



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112980695 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202011616993.7

C12P 33/20 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.30

C12R 1/885 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.20722 2020.09.14

(71) 申请人 中国中医科学院中药研究所

地址 100700 北京市东城区东直门内南小街16号

申请人 盛实百草药业有限公司

(72) 发明人 陈士林 董林林 尉广飞 李刚

张乃晏 陈延国 金淑艳

(74) 专利代理机构 广西咕咕狗专利代理事务所

(普通合伙) 45137

代理人 苗计伟

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

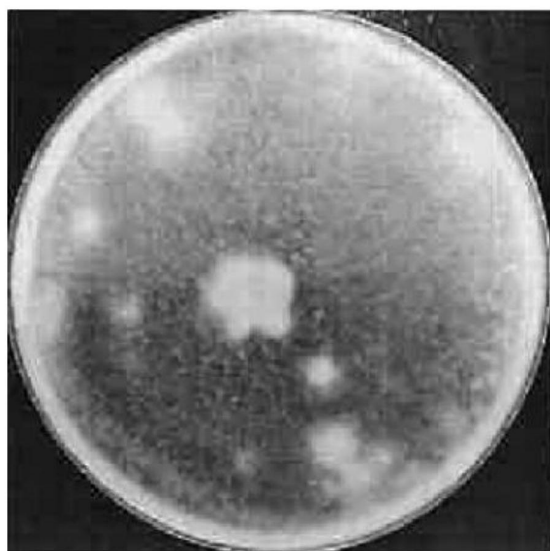
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用

(57) 摘要

本发明属于微生物学技术领域,具体涉及的是一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用。一种Trichoderma koningii RF-1菌株,其分类学名为康宁木霉Trichoderma koningii,于2020年9月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为GDMCC No.20722。本发明的RF-1菌株可将人参皂苷Rb<sub>1</sub>快速转化成人参皂苷Rd和稀有人参皂苷Rg<sub>3</sub>,在28℃恒温培养箱中160r·min<sup>-1</sup>培养10天后,转化成人参皂苷Rd的平均转化率可达40.00%;转化成稀有人参皂苷Rg<sub>3</sub>的平均转化率可达32.31%;为获得稀有人参皂苷提供了理想的途径,同时可为人参属专用肥或菌剂开发提供材料。



1.一种Trichoderma koningii RF-1菌株,其分类学名为康宁木霉Trichoderma koningii,于2020年9月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No.20722。

2.权利要求1所述的Trichoderma koningii RF-1菌株在将人参皂苷Rb<sub>1</sub>转化成人参皂苷Rd和/或Rg<sub>3</sub>中的应用。

## 一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物学技术领域,具体涉及的是一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用。

### 背景技术

[0002] 人参属多年生草本植物的干燥根及根茎,药理作用广泛,具有极高的药用价值和前景。皂苷是人参Panax ginseng和三七Panax notoginseng的主要药效成分,具有抗肿瘤、抗衰老、软化血管、保肝等作用。人参皂苷Rd对于中枢神经系统亦显示出良好的神经保护效应;稀有人参皂苷Rg<sub>3</sub>能够保护心脑血管、增强免疫功能、抗增生性瘢痕、抗疲劳等作用。人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>在天然人参属植物中的含量较少,因此将人参主皂苷转化为稀有人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>的研究具有很重要的意义。

[0003] 近年来,以人参主皂苷为原料进行生物转化的方法主要有化学法和生物法,其中生物转化法具有特异性高、成本低、反应条件温和、选择性高、环境友好等优点,被认为是获取稀有人参皂苷的最有效的方法。植物内生菌(Endophytes)是指存活于健康植物组织内部,而又不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群,主要包括真菌、细菌和放线菌。近年来,内生菌在生物转化上的应用已引起了人们的广泛关注,并已经应用于一些天然化合物的生物合成,如黄烷、四氢呋喃木酚素和黄芪皂苷。因此,从植物内生菌筛选和培养能将人参主皂苷转化为稀有人参皂苷的菌株具有很重要的意义。

[0004] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用。

[0006] 本发明提供的Trichoderma koningii RF-1菌株是从三七中分离得来,经形态学和分子生物学鉴定为康宁木霉Trichoderma koningii,于2020年9月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编:100101),保藏号为CGMCC No.20722。

[0007] 本发明还提供了所述的Trichoderma koningii RF-1菌株在将人参皂苷Rb<sub>1</sub>转化成人参皂苷Rd和/或Rg<sub>3</sub>中的应用。

[0008] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0009] 本发明的RF-1菌株可将人参皂苷Rb<sub>1</sub>快速转化成人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>,在28℃恒温培养箱中160r·min<sup>-1</sup>培养10天后,转化成人参皂苷Rd的平均转化率可达40.00%;转化成人参皂苷Rg<sub>3</sub>的平均转化率可达32.31%;为获得稀有人参皂苷提供了理想的途径,同时可为人参属专用肥或菌剂开发提供材料。

[0010] 保藏信息说明

[0011] 康宁木霉(Trichoderma koningii)RF-1,保藏编号为CGMCC No.20722,保藏日期

为2020年9月14日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

### 附图说明

- [0012] 图1为本发明RF-1的菌落形态;  
[0013] 图2为本发明RF-1的菌丝形态;  
[0014] 图3为构建的所得序列的进化树;  
[0015] 图4为RF-1的HPLC图;  
[0016] 有关附图标记的说明:  
[0017] a为人参皂苷标准品HPLC图,其中1-5分别为:人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、Rd和Rg<sub>3</sub>。  
[0018] b为人参皂苷Rb<sub>1</sub>和无菌液体培养基的HPLC图;  
[0019] c为人参皂苷Rb<sub>1</sub>接种RF-1经培养后的HPLC图。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0021] 下述实施例中所用的材料和试剂,如无特殊说明,均可从商业途径得到。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0022] 在以下实施例中使用到的标准品、实验试剂和实验仪器如下:

[0023] 标准品:分别精密称取减压干燥至恒重的对照品人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub>、Rd、Rg<sub>3</sub>、F<sub>1</sub>10mg,置1mL棕色容量瓶中,加甲醇溶解,定容置刻度,质量浓度为10mg/mL。

[0024] 实验试剂:FastDNA Spin Kit for Soil试剂盒(MoBio Laboratories, Inc., USA),无水乙醇(天津一方科技有限公司),次氯酸钠(天津宏达有限公司),27F/338R扩增引物(上海生工生物公司)。

[0025] 实验仪器:高效液相色谱仪(1260,Agilent),灭菌锅(SN510C,重庆雅马拓科技有限公司),电子天平(ME203E/02,梅特勒-托利多仪器有限公司),匀浆仪(MPFastPrep-245G,美国MP公司),漩涡器(ABSON, MixStat公司),离心机(SIGMA, Germany),PCR仪(2720,杭州得聚有限公司),电泳仪(DYY-8C,北京六一仪器厂),显微镜(COSSI,奥林巴斯株式会社),电泳凝胶成像仪(JY04S-3C,北京君意有限公司)。

[0026] 实施例1:内生菌分离、纯化和鉴定

[0027] 1.1分离及纯化内生菌

[0028] 取新鲜健康的三七根、茎和叶,流水冲洗干净后表面消毒处理,用无菌手术刀将组织切成0.5cm大小后接种于PDA培养基,置于25℃条件下培养至长出菌斑,将不同的菌落分别挑至PDA培养基中,逐步分离纯化,直至得到纯化的单菌株。

[0029] 1.2形态鉴定

[0030] 挑取不同形态的单菌落接种于PDA培养基上,于28℃黑暗条件下培养3d,观察菌落形态,其中RF-1菌株的如附图1所示。

[0031] 从附图1中可以看出,RF-1菌株的菌落平坦,质地絮状,白色到绿色;菌落背面米色,无可溶性色素。

[0032] 挑取不同形态的单菌落制成临时装片,于显微镜下观察菌丝形态、孢子形状及隔膜数量等性状,其中RF-1的菌株的显微结构如附图2所示。

[0033] 从图2中可看出,RF-1菌株的营养菌丝光滑,无色,具分隔2.1-8.8 $\mu\text{m}$ ;分生孢子梗为菌丝的短侧枝,产孢瓶梗单生、对生或3-5个轮生,4.6-12.2 $\times$ 1.3-2.2 $\mu\text{m}$ ;分生孢子椭圆形或近圆柱形,壁光滑且厚,3.1-4.9 $\times$ 2.3-4.1 $\mu\text{m}$ 。

[0034] 1.3分子鉴定

[0035] 采用基因试剂盒提取,使用如下表1中的ITS通用引物测序鉴定,测序结果如SEQ ID No.3所示。

[0036] 表1 ITS通用引物

	通用引物名称	基因序列	序列表序号
[0037]	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	SEQ ID No.1
	ITS2R	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	SEQ ID No.2

[0038] 构建所得序列的进化树,如图3所示;结合该进化树,并所得序列进行在线同源性比对,发现该菌株与康宁木霉(*Trichoderma koningii*)的相似性较高,确定分离得到的菌株为康宁木霉属,将其命名为菌株RF-1。

[0039] 实施例2:菌株的应用

[0040] 5mL离心管中加入1900 $\mu\text{L}$ 无菌PDA液体培养基和100 $\mu\text{L}$  10mg/mL的人参皂苷Rb<sub>1</sub>,然后接种2mL菌株RF-1,重复3次;置于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中160r/min培养10d后,加入溶解度为600 $\mu\text{L}$ 的正丁醇溶解停止反应,高速离心后,取上清进行HPLC分析,并计算3次重复的人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>的转化率;RF-1的HPLC图如附图4所示,人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>的转化率见下表2。

[0041] 表1 RF-1转化人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>的转化率(%)

	皂苷	组别	转化率(%)	均值(%)
[0042]	Rd	1	39.64	40.00
		2	38.81	
		3	41.55	
	Rg <sub>3</sub>	1	31.58	32.31
		2	32.76	
		3	32.59	

[0043] 从图4和表2可以看出,本发明的RF-1可以将人参皂苷Rb<sub>1</sub>转化成人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>,其中3次重复人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>的平均转化率分别可达40.00%、32.31%。

[0044] 综上所述,本发明的RF-1菌株可将人参皂苷Rb<sub>1</sub>快速转化成人参皂苷Rd和Rg<sub>3</sub>,为获得稀有人参皂苷提供了理想的途径,同时可为人参属专用肥或菌剂开发提供材料。

[0045] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及

各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

## 序列表

<110> 中国中医科学院中药研究所

<120> 一种Trichoderma koningii RF-1菌株及其应用

<130> 2020

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cttggtcatt tagaggaagt aa 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gctgcgttct tcatcgatgc 20

<210> 3

<211> 261

<212> DNA

<213> 康宁木霉(Trichoderma koningii)

<400> 3

cgttggtgac cagcggaggg atcattaccg agtttacaac tcccaaacc aatgtgaacc 60  
ataccaaact gttgcctcgg cggggtcacg ccccggtgc gtcgcagccc cggaaccagg 120  
cgcccgccgg agggaccaac caaactcttt ctgtagtccc ctgcggacg ttatttctta 180  
cagctctgag caaaaattca aatgaatca aaacttcaa caacgatct cttggttctg 240  
gcatcgatga agaacgcagc a 261



图1

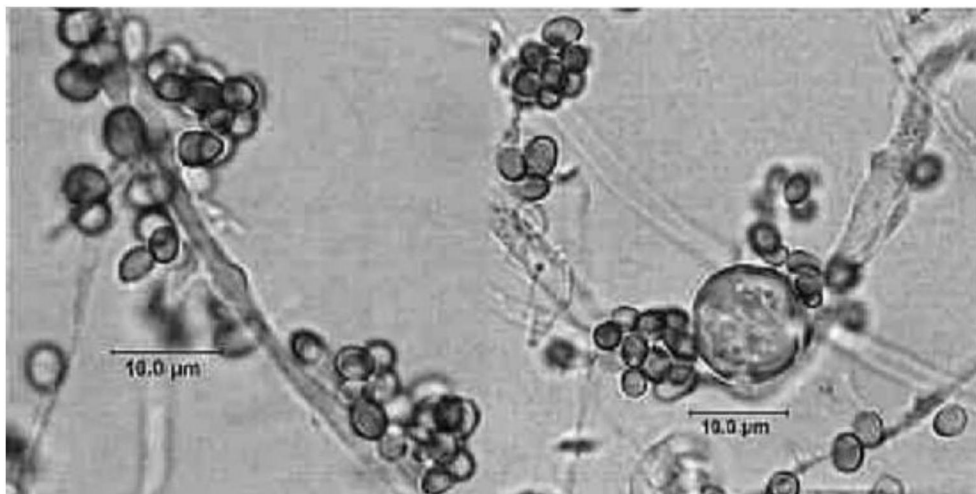


图2



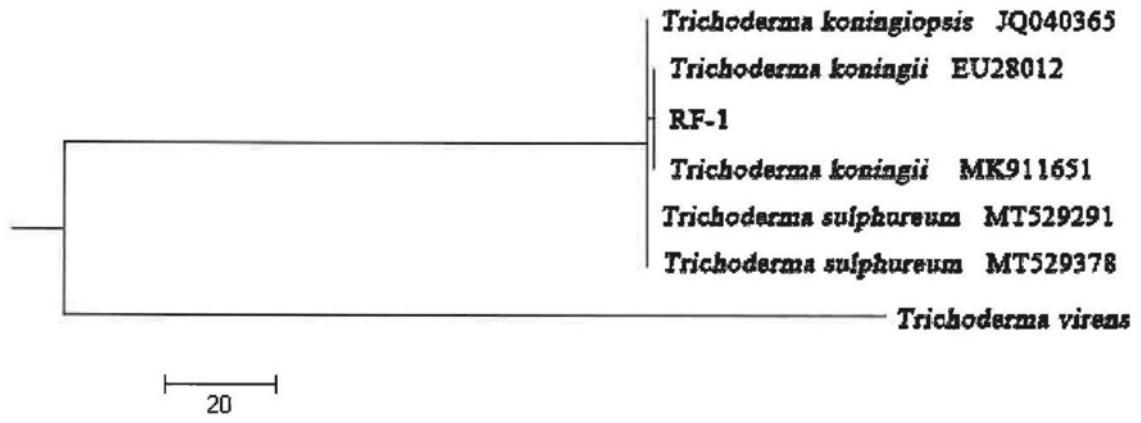


图3

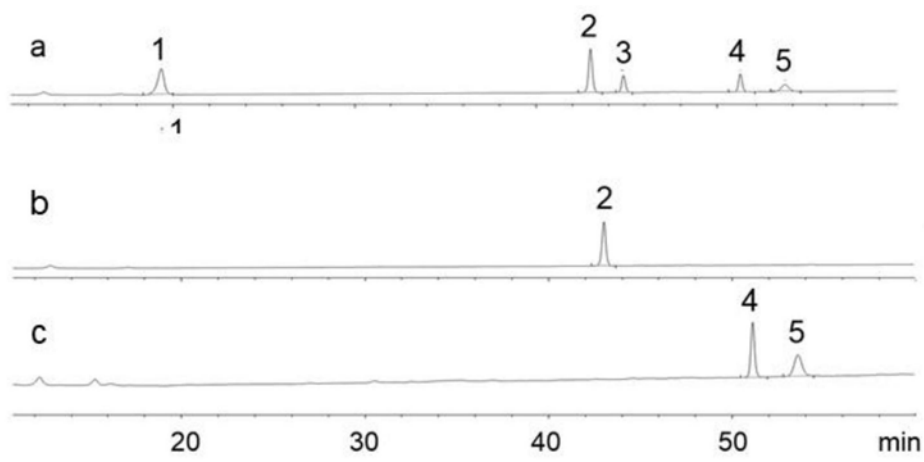


图4