

一株快速转化甜菊苷的细菌鉴定、产酶及转化特性

刘虎¹, 陈育如^{1,2*}, 姜中玉¹

(¹ 南京师范大学生命科学院, 江苏省微生物资源工程技术研究中心, 南京 210046)

(² 南京师范大学泰州学院生物技术系, 泰州 225300)

摘要:【目的】本研究鉴定了一株筛选的甜菊苷特异降解菌、优化了该菌产 β -葡萄糖苷酶的条件以及研究了该菌对甜菊苷的转化特性。【方法】经 16S rRNA 基因序列测序和系统发育学分析, 结合形态学特征确定该菌株的系统发育地位。用单因素及多因素分析探讨了其对甜菊苷的降解, 通过液质联用检测了降解产物。【结果】菌株-J2 与巨大芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列相似性达到 100%, 结合形态学特征, 鉴定该菌为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。在玉米淀粉 4%、豆粕粉 1%、硫酸镁 0.04%、pH 7.0、37°C、220 r/min、接种量 10%、培养 36 h 的条件下, 该菌产 β -葡萄糖苷酶活力为 779.68 U/mL。甜菊苷转化的结果表明: 3 d 可将 10 mg/mL 甜菊糖溶液中甜菊苷转化 74%, 使莱鲍迪甙 A 和甜菊苷的比例 (RA/SS) 由转化前的 0.38 上升至 0.99, RA 的相对量增加 160.5%, 5 d 时转化完全。转化产物经液质联用鉴定为甜菊双糖甙。【结论】确定菌株-J2 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 该菌对甜菊苷具有高效、特异的转化能力, 为首次报道的新型、安全菌株。

关键词: 甜菊苷; 生物转化; 莱鲍迪甙 A; β -葡萄糖苷酶; 巨大芽孢杆菌

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0885-06

甜菊糖是从菊科甜叶菊 (*stevia rebaudiana bertonii*) 中提取的天然甜味剂, 是新型的甜味剂^[1]。甜菊糖以甜菊苷 (stevioside, SS) 和莱鲍迪甙 A (rebaudioside A, RA) 两种成份为主, 同时含有包括甜菊双糖甙 (steviolbioside) 在内的多种含量较低的成分, 三者分子结构见图 1, 其共性为含有相同的甜菊醇结构母核, 不同的是母核上连接葡萄糖单位的数目和连接位置。RA 呈味品质最好但含量低, SS 含量高但其甜味成份有一定的后涩味^[2]。因此人们希望纯化 RA 使甜味更纯正。但 RA 与 SS 在化学性质、分子结构和极性都非常接近, 提纯比较困难^[3], 而化学结晶分离方法要用到有毒的甲醇为溶剂^[4], 将甜菊苷降解后将有利于与 RA 的分离。

生物方法中, 赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 具有降

解甜菊苷的水解酶, 通过对该菌的培养转化可以达到提高 RA 含量的效果, 但转化时间要 7-15 d, 转化 100% 甜菊苷时经 7 d 后 SS 含量仍大于 80%, RA/SS 值由 0 增加到 0.4^[5]。本工作选育了一株巨大芽孢杆菌 (CCTCC NO: M209201), 并对其产酶特性及 SS 生物转化进行了研究。

甜菊苷的生物催化反应式: 甜菊苷
J2 菌催化 \longrightarrow 甜菊双糖甙 + 葡萄糖。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料、菌株和培养基: 甜菊糖 (SS > 50%), 由甜菊糖公司友情提供。巨大芽孢杆菌-J2 (*Bacillus megaterium*, CCTCC NO: M209201), 本实

基金项目: 林业公益性行业科研专项基金 (200904055)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-523-86152880; E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

作者简介: 刘虎 (1983-), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物的学习与研究。

收稿日期: 2009-12-11; 修回日期: 2010-01-27

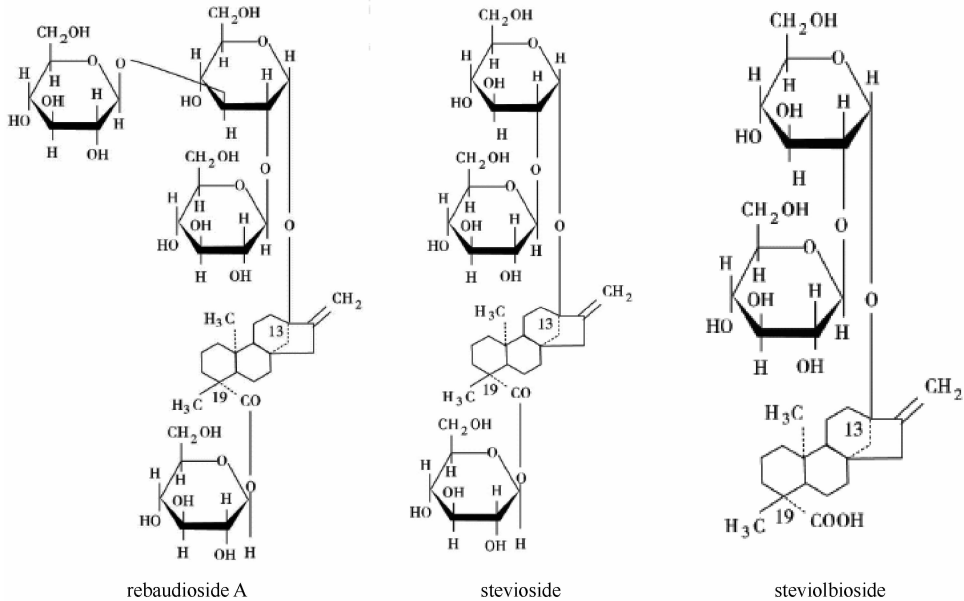


图1 莱鲍迪甙 A、甜菊苷和甜菊双糖甙的分子结构式

Fig. 1 The structure of rebaudioside A, stevioside and steviolbioside.

实验室分离保存。菌种保藏培养基:牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, pH7.2。产酶培养基:葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, KH_2PO_4 1%, NaCl 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, pH 7.0, 摇瓶装液量 50 mL/250 mL。

1.1.2 主要试剂和仪器:乙腈(Shanghai Xingke Biochemistry Co., Ltd);细菌通用引物(上海生工生物工程技术服务有限公司);试剂盒 K713(上海申能博彩生物科技有限公司);CA-1390-1 垂直层流洁净工作台(上海净化设备有限公司);GNP-9080 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);HD-930 型组合式全温摇床(江苏太仓市博莱特实验仪器厂);ES-315 高压蒸汽灭菌锅(TOMY, Japan);FA1004 电子分析天平(上海天平仪器厂);HH-2 数显恒温水浴锅(常州国华实验仪器厂);Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司);Agilent 6310 质谱仪(Agilent 公司)。

1.2 菌种鉴定

1.2.1 提取 DNA:从江苏土壤中筛选了一株对甜菊糖有降解能力的细菌-J2,经传代培养 15 h 的菌液用 K713 细菌试剂盒提取 DNA。

1.2.2 引物:用于 16S rRNA 基因扩增的细菌通用引物为 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'。

1.2.3 PCR 反应:采用 50 μL 反应体系,反应条件:98 $^\circ\text{C}$ 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 35 S,55 $^\circ\text{C}$ 35 S,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,共 35 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 4 min。

1.3 甜菊糖的检测

甜菊糖含量用 HPLC 法测定,色谱条件:Agilent 1100 高效液相色谱仪,色谱柱为 Kromasil-NH₂ (4.6 mm \times 250 mm),210 nm 紫外检测,流动相为 80% 乙腈水溶液(V/V),柱温 25 $^\circ\text{C}$,流速 1.0 mL/min,时间为 15 min。

1.4 酶活性测定^[6]

参考文献[6]方法并作适当改动,产酶培养基装液量 50 mL/250 mL,5% 接种量加入培养 24 h 的菌液,37 $^\circ\text{C}$ 、220 r/min 培养 36 h。发酵液 1776 \times g 离心 10 min,收集上清即为粗酶液。将 0.2 mL 水杨苷溶液,加 0.2 mL 酶液,混匀后 50 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min,加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂后沸水浴 5 min,冷却后蒸馏水定容至 10 mL,在 540 nm 下测定其吸光度。酶活力单位定义:1 mL 酶液在 pH5.0,50 $^\circ\text{C}$ 下催化反应 1 min 产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量为一个活力单位。

计算公式为:葡萄糖标准曲线: $y(OD_{540}) = 1.2064 \times (\text{葡萄糖含量}/\text{mg}) + 0.0016 (R^2 = 0.999)$;
 β -葡萄糖苷酶活力单位(U/mL) = $1000 \times N \times (\Delta OD_{540} - 0.0016) / 1.2064 \times 10 \times 0.2$;其中 N 为酶液稀释倍数。

1.5 甜菊苷降解物的液质联用测定

质谱条件:电喷雾离子化源(ESI),雾化电压 3500V,正离子模式,加热毛细管温度 325 $^\circ\text{C}$,扫描范围:50 - 1000 m/z。

2 结果

2.1 降解甜菊糖微生物的鉴定

2.1.1 J2 菌的形态及菌落特征

所筛选的细菌能降解甜菊苷^[7], 菌体杆状, G⁺, 单个排列或多个相连, 产芽孢。在肉汤培养基平板上菌落呈圆形、扁平、有光泽、表面光滑、乳白色较不透明。

2.1.2 J2 菌的 16S rDNA 序列系统发育分析

对该菌进行的分子鉴定结果表明, 其 16S rDNA 序列全长为 1513 bp。用 Blast 与 GenBank 中的核酸

数据进行比对分析, 结果发现该菌与数据库中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的相似性达 100%, 从进化树 (图 2) 可以看出, 该菌与 *Bacillus megaterium* IAM 13418^T、*Bacillus megaterium* C1、*Bacillus megaterium* MP-5 和 *Bacillus megaterium* strain rif2008100 菌株聚类在一起, 成为一簇, 而与芽孢杆菌的其它各种如 *Bacillus subtilis* NCDO 1769^T; *Bacillus badius* ATCC 14574^T; *Bacillus cohnii* DSM 6307^T 等菌株之间的差异则较大。所以鉴定该菌为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。

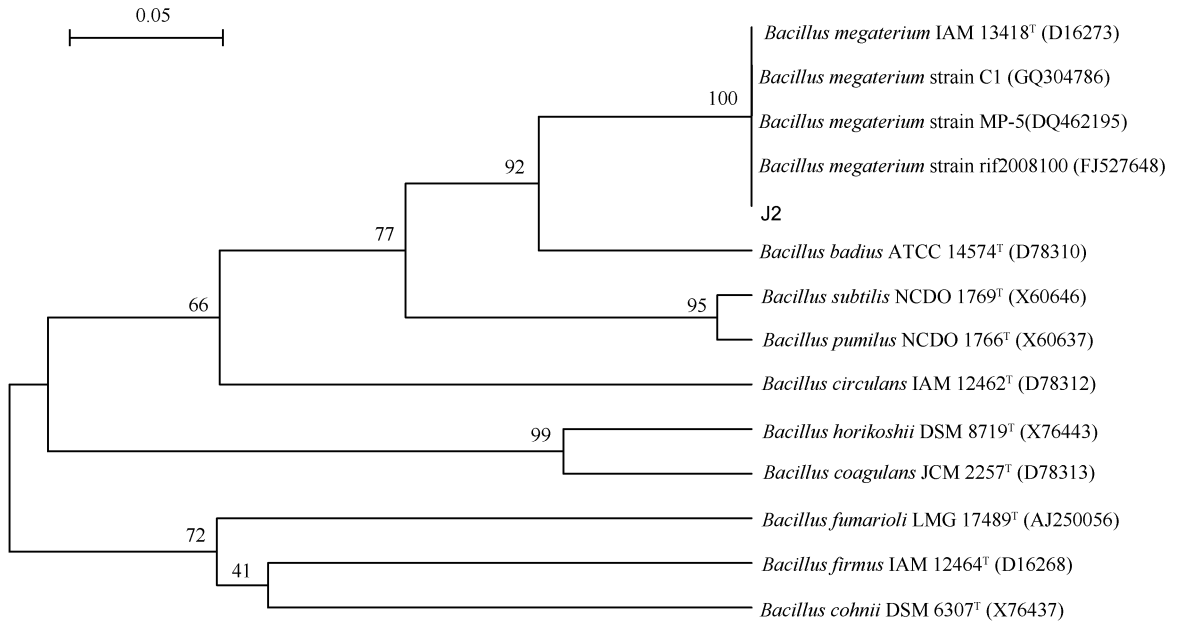


图 2 基于 16S rDNA 的菌株 J2 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain J2 and relevant strains constructed from complete sequences of 16S rDNA. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.05 sequence divergence. T, type strain.

2.2 产酶条件的优化

2.2.1 碳源对产酶的影响: 以葡萄糖、乳糖、玉米淀粉、木薯淀粉和麸皮等不同的碳源 (含量 2%) 于 pH 7.0, 37℃、220 r/min 振荡培养 36 h, 装液量 50 mL/250 mL, 考察碳源对菌株产 β-葡萄糖苷酶活力的影响。

由图 3 可见, 玉米淀粉作为碳源时, 该菌的产 β-葡萄糖苷酶活力最高, 达 23.56 U/mL, 以木薯淀粉为碳源时酶活力为 11.49 U/mL, 只有以玉米淀粉作为碳源时的 48.8%, 葡萄糖作为碳源时产酶活力最低, 仅为 0.83 U/mL, 故优选碳源为玉米淀粉。

2.2.2 氮源对产酶的影响: 以 (NH₄)₂SO₄、尿素、蛋白胨、酵母膏、豆粕粉等为氮源 [含量 2%], 考察氮源对 β-葡萄糖苷酶活力的影响, 结果见图 3 所示。

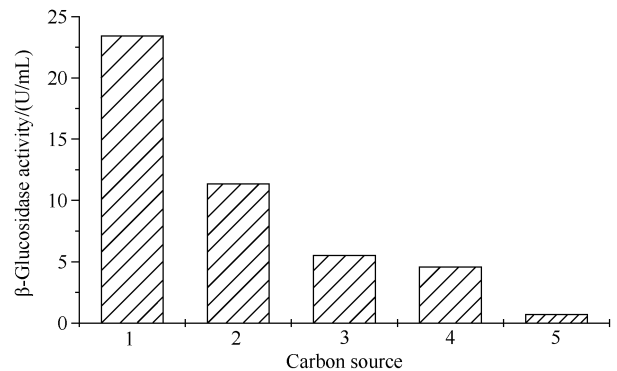


图 3 碳源对产 β-葡萄糖苷酶的影响

Fig. 3 Effect of carbon source on β-Glucosidase production. 1. Corn starch; 2. Cassava starch; 3. α-lactose; 4. Bran; 5. Glucose.

由图 4 可见,用豆粕粉为氮源时,该菌产酶活性为 157.24 U/mL,因此以豆粕粉为氮源较为适宜。

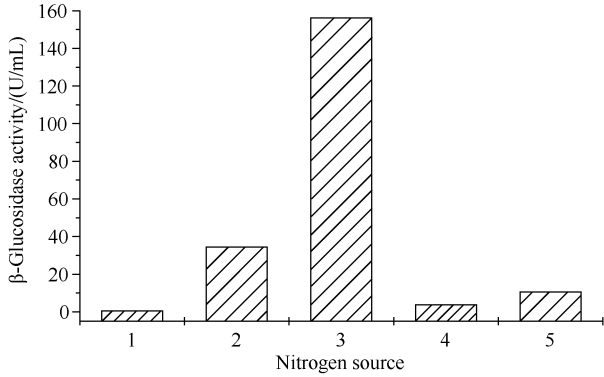


图 4 氮源对产 β 葡萄糖苷酶的影响

Fig.4 Effect of nitrogen source on β -Glucosidase production. 1. Ammonium sulphate; 2. Urea; 3. Defatted soybean; 4. Yeast extract; 5. Peptone.

2.2.3 正交试验:对培养基的成分进行了优化,设计因素、水平和结果见表 1 和表 2。

表 1 产酶条件 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

Table 1 Factor analysis is table of orthogonal-test of enzyme production

Level	A Corn starch /%	B Defatted soybean /%	C $MgSO_4$ /%	D SS /%
1	1	1	0.01	0.05
2	2	2	0.02	0.2
3	4	3	0.04	1

表 2 产酶条件 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Factor and level table of orthogonal-test of enzyme production

Test number	A	B	C	D	β -Glucosidase activity /U/mL
1	1	1	1	1	40.64
2	1	2	2	2	13.70
3	1	3	3	3	6.66
4	2	1	2	3	96.04
5	2	2	3	1	153.93
6	2	3	1	2	196.34
7	3	1	3	2	674.40
8	3	2	1	3	439.41
9	3	3	2	1	228.03
K1	61	811.08	676.39	422.6	
K2	446.31	607.04	337.77	884.44	1849.15
K3	1341.84	431.03	834.99	542.11	
k1	20.33	270.36	225.46	140.87	
k2	148.77	202.35	112.59	294.81	
k3	447.28	143.68	278.33	180.70	
R	426.95	126.68	165.74	153.95	
Optimal level	A3	B1	C3	D2	
Factors order	A	C	D	B	

由表 2 可见,最优水平组合为 A3 B1 C3 D2,故优选最佳培养基配方为:玉米淀粉 4%,豆粕粉 1%,硫酸镁 0.04%,SS 0.2%。在 4 种因素中,碳源对产酶的影响最显著,无机盐和 SS 次之,氮源最小。在最优条件下酶活力可达 674.4 U/mL。

经过培养条件的单因素分析及培养基正交试验,该菌株在玉米淀粉 4%,豆粕粉 1%,硫酸镁 0.04%,SS 0.2%,pH7.0,接种量 10%,36 h,37°C 条件下, β -葡萄糖苷酶的活性为 779.68 U/mL。

2.3 巨大芽孢杆菌-J2 (*Bacillus megaterium*-J2) 对甜菊糖的生物转化

100 mL 转化液中甜菊糖浓度为 1%,加入 10% (V/V) 菌液,pH 自然,在 37°C、180 r/min 转化 3 d。HPLC 测定转化前后 SS 和 RA 的比例。结果显示(图 5-A、B),甜菊苷 SS 被大量降解而 RA 量基本保持不变,因此 RA 的纯度得到相对提高。转化 3 d

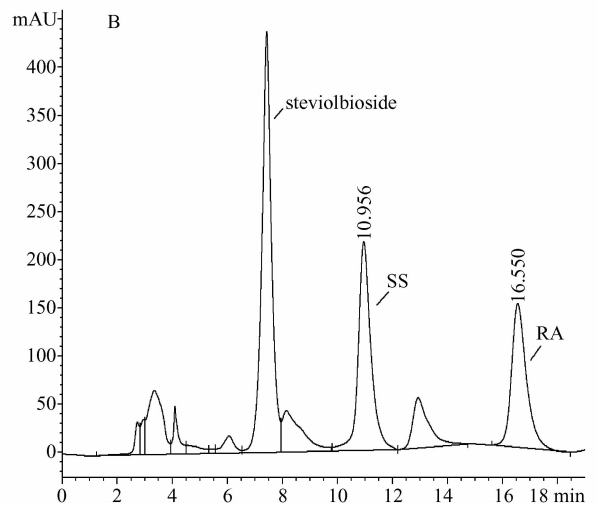
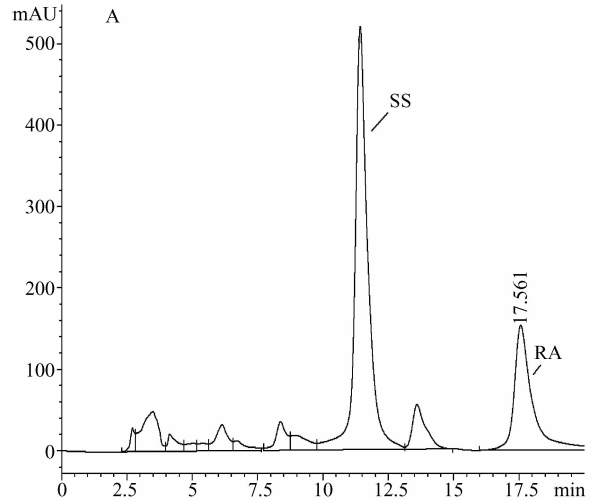


图 5 甜菊糖转化原液 HPLC(A) 和转化 3 d HPLC(B)

Fig.5 The HPLC graph (A) of Stevioside before transformation by β -Glucosidase and The HPLC graph (B) of Stevioside after 3 d transformation by β -Glucosidase.

可将 10 g/L 甜菊糖溶液中 SS 含量降解 74% ,5 d 后全部降解,转化为甜菊双糖甙。因此该菌具有高效的转化速度。本实验中莱鲍迪甙 A 和甜菊苷的比例(RA/SS)由转化前的 0.38 上升至 0.99。

2.4 转化产物的液质联用分析

对甜菊糖的菌转化产物进行了 HPLC-MS 分析,结果见表 3。由表 3 可见,甜菊双糖甙的 MS 谱中, $[M-Na]^-$ 的 m/z 为 827.3,其 MS 谱中丰度最大的离子为 m/z 665.2,MS2 谱中丰度较大的离子为 m/z 503.3,甜菊双糖甙的 MS 谱中丰度较大的离子为 m/z 503.3,与甜菊苷 MS2 谱丰度最大的离子 m/z 相同,说明经两次裂解的片段为葡萄糖碎片单位,而未知样品即转化产物的 MS 谱中丰度最大的离子 m/z 与甜菊双糖甙完全相同,故分析转化产物应为甜菊双糖甙。

表 3 标准品、转化产物的离子化物及其离子化产物的分子量质谱分析

Table 3 The molecular weight analysis of Precursor, sodium ionized and product ions from the standard compounds and biotransformation product by mass spectrometry

Samples	$[M-M]^-$	$[M-Na]^-$	Main product ions
stevioside	803.4	827.3	665.2, 503.3
rebaudioside A	965.4	989.6	827.3, 503.3
steviolbioside	641.1	665.2	503.3
unknown sample	641.1	665.2	503.3

与甜菊苷相比,甜菊双糖甙较易与莱鲍迪甙 A 的分离,甜度仅为甜菊苷的 1/20^[8],不宜作为甜味剂使用,但其分子结构中只含一分子槐糖和一分子甜菊醇基团,甜菊双糖甙在酸条件下,被水解为高附加值的槐糖和异甜菊醇^[9],是最佳的反应原料,因此具有较强的利用价值。

3 讨论

在甜菊糖的微生物转化前期研究中,Nakano 等报道了马铃薯环腐病菌可降解甜菊糖 SS 的 C19 位的糖苷酯键,降解酶属于 β -葡萄糖苷酶,使 SS 被转化为甜菊双糖甙^[10],但没有转化效率的报道,本工作筛选的巨大芽孢杆菌具有高产 β 葡萄糖苷酶能力,利用该酶可将甜菊苷选择性降解,进而可使 RA 的纯度得到提高。Oliveiraa 等也报道了赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 可降解甜菊苷,但降解时间需 7-15 d,转化 8 d 后降解率仍低于 20%^[5],本工作所用所筛选的巨大芽孢杆菌经 3 d 的转化,可将 10 g/L 甜菊糖溶液中的 SS 转化 74%,降解速度优势非常明显,巨大芽孢杆菌是在生物肥料中广泛应用

的安全菌株^[11],在安全性等方面有优势。

巨大芽孢杆菌产多种酶,包括环糊精葡萄糖基转移酶^[12],木聚糖酶^[13],耐热性胞外脂肪酶^[14]等。因而巨大芽孢杆菌也被用于其他一些物质的微生物转化中,如转化脂肪醛^[15],转化二氢异甜菊醇(ent-16 beta-hydroxybeyeran-19-oic acid)^[16],转化对羟基苯基丙烯酸^[17],或采用固定化的巨大芽孢杆菌对碳水化合物进行羟基化^[18],但巨大芽孢杆菌产 β -葡萄糖苷酶用于降解甜菊苷为本课题组首次报道^[7]。

参考文献

- [1] 胡献丽,董文宾,郑丹,等. 甜菊及甜菊糖研究进展. 食品研究与开发 (*Food Research and Development*), 2005, 1(26): 36-38.
- [2] Starrat AN, Kirby CW, Pocs R, et al. A diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 2002, 59: 367-370.
- [3] Bondarev NL, Sukhanova MA, Reshetnyak OV, et al. steviol glycoside content in different organs of *stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum*, 2003, 47(2): 261-264.
- [4] Katantri T, Xitatsume M. Preperation of *Stevia* sweetener. JP 07, 143,860, 1995.
- [5] Oliveiraa BH, Packera JF, Chimellib M, et al. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(1): 92-96.
- [6] 顾卫民,郭海风,沈爱光. β -葡萄糖苷酶产生菌发酵条件的优化、粗分离及其特性研究. 江苏食品与发酵 (*Jiangsu Food & Fermentation*), 2001, (4): 12-16.
- [7] 陈育如,刘虎,姜中玉. 一种提高甜菊糖甜质的方法. 中国专利: 申请号 200910036066.5, 2009.9.16.
- [8] 王德骥. 关于甜菊糖苷的甜度、甜味和苦涩后味的成因机理. 中国食品添加剂 (*China Food Additives*), 2007, (3): 46-53.
- [9] 陈育如,刘虎,姜中玉,等. 一种同时制备异甜菊醇和槐糖的方法, 中国专利, 公开号 CN 101497633A, 2009.3.10.
- [10] Nakano H, Okamoto K, Yatake T, et al. Purification and characterization of a novel [β]-glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 85(2): 162-168.
- [11] 曹凤明,李俊,沈德龙,等. 多重 PCR 技术检测微生物肥料中巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的研究与应用. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2009, 36(9): 1436-1441.

- [12] Zhekova B, Dobrev G, Stanchev V, et al. Approaches for yield increase of beta-cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2009, 25(6): 1043-1049.
- [13] Sindhu I, Chhibber S, Capalash N, et al. Production of cellulase-free xylanase from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp. *Current Microbiology*, 2006, 53(2): 167-172.
- [14] Sekhon A, Dahiya N, Tiwari RP, et al. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *Journal of Basic Microbiology*, 2005, 45(2): 147-154.
- [15] Abanda-Nkpwatt D, Schwab W. Microbial transformation of aliphatic aldehydes by *Bacillus megaterium* to 2,3-dialkylacroleins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(19): 5939-5942.
- [16] Yang LM, Hsu FL, Cheng JT, et al. Hydroxylation and glucosidation of ent-16 beta-hydroxybeyeran-19-oic acid by *Bacillus megaterium* and *Aspergillus niger*. *Planta Medica*, 2004, 70(4): 359-363.
- [17] Torres JLTY, Rosazza JPN. Microbial transformations of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(11): 1408-1414.
- [18] Zhekova BY, Pishtiyski IG, Stanchev VS. Investigation on cyclodextrin production with cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *Food Technology and Biotechnology*, 2008, 46(3): 328-334.

Identification, culture optimization and biotransformation of a stevioside-degrading bacterium

Hu Liu¹, Yuru Chen^{1,2*}, Zhongyu Jiang¹

(¹Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Microbiology Resources, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(²Department of Biotechnology Taizhou College, Nanjing Normal University, Taizhou 225300, China)

Abstract: [**Objective**] Our study aimed at screening and identifying a specific bacterium capable of degrading stevioside. We also studied the conditions of enzyme production and stevioside conversion. [**Methods**] Taxonomic group of the strain was confirmed by physical characterization and phylogenetic analysis by 16S rRNA gene sequence analysis and phylogenetic tree construction of the strain. The optimum conditions of enzyme producing and stevioside degrading were studied by single factor and multi-factor statistical analysis. Degradation product was detected and identified via liquid chromatography-mass spectrometry. [**Results**] Based on the result of 16S rRNA gene sequence analysis, the strain named J2 shares 100% sequence identity with the sequence of the *Bacillus megaterium*. The activity of beta-Glucosidase produced by this *Bacillus megaterium* strain was up to 779.68 U/ml with 4% maize starch, 1% defatted soybean, 0.04% MgSO₄ and 0.2% stevioside as culture medium when fermented under the condition of pH 7.0, 37°C, 220 r/min and 10% inoculum for 36 h. The results of conversion showed that 10 mg/ml stevioside can be converted to steviolbioside by 74% after 3 days which has been identified by LC-MS. The ratio of rebaudioside A and stevioside was increased to 0.99 compared to original solution 0.38, which lead to 160.5% increasement of rebaudioside A in the relative amount. Stevioside can be converted completely after 5 days. [**Conclusion**] The isolated strain J2 was identified as *Bacillus megaterium*. It was a novel and safe strain with high, specific conversion stevioside to steviolbioside ability.

Keywords: stevioside; biotransformation; rebaudioside A; β-Glucosidase; *Bacillus megaterium*

(本文责编:王晋芳)