等特性。



研究最为广泛的是 ILs 及其水溶液中脂肪酶、蛋白酶和酯酶的催化,而对于糖苷酶水解作用的研究很少<sup>[80]</sup>。通常,疏水、低粘度、表面活性、亲电阴离子和离液阳离子 (Chaotropic cation) 的 ILs 增强酶活性和稳定性<sup>[80]</sup>。然而由于许多结果矛盾没有一般相关性规律,因此,以提高酶活性和稳定性的方法正在探索,如水中 ILs 微乳液、设计与酶相容的离子溶剂、酶电荷的修饰、酶的固定化等<sup>[81]</sup>。

#### 4.1 离子液体参与水相转化应用概况

全细胞催化存在催化剂不稳定、产物抑制、有毒副产物形成和质量传递等问题。在水-ILs 的两相催化中,由于全细胞悬浮在水相而有机底物溶解在疏水 ILs 相 (或贮存产物),从而避免了反应中低水溶性的底物 (或产物) 抑制。Chen 等<sup>[82]</sup>在含 ILs 体系中全细胞催化水解甘草甜素制备单葡萄糖醛酸甘草次酸,发现在咪唑类 ILs 存在下,ILs 提高了细胞膜通透性,且相比 *E. coli* BL21 和 *P. pastoris* GS115,青霉 *Penicillium purpurogenum* Li-3 对 ILs (主要为 [Bmim] [PF<sub>6</sub>]) 耐受性最强,60 h 收率达 87.63%。ILs 在生物催化中的应用需综合对所需化学反应 (产物分离) 的溶剂性质和对全细胞的溶剂毒性作用。而 ILs 对微生物细胞的毒性是其工业应用瓶颈之一,目前在含 ILs 系统中研究最多的微生物是 *E. coli* 和酿酒酵母 *S. cerevisiae*。Egorova 等<sup>[18]</sup>研究了 ILs 毒理学特性,从反应介质 (溶剂) 角度分析了全细胞在苛刻化学催化中的应用前景。

酶能够在体外不适合细胞生长的条件下进行催化,专一性强、催化方式简单。离子液体中阳离子或阴离子类型对酶的活性、稳定性和结构具有重要影响。Yanhong 等<sup>[83]</sup>对含 C<sub>6</sub>MIm·BF<sub>4</sub> 体系黑李种子 β-糖苷酶糖基化红景天苷合成条件进行优化,发现阳离子咪唑环上的烷基取代基的最佳链长为 C<sub>6</sub>。Ferdjani 等<sup>[84]</sup>研究了在 ILs/水不同比例时嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus* β-糖苷酶和

两种分别来自海栖热袍菌 *Thermotoga maritima*、嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilus* 的 α-半乳糖苷酶的活性、稳定性,发现在适合水溶性 ILs (Water-miscible ILs) 中 *T. thermophilus* β-糖苷酶热稳定性最高。Brakowski 等<sup>[85]</sup>发现含 ILs-水缓冲乳液中, [Bmim][PF<sub>6</sub>] 导致来自奥氏曲霉 *Aspergillus oryzae* 的 β-半乳糖苷酶转糖基底物专一性的改变。Kudou 等<sup>[86]</sup>基于咪唑 ILs 磷酸盐缓冲液,在乙酸 1-丁基-3-甲基咪唑鎓 [Bmim] [OAc], pH 7.0, 葡糖苷酶水解活性最高,通过稳态发射光谱证明糖苷酶活性改善可能与酶构象的灵活性有关。

由于毒性低、生物可降解、易于制备、具 100% 原子经济等特点,基于含胆碱盐和三类氢键供体 (酰胺、醇和糖) 的低共熔溶剂 (DESs) 可作为传统离子液体的廉价替代品,成为 β-葡萄糖苷酶催化的新型绿色溶剂,可拓展其在食品和医药领域方面的应用。以对硝基苯基-β-吡喃葡萄糖苷作为水解反应模型, Xu 等<sup>[87]</sup>发现基于氯化胆碱的 DESs (含 6% (V/V) 水的氯化胆碱/丙二醇) 显著改善 β-葡萄糖苷酶的活性和稳定性。在 ILs 中可通过酶表面电荷修饰和酶固定化来进行酶的稳定和激活,以增强在 ILs 中的耐受性。Zhao 等<sup>[88]</sup>总结了固定化酶在 ILs 中被稳定和激活的实例,但大多数与脂肪酶有关。*Nature Chemistry* 最新报道了 Jason 等<sup>[89]</sup>以阳离子化的葡萄糖苷酶降解溶于 ILs 的纤维素,极大提高了纤维素降解效率 (100 °C 以上的催化效率是在水溶液时的 30 倍) (图 5)。表面阳离子化修饰的葡萄糖苷酶 (以 ILs 代替水作溶剂,通过碳二酰亚胺介导 N,N'-二 (2-氨基乙基)-1,3-丙二胺定向偶联酶表面天冬氨酸和谷氨酸残基) 在 ILs 中溶解度增加,在苛刻实验条件下依然能以恒定速率工作至少 7 d。

ILs 中酶以与偶联载体 (聚合物、纳米微粒或碳纳米管)、被水凝胶包裹或以原始状态悬浮的方式进行固定化。无固相支撑的 CLEAs 有望提高

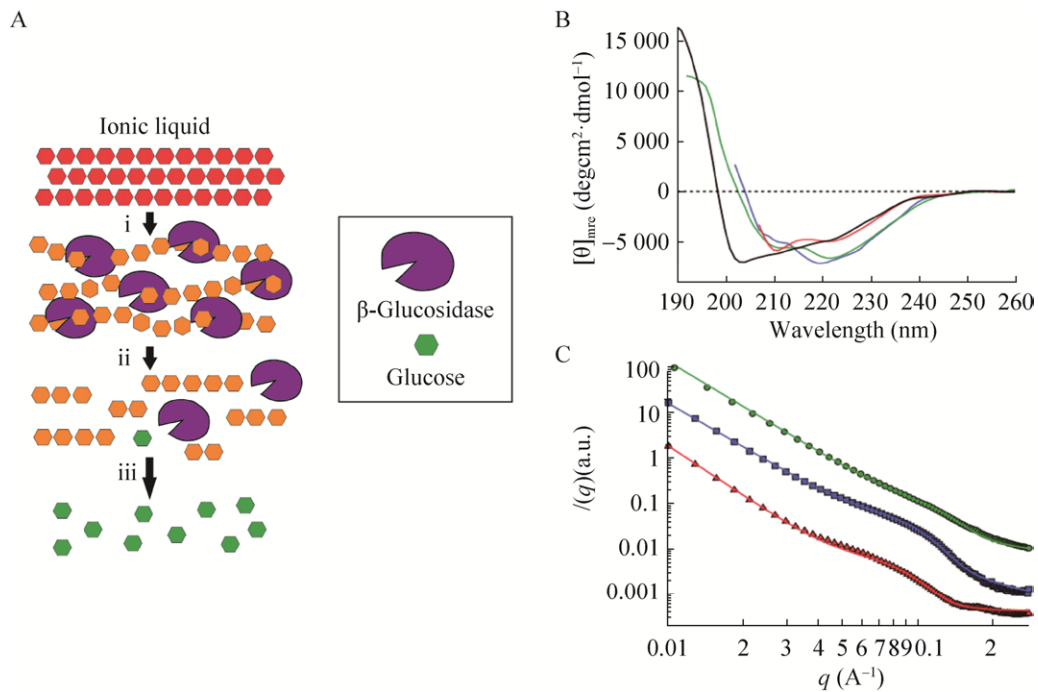


图5 离子液体体系纤维素酶非水均相转化多糖催化机理 (改编自参考文献[89])

Fig. 5 Mechanisms of cellulase activity and structure on non-aqueous homogeneous biocatalytic conversion of polysaccharides in ionic liquids<sup>[89]</sup>. (A) Cartoon detailing proposed mechanism for cellulose hydrolysis by  $\beta$ -glucosidase solubilized and stabilized in ionic liquids, showing dissolution of cellulose in ionic liquid. (B) Far-UV SRCD spectra showing secondary structure of [C-Glu][S]. (C) SAXS profiles showing nanoconjugate dimensions for concentrated solutions of [C-Glu][S].

ILs 中酶稳定性, Toral 等<sup>[90]</sup>发现 CLEA 和在聚丙烯上吸附交联的固定化脂肪酶能够在使游离酶失活的 ILs (如 [BMIM][NO<sub>3</sub>]) 中仍然保持催化活性。溶胶-凝胶基质具有防止反应过程中酶从载体泄漏的优点, 而凝结和干燥过程中的凝胶收缩可能导致酶变性。通过在溶胶-凝胶固定化过程中添加离子液体, 可提高包封酶的固定效率以及机械抗裂性, 表明离子液体在酶性能中起着重要作用<sup>[91]</sup>。

#### 4.2 在酶转化人参皂苷中的应用潜能

在人参皂苷生物转化方面尚无 ILs 的应用, 首先就人参皂苷溶解性进行分析。大多数人参皂苷在含水正丁醇 (常作为皂苷萃取溶剂) 中溶解度较大, 而次级皂苷由于糖基数减少、极性减小、在水中溶解度降低, 苷元则难溶于水。例如, Re 不易溶解于水, 而在 DMSO 中溶解度达 200 mg/mL。

Cui 等<sup>[40]</sup>以 20 mg/mL 人参皂苷 Re 在含 10% DMSO 缓冲液中进行转化, 实现了 10 L 发酵罐中 100 g 级 Rg2(S) 的酶法生产。来源于蘑菇真菌 *Armillaria mellea* 菌丝体的酶转化制备 Compound K 时, 在底物 Rb1 中加入甲醇助溶<sup>[55]</sup>。

据此, 有望以非挥发、环保的 ILs 代替 DMSO 和甲醇有机溶剂发挥对底物的助溶作用。以咪唑类 ILs 提取和富集三七中药材及其制剂中的微量人参皂苷 20(S)-Rg3 和 Rk1<sup>[92-94]</sup>, 进一步证明 ILs 有助于增加稀有人参皂苷溶解度, 可开发应用于人参皂苷的生物催化转化。结合以上 ILs 参与其他类型产物水相反应的生物转化时对全细胞及酶催化性能的影响, 可能获得比在有机溶剂时更高的催化活性、选择性和稳定性。因而, ILs 参与的稀有人参皂苷生物催化体系的构建, 在转化工

艺中除 ILs 对底物溶解性作用外, 还需要考虑作为反应介质 ILs 对菌体毒性或酶催化性能的影响, 以及作为酶修饰剂, ILs 的改性方法及酶稳定化的应用形式。

## 5 展望

稀有人参皂苷生物催化转化的关键问题包括特异性酶活性不高、涉及酶及其催化机制不明确、结构生物信息学研究不系统, 改变酶水解皂苷糖基专一性的研究尚处于起步阶段。益生菌及其酶的使用已在食品工业中的实用应用中显示出巨大潜力。而离子液体可以通过改变反应体系的极性增加糖类的溶解度, 为合理设计糖基转化反应体系创造多种机会。因此, 今后研究工作应集中在: 1) 基于同源建模、分子对接催化分子机制的揭示来改造酶分子, 以改变酶专一性、提高酶活性和稳定性; 2) 基于 ILs 的溶剂工程在酶固定化及酶表面修饰的作用, 改善酶转化人参皂苷的催化效率和稳定性。通过筛选及构建基因工程菌、发酵或胞外表达 GH, 以化学修饰并制备多种不同尺度、形态的益生菌酶制剂。同时, 以光谱法、计算机模拟等可视化技术研究 ILs-酶-底物相互作用, 系统分析 ILs 反应体系中影响糖苷酶结构及其活性、专一性和稳定性的催化分子机制。最终实现对人参皂苷定向、高效的生物转化工艺, 有助于深入探究并开发新癌症化学预防的药物化学和药理学方法。

## REFERENCES

- [1] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [2] Wong AS, Che CM, Leung KW. Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: a functional and mechanistic overview. *Nat Prod Rep*, 2014, 32(2): 256–272.
- [3] Lee CH, Kim JH. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J Ginseng Res*, 2015, 38(3): 161–166.
- [4] Yang WZ, Hu Y, Wu WY, et al. Saponins in the genus *Panax L.* (Araliaceae): a systematic review of their chemical diversity. *Phytochemistry*, 2014, 106: 7–24.
- [5] Cheong JH, Kim H, Hong MJ, et al. Stereoisomer-specific anticancer activities of ginsenoside Rg3 and Rh2 in HepG2 cells: disparity in cytotoxicity and autophagy-inducing effects due to 20(S)-Epimers. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(1): 102–108.
- [6] Shin KC, Oh DK. Classification of glycosidases that hydrolyze the specific positions and types of sugar moieties in ginsenosides. *Crit Rev Biotechnol*, 2015, 36(6): 1036–1049.
- [7] Park CS, Yoo MH, Noh KH, et al. Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(1): 9–19.
- [8] Liu CY, Zhou RX, Sun CK, 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 Gins Res*, 2015, 39(3): 221–229.
- [9] Guo CL, Cui XM, Yang XY, et al. Advances in studies on biotransformation of ginsenosides. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(20): 3899–3904 (in Chinese). 郭从亮, 崔秀明, 杨晓艳, 等. 人参皂苷生物转化研究进展. *中国中药杂志*, 2014, 39(20): 3899–3904.
- [10] Ku S. Finding and producing probiotic glycosylases for the biocatalysis of ginsenosides: a mini review. *Molecules*, 2016, 21(5): 645.
- [11] Hasegawa H. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: metabolic activation of ginsenoside: deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95(2): 153–157.
- [12] Kim KA, Yoo HH, Gu W, et al. Effect of a soluble prebiotic fiber, NUTRIOSE, on the absorption of ginsenoside Rd in rats orally administered ginseng. *J Ginseng Res*, 2014, 38(3): 203–207.
- [13] Wang JR, Yau LF, Zhang R, et al. Transformation of ginsenosides from Notoginseng by artificial gastric juice can increase cytotoxicity toward cancer cells. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(12): 2558–2573.
- [14] Quan K, Liu Q, Wan JY, et al. Rapid preparation of

- rare ginsenosides by acid transformation and their structure-activity relationships against cancer cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 8598.
- [15] Wei GQ, Zheng YN, Li W, et al. Structural modification of ginsenoside Rh<sub>2</sub> by fatty acid esterification and its detoxification property in antitumor. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(2): 1082–1085.
- [16] Cao JQ, Zhang XS, Qu FZ, et al. Dammarane triterpenoids for pharmaceutical use: a patent review (2005–2014). *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25(7): 805–817.
- [17] He CA, Yu XY, Meng QX, et al. Research in Structural modification of biotransformation of natural drugs. *Nat Prod Res Dev*, 2012, 24(6): 843–847 (in Chinese).  
贺赐安, 余旭亚, 孟庆雄, 等. 生物转化对天然药物进行结构修饰的研究进展. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 843–847.
- [18] Egorova KS, Ananikov VP. Ionic liquids in whole-cell biocatalysis: a compromise between toxicity and efficiency. *Biophys Rev*, 2018, 10(3): 881–900.
- [19] Ferrer M, Martinez-Martínez M, Bargiela R, et al. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microb Biotechnol*, 9(1): 22–34.
- [20] Yang XD, Yang YY, Ouyang DS, et al. A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K. *Fitoterapia*, 2015, 100: 208–220.
- [21] Wu LP, Jin Y, Yin CR, et al. Co-transformation of *Panax* major ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>1</sub> to minor ginsenosides C-K and F<sub>1</sub> by *Cladosporium cladosporioides*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(4): 521–527.
- [22] Hoang VA, Kim YJ, Nguyen NL, et al. *Chryseobacterium yeoncheonense* sp. nov., with ginsenoside converting activity isolated from soil of a ginseng field. *Arch Microbiol*, 2013, 195(7): 463–471.
- [23] Rossi M, Amaretti A, Leonardi A, et al. Potential impact of probiotic consumption on the bioactivity of dietary phytochemicals. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(40): 9551–9558.
- [24] Zhang L, Li F, Qin WJ, et al. Changes in intestinal microbiota affect metabolism of ginsenoside Re. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(10): e4284.
- [25] Molina G, Contesini FJ, De Melo RR, et al.  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus*//Gupta VK, Ed. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2016: 155–169.
- [26] Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1119–1139.
- [27] Lin FJ, Guo XY, Lu WY. Efficient biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to Rd by isolated *Aspergillus versicolor*, excreting  $\beta$ -glucosidase in the spore production phase of solid culture. *Anton Leeuwenhoek*, 2015, 108(5): 1117–1127.
- [28] Mao KY, Chen DM, Fan YL, et al. Analysis on competitive situation of probiotics industry. *Competitive Intelligence*, 2018, 14(2): 30–34 (in Chinese).  
毛开云, 陈大明, 范月蕾, 等. 益生菌产业竞争态势分析研究. *竞争情报*, 2018, 14(2): 30–34.
- [29] Ku S, You HJ, Park MS, et al. Whole-cell biocatalysis for producing ginsenoside Rd from Rb<sub>1</sub> using *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(7): 1206–1215.
- [30] Park SJ, Youn SY, Ji GE, et al. Whole cell biotransformation of major ginsenosides using *Leuconostocs* and *Lactobacilli*. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21(3): 839–844.
- [31] Huq MA, Akter SK, Kim YJ, et al. Biotransformation of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to pharmacologically active ginsenoside Rg<sub>3</sub> through fermentation by *Weissella hellenica* DC06 in newly developed medium. *Bangladesh J Sci Indust Res*, 2016, 51(4): 271–278.
- [32] Li L, Shin SY, Lee SJ, et al. Production of ginsenoside F<sub>2</sub> by using *Lactococcus lactis* with enhanced expression of  $\beta$ -glucosidase gene from *Paenibacillus mucilaginosus*. *J Agric Food Chem*, 2015, 64(12): 2506–2512.
- [33] Kim YJ, Zhang DB, Yang DC. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6): 717–735.
- [34] Yang JL, Hu ZF, Zhang TT, et al. Progress on the studies of the key enzymes of ginsenoside biosynthesis. *Molecules*, 2018, 23(3): 589.
- [35] Han JY, Kim HJ, Kwon YS, et al. The Cyt P450

- enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2062–2073.
- [36] Dai ZB, Liu Y, Zhang XA, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 2013, 20: 146–156.
- [37] Zhao FL, Bai P, Liu T, et al. Optimization of a cytochrome P450 oxidation system for enhancing protopanaxadiol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(8): 1787–1795.
- [38] Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Res*, 2014, 24(6): 770–773.
- [39] Wang PP, Wei YJ, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub> by metabolically engineered yeasts. *Metab Eng*, 2015, 29: 97–105.
- [40] Wei W, Wang PP, Wei YJ, et al. Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F<sub>1</sub> and Rh<sub>1</sub> in metabolically engineered yeasts. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1412–1424.
- [41] Zhuang Y, Yang GY, Chen XH, et al. Biosynthesis of plant-derived ginsenoside Rh<sub>2</sub> in yeast via repurposing a key promiscuous microbial enzyme. *Metab Eng*, 2017, 42: 25–32.
- [42] Zhao CC, Gao X, Liu XB, et al. Enhancing biosynthesis of a ginsenoside precursor by self-assembly of two key enzymes in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(17): 3380–3385.
- [43] Li DH, Zhang Q, Zhou ZJ, et al. Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarediol-II in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(4): 603–609.
- [44] Yu L, Chen Y, Shi J, et al. Biosynthesis of rare 20(R)-protopanaxadiol/protopanaxatriol type ginsenosides through *Escherichia coli* engineered with UDP-glycosyltransferase genes. *J Gins Res*, 2019, 43: 116–124.
- [45] Lu J, Yao L, Li JX, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferase involved in biosynthesis of ginsenosides Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> and identification of critical conserved amino acid residues for its function. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(36): 9446–9445.
- [46] Rakotoarivonina H, Hermant B, Monthe N, et al. The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. *Microb Cell Fact*, 2012, 11(1): 159.
- [47] Du J, Cui CH, Park SC, et al. Identification and characterization of a ginsenoside-transforming  $\beta$ -glucosidase from *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 and its application for enhanced production of minor ginsenoside Rg<sub>2</sub> (S). *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e96914.
- [48] Kim TH, Yang EJ, Shin KC, et al. Enhanced Production of  $\beta$ -D-glycosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in Recombinant *Escherichia coli* in fed-batch culture for the biotransformation of ginseng leaf extract to ginsenoside compound K. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2018, 23(2): 183–193.
- [49] Shin KC, Kim TH, Choi JH, et al. Complete biotransformation of protopanaxadiol-type ginsenosides to 20-O- $\beta$ -glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol using a novel and thermostable  $\beta$ -glucosidase. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(11): 2822–2829, doi: 10.1021/acs.jafc.7b06108.
- [50] Xie J, Zhao D, Zhao L, et al. Characterization of a novel arabinose-tolerant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase with high ginsenoside Rc to ginsenoside Rd bioconversion productivity. *J Appl Microbiol*, 2016, 120(3): 647–660.
- [51] Quan LH, Min JW, Sathiyamoorthy S, et al. Biotransformation of ginsenosides Re and Rg<sub>1</sub> into ginsenosides Rg<sub>2</sub> and Rh<sub>1</sub> by recombinant  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(5): 913–917.
- [52] Pandey M, Verma RK, Saraf SA. Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian J Pharm Clin Res*, 2010, 3: 11–15.
- [53] Yi Z, He S, Simpson BK. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 19: 30–35.
- [54] Youn SY, Park MS, Ji GE. Identification of the beta-glucosidase gene from *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis and its expression in *B. bifidum* BGN4. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(12): 1714–1723.
- [55] Upadhyaya J, Kim MJ, Kim YH, et al. Enzymatic formation of compound-K from ginsenoside Rb<sub>1</sub> by enzyme preparation from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *J Gins Res*, 2016, 40(2): 105–112.
- [56] Wang Y, Choi KD, Yu HS, et al. Production of ginsenoside F<sub>1</sub> using commercial enzyme cellulase

- KN. *J Gins Res*, 2016, 40(2): 121–126.
- [57] Zhou W, Huang H, Zhu HY, et al. New metabolites from the biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by *Paecilomyces bainier* sp. 229 and activities in inducing osteogenic differentiation by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation. *J Gins Res*, 2018, 42(2): 199–207.
- [58] Teng R, Ang C, Mcmanus D, et al. Regioselective acylation of ginsenosides by *Novozyme* 435 to generate molecular diversity. *Helv Chim Acta*, 2010, 87(7): 1860–1872.
- [59] Gebhardt S, Bihler S, Schubert-Zsilavec M, et al. Biocatalytic generation of molecular diversity: modification of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by  $\beta$ -1, 4-galactosyltransferase and *Candida antarctica* Lipase, Part 4. *Helv Chim Acta*, 2015, 85(7): 1943–1959.
- [60] Zhang Q, Zhao WQ, Meng F, et al. Transformation of ginsenoside F<sub>1</sub> from ginsenoside Rg<sub>1</sub> catalyzed by immobilized  $\beta$ -glycosidase. *Chin J Antibiot*, 2012, 37(1): 49–55 (in Chinese).  
张琪, 赵文倩, 孟飞, 等. 固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶制备人参 F<sub>1</sub> 的研究. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(1): 49–55
- [61] Yu ZH, Li QY, Cui L, et al. Transformation of rare ginsenoside Compound K from ginsenoside Rb<sub>1</sub> catalyzed by snailase immobilization onto microspheres. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2014, 45(21): 3092–3097 (in Chinese).  
于兆慧, 刘其媛, 崔莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究. *中草药*, 2014, 45(21): 3092–3097.
- [62] Yuan Y, Luan XN, Rana XK, et al. Covalent immobilization of cellulase in application of biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub>. *J Mol Catal B Enzym*, 2017, 133(S1): S525–S532.
- [63] Graebin N, Schöffler J, Andrades D, et al. Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: state of the art and perspectives. *Molecules*, 2016, 21(8): 1074.
- [64] Xue DS, Wang JB, Yao SJ. High production of  $\beta$ -glucosidase from a marine *Aspergillus niger* immobilized on towel gourd vegetable sponges. *Chin Chem Lett*, 2015, 26(8): 1011–1015.
- [65] Yan JL, Pan GX, Li LQ, et al. Adsorption, immobilization, and activity of  $\beta$ -glucosidase on different soil colloids. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 348(2): 565–570.
- [66] de Alencar Figueira J, Dias FFG, Sato HH, et al. Screening of supports for the immobilization of  $\beta$ -Glucosidase. *Enzyme Res*, 2011, 2011: 642460.
- [67] Javed MR, Buthe A, Rashid MH, et al. Cost-efficient entrapment of  $\beta$ -glucosidase in nanoscale latex and silicone polymeric thin films for use as stable biocatalysts. *Food Chem*, 2016, 190: 1078–1085.
- [68] Reshmi R, Sugunan S. Improved biochemical characteristics of crosslinked  $\beta$ -glucosidase on nanoporous silica foams. *J Mol Catal B Enzym*, 2013, 85–86: 111–118.
- [69] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*. 2007, 40(6): 1451–1463.
- [70] Zhang Y, He SD, Simpson BK. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 19: 30–35.
- [71] Mak WS, Tran S, Marcheschi R, et al. Integrative genomic mining for enzyme function to enable engineering of a non-natural biosynthetic pathway. *Nat Commun*, 2016, 6: 10005.
- [72] Samaei-Daryan S, Goliaei B, Ebrahim-Habibi A. characterization of surface binding sites in glycoside hydrolases: a computational study. *J Mol Recognit*, 2017, 30(9): e2624.
- [73] Sainz-Polo MA, Valenzuela SV, González B, et al. Structural analysis of glucuronoxylan-specific Xyn30D and its attached CBM35 domain gives insights into the role of modularity in specificity. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31088–31101.
- [74] Kong XJ, Yuan SG, Li L, et al. Engineering of an epoxide hydrolase for efficient bioresolution of bulky pharmaco substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(44): 15717–15722.
- [75] Pang PJ, Cao LC, Liu YH, et al. Structures of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase provide insights into its mechanism. *J Struct Biol*, 2017, 198(3): 154–162.
- [76] Zhang YL, Zhao Z, Liu HY. Deriving chemically essential interactions based on active site alignments and quantum chemical calculations: a case study on glycoside hydrolases. *ACS Catal*, 2015, 5(4): 2559–2572.
- [77] Yan S, Wei PC, Chen Q, et al. Functional and



- structural characterization of a  $\beta$ -glucosidase involved in saponin metabolism from intestinal bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1349–1356.
- [78] Park SJ, Choi JM, Kyeong HH, et al. Rational design of a  $\beta$ -glycosidase with high regioselectivity for triterpenoid tailoring. *ChemBioChem*, 2015, 16(5): 854–860.
- [79] Choi JH, Shin KC, Oh DK. An L213A variant of  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* with increased  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity converts ginsenoside Rc to compound K. *PLoS ONE*, 2018, 13(1): e0191018.
- [80] Ribeiro BD, Santos AG, Marrucho IM. CHAPTER 6: Biocatalysis in ionic liquids//Coelho MA, Ribeiro BD, Eds. *White Biotechnology for Sustainable Chemistry*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2015.
- [81] Gao WW, Zhang FX, Zhang GX, et al. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochem Eng J*, 2015, 99: 67–84.
- [82] Chen JY, Kaleem I, He DM, et al. Efficient production of glycyrrhetic acid 3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide by whole-cell biocatalysis in an ionic liquid/buffer biphasic system. *Process Biochem*, 2012, 47(6): 908–913.
- [83] Yanhong BI, Wang ZY, Mao YY, et al. Ionic Liquid effects on the activity of  $\beta$ -Glycosidase for the synthesis of salidroside in co-solvent systems. *Chin J Catal*, 2012, 33(7/8): 1161–1165.
- [84] Ferdjani S, Ionita M, Roy B, et al. Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(6): 1215–1219.
- [85] Brakowski R, Pontius K, Franzreb M. Investigation of the transglycosylation potential of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* in the presence of the ionic liquid [Bmim][PF<sub>6</sub>]. *J Mol Cat B Enzym*, 2016, 130: 48–57.
- [86] Kudou M, Kubota Y, Nakashima N, et al. Improvement of enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase from *thermotoga maritima* by 1-butyl-3-methylimidazolium acetate. *J Mol Cat B Enzym*, 2014, 104: 17–22.
- [87] Xu WJ, Huang YK, Li F, et al. Improving  $\beta$ -glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride. *Biochem Eng J*, 2018, 138: 37–46.
- [88] Zhao H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *J Chem Technol Biotech*, 2010, 85(7): 891–907.
- [89] Brogan APS, Bui-Le L, Hallett JP. Non-aqueous homogenous biocatalytic conversion of polysaccharides in ionic liquids using chemically modified glucosidase. *Nat Chem*, 2018, 10(8): 859–865, doi: 10.1038/s41557-018-0088-6.
- [90] Toral AR, De Los Ríos AP, Hernández FJ, et al. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(5): 1095–1099.
- [91] Venardos D, Klei HE, Sundstrom DW. Conversion of cellobiose to glucose using immobilized  $\beta$ -glucosidase reactors. *Enzyme Microb Technol*, 1980, 2(2): 112–116.
- [92] Li LJ, Jin YR, Wang XZ, et al. Ionic liquid and aqueous two-phase extraction based on salting-out coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of seven rare ginsenosides in Xue-Sai-Tong injection. *J Sep Sci*, 2015, 38(17): 3055–3062.
- [93] Li FF, Li Q, Wu SG, et al. Salting-out extraction of sinomenine from *Sinomenium acutum* by an alcohol/salt aqueous two-phase system using ionic liquids as additives. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, 93(7): 1925–1930, doi: 10.1002/jctb.5318.
- [94] Li LJ, Li XW, Ding J, et al. Ionic Liquid surfactant-mediated ultrasonic-assisted extraction coupled with HPLC for the determination of five rare ginsenosides in *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen. *Chem J Chin Univ*, 2016, 37(3): 454–459 (in Chinese). 李兰杰, 李绪文, 丁健, 等. 超声辅助结合离子液体双水相提取-高效液相色谱法测定三七中 5 种稀有参皂苷的含量. *高等学校化学学报*, 2016, 37(3): 454–459.

(本文责编 郝丽芳)