

发酵法生产京尼平菌株的筛选与培养

付岩帅 张 鹏 陈 畅*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 从土壤中筛选到一株产 β -葡萄糖苷酶的菌株 FYS-9, 其发酵可将京尼平苷转化为京尼平。通过菌落形态特征、孢子和菌丝显微观察及 18S rDNA 基因序列分析, 初步鉴定该菌株为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。以 FYS-9 为出发菌株, 通过紫外线、原生质体诱变, 选育得到一株高产 β -葡萄糖苷酶的突变株 70C-3, 该突变株发酵产酶平均酶活力达到 36.15 IU/mL, 比 FYS-9 提高 39.4%。对突变株 70C-3 发酵转化京尼平苷条件的优化结果表明, 在京尼平苷添加量 1.5%, 30℃、150 r/min 转化 24h 的条件下, 京尼平苷的转化率达到 97.7%, 京尼平的产量可达 8.5 g/L。

关键词: 京尼平; 京尼平苷; β -葡萄糖苷酶; 泡盛曲霉; 微生物转化

中图分类号: TQ46417

引 言

京尼平是一种环烯醚萜类无毒物质, 对抗炎、治疗肝脏疾病、抗脂质过氧化、降压、缓解 II 型糖尿病症状、抗 NO 生成、通便等具有良好效果^[1-4]。它同时是一种优良的天然生物交联剂^[5]。京尼平在自然界中的含量很少, 直接提取十分困难。目前的制备方法一般采用酶解法, 即利用 β -葡萄糖苷酶水解京尼平苷生产京尼平^[6], 但由于其成本较高, 从而限制了它的应用, 未能实现工业化生产。

对 β -葡萄糖苷酶的发酵生产已有一些报道。沈加成等^[7]利用 N⁺ 注入棘孢曲霉 L22, 筛选得到产酶活力为 16.24 IU/mL 的突变株 NIP35; 张玲^[8]以果曲霉菌株 CN-67 为出发菌, 通过原生质体紫外诱变法获得一株突变菌株 UV-29, 酶活力达到 (20.48 ± 0.01) IU/mL; 刘敏等^[9]利用黑曲霉 NL02 以麸皮为碳源发酵所产酶活力为 19.12 IU/mL。陈军杰^[10]以无花果曲霉为出发菌, 通过诱变筛选获得一株遗传稳定性较好的突变株 N-9, 所产酶活力为 6.86 IU/mL, 后经优化培养条件后 β -葡萄糖苷酶活力达到 8.50 IU/mL。Garcia-kirchnerd 等^[11]用 *Aspergillus niger* C-6 发酵产 β -葡萄糖苷酶, 在优化了的发酵条件下得 β -葡萄糖苷酶活达 7.2 IU/mL。王永宏等^[12]筛

选到一株产 β -葡萄糖苷酶酶活为 8.2 U/mL 的青霉 MK-1, 利用它发酵转化京尼平苷的转化率达 95%。

本文利用泡盛曲霉发酵生产京尼平, 这是首次报道利用该种微生物生产京尼平。用紫外、原生质体诱变技术作用于所筛菌株 FYS-9, 获得高 β -葡萄糖苷酶活力突变菌株 70C-3, 平均酶活达到 36.15 IU/mL, 优于已报道水平。微生物发酵法在常温、常压等温和条件下直接实现京尼平苷的转化, 不仅最大限度避免了其有效成分的破坏, 同时有利于简化生产工艺, 降低生产成本, 提高产率。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 实验试剂

微晶纤维素, 纤维二糖, 国药集团化学试剂有限公司; 纤维素酶、蜗牛酶, 北京拜尔迪生物技术有限公司; 京尼平苷, 京尼平, 临川之信生物科技有限公司; pNPG, 对硝基苯酚, Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。高渗液为 0.6 mol/L 的 NaCl 溶液。

1.1.2 实验仪器

HZQ-R 全温振荡培养箱, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; HPS-250 生化培养箱, 哈尔滨东明医疗仪器厂; BDJT-VS 超净工作台, 北京碧都空气净化设备公司; LDZX-40BI 立式自动电热压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; TDL-5A 型低速大容量离心机, 上海安亭科学仪器厂; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; My-Cycler 梯度 PCR 仪, Gel Doc XR Imaging System, 美国 BIO-RAD; UV-3000 紫外/

收稿日期: 2010-12-26

第一作者: 男, 1986 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: chenchang@mail.buct.edu.cn

可见光分光光度计、10 A 高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司。

1.2 培养基

菌种富集培养基(g/L):纤维二糖 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 2, 链霉素 适量。筛选平板培养基:参见文献[13]。PDA 培养基(g/L):马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 6.0。再生培养基:在察氏培养基的基础上加入 NaCl 0.6 mol/L。产酶发酵培养基(g/L):麸皮 15, 玉米芯 15, 酵母粉 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, KH_2PO_4 2, 吐温 80 1.0% (体积分数), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5。以上培养基 115 °C 灭菌 30 min 后备用。

1.3 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选

取自山东滨州农村多年堆积秸秆的土壤,用无菌水配制成土壤悬液,吸取 1 mL 于富集培养基中, 30 °C, 150 r/min 条件下震荡培养 3 d。菌种经富集培养后,梯度稀释至 $10^{-7} \sim 10^{-3}$, 将各梯度菌悬液分别涂布于平板筛选培养基上,置于 30 °C 培养箱中倒置培养 4 d。观察菌落,将能产生明显透明圈的菌落挑取,接种到 PDA 斜面培养基上,待测酶活。通过测定酶活高低,挑取优势菌株进行纯化保藏。

1.4 菌种鉴定

吸取 100 μL 适宜浓度的孢子悬液涂布于 PDA 平板上,置于 30 °C 培养箱中培养 3 d,观察其菌落形态;在凹玻片的凹孔内加入适量 PDA 培养基,待其凝固,用接种环挑取少量孢子接种于凹孔内的培养基上,置于 30 °C 培养箱内培养 1 d,显微镜下观察其菌丝及孢子梗形态。利用优化的 SDS 法从处于旺盛生长期的菌体中提取基因组 DNA^[14],以常用引物 SSU-0817 和 SSU-1536 扩增 18S rDNA 基因,PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析^[15],并交由北京中科希林生物科技有限公司进行测序。测序结果提交 GeneBank 进行 BLAST 检索。

1.5 孢子紫外诱变株的筛选

以无菌生理盐水冲洗孢子斜面,制成浓度为 $10^6 \sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子悬液,梯度稀释后涂布于筛选平板,分别紫外照射处理 3、5、7、9、11 min。通过透明圈大小进行初筛。

1.6 菌株原生质体的制备

将紫外诱变所得菌株孢子涂布于带有玻璃纸的 PDA 平板培养基上,培养 24 h 后将玻璃纸上的菌丝接种于液体培养基,摇瓶培养 24 h 后离心收集菌丝体。将菌丝加入到 5 mg/mL 的蜗牛酶与 5 mg/mL 的

纤维素酶组成的酶解体系中,于 32 °C, 180 r/min 震荡处理 2 ~ 4 h。显微镜下观察,待有大量原生质体形成时停止酶处理,再用高渗液洗涤,800 r/min 离心即得原生质体。

1.7 原生质体紫外诱变及再生

取 15 mL 经高渗液稀释至适当浓度的原生质体悬浮液倒入 9 cm 的平板中,置于距离 30 W 紫外灯 30 cm 处,进行紫外照射诱变。分别在不同时间点取样作梯度稀释,于原生质体再生培养基中培养,观察菌落生长情况,同时以水悬浮原生质体悬液作再生对照。

1.8 分析方法

1.8.1 β -葡萄糖苷酶酶活测定

根据文献[16]方法测定 β -葡萄糖苷酶酶活。一个酶活单位规定为每 min 水解 pNPG 产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需要的酶量。酶活利用公式(1)计算

$$U = cN/(tV) \quad (1)$$

其中: U 为酶活, IU/mL; N 为粗酶液稀释倍数; t 为反应时间, min; V 为加入酶液的体积, mL; c 为对应于标准曲线上对硝基苯酚的浓度值, mmol/L。

1.8.2 京尼平苷转化率的测定

挑取所筛得菌株孢子接种于发酵培养基,于 28 °C, 130 r/min 摇床中培养 3 d,然后加入一定量的京尼平苷,于 30 °C, 150 r/min 摇床反应 24 h,发酵液于 4200 r/min 离心 15 min,上清液用高效液相色谱检测^[17],色谱柱: YWG-C18 柱, 4.6 mm \times 25 cm \times 5 μm ; 柱温: 25 °C; 流动相: $V_{\text{甲醇}}: V_{\text{水}} = 30: 70$; 流速: 1 mL/min; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 240 nm; 进样量: 20 μL 。

配制不同已知浓度的京尼平标准品溶液。各吸取 20 μL 分别进样, HPLC 测定出峰面积。以峰面积(Y)对京尼平质量浓度(X)作线性回归。得回归方程(2)为

$$Y = 20385X - 70360 \quad (2)$$

京尼平在质量浓度为 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内具有良好的线性关系。 $R^2 = 0.9978$ 。保留时间为 13.282 min。根据回归方程可计算发酵液中京尼平的产生量。

京尼平苷的转化率(y)利用公式(3)计算

$$y = m_2/m_1 \times 100\% \quad (3)$$

其中: m_1 为添加的京尼平苷物质的量, mol; m_2 为反应后发酵液中京尼平物质的量, mol。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选及鉴定

由于 β -葡萄糖苷酶产生菌可降解微晶纤维素,可在平板培养基上产生明显的透明圈,根据透明圈的大小,初步判定不同菌株产酶活力的高低。通过该方法共初步分离筛选到15株 β -葡萄糖苷酶的菌株,分别命名为FYS-1~FYS-15。随后,将各菌株接种到发酵产酶培养基中震荡培养6 d,测定 β -葡萄糖苷酶活力。其中菌株FYS-5、FYS-8、FYS-9酶活较高,分别为25.34、25.54、25.93 IU/mL。选择酶活最高且传代稳定性最好的菌株FYS-9纯化并保藏。

FYS-9菌落呈丝绒状、平薄、具放射状皱纹、全缘;菌落初为绿褐色,后变为褐黑色;反面初为黄色,后变为淡黄色。菌落边缘放射状白色菌丝,渗出物缺乏;产孢结构双层,分生孢子头近球形,壁粗糙。孢子梗着生于基质,孢梗茎壁光滑;顶囊近球形,表面全面可育。将测得的该菌株18S rDNA基因序列输入NCBI网站,用BLAST程序与数据库中已有的

序列进行比对分析,其与*Aspergillus awamori* strain HKF77相似度为100%。经形态特征及18S rDNA序列比对,初步鉴定该菌为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。

2.2 菌种的诱变选育

2.2.1 泡盛曲霉 A5-5 的获得

孢子经过紫外诱变后,于照射时间为3 min,致死率为94.5%的透明圈平板中,通过初筛、复筛得到一株酶活力为30.16 IU/mL,较FYS-9提高16.3%的菌株A5-5。

2.2.2 原生质体的释放

显微镜下观察原生质体释放过程,如图1所示。酶解2 h后,只有少量原生质体从菌丝顶端释放出来,且最早释放出来的原生质体的体积较小。此时,菌丝基本未被破坏,内部仍有成串的原生质体。随着酶解时间达3 h后,有较多体积较大的原生质体释放,但仍有细长菌丝存在。酶解至4 h,酶解液中已无太长菌丝,大量不同体积的原生质体位于断裂的菌丝片段之间。此时,原生质体的释放较为完全。

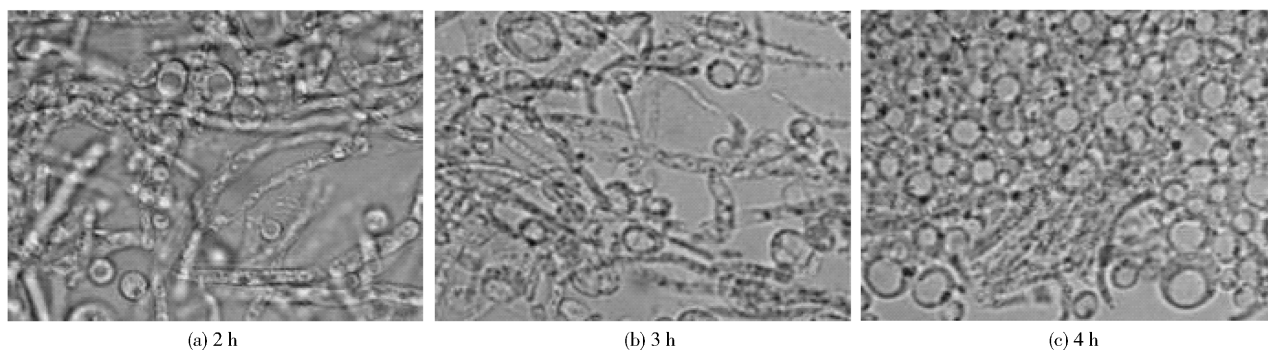


图1 菌株A5-5原生质体释放过程

Fig.1 Release of protoplasts from A5-5

2.2.3 原生质体的紫外诱变筛选结果

原生质体致死率曲线图如图2所示,原生质体的致死率随着照射时间的延长而增加,当紫外照射时间为30 s时,致死率为36.7%,当达到70 s时,致死率迅速增加到84.6%,达到120 s时,原生质体致死率已经接近100%,在30 s到90 s的照射时间段内紫外线对A5-5原生质体致死率的影响最大。

从经诱变处理70~150 s的再生平板单菌落中挑取334株突变菌株,转接至PDA斜面培养基,待长出孢子后标记保藏。用接种环刮取孢子分别接种于产酶发酵培养基中进行摇瓶培养5~7 d,测定酶活,挑选出了5株酶活明显提高的突变菌株70A-2、70B-4、70C-3、90B-6、120A-4。将各菌株进行连续传

代培养后,得到酶活力显著提高且传代稳定的菌株70C-3,其酶活力稳定在36.15 IU/mL,比FYS-9提高了39.4%。

2.3 发酵生产京尼平条件的优化

2.3.1 发酵温度

根据菌株70C-3的最佳生长温度选取25、28、30、33、35℃测定发酵温度对产酶及京尼平苷转化率的影响。由图3可知,当温度低于30℃时,菌株产酶活力较低,京尼平苷的转化率不高,随着温度的升高而逐渐增大。当温度达到30℃时,酶活达到35.97 IU/mL,京尼平苷的转化率达到92.9%。继续升高温度,产酶活力有一定下降趋势,这是由于发酵温度的升高,不利于菌体生长代谢及产酶从而影响

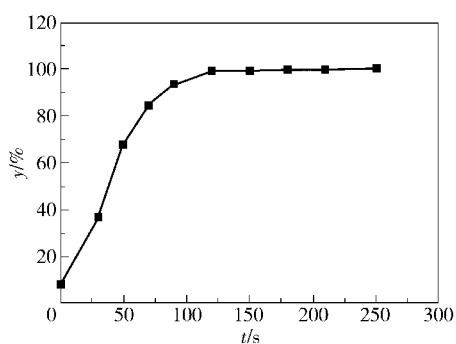


图2 不同紫外诱变时间原生质体致死率

Fig. 2 The death rate of protoplasts treated for different mutation times

京尼平苷的转化。观察发现京尼平苷的转化率随着发酵温度的升高明显下降且发酵液的颜色随之加深,这是所产生的京尼平与培养基中某些氨基酸发生了反应^[18]而造成了损失。因此选定最佳发酵温度为 30℃。

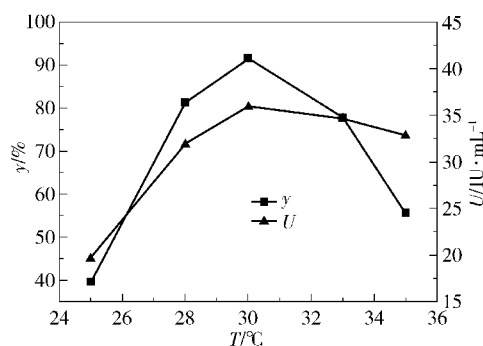


图3 温度对产酶及京尼平苷转化率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity and geniposide conversion

2.3.2 发酵时间

由图 4 可知,起初随着发酵时间的延长京尼平苷的转化率逐渐增大,当转化时间超过 24 h 后,京尼平苷的转化率逐渐下降,且发酵液的颜色逐渐加深显蓝色。这是由于产生的京尼平与培养基中的某些氨基酸发生了不可逆反应生成栀子蓝色素^[18]的缘故,为了保证京尼平的产量,减少损失,选定转化时间为 24 h,此时京尼平苷的转化率达到 92.3%。

2.3.3 转速

摇床的转速直接影响到发酵体系的溶氧量,以促进菌体的生长及产酶,从而间接影响到京尼平苷的转化率。由图 5 可知,当摇床转速为 150 r/min 时,京尼平苷的转化率最大,达到 92.8%。而当转速较低时,反应体系中的溶氧量较低,影响了菌体的生长代谢及其与反应物的充分接触,从而延长了反

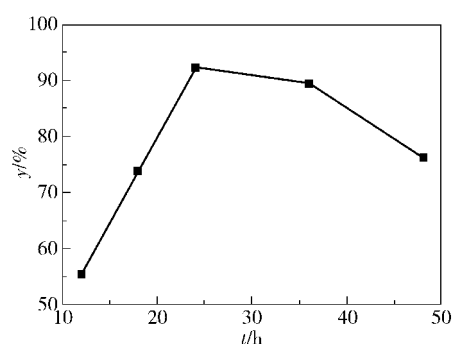


图4 发酵时间对京尼平苷转化率的影响

Fig. 4 Effect of time on geniposide conversion

应时间。当转速过高时,亦抑制了菌体的生长代谢,不利于产物的合成。因此选取最佳摇床转速为 150 r/min。

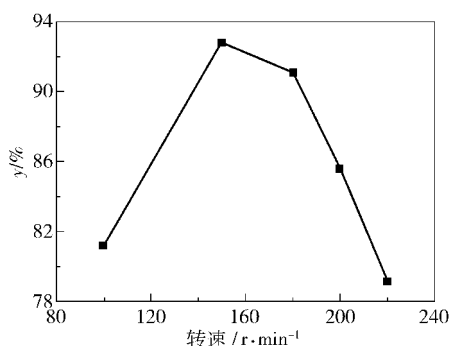


图5 转速对京尼平苷转化率的影响

Fig. 5 Effect of rotation speed on geniposide conversion

2.3.4 京尼平苷质量浓度

底物质量浓度是影响生物催化反应的一个重要因素。当底物质量浓度较低时,反应速度会随底物质量浓度的增加而急速增加;底物质量浓度过高则可能产生底物抑制作用。由图 6 结果表明,随着京尼平苷质量浓度的增加反应转化率逐渐降低,产物质量浓度也随之出现先增大后减少的变化趋势。当京尼平苷质量浓度达到 15 g/L 时,产物质量浓度达

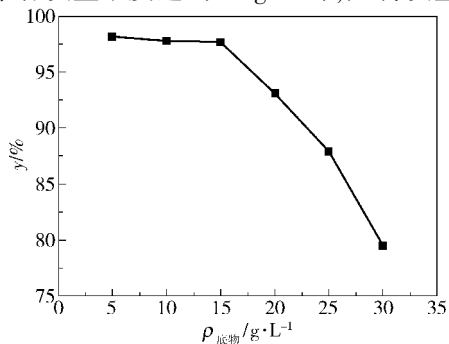


图6 京尼平苷添加量对京尼平苷转化率的影响

Fig. 6 Effect of geniposide content on conversion

到最大,此时的转化率为97.7%。从图6中可以看出,当京尼平苷质量浓度高于15 g/L时,反应转化率急剧下降,且产物的量也随之减少。因此,选取最佳京尼平苷添加质量浓度为15 g/L。

3 结论

(1)从土壤中筛选到了一株具较高 β -葡萄糖苷酶活力的菌株FYS-9,经鉴定为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。通过对菌株FYS-9进行紫外、原生质体诱变,选育得到一株产酶活力达到36.15 IU/mL,较FYS-9提高39.4%的突变株70C-3。

(2)发酵生产京尼平的最优条件为:30℃,150 r/min,添加京尼平苷1.5%转化24 h。在此条件下,京尼平苷的转化率达到97.7%,京尼平产量可达8.5 g/L。

参考文献:

- [1] Koo H J, Lim K H, Jung H J, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103: 496–500.
- [2] Inao M, Movhida S, Matsui A, et al. Japanese herbal medicine Inchin-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis[J]. *Journal of Hepatology*, 2004, 41: 584–591.
- [3] 黄洪林, 杨怀瑾, 刘立超, 等. 栀子降血糖作用的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(1): 1–3.
Huang H L, Yang H J, Liu L C, et al. Experimental studies on fructus gardenias in decreasing blood sugar [J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, 2006, 17(1): 1–3. (in Chinese)
- [4] Koo H J, Song Y S, Kim H J, et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 495: 201–208.
- [5] Mi F L, Tan Y C, Liang H F, et al. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant [J]. *Biomaterial*, 2002, 23: 181–191.
- [6] 梁华正, 廖夫生, 彭玲西, 等. 氨基酸为显色剂比色法测定京尼平的含量[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18: 467–470.
Liang H Z, Liao F S, Peng L X, et al. Determination of genipin by colorimetry using amino acid [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2006, 18: 467–470. (in Chinese)
- [7] 沈加成, 朱明田, 曲音波. N^+ 注入诱变选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株及其产酶条件的优化[J]. *纤维素科学与技术*, 2008, 16(4): 7–11.
Shen J C, Zhu M T, Qu Y B. Breeding of β -glucosidase producing strains by N^+ implantation and research on fermentation conditions [J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2008, 16(4): 7–11. (in Chinese)
- [8] 张玲. β -葡萄糖苷酶的液态发酵生产[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
Zhang L. Study of the production of beta-glucosidase in submerged fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007. (in Chinese)
- [9] 刘敏, 欧阳嘉, 勇强, 等. 黑曲霉液体发酵制备 β -葡萄糖苷酶的研究[J]. *生物质化学工程*, 2008, 42(5): 5–8.
Liu M, Ouyang J, Yong Q, et al. Preparation of β -glucosidase by *Aspergillus Niger* in submerged fermentation [J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2008, 42(5): 5–8. (in Chinese)
- [10] 陈军杰. β -葡萄糖苷酶的液态发酵生产及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
Che J J. β -glucosidase production by submerged fermentation and its application [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005. (in Chinese)
- [11] García-kirchner O, Segura-granados M, Rodríguez-Pascal P. Effect of media composition and growth conditions on production of p-glucosidase by *Aspergillus niger* C-6 [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121/122/123/124: 347–360.
- [12] 王永宏, 苏建, 王建芳, 等. 栀子中京尼平苷的微生物转化研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(12): 3003–3004.
Wang Y H, Su J, Wang J F, et al. Studies on the microbial transformation of geniposide in gardenia [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(12): 3003–3004. (in Chinese)
- [13] 王春丽, 武改红, 陈畅, 等. 黑曲霉原生质体诱变选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1921–1926.
Wang C L, Wu G H, Chen C, et al. Protoplast mutagenesis for improving β -glucosidase production of *Aspergillus niger* [J]. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1921–1926. (in Chinese)
- [14] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
Wei Q. Laboratory manual for Molecular Biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007. (in Chinese)
- [15] 金敏, 黄爱华, 陈照立, 等. 常见致病真菌通用引物PCR检测技术研究[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26

- (11): 969-971.
- Jin M, Huang A H, Chen Z L, et al. Detection of Common Fungal Pathogens By General Primer PCR[J]. Journal Environmental Health, 2009, 26(11): 969-971. (in Chinese)
- [16] 李平, 宛晓春, 丁霄霖, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的活力测定和酶学性质[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 304-309.
- Li P, Wan X C, Ding X L, et al. Determin and characteristics of β -glucosidase from aspergillus niger [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 1998, 25(3): 304-309. (in Chinese)
- [17] 张丽茹, 于治国, 范岩, 等. 栀子中京尼平苷的分离及其含量测定[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1253-1255.
- Zhang L R, Yu Z G, Fan Y, et al. Study on the separation of geniposide in gardenia and its determination [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(11): 1253-1255. (in Chinese)
- [18] 吴拾荆, 李华. β -葡萄糖苷酶高产株的筛选及在栀子色素制备中的应用[J]. 武汉化工学院学报, 2001, 23(1): 28-30.
- Wu S J, Li H. Isolatin of higher β -glucosidase strains and its appling to producing gardenia pigment[J]. J Wuhan Inst Chem Tech, 2001, 23(1): 28-30. (in Chinese)

Screening of *Aspergillus awamori* for the biosynthesis of genipin

FU YanShuai ZHANG Peng CHEN Chang

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A strain of fungus FYS-9 for producing genipin from β -glucosidase was screened from soil. This strain was identified as *Aspergillus awamori* according to its morphology characteristics and 18S rDNA gene sequence. Strain FYS-9 was utilized as the original strain to obtain another isolated mutant 70C-3. The β -glucosidase activity of strain 70C-3 was 36.15 IU/mL, an improvement of 39.4% compared with the original strain. The optimal conditions were found to be fermentation for 24 h with addition of 1.5% geniposide at 30 °C with shaking at 150 r/min. The conversion of geniposide reached 97.7% and the yield of genipin reached 8.5 g/L.

Key words: genipin; geniposide; β -glucosidase; *Aspergillus awamori*; microbial conversion