

# 一株产 CGTase 环糊精葡萄糖基转移酶的 细菌改性甜菊苷的研究

宋婷婷<sup>1</sup>, 尹慧慧<sup>1</sup>, 杨帆<sup>2</sup>, 闫莽<sup>1</sup>, 陈育如<sup>1,2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 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基因组学重点实验室,  
江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

(2. 格里菲斯大学环境学院和环境未来研究所, 澳大利亚 昆士兰 QLD 4222)

[摘要] 本文对筛选的一株产 CGTase 环糊精葡萄糖基转移酶的细菌(*Bacillus* sp. CGT7)转化并改性甜菊苷进行了研究,探讨了影响酶活性和转化效果的因素。实验结果表明,在 CGT7 菌的培养过程中,碳源、氮源、温度和初始 pH 等因素对菌株产酶活性均有不同程度的影响,适宜的碳源为马铃薯淀粉,氮源为豆粕粉,培养温度为 30 ℃,初始 pH 值为 8.5。适宜条件下培养的 CGT7 菌的酶活性可达 544 U/mL,以甜菊糖苷为底物、环糊精为糖基供体时,转糖苷产物 Stv-Glu 浓度为 0.61 mg/mL。

[关键词] 环糊精葡萄糖基转移酶,甜菊糖,酶法改性,糖基供体,酶活性

[中图分类号] Q814 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)01-0095-04

## Bioconversion of Stevioside by CGT7 Bacteria with Cyclodextrin Glucanotransferase Activity

Song Tingting<sup>1</sup>, Yin Huihui<sup>1</sup>, Yang Fan<sup>2</sup>, Yan Mang<sup>1</sup>, Chen Yuru<sup>1,2</sup>

(1. Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Microbiology Resource, Jiangsu Key Laboratory for Functional Microbes and Genomic,  
Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Griffith School of Environment and Environmental Futures Research Institute, Griffith University, Queensland 4222, Australia)

**Abstract:** This work screened the strain CGT7 which produces cyclodextrin glucanotransferase, and studied its bioconversion and modification activities from stevioside into Stv-Glu. The efficient factors were discussed. Experimental results showed that carbon source, nitrogen source, temperature and pH value of culture medium can effect on cyclodextrin glucanotransferase activity of CGT7 observably. Potato starch and soybean cake meal are the appropriate carbon and nitrogen sources with an initial pH value of 8.5 at 30 ℃. The cyclodextrin glucanotransferase activity of CGT7 culture medium reached 544 U/mL under the optimized condition, and the concentration of bioconversion product Stv-Glu was obtained at 0.61 mg/mL when stevioside was introduced as the substrate and cyclodextrin as the glycosyl donor.

**Key words:** cyclodextrin glucanotransferase, steviol glycoside, enzymatic modification, glycosyl donor, enzyme activity

甜菊糖苷(steviol glycoside)是从甜叶菊(*stevia rebaudiana*)叶中提取的甜味成分的混合物。目前,文献报道中已经有超过 30 种的甜菊糖苷甜味成分被鉴定<sup>[1]</sup>,占甜叶菊叶干重的 4%~20%<sup>[2]</sup>,属于四环二萜类化合物。研究表明,甜菊糖苷具有预防动脉硬化、肥胖、心脏病、龋齿等作用,还具有抗氧化、调节血糖、抗腹泻、降血压、抗炎、利尿和免疫调节等功能<sup>[3]</sup>。而将甜菊糖苷经糖基转移酶的作用加上葡萄糖基后可成为甜味更佳的成份,本工作对筛选的产环糊精葡萄糖基转移酶的微生物转化甜菊苷的酶活性优化进行了研究。

## 1 材料、设备与方法

### 1.1 材料与试剂

筛选微生物的土壤采自南京师范大学仙林校区的校园中。

收稿日期:2016-03-23.

基金项目:江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA210002)、江苏省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(NY-011-2015)。

通讯联系人:陈育如,教授,博士,研究方向:天然产物与药物研究. E-mail:chenyuru@njjnu.edu.cn

正丁醇(分析纯),乙腈(HPLC 级),甲醇(HPLC 级);甜菊糖(Stv 37.1%,甜菊糖公司提供),莱鲍迪苷 A(RA 99%),淀粉,甜菊叶,由甜菊糖公司提供.

1.2 培养基

斜面保藏培养基:淀粉 1%,酵母膏 0.5%, $K_2HPO_4$  0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, $Na_2CO_3$  1%,琼脂 2%.  
产酶培养基:淀粉 1%,酵母膏 0.5%, $K_2HPO_4$  0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, $Na_2CO_3$  1%.

1.3 方法

1.3.1 酶液制备<sup>[4]</sup>

250 mL 三角瓶装入液体培养基 50 mL,菌种接种量 3%,于 30 ℃、180 r/min 摇瓶培养 48 h,经 3 000 r/min 离心 20 min 收集上清液即为酶液.

1.3.2 酶液对甜菊苷的转化和改性

配制 2%的甜菊糖溶液,加入淀粉,使淀粉:甜菊糖重量比为 2:1,取配制好的甜菊糖淀粉溶液与等体积的酶液混匀,在 38 ℃的水浴中进行转化,定时取样分析.

1.3.3 产物定量分析

HPLC 定量分析,以外标法计算 Stv、Stv-Glu 的变化量,按标准曲线计算<sup>[5]</sup>.

2 结果与讨论

2.1 转化时间对 CGT7 菌酶液转化甜菊苷的影响

本工作对筛选得到的能将甜菊苷转化为 Stv-Glu 的 CGT7 菌在不同时间进行转化,考察转化时间对底物浓度和产物浓度的影响,结果如图 1 所示.

从图 1 可见,随着时间的延长,转化液中甜菊苷(Stv)的浓度逐渐减少,产物 Stv-Glu 的浓度逐渐增加,产物 Stv-Glu 的浓度在 10 h 时达到 0.57 mg/mL.

2.2 碳源对产酶的影响

本工作以不同碳源(1%)在装液量 50 mL/250 mL、30 ℃、180 r/min 条件下培养 CGT7 菌 48 h,考察碳源对 CGT7 菌株产 CGTase 活力的影响,结果如表 1 所示.

从表 1 可见,以马铃薯淀粉和玉米淀粉作为碳源能获得更高的酶活性,分析这些碳源中含有更利于产 CGTase 酶的成份<sup>[7]</sup>,这两类淀粉均适合于作为此菌的碳源.

2.3 氮源对产酶的影响

选用不同氮源于装液量 50 mL/250 mL、30 ℃、180 r/min 培养 CGT7 菌 48 h,考察氮源对 CGT7 菌株产 CGTase 活力的影响,结果如表 2 所示.

表 1 碳源对 CGT7 菌产 CGTase 的影响

| Table 1 Effect of different carbon sources on CGTase activity |            |
|---|------------|
| 碳源  | 酶活力/(U/mL) |
| 马铃薯淀粉   | 459        |
| 可溶性淀粉   | 406        |
| 玉米粉   | 317        |
| 玉米淀粉  | 441        |
| 葡萄糖   | 24         |
| 麦芽糖   | 12         |

表 2 不同氮源对 CGT7 产酶的影响

| Table 2 Effect of different nitrogen sources on CGTase activity |            |
|---|------------|
| 碳源  | 酶活力/(U/mL) |
| 酵母膏   | 473        |
| 豆粕粉   | 469        |
| 蛋白胨   | 87         |
| 玉米浆   | 452        |
| 尿素  | 26         |
| 硫酸铵   | 34         |

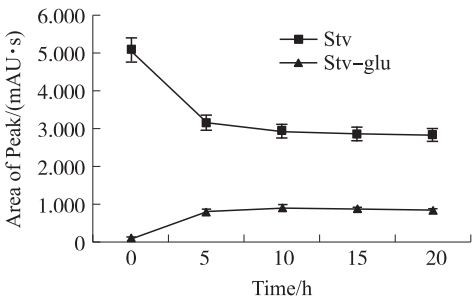


图 1 转化过程中 Stv 与产物 Stv-Glu 含量的变化  
Fig. 1 The time course of the concentrations of Stv and Stv-Glu in the process of bioconversion

由表 2 可见,CGT7 菌以酵母膏、豆粕粉和玉米浆为氮源时的 CGTase 酶活力较高,这些有机氮源有助于微生物的生长与酶的合成<sup>[8-9]</sup>;从成本考虑,豆粕粉和玉米浆更适合作为 CGT7 菌产酶的氮源.

2.4 温度对产酶的影响

多数微生物的生长对温度敏感,适宜温度对微生物的生长和产酶都很重要<sup>[10]</sup>. 本工作以玉米淀粉为碳源,豆粕粉为氮源,考察温度对产酶的影响(接种 48 h 培养后测离心上清液的酶活力),结果如表 3 所示.

从表 3 可见,在 30 ℃ 培养时,所产酶液的酶活性最高(478 U/mL),说明 30 ℃ 是最适合 CGT7 菌的产酶温度.

2.5 初始 pH 对产酶的影响

以玉米淀粉为碳源,豆粕粉为氮源,配制初始 pH 8.0、pH 8.5、pH 9.0、pH 9.5 和 pH 10.0 的产酶培养基,接种 CGT7 菌,30 ℃ 培养 48 h 测酶活力,结果见表 4 所示.

表 3 温度对菌种产 CGTase 的影响  
Table 3 Effect of different temperatures on CGTase activity

| 温度/℃ | 酶活力/(U/mL) |
|------|------------|
| 25   | 278        |
| 30   | 478        |
| 35   | 425        |
| 40   | 240        |
| 45   | 197        |

表 4 初始 pH 对菌种产 CGTase 的影响  
Table 4 Effect of the initial pHs on CGTase activity of strain CGT7

| pH  | 酶活力/(U/mL) |
|-----|------------|
| 7.0 | 192        |
| 7.5 | 365        |
| 8.0 | 412        |
| 8.5 | 544        |
| 9.0 | 371        |

从表 4 可见,在初始 pH 8.5 的条件下酶活性最高(544 U/mL),可见控制 pH 可以调解菌体产酶<sup>[11]</sup>,对 CGT7 菌的产酶同样如此.

2.6 糖基供体对甜菊苷转化的影响

分别以 β-环糊精、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉作为糖基供体,以不加糖基供体为对照,考察不同糖基供体对甜菊糖苷转化的影响,结果如图 2 所示.

从图 2 可见,与对照相比,增加糖基供体对转化率有明显的影 响;其中以加 β-环糊精为糖基供体时,Stv-Glu 的浓度最高(0.56 mg/mL),经后续进一步优化后,转糖苷产物 Stv-Glu 浓度为 0.61 mg/mL.

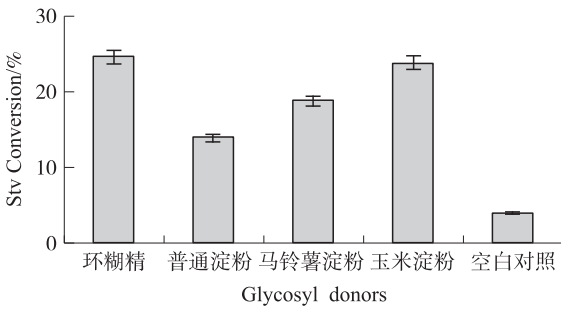


图 2 糖基供体对转化率的影响(转化 10 h)

Fig. 2 The selection of glycosyl donors based on their bioconversion rates of Stv

3 结论

(1)本实验室筛选的 CGT7 菌株是甜菊苷的适宜改性微生物,能将甜菊苷转化为 Stv-Glu,对甜菊苷的改性和味质改善有明显的效果.

(2)CGT7 菌的培养过程中,碳源、氮源、温度和初始 pH 等因素对菌株产酶活性均有不同程度的影响,适宜的碳源为马铃薯淀粉、氮源为豆粕粉,适宜培养温度为 30 ℃,适宜的初始 pH 值为 8.5,适宜的糖基供体为 β-环糊精.

(3)在以玉米淀粉为碳源、豆粕粉为氮源、初始 pH 8.5 的条件下,CGT7 菌培养后的酶活性可达 544 U/mL,转糖苷产物 Stv-Glu 浓度为 0.61 mg/mL.

[参考文献]

[1] WOLWER R U. The leaves of *stevia rebaudiana*(bertoni),their constituents and the analyses there of:A review[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2012,60(4):886-895.

[2] PURI M. “Extraction and safety of stevioside”;response to the article “*stevia rebaudiana* bertoni,source of a high potency natural sweetener;a comprehensive review on the biochemical,nutritional and functional aspects”[J]. Food chemistry,2012,135(3):1861-1862.

[3] GEERAERT B,CROMBE F,HULSMANS M,et al. Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and

- antioxidant defense in obese insulin-resistant mice[J]. International journal of obesity, 2010, 34(3): 569–577.
- [4] CHAN P, XU D Y, LIU J C, et al. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats[J]. Life sciences, 1998, 63(19): 1 679–1 684.
- [5] JEPPESEN P B, GREGERSEN S, ROLFSEN S E, et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic goto-kakizaki rat[J]. Metabolism: clinical and experimental, 2003, 52(3): 372–378.
- [6] CHAN P, TOMLINSON B, CHEN Y J, et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension[J]. British journal of clinical pharmacology, 2000, 50(3): 215–220.
- [7] GREGERSEN S, JEPPESEN P B, HOLST J J, et al. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects[J]. Metabolism: clinical and experimental, 2004, 53(1): 73–76.
- [8] CHEN T H, CHEN S C, CHAN P, et al. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *stevia rebaudiana*[J]. Planta medica, 2005, 71(2): 108–113.
- [9] FERREIRA E B, de ASSIS R N F, da COSTA M A, et al. Comparative effects of *stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis[J]. Planta medica, 2006, 72(8): 691–696.
- [10] ESMAT A, AZZA A, FERIAL M. Physico-chemical assessment fo natural sweeteners *steviosides produced* from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant[J]. African journal of food science, 2010, 4: 269–281.
- [11] BRAHMACHARI G, MANDAL L C, ROY R, et al. Stevioside and related compounds-molecules of pharmaceutical promise: a critical overview[J]. Archiv der Pharmazie, 2011, 344(1): 5–19.
- [12] 胡静, 陈育如, 魏霞, 等. 高产环糊精葡萄糖基转移酶的枯草芽孢杆菌选育、产酶与酶学特性[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 97–102.
- [13] 郁军, 岳鹏翔, 程其春. 酶法改性甜菊糖苷的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 214–218.
- [14] KOCHIKIAN V T, MARKOSIAN A A, ABELIAN L A, et al. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A[J]. Applied biochemistry microbiology, 2006, 42(1): 37–43.

[责任编辑: 黄 敏]