

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(1):62-68; 4 January 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.008

棘孢曲霉转化甜菊糖为甜菊醇及纯化莱鲍迪苷 A

马迎迎¹, 陈育如^{1,2*}, 张伟娜¹, 孙欢¹, 夏文静²

¹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, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省功能微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 210023

²南京师范大学泰州学院, 生物技术与化学工程学院, 江苏 泰州 225300

摘要: 【目的】本工作对棘孢曲霉固体发酵抽提酶液转化甜菊糖进行了研究, 并对转化产物进行鉴定及纯化分析。【方法】用高效液相色谱、液质联用及红外光谱等方法对转化新产物进行鉴定, 对上清液中莱鲍迪苷 A (RA) 成分进行纯化。【结果】棘孢曲霉酶液在 10 h 内对甜菊糖中的甜菊苷 (SS)、莱鲍迪苷 C (RC) 进行高效特异性转化, 以沉淀的形式析出的转化产物经鉴定为甜菊醇, 转化率高达 98.0%, 分离提纯后纯度为 95.2%, 回收率达 84.0%。由于甜菊醇的沉淀分离, 留在溶液中的 RA 更易被纯化。RA 通过树脂吸附分离的回收率为 80.5%。【结论】棘孢曲霉酶液对甜菊糖的一次转化可以同时得到甜菊醇和莱鲍迪苷 A 两种产品, 是一种经济高效的工艺。

关键词: 甜菊糖, 棘孢曲霉, 生物转化, 莱鲍迪苷 A, 甜菊醇

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 01-0062-07

甜菊醇 (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oic acid, steviol), 是甜菊苷的苷元, 分子具有对映贝壳杉烯型四环二萜骨架结构, 具有广泛的生理活性, 能提高小麦抵御严寒^[1]、有利于小鸡孵化^[2]、清热解毒、抗菌消炎、抗肿瘤等生理活性功能^[3-4]。在 20 世纪 80 年代, 甜菊糖经高碘酸钠或四醋酸铅氧化, 再经碱水解可以得到甜菊醇^[5], 此法需要消耗大量价格昂贵的高碘酸钠和有毒的重金属盐。Oliveira 等利用赤霉菌生物转化甜菊糖能得到甜菊醇^[6], 但这种转化方法在室温下需长达 7 天, 转化效率也有待于提高。甜叶菊中甜菊醇含量极低, 经提取和分离等步骤只能得到少量的甜菊醇, 因此产量难以提高。

用蜗牛酶水解甜菊糖获得甜菊醇是近年来开发的方法之一, 但蜗牛酶本身成本高而难以用于工业化生产^[7]。本课题组以巴氏微杆菌生物转化甜菊醇比蜗牛酶法成本大为降低, 但巴氏微杆菌会将莱鲍迪苷 A 降解, 菌体与沉淀的甜菊醇也不易分离^[8]。因此寻找更新的微生物和转化方法对甜菊醇的工业化生产具有重要的意义。

甜菊糖中的莱鲍迪苷 A 是甜度与品质俱佳的糖苷, 其甜度是蔗糖的 300 倍^[9], 可用于饮料、酱油及各种蔬菜的腌制等, 大大降低蔗糖的使用量, 更适合于肥胖症和糖尿病患者使用^[10]。因此, 低成本地分离甜菊糖中的莱鲍迪苷 A 具有重要的经济价值。

基金项目: 国家林业行业公益专项 (200904055); 江苏省优势学科生物学项目 (2011010)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-85891527; E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

作者简介: 马迎迎 (1986-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 从事微生物的学习与研究。

收稿日期: 2013-05-13; **修回日期:** 2013-06-21

现有莱鲍迪昔 A 的提取方法主要是树脂分离和双溶剂结晶法等。树脂分离利用大孔树脂的选择性进行^[11], 由于甜菊糖中的苷类极性相似, 因此分离难度大; 而双溶剂重结晶法^[12-13], 是根据各种糖苷在不同有机溶剂中的溶解度差异来分离的, 在实验过程中需要消耗大量有机溶剂。巨大芽孢杆菌^[14]可将甜菊苷选择性降解以提纯莱鲍迪昔 A (RA), 但甜菊苷的降解产物仍是水溶性的不易与莱鲍迪昔 A 分离。本工作采用棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)^[15] 酶液对甜菊糖进行转化, 产物甜菊醇以沉淀形式析出, 莱鲍迪昔 A 留在转化液中, 极利于产品的后续分离纯化工作, 过程周期短, 条件温和, 成本低。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*, 保藏号 CCTCC NO: M2011264), 本实验室分离保存。

1.1.2 培养基: 菌种保藏用土豆葡萄糖琼脂培养基 (PDA 培养基)。固体发酵培养基: 5 g 麸皮、5 g 豆粕粉、25 mL 的营养液 [MgSO_4 0.08%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%、 KH_2PO_4 0.04%] 混匀, 自然 pH, 121℃ 灭菌 30 min。

1.1.3 材料: 甜菊糖 (SS > 40%, 普赛科公司)、正丁醇 (AR 级, 国药集团化学试剂公司)、乙腈和甲醇 (均为 HPLC 级, TOE SCIENTIFIG INC 公司)。

1.1.4 仪器: GNP-9080 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备公司); ES-315 高压蒸汽灭菌锅 (TOMY, Japan); FA2004 电子分析天平 (上海良平仪器仪表公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 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); LC-MS (Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS); 高速离心机 Sigma 3k30 (Sigma 公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 红外光谱仪 Nexus670 (美国尼高力公司); CN-210 树脂 (市购)。

1.2 酶液制备及其转化方法

制备棘孢曲霉孢子悬液接种于固体发酵培养基, 30℃ 培养 3 天, 加入 100 mL 无菌水浸提, 抽滤得酶液约 75 mL。取 60 mL 酶液加入 0.5% (V/V) 甜菊糖在 45℃ 水浴中静置转化, 定时取样分析。

1.3 HPLC 和液质联用分析

HPLC 分析: 色谱柱为 Kromasil-NH₂ (4.6 mm × 250 mm), 210 nm 紫外检测, 流动相为乙腈-水 (3:1 V/V), 柱温 30℃, 流速为 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 时间 15 min。

液质联用分析: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS 液质联用仪. 电喷雾离子化源 (ESI); 负离子模式检测; 加热毛细管温度 300℃; 扫描范围 100 - 1500 m/z; 吹扫气压力 45 psi; 雾化电压 3.5 kV; 一级质谱碰撞能量 5 eV。

1.4 红外分析及转化产物纯化

甜菊醇与溴化钾混匀研磨后压片, 进行红外分析。棘孢曲霉酶液对甜菊糖中的 SS、RC 进行特异性转化, 转化的新产物经有机溶剂纯化后得到高纯度结晶。转化液中的 RA 经过 CN-210 树脂吸附, 先用 3 倍柱体积水进行洗脱, 再用 3 倍柱体体积的 70% 乙醇洗脱, 收集该洗脱液, 进行液相检测。

1.5 计算方法

取一定量的甜菊醇标品, 准确配制 0.96 mg/mL 的甜菊醇标准溶液, 梯度稀释至浓度分别为 0.48、0.24、0.12、0.06、0.03, 经 0.25 μm 微孔过滤膜过滤, HPLC 分析, 绘制甜菊醇浓度-峰面积标准曲线, 据此计算甜菊醇生成量。

甜菊醇标准曲线: $y = 310.35x \text{ (g/mL)} + 6.84$ ($R^2 = 0.999$); x 为甜菊醇浓度, y 为峰面积。

甜菊醇回收率 = 纯化后甜菊醇量 (g) / 纯化前甜菊醇量 (g) × 100%。

取一定量的 RA 标品, 准确配制 0.445 mg/mL 的 RA 标准溶液, 梯度稀释至不同浓度, 根据 HPLC 结果绘制 RA 浓度-峰面积标准曲线, 据此计算 RA 量。

RA 标准曲线: $y = 52638.28x \text{ (g/mL)} + 1706.25$ ($R^2 = 0.996$); x 为 RA 浓度, y 为峰面积。

RA 回收率 = 纯化后 RA 量 (g) / 纯化前 RA 量 (g) × 100%

2 结果

2.1 酶液对甜菊糖的转化

甜菊糖原液、转化 10 h 和 24 h 的 HPLC 分析见图 1 中 A、B、C 所示。

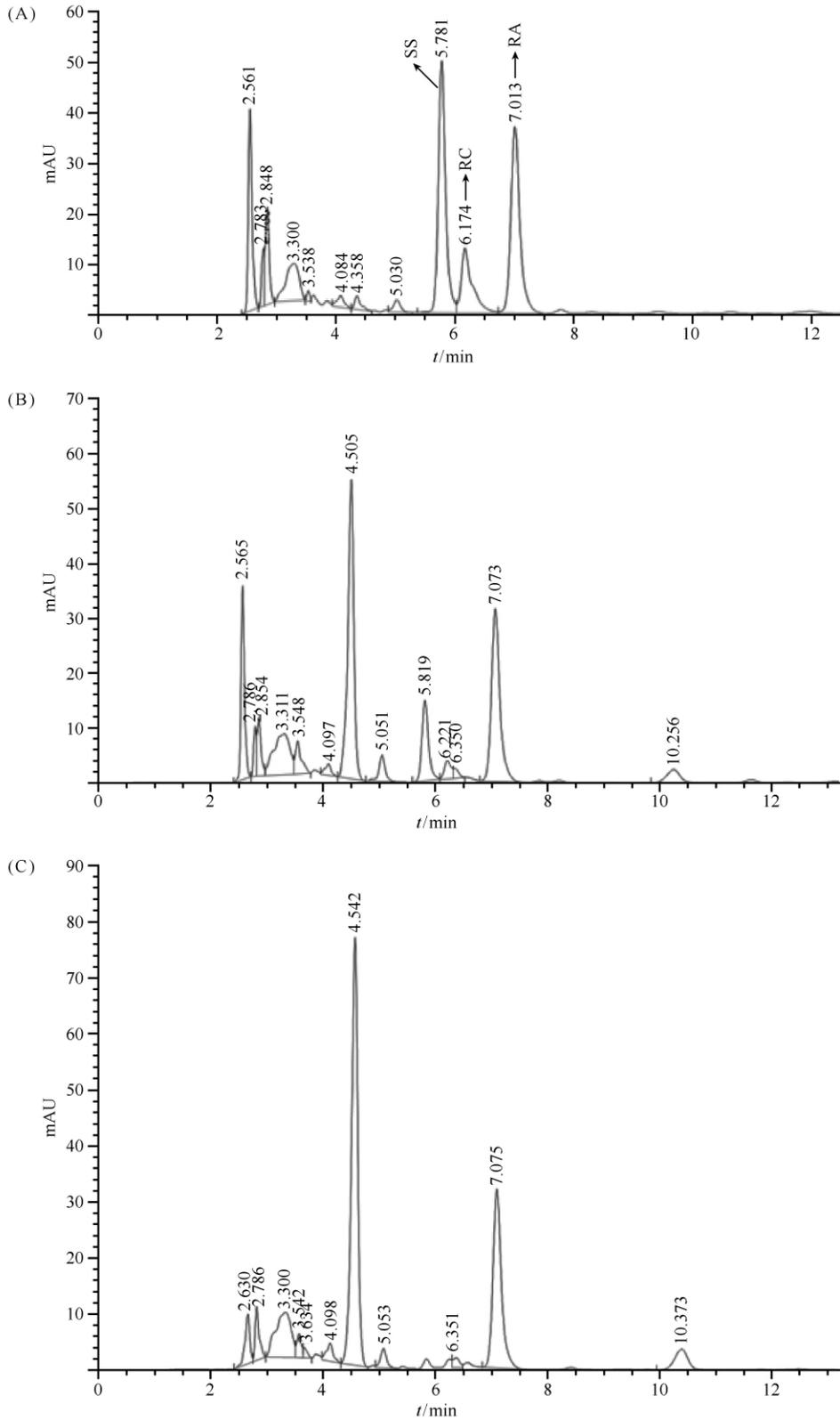


图 1. 棘孢曲霉酶液转化甜菊糖 0 h (A)、10 h (B) 和 24 h (C) 的 HPLC 图

Figure 1. HPLC analysis of stevioside biotransformed 0 h (A), 10 h (B) and 24 h (C) by enzyme of *Aspergillus aculeatus*.

从图 1-A、B 两图可见,随着转化的进行,甜菊糖中的甜菊苷(SS)、莱鲍迪苷 C(RC)量减少,出现新产物,出峰时间为 4.5 min。由图 1-C 可见,24 h 后,SS、RC 完全被降解,新产物浓度达到最大值。图 2 可见,RA 量基本稳定,随着时间的增加,在 SS 量接近转化完成时,RA 也开始被降解。适当地控制转化时间可得到最大量的 RA 和新产物。

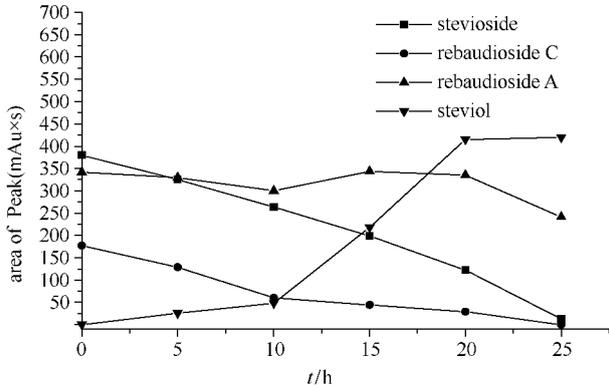


图 2. 棘孢曲霉酶液转化甜菊糖变化曲线

Figure 2. Time course of stevioside content by enzyme of *Aspergillus aculeatus*.

2.2 产物鉴定

在棘孢曲霉酶液转化甜菊糖 10 h 后,溶液中出现了大量的沉淀,随着时间的延长,沉淀量会持续增加,至 24 h 沉淀量达到最大值,转化液经离心分离得到沉淀新产物和上清液。取少量沉淀干燥后用 75% 乙腈溶解,HPLC 分析的结果见图 3-A 所示。

为鉴定沉淀物质的成份,将其 HPLC 分析图(图 3-A 所示)与甜菊醇标准品的 HPLC 分析图(图 3-B 所示)进行比较。发现其出峰时间与甜菊醇出峰时间相同,因此推测是甜菊醇。为此,对经结晶纯化的新产物进行 LC-MS 分析,结果见图 4 所示。

从图 4-A 的质谱图可见,丰度最大的离子为 $m/z = 317.2$,与图 4-B 甜菊醇标准品的 $m/z = 317.2$ 相同,即新产物对应的分子量是 318,因此进一步验证新产物是甜菊醇。

纯化新产物的红外光谱见图 5 所示,与谱图库中的甜菊醇标准品图谱一致,因此新产物应为甜菊醇。

2.3 沉淀物质和转化上清液中 RA 的纯化

棘孢曲霉酶液转化甜菊糖,产生的沉淀中除了甜菊醇外还有其他物质(见图 3-A)。用乙醇溶解沉淀,离心后,对上清液旋转蒸发,得到的白色物质是甜菊醇,按照甜菊醇“浓度-峰面积”标准曲线,得出

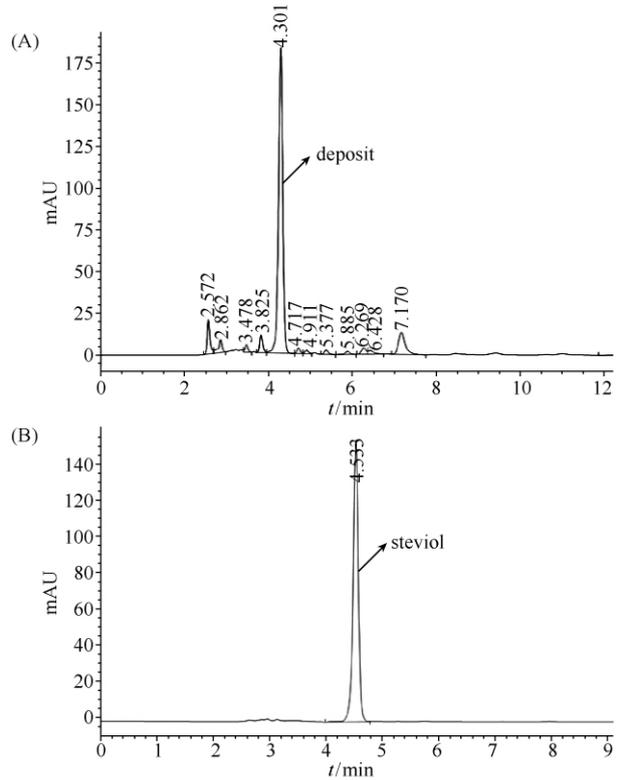


图 3. 沉淀物(A)和甜菊醇标品(B)的 HPLC 分析图

Figure 3. HPLC analysis of new compound (A) and steviol (B).

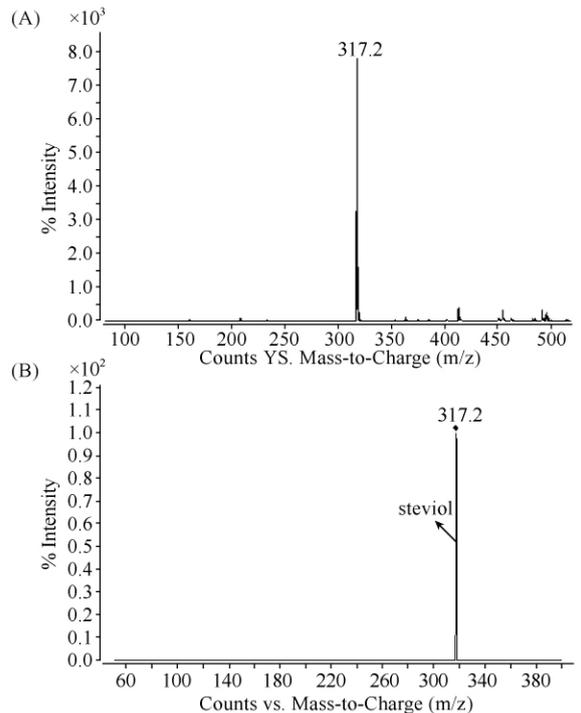


图 4. 新产物(A)和甜菊醇标品(B)的一级质谱图

Figure 4. MS spectrum of new compound (A) and steviol (B).

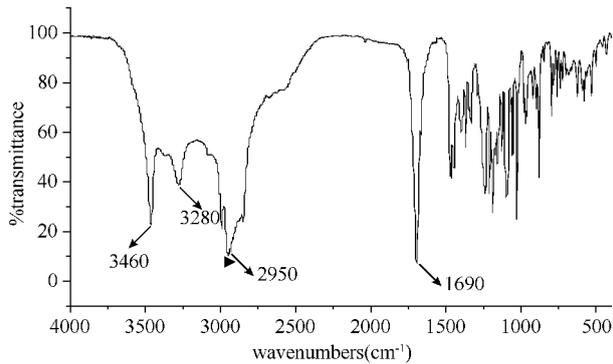


图 5. 新产物的红外光谱分析

Figure 5. IR spectrum of new compound.

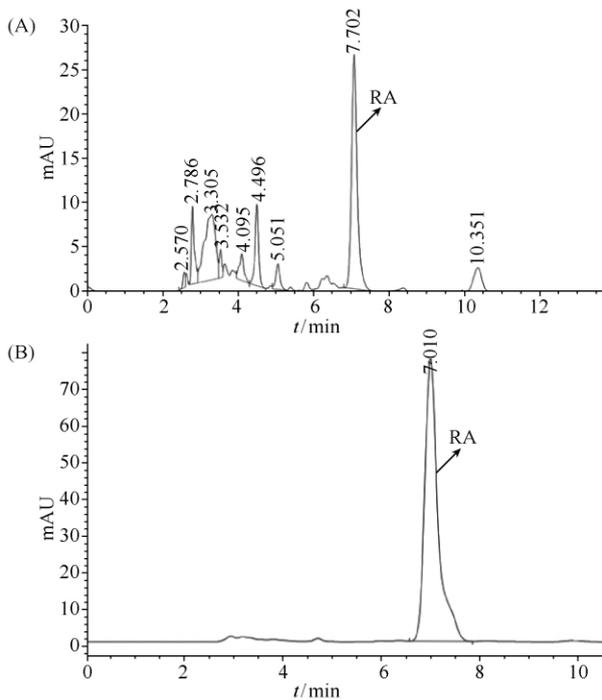


图 6. 纯化前上清液 (A) 和纯化后上清液 (B) 的 HPLC 分析

Figure 6. HPLC analysis of the supernatant (A) and the purified supernatant (B).

甜菊醇的纯度为 95.2%，根据纯化前后样品中甜菊醇 HPLC 峰面积和甜菊醇的标准曲线得到纯化前后甜菊醇的量，再结合甜菊醇回收率的计算方法得出回收率为 84.0%。

对离心后得到的上清液进行 HPLC 分析，结果见图 6-A 图所示，上清液中主要成分是 RA，浓缩后经 CN-210 大孔树脂吸附洗脱，进行 HPLC 检测，结果见图 6-B 图，旋转蒸发后得到白色结晶体，根据 RA 标

准曲线，推算 RA 的纯度为 86.2%。根据纯化前后样品中 RA 的 HPLC 峰面积和 RA 标准曲线得出纯化前后 RA 的量，再结合 RA 回收率的计算方法得出回收率为 80.5%。

3 讨论

利用棘孢曲霉对甜菊糖进行生物转化的研究表明，甜菊糖中甜菊苷 (SS) 和莱鲍迪苷 C (RC) 成份转化为甜菊醇并以沉淀析出，转化液中的莱鲍迪苷 A 得到纯化，此方法为甜菊醇和莱鲍迪苷 A (RA) 的制备和甜菊糖的深度开发提供了新方法。

棘孢曲霉所产酶是胞外酶，转化甜菊糖所需周期短，且得到的新产物甜菊醇与莱鲍迪苷 A 极易分离，与巴氏微杆菌转化甜菊糖为甜菊醇^[8]的方法相比，在转化时间和分离成本方面更有优势。棘孢曲霉还可用于槐角中槐角苷、染料木素等成份的转化^[15]，生成 5、7、8、4'-四羟基异黄酮，本工作拓展了棘孢曲霉的应用范围。

本工作探讨了棘孢曲霉的酶液对甜菊糖的转化，酶用量的探讨及酶的固定化重复使用以及对酶液进行分离纯化，与黄杆菌转化甜茶苷的方法^[16]相似，找到对该转化起关键作用的酶是今后深入研究的方向。

参考文献

- [1] Timofeeva OA, Nevmerzhtskaya YY, Miftakhova IG, Strobykina AS, Mikhailov AL, Strobykina IY, Mirnonov VF. Diterpenoid steviol derivatives regulate the growth of winter wheat and improve its frost resistance. *Doklady Biological Sciences*, 2010, 435 (1) : 411-414.
- [2] Mohsen D, Jan MCG, Johan GB, Hassan K, Hilke W, Zarbakht A, Eddy D and Nadia E. Evaluation of Steviol injection on Chicken Embryos: Effects on Post-hatch Development, Proportional Organ Weights, Plasma Thyroid Hormones and Metabolites. *Japan Poultry Science Association*, 2010, 47 (1) : 71-76.
- [3] Fuji K, Node M, Ito N, Fujita E, Takeda S, Unemi N. Terpenoids L. Antitumor activity of diterpenoids from *Rabdosia shikokiana* var. *occidentalis*. *Chemical and*

- Pharmaceutical Bulletin*, 1985, 33 (3) : 1038-1042.
- [4] Fujita T, Takeda Y, Yuasa E, Okamura A, Shingu T, Yokoi T. Structure of inflexinol, a new cytotoxic diterpene from *Rabdosia inflexa*. *Phytochemistry*, 1982, 21 (4) : 903-905.
- [5] Ogawa T, Nozaki M, Mztsui M. Total synthesis stevioside. *Tetrahedron*, 1980, 36 (18) : 2641-2684.
- [6] Oliveira HD, Bras, Trindade FD, Luiz J. Production of hydroxysteviol and its application as a plant growth regulator. *Brazil*, 2006, 08: 22.
- [7] Hu YQ, Shi H. The progress of steviol and serivatives. *Journal of Guangxi University*, 2011, 42 (01) : 10-14. (in Chinese)
胡艳秋, 石浩. 甜菊醇及其衍生物的研究进展. 精细化工, 2011, 42 (01) : 10-14.
- [8] 陈育如, 玄燕, 赵乙萱, 刘润薇. 巴氏微杆菌 XJ 及应用该菌制备甜菊醇的方法. 中国: 201110159563. 1. 2011. 6. 15.
- [9] Lu Y, HuGH, The progress of Rebaudioside A. *Additives and Nutrition*, 2012, (6) : 49 - 51. (in Chinese)
路勇, 胡国华. 莱鲍迪 A 苷的研究进展. 添加剂与营养, 2012, (6) : 49-51.
- [10] Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. The technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46: S1-S10.
- [11] Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Extracts by Human Microflora. *Agricultural and food chemistry*. 2003, 51: 6618-6622.
- [12] Liu YF, Di DL, Bai QQ, Li JT, Chen ZB, Lou S, Ye HL. Preparative Separation and Purification of Rebaudioside A from Steviol Glycosides Using Mixed-Mode Macroporous Adsorption Resins. *American Chemical Society*. 2011, 59: 9629-9636.
- [13] Jaworska K, Krynitsky AJ, Rader JI. Simultaneous Analysis of Steviol and Steviol Glycosides by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection on a Mixed-Mode Column: Application to Stevia Plant Material and Stevia-Containing Dietary Supplements, *Journal of AOAC International*, 2012, 95 (6) : 1588-1596.
- [14] 陈育如, 刘虎, 姜中玉. 一种提高甜菊糖甜质的方法. 中国: 200910036066. 5. 2009. 10. 16.
- [15] 陈育如, 张玉千, 玄燕, 唐超. 一株棘孢曲霉菌株及应用该菌株制备 5, 7, 8, 4-四羟基异黄酮的方法. 中国: 201110225855. 0. 2011. 08. 08.
- [16] 陈育如, 玄燕, 赵乙萱, 张玉千, 夏文静. 黄杆菌胞内酶提取和快速转化甜菊糖为甜茶甙的方法. 中国: 201010569609. 2. 2010. 12. 02.

Biological conversion of stevioside to steviol by *Aspergillus aculeatus* and the purification of rebaudioside A

Yingying Ma¹, Yuru Chen^{1,2*}, Weina Zhang¹, Huan Sun¹, Wenjing Xia²

¹Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomic, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

²School of Biotechnology and Chemical Engineering, Taizhou College, Nanjing Normal University, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this research was to apply *Aspergillus aculeatus* solid fermentation extracts to convert stevioside and rebaudioside C, followed by identifying and purifying the new conversion product. [Methods] The product was identified by high performance liquid chromatography, chromatography-mass spectrometry and Infrared spectrum. The new product and rebaudioside A existed in the supernatant were purified by alcohol and macroporous resin. [Results] The *Aspergillus aculeatus* enzyme extracts could convert the stevioside and rebaudioside C to the new product within 10 hours. The conversion rate was 98.0% in 24 hours. The conversion product existed in deposit was identified as steviol. The purity and recovery percent of steviol were 95.2% and 84.0% respectively. Because stevioside could occur to deposit, the rebaudioside A existed in supernatant was purified easily. We used the resin chromatography to purify RA and the recovery could reach 80.5%. [Conclusion] *Aspergillus aculeatus* enzyme extracts could convert stevioside efficiently and specifically, and we could obtain rebaudioside A and steviol at the same time.

Keywords: stevioside, *Aspergillus aculeatus*, bioconvert, rebaudioside A, steviol

(本文责编:张晓丽)

Supported in part by a research grant from the Special Project for Forest Public Benefit (200904055) and Project for Advantage Life Science of Jiangsu Province (2011010)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-523-86152880; E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

Received: 13 May 2013/Revised: 21 June 2013

1953年创刊以来所有文章全文上网

从2008年1月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2014年1月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊6年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2013	月刊	48 - 53	1 - 12
2014	月刊	54	1