

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.11.003

# 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶洋虫内共生真菌筛选、鉴定及联合转化人参皂苷作用机制

Screening and identification of two strains of  $\beta$ -glucosidase producing symbiotic fungi in *Martianus dermestoides* and the mechanism of combined transformation of ginsenoside

房柳 王艳成 姬文秀 董微巍

FANG Liu WANG Yan-cheng JI Wen-xiu DONG Wei-wei

(延边大学农学院, 吉林 延吉 133000)

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

**摘要:** 筛选、鉴定出洋虫成虫体内两株产  $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌, 两菌株联合发酵提高稀有皂苷转化率和发酵品质, 对其动态发酵反应过程进行研究, 明确人参皂苷的转化机制。通过 MRS (七叶苷, 柠檬酸铁) 培养基筛选, 18S rRNA 基因扩增分别对两株产  $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌进行鉴定, 并与全组分人参皂苷发酵反应, 利用 LC-MS/MS 对发酵产物进行分析。经鉴定两株产  $\beta$ -葡萄糖苷酶分别属于 *Chaetomium* 和 *Aspergillus* 属; WY1 与人参主皂苷反应产物为 Rd 和 Rh1; WY2 与人参主皂苷反应产物为 Rd、Rh1、Rg3 和 compound K; WY1/WY2 双菌联合发酵有效提高了 Rh1、Rg3 和 compound K 的转化率, 其转化途径为  $Re \rightarrow Rg1 \rightarrow Rh1$ ;  $Rf \rightarrow Rh1$ ;  $Rb1/Rb2/Rc \rightarrow Rd \rightarrow Rg3$ /compound K, 人参二醇类皂苷比人参三醇类皂苷更容易被转化且大部分被转化为 Rg3。

**关键词:** 洋虫; 稀有人参皂苷; 发酵反应; 高效液相色谱质谱联用;  $\beta$ -葡萄糖苷酶

**Abstract:** Two strains of fungi producing  $\beta$ -glucosidase were screened and identified from *Martianus dermestoides*. The conversion of rare ginsenosides and fermentation quality were improved by combined fermentation of the two strains. The dynamic fermentation process was studied, and the mechanism of ginsenoside transformation was clarified. Screening was performed by MRS (aesculin, ferric citrate) medium. Two fungi producing  $\beta$ -

glucosidase were identified by 18S rRNA gene amplification. The strains were fermented with total ginsenoside, the fermentation products were analyzed by LC-MS/MS. Two fungi producing  $\beta$ -glucosidase were identified as genus *Chaetomium* and *Aspergillus* respectively. The fermentation products of WY1 reacted with total ginsenosides were Rd and Rh1. The fermentation products of WY2 reacted with total ginsenosides were Rd, Rh1, Rg3 and compound K. The conversion rates of Rh1, Rg3 and compound K were improved by WY1/WY2 combined fermentation. The transformation path was  $Re \rightarrow Rg1 \rightarrow Rh1$ ;  $Rf \rightarrow Rh1$ ;  $Rb1/Rb2/Rc \rightarrow Rd \rightarrow Rg3$ /compound K. Protopanaxadiol-type ginsenosides were more easily converted than protopanaxatriol-type ginsenosides and most of the products are Rg3.

**Keywords:** *Martianus dermestoides*; rare ginsenosides; fermentation reaction; LC-MS/MS;  $\beta$ -glucosidase

人参(*Panax ginseng* C.A.Meyer), 素有“百草之王”之美称, 是中国中医药宝库中的瑰宝, 也是吉林省得天独厚的特产资源, 目前已有 3 000 多年的应用历史<sup>[1]</sup>。由于人参具有免疫调节、抗癌、抗氧化、治疗糖尿病和抗炎等药理活性<sup>[2-6]</sup>。经过多年来的产业培育, 人参开始走出中药柜, 被作为主要活性成分添加到食品、保健品之中, 用来提高其产品功能性。人参皂苷是人参的主要活性成分, 主要包括 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2 和 Rd 等人参皂苷和一些含量甚微的 Rg3、compound K、Rh1、Rh2、Rh3 等稀有人参皂苷, 不同种类的人参皂苷具有不同的药理活性。研究<sup>[7]</sup>表明, 人参皂苷经水解(脱糖基)作用脱去糖基, 转化为稀有人参皂苷, 稀有人参皂苷所含糖基少, 生物利用度和药理活性高。孙广仁等<sup>[8]</sup>开发了一种多菌种发酵人参酒, 人参酒发酵产生稀有皂苷提高了其功能

**基金项目:** 吉林省教育厅“十三五”规划科研项目(编号: JJKH20191131KJ, JJKH20200518KJ)

**作者简介:** 房柳, 女, 延边大学在读硕士研究生。

**通信作者:** 董微巍(1979—), 女, 延边大学副教授, 硕士生导师, 博士。E-mail: wwdong@ybu.edu.cn  
姬文秀(1980—), 女, 延边大学讲师, 硕士生导师, 博士。E-mail: jwxlyq@ybu.edu.cn

**收稿日期:** 2020-08-01

性,改善了人参酒风味。蔡爽<sup>[9]</sup>开发了一种人参皂苷转化,具有缓解非溃疡性消化不良的功效。筛选有利于人参发酵、高效转化人参皂苷的功能菌株,提高人参产品功能性,体外合成稀有人参皂苷已成为国内外学者们所关注的焦点<sup>[10-12]</sup>。

昆虫体内共生菌生存环境独特,积累着大量具有特殊生理活性和功能的物质,也是人们发现微生物新物种和制备较好生物活性代谢产物的重要来源。目前多利用昆虫共生菌中纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶等分解纤维素、木质素、制备生物农药等研究<sup>[13]</sup>,对开发利用昆虫共生功能菌改性中草药活性的研究报道很少。利用昆虫内生菌资源发酵改性中草药提高其功能与活性,为中草药及其功能产品发酵提供微生物资源目前已日益被关注。Wang等<sup>[14]</sup>利用冬虫夏草中真菌高效转化人参皂苷 Rb1→Rd→F2→compound K,转化率高达82%,制得 compound K 纯度高达91%。冬虫夏草是中国青藏高原特有的名贵药材,其资源稀少,价格昂贵,限制了它的广泛使用<sup>[15]</sup>。药用昆虫洋虫(*Martianus dermestoides*)主要以中药人参、茯苓、红花等为食,根据其习性推测洋虫体内具有降解人参皂苷功能菌株。前期课题组成员<sup>[16]</sup>对洋虫幼虫和成虫内生菌组成结构进行了系统分析,结果表明,洋虫内不可培养的和未被分类的菌种占一定的比例,洋虫体内共生菌是庞大的动态微生物寄居场所,是有待开发的生物资源。试验拟利用动物药洋虫内特殊生境的微生物进行产 $\beta$ -葡萄糖苷酶功能菌株筛选、鉴定,并与植物药人参中全组分人参皂苷发酵反应制备人参稀有皂苷(Rg3、Rh1和compound K),以期改善人参生物利用度。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

洋虫:延边大学植物保护实验室;

鲜人参根(4年生植物):吉林集安;

正丁醇、甲醇、无水乙醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

PCR相关试剂:美国 Genview 公司;

色谱级乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)和去离子水:色谱级,美国费希尔科学世界公司;

人参皂苷标准品(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rh1、Rg2、Rg3、F1和compound K):国家标准物质网;

真菌DNA提取试剂盒:上海生工生物工程有限公司;

PCR扩增仪:2720-Thermal-Cycler型,美国应用生物系统公司;

高效液相色谱仪:Agilent1260LC型,安捷伦科技有限公司;

电子天平:YP600型,天津天马横基仪器有限公司;

离心沉淀器:80-2型,天津赛得利实验仪器分析制造厂;

旋转蒸发仪:RE-52A型,上海亚荣生化仪器厂;

恒温水浴锅:HH-S8A型,上海仪器仪表科技有限公司。

### 1.2 人参皂苷提取物

取新鲜人参根(4年生植物)样品干燥并粉碎,取10g粉末在82℃下用1000mL80%乙醇回流冷凝2h,反复两次,合并萃取液,减压浓缩后在50℃的烘箱中烘干,制备人参皂苷粗提取物<sup>[17]</sup>。

### 1.3 洋虫内共生菌液制备

1.3.1 洋虫的饲养与驯化 按照80%红枣和20%人参的比例混合饲料饲养驯化洋虫,在30cm×20cm×10cm培养箱中保持(24±2)℃的温度,培养1年。每批幼虫培养15d左右,装入昆虫培养箱,保持幼虫和成虫的适当密度,便于连续取食,保持种群的稳定。

1.3.2 洋虫内共生菌液制备 取洋虫成虫15只,置于75%乙醇中90s,用无菌水反复冲洗,在无菌操作台用研钵研磨,加极少量蒸馏水移至离心管;先以500r/min离心5min,取出上清液,再以10000r/min离心5min,取下方沉淀,加入生理盐水制备洋虫内共生菌液。

### 1.4 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选与鉴定

1.4.1 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选 利用10倍稀释法逐级稀释菌液,然后取100 $\mu$ L洋虫菌液加到MRS筛选培养基(加入七叶苷、柠檬酸铁)上,采用涂布平板法将菌液在培养基上涂布均匀,密封,厌氧条件下恒温培养箱中倒置培养72h,观察其生长状况。挑选菌落呈黑色且边缘整齐的单一菌落,利用划线法将其接种到新的培养基上,多次重复直至得到单一菌株。从中挑选两株生长状态良好且菌落颜色较深的菌株进行后续试验<sup>[18]</sup>。

1.4.2 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶功能菌株的鉴定 DP336试剂盒提取基因组DNA,序列通用引物(ITS1:5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3';ITS4:5-TCCTCCG CTTATT-GATATGC-3')进行PCR扩增,PCR产物的测序工作由北京百迈客有限公司完成。

### 1.5 菌液与人参皂苷提取物发酵反应

取4mg人参皂苷粗提取物,加入500 $\mu$ L菌液至2mL离心管中,在85% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>的厌氧条件下,将筛选出的菌株以及二者的混合菌株富集培养24h,取人参皂苷与菌液反应20d,采用高效液相色谱质谱联用仪(LC-MS/MS)对不同发酵时间(0,1,2,3,7,12,20d)下的生物转化产物进行研究。

### 1.6 LC-MS/MS分析产物

发酵产物经饱和正丁醇3倍体积萃取,以5000r/min离心5min,取上清液,反复3次;将萃取出的菌液旋转蒸发至膏状,加入100 $\mu$ L液相甲醇,移至液相小瓶,LC-MS/MS分析。安捷伦1260系列液相色谱系统与安捷伦Poroshell ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(4.6mm×250mm,5 $\mu$ m)

和 C<sub>18</sub> 保护柱对其进行检测分析。该系统使用 Mass Hunter 采集软件 B.07.00 进行操作。流动相由水(0.1% 甲酸, 溶剂 A)和乙腈(0.1% 甲酸, 溶剂 B)组成, 采用以下梯度洗脱程序: 0~13 min, 0%~23% B; 13~33 min, 23%~46% B; 33~38 min, 46%~68% B; 38~45 min, 68%~68% B; 45~55 min, 68%~100% B。进样量 2 μL, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 203 nm。

利用安捷伦 6420 型三重四极质谱仪(QQQ-MS)对化合物进行质谱分析。采用正电喷雾离子化(ESI)MS-MS 对人参皂苷的代谢产物进行分析。毛细管电压为 4 000 V, 气体以 3 L/min 的速度流动, 气体温度为 300 °C。获得了  $m/z$  500~1 500 质量范围内的全扫描质谱图。通过测定发酵产物中  $[M+Na]^+$  或  $[M-2H_2O+OH]^+$  离子片段质量来确定人参皂苷含量。

### 1.7 方法验证

定量分析采用外标法。制备含有 12 种人参皂苷标准物质溶液, 并稀释至适当浓度, 以绘制标准曲线。通过绘制峰面积与各分析物浓度之间的关系, 得到校正曲线。在色谱条件下, 以信噪比  $S/N=3$  为检测限(LOD)、 $S/N=10$  为定量限(LOQ)为原则, 计算 12 个目标分析物的检测限和定量限。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的鉴定

利用七叶苷显色原理, 即七叶苷被 β-葡萄糖苷酶水解后生成的 6,7-二羟香豆素也叫七叶苷元, 与铁离子反应, 使培养基内的菌落周围生成黑褐色物质, 从洋虫成虫 10 个菌液样品体内筛选出 2 株具有产生 β-葡萄糖苷酶的功能真菌, 编号为 WY1、WY2, 经 18S rRNA 基因扩增分别对两株产 β-葡萄糖苷酶真菌进行鉴定。洋虫内生真菌 WY1 经 PCR 扩增后获得 1 条 558 bp 左右的特异性条带, WY2 经 PCR 扩增后获得 1 条 598 bp 左右的特异性条带, 将序列提交至 NCBI 数据库, 通过 Blast 搜索与所得到的序列相似性高的序列, 并通过软件 CLUSTALX 1.83 和 MEGA 7.00 构建系统发育树(见图 1)。

通过系统发育树分析结果表明, WY1 序列与菌株 *Chaetomium globosum* 相似度达 98%, 定性该菌株为 *Chaetomium* 属, WY2 序列与菌株 *Aspergillus fumigatus* 相似度达 93%, 初步定性该菌株为 *Aspergillus* 属。

### 2.2 菌株与人参皂苷发酵反应

2.2.1 定量方法验证 对一定浓度范围内的人参皂苷标准品线性校准曲线进行分析, 并进行线性回归计算, 按 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算方法分别确定检出限和定量限, 参数与结果见表 1。

如表 1 所示, 在质量浓度 50~5 000 ng/mL 范围内, 相关系数均大于 0.992, 所有分析物的浓度与峰面积呈良好的线性关系, 可以满足 12 种人参皂苷标准化合物检测

计算要求。

### 2.2.2 内生菌 WY1 与人参皂苷提取液发酵产物分析

利用内生菌 WY1 对人参皂苷提取液进行生物转化, 通过 HPLC-MS/MS 对发酵产物中人参皂苷进行定性分析, 检测结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 在人参粗提液中共有 7 种人参皂苷(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2、Rd)在 WY1 作用下, 发酵产物为稀有人参皂苷 Rh1。

定量分析了人参皂苷在 WY1 菌液作用下动态发酵过程发酵产物中人参皂苷的变化趋势, 如图 3 所示。人参皂苷(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2)含量随着与 WY1 菌液的发酵反应时间增长而逐渐减少, 而人参皂苷 Rd 含量呈先减少后升高的变化趋势。代谢初期 Rd 被水解转化, 在 0~5 d 其含量随着时间变化而逐渐减少, 但是, 由于二醇类人参皂苷 Rb1、Rc、Rb2 在发酵反应过程中水解掉 C-20 位外部糖基转化被转化生成 Rd, 在 5~20 d 其含量又呈升高趋势, 所以在 WY1 作用下转化途径是 Rb1/Rb2/Rc→Rd。稀有人参皂苷 Rh1 是三醇类人参皂苷(Rg1、Re、Rf)主要发酵产物, 其可能由于在 WY1 作用下人参皂苷 Re 水解掉 C-6 位外部糖基转化为人参皂苷 Rg1, 人参皂苷 Rg1 水解掉 C-6 位外部糖基转化为人参皂苷 Rh1; Rf 水解掉 C-6 位外部糖基直接转化为 Rh1, 其转化途径为 Re→Rg1→Rh1; Rf→Rh1, 为此, 随着发酵反应进行人参皂苷 Rh1 含量逐渐升高。目前, 稀有人参皂苷 Rh1 主要是通过合成和转化的方法来获取, 其中微生物转化法具有反应体系稳定、菌种生长迅速且无需分离纯化酶液等优点, 受到众多研究者的青睐<sup>[19]</sup>, 试验从洋虫内

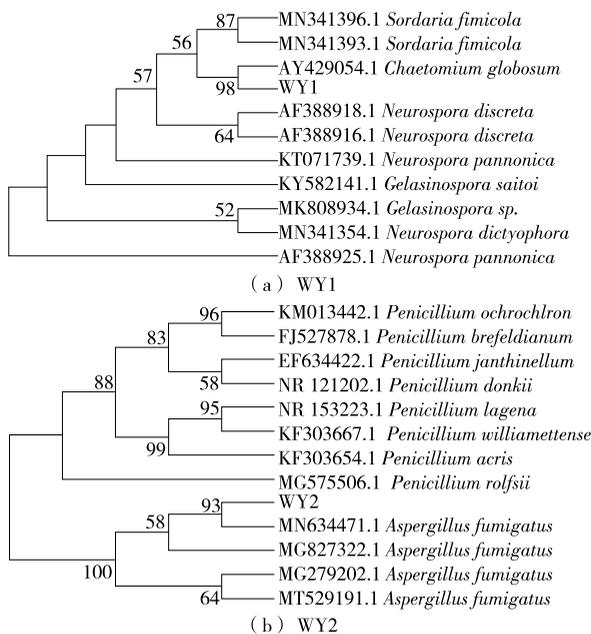


图 1 菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain WY1 and WY2

分离的 C. WY1 可以与人参总皂苷发生去糖基化反应, 将人参皂苷中二醇类皂苷转化为 Rd, 将三醇类皂苷生物转化为稀有皂苷 Rh1, 可为制备靶向制备 Rh1 发酵功能菌提供资源。

2.2.3 内生菌 WY2 与人参皂苷提取液发酵产物分析

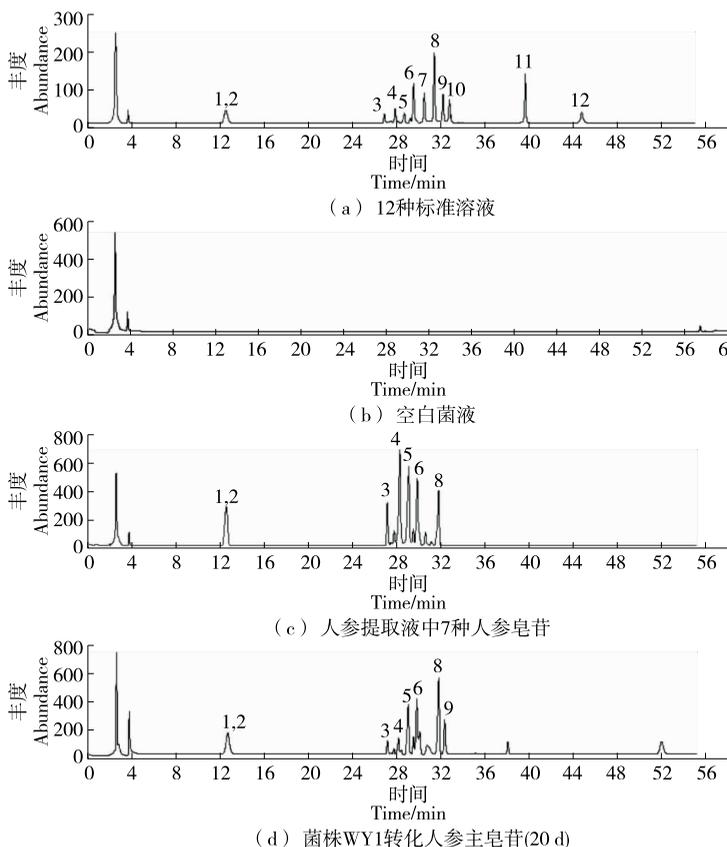
利用 HPLC-MS/MS 定性分析内生菌 WY2 对人参皂苷提取液发酵产物中的人参皂苷, 发酵反应总离子色谱图如图 4 所示。

由图 4 可知, 在人参粗提液中共有 7 种人参主皂苷 (Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2、Rd) 在 WY2 作用下, 发酵产

表 1 12 种人参皂苷的线性范围、回归方程、相关系数、检测限和定量限

Table 1 Validation of the LC-MS/MS method for the determination of ginsenosides; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation

| 化合物        | 回归方程              | 相关系数    | 线性范围/(ng · mL <sup>-1</sup> ) | 检测限/(ng · mL <sup>-1</sup> ) | 定量限/(ng · mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|-------------------|---------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Re         | y=0.268 1x-19.120 | 0.999 6 | 50~5 000                      | 8.62                         | 25.23                        |
| Rg1        | y=0.267 2x-17.130 | 0.999 9 | 50~5 000                      | 5.66                         | 15.78                        |
| Rf         | y=0.073 8x+1.714  | 0.999 5 | 50~5 000                      | 5.31                         | 15.12                        |
| Rb1        | y=0.144 4x+5.925  | 0.998 7 | 50~5 000                      | 13.23                        | 39.89                        |
| Rc         | y=0.129 9x+1.079  | 0.998 9 | 50~5 000                      | 16.35                        | 51.22                        |
| Rb2        | y=0.066 8x+5.686  | 0.994 6 | 50~5 000                      | 13.19                        | 40.55                        |
| Rg2        | y=0.269 9x-1.745  | 0.995 6 | 50~5 000                      | 5.77                         | 14.62                        |
| Rd         | y=0.087 1x+0.206  | 0.999 9 | 50~5 000                      | 3.38                         | 7.68                         |
| Rh1        | y=0.565 6x+3.899  | 0.998 4 | 50~5 000                      | 18.05                        | 50.52                        |
| F1         | y=0.456 1x+1.485  | 0.994 2 | 50~5 000                      | 8.46                         | 25.64                        |
| Rg3        | y=0.027 8x+0.951  | 0.995 3 | 50~5 000                      | 14.74                        | 45.85                        |
| compound K | y=0.888 1x-2.034  | 0.992 4 | 50~5 000                      | 6.55                         | 17.74                        |



1. Re 2. Rg1 3. Rf 4. Rb1 5. Rc 6. Rb2 7. Rg2 8. Rd 9. Rh1 10. F1 11. Rg3 12. compound K

图 2 菌株 WY1 转化人参主皂苷总离子色谱图

Figure 2 Chromatogram of ginsenoside transformed by strain WY1

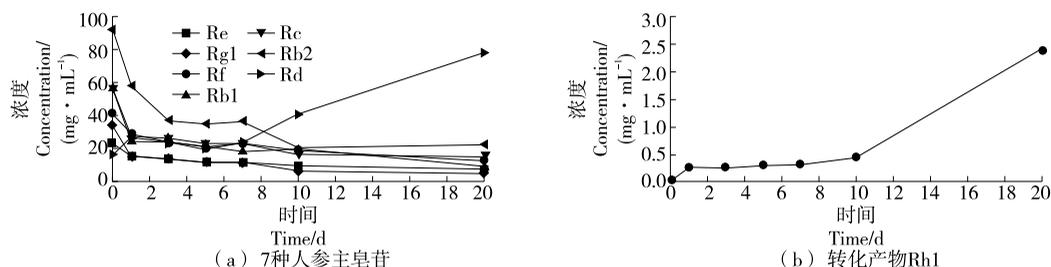


图 3 发酵过程中 7 种人参皂苷含量及其转化产物 Rh1 随时间变化曲线

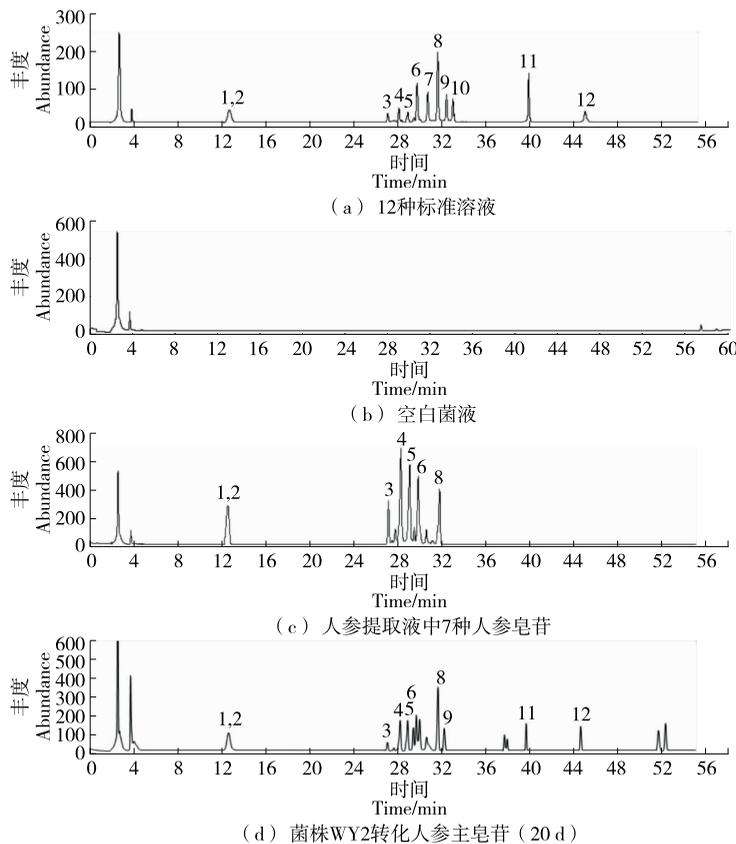
Figure 3 The variation curve of 7 main ginsenosides and the transformed product Rh1 with time during fermentation

物为稀有人参皂苷 Rh1、Rg3 和 compound K。定量分析了人参皂苷在 WY2 菌液作用下动态发酵过程发酵产物中人参皂苷的变化趋势,如图 5 所示。

WY2 菌液发酵人参皂苷(0, 1, 3, 5, 7, 10, 20 d)动态反应中,人参皂苷浓度—时间曲线如图 5(a)所示,人参皂苷(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2)含量随着与 WY2 菌液的发酵反应时间增长而逐渐减少,发酵第 3 天产生稀有人参皂苷 Rg3 和 compound K,其主要由于人参皂苷(Rb1、Rb2、Rc)水解掉 C-20 位外部糖基转化为人参皂苷 Rd, Rd 作为中间代谢产物水解掉 C-20 位糖基转化为人参皂苷 Rg3,水解掉 C-3 位糖基转化为 compound K,其转化途径为 Rb1/Rb2/Rc→Rd→Rg3/compound K,所以人

参皂苷 Rd 含量呈先减少后升高, Rg3 和 compound K 含量随着发酵反应时间增长而增加的变化趋势。同 2.3.1 人参皂苷 Rh1 是三醇类皂苷 Rg1、Re 和 Rf 的主要转化产物,随着发酵反应进行含量逐渐升高。

烟曲霉 WY2 属曲霉菌属,目前在微生物转化领域具有一定的应用前景,如马宗敏等<sup>[20]</sup>采用黑曲霉对薯蓣科植物黄山药根茎进行微生物转化,转化后得到了 4 个化合物,左明星等<sup>[21]</sup>利用烟曲霉 GZWMJZ-152 将茶粕中的山茶苷代谢,从发酵提取物中分离得到 5 个化合物,其曲霉菌属在发酵中草药植物中已具有较高的研究价值。试验利用洋虫内分离的烟曲霉 WY2 转化人参皂苷萃取液新增了 3 种活性皂苷化合物。



1. Re 2. Rg1 3. Rf 4. Rb1 5. Rc 6. Rb2 7. Rg2 8. Rd 9. Rh1 10. F1 11. Rg3 12. compound K

图 4 菌株 WY2 转化人参皂苷色谱图

Figure 4 Chromatogram of ginsenoside transformed by strain WY2

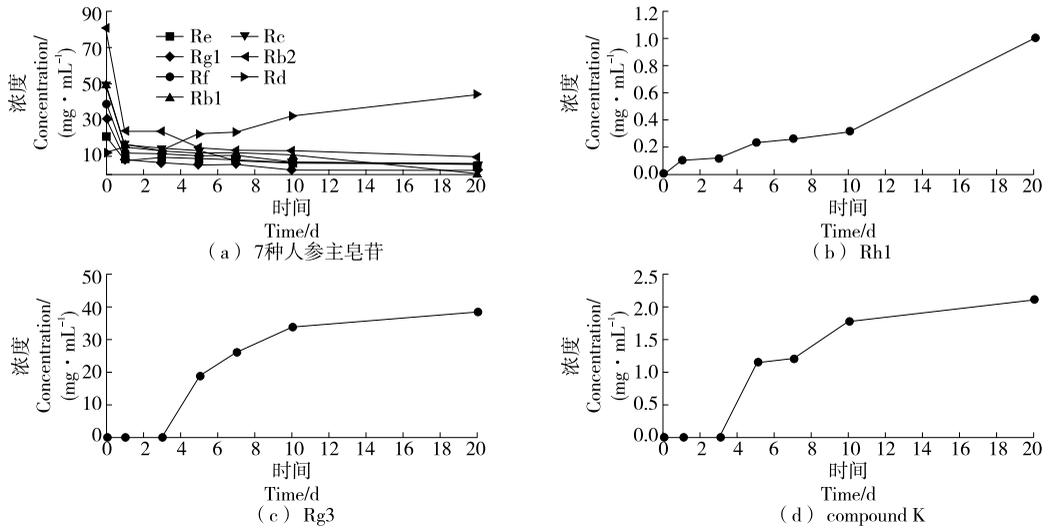


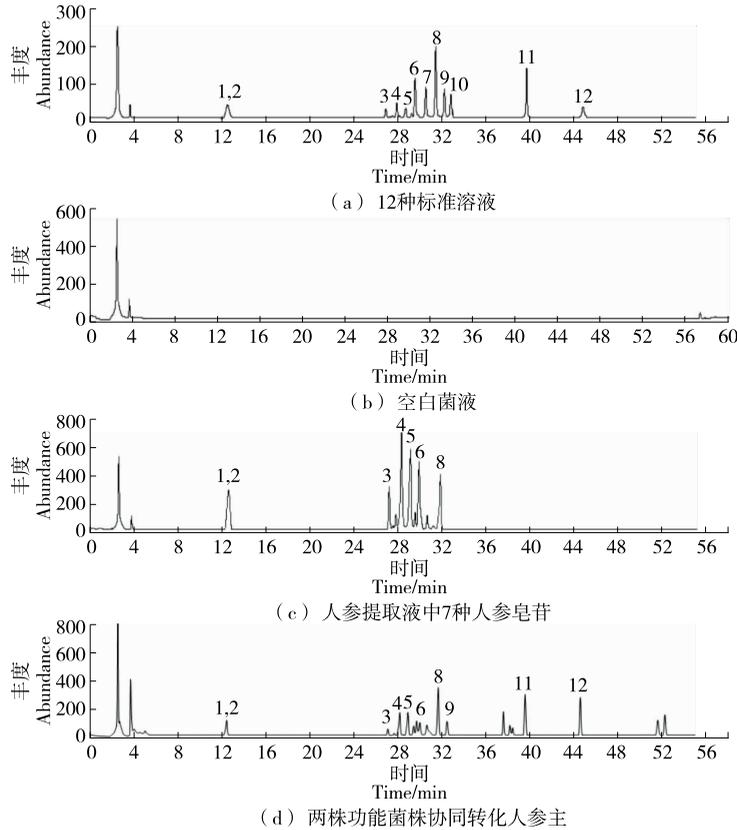
图 5 WY2 发酵 7 种人参主皂苷中发酵产物皂苷含量随时间变化曲线

Figure 5 The variation curve of ginsenosides with time during WY2 and 7 main ginsenosides fermentation

2.2.4 内生菌 WY1/WY2 联合发酵人参皂苷提取液产物分析 利用 HPLC-MS/MS 定性分析内生菌 WY1/WY2 两菌按 1 : 1 比例复合发酵人参皂苷,提取液产物中的人参皂苷,发酵反应总离子色谱图如图 6 所示。

由图 6 可知,人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2 在

联合菌剂作用下代谢转化的稀有人参皂苷分别为 Rh1、Rg3 和 compound K。WY1/WY2 联合菌剂发酵人参皂苷在(0,1,3,5,7,10,20 d)动态反应中定量分析了两株菌株联合发酵转化人参皂苷的反应产物,人参皂苷成分随时间变化曲线如图 7 所示。



1. Re 2. Rg1 3. Rf 4. Rb1 5. Rc 6. Rb2 7. Rg2 8. Rd 9. Rh1 10. F1 11. Rg3 12. compound K

图 6 两株功能菌株协同转化人参皂苷色谱图

Figure 6 Chromatogram of ginsenoside transformed by two functional strains

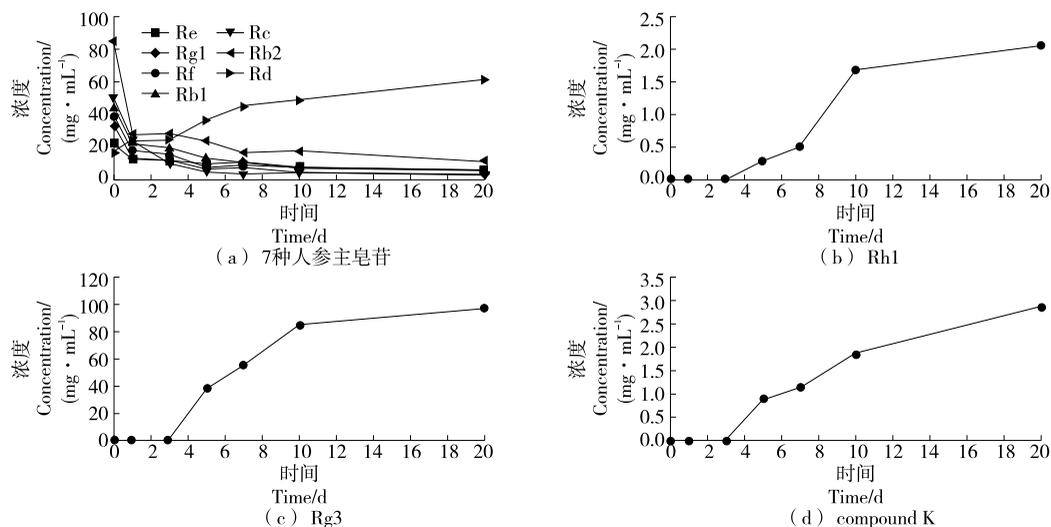


图 7 WY1/WY2 发酵 7 种人参皂苷中发酵产物中皂苷含量随时间变化曲线

Figure 7 The variation curve of ginsenosides with time during WY1/WY2 and 7 main ginsenosides fermentation

由图 7(a)可知,人参主皂苷(Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2)含量随着发酵反应时间增长逐渐减少,人参皂苷 Rd 因在 WY1/WY2 作用下发生水解反应,发酵初期因被水解而呈减少趋势,但由于二醇类主皂苷(Rb1、Rc 和 Rb2)在发酵过程中产生了人参皂苷 Rd,其含量在 3 d 后开始出现逐渐升高趋势。三醇类皂苷反应产物稀有人参皂苷 Rh1 在发酵第 1 天开始产生,随着发酵反应进行含量逐渐升高,在发酵第 3 天产生稀有人参皂苷 Rg3 和 compound K,其含量随着发酵反应时间增长而增加,转化机制同 2.3.2 所述。

微生物在生长发酵过程中会产生很多酶,具有强大的代谢能力,可以提高中药的有效成分含量。WY1/WY2 双菌联合发酵,可改善人参皂苷生物活性,与单一菌株相比可提高稀有人参皂苷 Rh1、Rg3 和 compound K 的转化效率。相关的研究<sup>[22]</sup>以及生产实践表明,使用多种菌株进行混合发酵制备的相关产品,与单一菌种发酵相比,具有更好的品质与效果,在试验的两种菌株作用下人参二醇类皂苷比人参三醇类皂苷更容易被转化,二醇类主皂苷大部分被转化为稀有人参皂苷 Rg3。

### 3 结论

筛选出两株洋虫体内共生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶真菌 *Chaetomium globosum* WY1 和 *Aspergillus fumigatus* WY2 及 WY1/WY2 联合菌剂分别与全组分人参皂苷发酵培养,通过比较 WY1/WY2 联合菌剂转化制备稀有人参皂苷 Rh1、Rg3 和 compound K 较为高效,转化途径为 Re→Rg1→Rh1; Rf→Rh1; Rb1/Rb2/Rc→Rd→Rg3/compound K。为了更好地提高人参皂苷的转化效率,该研究将继续对 WY1/WY2 联合菌剂的培养条件 pH、温度、培养基等进行优化。

### 参考文献

- [1] 逢世峰, 李亚丽, 许世泉, 等. 人参不同部位人参皂苷类成分研究[J]. 人参研究, 2015, 27(1): 5-8.
- [2] 吴晓民, 赵丹, 朱艳萍, 等. 人参多糖的药理作用与临床研究进展[J]. 人参研究, 2016, 28(5): 40-46.
- [3] JIN Xin, CHE Dao-biao, ZHANG Zhen-hai, et al. Ginseng consumption and risk of cancer: A meta-analysis[J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 40(3): 269-277.
- [4] KIM U, PARK M H, KIM D H, et al. Metabolite profiling of ginsenoside Re in rat urine and faeces after oral administration[J]. Food Chem, 2013, 136(3/4): 1 364-1 369.
- [5] SUN J, WEI W, GUO Y, et al. Pharmacokinetic study of ginsenoside Rc and simultaneous determination of its metabolites in rats using RR-LC-Q-TOF-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 16-21.
- [6] 史得君, 严欢, 崔清美, 等. 人参茎叶提取物对 I 型糖尿病小鼠模型的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 165-169.
- [7] 王莹. 长白山虫草真菌转化稀有人参皂苷菌株的筛选、鉴定及转化条件的优化[D]. 长春: 吉林化工学院, 2019: 5.
- [8] 孙广仁, 赵闻琦. 多菌种发酵人参酒及皂苷转化分析[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 234-239.
- [9] 蔡爽. 人参皂苷的制备及改善肠胃功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006: 8.
- [10] 韩铭鑫, 李方彤, 张琰, 等. 稀有人参二醇型皂苷的人肠道菌群生物转化[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(7): 1 390-1 396.
- [11] 邵淇, 陈贺, 尹成日. 乳酸菌对人参皂苷 Rb1 的生物转化研究[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2016, 42(2): 177-180.
- [12] 许春春, 于渤海, 王红蕾, 等. 重组嗜热  $\beta$ -葡萄糖苷酶转化稀有人参皂苷 Rd 和 CK[J]. 高等学校化学学报, 2016, 37(2): 281-289.

(下转第 90 页)

与徇私舞弊的状况出现,严控行政监管部门与相关企业之间发生寻租等违法现象,开通便捷、高效的食品安全举报渠道,并充分保护举报人的个人隐私,提升举报人的奖励规模。此外,加强对现有食品认证机构的管理与监督,提高企业认证资质的“门槛”,严惩食品认证过程中的违法行为。

3.3.3 加强食品企业的行业自律 相关食品企业从业者应在食品安全法律框架下,自觉强化自身在材料选择、材料存储与预处理、生产加工、物流运输以及销售、售后过程中的安全管理与潜在污染控制,基于行业自律精神下,及时披露食品必要信息,并对行业内部相关企业进行监督与检举,促进整个行业道德水准提升,并改善公众食品信任状况,为建立全社会食品安全良性信任机制作出重要贡献。如发生食品安全事件,需主动、积极向社会公开,并及时介入专家处置机制,最大化降低对消费者身心健康的危害。

3.3.4 提升公众参与食品安全的力度 对于食品安全而言,公众群体一直处于信息不对称的弱势地位,特别是购买或食用相关问题食品的消费者。公众群体需加强自身能力建设,在现有司法框架下,积极、主动参与食品安全的治理与监管过程,运用网络环境与信息技术等渠道,表达并参与对相关食品安全事务的举报与维权活动,并联络组织消费者协会、行业专家、司法团体、社会公益组织等社会团体实行公众食品安全管理议程,为改善食品安全管制、形成全社会食品安全的公众信任机制发挥更为显著的作用。

## 4 结论

公众群体对于食品安全存在不同程度的信任危机的主要诱因在于相关核心利益主体所获取的信息失衡,尤其是食品行业经营者与食品消费者之间。从产生信息不对称的食品安全经济学机制和基于公众信任理论下的食品安全认知体系出发,全面剖析了导致当前公共食品安

全信任危机的主导因素,并结合相关研究成果,从明晰相关核心利益主体范围、构建信任机制基本原则和实现良心信任机制实践策略方面初步梳理、概括对公众食品安全信任形成机制的实现途径。文章侧重于理论层面的全结构式机制搭建与相应制度建设,对于各核心利益主体、构建过程与可行性分析尚缺乏有力论证与调查,后续研究可进一步突出产生信任危机的具体案例与形成机制展开量化深入探究,促进中国公众食品安全信任机制得以不断完善。

## 参考文献

- [1] 叶舟舟,许晓岚,生吉萍,等. 公众对食品安全风险预警信息的信任水平与影响因素研究[J]. 农产品质量与安全, 2018(4): 40-45.
- [2] 王振铎. 信息交流下消费者安全食品信任评价机制的构建[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 83-85.
- [3] 尹世久,王小楠,高杨,等. 信息交流、认证知识与消费者安全食品信任评价[J]. 江南大学学报(人文社会科学版), 2014, 13(5): 124-132.
- [4] 陈有华,陈美霞,钱桂云. 容量约束、信息不对称与食品安全风险治理研究[J]. 中国食品安全治理评论, 2019(1): 51-72.
- [5] AKERLOF G A. The market for "lemons": Quality uncertainty and the market mechanism[J]. *Uncertainty in Economics*, 1978, 235: 237-251.
- [6] NELSON P. Information and consumer behavior[J]. *The Journal of Political Economy*, 1970, 78(2): 311-329.
- [7] MAYER R C, DAVIS J H, SCHOORMAN F D. An integrative model of organizational trust[J]. *Academy of Management Review*, 1995, 20(3): 709-734.
- [8] 孔娜娜. 食品安全治理公众个体参与能力评价模式研究[J]. 武汉理工大学学报(信息与管理工程版), 2018, 40(2): 141-146.
- [9] 胡婧超. 山西省食品安全监管的公众参与能力现状及提升策略研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2019: 21-22.
- [10] 杜娇,姜淑喆,未建华. 白蚁及其共生菌来源的 4 种木质纤维素酶的共表达[J]. 生物工程学报, 2019, 35(2): 79-88.
- [11] WANG Wei-nan, YAN Bing-xiong, XU Wen-di, et al. Highly selective bioconversion of ginsenoside Rb1 to compound K by the mycelium of cordyceps sinensis under optimized conditions[J]. *Molecules*, 2015, 20(10): 19 291-19 309.
- [12] 汤蕾,余晓斌,郝学财,等. 响应面法优化虫草液态发酵培养基[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 41-43.
- [13] 王长文,房柳,梁运江,等. 基于高通量测序的不同虫态洋虫内共生微生物群落分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(9): 1 705-1 713.
- [14] DONG Wei-wei, XUAN Fang-ling, ZHONG Fei-liang, et al. Comparative analysis of the rats' gut microbiota composition in animals with different ginsenosides metabolizing activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(2): 327-337.
- [15] 刘文静,程晗,陈崇艺,等. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 43-49.
- [16] 田蕾. 三七双向发酵技术的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2015: 5.
- [17] 马宗敏,段绪红,秦梦,等. 微生物发酵技术在中药苷类生物转化中的应用进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2017, 19(5): 858-864.
- [18] 左明星,周彦伶,许言超,等. 烟曲霉 GZWMJZ-152 茶粕发酵代谢产物[J]. 菌物学报, 2019, 38(2): 264-271.
- [19] 张欣宇. 复合益生菌微生态添加剂的培养条件优化及功效评价[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 5.

(上接第 22 页)