

研究报告

云南省不同地区森林腐木产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性探究及宏基因组分析张林波¹, 杨万松², 曾永杰¹, 李铭刚¹, 赵江源^{*1}

1 云南大学 生命科学学院 教育部西南微生物多样性重点实验室 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091

2 云南悦芳季生物科技有限公司, 云南 昆明 650091

张林波, 杨万松, 曾永杰, 李铭刚, 赵江源. 云南省不同地区森林腐木产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性探究及宏基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2755-2768.

ZHANG Linbo, YANG Wansong, ZENG Yongjie, LI Minggang, ZHAO Jiangyuan. Diversity and metagenomic analysis of β -glucosidase-producing bacteria from decaying wood in forests in different regions of Yunnan Province[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2755-2768.

摘要: 【背景】 β -葡萄糖苷酶可以将多种糖苷底物水解成具有工业意义的苷元, 在食品、医药和工业等方面均有应用。在医药领域中, 它通过转化天然产物中的糖苷化合物, 可用于生产稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。森林腐木中蕴含着丰富的木质纤维素, 这些物质是 β -葡萄糖苷酶降解的底物, 然而, 关于本研究区域产 β -葡萄糖苷酶细菌的发掘并无相关报道。【目的】通过纯培养筛选结合宏基因组分析手段, 发掘 β -葡萄糖苷酶微生物(基因)资源, 并解析不同地区森林腐木的微生物多样性差异。【方法】通过纯培养方法分离细菌, 利用七叶苷培养基和转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的方法筛选产 β -葡萄糖苷酶菌株, 利用宏基因组测序补充纯培养分离筛选工作并探究腐木样品中微生物群落的结构和功能。【结果】从云南省 5 个不同地区, 即师宗县菌子山、昆明团结乡原始森林、武定县万松山、屏边县大围山和金平县分水岭的森林腐木样品中共分离获得 267 株细菌, 通过七叶苷培养基筛选到 154 株产 β -葡萄糖苷酶细菌, 隶属于 4 门 8 纲 13 目 19 科 37 属。产酶菌株中, 变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌门, 金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)为优势菌属, 昆明团结乡原始森林地区产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性最丰富。武定县万松山样品筛选到的菌株 YIM B11765 β -葡萄糖苷酶活最高, 为 0.34 U/mL, 该菌株和菌株 YIM B11728 均可以将人参皂苷 Rb1 和 Rg1 分别转化为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。腐木样品宏基因组分析结果表明, 细菌域占主导地位, 变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinomycetota*)所占丰度最大, 链霉菌属(*Streptomyces*)为优势菌属, 5 个地区样品均是糖苷水解酶类注释到 CAZy 数据库的数量最多, 并从中筛选到 4 个具有转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 潜力的 β -葡萄糖苷酶。昆明团结乡原始森林样品的微生物群落多样性最丰富; 师宗

资助项目: 云南大学校企联合项目(H20240045)

This work was supported by the Yunnan University School-enterprise Cooperation Project (H20240045).

*Corresponding author. E-mail: jyzhao@ynu.edu.cn

Received: 2024-09-10; Accepted: 2024-11-20; Published online: 2024-12-18

县菌子山地区样品碳水化合物活性酶类多样性最丰富。链霉菌属(*Streptomyces*)和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)这2个微生物类群对主要的直系同源簇(cluster of orthologous groups, COG)功能、KEGG 代谢途径以及碳水化合物活性酶的功能贡献度最大。【结论】通过纯培养分离及筛选获得一批产 β -葡萄糖苷酶细菌,其中2株细菌可分别转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。利用宏基因组信息挖掘与 AlphaFold 3 预测的蛋白质三级结构,通过虚拟筛选得到4个具有转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 潜力的 β -葡萄糖苷酶,为纯培养分离筛选作了重要补充。同时,师宗县菌子山地区具有较大的功能微生物资源发掘潜力,为进一步开发利用提供了理论依据。

关键词: 森林腐木; β -葡萄糖苷酶; 活性菌株; 宏基因组分析

Diversity and metagenomic analysis of β -glucosidase-producing bacteria from decaying wood in forests in different regions of Yunnan Province

ZHANG Linbo¹, YANG Wansong², ZENG Yongjie¹, LI Minggang¹, ZHAO Jiangyuan^{*1}

¹ Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

² Yunnan Yuefangji Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Background] β -glucosidases can hydrolyze various glycosidic substrates into aglycones with industrial significance and have applications in food, medicine, and industry. In medicine, β -glucosidases can produce rare ginsenosides CK and 20(S)-Rh1 by transforming glycosides in natural products. Decaying wood in forests contains abundant lignocellulose, which is the degradation substrate of β -glucosidase. However, the discovery of β -glucosidase-producing bacteria in the study area of this study has not been reported. [Objective] To explore the microbial (gene) resources of β -glucosidases by the pure culture method and metagenomic analysis and compare the microbial diversity of decaying wood among different forest regions. [Methods] Bacteria were isolated by the pure culture method, and β -glucosidase-producing strains were screened by the medium containing aesculin and transformation of ginsenosides Rb1 and Rg1. Metagenomic sequencing was performed to supplement the pure culture and screening work and explore the structures and functions of microbial communities in different decaying wood samples. [Results] A total of 267 bacterial strains were isolated from decaying wood samples collected from five different regions in Yunnan Province, including Junzi Mountain in Shizong County, a primitive forest in Tuanjie Township of Kunming City, Wansong Mountain in Wuding County, Dawei Mountain in Pingbian County, and Fenshui Ridge in Jinping County. Among these strains, 154 β -glucosidase-producing strains were screened out, belonging to 37 genera, 19 families, 13 orders, 8 classes of 4 phyla. *Proteobacteria* was the dominant phylum among the enzyme-producing strains, and *Chryseobacterium* was the dominant genus. The primitive forest in Tuanjie Township of Kunming City had the highest diversity of β -glucosidase-producing bacteria. The strain YIM B11765, isolated from Wansong Mountain in

Wuding County, exhibited the highest β -glucosidase activity of 0.34 U/mL. This strain and strain YIM B11728 can transform ginsenosides Rb1 and Rg1 into rare ginsenosides CK and 20(S)-Rh1, respectively. The results of the metagenomic analysis of decaying wood samples indicated that bacteria were dominant, with *Proteobacteria* and *Actinomycetota* showing the largest relative abundance. *Streptomyces* was the predominant genus. Among the samples from the five regions, glycoside hydrolases were the most abundant enzymes annotated in the CAZy database. Furthermore, four β -glucosidases with the potential to catalyze the transformation of ginsenosides Rb1 and Rg1 were screened from these enzymes. The microbial diversity was the highest in the samples from the primary forest in Tuanjie Township of Kunming City. Carbohydrate-active enzymes were the richest in the samples from Junzi Mountain in Shizong County. *Streptomyces* and *Bradyrhizobium* contributed the most to the main COG functions and KEGG metabolic pathways, as well as the functions of carbohydrate-active enzymes. **[Conclusion]** A batch of β -glucosidase-producing bacteria was obtained by pure culture isolation and screening, among which two strains could transform ginsenosides Rb1 and Rg1 into rare ginsenosides CK and 20(S)-Rh1, respectively. After metagenomic information mining, AlphaFold 3 prediction of protein tertiary structure, and virtual screening, four β -glucosidases with the potential to transform ginsenosides Rb1 and Rg1 were obtained, which supplemented the pure culture isolation and screening work. Junzi Mountain in Shizong County demonstrates great potential for the mining of functional microbial resources, which provides a theoretical basis for further development and utilization.

Keywords: decaying wood in forests; β -glucosidase; active strains; metagenomic analysis

β -葡萄糖苷酶作为纤维素降解酶系中的关键酶之一,能够促使 β -D-葡萄糖苷键断裂,进而将糖苷类底物转化为葡萄糖及其相应的配体^[1-2]。由于其高效性、特异性和环境友好性, β -葡萄糖苷酶已被广泛应用于食品加工、医学、工业及生物能源等多个领域。在医药领域中, β -葡萄糖苷酶可以用于转化天然产物中的糖苷化合物,从而改变其生理活性和药用价值。代表性的例子为:特定 β -葡萄糖苷酶可将人参皂苷Rb1转化为稀有人参皂苷CK;人参皂苷Rg1则通过 β -葡萄糖苷酶水解糖苷键直接转化为20(S)-Rh1。稀有人参皂苷CK和20(S)-Rh1具有广泛的药理作用,CK可有效治疗癌症^[3]、糖尿病、炎症、过敏、血管生成、衰老,相较于其他人参皂苷,CK还具有神经保护和保肝作用^[4-8];20(S)-Rh1则具有显著的抗炎和抗氧化活性,并且对免疫调节和认知功能具有积极影响^[9]。然而,目前工业生产中应用于稀有人参皂苷转化

的 β -葡萄糖苷酶存在酶活力较低、稳定性差及生产成本高等问题^[10-11],这在一定程度上限制了稀有人参皂苷的大规模及高效生产应用。

腐木,作为研究微生物多样性和生态功能的重要资源,也是发掘具有工业应用价值的 β -葡萄糖苷酶微生物的宝库。微生物在自然界中分布广泛,主要来源于土壤、水体、极端环境及生物体内。腐木为微生物的生长和繁殖提供了独特的微环境,是微生物栖息地的重要组成部分,其体积和多样性均被认为对腐生生物至关重要,对各种分类群具有重要的生态价值^[12]。 β -葡萄糖苷酶在纤维素降解过程中起着重要的作用,纤维素是植物细胞壁的主要成分,而腐木正是植物残体经过长时间分解形成的。同时,腐木上微生物种类繁多,形成了复杂的微生物群落,它们依赖于分解木材中的纤维素和其他有机物质来获取必需的营养和能量,其中某些微生物可能具有潜在的产 β -葡萄糖苷酶能力。

目前,关于腐木微生物资源的研究,主要集中在从腐木样品中筛选具有纤维素降解能力的菌株^[13-15]。此外,还有一些研究集中在以腐木为研究对象,进行产酶^[16]、抗菌和新物种微生物的分离筛选研究等方面。

本研究以云南省不同地区的森林腐木为对象,通过可培养细菌的分离及产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选,发掘 β -葡萄糖苷酶微生物资源。通过宏基因组分析弥补传统可培养方法的不足,揭示那些难以或无法培养的微生物基因信息。两者结合不仅可以更全面地发掘 β -葡萄糖苷酶微生物资源,而且可以丰富相关地区的微生物多样性。本研究为 β -葡萄糖苷酶微生物资源的发掘提供了一种有效途径,也为工业化开发利用提供了理论依据和实用价值。

1 材料与方 法

1.1 样品采集与处理

本实验的样品均来源于云南省不同地区的森林腐烂朽木,包括师宗县菌子山(树种为麻栎与核桃树,编号为JZS)、昆明团结乡原始森林(树种为滇青冈与云南松,编号为MLSX)、武定县万松山(树种为云南松,编号为WSS)、屏边县大围山(树种以石栎属与青冈属为主,编号为DWS),以及金平县分水岭(树种以石栎属与青冈属为主,编号为FSL)。采集到的样品送回实验室进行微生物分离培养,同时,每个地区各取10份腐朽程度高的样品,混合均匀后取5 g, -80℃保存备用。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

BG11培养基、光合细菌培养基、平板计数肉汤和七叶苷培养基,青岛海博生物技术有限公司。液体发酵培养基(g/L): NaNO_3 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 纤维素粉 5.0, K_2HPO_4 0.1, 酵母浸粉 1.0, pH 6.0。液体培养基(g/L): NaNO_3 3.0, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KCl 0.5, 人参皂苷 10.0 (含二醇组皂苷和三醇组皂苷各

5.0), pH 自然。人参二醇组皂苷(Rb1 为主要成分), 人参三醇组皂苷(Rg1 为主要成分), 人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1 标准品, 上海诗丹德标准技术服务有限公司。超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温摇床, 上海苏坤实业有限公司; 恒温水浴锅, 国华(常州)仪器制造有限公司; 多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; 旋转蒸发仪, BUCHI 有限公司; 高效液相色谱-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司。

1.3 可培养细菌的分离与鉴定

采用稀释涂布法, 将样品涂布于混合培养基分离可培养细菌, 混合培养基由本实验室制备, 由 BG11 培养基、光合细菌培养基和平板计数肉汤培养基按 1:3:10 的比例混合并加入 2% 琼脂制成。待平板上长出单菌落, 纯化后转接于斜面培养基备用。采用 Chelex-100 法提取菌株的基因组 DNA, 利用通用引物 PA (5'-CAG AGTTTGATCCTGGCT-3') 和 PB (5'-AGGAGGT GATCCAGCCGCA-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板 1.0 μL , 引物 PA、PB (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , Green Taq Mix 11 μL , ddH₂O 12 μL 。PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 32 次循环; 72℃ 10 min。目的基因委托北京擎科生物科技股份有限公司(昆明)测序, 测序结果在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行相似性比对。

1.4 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选

1.4.1 酶活定性初筛

取 200 μL 已灭菌的七叶苷培养基加入 96 孔板中, 随后接种待测菌株, 30℃ 培养 24 h。根据颜色变黑程度初步评估其产酶活性。

1.4.2 粗酶液的制备

选取 96 孔板中颜色变黑的菌株, 用接种环刮取一环菌体接种于 50 mL 液体发酵培养基中, 30℃、150 r/min 振荡培养 5 d。取 2 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 15 min, 所得上清液即为粗酶液。

1.4.3 β -葡萄糖苷酶酶活定量测定

取 200 μL 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、

0.8、1.0、1.2、1.4 $\mu\text{mol/mL}$ 的对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, pNP)梯度稀释标准液和 2 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液混合后,各加入 2 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液充分混匀,用酶标仪测定反应液的 OD_{410} ,根据测定值绘制标准曲线。

取 2 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 0.5 mL 5 mmol/L 对-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG)溶液混合,水浴预热后加入 0.5 mL 粗酶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,加入 2 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应,用酶标仪测定反应液的 OD_{410} (以煮沸处理过的粗酶液作为空白对照)。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下每分钟水解 pNPG 生成 1 μmol pNP 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.5 菌株转化人参皂苷试验

1.5.1 转化试验

无菌条件下,将各地区酶活最高的菌株接种到液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床培养 2 周。培养结束后用滤纸过滤培养液,菌丝滤渣中加入 50 mL 95%乙醇,浸泡 24 h 后再次过滤,收集滤液,再次将滤液定容至 50 mL,取出 10 mL 滤液旋转蒸发浓缩至干燥,干燥后的浓缩液用移液枪精密吸取 1 mL 甲醇溶解。

1.5.2 薄层色谱法检测转化产物

将样品和标准品溶液点于 G60 硅胶板(5 cm $\times$ 10 cm),吹干后置展层剂中使其上行展层,展层剂为氯仿:甲醇:水=87:13:1。展层完毕后置碘缸中使皂苷显色,与皂苷的标准样品进行对照,通过比移值(R_f =斑点中心到起始线的距离/溶剂前沿到起始线的距离)对皂苷成分进行初步鉴定。

1.5.3 质谱法分析转化产物

质谱条件:Agilent HPLC1100 MSD/TOF,电喷雾离子源,正离子或负离子模式,流动相甲醇/水(含 0.1%甲酸,80:20),流速 0.2 mL/min,离子源温度 325 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流速 7 L/min,裂解电压 150 V。

方法:在进行薄层色谱分析后,刮取硅胶

板上与人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1 标准品相对应位置的色谱条带,用 1 mL 甲醇溶解,然后用 0.45 μm 过滤器过滤除去硅胶,收集滤液,上机测试。

1.6 宏基因组测序

委托上海美吉生物医药科技有限公司提取样品(编号为 JZS、MLSX、WSS、DWS、FSL)总 DNA,并进一步构建宏基因组文库完成宏基因组测序工作。

1.7 宏基因组生物学信息学分析

本试验通过美吉云平台进行。基于原始测序数据,使用 Fastp 软件对其进行数据质量控制,获得后续分析需要的高质量数据。使用 Megahit 软件对短序列进行拼接组装,使用 Prodigal 软件预测组装结果中的开放阅读框架,并将其翻译为氨基酸序列。最后,通过 CD-HIT 软件将预测出来的基因序列进行聚类并构建非冗余基因集。

使用 Diamond 和 BLASTp 工具将非冗余基因集与非冗余蛋白数据库(non-redundant protein database, NR)、直系同源簇(cluster of orthologous groups, COG)、京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)进行比对,并通过对数据库获得相关注释,使用 hmmscan 工具将非冗余基因集与碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)数据库进行比对,获得基因对应的碳水化合物活性酶注释信息。基于 Mothur 对应指数分析的算法,使用 R 包进行 α 多样性指数的计算。

1.8 宏基因组特定 β -葡萄糖苷酶基因虚拟筛选

通过 AlphaFold 3 预测 β -葡萄糖苷酶基因编码蛋白的三级结构,选取预测模板建模得分(the predicted template modeling score, pTM) ≥ 0.9 的酶蛋白分别与人参皂苷 Rb1 和 Rg1 进行分子对接,其中人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的三级结构文件从 ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>)

Default.aspx)网站下载保存。利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接研究,最后使用 PyMOL 软件进行可视化,利用 PLIP 工具(<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)分析蛋白质-配体的相互作用。通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa%20_sopma.html)网站分别对筛选到的 β -葡萄糖苷酶蛋白理化特性和二级结构进行分析。利用 DoGSite3 (<https://proteins.plus/>)网站分析预测 β -葡萄糖苷酶蛋白三级结构的结合位点。

2 结果与分析

2.1 腐木细菌纯培养分离结果

从 5 个地区森林腐木样品中共分离到 267 株细菌,隶属于 4 门 8 纲 15 目 24 科 50 属,其中变形菌门(*Proteobacteria*) 151 株,拟杆菌门(*Bacteroidota*) 63 株,放线菌门(*Actinomycetota*) 29 株,厚壁菌门(*Firmicutes*) 24 株。分离细菌中金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)数量最多,为 37 株,其次是假单胞菌属(*Pseudomonas*) 30 株,寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*) 18 株,这 3 个属和芽孢杆菌属(*Bacillus*)为 5 个地区共有。本研究分离到的 267 株细菌的 16S rRNA 基因序列已提交至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC),编号为 NMDCN00069AN。

2.2 产酶菌株筛选结果

2.2.1 酶活性筛选结果

从 5 个地区样品分离到的 267 株菌株中筛选获得 154 株产 β -葡萄糖苷酶细菌,隶属于 4 门 8 纲 13 目 19 科 37 属。产酶菌株中,金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)数量最多(25 株),也是菌子山、万松山和大围山样品的优势菌属;申氏菌属(*Shinella*)和柔武氏菌属(*Raoultella*)分别为昆明团结乡原始森林和分水岭样品的优势菌属。

对不同地区样品产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性进行分析,结果如表 1 所示,从昆明团结乡

表 1 不同地区森林腐木样品产 β -葡萄糖苷酶菌株多样性

Table 1 Diversity of β -glucosidase-producing strains in forest decaying wood samples from different regions

Sample name	Number of strains	Number of genera	Shannon	Simpson
JZS	22	8	1.87	0.14
MLSX	36	20	2.83	0.04
WSS	30	11	2.18	0.11
DWS	34	12	2.26	0.09
FSL	32	13	2.19	0.12

JZS: 师宗县菌子山; MLSX: 昆明团结乡原始森林; WSS: 武定县万松山; DWS: 屏边县大围山; FSL: 金平县分水岭。下同。

JZS: Junzi Mountain in Shizong County; MLSX: Kunming Tuanjie Township primitive forest; WSS: Wansong Mountain in Wuding County; DWS: Dawei Mountain in Pingbian County; FSL: Fenshui Ridge in Jinping County. The same below.

原始森林样品分离到的菌株中筛选到 36 株产酶细菌,分布在 20 个属,其 Shannon 指数为 2.83, Simpson 指数为 0.04,表明该地区产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性较为丰富;其次是大围山样品,筛选到 34 株产酶细菌,分布在 12 个属;万松山和分水岭样品的产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性差异不大;菌子山样品的产 β -葡萄糖苷酶细菌多样性则相对最低。

2.2.2 酶活定量测定结果

采用 pNPG-酶标仪法评估 154 株产 β -葡萄糖苷酶细菌的酶活性水平,标准曲线为 $y=0.4156x+0.0734$, $R^2=0.9992$,其中 x 为 pNP 浓度($\mu\text{mol/mL}$), y 为该浓度对应的吸光度值。根据标准曲线计算 β -葡萄糖苷酶酶活,结果表明,万松山样品的菌株 YIM B11765 酶活最高,为 0.34 U/mL,其次是大围山样品的菌株 YIM B11798,酶活为 0.31 U/mL。

2.3 菌株转化人参皂苷实验结果

通过薄层色谱检测,条带 S1 和 S2 分别对应人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1 标准品(图 1),初步表明菌株 YIM B11728 和 YIM B11765 可以将人参皂苷 Rb1 和 Rg1 分别转化为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。

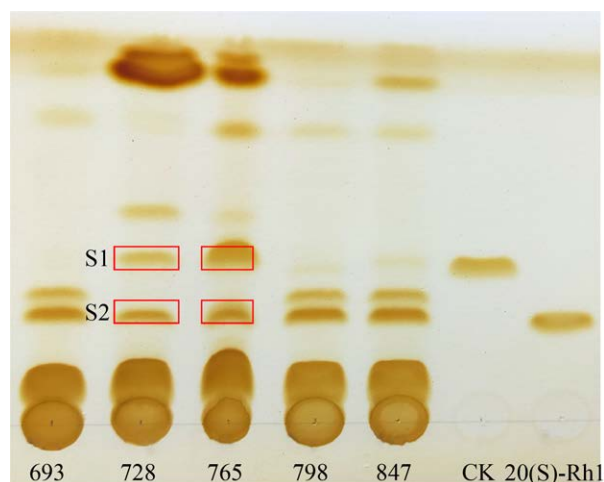


图 1 菌株转化人参皂苷的薄层色谱检测结果
Figure 1 Thin-layer chromatography detection results of ginsenoside transformation by strains.

通过质谱进一步检测菌株 YIM B11728 和 YIM B11765 的转化产物。在条带 S1 和 S2 的质谱分析中, 人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1 均以 $[M+Na]^+$ 的形式被检测到(图 2)。条带 S1 的质荷比为 $[M+Na:645.43]^+$, 表示其分子式为 $C_{36}H_{62}O_8$, 相应的分子量为 622.43; 条带 S2 的质荷比为 $[M+Na:661.43]^+$, 表示其分子式为 $C_{36}H_{62}O_9$, 相应的分子量为 638.43。鉴于条带 S1 和 S2 的分子式和分子量与已知的人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1 相匹配, 可以鉴定这 2 个条带的化合物分别为人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。结果表明, 菌株 YIM B11728 和 YIM B11765 可以将人参皂苷 Rb1 和 Rg1 分别转化为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。

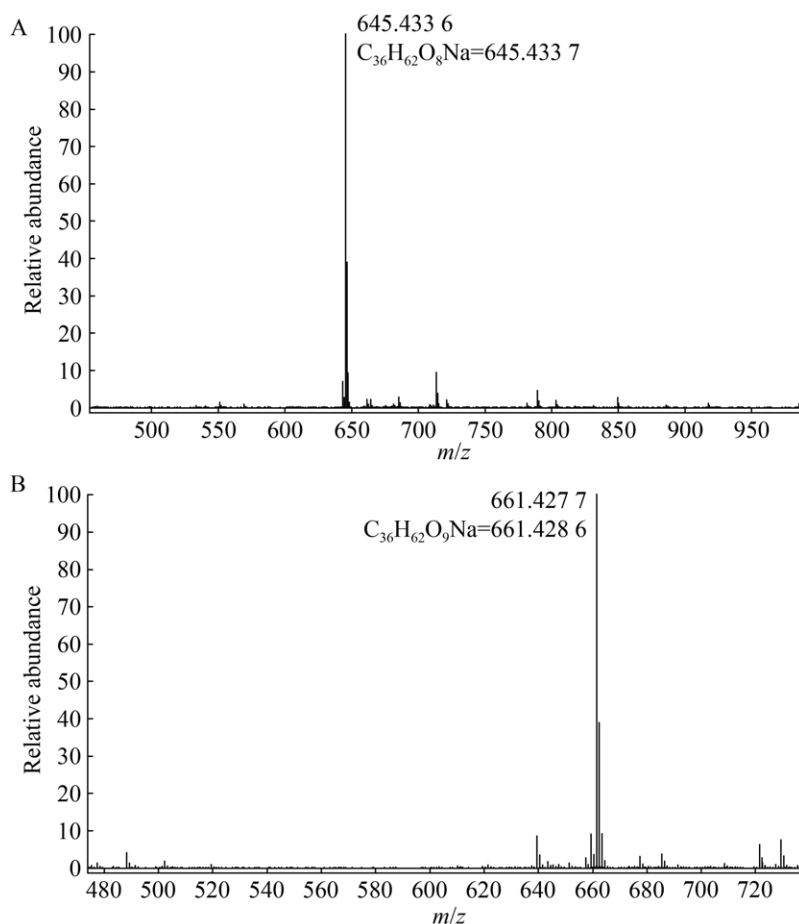


图 2 条带 S1 (A)和 S2 (B)的质谱图
Figure 2 Mass spectra of bands S1 (A) and S2 (B).

2.4 宏基因组测序分析结果

2.4.1 宏基因组测序信息

五个地区样品质控后得到的 clean read 条数范围为 42 252 094–53 448 196, 组装得到的 contig 范围为 276 009–356 685。每个地区碱基质量值达到 20 以上的序列占比均高于 97%, 达到 30 以上的序列占比均高于 91%, G+C 碱基含量为 58%–60%。N50 值在 450 bp 以上(表 2)。去冗余前所有样品共预测到 1 870 280 个基因, 所有样品基因的平均序列长度为 405.59 bp, 通过聚类得到 1 398 448 个非冗余基因集基因, 总序列长度为 633 247 758 bp, 平均序列长度为 452.82 bp。

2.4.2 样品物种与功能注释

使用 BLASTp 将非冗余基因集与 NR 数据库进行比对, 结果显示, 5 个地区样品总微生物物种注释共发现 230 个门 462 个纲 945 个目 1 909 个科 5 288 个属 27 524 个种。

细菌域占主导地位, 其相对丰度为 97.51%; 真核生物域相对丰度为 2.08%; 真菌界的相对丰度为 1.73%。物种门水平上, 变形菌门和放线菌门所占丰度最大, 占比分别为 35.49% 和 28.79%。物种属水平上, 链霉菌属(*Streptomyces*) 为优势菌属, 占比 11.41%, 其次是慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*), 占比为 6.05%。将物种属水平总丰度前 50 的物种绘制群落柱形图(图 3), 菌子山样品中, 链霉菌属、慢生根瘤菌属为优势菌属; 昆明团结乡原始森林样品中, 土壤杆菌属(*Edaphobacter*) 和慢生根瘤菌属为优势菌属; 万松山样品中, 慢生根瘤菌属和诺卡氏菌属(*Nocardia*) 为优势菌属; 大围山和分水岭样

品中, 慢生根瘤菌属为优势菌属。

通过与 CAZy 数据库进行比对, 注释结果显示, 糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)注释到的基因数量最多, 有 19 677 个, 其次是糖基转移酶(glycosyl transferase, GT)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)、辅助氧化还原酶(auxiliary activity, AA)、碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM)和多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL), 注释到的基因数量分别是 15 159、7 513、5 064、2 143 和 1 351; 此外, 还注释到 20 个纤维素酶体模块。

五个地区样品中, 均是糖苷水解酶基因注释到的最多, 其中菌子山注释到 4 394 个糖苷水解酶基因和 12 个纤维素酶体模块基因; 昆明团结乡原始森林注释到 4 278 个糖苷水解酶基因; 万松山注释到 5 254 个糖苷水解酶基因和 4 个纤维素酶体模块基因; 大围山注释到 2 890 个糖苷水解酶基因; 分水岭注释到 2 861 个糖苷水解酶基因和 4 个纤维素酶体模块基因。

2.4.3 样品 α 多样性分析

对 5 个地区样品进行群落结构 α 多样性分析, 分类水平为 species, 结果如表 3 所示, 5 个地区样品的物种丰富度范围在 13 234–17 195 之间, Shannon 指数范围在 5.74–6.17 之间。昆明团结乡原始森林地区的物种丰富度最高, 群落多样性也最高, 表明该地区的微生物群落多样性最丰富。

对 5 个地区样品进行碳水化合物活性酶 α 多样性分析, 分类水平为 family, 结果如表 4 所示, 5 个地区样品的碳水化合物活性酶丰富度范围在 362–415 之间; Shannon 指数范围在

表 2 样品宏基因组测序信息

Table 2 Sample metagenome sequencing information

Sample	Clean read	Clean base (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C (%)	N50 (bp)
MLSX	43 840 886	6 552 962 139	97.30	92.25	59.58	531
WSS	42 252 094	6 317 939 708	97.72	93.33	58.87	506
JZS	43 644 460	6 519 462 047	97.17	91.93	60.30	812
DWS	46 472 686	6 970 457 533	97.93	93.84	58.28	460
FSL	53 448 196	8 027 777 549	97.91	93.74	59.13	452

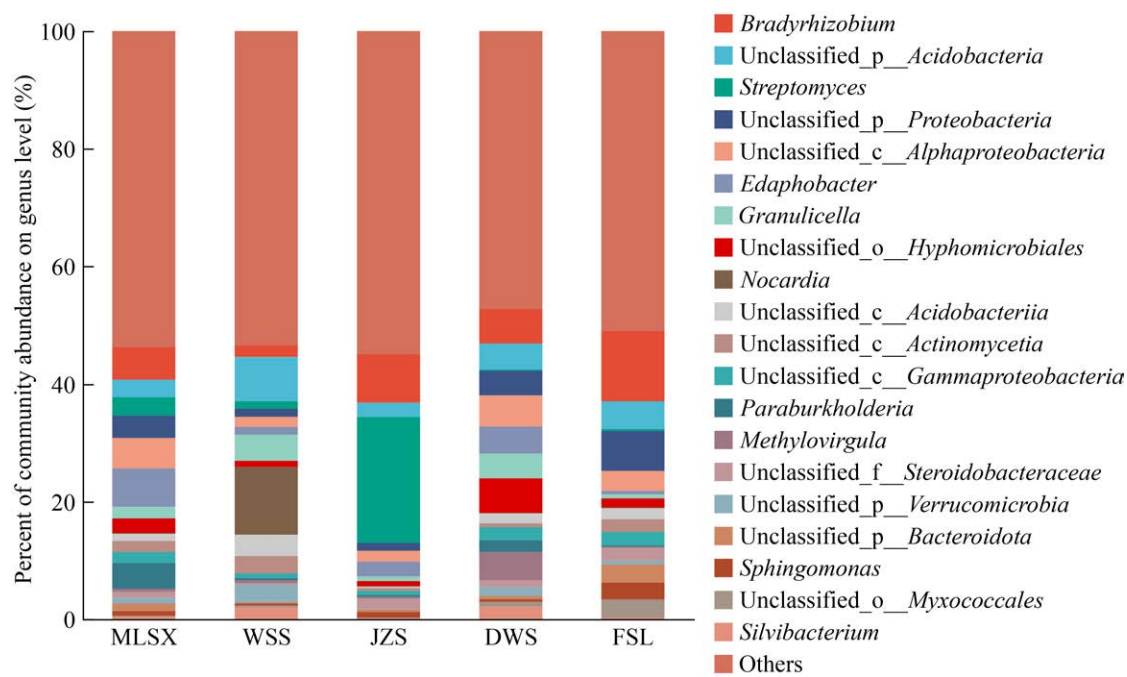


图 3 不同地区样品物种属水平群落柱形图
Figure 3 The community histogram of sample species in different regions at the genus level.

表 3 五个地区样品群落结构 α 多样性指数表
Table 3 Alpha diversity index table of sample community structure in five regions

Sample code	Sobs	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
DWS	13 234	13 234	13 234	5.74	0.02
WSS	15 495	15 495	15 495	5.96	0.02
MLSX	17 195	17 195	17 195	6.17	0.01
FSL	14 186	14 186	14 186	6.11	0.01
JZS	15 957	15 957	15 957	6.08	0.02

表 4 五个地区样品碳水化合物活性酶 α 多样性指数表
Table 4 Alpha diversity index table of carbohydrate active enzymes in five regions

Sample code	Sobs	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
DWS	362	362	362	4.57	0.02
WSS	413	413	413	4.65	0.02
MLSX	403	403	403	4.65	0.02
FSL	374	374	374	4.67	0.02
JZS	415	415	415	4.78	0.02

4.57–4.78，万松山、昆明团结乡原始森林和分水岭样品的 Shannon 指数差异不大，其中菌子山样品的丰富度和多样性指数均最高，表

明该地区样品碳水化合物活性酶类多样性最丰富。

2.4.4 样品物种与功能贡献度分析

通过美吉宏基因组云平台分别选取总丰度前 10 的微生物类群和主要的 COG 功能、KEGG 代谢途径和碳水化合物活性酶进行物种与功能贡献度分析。这些微生物类群的丰度均与 4 种主要的 COG 功能(E 氨基酸转运和代谢、G 碳水化合物的运输和代谢、R 仅一般功能预测和 K 转录)、6 种最丰富的 KEGG 代谢途径(代谢途径、次生代谢物的生物合成、不同环境中的微生物新陈代谢、碳代谢、氨基酸的生物合成和 ABC 转运体)以及 6 种碳水化合物活性酶(图 4)相关。

氨基酸转运和代谢、碳水化合物的运输和代谢这 2 个 COG 功能类别以及 6 种 KEGG 代谢途径均是链霉菌属和慢生根瘤菌属贡献度最大，而这 2 个微生物类群在菌子山样品中占比最大。转录功能中则是链霉菌属和无色杆菌属(*Achromobacter*)贡献度最大。

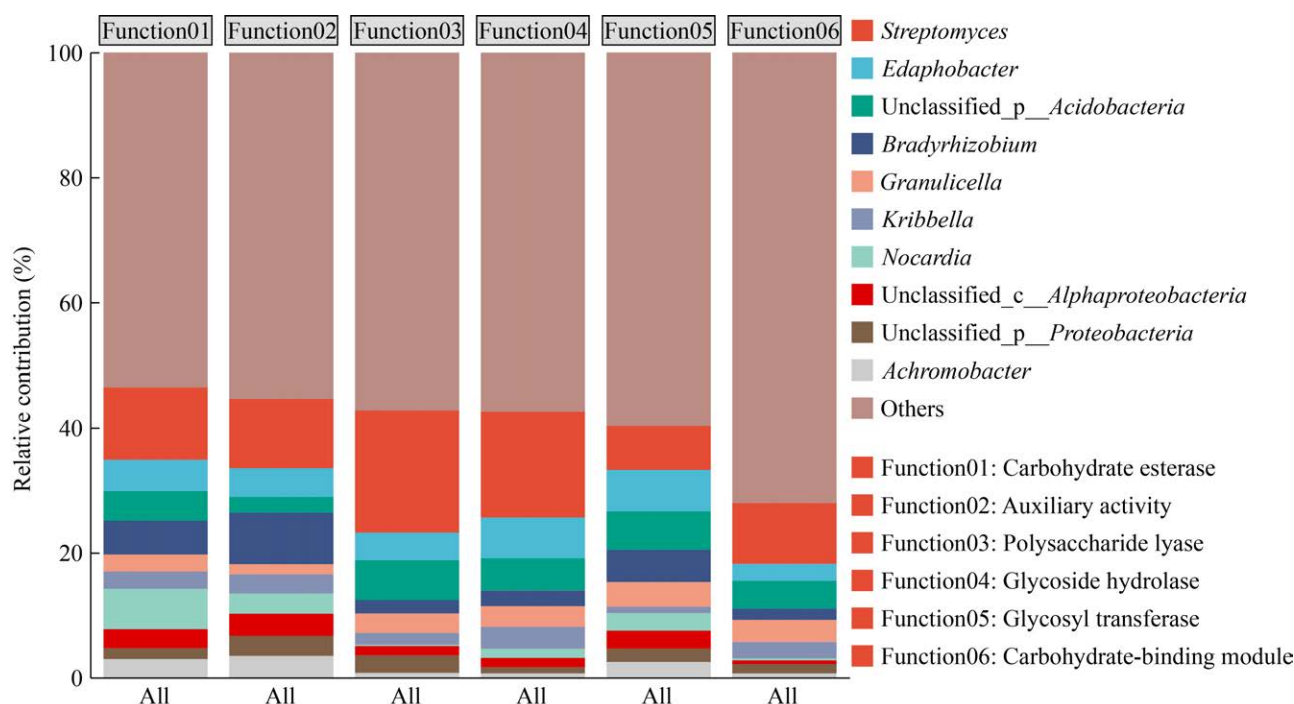


图4 物种与碳水化合物活性酶功能贡献分析柱状图

Figure 4 Histogram of species and carbohydrate-active enzyme function contribution analysis.

六种碳水化合物活性酶中,也是链霉菌属微生物类群贡献度最大,糖苷水解酶和多糖裂解酶类中,链霉菌属的贡献度尤为突出,该微生物类群同样在菌子山样品中占比最大;碳水化合物酯酶中,链霉菌属和诺卡氏菌属贡献度最大;糖基转移酶中,链霉菌属和土壤杆菌属贡献度最大(图4)。

2.5 特定 β -葡萄糖苷酶基因虚拟筛选结果

通过可培养方法从样品中分离筛选到具有 β -葡萄糖苷酶活性且能转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的菌株,随后的宏基因组测序分析揭示了样品中糖苷水解酶基因注释到的数量最多。因此,进一步分析糖苷水解酶,挖掘具有转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 功能潜力的 β -葡萄糖苷酶基因。

结果表明,注释到的糖苷水解酶基因来自258个家族,其中包含115个亚家族,大多数的基因来源于GH1、GH2、GH3、GH15、GH23、GH74和GH109家族,属于 β -葡萄糖苷酶的GH1

和GH3家族基因数量分别为439个和793个。从糖苷水解酶GH1和GH3家族中筛选到25个编码氨基酸序列长度大于400的 β -葡萄糖苷酶基因。

使用AlphaFold 3预测25个 β -葡萄糖苷酶基因编码酶蛋白的三级结构,选取4个pTM $\geq$ 0.9的 β -葡萄糖苷酶,分别与人参皂苷Rb1和Rg1分子对接,结果如表5和图5所示。4个 β -葡萄糖苷酶均来源于师宗县菌子山样品,分子对接结合物中酶蛋白形成的结合口袋紧密地包裹住底物分子,并且对接的结合能均低于-8.0 kcal/mol,表明筛选到的 β -葡萄糖苷酶能够有效地与人参皂苷Rb1和Rg1结合,并且它们能够形成稳定的复合物。

通过BLASTp比对筛选到的4个 β -葡萄糖苷酶蛋白中JZS_k97_221105_3、JZS_k97_304729_6与链霉菌属(*Streptomyces*)来源的 β -葡萄糖苷酶相似性最高(登录号分别为WP_050362547.1和WP_255947269.1),酶蛋白JZS_k97_56797_3与慢

表 5 β -葡萄糖苷酶蛋白三级结构预测得分及分子对接结果
Table 5 β -glucosidase protein tertiary structure prediction scores and molecular docking results

Enzyme number	Prediction score of tertiary structure of β -glucosidase		Minimum binding energy for molecular docking (kcal/mol)	
	ipTM	pTM	Ginsenoside Rb1	Ginsenoside Rg1
JZS_k97_304729_6	0.85	0.90	-9.20	-8.10
JZS_k97_221105_3	0.86	0.90	-9.90	-9.70
JZS_k97_56797_3	0.88	0.92	-9.40	-9.50
JZS_k97_180145_3	0.88	0.90	-10.90	-10.80

ipTM: 界面预测模板建模得分; pTM: 预测模板建模得分。
ipTM: The interface predicted template modeling score; pTM: the predicted template modeling score.

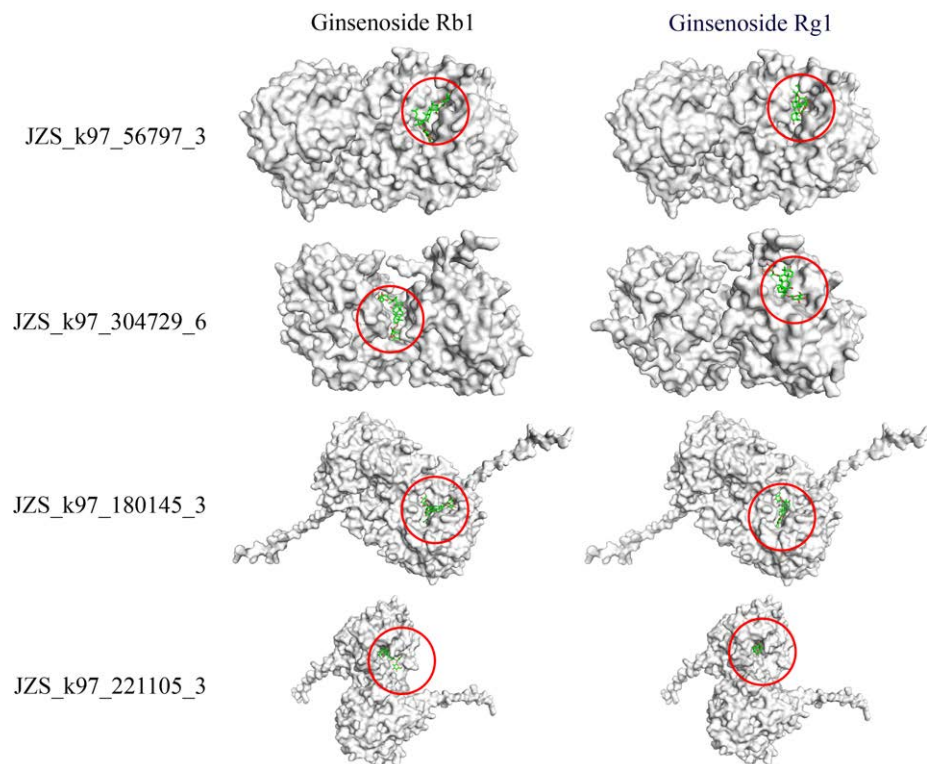


图 5 预测 β -葡萄糖苷酶与人参皂苷 Rb1 和 Rg1 结合物的表面模型 红圈内为人参皂苷配体在预测酶蛋白上的相对位置。

Figure 5 Surface model for predicting the binding of β -glucosidase with ginsenosides Rb1 and Rg1. The red circle is the relative position of ginsenoside ligand on the predicted enzyme protein.

生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)来源的 β -葡萄糖苷酶相似性最高(登录号为 HUN99778.1), 酶蛋白 JZS_k97_180145_3 与土壤杆菌属(*Edaphobacter*)来源的 β -葡萄糖苷酶相似性最高(登录号为 WP_299377524.1)。同样地, 对 4 个已报道的 β -葡萄糖苷酶进行了理化特性、二级结构和结

合位点的分析。结果表明, 本研究筛选的酶在理论等电点、消光系数、 β -转角含量及结合口袋方面与这些报道的 β -葡萄糖苷酶均存在差异(表 6)。对 4 个已报道的 β -葡萄糖苷酶进行人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的分子对接研究后发现, 相较于本研究筛选的酶蛋白, 在形成氢键的数量及

表 6 β -葡萄糖苷酶蛋白差异分析结果Table 6 The results of differential analysis of β -glucosidase protein

Enzyme number	Theoretical pI	Extinction coefficient	β -turn (%)	Binding pocket		
				Volume [$\text{\AA}^3$]	Surface [$\text{\AA}^2$]	Depth [$\text{\AA}$]
JZS_k97_304729_6	5.74	105 310	8.64	399.87	470.54	16.90
WP_255947269.1	5.51	108 415	8.44	467.97	554.56	20.02
JZS_k97_221105_3	5.00	95 340	9.49	314.37	397.18	13.62
WP_050362547.1	5.04	95 340	9.07	309.25	386.63	12.87
JZS_k97_56797_3	5.70	89 270	8.61	173.06	278.53	11.62
HUN99778.1	5.66	90 760	6.86	176.13	252.83	8.04
JZS_k97_180145_3	7.09	99 365	8.64	315.90	457.16	13.69
WP_299377524.1	6.81	100 855	9.05	276.48	394.72	14.97

参与氢键的活性位点氨基酸残基组成上也存在差异。

通过 AlphaFold 3 快速准确地预测蛋白质三维结构, 结合计算机辅助的分子对接技术, 我们能够从宏基因组数据中识别出具有特定结构特征或潜在生物活性的蛋白质。这一过程不仅加速了从大量数据中筛选出有前景的候选蛋白质, 而且为后续的实验验证和应用开发奠定了基础。

3 讨论

云南省坐落于我国西南部, 因其独特的地理位置和多样的气候条件, 孕育了繁茂的森林生态系统以及丰富的生物多样性。当树木老化或死亡后, 微生物作为分解者会在腐木上繁殖并分解这些有机物质, 释放出养分, 这提供了天然丰富的资源, 其中存在大量的木质纤维素, 这些物质是 β -葡萄糖苷酶降解的底物。同时, 腐木上各种微生物种类繁多, 形成了复杂的微生物群落, 其中某些微生物可能具有潜在的产 β -葡萄糖苷酶能力。通过宏基因组测序分析, 我们发现在森林腐木样品中, 细菌占据了优势地位, 而真菌界的相对丰度仅为 1.73%, 表明细菌是发掘 β -葡萄糖苷酶的重要微生物资源。

通过对产 β -葡萄糖苷酶菌株的酶活进行评估, 我们发现在森林腐木样品中分离得到的菌株 YIM B11765 表现出最高的酶活性。该菌株被鉴

定为雷夫松氏菌属(*Leifsonia*)。先前的研究中, He 等^[17]从 *Leifsonia* 中成功克隆并表达了一种新型 β -葡萄糖苷酶, 该酶表现出优异的葡萄糖耐受性。王茜等^[18]也成功克隆并表达了 *Leifsonia* 的一个 GH3 家族糖苷酶基因, 该酶可用于以藏红花素为底物制备藏红花苷。在本研究中, 菌株 YIM B11765 和 YIM B11728 可将人参皂苷 Rb1 和 Rg1 分别转化为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。目前, 关于 *Leifsonia* 转化人参皂苷的报道相当有限, 因此, 这些菌株的发现具有重要的应用潜力。此外, 菌株 YIM B11728 被鉴定为微杆菌属(*Microbacterium*), Cheng 等^[19]筛选到能将人参皂苷 Rb1 或 Rd 转化为 Rg3 的微杆菌属菌株。Quan 等^[20]克隆表达了微杆菌属菌株的 β -葡萄糖苷酶基因, 该重组酶能将人参皂苷 Rb1 转化为 Rg3。Quan 等^[21]还克隆并表征了微杆菌属菌株的 β -葡萄糖苷酶基因, 该重组酶能将人参皂苷 Rb1 转化为稀有人参皂苷 Rd 和 CK。Kim 等^[22]则分离到能将人参皂苷 Rb1 转化为 Rd 和 Rh2 的微杆菌属菌株。综上所述, 未来的研究可以探索这 2 株菌的最适生长条件并优化人参皂苷转化的条件, 以提高人参皂苷的转化率和产量。

我们还从 CAZy 数据库注释结果中筛选到 4 个 β -葡萄糖苷酶, 这些酶均来源于师宗县菌子山样品, 4 个 β -葡萄糖苷酶蛋白与人参皂苷 Rb1 和 Rg1 进行分子对接, 其对接结合能均低于

-8.0 kcal/mol, 表明筛选的 β -葡萄糖苷酶可以与人参皂苷 Rb1 和 Rg1 有效结合。对比先前的研究, Hong 等^[23]使用来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的商业 β -葡萄糖苷酶与人参皂苷 Rb1 进行分子对接, 其最低亲和值为-14.39 kcal/mol。 β -葡萄糖苷酶 BaBgl1A 和 B1BG3 与人参皂苷 Rb1 分子对接的最低结合能分别为-7.0 kcal/mol 和 -9.1 kcal/mol^[24]。Zhong 等^[25]通过对 β -葡萄糖苷酶和人参皂苷 Rb1 进行分子对接研究, 显示其最低亲和值为-8.9 kcal/mol。潘虹等^[26]研究发现, 野生型和突变型 β -葡萄糖苷酶与人参皂苷 Rb1 分子对接的最低结合能分别为-5.93 kJ/mol 和-9.02 kJ/mol。经过分子对接研究, 表明宏基因组测序结果中筛选到的 β -葡萄糖苷酶具备转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的潜力。

通过宏基因组分析发现, 链霉菌属和慢生根瘤菌属为菌子山样品的优势菌属。这 2 个微生物类群对多种功能贡献度最大, 并且 5 个地区样品中, 在菌子山样品中的占比最大。链霉菌属作为抗生素的主要生产者, 还具有生物防治和促进植物生长的作用。慢生根瘤菌属则能够与豆科植物共生形成根瘤, 具有固氮作用, 这对于农业生产具有重要意义。本研究的菌株纯培养并未分离到这 2 个属的菌株, 因此, 对该地区资源的深度开发, 有望发现能够产生新抗生素或其他活性物质的菌株, 这将为药物研发、生物防治、酶制剂的开发等提供新的微生物资源, 在农业生产上也有积极的应用前景。

4 结论

本研究从云南省 5 个不同地区, 即师宗县菌子山、昆明团结乡原始森林、武定县万松山、屏边县大围山和金平县分水岭的森林腐木样品中分离到 267 株细菌, 筛选获得 154 株产 β -葡萄糖苷酶细菌。其中, 菌株 YIM B11765 的 β -葡萄糖苷酶活最高, 为 0.34 U/mL, 该菌株和 YIM B11728 均可将人参皂苷 Rb1 和 Rg1 分别转化为稀有人参皂苷 CK 和 20(S)-Rh1。宏基因组测序

分析揭示了原核微生物为森林腐木样品中的优势种群, 并且细菌是发掘 β -葡萄糖苷酶的重要资源。测序结果中筛选到 4 个来源于菌子山样品的 β -葡萄糖苷酶, 这些酶具有转化人参皂苷 Rb1 和 Rg1 的潜力。此外, 师宗县菌子山地区蕴藏着丰富的产生抗生素和固氮生物活性等的功能微生物资源, 具有较大的发掘潜力。本研究中纯培养筛选与宏基因组分析相结合的方法是发掘 β -葡萄糖苷酶微生物资源的重要途径, 研究结果为深入开发利用微生物资源提供了理论依据, 并为基因工程菌的构建奠定了基础。

作者贡献声明

张林波: 设计实验方案、开展实验、实验数据分析、撰写及修改论文; 杨万松: 资金支持; 曾永杰: 协助数据处理; 李铭刚: 学术指导、论文审稿及修改; 赵江源: 论文审稿及修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 王晨, 李家儒. 植物 β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(2): 101-109.
WANG C, LI JR. Research progress of plant β -glucosidase[J]. Biotic Resources, 2021, 43(2): 101-109 (in Chinese).
- [2] 陶后怡, 凌焰辉, 袁满, 唐嬉月, 王圆圆, 魏胜华. 苹果籽中 β -葡萄糖苷酶提取过程的研究[J]. 当代化工研究, 2022(19): 69-71.
TAO HY, LING YH, YUAN M, TANG XY, WANG YY, WEI SH. Study on extraction of β -glucosidase from apple seeds[J]. Modern Chemical Research, 2022(19): 69-71 (in Chinese).
- [3] CAO SS, YANG F, TIAN F, LIU XC, FAN DD, WU ZS. Immobilized β -glucosidase on Cu(PTA) for the green production of rare ginsenosides CK[J]. Process Biochemistry, 2023, 133: 169-178.
- [4] MORSHED MN, AKTER R, KARIM MR, IQBAL S, KANG SC, YANG DC. Bioconversion, pharmacokinetics, and therapeutic mechanisms of ginsenoside compound K and its analogues for treating metabolic diseases[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2024, 46(3): 2320-2342.
- [5] JIANG YY, LI WN, FAN DD. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside CK by strain XD101: a safe bioconversion strategy[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(7): 2110-2127.

- [6] JIN Y, WANG DD, IM WT, SIDDIQI MZ, YANG DC. Ketoneization of ginsenoside C-K by novel recombinant 3- β -hydroxysteroid dehydrogenases and effect on human fibroblast cells[J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3792.
- [7] SONG WS, SHIN KC, OH DK. Production of ginsenoside compound K from American ginseng extract by fed-batch culture of *Aspergillus tubingensis*[J]. *AMB Express*, 2023, 13(1): 64.
- [8] KIM H, JEONG EJ, HWANG B, LEE HD, LEE S, JANG M, YEO K, SHIN Y, PARK S, LIM WT, KIM WJ, MOON SK. Pharmacological effects of biologically synthesized ginsenoside CK-rich preparation (AceCK40) on the colitis symptoms in DSS-induced Caco-2 cells and C57BL mice[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155301.
- [9] TAM DNH, TRUONG DH, NGUYEN TTH, QUYNH LN, TRAN L, NGUYEN HD, SHAMANDY BE, LE TMH, TRAN DK, SAYED D, VU VV, MIZUKAMI S, HIRAYAMA K, HUY NT. Ginsenoside Rb1: a systematic review of its pharmacological properties[J]. *Planta Medica*, 2018, 84(3): 139-152.
- [10] YANG WQ, SU YW, WANG RB, ZHANG HY, JING HY, MENG J, ZHANG GQ, HUANG LQ, GUO LP, WANG J, GAO WY. Microbial production and applications of β -glucosidase: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 256: 127915.
- [11] 冯伦元, 何腊平, 李翠芹, 张宏文, 邢书奇, 陈翠翠. 贵州传统发酵豆制品中水解银杏黄酮苷的微生物 β -葡萄糖苷酶筛选[J]. *微生物学报*, 2020, 60(2): 320-332.
- FENG LY, HE PH, LI CQ, ZHANG HW, XING SQ, CHEN CC. Screening of *Ginkgo*-flavonoids-hydrolyzing microbial β -glucosidase from traditional fermented soybean in Guizhou[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(2): 320-332 (in Chinese).
- [12] BUJOCZEK L, BUJOCZEK M. Factors influencing the diversity of deadwood, a crucial microhabitat for many rare and endangered saproxylic organisms[J]. *Ecological Indicators*, 2022, 142: 109197.
- [13] 冯欣欣, 李凤兰, 徐永清, 李磊, 贺付蒙, 冯艳忠, 袁强, 刘娣. 新疆寒冷地区腐木中产纤维素酶菌株的筛选与低温产酶特性[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(8): 1468-1476.
- FENG XX, LI FL, XU YQ, LI L, HE FM, FENG YZ, YUAN Q, LIU D. Screening of cellulase producing strains from rotten wood in Xinjiang cold area and analysis of their characteristics of enzyme production at low temperature[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(8): 1468-1476 (in Chinese).
- [14] 毛婷, 朱瑞清, 牛永艳, 杜津昊, 郑群, 王治业. 纤维素降解芽孢菌的筛选及产酶条件优化[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 71-76.
- MAO T, ZHU RQ, NIU YY, DU JH, ZHENG Q, WANG ZY. Screening and enzyme production conditions optimization of cellulose-degrading *Bacillus*[J]. *China Brewing*, 2020, 39(1): 71-76 (in Chinese).
- [15] ROY D, GUNRI SK, PAL KK. Isolation, screening and characterization of efficient cellulose-degrading fungal and bacterial strains and preparation of their consortium under *in vitro* studies[J]. *3 Biotech*, 2024, 14(5): 131.
- [16] BARRILLI ÉT, TADIOTO V, MILANI LM, DEOTI JR, FOGOLARI O, MÜLLER C, BARROS KO, ROSA CA, dos SANTOS AA, STAMBUK BU, TREICHEL H, ALVES SL. Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(7): 1729-1739.
- [17] HE Y, WANG CX, JIAO RH, NI QX, WANG Y, GAO QX, ZHANG YZ, XU GZ. Biochemical characterization of a novel glucose-tolerant GH3 β -glucosidase (Bg11973) from *Leifsonia* sp. ZF2019[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(13): 5063-5079.
- [18] 王茜, 许光治. *Leifsonia* 菌 β -葡萄糖苷酶(Lf18920)的酶学性质研究及对藏红花素转化作用的初步研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(2): 11-18.
- WANG X, XU GZ. Enzymatic properties of *Leifsonia* β -glucosidase (Lf18920) and its degradation of crocin[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(2): 11-18 (in Chinese).
- [19] CHENG LQ, NA JR, BANG MH, KIM MK, YANG DC. Conversion of major ginsenoside Rb1 to 20(S)-ginsenoside Rg3 by *Microbacterium* sp. GS514[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(1): 218-224.
- [20] QUAN LH, MIN JW, YANG DU, KIM YJ, YANG DC. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 to 20(S)-Rg3 by recombinant β -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(2): 377-384.
- [21] QUAN LH, MIN JW, JIN Y, WANG C, KIM YJ, YANG DC. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 to compound K by recombinant β -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(14): 3776-3781.
- [22] KIM H, KIM JH, LEE PY, BAE KH, CHO S, PARK BC, SHIN H, PARK SG. Ginsenoside Rb1 is transformed into rd and Rh2 by *Microbacterium trichothecenylicum*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(12): 1802-1805.
- [23] HONG YN, SHI Y, FAN YR, PAN H, YAO XY, XIE Y, WANG XJ. Biotransformation of ginsenoside compound K using β -glucosidase in deep eutectic solvents[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2024, 47(10): 1647-1657.
- [24] LI MJ, HUANG ZX, ZHANG R, ZHOU JP. Review of probiotics, gut microorganisms, and their enzymes involved in the conversion of ginsenosides[J]. *Food Bioscience*, 2024, 58: 103829.
- [25] ZHONG SN, YAN M, ZOU HY, ZHAO P, YE HQ, ZHANG TH, ZHAO CH. Spectroscopic and *in silico* investigation of the interaction between GH1 β -glucosidase and ginsenoside Rb1[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(4): 1917-1928.
- [26] 潘虹, 姚向钰, 洪一楠, 王晓军, 樊雨柔. β -葡萄糖苷酶 J384W 位点突变的生物信息学及分子对接[J]. *西安工程大学学报*, 2024, 38(3): 61-67.
- PAN H, YAO XY, HONG YN, WANG XJ, FAN YR. Bioinformatics and molecular docking study of β -glucosidase J384W locus mutation[J]. *Journal of Xi'an Polytechnic University*, 2024, 38(3): 61-67 (in Chinese).