

枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 转化人参皂苷 Rb1 的特性及其全基因组测序分析

赵彩秀¹, 王楠¹, 黄鑫¹, 越皓¹, 郭云龙^{1*}, 刘淑莹^{1,2*}

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

摘要:目的 对枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 转化人参皂苷 Rb1 的特性及其全基因组测序进行分析。方法 利用 ONT 测序平台以及 Nanopore 测序平台进行全基因组测序鉴定该菌的特征, 并对该菌进行了 GO、COG 以及 CAZy 功能注释分析。结果 该菌株基因组全长为 4 215 536 bp, GC 含量为 43.51%, 预测编码了 4 229 个开放阅读框 (ORFs); GO 分析的功能细分为 43 类, COG 分析的功能细分为 25 类, CAZy 分析该菌有 108 个与人参皂苷转化相关的基因。结论 枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 全基因组测序结果可为今后进一步研究该菌种对人参皂苷的转化提供依据。

关键词: 微生物转化; 土壤; 稀有人参皂苷; 高分辨质谱; 全基因组测序

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)02-0518-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.045

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 是我国乃至世界的名贵中药材之一, 具有极高的药用价值及保健功能, 特别是在 2002 年人参被批准为新资源食品, 人参食品相关的基础研究和产品开发成为热点^[1]。人参具有大补元气、养血生津、保护心肌、疏通筋脉的功效^[2]。人参皂苷是人参的主要活性成分, 分为达玛烷型四环三萜类原人参二醇型皂苷、达玛烷型四环三萜类原人参三醇型皂苷、齐墩果烷型五环三萜类皂苷及奥克梯隆型皂苷^[3-4]。相关的药理活性研究表明, 人参皂苷具有抗病毒、抗衰老、抗肿瘤、改善认知功能、抗心律失常等作用^[5-7]。人参皂苷的代谢研究证实了进入机体起作用的是经过胃肠道菌群代谢后的代谢产物次级皂苷, 这些次级皂苷通常被称为稀有人参皂苷, 具有相对较高的生理活性和药理作用, 更容易被机体吸收^[8-9]。人参皂苷 Rg3 具有抗肿瘤、抗糖尿病、抗抑郁、抗炎、增强机体免疫力等作用^[10-11]。人参皂苷 CK 具有抗炎、抗氧化、抗癌、抗抑郁等作用^[12-14]。稀有人参皂苷在人参中含量相对较低, 甚至有些稀有人参皂苷根本不存在, 直接制备和纯化成本较高, 系统研究稀有人参皂苷转化具有一定的理论意义和市场需求。

现阶段稀有人参皂苷的转化方法主要有化学转化法、微生物转化法和酶转化法^[15]。化学转化法反应条件剧烈, 副产物多, 易造成环境污染^[16]。微生物转化法的微生物来源比较广泛、种类繁多、更容易获得, 微生物转化反应速度快、成本低^[17-18]。酶转化法反应条件温和, 转化效率高, 无环境污染^[19]。其中生物转化通过对人参皂苷上的糖

基进行结构改造来制备出活性较高的稀有人参皂苷的研究成为国内外人参皂苷研究的热点^[20]。Zhou 等^[21]研究发现, 人参皂苷 Rb1 可通过 *Paecilomyces bainier* sp. 229 转化为人参皂苷 CK 以及 1 个已知的 3-酮衍生物和 2 个新的脱氢代谢物, 并探讨了其对 Wnt 信号通路的作用机制。李俊莹等^[22]研究表明, 人参内生真菌 *Burkholderia* sp. GE 17-7 能够特异性水解原人参二醇型皂苷 C-20 位糖基, 制备人参皂苷 Rg3。

人参皂苷转化产物一般通过薄层色谱检测, 但其灵敏度较低。超高效液相色谱与高分辨质谱相联用技术具有耗时少、分辨率高、特异性强和灵敏度高等特点, 能够进行更加准确可靠的分析, 但其缺点成本较高^[23-24]。

前期实验以人参茎叶总皂苷为碳源, 富集土壤中的微生物, 经分离、纯化后, 得到 30 种可转化稀有人参皂苷的微生物, 经过测序确定 JLGA-SD-28 为枯草芽孢杆菌。本实验将枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 作为发酵底物进行进一步分析研究, 以人参皂苷 Rb1 为转化底物, 通过振荡培养后, 采用 UHPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用技术对转化前后的底物和产物进行检测, 阐明枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 转化人参皂苷 Rb1 的途径, 并且通过全基因组测序, 确定其功能特性。

1 材料

1.1 试剂 枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 为本实验室前期从土壤中筛选得到, 经长春中医药大学王淑敏教授鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*; 人参皂苷 Rb1 标准品

收稿日期: 2020-03-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (NO. 2017YFC1702105)

作者简介: 赵彩秀 (1996—), 女, 硕士生, 从事药物分析方向研究。E-mail: 1054452845@qq.com

* 通信作者: 郭云龙 (1983—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事药物分析、仪器分析研究。E-mail: guoyl02@ccucm.edu.cn

刘淑莹 (1943—), 女, 博士, 教授, 从事中药化学和有机质谱研究。E-mail: liusy02@ccucm.edu.cn

(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号Z20S9X70603);人参皂苷 Rg5 标准品(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号B24M8S32390);人参皂苷 Rg3 标准品(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号Z25J9X64237);人参皂苷 CK 标准品(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号Y20N9Z75484);人参皂苷 Rk1 标准品(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号B27J8S39859);乙腈(色谱纯,美国Fisher公司,批号184266);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司,批号186346);超纯水(Dura series超纯水处理系统)。

1.2 仪器 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);全温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);DZF-6050真空干燥箱(上海申贤恒温设备厂);SW-CJ-1D型单人净化工作台(苏州净化设备有限公司);Thermo Ultimate 3000型超高效液相色谱系统、Thermo Q-Exactive Orbitrap 质谱仪,包括Xcaliber工作站(美国Thermo Fisher公司)。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 培养基 LB培养液(100 mL)、氯化钠1 g、胰蛋白胨1 g、酵母粉0.5 g、5 mol/L氢氧化钠20 μ L、蒸馏水定容至100 mL,121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌20 min。

2.1.2 50 mmol/L磷酸盐缓冲液 A液(pH 7.0),取二水合磷酸二氢钠3.12 g,加蒸馏水定容至100 mL;B液,取十二水合磷酸氢二钠7.17 g,加蒸馏水定容至100 mL;取A液39 mL与B液61 mL混合,蒸馏水定容至400 mL。

2.1.3 转化底物人参皂苷 Rb1 溶液 取人参皂苷 Rb1 10 mg,加无菌水定容至10 mL,即得。

2.2 稀有人参皂苷转化 将枯草芽孢杆菌JLGA-SD-28置于LB培养液中,在37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下的摇床中培养24 h,得到该菌的菌液。取菌液8 mL,加入Rb1底物皂苷溶液1 mL、磷酸盐缓冲液1 mL,在37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下的摇床中培养4 d,得到人参皂苷转化后的样品。

2.3 人参皂苷转化后样品处理 在人参皂苷转化后的样品中加入等体积的水饱和正丁醇,涡旋震荡1 min,在6 000 r/min的条件下离心5 min,取上清液,在45 $^{\circ}$ C的水浴锅中挥干后加入1 mL甲醇溶解,得到待测样品。

2.4 Thermo QE液质联用检测

2.4.1 Thermo QE液质联用检测色谱条件 SUPELCO C₁₈色谱柱(5 cm \times 3.0 mm, 2.7 μ m);流动相0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 min, 15% B; 5 min, 19% B; 10 min, 19% B; 13 min, 25% B; 15 min, 28% B; 18 min, 28% B; 22 min, 30% B; 25 min, 35% B; 30 min, 40% B; 35 min, 60% B; 38 min, 80% B; 40 min, 100% B; 45 min, 100% B; 50 min, 15% B; 60 min, 15% B);体积流量0.4 mL/min;进样量5 μ L;柱温35 $^{\circ}$ C。

2.4.2 Thermo QE液质联用检测质谱条件 电喷雾离子

源;负离子模式;喷雾电压-3 kV;干燥气温度350 $^{\circ}$ C;鞘气流速40 L/min;辅助气流速10 L/min;吹扫气体积流量1 L/min;扫描方式为Full MS;质量扫描范围m/z 100~1 500;质量分辨率70 000。

2.5 枯草芽孢杆菌JLGA-SD-28菌种的全基因组测序、组装、注释 将枯草芽孢杆菌JLGA-SD-28的基因组DNA委托北京百迈客生物科技有限公司利用ONT测序平台以及Nanopore测序平台进行全基因组测序。利用Nanodrop、Qubit和0.35%琼脂糖凝胶电泳进行纯度、浓度和完整性检测,提取高质量基因组DNA;通过BluePippin全自动核酸回收系统回收大片段DNA;SQK-LSK109连接试剂盒进行文库构建;上机测序。使用Canu v1.5软件^[25]对过滤后subreads进行组装,最后采用Pilon^[26]软件利用二代数据进一步对组装基因组进行纠错,得到最终准确度更高的基因组。对重复序列、编码基因、非编码RNA、假基因、前噬菌体、基因岛、CRISPR进行基因组组分分析,得到预测基因。利用预测得到的基因序列与蛋白质直系同源簇(Cluster of Orthologous Groups of proteins, COG^[27])、非冗余蛋白(non-redundant database, Nr^[28])等功能数据库做BLAST^[29]比对,得到基因功能注释结果。基于Nr数据库比对结果,应用软件Blast2GO^[30]进行基因本体(Gene Ontology, GO^[31])数据库的功能注释。利用已预测得到的基因组信息,如重复序列、鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比率(GC含量)等,应用软件Circos^[32]绘制基因组圈图。另外,利用软件hmmer^[33]基于碳水化合物相关酶数据库(Carbohydrate-Active enZymes, CAZy^[34])进行碳水化合物酶类基因的功能注释。

3 结果

3.1 Thermo QE液质联用检测结果 通过与标准品对比,确定其转化产物,结果见图1。

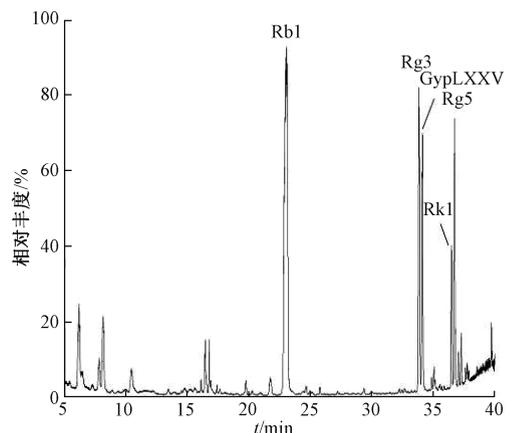


图1 枯草芽孢杆菌JLGA-SD-28转化人参皂苷Rb1总离子流图

本实验中,枯草芽孢杆菌JLGA-SD-28可将人参皂苷Rb1转化为人参皂苷Rg3、Rk1、Rg5以及绞股蓝皂苷LXXV。推测人参皂苷Rb1转化途径为人参皂苷Rb1的C-3位糖苷键发生水解断裂为绞股蓝皂苷LXXV;人参皂苷Rb1

的 C-20 位糖苷键发生水解断裂为人参皂苷 Rg3, 人参皂苷 Rg3 的 C-20 位发生脱水反应, 生成人参皂苷 Rk1 和人参皂

苷 Rg5, 见图 2。

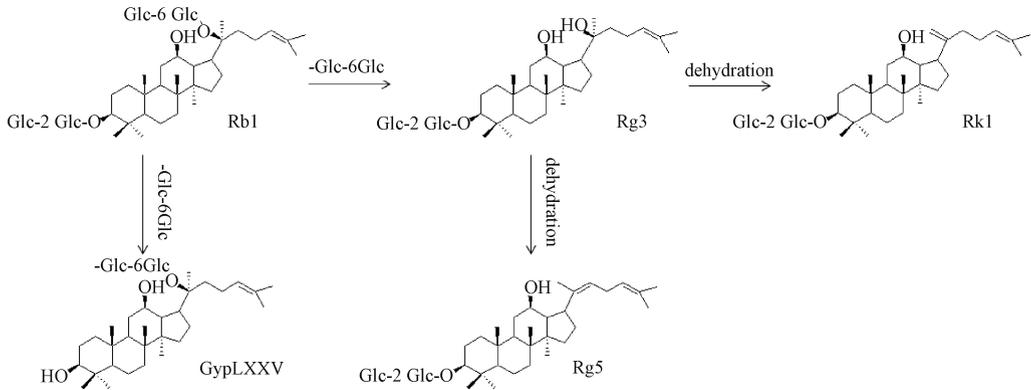
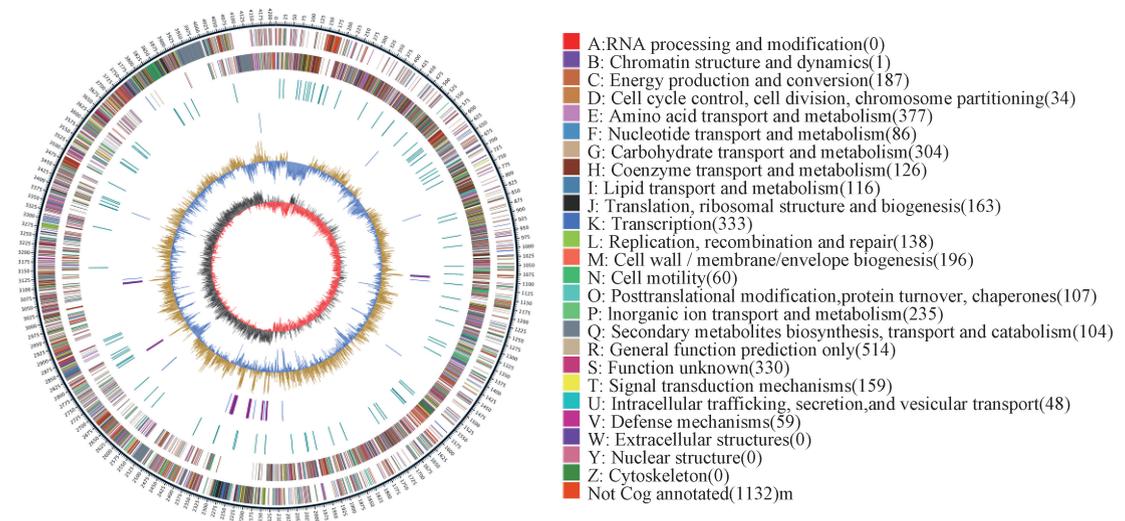


图 2 枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 转化人参皂苷 Rb1 途径

3.2 枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 基因组功能 枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 的基因组全长为 4 215 536 bp, GC 含量为 43.51%, 基因组预测编码了 4 229 个开放阅读框 (ORFs),

预测基因的平均长度为 878 bp, 其中假基因 11 个, 非编码 RNA 基因 217 个, 包括 30 个 rRNA、86 个 tRNA 和 101 个其他 ncRNA。枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 的基因组圈见图 3。



注: A 为 RNA 加工和修饰; B 为染色质结构和动力学; C 为能源生产和转换; D 为细胞周期控制、细胞分裂、染色体划分; E 为氨基酸转运与代谢; F 为核苷酸转运与代谢; G 为碳水化合物的运输与代谢; H 为辅酶转运与代谢; I 为脂质运输与代谢; J 为翻译、核糖体结构与生物发生; K 为转录; L 为复制、重组和修复; M 为细胞壁/细胞膜/细胞膜生物发生; N 为细胞运动; O 为翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白; P 为无机离子转运与代谢; Q 为次生代谢产物的生物合成、转运和分解代谢; R 为通用功能预测; S 为未知功能; T 为信号转导机制; U 为细胞内运输、分泌和囊泡运输; V 为防御机制; W 为细胞外结构; Y 为核结构; Z 为骨架; 无 COG 注释。

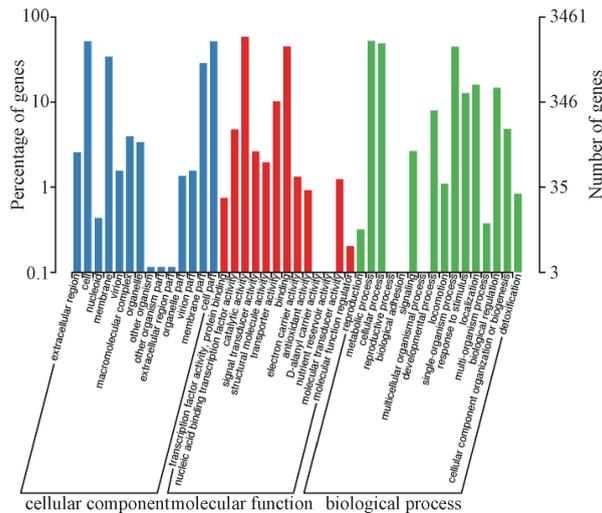
图 3 基因组圈图

3.3 基因组功能注释

3.3.1 GO 功能注释 GO 注释分类统计结果见图 4。在枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 的 GO 分析中, 共有 3 461 个基因被注释, 分生物过程 (7 202)、分子功能 (4 439) 和细胞成分 (6 302) 3 类功能注释结果, 共包括 43 种功能。在生物过程分类中, ORFs 数量最多的是代谢过程 (1 820)、细胞过程 (1 695) 和单组织过程 (1 547)。在分子功能分类中, 催化活性 (2 038) 的 ORFs 数量最多, 其次是结合活性 (1 567)。在细胞成分分类中, ORFs 数量最多的是细胞 (1 796) 和细胞部分 (1 796), 其次是膜 (1 185) 和膜部分 (1 000)。

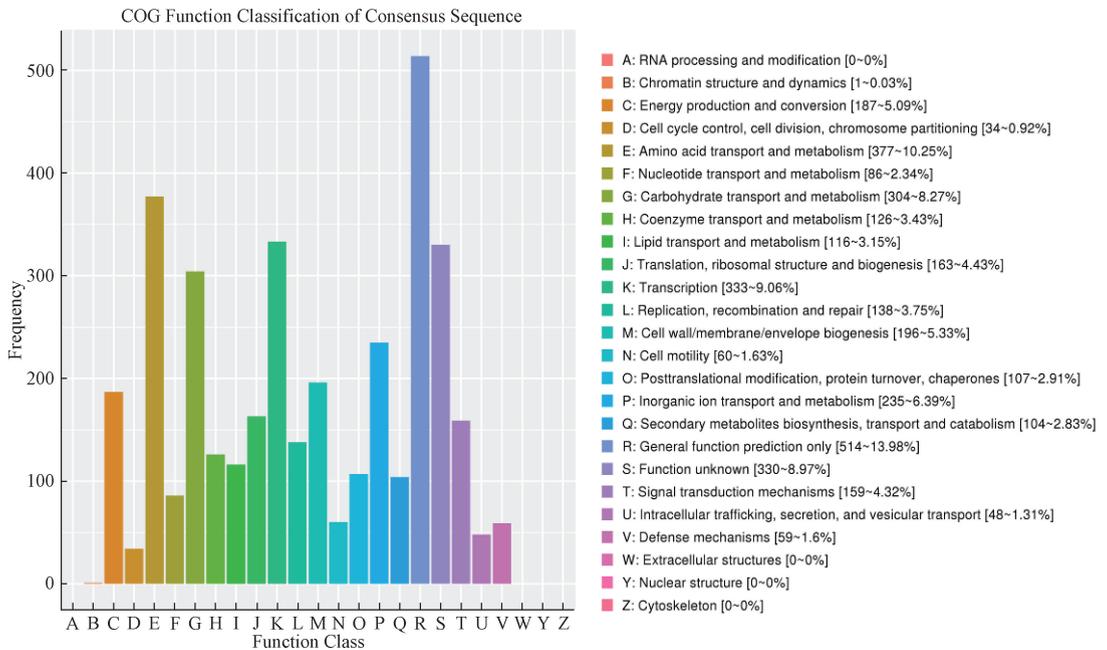
3.3.2 COG 功能注释 COG 注释分类统计结果见图 5。枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 的 COG 功能注释分类显示注释的 3 097 个 ORFs 分为 25 类, 其中仅一般功能预测占比最大 (13.98%), 其次是氨基酸转运和代谢 (10.25%)、转录 (9.06%)、功能未知 (8.97%)、碳水化合物转运和代谢 (8.27%), RNA 加工和修饰、细胞外结构、核结构和细胞骨架没有基因分布。

3.3.3 CAZy 功能注释 CAZy 功能注释中糖苷水解酶分析结果见表 1, 糖苷转移酶分析结果见表 2。通过 CAZy 数据库功能注释结果, 分析了枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 基因组中与糖苷水解酶以及糖苷转移酶相关的基因。该菌共有 108



注：横坐标为 GO 各分类内容，纵坐标左边为基因数目所占百分比，右边为基因数目。横坐标从左至右依次为细胞外区域；细胞；类核；膜；病毒粒子；高分子配合物；细胞器；其他有机体；其他有机体部分；细胞成分部分；细胞器部分；病毒粒子部分；膜部分；细胞部分。分子功能，转录因子活性、蛋白质结合；核酸结合转录因子活性；催化活性；信号传感器；分子结构；转运体；结合作用；电子载体；抗氧化活性；D-丙氨酰载体活性；储备营养活性；分子传感器；分子功能调节剂。生物过程，繁殖；代谢过程；细胞过程；繁殖过程；生物粘附；信号转导；多细胞生物过程；发育过程；运输；单组织过程；刺激反应；定位；多生物过程；生物调节；细胞成分组织或生物发生；脱毒作用。

图4 GO 功能注释分类统计图



注：横坐标为 COG 各分类内容，纵坐标为基因数目。A 为 RNA 加工和修饰；B 为染色质结构和动力学；C 为能源生产和转换；D 为细胞周期控制、细胞分裂、染色体划分；E 为氨基酸转运与代谢；F 为核苷酸转运与代谢；G 为碳水化合物的运输与代谢；H 为辅酶转运与代谢；I 为脂质运输与代谢；J 为翻译、核糖体结构与生物发生；K 为转录；L 为复制、重组和修复；M 为细胞壁/细胞膜/细胞膜生物发生；N 为细胞运动；O 为翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣蛋白；P 为无机离子转运与代谢；Q 为次生代谢产物的生物合成、转运和分解代谢；R 为通用功能预测；S 为未知功能；T 为信号转导机制；U 为细胞内运输、分泌和囊泡运输；V 为防御机制；W 为细胞外结构；Y 为核结构；Z 为骨架。

图5 COG 功能注释分类统计图

个基因与人参皂苷的转化相关，其中有 62 个基因与人参皂苷 Rg3 和绞股蓝皂苷 LXXV 的转化相关，可分为 24 个不同

的糖苷水解酶家族；有 46 个基因与人参皂苷 Rk1 和 Rg5 的转化相关，可分为 12 个不同的糖苷转移酶家族。

表 1 CAZy 功能注释糖苷水解酶分析表

糖苷水解酶家族	基因数/个	基因列表
GH1	4	GE02070, GE02156, GE02603, GE02860
GH3	1	GE02429
GH4	5	GE00393, GE01156, GE01999, GE02996, GE03099
GH5	1	GE04130
GH11	1	GE04206
GH13	8	GE01121, GE01224, GE01257, GE01592, GE01598, GE02543, GE02563, GE03061
GH16	1	GE02051
GH18	4	GE01539, GE02273, GE02847, GE03678
GH23	6	GE00011, GE00241, GE00722, GE02767, GE03438, GE03558
GH26	1	GE02864
GH30	1	GE04132
GH32	3	GE00824, GE01582, GE01945
GH42	2	GE01550, GE02991
GH43	4	GE01008, GE02077, GE04067, GE04133
GH46	1	GE00809
GH51	2	GE00976, GE00999
GH53	1	GE01549
GH65	1	GE01593
GH68	1	GE01581
GH73	2	GE01239, GE01718
GH76	1	GE02232
GH105	2	GE01139, GE02983
GH109	8	GE00902, GE01137, GE01244, GE01490, GE02114, GE03109, GE03329, GE03361
GH126	1	GE02693

表 2 CAZy 功能注释糖苷转移酶分析表

糖苷转移酶家族	基因数/个	基因列表
GT1	3	GE00041, GE02848, GE03508
GT2	15	GE00082, GE00252, GE01564, GE01566, GE01569, GE01693, GE01706, GE01707, GE01932, GE01939, GE02696, GE03014, GE03142, GE03581, GE03635
GT4	9	GE00356, GE00607, GE01214, GE01217, GE01568, GE01570, GE01692, GE01697, GE01713
GT5	1	GE01221
GT8	1	GE01985
GT26	1	GE01715
GT28	4	GE00302, GE01926, GE03631, GE03829
GT35	1	GE01220
GT44	1	GE01761
GT46	2	GE03013, GE03015
GT51	4	GE00342, GE01280, GE01891, GE03289
GT83	4	GE02197, GE02197, GE03580, GE03580

4 结论

人参皂苷转化过程中底物及产物的检测, 通常选用薄层色谱方法, 但展开剂和显色剂对人体危害较大, 特别是氯仿, 世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单初步整理参考, 氯仿在 2B 类致癌物清单中, 同时薄层色谱法其灵敏度和专属性具有一定的局限性。本实验通过超高效液相色谱与高分辨质谱联用技术验证了参地土壤所筛选出枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 具有较强的转化人参皂苷 Rb1 的能力, 进一步明确了其转化途径, 其主要产物为人参皂苷 Rg3、Rk1、Rg5 以及绞股蓝皂苷 LXXV, 并且具有更强的抗肿瘤、降压、抗炎等药理活性^[35]。

利用微生物法转化人参皂苷, 其本质是通过微生物生长不同时期所产生的酶, 酶解人参皂苷元所连接不同的糖基团。本实验通过全基因组测序技术对枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 进行分析, 明确其基本的功能特性, 进而发现与转化人参皂苷的基因和糖基水解酶及糖苷转移酶的具体数量。

本实验确定了枯草芽孢杆菌 JLGA-SD-28 对转化人参皂苷 Rb1 的转化途径及产物, 并且通过全基因组测序分析了具有转化人参皂苷功能的基因, 以期后续研究该菌种对转化人参皂苷的转化提供参考, 也为该菌的酶学研究提供依据。

参考文献:

- [1] 王 影, 查 琳, 杨怀雷, 等. 人参食品研究进展[J]. 人参研究, 2019, 31(5): 54-58.
- [2] 贝 圆, 冯 俭, 罗方利, 等. 人参当归配伍对人参中人参皂苷 Rg1、Re、Rb1 溶出率的影响[J]. 华西药学杂志, 2013, 28(6): 619-621.
- [3] 徐 静, 贾 力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [4] 姚梦杰, 吕金朋, 张 乔, 等. 人参化学成分及药理作用研究[J]. 吉林中医药, 2017, 37(12): 1261-1263.
- [5] 姬 庆, 郜玉钢, 赵 岩, 等. 酶法转化制备人参皂苷单体的研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(22): 3356-3360.
- [6] 陈兆耀, 刘新峰, 徐格林. 人参皂苷改善认知功能作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(24): 4980-4982.
- [7] 陈梅卿, 李卫华, 石桂秀. 人参皂苷 Rb1 对心血管系统的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(3): 506-509.
- [8] 周中流, 李春燕, 陈林浩, 等. 天然产物皂苷类化合物生物转化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 173-192.
- [9] 武伦鹏, 白龙律, 韩春峰, 等. 微生物转化人参主要皂苷 Rb1 为 C-K 的研究[J]. 人参研究, 2016, 28(2): 7-11.
- [10] 杨 玉, 陈春林. 人参皂苷 Rg3 的药理作用研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(5): 497-500.
- [11] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. American ginseng: potential structure-function relationship in cancer chemoprevention[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(7): 947-954.
- [12] Jiang S, Zhang H N, Qian M, et al. Effects of ginsenoside CK pretreatment on oxidative stress and inflammation in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Biotechnol Biotech Eq*, 2018, 32(6): 1606-1612.
- [13] Jin X, Zhou J P, Zhang Z H, et al. The combined administration of parthenolide and ginsenoside CK in long circulation liposomes with targeted tLyp-1 ligand induce mitochondria-mediated lung cancer apoptosis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(3): s931-s942.
- [14] Song W, Guo Y, Jiang S, et al. Antidepressant effects of the ginsenoside metabolite compound K, assessed by behavioral despair test and chronic unpredictable mild stress model[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(7): 1371-1382.
- [15] 郭从亮, 崔秀明, 杨晓艳, 等. 人参皂苷生物转化研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3899-3904.
- [16] 李伟娜, 蒋云云, 刘彦楠, 等. 人参皂苷单体定向转化的生物催化及应用进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1590-1606.
- [17] 南 博, 游 颖, 王雨珊, 等. 微生物法转化人参皂苷的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 196-199.
- [18] 台亚楠, 董 曼, 任婧楠, 等. 柠檬烯微生物转化的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 272-277.
- [19] 包海鹰, 李 磊, 咎立峰, 等. 黑根霉对人参皂苷 Re 的生物转化[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 548-554.
- [20] 郑 溢, 李 旒, 郑志忠, 等. 绞股蓝皂苷生物转化与活性的研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 324-333.
- [21] Zhou W, Huang H, Zhu H Y, et al. New metabolites from the biotransformation of ginsenoside Rb1 by *Paecilomyces bainier* sp. 229 and activities in inducing osteogenic differentiation by Wnt/ β -catenin signaling activation[J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(2): 199-207.
- [22] 李俊莹, 武伦鹏, 康辰凯, 等. 人参内生菌 *Burkholderia* sp. GE 17-7 制备人参皂苷 Rg3 的研究[J]. 生物学杂志, 2019, 36(2): 41-45.
- [23] 杜晨晖, 李 泽, 崔小芳, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 技术研究酸枣仁发酵过程中的化学成分转化[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(8): 1614-1620.
- [24] 乔梦丹, 刘 尚, 张 琰, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS/MS 研究人参皂苷在发酵过程中的生物转化[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(2): 219-225.
- [25] Koren S, Walenz B P, Berlin K, et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation[J]. *Genome Res*, 2017, 27(5): 722-736.
- [26] Walker B J, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963.
- [27] Tatusov R L, Galperin M Y, Natale D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 33-36.
- [28] Deng Y Y, Li J Q, Wu S F, et al. Integrated nr database in protein annotation system and its localization[J]. *Comput Eng*, 2006, 32(5): 71-74.
- [29] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [30] Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [31] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-29.
- [32] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1639-1645.
- [33] Eddy S R. Profile hidden markov models[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 755-763.
- [34] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(suppl 1): D233-D238.
- [35] 曾露露, 丁传波, 刘文从, 等. 人参稀有皂苷药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 680-682.