

特异的中草药配糖体苷酶微生物及其发酵与酶学特性

金凤燮¹, 庄子瑜¹, 鱼红闪¹, 徐金丽¹, 柳青梅², 安东善², 林完泽², 李承宅²

1 大连工业大学生物与食品工程学院, 大连 116034

2 Environmental and Molecular Microbiology Laboratory, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, South Korea

摘要: 配糖体是中草药主要有效成分之一。但是中草药成分并不是活性最佳结构, 中草药口服后其成分在消化系统酶和微生物的作用下, 转化为另一种结构吸收、起药效; 但是体内的这种转化甚微, 往往受到人的个体条件的影响。如果这种体内的转化反应在体外实现, 中草药成分酶转化为高活性成分, 将对创新药、中医药、公众营养食品和保健食品、功能化妆品等意义很大。为此, 以下主要介绍本实验室研究过的中草药配糖体苷酶新微生物筛选、分类鉴定, 特异的中草药配糖体苷酶的发酵产酶和其酶学特性。

关键词: 中草药配糖体苷酶, 新微生物筛选, 特异酶发酵, 皂苷糖苷酶

Microorganisms of special herb-glycosidases and their fermentation, enzyme properties

Fengxie Jin¹, Ziyu Zhuang¹, Hongshan Yu¹, Jinli Xu¹, Qingmei Liu², Dongshan An², Wanteak Im², and Sungtaik Lee²

1 College of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

2 Environmental and Molecular Microbiology Laboratory, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, South Korea

Abstract: Herb-glycosides are main active elements of Zhongcaoyao (Chinese traditional medicines, Chinese medical herbs). However, the herb-glycoside structures are not optimal active structure for the human bodies. After orally taken up, the herb-glycosides of Zhongcaoyao could be changed into other more active structures by the digestive system such as enzymes and intestinal microorganisms; then degraded and absorbed in the human body and play the real role of pharmonic effect; but only a small amount could be changed and controlled by circadian state of the human body. If this biochange of herb-glycosides to more active structures *in vivo* was finished *in vitro*, it is very useful for the development of the Chinese traditional medicines, new plant medicines, health food, and function cosmetics. To biotransformate herb-glycosides to more active structure, this paper introduced the studies of author's team on the new microorganism isolation of the special herb-glycosidases and enzyme fermentation, the special enzyme purification and characterization.

Keywords: herb-glycosidases, new strain, special enzyme fermentation, saponin-glycosidases

Received: September 25, 2009; **Accepted:** October 28, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 2007600, 30371744, 30470055), Liaoning Excellent Talents in University (Nos. 2007T006, 2008T008, 2009T007).

Corresponding author: Fengxie Jin. E-mail: fxjin@dlpu.edu.cn

Hongshan Yu. E-mail: hongshan@dlpu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos. 2007600, 30371744, 30470055), 辽宁省教育厅创新团队项目(Nos. 2007T006, 2008T008, 2009T007)资助。

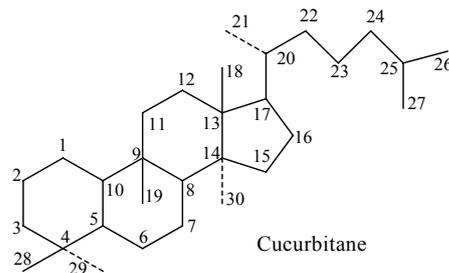
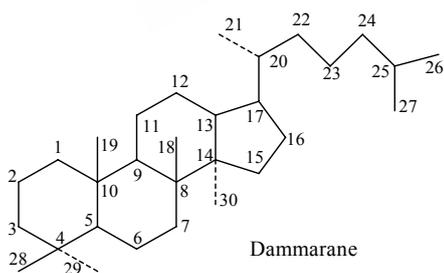
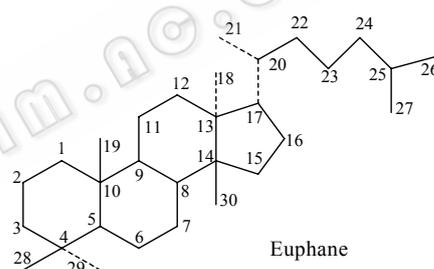
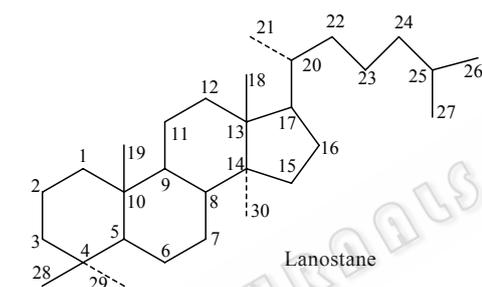
我国 1982 年至 1994 年对中药资源进行调查, 结果发现中草药有 12 807 种; 其中植物药 11 146 种, 动物药 1581 种。几千年来中草药对中华民族的健康和饮食文化起到了重要的作用。中草药不仅用于治疗疾病, 也可用于食品、保健(功能)食品、功能化妆品。如食品的香辛料、食品配料、天然色素来源于中草药的植物; 豆类食品中含有皂苷和异黄酮苷; 茶饮料中的茶多酚和皂苷; 油料种子中的苷类; 低热量甜味剂的甘草皂苷、甜叶菊苷、罗汉果苷。我国批准的近万种保健食品, 都离不开中草药。又如, 传统发酵黄酒的小曲、董酒的大曲的制备中加入数十种的中药, 传统药酒中所加入的中草药种类达数百种^[1]。

中草药的主要有效成分是: 配糖体的苷类与皂苷(包括三萜和甾醇类皂苷)类、苯丙素与黄酮类、醌类、木脂素与鞣质、低萜类及生物碱类等; 其中很

大部分与糖结合, 以苷类形式存在。配糖体(Glycosides, 苷类)是植物体和中草药中最重要的活性成分之一。根据苷元的不同可分为: 皂苷(甙)类、黄酮苷和其他苷类。苷的种类繁多, 其中, 已知的皂苷有上千种, 分为三萜类皂苷(Triterpenoid saponins)和甾醇类皂苷(Steroidal saponins)。

三萜皂苷的非糖基部分由 6 个异戊二烯聚合成的 30 个碳的三萜类, 分为四环三萜皂苷和五环三萜皂苷。

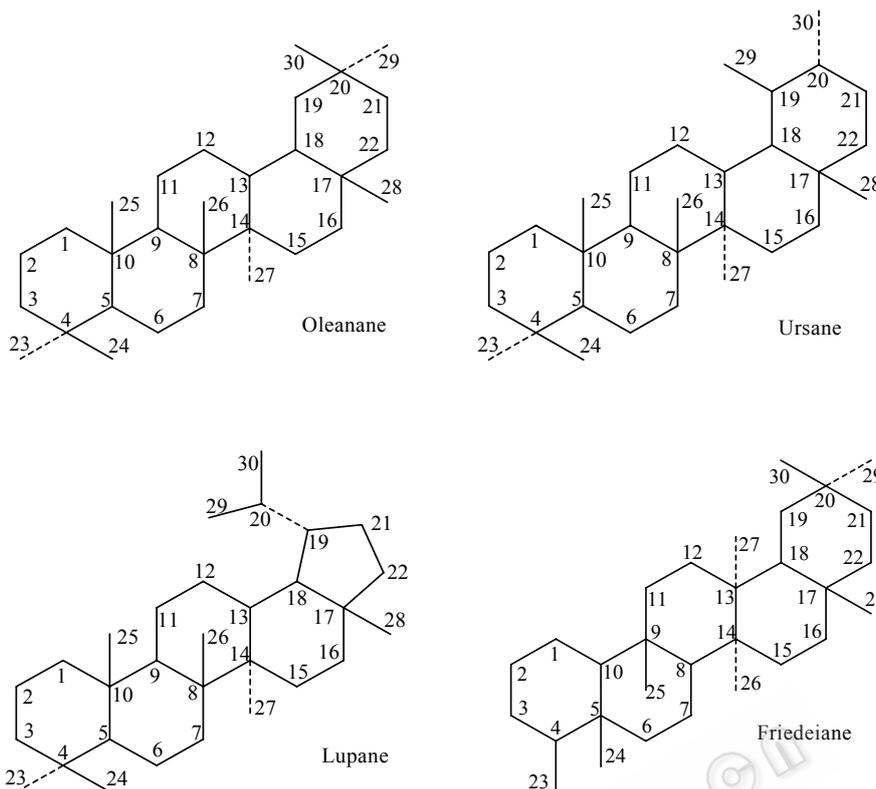
四环三萜皂苷, 根据母环第 18、19 碳上的甲基位置不同分为: 羊毛脂烷(Lanostane)型、大戟烷(Euphane)型、达玛烷(Dammarane)型、葫芦素烷(Cucurbitane)型、原萜烷(Protostane)型、楝烷(Meliacane)型、环波罗密烷(Cycloartane)型等皂苷。其部分结构为:



而且侧链的不同形成多种多样的皂苷群: 如, 羊毛脂烷型的黄芪皂苷 VII、海绵的 Sarasinoside 皂苷; 达玛烷型皂苷 90 余种, 如人参、大枣皂苷、绞股蓝皂苷等; 葫芦素烷型的有罗汉果皂苷。

五环三萜皂苷, 根据母环的 29、30 碳上的甲

基不同分为: 齐墩果烷(Oleanane)型、乌苏烷(Ursane)型、羽扁豆烷(Lupane)型、木栓烷(Friedeiane)型、羊齿或异羊齿烷(Fernane、Isosfarnane)型、何帕或异何帕烷(Hopane, Isihopane)型; 其部分结构为:



而且侧链的不同形成多种多样的皂苷群: 如齐墩果烷型的人参、柴胡、紫苑、木通等皂苷; 乌苏烷型(熊果酸型)的地榆皂苷; 羽扇豆烷型的白头翁皂苷等。

甾醇皂苷(甾)(Steroidal saponins), 甾醇皂苷碳原子数量为 27 个碳的配糖体; 分为螺甾皂苷(Spirostanol saponins)和呋甾皂苷(Furostanol saponins); 还有非糖基的甾体碳原子数量为 21~24 个碳的强心苷。皂苷的糖基部分: 主要有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-夫糖、D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸, 也形成吡喃型和呋喃型; 其糖基在苷元上位置是第 1-O-、3-O-、6-O-、18-O-、20-O-、22-O-、24-O-、25-O- 碳上, 以单糖或低聚糖的形式与苷元结合成苷, 多为醇苷, 也有酯苷^[1]。

皂苷具有抗血栓、抗癌、强心、降血糖、免疫调节、抗炎、抗风湿、抗菌、抗病毒(包括抗 HIV-1 病毒)、增加白血球、促进细胞合成等功能; 不仅广泛用于天然药物, 也广泛用于保健食品、高级化妆品。

但是, 中草药成分与化学药的最大区别为: 化学药口服后直接吸收、起药效; 但中草药成分口服后, 在消化系统酶和微生物的作用下转化为另一种结构、吸收、起药效; 体内的这种转化很微弱, 往往受到人的个体条件的影响。1994 年日本 Kobashi 等^[2]发现了人参皂苷 Rb1 和 Rg1 口服后, 经消化系统的微生物转化为低糖基皂苷后被人体吸收。其主要代谢机理为 Rb₁→Rd→F₂→C-K→苷元; Rg₁→Rh₁(或 F₁)→苷元。以后日本 Kobashi 的学生相继发现原人参二醇类皂苷 Rb₂、Rc 等口服后被肠道菌水解为 F₂、C-K 等^[3]。2003 年 Ko 等研究发现, 微生物发酵液处理原人参三醇类皂苷制备 Rg₂、Rh₁ 和 F₁ 等皂苷^[4]。并相继发现了甘草皂苷、柴胡皂苷, 大黄的番泻苷、栀子的京尼平苷、芍药的芍药苷、黄芩的黄芩苷等, 口服后在肠道菌的作用下其苷类糖基被水解、转化为高活性物质, 吸收起药效^[5]。也就是说, 中草药成分—天然产物不一定是活性最佳的结构; 如果改变其结构, 其生理活性可提高几十倍甚至几百倍^[6]。

如果这种体内的中草药配糖体变成高活性的次生产物实现体外的生物转化, 不仅对中药、创新药

物意义很大,也对食品和化妆品等意义很大。但是,中草药配糖体种类甚多,单是皂苷类就达上千种;其生物转化或者是酶转化,必然涉及到配糖体苷元种类、糖基种类、糖基结合位置、糖苷键种类的影响;尤其中草药中含有的配糖体定向转化为活性高的成分,现有的酶无法解决。因此需要开发大批对苷元种类、糖基种类、糖基位置、糖苷键种类特异选择性的、数量繁多的配糖体苷酶群和其微生物。

以下主要介绍本研究所研究过的产特异的配糖体苷酶的新微生物筛选以及分类鉴定、产酶发酵和酶学特性。

1 产特异的配糖体苷酶微生物的筛选

1.1 特异的中草药配糖体苷酶类

中草药配糖体种类甚多,其中皂苷类上千种,其他的黄酮、苯丙素、醌类、木脂素、低萜类等的苷类数量更多。数量繁多的中草药配糖体定向生物转化为活性高的次生物质的“中草药配糖体糖苷酶的酶学”必然涉及到如下的特异性:

1) 中草药配糖体糖苷酶类对配糖体苷元种类的选择性:对皂苷、黄酮、苯丙素、醌类、木脂素、低萜类等的苷类的苷元的选择性;对皂苷而言,对四环三萜皂苷的羊毛脂烷型、大戟烷型、达玛烷型、葫芦素烷型、原萜烷型、楝烷型、环波罗密烷型等皂苷元选择性,对五环三萜皂苷的齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扁豆烷型、木栓烷型、羊齿或异羊齿烷型、何帕或异何帕烷型等苷元的选择性;对甾醇皂苷的27个碳的螺甾皂苷和呋甾皂苷、21~24个碳的强心苷元的选择性等。

2) 中草药配糖体糖苷酶类对配糖体的糖基(葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、夫糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸)种类的选择性。

3) 中草药配糖体糖苷酶类对糖基在苷元上(1-O-、3-O-、6-O-、18-O-、20-O-、22-O-、24-O-、25-O-等)位置的选择性。

4) 中草药配糖体糖苷酶类对配糖体的醇苷和酯苷、 α -、 β -1,4或1,2或1,3或1,5苷键等糖苷键键种类的选择性。

因此,上万种的中草药配糖体中,选择一种定向改变其糖基制备高活性次生物质,需要开发大批的对苷元种类、糖基种类、糖基位置、糖苷键种类特异选择性的、数量繁多的配糖体苷酶群;也需要开发大批的产特异的中草药配糖体糖苷酶群的微生物。下面介绍作者团队部分对中草药配糖体糖苷酶和微生物的研究工作。

1.2 产特异的配糖体苷酶微生物的筛选

笔者在日本的堆肥、温泉等分离筛选了高温厌氧的纤维素分解菌,经分类鉴定^[6],该菌为 *Clostridium* 属(Genus)中的新的一种,命名为高温堆肥梭状芽孢杆菌 *Clostridium thermocopriae*^[7-8]。又从中国酱香型白酒的高温大曲中分离筛选了高温好氧的产耐高温 α -淀粉酶的新菌,该菌进行分类鉴定,是 *Bacillus* 属中的新的一种,暂命名为 *Bacillus* sp. JF 菌^[9]。这些新菌改变发酵条件,加入产酶诱导物等,可以发酵产人参、薯蓣等皂苷糖苷酶,也可以发酵产黄酮类苷酶。

为了得到一批产特异的配糖体苷酶的新微生物,本课题组与韩国 KAIST(Korea Advanced Institute of Science and Technology)李承宅教授和林完泽博士,共同研究了我国吉林省抚松与辽宁新宾人参土壤、韩国土壤中筛选特异的配糖体苷酶微生物,并研究了新微生物的初步分类鉴定、产特异酶的发酵。在该研究过程中,采用低营养、长时间培养的方法筛选新菌。方法如下:含2%琼脂低营养培养基中,将土壤样品稀释、涂铺在培养皿的固体培养基上,培养1~3个月。并对每一个菌落重新分离单菌落、测定其16S rRNA的基因序列,与GenBank库中所登录的已知菌比较,结果发现:与已知菌的16S rRNA的基因序列相似度90%以下有25种,90%~95%的有43种,90%~97%的有50种,97%~98%的有35种,98%~98.5%的有14种,98.5%~99%的有7种,90%以上的有28种。

对新菌进行了分类鉴定,其中部分鉴定结果如下,从吉林抚松产白山人参的土壤中分离的菌的16S rRNA基因序列与红色杆菌 *Rubrobacteraceae* 科的菌相比较,与 *Conexibacter woesei* 菌相似度为

93.8%, 与 *Solirubrobacter pauli* 相似度为 92.4%, 与 *Patulibacter minatonensis* 菌相似度为 91.5%; 是 Rubrobacteraceae 科中的新的属和种, 定名为 *Baekduia soli* gen. nov., sp. nov. 从韩国人参土壤中分离的菌的 16S rRNA 基因序列与 *Emticicia oligotrophica* 相似度为 94.6%, 定名为 *Emticicia ginsengisoli* sp. nov.^[10]; 与 *Spirosoma rigui* 相似度为 91.8%, 定名为 *Spirosoma panaciterrae* sp. nov.^[11]。另外, 新筛选的菌 16S rRNA 基因序列与基因库 (GenBank) 中的已知菌比较, 经鉴定属于 *Hymenobacter* 属的新种, 定名为 *Hymenobacter daecheongensis* sp. nov.^[12]。

上述很多新菌经发酵优化可以生产水解人参、薯蓣和柴胡皂苷等皂苷糖苷酶和淫羊藿苷等特异的中草药配糖体苷酶。

2 特异的中草药配糖体苷酶的发酵

中草药配糖体与多糖类不同, 配糖体分子中具有非糖基部分; 尤其皂苷类的配基部分 30 个碳疏水基团, 因此配糖体苷酶发酵肯定具有与糖类糖苷酶发酵不同的特异性。

2.1 纤维素或淀粉酶菌产特异的中草药配糖体苷酶

作者团队研究了产纤维素的 *Clostridium thermocopriae*^[7-8] 菌、产淀粉酶的 *Bacillus* sp. JF 菌^[9]、产淀粉酶的霉菌^[13]等, 研究发酵产人参、薯蓣、柴胡等皂苷糖苷酶。结果发现上述菌在生产纤维素酶或者淀粉酶发酵条件下几乎不产人参等皂苷糖苷酶; 只有在培养温度接近极限、碳源和氮源极端贫乏、极端恶劣发酵条件下才产生皂苷糖苷酶。

2.2 上述新筛选菌发酵产配糖体苷酶

选出上述 20 种生成高活性配糖体苷酶的菌株, 研究了发酵产特异的中草药苷类酶, 发现其产酶发酵受温度和培养基成分的影响。例如, 如果在培养基(含蛋白胨和酵母膏和氯化钠)中加入不同的诱导物, 细菌 *Arthrobacter* sp. 3、*Rhodanobacter* sp. 14、*Rhodospseudomonas* sp. 18 生成不同的柴胡皂苷、淫羊藿苷等中草药苷类酶。如果培养基中蛋白胨和酵

母膏含量超过 5%, 很难产中草药苷类酶。

上述菌产酶也受到温度的影响: 培养基中含人参皂苷、发酵温度为 25°C 时, 主要产酶可以水解人参二醇类皂苷(Rb₁、Rb₂、Rc)生成 Rd 和 Rg₃; 当发酵温度为 35°C 时, 主要产酶可以水解人参二醇类皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc 生成 Rd、F₂ 和 C-K。因此, 新细菌发酵产特异的配糖体苷酶是底物诱导和温度偶联的^[14-16]。

由此得知, 特异的中草药配糖体苷酶, 在普通糖苷酶、蛋白酶发酵条件下很难产生, 尤其是皂苷酶, 只有在极端恶劣的特定发酵条件下才产酶。另外, 发酵产特异的中草药配糖体苷酶是底物诱导和温度偶联的。

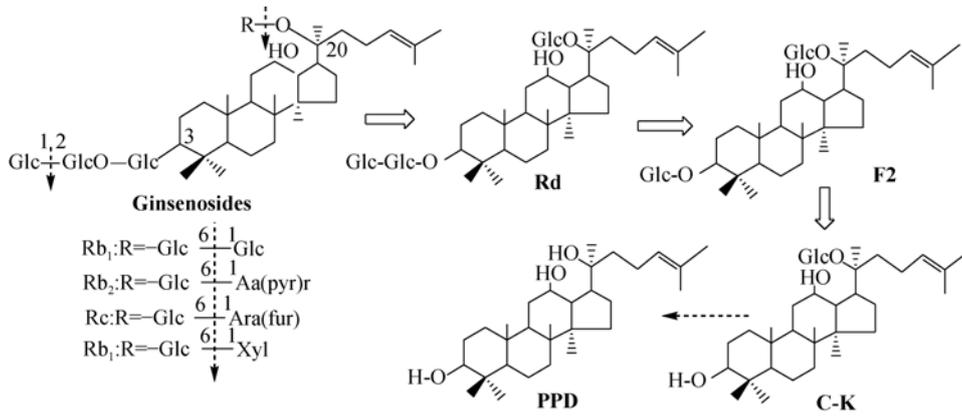
3 特异的配糖体苷酶学特性

生物转化是改变中草药成分——配糖体等天然产物、制备高活性物质的最有效方法之一。其主要优点包括: 特异酶反应选择性高, 可以限制性地改变基团, 目的产物明确; 可以把中草药中基本骨架结构相同、但是个别基团不同的一类化合物, 转变成结构相同的化合物; 克服了植物细胞培养法目的性和专一性很差的问题; 酶反应条件温和, 无污染, 副反应少, 克服酸碱反应的污染和副反应的问题; 有利于新药物、功能食品和化妆品的开发与质量管理, 解决化学法污染, 尤其解决化学法很难达到的、复杂结构皂苷类基团的改变。

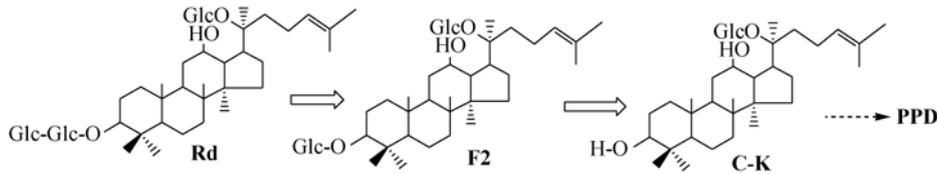
本研究室从微生物培养物和植物提取物中发现了如下 4 种人参皂苷糖苷酶^[17-20]。

3.1 人参皂苷糖苷酶 I 型

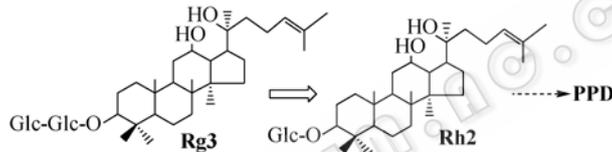
与二醇类皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 反应, 水解人参皂苷人参二醇类皂苷的 20-O-上的-(1→6)-葡萄糖苷键、-(1→6)-阿拉伯糖苷键、-(1→6)-木糖苷键和 3-O-上的-(1→2)-葡萄糖苷键, 生成 Rd; Rd 继续水解成 F₂, F₂ 进一步水解成 C-K; C-K 微量地进一步水解成皂苷元(PPD); 与二醇类皂苷 Rd 反应, 生成 F₂ 和 C-K; 与 Rg₃ 反应主要生成 Rh₂; 人参皂苷糖苷酶 I 型与二醇类皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc 反应为:



人参皂苷糖苷酶 I 型与人参皂苷 Rd 反应为:



人参皂苷糖苷酶 I 型与 Rg3 反应为:



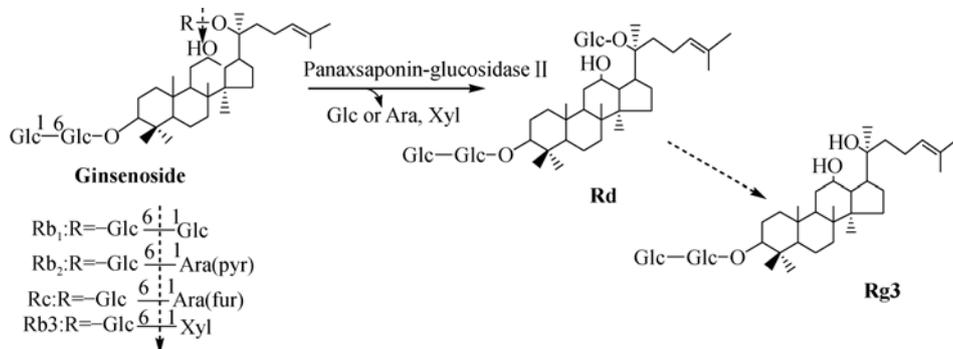
由此可见, 人参皂苷糖苷酶 I 型与人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 反应, 主要生成 Rd、F2、C-K; 与人参皂苷 Rd 反应主要生成 F2 和 C-K; 与人参皂苷 Rg3 反应生成 Rh2; 反应时间长, 会少量生成苷元; 是能水解人参二醇类皂苷多种糖基的酶。

3.2 人参皂苷糖苷酶 II 型

与人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 反应, 与人参皂苷糖苷酶 I 性不同, 不水解 3-O-上的糖基, 只

水解人参皂苷分子 20-O-上的β-(1 6)-葡萄糖苷键、α-(1 6)-阿拉伯糖苷键、β-(1 6)-木糖苷键, 主要生成 Rd, Rd 进一步水解成 Rg3 皂苷(见下图)。

真菌的人参皂苷糖苷酶 II 型与人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 反应, 主要产物 Rd、Rg3 的生成量非常少^[21], 但是细菌来源的人参皂苷糖苷酶 II 型与人参二醇类皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc 反应, 生成 Rd, 进一步转化为人参皂苷 Rg3, 可用于 20(S)-Rg3 的制备。



Cheng 等^[22]发现来源于 *Microbacterium esteraromaticum* 菌^[22-23]的酶, 可以水解人参三醇类皂苷 Re 和 Rg1 的 20-O-糖基, 生成人参皂苷 Rg2 和 Rh1。

3.3 人参皂苷糖苷酶 III 型

与 Rd 等人参二醇类皂苷反应, 该酶水解人参皂苷 Rd 第 3 碳上的皂苷原核糖之间的糖苷键, 生成 C-K 或者 3-O-OH 的人参二醇类皂苷。

3.4 人参皂苷酶 IV 型

可以水解人参三醇类皂苷 Re、Rg2 的第 6-O-上的 α -(1-2)-鼠李糖苷键, 生成 Rg1 和 Rh1, 或者能水解人参皂苷 Rf 的 β -(1-2)-葡萄糖苷键, 生成 Rg1。

由此可知: 人参皂苷酶对苷元选择性高, 在皂苷分子上糖基位置选择性高, 对糖基种类选择性低, 水解多种糖基, 不同于传统的糖苷酶。例如, 人参皂苷酶 I 能水解人参原二醇类皂苷的 3-O-和 20-O-的葡萄糖基、木糖基和阿拉伯糖基, 能水解 1-2、1-3、1-4、1-6 等糖苷键; 人参皂苷酶 II 能水解人参原二醇类皂苷的 20-O-的葡萄糖基、木糖基和阿拉伯糖基, 不能水解 3-O-糖基; 两种酶不能水解人参原三醇类皂苷的糖基。

本研究室分离提纯了特异的白头翁、朱砂根、柴胡、黄芪、薯蓣、麦冬、虎眼万年青的皂苷酶; 也分离提纯了淫羊藿、芦丁、黄芩、异黄酮的苷酶; 研究了其酶特性和发酵产酶特性^[24-26]。本实验室已建立用特异酶转化的天然活性物质的工业化分离提纯方法, 制备数十种产物, 正开发其功能食品和化妆品。

4 结束语

配糖体是中草药的最主要有效成分之一: 中草药配糖体中皂苷类上千种, 其他苷类数量更多。中草药成分与化学药的最大区别在于: 化学药物口服后直接吸收、起药效; 但中草药成分口服后、在消化系统酶和微生物的作用下转化为另一种结构、吸收、起药效; 体内的这种转化很微弱, 往往受到人的个体条件的影响。

如果可以在体外将中草药配糖体转化为高活性的次生产物, 对中药、新药物的发现、食品和化妆

品的开发等意义重大。但是, 中草药配糖体种类甚多, 利用一种特定配糖体酶定向转化生产高活性物质, 必须筛选对该配糖体苷元、糖基种类、糖基结合位置、糖苷键种类等特异选择性的特异酶, 现有的酶无法解决。因此需要开发大批的对苷元种类、糖基种类、糖基位置、糖苷键种类特异选择性的配糖体苷酶群及其微生物。

本研究室只研究了几十种中草药配糖体的生物转化, 目前国内很多单位也在研究中草药成分的生物转化, 相信今后会出现更多的成果。

REFERENCES

- [1] Jin F, *et al.* Biotransformation of Natural Products. Beijing: Chemical Industry Press, 2009: 6-32.
金凤燮, 等著. 天然产物生物转化. 北京: 化学工业出版社, 2009: 6-32.
- [2] Kanaoka M, Okao T, Kobashi K. Metabolism of ginseng saponins, glycosides, by human intestinal flora. *J Trad Med*, 1994, **11**: 241-245.
- [3] Bae EA, Park SY, Kim DH. Constitutive β -glucosidase hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Bio Pharm Bull*, 2000, **23**: 1481-1485.
- [4] Ko SR, Choi KJ, Suzuki Y. Enzymatic preparation of ginsenoside Rg2, Rh1, and F1. *Chem Pharm Bull*, 2003, **51**: 404-408.
- [5] Kobashi K. Glycosides are natural prodrugs. *J Trad Med*, 1998, **15**: 1-13.
- [6] Ishihara M, Homma M, Kuno E, *et al.* Combination use of Kampo-medicines and drugs affecting intestinal flore. *Yakugaku Zasshi*, 2002, **122**: 695-701.
- [7] Jin F, Toda K. Purification and characterization of cellulase from *Clostridium thermocopriae* sp. nov. JT3-3. *J Ferment Bioeng*, 1988, **67**: 8-13.
- [8] Jin F, Yamasato K, Toda K. *Clostridium thermocopriae* sp. nov., a cellulolytic thermophile from animal feces, compost, soil, and a hot spring in Japan. *Int J Syst Bact*, 1988, **38**: 279-281.
- [9] Jin F, Cheng X, Shi Y, *et al.* Isolation of new thermophilic aerobic bacteria which produce thermostable α -amylase. *J Gen Appl Microbial*, 1990, **36**: 415-424.
- [10] Liu QM, Leonid NT, Yu H, *et al.* *Emticicia ginsengisoli* sp. nov., a species of the family 'Flexibacteraceae' isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**: 1100-1105.
- [11] Leonid NT, Xu J, Jin F, *et al.* *Spirosoma panaciterrae* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59**: 331-335.

- [12] Xu J, Im WT, Liu QM, *et al.* *Hymenobacter daecheongensis* sp. nov., isolated from stream sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59**: 1183–1187.
- [13] Yu H, Wu S, Guo Y, *et al.* Purification and characterization of ginsenoside β -glucosidase. *J Ginseng Res*, 1999, **23**: 50–54.
- [14] Wang L, Yu XX, Yu HS, *et al.* Transformation of protopanaxadiol saponin to compound-K. *J Dalian Polytech Univ*, 2008, **27**(1): 22–25.
王亮, 于小溪, 鱼红闪, 等. 人参二醇类皂苷转化成 C-K 细菌的研究. 大连工业大学学报, 2008, **27**: 22–25.
- [15] Shao W, Jin FX, Yu HS. Production and characterization of ginsenoside- β -glucosidase from bacteria GS0202. *J Dalian Polytech Univ*, 2008, **27**(1): 30–33.
邵巍, 金凤婵, 鱼红闪. GS0202 菌产人参皂苷- β -葡萄糖苷酶条件及其酶反应条件. 大连工业大学学报, 2008, **27**: 30–33.
- [16] Yu XX, Jiang XY, Wang Y, *et al.* Ginsenosidase transforming protopanaxadiol type saponin to ginsenoside by different bacteria. *J Dalian Polytech Univ*, 2008, **27**(2): 97–101.
于小溪, 姜晓野, 王岩, 等. 把人参二醇类皂苷转化为 Rg3 的特种人参皂苷糖苷酶生成的细菌筛选. 大连工业大学学报, 2008, **27**: 97–101.
- [17] Yu H, Zhang C, Liu N, *et al.* Purification and characterization of ginsenosidase hydrolyzing multi-glycosides of protopanaxadiol ginsenoside, ginsenoside Type I. *Chem Pharm Bull*, 2007, **55**: 231–235.
- [18] Yu H, Liu H, Zhang C, *et al.* Purification and characterization of gypenoside- α -L-rhamnosidase hydrolyzing gypenoside-5 into ginsenoside Rd. *Proc Biochem*, 2004, **39**: 861–867.
- [19] Zhang C, Yu H, Bao Y, *et al.* Purification and characterization of ginsenoside- β -glucosidase from ginseng. *Chem Pharm Bull*, 2001, **49**: 795–798.
- [20] Zhang C, Yu H, Bao Y, *et al.* Purification and characterization of ginsenoside- α -arabiofuranase hydrolyzing ginsenoside R_c into R_d from the fresh root of *Panax ginseng*. *Proc Biochem*, 2002, **37**: 793–798.
- [21] Yu H, Liu Q, Zhang C, *et al.* A new ginsenosidase from *Aspergillus* strain hydrolyzing 20-O-multi-glycoside of PPD ginsenoside. *Proc Biochem*, 2009, **44**: 772–775.
- [22] Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, *et al.* Conversion of major ginsenoside R_{b1} to ginsenoside F₂ by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 1121–1127.
- [23] Cheng LQ, Na JR, Bang MH, *et al.* Conversion of major ginsenoside R_{b1} to 20(S)-ginsenoside R_{g3} by *Microbacterium* sp. GS514. *Phytochemistry*, 2008, **69**: 218–224.
- [24] Zhang C, Yu H, Lu M, *et al.* Enzyme synthesis of salidoside: purification and characterization of salidosidase from *Aspergillus niger*. *Proc Biochem*, 2005, **40**: 3143–3147.
- [25] Qian S, Yu H, Zhang C, *et al.* Purification and characterization of dioscin- α -L-rhamnosidase from pig liver. *Chem Pharm Bull*, 2005, **53**: 934–937.
- [26] Zhang C, Li D, Yu H, *et al.* Purification and characterization of picied- β -D-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Proc Biochem*, 2007, **42**: 83–88.