

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 24 日 (24.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/201596 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
C12P 17/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/001510
- (22) 国际申请日: 2013 年 12 月 6 日 (06.12.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310245307.3 2013 年 6 月 19 日 (19.06.2013) CN
- (71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号杜伟, Liaoning 116023 (CN)。
- (72) 发明人: 杨凌 (YANG, Ling); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 窦同意 (DOU, Tongyi); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 栾宏伟 (LUAN, Hongwei); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 刘兴宝 (LIU, Xingbao); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 侯琨 (HOU, Kun); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。
- (74) 代理人: 沈阳晨创科技专利代理有限公司 (SHENYANG CHENCHUANG TECHNICAL PATENT AGENT LTD); 中国辽宁省沈阳市浑南新区沈

营路 3 号瑞宝国际花苑 2 号楼 1 单元 5-1 室, Liaoning 110013 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。

(54) Title: NEW *CELLULOSIMICROBIUM CELLULANS* STRAIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种纤维化纤维微细菌菌株及其应用

(57) Abstract: Provided is a new *Cellulosimicrobium cellulans* strain. The microbium cellulans (*Cellulosimicrobium cellulans*) strain F16 is under strain preservation number CCTCC M 2013201. Also provided is an application of the strain, and the strain is used to prepare aglycon of glycoside.

(57) 摘要: 提供了一种纤维化纤维微细菌, 该菌株为纤维化纤维微细菌 (*CelMosimicrobiwncelMcms*) 菌株 F16, 保藏号为 CCTCC M 2013201。还提供了该菌株的应用, 将其用于糖苷化合物苷元的制备。



WO 2014/201596 A1

一种纤维化纤维微细菌菌株及其应用

技术领域

本发明属于生物化工领域，具体涉及一种纤维化纤维微细菌菌株及其应用。

背景技术

许多天然具有活性化合物往往以糖苷的形式存在于自然界中，将其糖基去除后，便可释放出有活性的化合物。如抗癌药物紫杉醇，其主要存在于红豆杉植物的树皮中。而在红豆杉的枝叶中则大量存在着木糖苷化的紫杉醇前体或其相同母核的类似物（称之为紫杉烷类化合物），如 7-木糖紫杉醇和 7-木糖-10 去乙酰紫杉醇（10DAXT），其在如中华、云南及南方红豆杉的枝叶中的累积量可高出紫杉醇 10 倍以上，将 7-位木糖基水解后再经一步乙酰化即可转化为紫杉醇。

另外一种典型的天然产物如来自名贵中草药人参的人参皂苷。人参皂苷是公认人参中的主要活性成分，其基本骨架主要是原人参二醇（PPD）和原人参三醇（PPT）。其中含量高的如 Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Re、Rg1 等，都是基本骨架被高度“糖基化”了的化合物，其所含糖基从一个到五个不等，而具有很好抗肿瘤和抑菌活性的却是人参中一些含量很少的稀有人参皂苷如 Rh1、Rh2、Rg3、Rg5、CK、PPT、PPD 等，这些化合物往往含糖基较少，或直接是不带有任何糖基的苷元，是上述高含量人参皂苷去糖基化后的产物（J Pharm Pharmacol. 1998 Oct; 50(10): 1155-60.）。日本公开特许 58-131999（JPO）58-131999 公布了 20（S）-原人参二醇、20

(R)-原人参二醇、20(S)-原人参三醇、20(R)-原人参三醇都具有抑制肿瘤生长的活性，其中 20(S)-原人参二醇(PPD)的活性最强。进一步的研究表明 20(S)-PPD 可以通过增强机体免疫和直接的细胞毒作用杀死肿瘤细胞，还可以抑制肿瘤间质血管生成，阻止肿瘤细胞的生长；在神经系统方面，20(S)-PPD 可以抗癫痫、抗抑郁、增强学习能力等，是一个非常具有开发价值的化合物 (Front Pharmacol. 2012; 3: 25. Chinese Medicine 2010, 5:20)。

此外，还有很多天然化合物都存在类似情况，如黄芪甲苷，红链霉素糖苷，异槲皮苷，大豆皂苷，红景天苷，天麻苷，山慈菇苷 A，薯蓣皂苷，亚麻木酚素，哈巴俄苷及哈巴苷等等。

由于人们往往对其苷元更感兴趣，但这类化合物一般骨架复杂，化学方法断裂糖苷键的选择性差，副产物多，环境污染等原因，制备相应苷元十分困难。相比之下生物转化方法由于具有高度的选择性和专一性，几乎没有副产物，反应条件温和，环境友好，成为制备此类化合物相应苷元的首选。目前已有很多关于酶法水解糖苷类化合物的报道，如韩国研究者公布了利用针尾曲霉水解红参中人参皂苷以提高其中人参皂苷苷元的含量(J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53(5), 553-558 (2010))，Kohada 报道以 G-Rb1、Rb2、Rb3、Rc 和 Rd 为原料，用醋酸水解脱去 C-20 位上的糖，再用粗橙皮苷酶等水解脱去 3 位上的糖，制得 20(S)-PPD(JPO 58-131999)，中国专利 CN03101549.2 公开了利用乳酸菌或肠道细菌生物转化制备人参组合物的方法，中国专利 CN 102703329 公开了一株能够高效转化黄姜中皂苷生产薯蓣皂苷元的菌株，Hanson RL (1997) 利用细菌 *Moraxella* sp.、

Bacillus macerans、*Bacillus circulans* 和 *Micrococcus* sp. 将 C-7 木糖紫杉烷转化为 C-7 羟基紫杉烷, 中国专利 CN 102296053 公开了一种来自真菌的 β -木糖苷酶也具有水解 C-7 木糖紫杉烷的能力, 并实现其在酵母中的胞内表达等, 但往往存在使用菌体转化、产酶及转化效率低的情况, 尤其对于一些水溶性差、空间位阻大的化合物, 如 10DAXT, 普通糖苷酶往往难以水解。

发明内容

本发明的目的在于提供一种纤维化纤维微细菌菌株及其应用, 该菌株可将含木糖苷键或葡糖苷键的化合物水解而获得相应的苷元。本发明使用一种纤维化纤维微细菌菌株或该菌株所产生的酶接触含有至少一种木糖苷键或葡糖苷键的黄芪皂苷类、人参皂苷类、紫杉烷木糖苷类、红链霉素糖苷、异槲皮苷、大豆皂苷类化合物, 并水解相应的糖苷键。该方法可以制备至少一种上述糖苷化合物的苷元, 也可以制备在转化上述苷元的过程中所产生的具有药理活性的中间产物。

本发明提供了一种纤维化纤维微细菌菌株, 该菌株为纤维化纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*) 菌株 F16, 菌种保藏号为 CCTCC M 2013201, 保藏日期为 2013 年 5 月 14 日, 保藏单位为中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国武汉大学。

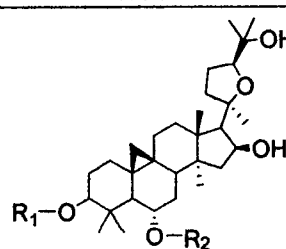
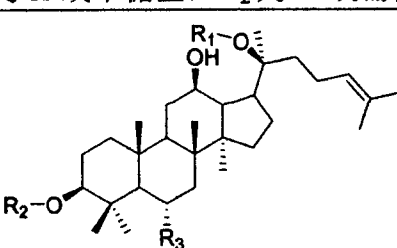
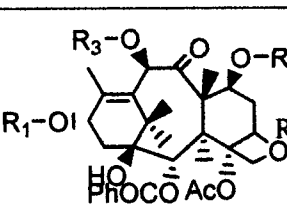
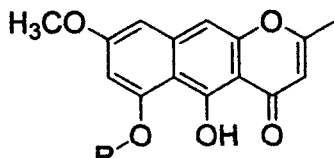
本发明还提供了所述纤维化纤维微细菌菌株的应用, 该菌株应用于糖苷化合物苷元的制备。

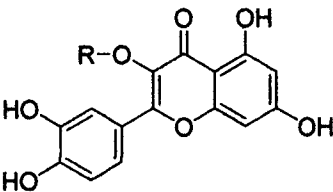
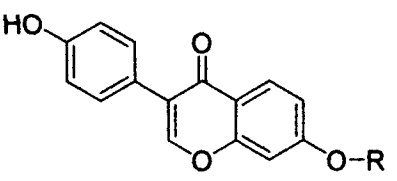
本发明提供的所述纤维化纤维微细菌菌株的应用, 该菌株或其发酵产生的水解酶, 接触含糖苷键的糖苷化合物, 将糖苷键水解, 得到的产物是

相应的苷元或中间体。

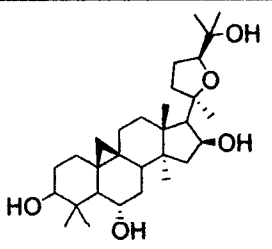
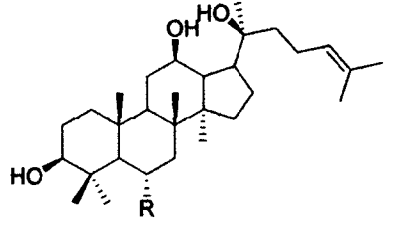
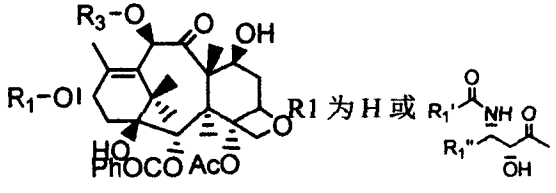
本发明提供的所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，所述糖苷键为葡萄糖苷键和/或木糖苷键。

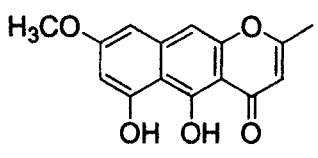
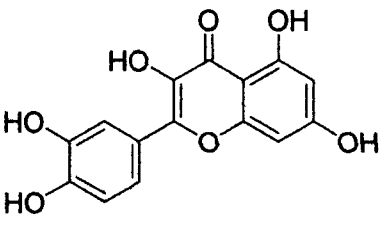
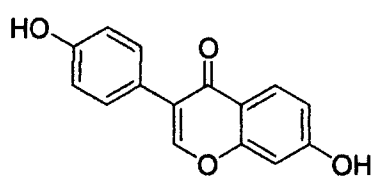
本发明提供的所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，所述糖苷化合物结构如下：

糖苷化合物名称	结构式
黄芪皂苷	 R₁ 为 H 或木糖基，R₂ 为 H 或葡萄糖基
人参皂苷	 R₁、R₂ 为 H、木糖基、葡萄糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基；R₃ 为 H、羟基、葡萄糖基、槐糖基或新橙皮糖基
紫杉烷木糖苷	 R₂ 为木糖基；R₃ 为 H 或酰氧基；R₁' 和 R₁'' 为 H，或芳基、芳烷基、链烷基，或上述三种烷基的取代物，取代基包括羟基、C1 至 C8 的烷氧基、缩醛、缩酮、卤素、硝基或氨基
红链霉素糖苷	 R 为木糖基、葡萄糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基

异槲皮苷类	 R 为木糖基、葡萄糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基
大豆皂苷	 R 为木糖基、葡萄糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基

本发明菌株制备的相应苷元结构是：

苷元名称	结构式
环黄芪醇	
原人参醇	 R 为 H 时，化合物为 20 (S) -原人参二醇；R 为羟基，则为 20 (S) -原人参三醇
紫杉烷	 R₃ 为 H 或酰氧基；R₁' 和 R₁'' 为 H，或芳基、芳烷基、链烃基，或上述三种烃基的取代物，取代基包括羟基、C1 至 C8 的烷氧基、缩醛、缩酮、卤素、硝基或氨基

红链霉素	
异槲皮素	
大豆皂苷苷元	

本发明提供的菌株的水解方法已考虑到具有上述分子结构的化合物的手性中心的所有立体构型，这些立体异构体或单独被水解，或与其它立体异构体混合在一起被水解。

本发明提供的菌株实用价值在于：环黄芪醇，原人参醇，紫杉烷类化合物，红链霉素，异槲皮素和大豆皂苷苷元，在药物制备领域有重要的应用价值。从植物中提取出的上述化合物通常是连接有大量糖基的糖苷化合物，且多为混合物，其中大部分糖苷化合物带有的是木糖基或葡萄糖基，而去糖基后的苷元才是最终想要的产品。一个或多个含有至少一种木糖苷键或葡萄糖苷键的黄芪甲苷、人参皂苷、紫杉烷木糖苷、红链霉素糖苷、异槲皮苷或大豆皂苷，在菌株 F16 或其发酵产生的水解酶的作用下被水解，得到相应苷元；所得化合物可以是具有药理活性的苷元，如环黄芪醇，原人参醇，紫杉烷类化合物，红链霉素，异槲皮素或大豆皂苷苷元，或其类似物，也可以是制备上述苷元的过程中所产生的未完全水解的中间体。

本发明提供的菌株使得被水解的黄芪甲苷、人参皂苷、紫杉烷木糖苷、

红链霉素糖苷、异槲皮苷和大豆皂苷的立体构型优先保留于产品中，所得相应苷元或其水解中间产物的糖苷键的绝对立体构型与原糖苷化合物的糖苷键绝对立体构型相同。

本发明提供的菌株用于从带有木糖苷键或葡萄糖苷键的黄芪甲苷、人参皂苷、紫杉烷木糖苷、红链霉素糖苷、异槲皮苷或大豆皂苷制备相应的苷元或其水解中间产物时十分有效。用本发明提供的方法可以水解一种带有木糖苷键或葡萄糖苷键的上述糖苷化合物，也可以连续性地或同时水解不同上述糖苷化合物的混合物。由植物材料提取的人参皂苷混合物、紫杉烷木糖苷和大豆皂苷混合物用本发明提供的方法水解，效果很好。

具体实施方式

下面的实施例将对本发明予以进一步的说明，但并不因此而限制本发明。

起始材料：

本发明所采用的起始材料可以是任何带有木糖苷键或葡萄糖苷键的黄芪甲苷、人参皂苷、紫杉烷木糖苷、红链霉素糖苷、异槲皮苷或大豆皂苷类化合物。带有木糖苷键或葡萄糖苷键的上述糖苷化合物可以是自然形成的，也可以是化学半合成或全合成所得。

酶与微生物：

本发明水解方法中使用的酶或微生物可以是下面描述的任何能催化酶水解反应的酶或微生物。这些酶或微生物材料，不管其来源或纯度，都可在游离状态下使用，或者将其用物理吸附或诱捕方法固定在支持物上使用。生物学纯的纤维化纤维微细菌（*Cellulosimicrobium cellulans*）菌株F16是新

发现的同时产 β -木糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的微生物。这种微生物的突变体，例如经化学的，物理的（如紫外辐射）或生物学方法（如分子生物学技术）改造以用于水解反应的突变菌株，也在本发明的考虑范围内。

纤维化纤维微细菌（*Cellulosimicrobium cellulans*）菌株F16分离自大连市甘井子区西山水库的土壤之中，其特征为：革兰氏阳性，可在好氧条件下生长，菌落呈圆形，直径0.9~2mm，黄白色突起，反光，边缘整齐。在显微镜下观察菌体为棒状，随着培养时间的延长逐渐转化成短杆，甚至球形。

本发明应用的酶是水解酶，尤其是葡萄糖苷酶和葡聚糖酶，以及木糖苷酶和木聚糖酶。本发明提供的菌株生产这些酶，可用提取和纯化的方法分离它们。本发明提供的微生物可以以完整湿细胞的形式，或者以冻干，喷雾干燥或加热干燥的形式，或者以经破碎抽提后的形式被应用于水解反应。

本发明提供的水解方法可以在微生物发酵后进行，也可以与发酵同时进行。

将菌株接种于含诱导剂的培养基中，好氧条件下发酵培养后，离心收集上清液，即为粗酶液。培养基pH在4-7之间，培养温度20-40℃之间。水解反应进行0.5-72小时，直至目的产品的产量达最大。水解反应时，pH保持在6-9，其中pH 7-8效果最好。

产物的分离：

应用本发明提供的方法所产生的六类苷元或其未完全水解的中间产物，可被分离纯化，根据水解产物的特征，可用提取，蒸馏，结晶，柱层

析或多种分离技术结合的方法进行纯化。

应用：

应用本发明提供的水解方法所获得的化合物如紫杉醇，是很好的抗癌药。7-木糖-10-去乙酰紫杉醇经本发明提供的方法水解后获得 10-去乙酰紫杉醇，此化合物再经 10 位乙酰化，即可得到紫杉醇。

应用本发明提供的水解方法所获得的化合物如人参二醇，具有非常好的抗肿瘤活性，同时还可以抗癫痫、抗抑郁、增强学习能力等，是一个非常具有开发价值的化合物，近些年被各国研究者进行改造，希望能够将其开发为一种新的抗肿瘤药。

实施例 1：粗酶液的制备

使用含 1%淀粉，0.2%蛋白胨，0.2%酵母提取物，0.2%磷酸氢二钾的培养基（灭菌前 pH 7.0）作为种子培养基。

将上述种子培养基 20ml 分配到 100ml 锥形瓶中，在 120 度下灭菌 15min，将纤维化纤维单胞菌 F16 菌株的琼脂斜面培养物接种到其中，并在 30 度下振荡培养 2 天作为种子液。

500ml Erlenmeyer 培养瓶中放入 100ml 含 1%桦木木聚糖，0.2%酵母浸膏，0.2%氯化铵，0.1% NaH_2PO_4 和 0.1% Na_2HPO_4 的培养基，pH 7，高压灭菌 121 度 30min。将 1ml 种子液接种于此培养基，150rpm，30℃摇瓶培养 5 天。离心收集上清液，即为粗酶液。

实施例 2：黄芪甲苷 IV 的水解粗酶液的制备

在 0.9ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1ml 50mM Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5），再加入 0.1ml 黄芪甲苷 IV 的甲醇溶液（浓度为 10 mg/ml）。100rpm，35℃

孵育 8 小时后,以环黄芪醇标准品作对照,TLC 分析,黄芪甲苷 IV 几乎全部转化为环黄芪醇。

实施例 3: 人参皂苷 Rb1 水解制备化合物 CK

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5),再加入 0.1 ml 人参皂苷 Rb1 的甲醇溶液(浓度为 10 mg/ml)。100rpm, 35℃孵育 4 小时。加入 2ml 甲醇终止反应,15000 转/分离心 20 分钟取上清液进行 UPLC 分析。反应液中人参皂苷 Rb1 几乎完全转化,产生化合物 K (即 CK, 产率 75%), 未完全水解的中间产物以及少量终产物 PPD。

UPLC 方法:

色谱柱: Kromasil ODS (2.1×150 mm, 3 μm)

流动相: 乙腈:水 (0→30 min: 20:80→95:5 梯度洗脱)

流速: 0.4 ml/min

柱温: 室温

检测波长: 203 nm

实施例 4: 人参皂苷 Rb1 水解制备原人参二醇 (PPD)

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5),再加入 0.1 ml 人参皂苷 Rb1 的甲醇溶液(浓度为 10 mg/ml)。100rpm, 35℃孵育 12 小时。加入 2ml 甲醇终止反应,15000 转/分离心 20 分钟取上清液进行 UPLC 分析,方法同实施例 3。反应液中人参皂苷 Rb1 几乎完全转化为终产物原人参二醇 (PPD), 产率 90%。

实施例 5: 人参皂苷 Re 水解制备原人参三醇 (PPT)

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH

7.5), 再加入 0.1 ml 人参皂苷 Re 的甲醇溶液 (浓度为 10 mg/ml)。100rpm, 35℃ 孵育 8 小时。加入 2ml 甲醇终止反应, 15000 转/分离心 20 分钟取上清液进行 UPLC 分析, 方法同实施例 3。反应液中人参皂苷 Re 几乎完全转化为终产物原人参三醇 (PPT), 产率 93%。

实施例 6: 7-木糖紫杉醇水解制备紫杉醇

在 0.9ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1ml 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再加入 0.1ml 7-木糖-紫杉醇的甲醇溶液 (浓度为 5 mg/ml)。100rpm, 30℃ 孵育 5 小时。加入 2ml 甲醇终止反应, 15000 转/分离心 20 分钟取上清液进行 HPLC 分析。反应液中无 7-木糖-紫杉醇残留, 并产生 0.41mg 紫杉醇 (产率 94%)。

HPLC 方法:

色谱柱: Kromasil ODS (4.6×200 mm, 5 μm)

流动相: 甲醇:水 (60:40)

流速: 1ml/min

柱温: 室温

检测波长: 227 nm

实施例 7: 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇水解制备 10-去乙酰紫杉醇

将 10ml 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的甲醇溶液 (浓度为 5mg/ml) 加入到 90ml 实施例 1 所述的粗酶液中, 100rpm, 30℃ 下反应 20 小时后, 加入 20ml 乙酸乙酯萃取, 共萃取 3 次, 合并上层有机相, 减压蒸干, 获得固体物质 102mg, 上硅胶柱 (20g) 并用氯仿:甲醇(98:2)进行洗脱, 得到 39 mg 10-去乙酰紫杉醇 (总收率 91%)。

实施例 8: 7-木糖紫杉烷混合物的水解

将 200 ml 含有 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇, 7-木糖-10-去乙酰三尖杉宁碱, 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇 C 的混合物 (从天然红豆杉提取物中分离, 含量分别为 65%, 9.9%, 3.3%) 的甲醇溶液 (5mg/ml) 加入到 2000ml 如前所述的粗酶液中, 100rpm, 35℃ 下反应 8 小时。反应液用乙酸乙酯萃取三次, 每次 200ml, 合并有机相蒸干溶解于 100ml 甲醇中, 用实施例 6 中 HPLC 方法进行定量检测, 发现其中无三种带木糖基的底物残留, 得到的产物中 10-去乙酰紫杉醇, 10-去乙酰三尖杉宁碱, 10-去乙酰紫杉醇 C 的含量分别 504mg, 75mg, 28mg, 回收率达到 90%。

实施例 9: 红链霉素龙胆二糖苷的水解

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1 ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再加入 0.1 ml 红链霉素龙胆二糖苷的甲醇溶液 (浓度为 12 mg/ml)。100rpm, 35℃ 孵育 4.5 小时。加入 2ml 甲醇终止反应, 15000 转/分离心 20 分钟取上清液进行 UPLC 分析。反应液中无红链霉素龙胆二糖苷残留, 并产生 0.52 mg 红链霉素 (产率 95%)。

UPLC 方法:

色谱柱: Kromasil ODS (2.1×150 mm, 3 μm)

流动相: 乙腈:水 (0→10 min: 20:80→95:5 梯度洗脱)

流速: 0.4 ml/min

柱温: 室温

检测波长: 278 nm

实施例 10: 异槲皮苷的水解

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再加入 0.1 ml 异槲皮苷的甲醇溶液 (浓度为 7 mg/ml)。100 rpm, 35℃ 孵育 4 小时后, 以异槲皮素标准品作对照, TLC 分析, 异槲皮苷几乎全部转化为异槲皮素。

实施例 11: 大豆皂苷的水解

在 0.9 ml 实施例 1 中的粗酶液中加入 1ml 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再加入 0.1 ml 大豆皂苷的甲醇溶液 (浓度为 5 mg/ml)。100 rpm, 35℃ 孵育 12 小时后, 以大豆皂苷苷元标准品作对照, TLC 分析, 大豆皂苷几乎全部转化为其苷元。

权 利 要 求 书

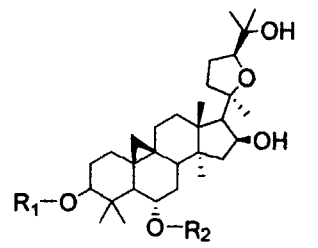
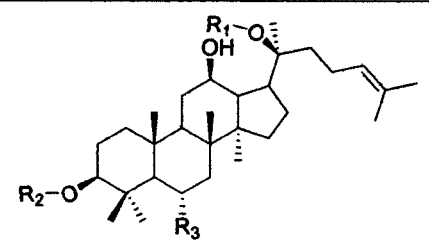
1、一种纤维化纤维微细菌菌株，其特征在于：该菌株为纤维化纤维微细菌(*Cellulosimicrobium cellulans*)菌株 F16，保藏号为 CCTCC M 2013201，保藏日期为 2013 年 5 月。

2、权利要求 1 所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，其特征在于：该菌株应用于糖苷化合物苷元的制备。

3、按照权利要求 2 所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，其特征在于：该菌株或其发酵产生的水解酶，接触含糖苷键的糖苷化合物，将糖苷键水解，得到的产物是相应的苷元或中间体。

4、按照权利要求 3 所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，其特征在于：所述糖苷键为葡萄糖苷键和/或木糖苷键。

5、按照权利要求 2 或 3 所述纤维化纤维微细菌菌株的应用，其特征在于：所述糖苷化合物结构如下：

糖苷化合物名称	结构式
黄芪皂苷	 R₁ 为 H 或木糖基，R₂ 为 H 或葡萄糖基
人参皂苷	 R₁、R₂ 为 H、木糖基、葡萄糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基；R₃ 为 H、羟基、葡萄糖基、槐糖基或新橙皮糖基

紫杉烷木糖苷	R₂ 为木糖基; R₃ 为 H 或酰氧基; R₁'和 R₁''为 H, 或芳基、芳烷基、链烃基, 或上述三种烃基的取代物, 取代基包括羟基、C1 至 C8 的烷氧基、缩醛、缩酮、卤素、硝基或氨基
3 红链霉素糖苷	R 为木糖基、葡糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基
异槲皮苷类	R 为木糖基、葡糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基
大豆皂苷	R 为木糖基、葡糖基、龙胆二糖基、槐糖基或新橙皮糖基

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N; C12P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED

Search terms: bacterial strain, glucoside compound, glycosidic bond, fiber?, bacteri+, Cellulosimicrobium cellulans, hydroly+, glucosid+, aglucon+, aglycon+, compound

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101381708 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 11 March 2009 (11.03.2009), see the whole document	1-5
A	CN 101691554 A (GUANGXI ACADEMY OF SCIENCES), 07 April 2010 (07.04.2010), see the whole document	1-5
A	JP 2005210977 A (HITACHIKIDEN KOGYO KK), 11 August 2005 (11.08.2005), see the whole document	1-5
A	CHEN, Yanhong et al., The Biologic Characteristics of a Strain of Cellulosimicrobium Cellulans and Its Utilization of Several Kinds of Benzoic Compounds, ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, 20 July 2008 (20.07.2008), vol. 35, no. 7, pages 1021-1027, ISSN: 0253-2654, see the whole document	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 March 2014 (05.03.2014)	Date of mailing of the international search report 20 March 2014 (20.03.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Tingchen Telephone No.: (86-10) 62089319

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001510

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SONG, J.M., WEI, D.Z., Production and Characterization of Cellulases and Xylanases of Cellulosimicrobiumcellulans Grown in Pretreated and Extracted Bagasse and Minimal Nutrient Medium M9, BIOMASS AND BIOENERGY, 31 December 2010 (31.12.2010), vol. 34, no. 12, pages 1930-1934, see the whole document	1-5

International application No.
PCT/CN2013/001510

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101381708 A	11.03.2009	WO 2009030098 A2	12.03.2009
CN 101691554 A	07.04.2010	CN 101691554 B	25.05.2011
JP 2005210977 A	11.08.2005	JP 4417127 B2	17.02.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/001510

CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i

C12P 17/02 (2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) n

A. 主题的分类

续见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N; C12P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED

检索词: 纤维, 菌株, 糖苷化合物, 苷元, 糖苷键, 水解, fiber?, bacteri+, Cellulosimicrobium cellulans, hydroly+, glucosid+, aglucon+, aglycon+, compound

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101381708 A (中国科学院大连化学物理研究所), 11.3 月 2009 (11.03.2009), 参见全文	1-5
A	CN 101691554 A (广西科学院), 07.4 月 2010 (07.04.2010), 参见全文	1-5
A	JP 2005210977 A (HITACHI KIDEN KOGYO KK), 11.8 月 2005 (11.08.2005), 参见全文	1-5
A	陈燕红等, 一株纤维化纤维微细菌的生物学特性及其对几种苯环类化合物的利用研究, 微生物学报, 20.7 月 2008 (20.07.2008), 第 35 卷, 第 7 期, 第 1021-1027 页, ISSN 0253-2654, 参见全文	1-5

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

05.3 月 2014 (05.03.2014)

国际检索报告邮寄日期

20.3 月 2014 (20.03.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

吴汀晨

电话号码: (86-10) 62089319

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Jian-min Song, Dong-zhi Wei, Production and characterization of cellulases and xylanases of cellulosimicrobiumcellulans grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9, Biomass and Bioenergy, 31.12 月 2010 (31.12.2010), 第 34 卷, 第 12 期, 第 1930-1934 页, 参见全文	1-5

关于同族专利的信息

PCT/CN2013/001510

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2009 年 7 月)

续: **A. 主题的分类**

C12N 1/20 (2006.01) i

C12P 17/02(2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) n