

张玉千,周学,郑丹,等.虎杖苷转化菌的筛选及所产酶的性质研究[J].江苏农业科学,2019,47(1):264-267.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.062

虎杖苷转化菌的筛选及所产酶的性质研究

张玉千,周学,郑丹,陈蓓琦,周盟盟

(南京师范大学泰州学院化学与生物工程学院,江苏泰州 225300)

摘要:利用专一性底物法,以虎杖水提液为初始培养基,经过初筛复筛获得转化菌。根据菌落形态特征对菌株进行初步鉴定,对转化菌产酶的酶学性质进行研究。结果表明,通过筛选得到 1 株特异性转化虎杖苷为白藜芦醇的菌株,经形态学鉴定为青霉菌。该菌产的酶最适 pH 值为 5.0,最适温度为 60 ℃;Fe²⁺、Na⁺ 和 Ca²⁺ 对酶活力有激活作用;虎杖苷是该酶理想的水解作用底物。利用该菌产的酶液转化虎杖原料,虎杖苷的转化率最高可达到 100%。

关键词:白藜芦醇;青霉菌;微生物转化;虎杖苷

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0264-04

虎杖是一种常用的中药原料,主要活性成分是虎杖苷(白藜芦醇苷)、白藜芦醇和蒽醌类化合物。其中,白藜芦醇活性较高,具有抗炎杀菌、抗氧化、抗肿瘤、保肝护肝、保护心血管及免疫调节等活性^[1-8]。白藜芦醇的制备方法有传统提取法、微生物转化法、微生物发酵法。传统提取法主要以蓼科、葡萄科、豆科植物为原料提取^[9-10]。其中,蓼科植物虎杖中白藜芦醇的含量可达 0.45%,虎杖苷的含量最高可达 2.55%^[11]。虎杖苷是白藜芦醇与 β -D-葡萄糖结合形成的糖苷,水解该糖苷键可以将虎杖苷转化成白藜芦醇^[12]。如果能将白藜芦醇苷转化为白藜芦醇,理论上可使其含量提高 3.3 倍^[13],可以大大增加虎杖的药用价值。

针对虎杖苷中 β -D-葡萄糖苷键的水解方法有化学法和生物法。化学降解法工序复杂,成本高,分离纯化困难,且白藜芦醇光热稳定性差^[14],所以对虎杖苷的化学降解方法研究得较少。生物转化法中,王辉以筛选出高活性 β -葡萄糖

苷酶为依据筛选出米曲霉,利用该菌摇瓶发酵 46 h 后,虎杖苷可以被完全转化为白藜芦醇^[15]。田天丽筛选得到根霉 T-34,通过带渣固体发酵技术在最佳发酵条件下发酵 24 h 后虎杖苷的转化率可达 98%^[13]。冯薇等筛选出细菌转化虎杖苷,8 h 转化率可达 90% 以上。微生物转化虎杖的本质是通过所产生的 β -葡萄糖苷酶水解虎杖苷,利用商品酶或利用微生物制备的酶制剂可用于虎杖苷的转化。王辉利用米曲霉所产的 β -葡萄糖苷酶粗酶液直接处理虎杖粗药材,12 h 转化率达 100%^[15]。

陈蓉蓉等对多种商品酶进行了筛选,确定以 β -葡萄糖苷酶的转化效果最好,转化率高达 98%^[16]。生物酶的转化工艺较稳定,做成固定化酶可重复利用,转化效率高,但酶的纯化较为困难,商品酶成本高,在工业中的应用受到限制。利用微生物产酶转化虎杖苷较为可行,而筛选出转化时间短、转化效率高的菌种尤为重要。本试验筛选得到 1 株转化菌,对转化菌所产的 β -葡萄糖苷酶的酶学性质进行研究,并且用粗酶液直接转化虎杖原料粉末。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:青霉菌。

初筛培养基(%):10% 虎杖煮提液, MgSO₄ 0.05 g, NaNO₃ 0.5 g, FeSO₄ 0.001 g, KH₂PO₄ 0.1 g, 琼脂 1.8 g, pH 值自然。

收稿日期:2017-09-05

基金项目:江苏省高校自然科学基金(编号:16KJB180017);2014 江苏省大学生实践创新训练项目(编号:201413843012Y);南京师范大学泰州学院第二批精品课程项目;泰州市社会发展项目(编号:TS201516)。

作者简介:张玉千(1985—),男,山东济宁人,硕士,讲师,主要从事天然产物的分离纯化及微生物转化研究。E-mail: zqwl2000@163.com。

Bioresource Technology, 2008, 99(9):3528-3533.

[2] 廖雷,师杰峰,彭娟,等.固定化生物活性炭处理糖蜜酒精废水[J].环境工程学报,2017,11(2):727-732.

[3] 银星宇.甘蔗糖蜜酒精废液治理工艺研究[D].长沙:中南大学,2005.

[4] 王伟,杨志超,刘生玉.微生物絮凝剂 GSY-9 对烟煤煤泥水的絮凝机理研究[J].煤炭工程,2017,49(1):123-126.

[5] 罗平,杨林玉,卫宏毅.微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养条件优化[J].工业用水与废水,2017,48(1):50-55.

[6] 马放,段姝悦,孔祥震,等.微生物絮凝剂的研究现状及其发展趋势[J].中国给水排水,2012,28(2):14-17.

[7] 石春芳,冷小云.微生物絮凝剂在制药废水处理中的应用研究[J].现代化工,2015,35(9):85-89.

[8] Zhang X H, Shuang-Shi L I, Yang G W, et al. Preparation of flocculant-producing microorganism and property analysis of microbial flocculant[J]. Safety and Environmental Engineering, 2008(4):39-42.

[9] 毛艳丽,闫永胜,刘瑞群,等.微生物絮凝剂及其产生菌的研究新进展[J].微生物学通报,2008,35(10):1616-1620.

[10] 毛艳丽,朱涛,裴中芳,等.利用糖蜜废水生产微生物絮凝剂及条件优化和效果实验研究[J].环境工程学报,2010,4(1):86-90.

复筛培养基:10% 虎杖煮提液, pH 值自然。

固体产酶培养基:麸皮、豆粕粉(碳氮比为 6:4)。

固体营养液:磷酸氢二钠 1 g, 硫酸铵 2 g, 硫酸镁 0.1 g, 加水定容至 100 mL, 固液比为 1:2。

材料:虎杖药材产自江苏省宝华山。白藜芦醇苷、白藜芦醇对照品的纯度为 98%, 购自西安华翠生物技术有限公司。甲醇(HPLC 级)、乙醇、乙腈(HPLC 级)、乙酸乙酯。

仪器:GNP-9080 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);ES-315 高压蒸汽灭菌锅(TOMY, Japan);Agilent 1260 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);高速离心机 Sigma 3k30(Sigma 公司)。

1.2 菌种筛选与鉴定

1.2.1 虎杖苷转化菌的筛选 初筛:取虎杖粉末用无菌水冲洗,梯度稀释,按常规方法涂布,30℃培养 2 d,挑选出长势良好的单菌落,保藏待用。复筛:将初筛菌种活化培养,制成孢子悬液,转接至复筛培养基,30℃、160 rpm 培养,取样检测。

1.2.2 菌种鉴定 将筛选到的菌株接种到 PDA 培养基上,在不同时间观察菌落生长性状,待产孢后取菌丝制作临时玻片在透视显微镜下观察菌丝、分生孢子梗、分生孢子,并描述它们的形态特征;用透视显微镜观察菌丝的自然生长和分支状况。根据形态特征对菌株进行分类鉴定。

1.3 酶学性质研究

1.3.1 粗酶液的制备 将活化后的菌种斜面用无菌水制成孢子悬浮液,接种到发酵产酶培养基,28℃条件下静止培养 48 h。取固体曲,用 pH 值为 5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液浸提,固液比为 1:10,将其用尼龙纱布过滤,4 500 rpm 离心 15 min,上清液即为酶液。

1.3.2 β -葡萄糖苷酶最适温度及稳定性 在不同温度下分别以 1% 水杨苷和 0.05% 虎杖苷为底物,按常规法测定酶活力,分别于 50、55、60、65、70℃测定酶活力。酶液分别在 30、40、50、60、70℃下保温 12 h,测定酶活力。取酶液,放于 60℃水浴中,分别在 2、4、6、8、10、12 h 取样,检测酶活力。

1.3.3 pH 值对 β -葡萄糖苷酶活性及酶的酸碱稳定性的影响 分别配制 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,常规方法测定酶活力。此外,将酶液与上述不同 pH 值缓冲液在 60℃下放置 1 h 后,按常规法测定对应的酶活力。

1.3.4 β -葡萄糖苷酶的底物特异性 分别配制浓度为 0.5% 的甜菊苷、虎杖苷、水杨苷、纤维二糖、京尼平苷溶液,再以它们为底物,按常规法测定对应的酶活力。

1.3.5 不同金属离子对 β -葡萄糖苷酶活力的影响 选取氯化钠、氯化钙、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸钴为试剂,在酶反应液中分别加入上述金属离子,使其终浓度为 1.0 mmol/L,于 60℃温 30 min,按常规法测定酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100%。

1.4 β -葡萄糖苷酶酶活力测定方法

水杨苷法测定 β -葡萄糖苷酶活力:于 0.2 mL 水杨苷溶液中加入 0.2 mL 酶液,混匀后 60℃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 pH 值 5.0、60℃下催化反应 1 min,产生 1 μ g 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 虎杖苷转化菌的筛选

通过初筛得到 11 株长势较好的菌种,菌株编号及转化 27 h 虎杖苷转化率如图 1 所示。初筛获得的 11 株菌种中,仅有 H4、H6 和 2-6 号菌有转化效果,且在转化 27 h 后转化率都达到了最大。其中 H6 号菌的转化率最高,为 98%,故选取 H6 号菌作为虎杖苷转化菌株。

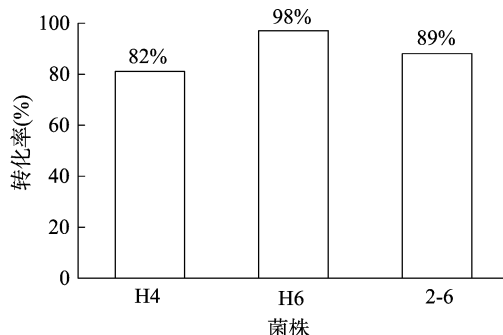


图1 复筛菌株的转化效率(转化27 h)

2.2 转化菌的鉴定

通过观察,菌落为绿色,背面为黄色。显微镜下观察并记录菌种的显微形态。由图 2 可知,显微镜下菌丝无色透明,表面光滑,有隔膜,直径为 4~5 μ m,菌丝上产生简单的长而直立的分生孢子梗,分生孢子梗分枝呈扫帚状。孢子梗上着生分生孢子链,分生孢子为椭圆形,两端稍细,长 5~7 μ m,宽 3~4 μ m。根据以上菌落形态、菌丝形状、孢子的形状及大小,初步确定为青霉属。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 β -葡萄糖苷酶最适温度 由图 3-a 和图 3-b 可知,随着反应温度的增加,酶活力先提高后降低,在 60℃时酶活力最高。以水杨苷为底物和以虎杖苷为底物测得的酶活力变化趋势一致。以水杨苷为底物测定酶活力能准确地反映该酶对底物的转化能力。

2.3.2 酶的稳定性影响 酶液分别在 30、40、50、60、70℃下保温 12 h,按常规法测定对应的酶活力。取酶液,放于 60℃水浴中保藏,分别在 2、4、6、8、10、12 h 取样,常规方法检测酶活力。由图 4 可知, β -葡萄糖苷酶在 50℃以下保温 12 h 后基本不失活,在 60℃保温 12 h 后酶活力有损失,60℃以后酶活力损失较大。由图 5 可知,60℃下,1~10 h 内酶活力较稳定,10 h 后酶活力降幅较大。

2.3.3 pH 值对 β -葡萄糖苷酶活性及酶的酸碱稳定性的影响 分别配制 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,采用常规方法测定酶活力。此外,将酶液与上述不同 pH 值缓冲液在 60℃下放置 1 h 后,按常规法测定其对应的酶活力。由图 6 可知, β -葡萄糖苷酶活力随着 pH 值的上升先提高后降低,在 pH 值为 5.0 时酶活力最高,这与多数文献报道的一致。由图 7 可知,酶在 pH 值为 4.0~6.0 之间时,相对酶活力较高,保持了较高的稳定性,在 pH 值 >6.0 或 pH 值 <4.0 时,酶活力明显下降。

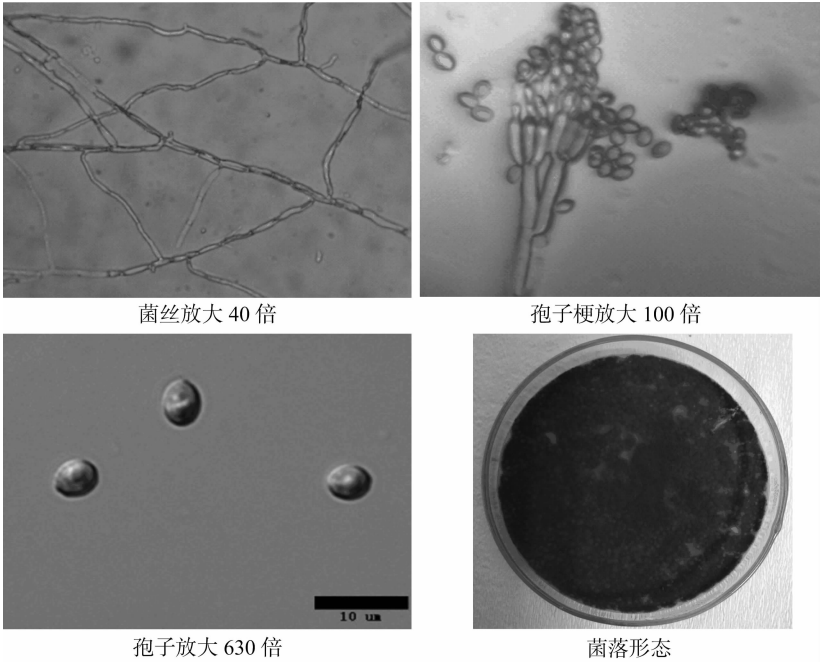


图2 H6 菌的显微形态

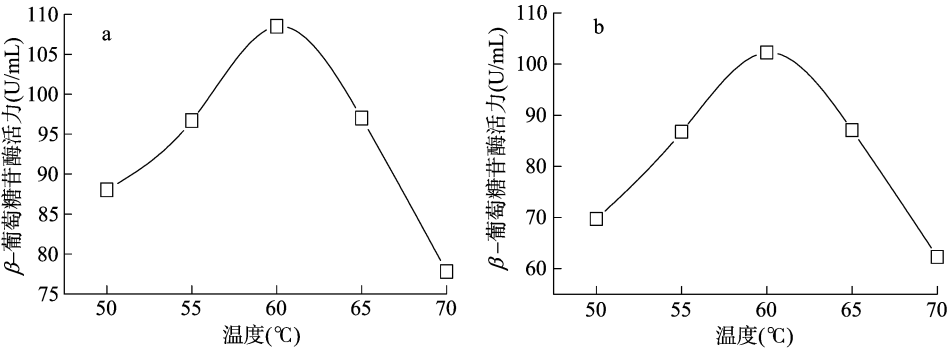


图3 以水杨苷为底物(a)和以虎杖苷为底物(b)的 β-葡萄糖苷酶最适温度

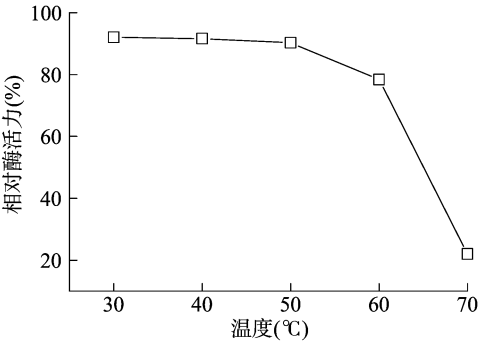


图4 温度对酶活力的影响

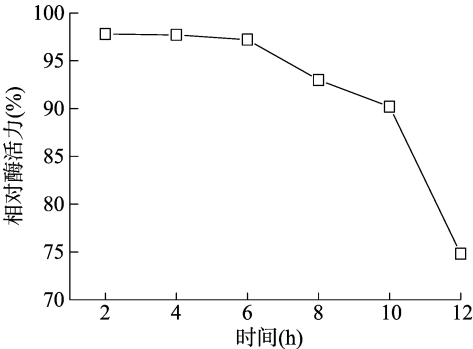


图5 60 °C 下酶活力变化

2.3.4 β-葡萄糖苷酶的底物特异性 在标准条件下,用 0.5% 的不同底物与酶液反应,结果如表 1 所示。由表 1 可知,酶对虎杖苷的水解效果最好,对水杨苷的水解效果其次,对纤维二糖和京尼平苷的水解效果较差,对甜菊苷的水解效果最弱。

2.3.5 不同金属离子对 β-葡萄糖苷酶活力的影响 选取氯化钠、氯化钙、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸钴为试剂。在酶反应液中分别加入上述金属离子,使其终浓度为 1.0 mmol/L,于

60 °C 温 30 min,按常规法测定对应的酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100%。从表 2 可以看出,金属阳离子对该酶都有不同程度的影响,其中 Fe^{2+} 、 Na^{+} 和 Ca^{2+} 对酶活力有轻微的激活作用,而 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 则有一定的抑制作用。

3 结论

本试验通过初筛和复筛得到 1 株霉菌,可将虎杖苷转化为白藜芦醇,经形态学鉴定为青霉菌属。对其所产酶的酶学

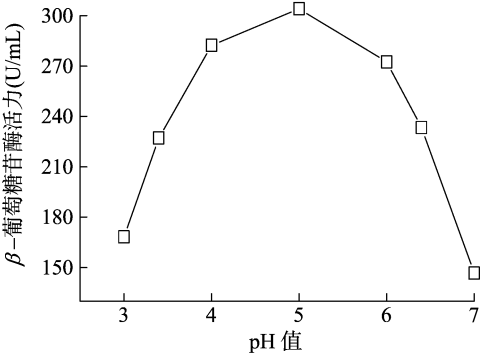


图6 pH 值对酶活力的影响

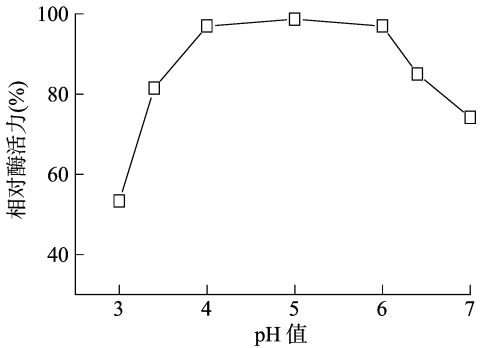


图7 酶的 pH 值稳定性

表 1 不同底物对 β -葡萄糖苷酶活力的影响

底物	酶活力 (U/mL)
甜菊苷	62.3
水杨苷	243.0
虎杖苷	891.0
纤维二糖	101.0
京尼平苷	80.3

注:表中底物用 pH 值 5.0 的缓冲液配制。

表 2 金属离子对 β -葡萄糖苷酶活力的影响

金属离子	浓度 (mmol/L)	相对酶活力 (%)
对照	0.0	100.0
Na ⁺	1.0	101.2
Ca ²⁺	1.0	101.4
Mg ²⁺	1.0	86.3
Fe ²⁺	1.0	102.6
Co ²⁺	1.0	89.9

注:除 Ca²⁺、Na⁺ 以氯化物形式加入外,其余离子均为硫酸盐形式加入。0、55、60℃ 反应 3 h,加 10 mL 95% 乙醇,40℃ 超声提取 40 min,取上清,稀释 10 倍,检测。

性质进行了研究,结果表明:酶的最适 pH 值为 5.0,pH 值在 4.0~6.0 之间时,酶的稳定性较好;酶最适反应温度为 60℃,并且在该温度下具有较好的热稳定性;Fe²⁺、Na⁺ 和

Ca²⁺ 对酶活力有激活作用;虎杖苷是该酶理想的水解作用底物。

本试验的结果可以拓展白藜芦醇的制备途径^[17],增加虎杖的利用价值。可以用虎杖中药材为原料,先提取虎杖苷,利用该菌株所产的酶液转化虎杖苷,或将酶液制成固定化酶再将虎杖苷转化成白藜芦醇。另外,还可以将虎杖药材粉碎后与该菌进行共发酵,从发酵后的固体曲中提取白藜芦醇。

参考文献:

[1]刘盛楠,邵淑丽,隋文静,等. 白藜芦醇诱导肺癌 A549 细胞凋亡[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(4):685-691.

[2]Öztürk E, Arslana A K K, Yerera M B, et al. Resveratrol and diabetes:a critical review of clinical studies[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2017,95:230-234.

[3]Harper C, Pate B B. Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice[J]. Carcinogenesis,2007,28(9):1946-1953.

[4]董 雯,王 蓉. 白藜芦醇诱导细胞自噬在神经退行性疾病进展中的作用[J]. 药学报,2016,51(1):18-22.

[5]Patel K R, Brown V A, Jones D J, et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients[J]. Cancer Res,2010,70(19):7392-7399.

[6]Alejandra A F, Helder D S, Robert S F, et al. Formation stability and antioxidant activity of food-grade multilayer emulsions containing resveratrol[J]. Food Hydrocolloids,2017,71:207-215.

[7]Wang W B, Lai H C, Hsueh P R, et al. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol[J]. J Med Microbiol,2006,55(10):1313-1321.

[8]Tung B T, Rodriguez-Bies E, Talero E, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver[J]. Exp Gerontol,2015,64:1-7.

[9]李先宽,李赫宇,李 帅,等. 白藜芦醇研究进展[J]. 中草药,2016,47(14):2568-2578.

[10]张文根,杨赛刚,李 波,等. 中国寥科植物化学成分研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(2):393-396.

[11]周建军,张宏杰,杨培君. 不同地区虎杖中白藜芦醇苷及苷元的含量比较[J]. 中药材,2005,28(1):31-33.

[12]任建伟. β -葡萄糖苷酶高产菌株选育及发酵条件优化[D]. 杭州:浙江大学,2015.

[13]田天丽. 微生物发酵转化虎杖的研究[D]. 成都:四川大学,2007:6-7.

[14]叶秋雄,黄 苇. 白藜芦醇苷的稳定性研究[J]. 食品工业科技,2011,32(4):155-157.

[15]王 辉. 微生物转化虎杖中白藜芦醇苷及其产物的分离纯化[D]. 大连:大连理工大学,2008:29-30.

[16]陈蓉蓉,姜 华,浦含林. 酶解法制备白藜芦醇的工艺优化[J]. 食品工程,2011(11):151-154.

[17]孙诗雯,张笑笛,宋 宇. 葡萄中白藜芦醇合成酶基因的克隆及其转化黄芩研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):38-41.