

## 一株将甜菊苷转化为甜茶甙的细菌鉴定及转化特性

姜中玉<sup>1</sup>, 陈育如<sup>1,2\*</sup>, 刘虎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏省微生物资源工程技术研究中心, 江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室, 南京 210046

<sup>2</sup>南京师范大学泰州学院生物技术系, 制药工程系, 泰州 225300

**摘要:**【目的】筛选一株对甜菊苷具有特异转化性能的细菌, 并对该菌及转化产物进行鉴定, 探讨转化酶及酶对甜菊苷的转化特性。【方法】通过 16S rDNA 序列分析, 构建该菌系统进化树, 结合菌体形态及菌落特征, 确立该菌系统发育学地位。通过高效液相色谱 (HPLC) 及液质联用 (LC-MS) 法检测并鉴定转化产物。用菌液直接对甜菊苷进行转化以研究菌的转化能力。用静息细胞、胞外液和胞内液对甜菊糖分别转化法, 确定转化酶与菌体的关系, 并用该酶液进行转化特性研究。【结果】该菌株与黄杆菌属的 16S rDNA 序列相似性为 99%, 结合菌体及菌落的形态特征, 鉴定该菌为黄杆菌属 (*Chryseobacterium sp.*) 黄杆菌。转化产物经高效液相色谱及液质联用法鉴定为甜茶甙。用菌液直接转化, 48 h 可将 10 g/L 甜菊糖中甜菊苷 (7.2 g/L) 完全转化, 转化率达 100%, 得到 5.7 g/L 甜茶甙溶液。【结论】确定该菌为黄杆菌 (*Chryseobacterium sp.*), 能将甜菊苷高效、特异性地转化为甜茶甙。

**关键词:** 黄杆菌, 甜菊苷, 甜茶甙, 胞内酶, 生物转化

**中图分类号:** Q939.97   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0043-07

甜菊糖是从菊科甜叶菊 (*Stevia rebaudiana bertonii*) 中提取的一种天然甜味剂, 含量占甜菊叶干重的 4% - 20%<sup>[1]</sup>。我国是世界上最大的甜菊糖生产国, 资源量大<sup>[2]</sup>。甜菊糖主要含甜菊苷 (stevioside, SS) 和莱鲍迪甙 A (rebaudioside A, RA) 两种成份。RA 甜味品质好但含量比 SS 低, SS 含量高但其甜味有一定的后苦味<sup>[3]</sup>。因此许多学者对 SS 进行了改性研究以期改善甜菊糖的甜味品质<sup>[4-6]</sup>。在生物转化研究中, 早在 1955 年, Mosettig 等使用蜗牛酶使 SS 彻底水解成甜菊醇, 但所得产物非常少<sup>[7]</sup>。日本学者 Kaneda 使用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 转化 SS 为甜茶甙 (rubusoside,

RS), 然后利用化学方法合成 RA, 但由 SS 转化为 RS 耗时 80 h, RS 只作为一种中间产物<sup>[8]</sup>。另有报道马铃薯环腐病菌 (*Clavibacter michiganense*) 产生的特异  $\beta$ -葡萄糖苷酶可将甜菊糖各种混合物 C19 位的糖苷酯键水解<sup>[9]</sup>, 产生甜菊双糖甙。Oliveira 等发现赤霉菌 (*Gibberella fujikuro*) 可以将甜菊糖中各种糖苷混合物部分转化为 RA, 从而提高混合物中 RA 的含量, 但此方法转化时间很长, 经 8 d 的转化甜菊苷的含量仍大于 80%, 转化率较低<sup>[10]</sup>。

甜茶甙也是一种天然甜味剂, 来源于蔷薇科悬钩子属多年生植物甜茶 (*Rubus suavissimus*), 含量占甜茶干叶重的 2.0% 左右, 化学结构与甜菊苷相似,

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: 姜中玉 (1986-), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物的学习与研究。

收稿日期: 2010-05-01; 修回日期: 2010-06-03

甜度是蔗糖的 300 倍,但热值低、甜度高、耐高温、食用极为安全,对高血压、糖尿病等有一定的辅助疗效,并能促进新陈代谢,治疗胃酸过多等疾病<sup>[11-12]</sup>。甜茶主要分布在我国南方丘陵地区,主产广西,通常生长于海拔 500 m - 1000 m,所以 RS 的来源受资源量和产地的限制<sup>[13]</sup>。

我们在选育了一株甜菊苷特异转化菌的基础上<sup>[14]</sup>,对转化菌进行了鉴定和快速转化 SS 为 RS 特性研究,利用甜菊苷特异转化产生甜茶甙,将大大减少甜茶种植对生态环境的压力,提高甜菊的资源利用率,并为甜菊糖的改性研究提供一条新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**黄杆菌 JH (*Chryseobacterium* sp. CCTCC NO: M209202)<sup>[14]</sup>从江苏土壤中筛选,本实验室分离保存。

**1.1.2 培养基:**菌种保藏培养基:肉汤培养基。(1)活化培养基:淀粉 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g/L,  $\text{NaCl}$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.4 g/L, 甜菊糖 1 g/L。(2)转化培养基:除甜菊糖含量为 10 g/L 外,其余成份与含量与活化培养基相同。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**甜菊糖(SS:72%)、甜菊苷标准品(SS $\geq$ 98%)和甜茶甙等由赣州普赛科公司提供。利福平(纯度 $\geq$ 95%)、甲醇(HPLC 级)、乙腈(HPLC 级)。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 垂直层流超净工作台(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);Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司);Agilent 6310 质谱仪(Agilent 公司);高速离心机 Sigma 3K30 Laboratory Centrifuges(Sigma 公司);高压破碎机(Thermo electron Corporation);自动制冰机 Scotsman AF100 automatic ice machines(S. P. A.)。

### 1.2 菌种的筛选与鉴定

经常规筛选获得 3 株能将甜菊糖转化的菌株,分别命名为 JH、JB、JQ。选择其中转化能力最强的

一株 JH 进行鉴定,通过菌落形态和分子生物学鉴定方法进行鉴定。在分离菌株的基础上,对所筛选的菌株分别培养并进行转化实验,HPLC 和 LC-MS 法鉴定转化产物。

分子生物学鉴定:经传代培养 15 h 的菌液用 K713 细菌试剂盒提取 DNA。用于 16S rRNA 基因扩增的细菌通用引物为 27f: AGAGTTTGATCCT GGCTCAG,1492r: GGTACCTTGTACGACTT。

PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ):10  $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , dNTP(5 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ (20 ng),Taq 酶 1.5 U,加水补至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:98 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min 后,94 $^\circ\text{C}$  变性 35 S,55 $^\circ\text{C}$  退火 35 S,72 $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^\circ\text{C}$  延伸 4 min。

16S rDNA 测序后,将序列与 Gene Bank 中序列进行比对,选取 12 个与所测序列相似性较高的种或属,使用生物软件 clustalx 和 MEGA4,采用 Neighbor-Joining 法构建进化树图。

### 1.3 甜菊糖的 HPLC 检测

色谱条件:Agilent 1100 高效液相色谱仪,色谱柱为 Kromasil-NH<sub>2</sub>(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。

### 1.4 LC-MS 法对产物的检测

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

### 1.5 计算方法

取一定量甜菊苷于 105 $^\circ\text{C}$  烘箱烘至恒重,准确配制 11.52 g/L 的甜菊苷标准溶液,梯度稀释至浓度分别为 5.76 g/L、2.88 g/L、1.44 g/L、0.72 g/L、0.36 g/L,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,HPLC 法检测 6 个样品的 SS 峰面积,绘制 SS 浓度 - 峰面积标准曲线。根据标准曲线计算 SS 转化率、RS 生成量,公式如下:

$$\text{SS 标准曲线: } y(\text{峰面积}) = 2988.3x(\text{浓度 g/L}) + 463.51(R^2 = 0.998)$$

$$\text{RS 生成量(g/L)} = (\text{原液中 SS 添加量} - \text{转化液中 SS 量}) \times \text{RS 摩尔质量} / \text{SS 摩尔质量}$$

$$\text{SS 转化率(\%)} = (\text{原液中 SS 添加量} - \text{转化液中 SS 量}) \times 100 / \text{原液中 SS 添加量}$$

## 1.6 菌或酶液对 SS 的转化

**JH 菌的直接转化:**100 mL 经 24 h 活化培养的菌液按 10% (V/V) 接种量接入转化培养基,在 30℃ ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )、180 r/min 的条件下培养 48 h。HPLC 法检测 SS 含量。

**静息细胞转化:**100 mL 经活化培养的菌液经  $14972 \times g$ 、4℃ 冷冻离心 12 min 得到菌体,菌体用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,并用相同缓冲液重新悬浮,定容至 30 mL 即得到静息细胞。加甜菊糖使其浓度为 10 g/L,培养 12 h。HPLC 法检测 SS 含量。

**胞外液制备:**100 mL 活化培养的菌液同样条件离心得到上清即为胞外液。

**机械破碎制备胞内液:**100 mL 活化培养的菌液冷冻离心所得菌体用 pH 7.0 磷酸盐缓冲液洗涤两次,并用少量缓冲液重新悬浮。将重悬菌液冰浴 0.5 h。采用高压细胞破碎仪于压力 8619 KPa 下对

菌体进行破碎,重复破碎 3 次,将破碎后的菌液于 4℃、 $8228 \times g$  离心 10 min,去除沉淀,即为初始胞内液。

**胞外液及胞内液对 SS 的转化:**取初始胞内液,加甜菊糖使其浓度为 10 g/L。将胞外液加甜菊糖使其浓度同样为 10 g/L,在胞内、外液中各添加 1 mL 0.5 g/L 利福平水溶液,于 30℃ ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) 条件下对 SS 进行转化,HPLC 法检测 SS 含量。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的筛选与鉴定

**2.1.1 JH 菌的形态及菌落特征:**所筛选菌体短杆状,形态微小, $G^-$ ,单个排列,无芽孢。在 PDA 培养基平板上菌落呈圆形,直径 1 mm - 2 mm,凸起、表面光滑、有光泽、边缘齐整、橙黄色较不透明。

**2.1.2 JH 菌的 16S rDNA 序列系统发育分析:**根据 1.2 的方法进行鉴定,建立系统进化树,见图 1。

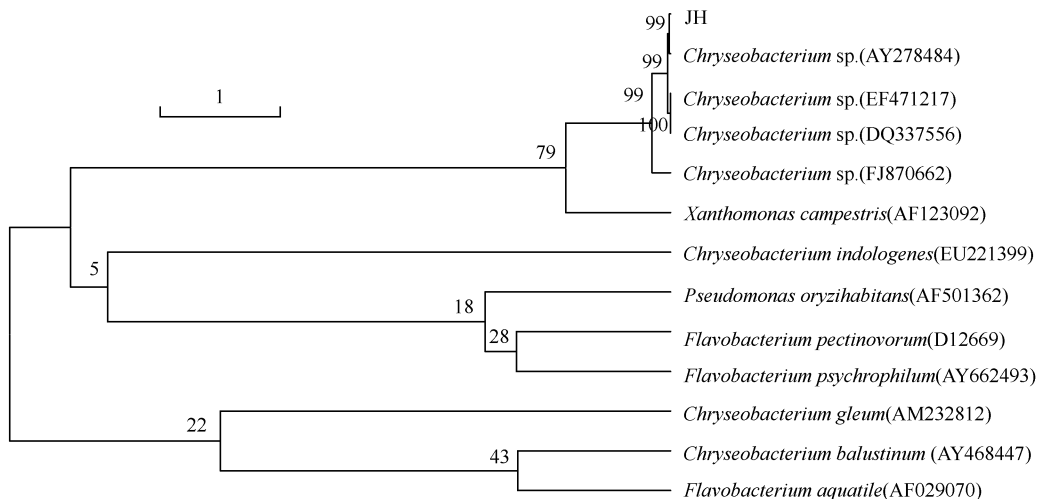


图 1 JH 菌的系统进化树图

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Chryseobacterium* sp. JH. Phylogenetic tree of strain JH and relevant strains constructed from complete sequences of 16S rDNA. Numbers in bracket represent the sequences accession number in Gene Bank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1 sequence divergence.

所测菌的 16S rDNA 序列全长为 1478 bp,用 Blast 与 Gene Bank 中的核酸数据进行比对分析,结果发现其与金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp. [AY278484]) 的序列相似性为 99%。从图 1 进化树可见,该菌与金黄杆菌属的亲缘关系最近,与其相邻属黄色杆菌属 (*Xanthomonas campestris*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas oryzae*) 亲缘关系则比较远。结合菌株形态和菌落特征分析,该菌符合

金黄杆菌属的特征,但与此属中的其他种比较又有显著的差别,大比目鱼黄杆菌 (*Chryseobacterium balustinum*)、水生黄杆菌 (*Flavobacterium aquatile*)、粘黄杆菌 (*Chryseobacterium gleum*) 等之间的差异都很大,相似性不足 50%,因此鉴定该菌为金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.) 金黄杆菌 JH。金黄杆菌 (*Chryseobacterium*) 又称黄杆菌 (*Flavobacterium*)<sup>[15]</sup>。

## 2.2 产物鉴定

**2.2.1 外标法对转化产物的鉴定:**将 RS 标准品添加到甜菊糖溶液中, HPLC 法检测 RS 色谱峰保留时间, 结果如图 2 所示。SS 完全转化的甜菊糖色谱图如图 5 所示。

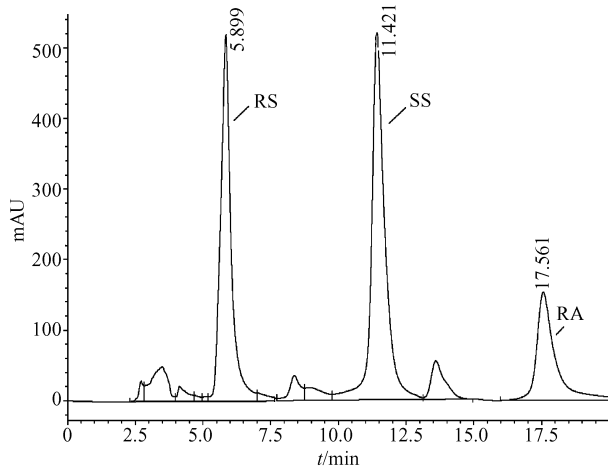


图 2 含 RS 的甜菊糖 HPLC 图

Fig. 2 The HPLC graph of RS-containing stevioside.

由图 2 可见, RS 标准品的保留时间为 5.899 min, 与图 5 中 SS 完全转化后的未知峰保留时间相同, 由此初步推断图 5 中未知峰可能为甜茶甙。

**2.2.2 LC-MS 法对转化产物的鉴定:**进一步对产物进行液质联用 (LC-MS) 分析, 结果见表 1 和图 3 所示。

表 1 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 1 The molecular weight analysis of Precursor, sodium ionized and product ions from the standard compounds and biotransformation product by mass spectrometry

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

表 1 是甜菊苷、莱鲍迪甙 A 和甜茶甙 3 种标准品和未知样品的质谱分析结果, 由表 1 和图 3 可见, 甜菊苷的 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, MS<sub>2</sub> 谱中丰度较大的离子为  $m/z$  503.3。甜茶甙的 MS 谱中丰度较大的离子为  $m/z$  503.3, 与甜菊苷 MS<sub>2</sub> 谱丰度最大的离子  $m/z$  相同, 说明甜菊苷经 2 次裂解去掉

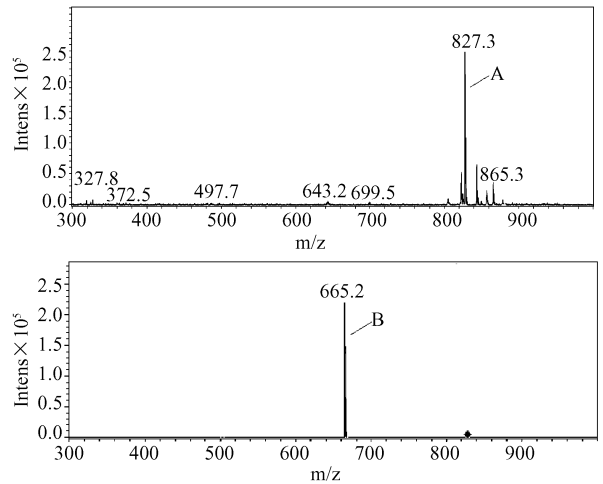


图 3 甜菊苷 (A) 和甜茶甙 (B) 的一级质谱图

Fig. 3 MS spectrum of stevioside (A) and rubusoside (B).

两个葡萄糖碎片, 甜茶甙经一次裂解去掉一个葡萄糖单位。而未知样品即转化产物的 MS 谱中丰度最大的离子  $m/z$  与甜茶甙完全相同。结合外标法分析鉴定转化产物为甜茶甙。

## 2.3 黄杆菌 JH (*Chryseobacterium sp.*) 对甜菊苷的转化

**2.3.1 JH 菌对 SS 的直接转化:**根据 1.6 实验方法利用菌体对 SS 直接进行了转化, 转化原液和转化完全的转化液 HPLC 图见图 4 和图 5。

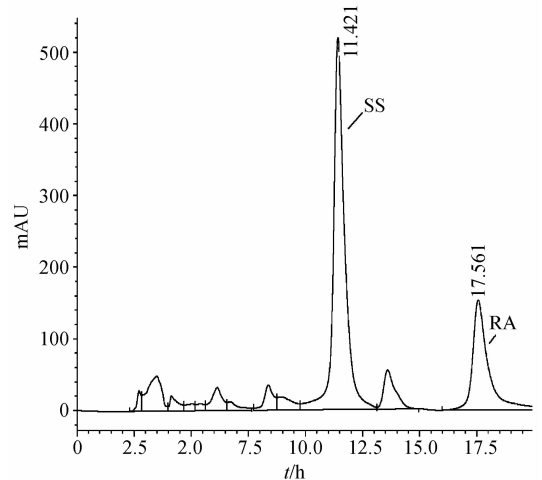


图 4 甜菊糖原液的 HPLC 图

Fig. 4 The HPLC graph of stevioside before transformation.

图 4 和图 5 可见, SS (保留时间 11.4 min) 被大量转化为 RS (保留时间 6.0 min)。JH 菌转化 48 h 可将 10 g/L 甜菊糖溶液中 SS 全部转化, 转化率达 100%, 转化后可得到含 5.7 g/L 的 RS 转化液, 可见该菌对 SS 具有高效特异的转化特性。

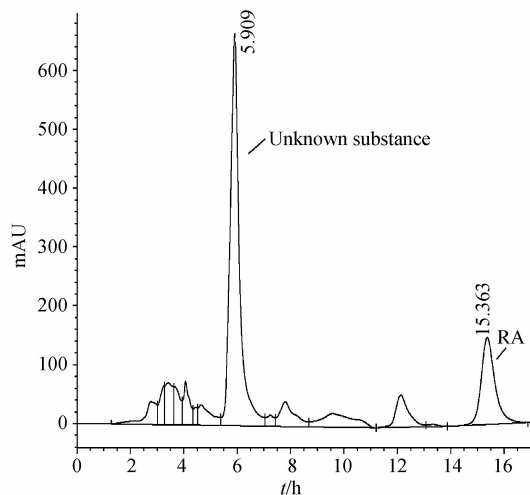


图5 SS转化完全的甜菊糖 HPLC 图

Fig. 5 The HPLC graph of completely converted stevioside.

**2.3.2 静息细胞、胞内液及胞外液对 SS 的转化:**按照方法 1.6 用静息细胞、胞内液及胞外液对 SS 进行转化。胞内液和胞外液对 SS 的转化过程中加入抗生素以抑制细菌的生长,适量利福平可以有效抑制杂菌和 JH 菌的生长。3 种转化物质对 SS 转化的结果如图 6 所示。

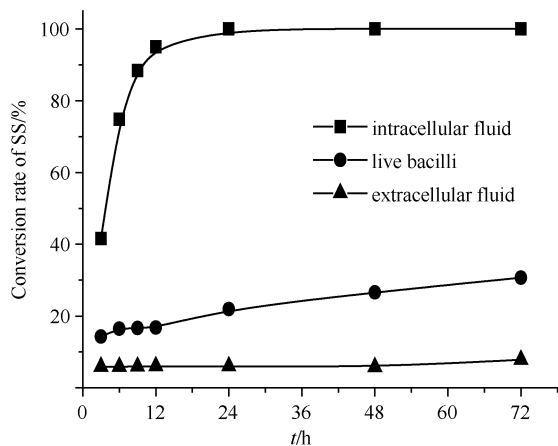


图6 等量活菌液,胞内、外液对 SS 的转化

Fig. 6 Conversion of SS by equivalent live bacilli, intracellular fluid and extracellular fluid.

从图 6 可见,在相等菌量条件下,胞内液对 SS 的转化率最高。12 h 内 SS 迅速转化,并在 12 h 时转化率达到 95.0%,24 h 时转化率达 100%。用静息细胞和胞外酶液时,SS 仅有少量转化,12 h 的转化率分别为 16.8% 和 6.0%,远低于胞内液的转化率,所以推测转化酶属于胞内酶。

**2.3.3 温度对胞内酶转化 SS 的影响:**在 25℃、30℃、

35℃、40℃、45℃ 和 50℃ 条件下,分别于 150 r/min 转化 4 h,以探讨温度对转化的影响,结果如图 7 所示。

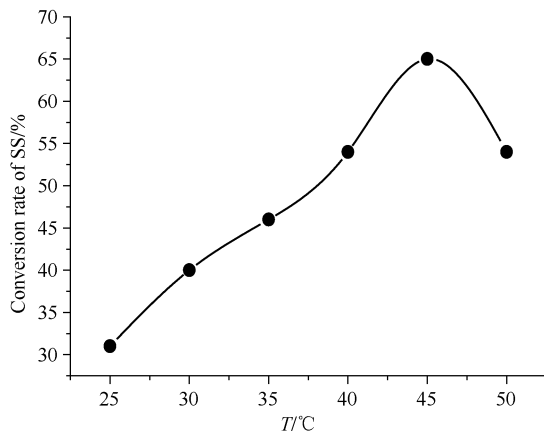


图7 温度对转化效果的影响

Fig. 7 Effect of temperature on conversion of stevioside.

由图 7 可见,在 25℃ - 45℃ 范围内,SS 转化率随温度的升高而增大,并在 45℃ 达到最高,为 65.0%。温度继续升高时转化率则下降。故最适转化温度为 45℃。

**2.3.4 pH 对胞内酶转化 SS 的影响:**在 4.6、5.0、6.0、7.0、8.0 和 8.7 不同 pH 的缓冲液中,于 45℃、150 r/min 转化 4 h,考察 pH 对 SS 转化的影响,结果如图 8 所示。

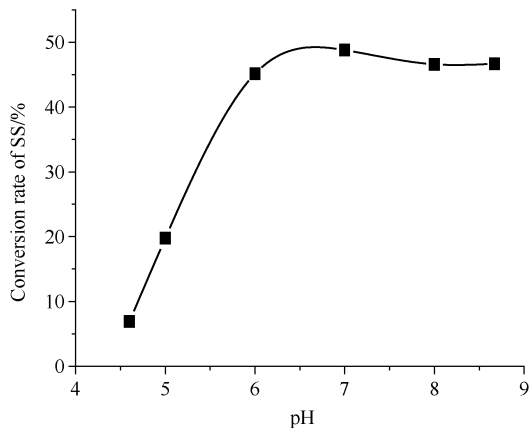


图8 溶液 pH 对转化效果的影响

Fig. 8 Effect of pH on conversion of stevioside.

由图 8 可见,该胞内酶的 pH 适应范围比较宽,在 pH 6.0 - 8.7 范围内,SS 转化率基本稳定在 45% 以上,pH 7.0 时转化率最高,为 48.8%。

### 3 讨论

本工作将分离并鉴定的黄杆菌应用于甜菊糖的

转化,并高效、特异性地将 SS 转化为 RS,为甜菊苷的开发应用提供了一条新的途径,同时还提出了甜茶甙因资源量的限制而产量受限问题的解决途径。该菌株仅对甜菊糖中 SS 成份有转化作用,而对甜度较高、口感更纯正的 RA 不降解,因此对甜菊糖中 RA 的生物酶法提纯也提供了一种重要的方法。黄杆菌通常用于环境中有害物质如芘、甲基叔丁基醚 (MTBE)、乙酰甲胺磷等的降解<sup>[16-18]</sup>,本工作拓展了黄杆菌的应用范围。

在对甜菊糖改性及转化的研究中,节杆菌<sup>[6]</sup>、马铃薯环腐病病菌<sup>[9]</sup>、赤霉菌<sup>[10]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[19]</sup>等均有应用,但无论是用游离细胞还是菌体所产酶对甜菊苷的转化速率都较慢。如 Oliveira 等利用赤霉菌 (*Gibberella fujikuro*) 直接转化 SS 以提高 RA 含量,其转化时间达 8 d,SS 转化率也低于 20%<sup>[10]</sup>。Kaneda 使用米曲霉所产淀粉酶对 SS 进行转化以获得中间产物甜茶甙,但转化时间高达 80 h<sup>[8]</sup>。

本工作利用所筛选的黄杆菌直接对甜菊糖进行转化,实验条件下经 48 h 可将 10 g/L 甜菊糖中 SS 完全转化。因此对该菌及酶进行深入研究对甜菊苷和甜茶苷产业的发展都具有重要的意义。

## 参考文献

- [ 1 ] Geuns JMC. Stevioside. *Phytochemistry*, 2003, 64:913-921.
- [ 2 ] 倪军明,李军平. 甜菊糖工业发展现状与前景. 广州食品工业科技 (*Guangzhou Food Science and Technology*), 2004, 20(3):156-158.
- [ 3 ] Starrat AN, Kirby CW, Pocs R, Brandle JE. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 2002, 59:367-370.
- [ 4 ] Lobov SV, Kasai R, Ohtani K, Tanaka O, Yamasaki K. Enzymic Production of Sweet Stevioside Derivatives; Transglucosylation by Glucosidases. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(12):2959-2965.
- [ 5 ] Abelyan VA, Balayan AM, Ghochikyan VT, Markosyan AA. Transglycosylation of Stevioside by Cyclodextrin Glucanotransferases of Various Groups of Microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40(2):129-134.
- [ 6 ] 徐仲伟,邵佩霞,陈华勇,王永华,杨博,宁正祥.  $\beta$ -呋喃果糖苷酶催化甜菊糖的改性研究. 现代食品科技 (*Modern Food Science and Technology*), 2008, 24(11):1108-1110.
- [ 7 ] Mosettig E, Nes WR. Stevioside II The Structure of The Aglucon. *Journal of Organic Chemistry*, 1955, 20(7):884-899.
- [ 8 ] Kaneda N, Kasai R, Yamasaki K, Tanaka O. Chemical Studies on Sweet Diterpene-Glycosides of *Stevia rebaudiana*; Conversion of Stevioside into Rebaudioside-A. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 1977, 25(9):2466-2467.
- [ 9 ] Nakano H, Okamoto K, Yatake T, Kiso T, Kitahata S. Purification and characterization of a novel [beta]-glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 85(2):162-168.
- [ 10 ] Oliveira BH, Packer JF, Chimelli M, Jesus DA. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(1):92-96.
- [ 11 ] 何伟平. 天然甜味剂-甜茶甙的工业化试验. 广西轻工工业 (*Guangxi Light Industry*), 1999, (1):1-5.
- [ 12 ] 周如金,黄敏,张玲,马玉刚,李春海. 大孔吸附树脂提取甜茶苷的研究. 林产化学与工业 (*Chemistry and Industry of Forest Products*), 2008, 28(5):35-39.
- [ 13 ] 梁坚. 甜茶的研究进展. 广西医学 (*Guangxi Medical Journal*), 2004, 26(6):845-847.
- [ 14 ] 陈育如,姜中玉,刘虎. 一种由甜菊糖苷制备甜茶甙的方法. 中国;200910035921.0.2009.9.14.
- [ 15 ] 梁逸辰. *Chryseobacterium taeanense* TKU001 发酵绿豆所生产淀粉酶及其生物活性物质之研究. 台湾淡江大学, 1998.
- [ 16 ] 聂麦茜,吴蔓莉,王晓昌,林玲,王蕊,王学选. 一株黄杆菌及其粗酶液对芘转化的动力学特征研究. 环境科学学报 (*Acta Scientiae Circumstantiae*), 2006, 26(2):181-185.
- [ 17 ] 张瑞玲,李鑫钢,欧志龙,姜斌,廉景燕. MTBE 转化菌的分离及转化动力学分析. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro-Environment Science*), 2007, 26(1):301-305.
- [ 18 ] 解开治,徐培智,陈建生,唐拴虎,张发宝,杨少海,黄旭. 乙酰甲胺磷转化菌株 XP-3 的分离鉴定及其生理特性研究. 广东农业科学 (*Guangdong Agricultural Sciences*), 2008, (8):79-82.
- [ 19 ] 胡静,陈育如,魏霞,刘友芬. 高产环糊精葡萄糖基转移酶的枯草芽孢杆菌的选育、产酶与酶学特性. 食品与生物技术学报 (*Journal of Food Science and Biotechnology*), 2008, 27(4):16-19.

# Identification and biotransformation properties of a bacterium that converts stevioside into rubusoside

Zhongyu Jiang<sup>1</sup>, Yuru Chen<sup>1,2\*</sup>, Hu Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jiangshu Engineering and Technology Research Center for Microbiology Resources, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Jiangsu key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

<sup>2</sup>Department of Biotechnology Taizhou College, Nanjing Normal University, Taizhou 225300, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The purpose of our study was to separate and identify a bacillus that could convert stevioside specifically. Then we identified the conversion product and studied the conversion capability of the bacillus. We also studied the enzyme with conversion capability and the conversion characteristic of the enzyme. [ **Methods** ] The bacillus was identified on the basis of morphology features and 16S rDNA sequence analysis. Phylogenetic tree was constructed to determine its taxonomic status. The product was detected and identified by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry methods. We use bacteria media directly to studied the conversion capability of the bacillus, and use resting cells, extracellular fluid and intracellular fluid to convert stevioside to determine the enzyme and made further study to learn its conversion characteristic. [ **Results** ] The 16S rDNA sequence of the strain had 99% similarity with *Chryseobacterium sp.*, which was ultimately identified as *Chryseobacterium sp.* JH. The product of biotransformation was rubusoside and the enzyme that converts stevioside into rubusoside was intracellular enzyme. The conversion rate could reach 100%, obtained 5.7 g/L rubusoside solution after 48 h by bacteria media when the concentration of stevia glycosides was 10 g/L, including 7.2 g/L stevioside. [ **Conclusion** ] The isolated strain JH was identified as *Chryseobacterium sp.*. It was a novel strain with high, specific ability to convert stevioside into rubusoside which had potential applications.

**Keywords:** *Chryseobacterium sp.*, stevioside, rubusoside, intracellular enzymes, biotransformation

(本文责编:张晓丽)