

稀有人参皂苷 C-K 转化菌株的 筛选鉴定及其转化特性

赵雪淞¹, 梁飞², 胡彦波², 梦月², 周义发²

(1. 辽宁工程技术大学 矿业学院, 辽宁 阜新 123000; 2. 东北师范大学 生命科学学院, 吉林 长春 130024)

摘要: 以原人参二醇型皂苷混合物为底物对 10 种霉菌进行筛选, 发现 3.26 号菌株能够将高含量的原人参二醇型皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc 等转化为具有抗肿瘤活性的稀有人参皂苷 Compound K (C-K)。经形态学和 ITS 序列分析鉴定, 该菌株属于附球霉属(*Epicoccum*)真菌。从该菌株培养液中分离出人参皂苷水解酶粗酶 E-I, 确定其最适 pH 值和最适温度分别为 pH 5.0 和 40 ℃。用 E-I 分别转化人参皂苷 Rb₁ 和 Rb₂、Rc, 发现它既能水解人参皂苷 Rb₁, 也能水解 Rb₂ 和 Rc, 但是对 Rb₁ 的水解活性更强。上述结果说明: 3.26 号菌株产生的糖苷酶具有广泛的底物专一性, 但是对葡萄糖苷键的专一性更高; 该菌的生物转化途径为人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc→Rd→F₂→C-K。

关键词: 人参皂苷, 人参皂苷 C-K, 生物转化, 筛选, ITS 序列分析

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0914—07

Screening, Identification and Transformational Property of Minor Ginsenoside Compound K-Producing Fungus

ZHAO Xue-song¹, LIANG Fei², HU Yan-bo², MENG Yue², ZHOU Yi-fa²

(1. College of Mining Industry, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China; 2. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: Ten fungi were screened with regard to their ability to convert major saponins Rb₁, Rb₂ and Rc to Compound K (C-K) which has notable anti-tumor activity. Among these, strain sp. 3.26 exhibited highest transfer ability. The strain sp. 3.26 was identified as *Epicoccum* sp. through ITS sequence analysis and morphology observation. A crude ginsenoside-hydrolyzing β -glucosidase (E-I) was isolated from a culture filtrate of the strain sp. 3.26. The optimal pH and temperature of E-I were pH 5.0 and 40 ℃, respectively. E-I not only hydrolyze ginsenoside Rb₁ but also hydrolyze Rb₂ and Rc. However, E-I has higher activity to Rb₁. This result indicated that the glycosidases secreted by strain sp. 3.26 has wide substrate specificity, and was more specific to glucosidic linkage, and the biotransformation pathways by this strain was: ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc→Rd→F₂→C-K.

收稿日期: 2013-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270479)。

作者简介: 赵雪淞(1971—), 女, 满族, 黑龙江五常人, 理学博士, 副教授, 主要从事植物与微生物相互作用研究。

E-mail: zhaosx210@163.com

Keywords: ginsenosides, compound K, biotransformation, screening, ITS sequence analysis

人参是百草之王,在我国已有 2000 多年的药用历史,具有多种药理学活性,对神经系统、内分泌系统、循环系统及免疫系统等均有作用。人参皂苷是人参的主要活性成分,从人参中分离出的人参皂苷有 40 余种^[1]。近年来的研究发现,有些在人参中含量很低的稀有人参皂苷如 Rg₃、C-K、Rh₂ 等具有优异的抗肿瘤活性,可抑制肿瘤细胞的增殖,抑制癌细胞转移、诱导肿瘤细胞凋亡和抗肿瘤诱导的血管新生等,有重要的药用价值^[2-5]。但是,稀有人参皂苷在人参中的含量太低,无法从人参中直接提取,而现有的化学合成技术还无法实现工业化生产,因此,如何高效大量制备稀有人参皂苷成为科学研究的焦点。

稀有人参皂苷的化学结构与人参中某些含量高的人参皂苷(如 Rb₁)相比,只是缺少了一个或几个糖基。理论上可以通过改变某些高含量人参皂苷的结构来获得稀有人参皂苷。结构修饰的方法主要有化学转化法和生物转化法。生物转化法具有反应条件温和、专一性强、得率高等优点,是获得稀有人参皂苷的有效途径,而优良菌种或菌株的筛选是生物转化成败的关键因素^[6]。人参中含量最高的人参皂苷是 Rb₁,其糖基的连接键为 β-葡萄糖苷键,微生物中 β-葡萄糖苷酶酶活高的菌种主要是霉菌^[7],因此霉菌是筛选转化菌株的良好来源。在作者所在研究团队以前的研究中,已经发现了一些优良的稀有人参皂苷转化菌株及其转化酶^[8-10]。作者从 10 种霉菌中筛选出 1 种能转化高含量的原人参二醇型皂苷为稀有人参皂苷 C-K 的菌株,并结合形态学和分子生物学技术进行了菌种鉴定,继而研究了该菌的转化特性。研究结果为稀有人参皂苷 C-K 的大量制备奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

10 种霉菌,采自长春市郊茄科植物病原组织,PDA 培养基 4℃暗保存;人参皂苷标准品,购自成都曼斯特生物技术有限公司;人参皂苷混合物及人参皂苷单体,由作者所在实验室制备,具体制备方法参见文献[11];DNA marker,Invitrogen 公司提供;

凝胶回收试剂盒,QIAGEN 公司提供;CTAB,Amresco 公司提供;氯仿、甲醇等化学试剂,均为北京化工厂生产。

1.2 仪器与设备

BCN-1360B 生物超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司制造;YXQ-LS-30SH 立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业公司制造;HZQ-C 空气浴振荡器,哈尔滨市东明医疗仪器厂制造;Z36HK 低温高速离心机,德国 Hermle 制造;倒置荧光显微镜,日本 Olympus 制造;DYCP-31D 水平电泳槽,北京市六一仪器厂制造;紫外/可见凝胶成像系统 UVItec 制造;PCR 仪,ABI 公司制造。

1.3 方法

1.3.1 分析方法 TLC 分析采用 G 60 硅胶板,展开剂 CHCl₃-MeOH-H₂O(体积比 65:35:10,下层)。显色剂为体积分数 5%硫酸乙醇,105℃加热 5 min。展开方式为上行展开。

1.3.2 人参皂苷转化菌株的筛选 供试菌种置于 V8 汁液体培养基中振荡培养,130 r/min,28℃,培养 8 d 后,纱布过滤,8 000 g、4℃、离心 20 min,弃去上清,得到孢子。将孢子悬浮在 20 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)中,在 130 r/min、28℃条件下振荡培养 24 h,然后加入人参皂苷储备液(人参皂苷样品溶于 pH 5.0 20 mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液中并通过 0.2 μm 的滤膜过滤除菌),使孢子的终浓度为 5×10⁶ 个/mL,底物的终质量浓度为 0.25 mg/mL,继续振荡培养 0~5 d。从加入人参皂苷的 0 时开始取样,每隔 24 h 取样一次,加入等体积的正丁醇萃取,上层正丁醇相减压蒸干,重新溶于质量分数 40%乙腈水溶液中,TLC 检测转化结果。

1.3.3 菌种形态鉴定 PDA 培养基接种 3.26 号霉菌,30℃恒温培养,观察菌落的形态、颜色;挑取菌丝,“Z”型接种,用灭菌的盖玻片垂直“Z”线插入到培养基中培养,取盖玻片显微观察。

1.3.4 菌种分子生物学鉴定 鉴定采用 rDNA-ITS (18S rRNA 基因-ITS)序列分析方法。具体方法为:V8 汁液体培养基(1 L 培养基含有 200 mL V8 汁和 2 g CaCO₃)30℃振荡培养 3.26 号菌株 5 d,取菌丝体预冻后加液氮研磨,CTAB 法提取霉菌 DNA,质量

分数 0.5% 琼脂糖凝胶电泳纯化。ITS 基因的扩增使用真菌通用引物,正向引物 (ITS1):5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',19bp;反向引物 (ITS4):5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',20 bp ([http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm#Internal transcribed spacer \(ITS\) region primers](http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm#Internal%20transcribed%20spacer%20(ITS)%20region%20primers))。ITS1 和 ITS4 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 45 s,48 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 3 min,30 个循环,72 ℃终延伸 10 min,4 ℃保温 60 min。ITS 扩增后的产物经质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,回收条带送至北京鼎国生物技术有限责任公司测序。

1.3.5 人参皂苷水解酶制备 V8 汁液体培养基,130 r/min、30 ℃恒温振荡培养 5 d。发酵液经 6 层纱布过滤、离心(4 ℃、1 200 r/min、20 min)后得到粗酶液。粗酶液中加入体积分数 5% 的 DEAE-纤维素 4 ℃条件下振荡吸附 12 h,转入层析柱(Φ 3.2 cm×28 cm),粗酶液中未结合的成分在装柱过程中流出,结合在 DEAE-纤维素上的成分以含有 0、0.25、0.5、0.75、1 mol/L NaCl 的缓冲液 A(25 mmol/L pH 5.0,NaAc-HAc)进行梯度洗脱,洗脱体积流量为 3 mL/min,每个梯度洗脱 2 倍柱体积,洗脱液每 50 mL 收集一管。收集有酶活性的级分、透析(透析液为缓冲液 A,4 ℃透析 24 h)后得到部分纯化的人参皂苷水解酶 E-I。该酶的制备过程以 $A_{280\text{ nm}}$ 处紫外光吸收值表征各级分的蛋白质含量,以对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷(pNPG)法表征酶活性。

1.3.6 转化途径分析 4 mg/mL 人参皂苷 250 μ L 和 2 250 μ L 酶液在 40 ℃保温,然后加入等体积的正丁醇终止反应。正丁醇相进行 TLC 分析。

1.3.7 最适 pH 值和最适反应温度测定 酶的最适 pH 值测定选用 pH 2.0~8.0 的 25 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液,1 个 pH 值为一个梯度。测定方法为:取各 pH 值的 Na_2HPO_4 柠檬酸缓冲液 450 μ L (pH 分别为 2.5~8.0),加入纯化后的 GE-I 20 μ L,再加入 pNPG 30 μ L,37 ℃保温 1 h 后,加入 2.5 mL NaOH(0.25 mol/L)终止反应,测定酶活力。最适合 pH 值下的酶活力记作 100%,其他 pH 值下的酶活力为其相对百分比。酶的最适反应温度测定选用 30~80 ℃,5 ℃为一个梯度。测定方法为取 450 μ L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0),加 20 μ L GE-I,30 μ L pNPG(5 mg/mL),各自温度下避光反应 1 h,然后加

入 2.5 mL NaOH(0.25 mol/L)溶液终止反应,测定酶活力。最适温度下的酶活力记作 100%,其他温度下的酶活力为其相对百分比。

2 结果与讨论

2.1 转化菌株的筛选

因为分离纯化得到人参皂苷单体的成本较高,此步试验采用人参皂苷 Rb_1 、 Rb_2 、 Rc 和少量 Rd 的混合物为底物,从 10 种霉菌中筛选稀有人参皂苷 C-K 转化菌株。图 1 显示了转化 5 d 后的结果:3.23、3.24、3.25、3.26、3.27 和 3.28 号菌株能够转化底物,产生低极性的转化产物,但是只有 3.26 号菌株能够转化底物为稀有人参皂苷 C-K,其转化途径可能是:原人参二醇型皂苷 $\rightarrow\text{Rd}\rightarrow\text{F}_2\rightarrow\text{C-K}$ 。因此,选择 3.26 号菌株作进一步研究。

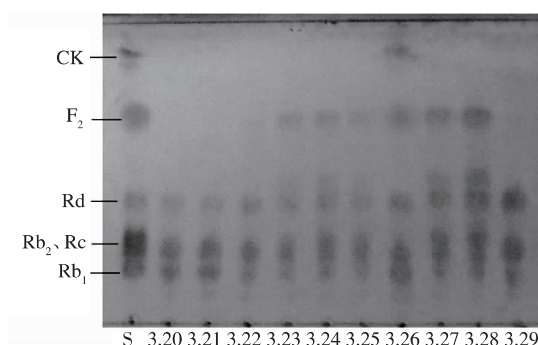


图 1 TLC 分析 10 种霉菌生物转化人参皂苷 Rb_1 、 Rb_2 、 Rc 和 Rd 的转化产物(S 代表标样)

Fig. 1 TLC Analysis of the products of biotransformation of ginsenosides Rb_1 、 Rb_2 、 Rc and Rd by 10 fungi (S represents standard ginsenosides)

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态鉴定 3.26 号菌株的菌落初呈白色、绒毛状,培养 7 d 后,菌落颜色略显红色(图 2(a))。显微镜观察菌丝的形态,有不规则的砖壁状横隔,分生孢子散落,颜色较深(图 2(b)(c))。经查找真菌鉴定手册^[12],该菌的形态特征与半知菌类丛梗孢目瘤座孢科附球霉属(Epicoccum)真菌相近。

2.2.2 分子生物学鉴定 ITS (Internal Transcribed Spacer,内转录间隔区)序列分析是当前真菌鉴定的重要手段。由于真菌核糖体 DNA ITS 区序列在生物进化过程中高度保守,因此,即使是亲缘关系非常接近的 2 个种都能在 ITS 序列上表现出差异,显示最近的进化特征。作者用 CTAB 法提取 3.26 号菌株

的基因组 DNA,质量分数 0.5%琼脂糖凝胶电泳,发现该菌的基因组 DNA 大约 14 000 bp(图 3(a)),将其作为 PCR 模板扩增 ITS 基因,PCR 产物与 DNA marker 比较,大小在 500~650 bp 之间(图 3(b))。PCR 产物回收后测序,然后登录 GenBank 数据库,将测序结果用 Blast 进行同源性分析,发现与附球霉属菌株 *Epicoccum* sp. SP3 18S rRNA 基因的相似度为 99%(图 4)。上述结果说明,3.26 号菌株为半知菌类丛梗孢目瘤座孢科附球霉属(*Epicoccum*)真菌。

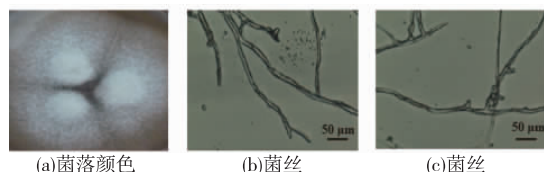


图 2 3.26 号菌株的菌落和菌丝 B 和 C(10×40 倍)形态
Fig. 2 Shapes of colony and hyphae of strain sp. 3.26

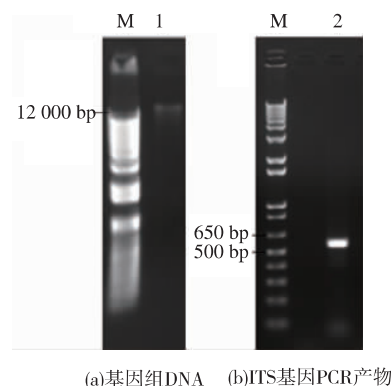


图 3 3.26 号菌株基因组 DNA 电泳图谱和 ITS 基因 PCR 产物电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of genome DNA extracted from strain sp. 3.26 and PCR production of ITS gene

Query 7	CTA-CTGAT-CGAGGTCAGAGTGT-AAAATGTACTTTTGGACGTCGCCGTTATGAGTGCA	63
Sbjct 529	CTACCTGATCCGAGGTCAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGACGTCGCCGTTATGAGTGCA	470
Query 64	AAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGA	123
Sbjct 469	AAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGA	410
Query 124	GTCTACACGAGAGGCGAGACAAAACACCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATG	183
Sbjct 409	GTCTACACGAGAGGCGAGACAAAACACCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATG	350
Query 184	ACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG	243
Sbjct 349	ACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG	290
Query 244	ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGA	303
Sbjct 289	ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGA	230
Query 304	TGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATAATTATGTTTTTCAGACGCTGA	363
Sbjct 229	TGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATAATTATGTTTTTCAGACGCTGA	170
Query 364	TTGCAACTGCAAAGGGTTTGAATGTTGTTCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGA	423
Sbjct 169	TTGCAACTGCAAAGGGTTTGAATGTTGTTCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGA	110
Query 424	AGGTACTCAAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAAACTCTAGGTAATG	483
Sbjct 109	AGGTACTCAAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAAACTCTAGGTAATG	50
Query 484	ATCCTTCCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTTACGACTTGTGACTTCC	533
Sbjct 49	ATCCTTCCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTTACGACTTGT- ACTTCC	1

图 4 3.26 号菌株 ITS 序列与 *Epicoccum* sp. SP3 比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of ITS sequences obtained from strain sp. 3.26. The ITS sequences of strain sp. 3.26 are aligned with those of *Epicoccum* sp. SP3

2.3 人参皂苷水解酶的制备

因为酶转化法有流程短、产率高、产物易分离纯化、不需要无菌操作等优点^[13],同时为了进一步验证 3.26 号菌株的转化能力和转化途径,从 3.26 号菌株的培养液中分离制备了人参皂苷水解酶粗酶 E-I。从图 5 可以看出,经 DEAE-纤维素柱层析后,在氯化钠溶液浓度为 0.25 mol/L 时有酶活峰出现,收集酶活峰,记为 E-I。

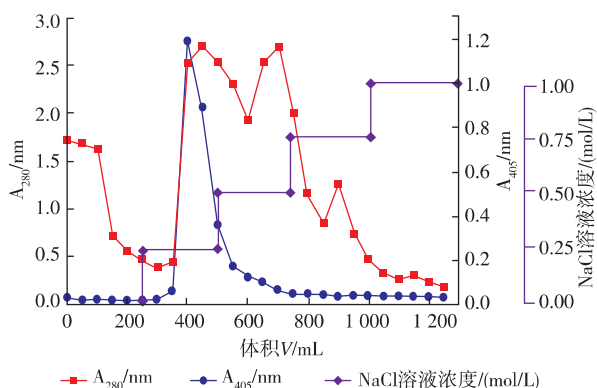


图 5 DEAE-纤维素离子交换层析制备人参皂苷水解酶 E-I
Fig. 5 Preparation of ginsenoside-hydrolyzing enzyme E-I by Ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose

2.4 人参皂苷水解酶 E-I 的最适 pH 值和最适温度

从图 6 可以看出, E-I 的最适 pH 值为 5.0, 最适温度为 40 °C。已有研究表明, 大部分 β -葡萄糖苷酶均为酸性蛋白质, 最适 pH 值大都在酸性范围内, 最适温度分布在 30~110 °C^[14]。本研究结果符合这一规律。

2.5 转化途径分析

用人参皂苷水解酶 E-I 在上述最适 pH 值和温度条件下分别转化人参皂苷 Rb_1 和 Rb_2 、 Rc 混合物, TLC 检测结果。如图 7 所示, 人参皂苷 Rb_1 的转化产物有 3 种: Rd 、 F_2 和 C-K, 转化 6 h 后, 产生 Rd 和 F_2 , 转化 12 h 后, 出现第 3 种产物 C-K, 转化 48 h 后, 底物人参皂苷 Rb_1 和产物 Rd 完全消失, 剩下产物 F_2 和 C-K (图 7(a)); 人参皂苷 Rb_2 和 Rc 的转化产物与人参皂苷 Rb_1 的转化产物相同。不同的是, 人参皂苷 Rb_2 和 Rc 的转化效率明显低于 Rb_1 , Rb_2 和 Rc 转化 24 h 后才有少量 C-K 出现, 转化 48 h 后, 仍然存在很多 Rd (图 7(b))。上述结果说明: 3.26 号菌株能够转化高含量的原人参二醇型皂苷为稀有

人参皂苷 C-K, 转化途径为: 原人参二醇型皂苷 $\rightarrow Rd \rightarrow F_2 \rightarrow CK$; 3.26 号菌株分泌的糖苷酶具有广泛的底物专一性, 但是对葡萄糖苷键的专一性更高。因为, 原人参二醇型皂苷 Rb_1 、 Rb_2 和 Rc 具有共同的苷元 (原人参二醇) 和 C-3 位的糖链 (Glc β -(1,2)-Glc), 不同之处在于 C-20 位的糖链: Rb_1 的 C-20 位是 2 个葡萄糖以 β -(1 $\rightarrow$ 6) 糖苷键相连接, Rb_2 的 C-20 位是一个吡喃型阿拉伯糖和一个葡萄糖以 α -(1 $\rightarrow$ 6) 糖苷键相连接, Rc 的 C-20 位是一个呋喃型阿拉伯糖和一个葡萄糖以 α -(1 $\rightarrow$ 6) 糖苷键相连接 (图 8), 而该菌分泌的糖苷酶既能水解人参皂苷 Rb_1 C-20 位的糖链, 也能水解 Rb_2 和 Rc C-20 位的糖链, 说明其具有广泛的底物专一性。

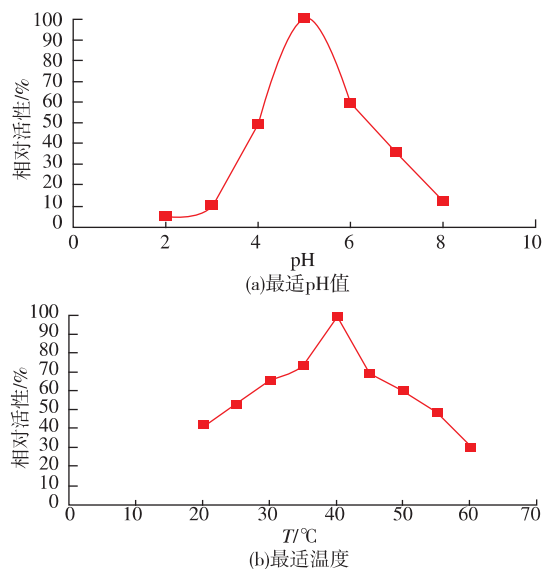


图 6 E-I 的最适 pH 值和最适温度
Fig. 6 Optimal pH and temperature of E-I

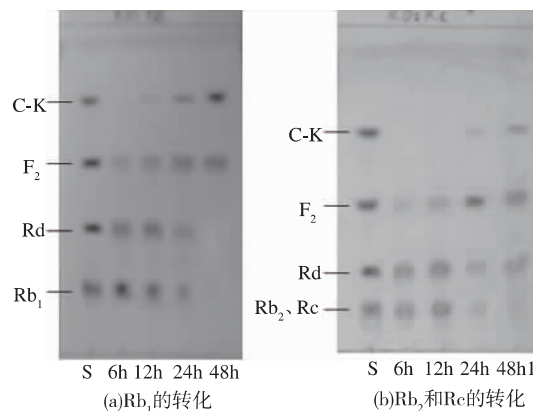


图 7 TLC 分析 E-I 对人参皂苷 Rb_1 和 Rb_2 、 Rc 的转化
Fig. 7 TLC Analysis of the biotransformation of ginsenosides Rb_1 and Rb_2 、 Rc by E-I

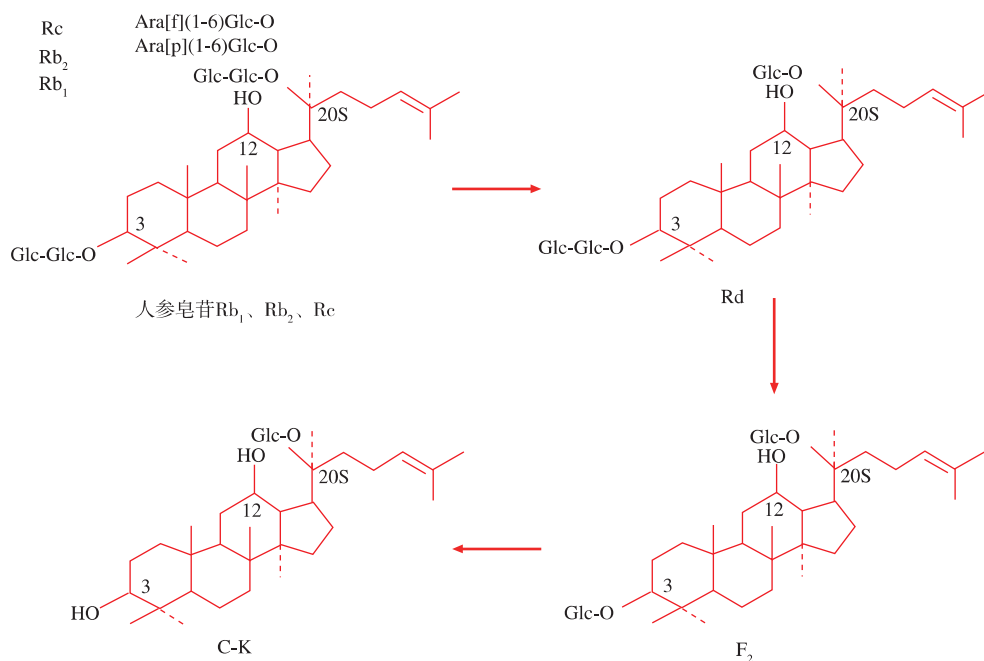


图 8 3.26 号菌株转化原人参二醇型皂苷的转化途径

Fig. 8 Biotransformation pathways of protopanaxadiol-type saponins by strain sp. 3.26

3 结 语

从 10 种霉菌中筛选出 1 种能够生物转化主要的人参皂苷 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 为稀有人参皂苷 C-K 的 3.26 号菌株。经形态学和 ITS 基因序列分析, 确定 3.26 号菌株属于附球霉属 (*Epicoccum*) 真菌。采用 DEAE-纤维素离子交换层析, 从 3.26 号菌株的培养液中分离出人参皂苷水解酶粗酶 E-I, 确定 E-I 的最适 pH 值和最适温度分别为 pH 5.0 和 40 ℃。在上述最适条件下, 用 E-I 对该菌转化人参皂苷的具

体途径进行研究, 发现该菌产生的糖苷酶具有广泛的底物专一性, 它既能水解人参皂苷 Rb₁, 也能水解 Rb₂ 和 Rc。3.26 号菌株对人参皂苷的生物转化途径为: 人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc → Rd → F₂ → C-K。该菌能将主要的人参二醇型皂苷都转化为 C-K, 使得可以采用原人参二醇型皂苷混合物为底物进行生物转化, 大大降低了人参皂苷分离纯化的成本, 而采用粗酶进行转化, 明显提高了 C-K 产率, 同时节省了分离纯酶的成本。3.26 号菌株的转化特性非常有利于稀有人参皂苷 C-K 的工业制备。

参考文献:

- [1] Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 812: 119-133.
- [2] Suda K, Murakami K, Hasegawa H, et al. Induction of apoptosis in Lewis lung carcinoma cells by an intestinal bacterial metabolite produced from orally administered ginseng protopanaxadiol saponins[J]. *Journal of Traditional Medicines*, 2000, 17 (6): 236-244.
- [3] Choi K, Kim M, Ryu J, et al. Ginsenosides compound K and Rh₂ inhibit tumor necrosis factor- α -induced activation of the NF- κ B and JNK pathways in human astroglial cells[J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 421: 37-41.
- [4] Nakata H, Kikuchi Y, Tode T, et al. Inhibitory effects of ginsenoside Rh₂ on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells[J]. *Cancer Science*, 1998, 89(7): 733-740.
- [5] Shinkai K, Akedo H, Mukai M, et al. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg₃[J]. *Cancer Science*, 1996, 87: 357-362.
- [6] 李学, 臧埔, 张连学, 等. 微生物转化法制备人参皂苷 Compound K 的研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(11): 323-327.
- LI Xue, ZANG Pu, ZHANG Lian-xue, et al. Research progress on ginsenoside CK production by microbial transformation[J].

- Food Science**, 2012, 33 (11): 323-327. (in Chinese)
- [7] 朱龙宝, 汤斌, 陶玉贵, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因克隆及在毕赤酵母中分泌表达[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 973-977.
- ZHU Long-bao, TANG Bin, TAO Yu-gui, et al. Cloning and secreting expression of the β -Glucosidase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(9): 973-977. (in Chinese)
- [8] ZHAO Xue-song, GAO Juan, LIU Hai-bo, et al. A highly selective ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*[J]. **Process Biochemistry**, 2010, 45(6): 897-903.
- [9] ZHAO Xue-song, GAO Ling, WANG Juan, et al. A novel ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*[J]. **Process Biochemistry**, 2009, 44(6): 612-618.
- [10] ZHAO Xue-song, WANG Juan, LI Jie, et al. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by phytopathogenic fungi *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2009, 36(5): 721-726.
- [11] 赵雪淞, 杜秀丽, 高娟. 人参锈腐病菌毁灭柱孢菌酶促降解人参皂苷研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 560-567.
- ZHAO Xue-song, DU Xiu-li, GAO Juan. Enzymatic degradation of ginsenosides by ginseng rust rot pathogen *Cylindrocarpon destructans*[J]. **Chinese Journal of Biological Control**, 2012, 28(4): 560-567. (in Chinese)
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405-641.
- [13] Noh K H, Son J W, Kim H J, et al. Ginsenoside Compound K production from ginseng root extract by a thermostable β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2009, 73: 316-321.
- [14] 李华, 高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107-112.
- LI Hua, GAO Li. Research advance on methods of determining β -Glucosidase activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(2): 107-112. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 第七届中国饲料营养学术研讨会

所属学科: 畜牧学, 动物食品科学

开始日期: 2014-10-01

所在城市: 北京市 东城区

主办单位: 中国畜牧兽医学会动物营养分会

联系电话: 010-62731297

E-MAIL: dwyxfh@163.com

会议网站: <http://www.ananutri.com/zhaoyaotongzhi/201306/155.html>

会议名称(中文): 中国首届微生物与白酒酿造技术研讨会

所属学科: 动植物微生物学

开始日期: 2013-11-15

结束日期: 2013-11-19

所在城市: 山西省 吕梁地区

具体地点: 汾阳市

主办单位: 中国微生物学会工业微生物学专业委员会

承办单位: 山西省微生物学会 山西杏花村汾酒集团有限责任公司

全文截稿日期: 2013-10-15

联系人: 宋金龙

联系电话: 13301362971

E-MAIL: shanxiwsw@163.com

会议网站: [http://www.china-cicc.org/news/ZhongGuoShouJieWeiShengWuYuBaiJiuNiangZaoJiShuYanTaoHui\(DiYiLunTongZhi\)-4121.html](http://www.china-cicc.org/news/ZhongGuoShouJieWeiShengWuYuBaiJiuNiangZaoJiShuYanTaoHui(DiYiLunTongZhi)-4121.html)