

内生真菌 *Eupenicillium javanicum* R57 水解京尼平苷 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质

梁金凤¹ 汪涯¹ 肖依文¹ 常军¹ 季波¹ 朱笃^{1,2*}

¹江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室 江西 南昌 330013

²江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330022

摘要: 从 10 株东乡野生稻内生真菌中筛选到 7 株可转化京尼平苷合成京尼平的菌株, 其中菌株 R57 的转化效率最高, 最大转化率可达 98.7%。通过菌体形态结合 ITS rDNA、18S rDNA 及 28S rDNA 序列分析, 将该菌鉴定为爪哇正青霉 *Eupenicillium javanicum* R57。菌株 R57 的粗酶液经硫酸铵沉淀、透析、超滤、EzFast DEAE FF 阴离子交换层析及 Sephadex G-150 凝胶柱层析, 获得电泳纯的 β -葡萄糖苷酶, 其相对分子质量约为 81kDa。该 β -葡萄糖苷酶对京尼平苷和 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 均有催化作用, 但对京尼平苷的 K_m 值最小, 为 0.153mmol/L, 且催化效率更高; 该 β -葡萄糖苷酶具有较强耐酸性和耐热性, 最适 pH 4.6, 最适温度 60℃。该酶活性受 K^+ 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 及尿素的激活, 但受 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mo^{3+} 、 Pb^{2+} 及 SDS 不同程度的抑制。

关键词: 微生物转化, 京尼平苷, 京尼平, β -葡萄糖苷酶, 爪哇正青霉

Purification and characterization of geniposide- hydrolyzing β -glucosidase from endophytic *Eupenicillium javanicum* R57 harboring in Dongxiang wild rice

LIANG Jin-Feng¹ WANG Ya¹ XIAO Yi-Wen¹ CHANG Jun¹ JI Bo¹ ZHU Du^{1,2*}

¹Key Laboratory of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013, China

²Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resource of Jiangxi Provinces, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China

基金项目: 国家自然科学基金 (31260137); 江西省教育厅科技项目 (GJJ160777); 江西科技师范大学科研重点项目 (2016XJZD001); 江西科技师范大学研究生创新专项资金项目 (YC2016-X07)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260137), Foundation of Jiangxi Educational Committee (GJJ160777), the Major Foundation of Jiangxi Science and Technology Normal University (2016XJZD001) and the Graduate Innovation Foundation of Jiangxi Science and Technology Normal University (YC2016-X07).

*Corresponding author. E-mail: zhudu12@163.com

Received: 2017-04-10, accepted: 2017-06-02

Abstract: In this study, seven out of ten endophytic fungal strains from Dongxiang wild rice were screened for producing β -glucosidase. The strain R57 has the highest conversion efficiency, and the biotransformation rate was 98.7% from geniposide to genipin. The strain R57 was identified as *Eupenicillium javanicum* R57 by morphological characteristics, microscopic observation and ITS rDNA, 18S rDNA, 28S rDNA sequence analysis. Using the combination of ammonium sulfate precipitation, dialysis, ultrafiltration, EzFast DEAE FF anion exchange chromatography and Sephadex G-150 gel column chromatography, β -glucosidase was purified. Molecular weight of β -glucosidase was determined to be 81kDa by SDS-PAGE. The β -glucosidase can hydrolyze p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (PNPG) and geniposide, however, the efficiencies of hydrolyzing geniposide were higher than that of PNPG. The K_m value of β -glucosidase to geniposide was 0.153mmol/L. β -glucosidase showed high pH stability and heat resistance, the highest reaction velocity was achieved at 60°C, pH 4.6. The hydrolysis activity of the β -glucosidase was activated by K^+ , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} and urea, while inhibited by Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{3+} , Pb^{2+} and SDS.

Key words: microbial transformation, geniposide, genipin, β -glucosidase, *Eupenicillium javanicum*

京尼平苷 (geniposide) 及其苷元京尼平 (genipin) 是茜草科植物栀子中主要的生理活性成分, 具有保肝、利胆、抗炎镇痛、抗血栓、抗癌、降血糖等药理作用 (傅春升等 2004; Takeuchi *et al.* 2005; 付田等 2007; Mikami & Takikawa 2008; Jeon *et al.* 2011)。京尼平是京尼平苷的肠内代谢产物, 是体内发挥药效的活性成分。近年来研究表明, 京尼平作为药物中间体和注射剂, 在抗肿瘤、治疗肝硬化、抑制神经退行性变等方面疗效显著 (Koo *et al.* 2005; Kim *et al.* 2008; Nam *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015)。同时, 京尼平还是一种天然的生物交联剂, 与其他化学交联剂作用相当, 但细胞毒性却比戊二醛低 10 000 倍 (王昊等 2013), 是化学交联剂的理想替代物, 在组织工程和药物载体等领域有着广阔

的应用前景 (Muzzarelli *et al.* 2015)。此外, 京尼平可以和氨基酸发生反应产生蓝黑色素, 有望用于指纹鉴别领域 (Jelly *et al.* 2009; Muzzarelli 2009)。

京尼平在栀子果实中的含量仅 0.005%–0.01%, 远低于京尼平苷含量 (3.0%–8.0%), 较低的含量很难满足日后应用的需求 (Dong *et al.* 2014)。鉴于此, 寻求高效高产京尼平的途径尤为迫切。目前, 制备京尼平的方法主要是利用酶或微生物水解京尼平苷的糖苷键使之转化为京尼平 (图 1)。付岩帅等 (2011) 采用泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* 转化京尼平苷的转化率可达 97.7%; 王永宏等 (2007)、霍蕾等 (2008) 也分别用微生物和酶转化京尼平苷或栀子为京尼平, 但其转化效率和转化时间都有待优化。本文报道了一株高效转化京尼平

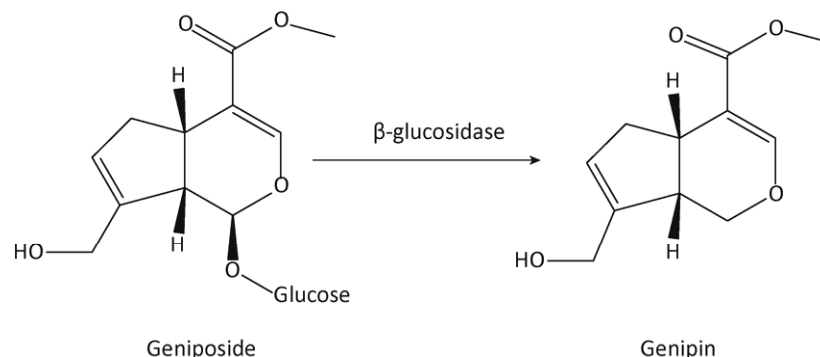


图 1 京尼平苷微生物转化生成京尼平的机理图

Fig. 1 Microbial mechanism of transforming geniposide into genipin.

苷生成京尼平的东乡野生稻内生真菌 R57, 其转化效率达 98.7%。随后经形态学和 ITS rDNA、18S rDNA 及 28S rDNA 序列分析将其鉴定为爪哇正青霉 *Eupenicillium javanicum*, 并对其所产的京尼平苷 β -葡萄糖苷酶进行分离纯化和酶学性质的研究。本研究对探索植物内生菌作为高效生物转化的微生物资源具有极其重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种: 供试菌株东乡野生稻内生真菌菌株 R52、R57、R84、R130、S59、S108、L63、L68、F147 和 F122 均是实验室前期从东乡野生稻中分离纯化所得, 用 PDA 固体斜面培养基 4℃ 保存于本实验室, 每 2 月活化 1 次。

1.1.2 培养基 PDA (g/L): 去皮马铃薯 200; 葡萄糖 20; 酵母粉 1.0; 琼脂粉 20。CYA (g/L): 蔗糖 30; NaNO₃ 3; KH₂PO₄ 1.0; 硫酸镁 0.5; KCl 0.5; FeSO₄ 0.01; 酵母提取物 5; 琼脂粉 15。YES (g/L): 酵母膏 20; 蔗糖 30; 硫酸镁 0.5; 琼脂粉 20。种子液培养基 (g/L): 葡萄糖 20; KH₂PO₄ 3.0; 硝酸铵 3.0; NaCl 0.5; 酵母粉 1.0; 硫酸镁 0.5; ZnSO₄·7H₂O 0.0029; MnSO₄·7H₂O 0.0017; H₃BO₃ 0.00003; pH 6.0。转化培养基 (g/L): 京尼平苷 2; KH₂PO₄ 3.0; 硝酸铵 3.0; NaCl 0.5; 酵母粉 1.0; 硫酸镁 0.5; ZnSO₄·7H₂O 0.0029; MnSO₄·7H₂O 0.0017; H₃BO₃ 0.00003; pH 6.0。PDB (g/L): 去皮马铃薯 200; 葡萄糖 20; 酵母粉 1.0。产酶培养基 (g/L): 麦麸 50; 硝酸铵 3.0; 酵母粉 1.0; KH₂PO₄ 2.0; MgSO₄·7H₂O 0.4; ZnSO₄·7H₂O 0.04; COSO₄·7H₂O 0.04。

1.1.3 主要仪器与设备: 双层全温度恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), RCT Basic 磁力搅拌器 (德国 IKA 公司), Sorvall Evolution RC 离心机 (德国 Thermo Fisher 公司), 恒温震荡水浴锅 (苏州威尔

公司), 超高效液相色谱仪 UPLC (美国 Waters 公司), AKTA purifier UPC10 蛋白纯化仪 (美国 GE 公司), Lamda365 紫外分光光度计 (日本爱朗公司)。

1.2 转化京尼平苷的微生物筛选

将 1.1.1 所述的活化后菌种接种至种子液培养基中, 28℃、150r/min 条件下连续培养 3d, 获得种子液。按 5% 的接种量, 将培养好的种子转接至转化培养基中, 28℃、150r/min 条件下连续培养 2d, 每隔 12h 取 2mL 发酵液检测转化情况。发酵液在 4℃、12 000r/min 条件下冷冻离心 20min, 取上清液, 然后采用薄层层析法 (TLC) 进行初步检测, 并用甲醇精密稀释 20 倍后, 用超高效液相色谱法 (UPLC) 检测, 确定筛选结果。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株形态观察: 将活化后的 R57 菌株分别挑取 1–2 环至 PDA 固体平板培养基、CYA 固体平板培养基和 YES 固体平板培养基中培养 14d, 观察其菌落形态; 并采用插片培养法, 用显微镜观察菌丝体形状以及孢子大小、形状、类型、颜色等。

1.3.2 菌株分子生物学鉴定: ITS rDNA 序列扩增引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 18S rDNA 序列扩增引物 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3'), 28S rDNA 序列扩增引物 LR0R (5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3') 和 LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') 由上海生工生物工程技术有限公司合成。采用 CTNB 法提取 DNA 模板, PCR 反应体系: 模板 DNA 2 μ L、10 \times PCR buffer 5 μ L、Taq DNA 聚合酶 2.5U、dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L、引物 3 μ L, 补充去离子水至 50 μ L。反应程序 94℃ 40s, 60℃ 40s, 72℃ 40s, 34 个循环; 72℃ 延伸 5min。PCR 产物经 1% 凝胶电泳检测后送交上海生工生物工程技术有限公司测序。

将测得的 ITS rDNA、18S rDNA 和 28S rDNA 等序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对并申请 GenBank 登录号。下载相关菌株的 ITS rDNA、18S

rDNA 及 28S rDNA 等序列, 使用 MEGA 5.05 软件 Clustal X 方法进行系统发育分析, 以 Neighbour-joining 法构建分子系统发育树, 在分枝上标记 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值, 以评估系统发育树的置信度, 从而确定菌株的亲缘关系及分类地位 (汪涯等 2011)。

1.4 标准液的制备分离

1.4.1 β -葡萄糖苷酶粗酶液的制备: 菌株 R57 接种至 PDB 液体培养基中, 于 28℃、150r/min 培养 3d, 再转接至产酶培养基中培养 4d。收集发酵液, 经布氏漏斗过滤, 4℃条件下 12 000r/min 离心, 上清液即为粗酶液, 4℃保存备用。

1.4.2 β -葡萄糖苷酶的分离: 粗酶液添加固体硫酸铵至 75%饱和度, 4℃放置过夜, 12 000r/min 离心 20min, 收集蛋白沉淀。粗蛋白溶于 20mmol/L、pH 4.8 醋酸盐缓冲溶液去除不溶物 (12 000r/min, 20min), 透析 48h, 收集溶液, 用 0.22 μ m 膜过滤和超滤浓缩。样品上样至 EzFast DEAE FF 色谱柱, 该柱先用 1mol/L Tris-HCl 预平衡后, 然后采用 1mol NaCl/Tris-HCl 溶液为流动相, 以 0–0.5mol 梯度洗脱, 流速为 1mL/min, 洗脱时间 100min。检测酶活, 合并相同的流出峰, 超滤浓缩后用 Sephadex G-150 (1.6cm \times 60cm) 继续纯化, 流动相为 20mmol/L、pH 4.8 醋酸盐缓冲液, 流速 0.5mL/min, 洗脱 2 个柱体积。收集 280nm 波长下的流出峰, 检测各管的酶活力及纯度。

1.5 分析方法

1.5.1 TLC 分析: TLC 分析条件中展开剂为三氯甲烷: 甲醇=5:1; 检测波长为 254nm (Akao *et al.* 1994)。

1.5.2 UPLC 分析: 分别精密称取 10mg 京尼平和京尼平苷标准品用甲醇溶解并定容至 10mL 容量瓶中, 制作出 1mg/mL 的标准品溶液。用 1mg/mL 的标准品溶液作为母液, 逐个定量稀释至 0.8、0.4、0.2、0.1、0.08、0.04、0.02 和 0.01mg/mL。以峰面积对京尼平苷和京尼平的质量浓度作线性回归。色谱条件: 色谱柱 J'sphere ODS-H80 (S-4 μ m, 8nm)

250mm \times 4.6mm L.D., C₁₈ 色谱柱。流动相: 甲醇:水 (35:55), 流速: 0.8mL/min, 进样量: 10 μ L, 检测波长: 238nm, 柱温: 30℃。获得京尼平标准曲线: $y=2.223\times 10^7x-127\ 512.99$, $r^2=0.9996$, 京尼平苷标准曲线: $y=1.483\times 10^7x-106\ 579.55$, $r^2=0.9994$ 。

转化率计算公式: 转化率=(反应物起始浓度-反应物剩余浓度)/反应物起始浓度 \times 100%

1.5.3 蛋白质浓度测定: 按照 Brandford (1976) 的方法进行检测。

1.5.4 β -葡萄糖苷酶活测定: UPLC 法: 反应液总体积为 1mL, 含 200 μ L 酶液, 2g/L 京尼平苷 800 μ L, 60℃, 反应 30min。以加 200 μ L 煮沸灭活的酶液为对照。反应后稀释 10 倍, 用 1.5.2 方法检测京尼平的含量。酶活单位: 每分钟产生 1 微摩尔京尼平所需的酶量为 1U。

PNPG 法: 酶液 0.2mL, 100mmol/L、pH 4.8 醋酸盐缓冲溶液 PNPG 0.3mL, 60℃, 反应 15min 后, 用 0.5mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 以 Na₂CO₃ 灭活酶液为对照。OD₄₀₀ 处比色。酶活单位: 每分钟产生 1 微摩尔对硝基苯酚所需的酶量为 1U。

1.5.5 β -葡萄糖苷酶分子量测定及纯度鉴定: 采用 SDS-PAGE 测定酶的分子量及纯度, 条件: 5%浓缩胶, 12%分离胶, 浓缩胶电压 85V, 分离胶电压 110V, 染色液: 考马斯亮蓝 R250, 脱色液: 冰醋酸:水:甲醇=225:225:50。

1.5.6 酶促反应时间: 以京尼平苷为底物, 以时间为变量, 按照 UPLC 法测酶活。

1.5.7 酶最适反应温度及其热稳定性: 在不同温度条件下, 以京尼平苷为底物按照 UPLC 法测酶活, 酶活最高时的反应温度视为酶最适反应温度; 酶液在不同温度下保温 1h 后, 测定残余酶活, 以未保温酶液的酶活为 100%, 比较不同温度下酶活的稳定性。

1.5.8 酶最适 pH 及其 pH 稳定性: 在不同的 pH 缓冲液中, 以京尼平苷为底物按照 UPLC 法测酶活, 以酶活最高时的 pH 视为酶最适反应 pH; 酶液在

不同 pH 下 4℃ 保存 12h, 测残余酶活, 以比较不同 pH 下酶活的稳定性。

1.5.9 酶的抑制剂和激动剂的研究: 在含待考察离子 10mmol/L 的酶促反应体系中, 以京尼平苷为底物按照 UPLC 法测酶活和残余酶活, 以不加任何离子的酶液的相对酶活为 100%, 研究各种离子对酶活的影响。

1.5.10 酶促反应动力学参数: 在 60℃、pH 4.8 的 20mmol/L 醋酸缓冲溶液中, 酶液与不同浓度的底物反应, 用 Lineweaver-Burk 双倒数曲线作图法计算出酶水解底物的 K_m 和 V_{max} , 并测定酶蛋白量, 计算 K_{cat} 。

2 结果与分析

2.1 具转化活性的内生真菌菌株筛选

从前期建立的东乡野生稻内生真菌库中随机选择 10 株菌株, 开展转化京尼平苷生成京尼平的能力检测。TLC 分析结果表明, 10 株真菌中有 7 株具转化能力, 分别为菌株 R57、R52、L63、S59、S108、F147 和 F122 (图 2)。京尼平苷经过内生真菌 24h 转化, 采用 UPLC 检测京尼平苷生成京尼平

的转化率, 发现菌株 R57 的转化率最高, 达 98.7% (图 3)。因此选择菌株 R57 开展后续研究。

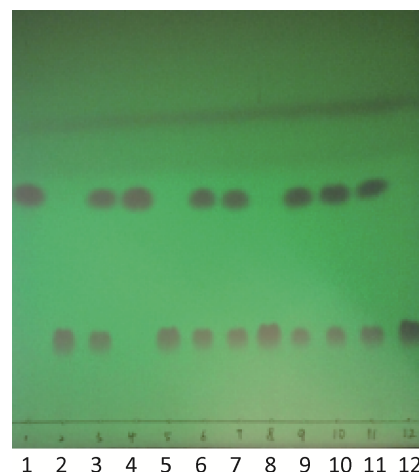


图 2 10 株东乡野生稻内生真菌生物转化京尼平苷的薄层色谱分析

Fig. 2 Thin layer chromatogram analysis of 10 fungal strains from Dongxiang wild rice for biotransforming geniposide. Standard: 1: Genipin; 2: Geniposide. Fungal strains 3–12: F122, R57, L68, R52, F147, R130, S59, S108, L63 and R84.

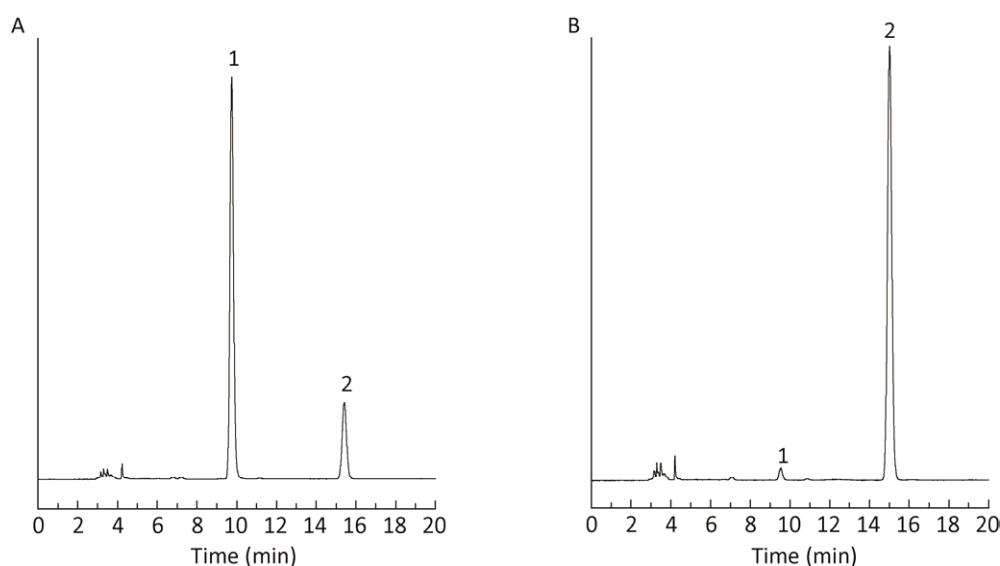


图 3 内生真菌 F147 (A)、R57 (B) 生物转化京尼平苷的 UPLC 谱图

Fig. 3 The UPLC analysis of transforming geniposide into genipin for 24h by endophytic fungi F147 (A) and R57 (B). 1: Geniposide; 2: Genipin.

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌株菌落形态鉴定: 菌株 R57 在 CYA 培养基上 28℃ 培养 7d, 菌落直径可达 44–46mm, 灰白色天鹅绒状, 表面平坦, 中间略凸起, 有褶皱, 背面有沟槽, 生长至第 14 天时, 菌落颜色变红, 褶皱加深, 背面沟槽加重, 有红色色素渗出 (图 4A、4E)。在 PDA 培养基上 28℃ 培养 7d, 菌落直径可达 48–52mm, 14d 后扩至全皿, 菌落呈鹅黄色絮状, 中间略凸起, 无褶皱, 有松散的气生菌丝生长, 随时间延长菌落正面颜色由鹅黄色加深至黄色, 表面平坦无褶皱, 有颗粒状外观, 背面和正面颜色相同 (图 4B、4F)。在 YES 培养基上 28℃ 培养 7d, 菌落直径可达 48–52mm, 白色天鹅绒状, 表面平坦, 中间略凸起, 有褶皱, 背面有沟槽, 生长至第 14 天时, 菌落最边缘变黄, 背面沟槽加重 (图 4C、4G)。显微观察发现, 该菌菌丝细长光滑, 菌丝有隔, 帚状枝单轮生或双轮生, 孢子呈球形或近球形, 分子孢子链疏松而岔开, 孢子壁光滑 (图 4D、4H)。

2.2.2 分子生物学鉴定: PCR 扩增得到长度为 589bp 的 ITS rDNA 序列 (基因登录号: KC871024)、长度

为 1 716bp 的 18S rDNA 序列 (基因登录号: MF099649) 以及长度为 930bp 的 28S rDNA 序列 (基因登录号: MF037881), 分别在 NCBI 上进行 BLAST 比对, R57 和 *Eupenicillium javanicum* 同源性达到 99%。参考在 GenBank 的比对结果, 利用 MEGA 5.05 软件以 Neighbour-joining 方法构建分子系统发育树。结合菌株的形态学观察结果与 ITS rDNA、18S rDNA 及 28S rDNA 分析结果, 将 R57 鉴定为爪哇正青霉 *Eupenicillium javanicum* R57 (图 5)。

2.3 菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶的分离纯化

实验考察了硫酸铵饱和度对 β -葡萄糖苷酶的分离效果, 结果表明, R57 所产的 β -葡萄糖苷酶在 75% 硫酸铵饱和度时分离的最彻底。粗酶液经透析、超滤和 EzFast DEAE FF 后, 大部分杂蛋白都被分离开, 再经过 Sephadex G-150 凝胶柱层析, 活性部分进行 SDS-PAGE 分析, 得到了电泳纯的 β -葡萄糖苷酶, 电泳图片显示 β -葡萄糖苷酶的分子量大约为 81kDa (图 6), β -葡萄糖苷酶用 PNPg 法测酶活, 比活力可达 206.11U/mg, 纯化倍数 16.37, 回收率为 5.91% (表 1)。

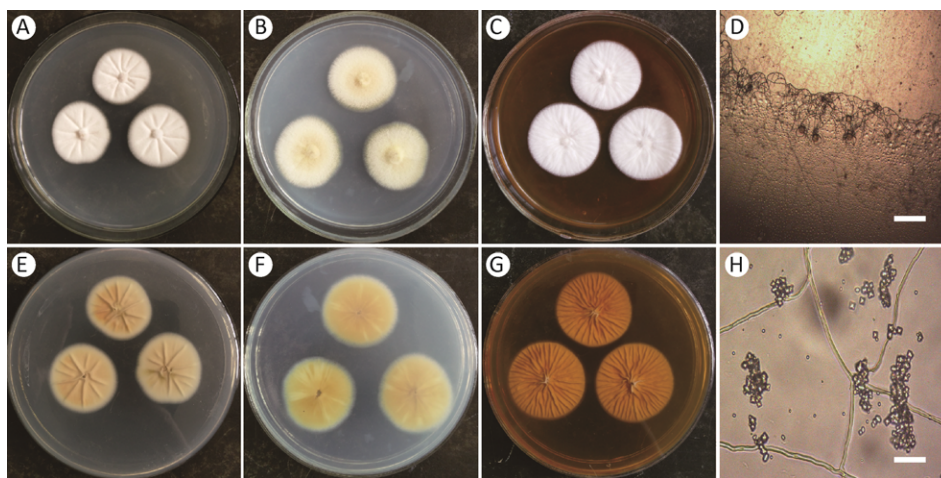


图 4 菌株 R57 在 CYA (A, E)、PDA (B, F) 和 YES (C, G) 上的菌落形态及菌体显微形态 (D, H) 标尺: D=30 μ m; H=10 μ m
Fig. 4 Macroscopic and microscopic characteristics of strain R57. A, E: Colony characteristics of R57 on CYA; B, F: Colony characteristics of R57 on PDA; C, G: Colony characteristics of R57 on YES; D, H: Microscopic morphology of R57. Bars: D=30 μ m; H=10 μ m.

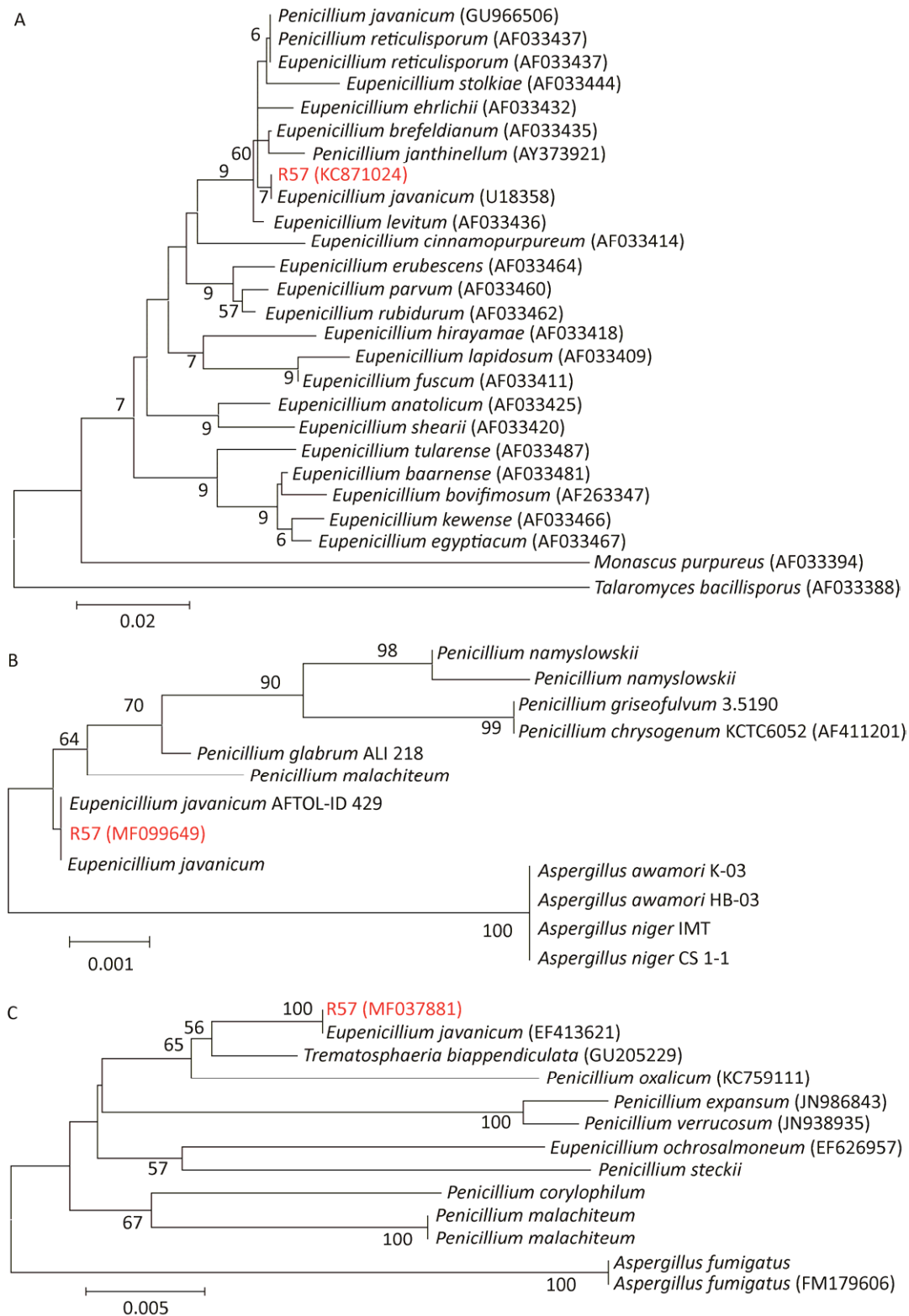


图 5 菌株 R57 的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain R57 and corresponding strains based on ITS rDNA (A), 18S rDNA (B) and 28S rDNA (C) sequence.

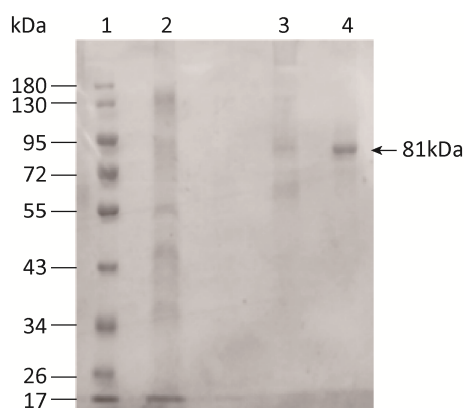


图 6 β -葡萄糖苷酶的电泳图 1: Marker; 2: 硫酸铵盐析脱盐超滤后样品; 3: EzFast DEAE FF 阴离子交换层析后样品; 4: Sephadex G-150 凝胶层析样品

Fig. 6 Biochemical analysis of purified β -glucosidase. 1: Marker; 2: Sample from ammonium sulfate precipitation, dialysis, ultrafiltration; 3: Sample from EzFast DEAE FF anion exchange chromatography; 4: Sample from Sephadex G-150 gel column chromatography.

2.4 菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

2.4.1 酶促反应时间进程: 在 0–50min 内, 京尼平

生成量呈线性上升, 之后逐渐趋于平稳 (图 7)。在 50min 内, β -葡萄糖苷酶的速度在初速度的范围内, 之后, 随反应时间延长, 曲线趋于平坦, 斜率变小, 反应速度下降。要真实反映出酶活力大小, 就应在初速度时间内测定。因此, β -葡萄糖苷酶的初速度的测定时间确定为 30min。

2.4.2 温度及温度稳定性对酶活的影响: 按酶活测定方法, 对温度及温度稳定性进行考察。在 60℃ 时, 菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶相对活力达到最大 (图 8A), 因此, 60℃ 是 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度, 而高于 65℃ 后, 酶活力急剧下降。酶在 65℃ 以下保温 1h, 稳定性良好, 且温度越低, 稳定性越强; 而高于 65℃ 后, 酶活力基本消失 (图 8B)。

2.4.3 pH 及 pH 稳定性对酶活的影响: β -葡萄糖苷酶在 pH 3.6–5.6 范围时, 具有较高的活力, 其最适 pH 为 4.6, 这说明其耐酸性较强 (图 9A)。 β -葡萄糖苷酶在 pH 2–7 之间, 稳定性较好, 常温保存 12h

表 1 β -葡萄糖苷酶的纯化步骤

Table 1 Summary of purification steps of β -glucosidase

纯化步骤	总蛋白	总活力	比活力	纯化倍数	回收率
Purification step	Total protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield (%)
	(mg)	(U)	(U/mg)	fold	
粗酶液	498	6 269	12.59	0	100
Crude extract					
75%硫酸铵沉淀	50	3 374	67.48	5.23	53.82
75% ammonium sulfate precipitation					
EzFast DEAE FF 阴离子交换层析	10.6	1 539	145.19	11.53	24.55
EzFast DEAE FF anion exchange chromatography					
Sephadex G-150 凝胶柱层析	1.8	371	206.11	16.37	5.91
Sephadex G-150 gel column chromatography					

仍具有 70% 以上的相对活力 (图 9B)。

2.4.4 金属离子、尿素及 SDS 对 β -葡萄糖苷酶的影响: 通过分别加入不同金属离子 (10mmol/L)、5% 的 SDS 及尿素 (10mmol/L), 分析其对 β -葡萄糖苷酶水解京尼平苷活性的影响。结果表明, β -葡萄糖苷酶的活性受 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 K^+ 和尿素的显著激活, 受 Fe^{2+} 、SDS、 Mo^{3+} 和 Pb^{2+} 的抑制, 其中, SDS、 Pb^{2+} 对 β -葡萄糖苷酶的抑制作用较明显, 其他金属离子则对 β -葡萄糖苷酶的活性影响不明显 (图 10)。

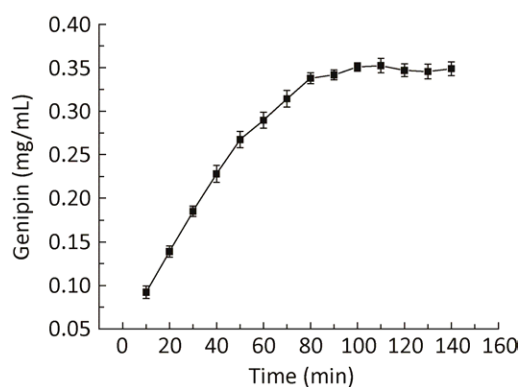


图 7 β -葡萄糖苷酶的反应时间进程

Fig. 7 Reaction time course of β -glucosidase.

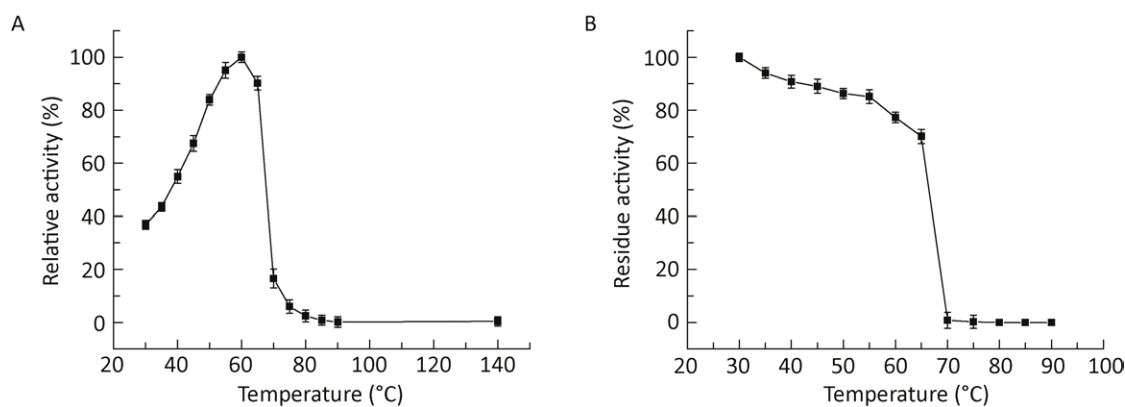


图 8 温度对 β -葡萄糖苷酶活性 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Fig. 8 Effects of temperature on activity (A) and stability (B) on β -glucosidase.

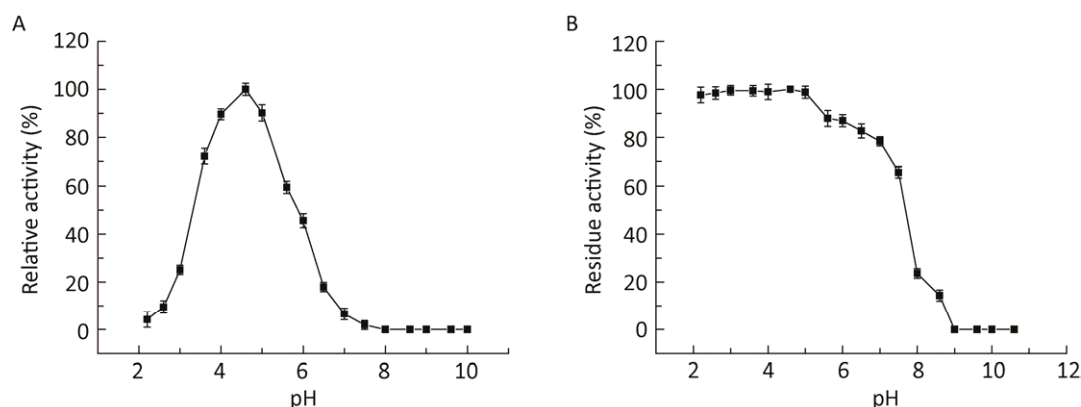


图 9 pH 对 β -葡萄糖苷酶活性 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Fig. 9 Effects of pH on activity (A) and stability (B) of β -glucosidase.

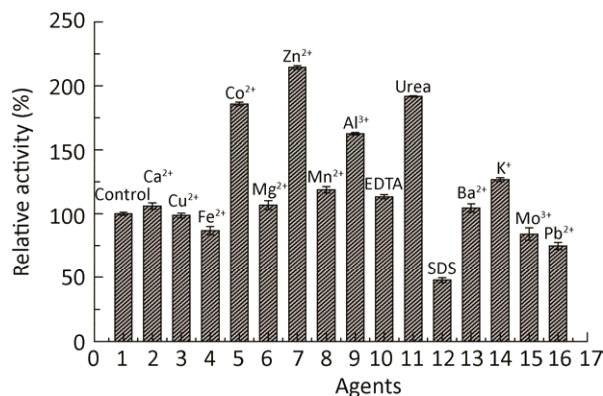


图 10 金属离子、尿素及 SDS 对 β -葡萄糖苷酶的影响

Fig. 10 Effects of some mental ions and agents on β -glucosidase hydrolyzing geniposide.

2.4.5 β -葡萄糖苷酶的动力学参数：通过 Michaelis-Menten 动力学参数双倒数曲线作图（图 11），计算动力学参数。该酶催化京尼平苷转化的

K_m 和 V_{max} 分别为 0.153mmol/L 和 0.382mmol/(L·min)，催化效率 (K_{cat}/K_m) 为 1.02×10^7 L/(mol·s)（表 2）。

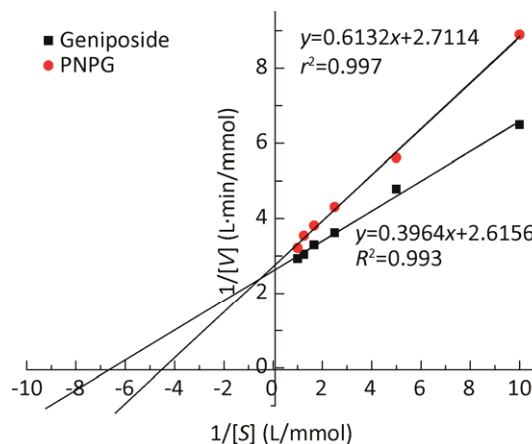


图 11 β -葡萄糖苷酶的双倒数曲线

Fig. 11 Lineweaver-Burk plot of β -glucosidase.

表 2 β -glucosidase 的动力学参数

Table 2 β -glucosidase kinetic parameters for hydrolysis of specific substrates

底物 Substrate	K_m (mmol/L)	V_{max} [mmol/(L·min)]	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m [L/(mol·s)]	数据来源 Data sources
京尼平苷 Geniposide	0.153	0.382	1 567	1.02×10^7	本研究 In this research
PNPG	0.226	0.369	1 508	6.67×10^6	本研究 In this research
京尼平苷 Geniposide	2.93	0.372	83	2.83×10^4	Gong <i>et al.</i> 2014
	13.0; 3.14	-	546; 326	4.28×10^4 ; 1.04×10^5	王剑锋等 2011 Wang <i>et al.</i> 2011

3 讨论

植物内生菌是存活于植物体内而不引起宿主植物发生病害的一类微生物。植物内生真菌生物多样性丰富，且其在适应植物内生特殊环境过程中需合成淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、漆酶、纤维素酶、果胶酶等水解酶，以保证其侵入植物组织并维持其生存，因此植物内生真菌成为亟待开发的生物催化资源宝库（Suryanarayanan *et al.* 2012）。由此我们推测，在植物内生菌中，筛选到高效、专一性酶

的可能性较大。本文以京尼平苷转化生成京尼平反应为对象，从实验室前期分离到的东乡野生稻内生真菌中随机挑选 10 株菌株，筛选其转化能力，结果发现 70% 的菌株都能转化京尼平苷，其中菌株 R57 的转化效率最高，最大转化率可达 98.7%。上述结果证实了我们的推测，进一步证明植物内生菌是筛选高效、专一性酶的资源宝库。

菌株 R57 经形态结合 ITS rDNA、18S rDNA 和 28S rDNA 序列分析方法，鉴定为爪哇正青霉 *E. javanicum* R57。迄今，已报道可转化京尼平苷的真

菌主要集中在曲霉属 *Aspergillus* sp.、木霉属 *Trichoderma* sp. 和青霉属 *Penicillium* sp. 等真菌, 而正青霉属 *Eupenicillium* sp. 转化京尼平苷此前未见报道。付岩帅等 (2011) 从土壤中分离出一株泡盛曲霉, 经诱变后生物转化京尼平苷, 其转化率可达 97.7%; 霍蕾等 (2008) 利用黑曲霉在常温中性条件下转化京尼平苷, 转化率可达 98%; 王永宏等 (2007) 筛选到一株青霉 MK-1, 其京尼平苷转化率为 95%; Dong *et al.* (2014) 用哈茨木霉生物转化栀子药材, 其京尼平苷的转化率为 97.8%。我们首次报道了植物内生真菌爪哇正青霉 *E. javanicum* R57 能高效转化京尼平苷生成京尼平, 其转化率高于现已报道的真菌。

β -葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的关键酶, 这类酶能将纤维二糖和一些苷类物质分解为葡萄糖和苷元。一般而言, 不同微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相对分子质量差异较大 (40–250kDa), 其酶学性质亦有较大差异, 最适反应温度一般在 35–65℃, 最适反应 pH 多在酸性范围内。本研究分离获得的菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶, 其相对分子质量为 81kDa, 最适反应温度 60℃, 在 65℃ 保温 1h 后仍保留 70.5% 的相对活力。现已报道的 β -葡萄糖苷酶, 除 Gong *et al.* (2014) 用黑曲霉诱变株 *A. niger* Au0847 分离出的 β -葡萄糖苷酶最适温度在 65℃ 外, 其余最适反应温度大都在 40–50℃ 之间, 这表明我们从野生株分离获得的 β -葡萄糖苷酶具有较高的最适反应温度和更好的热稳定性。与现已报道的 β -葡萄糖苷酶相同, 我们获得的 β -葡萄糖苷酶最适 pH 也偏酸性, 为 4.6。与已报道的 β -葡萄糖苷酶比活力相比, 菌株 R57 纯酶比活力为 206U/mg, 仅略低于黑曲霉突变株纯酶比活力 (236.75U/mg) (Gong *et al.* 2014)。菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶虽可同时水解京尼平苷和 PNPG, 但对京尼平苷具有更好的亲和性, 其 K_m 为 0.153mmol/L, 低于水解 PNPG 的 K_m 值。该 K_m 与 Gong *et al.* (2014)、王剑锋等 (2010) 分离的 β -

葡萄糖苷酶水解京尼平苷的 K_m 值相比均低, 说明本研究分离出的酶与京尼平苷结合所需的能量小, 更容易结合京尼平苷迅速水解为京尼平。此外, 我们获得的 β -葡萄糖苷酶对京尼平苷的最大反应速度 (V_{max}) 和催化效率 (K_{cat}/K_m) 更好, 分别为 0.382mmol/L·min 和 $1.02 \times 10^7 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ (表 2)。

一般而言, β -葡萄糖苷酶水解京尼平苷的活性易受激活剂的激活以及抑制剂的抑制。我们发现金属离子 K^+ 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Al^{3+} 对菌株 R57 的 β -葡萄糖苷酶有激活作用, Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mo^{2+} 则明显抑制 β -葡萄糖苷酶的活性, 而 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ba^{2+} 基本无影响。据文献报道, 来源不同的 β -葡萄糖苷酶激活剂和抑制剂亦有很大的不同; 王剑锋等 (2010)、Saibi & Gargouri (2011) 和 Gong *et al.* (2014) 分离获得的 β -葡萄糖苷酶, 其活性受到一定浓度 Fe^{2+} 的促进, 同时受到 Cu^{2+} 的抑制; 本研究获得的 β -葡萄糖苷酶则受 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 的激活, 受 Fe^{2+} 的抑制, 而 Cu^{2+} 基本无影响。低浓度变性剂 SDS 和尿素对 β -葡萄糖苷酶作用有很大不同, SDS 对酶有明显的抑制作用, 说明 SDS 导致酶蛋白变性。SDS 分子中疏水长链与酶蛋白分子内部的非极性基团, 而带负电荷的硫酸根可以与水作用, 使酶蛋白分子构象发生很大的变化。特别是寡相互作用聚酶蛋白的亚基解离并分别与 SDS 定量结合, 成为易溶于水的复合物, 使酶蛋白变性。而低浓度尿素对酶有显著的激活作用, 可能是由于酶蛋白的活性部位构象发生变化, 催化区域成为一种开放式的结构, 从而使酶活增加 (刘宇等 2016)。实验还表明, EDTA 对 β -葡萄糖苷酶无明显作用, 说明此酶不属于金属酶蛋白。

综上所述, 植物内生菌是生物催化剂的资源宝库, 是高效、专一性催化酶筛选值得关注的方向。我们筛选的东乡野生稻内生真菌爪哇正青霉 *E. javanicum* R57, 其 β -葡萄糖苷酶对京尼平苷的亲和力和极强, 催化活力和专一性总体优于现已报道的真菌酶, 有必要进一步开展研究。

[REFERENCES]

- Akao T, Kobashi K, Aburada M, 1994. Enzymic studies on animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(12): 1573-1576
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 25(1): 248-256
- Dong YS, Liu LP, Bao YM, Hao AY, Qin Y, Wen ZJ, Xiu ZI, 2014. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Chinese Journal of Catalysis*, 35(8): 1534-1546
- Fu CS, Lou HX, Zhang XS, 2004. Chemical constituents and pharmacological effects of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Foreign Medicine: Herbal Medicine*, 19(4): 152-156 (in Chinese)
- Fu T, Xiao Q, Tan J, He KZ, 2007. Protective effects of geniposide on acute alcoholic liver injury in rats. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 23(3): 25-27 (in Chinese)
- Fu YS, Zhang P, Chen C, 2011. Screening of *Aspergillus awamori* for the biosynthesis of genipin. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science)*, 38(3): 81-86 (in Chinese)
- Gong GH, Zheng ZM, Liu H, Wang L, Diao JS, Wang P, Zhao GH, 2014. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(6): 788-794
- Huo L, Su J, Shen J, 2008. Studies on the microbial transformation of geniposide. *Natural Product Research and Development*, 20(1): 70-73 (in Chinese)
- Jelly R, Patton ELT, Lennard C, Lewis SW, Lim KF, 2009. The detection of latent fingerprints on porous surfaces using amino acid sensitive reagents: a review. *Analytica Chimica Acta*, 652(1/2): 128-142
- Jeon WK, Hong HY, Kim BC, 2011. Genipin up-regulates home oxygenase-1 via P13-Kinase-JNK1/2-Nrf2 signaling pathway to enhance the anti-inflammatory capacity in RAW264.7 macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 512(2): 119-125
- Kim YS, Kim JJ, Cho KH, Jung WS, Moon SK, 2008. Biotransformation of ginsenoside Rb1, crocin, amygdalin, geniposide, puerarin, ginsenoside Re, hesperidin, poncirin, glycyrrhizin, and baicalin by human fecal microflora and its relation to cytotoxicity against tumor cells. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18(6): 1109-1114
- Koo HJ, Kim KH, Jung HJ, Park EH, 2005. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(3): 496-500
- Liu W, Li G, Hölscher C, Li L, 2015. Neuroprotective effects of geniposide from Alzheimer's disease pathology. *Reviews in the Neurosciences*, 26(4): 371-383
- Liu Y, Liu C, Liu SS, 2016. Effect of denaturants on the structure and enzyme activity of β -glucosidase from rubber seeds. *Modern Food Science and Technology*, 2016(12): 120-124+19 (in Chinese)
- Mikami M, Takikawa H, 2008. Effect of genipin on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *Hepatology Research*, 38(6): 614-621
- Muzzarelli RAA, 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1): 1-9
- Muzzarelli RAA, Mehtedi ME, Bottegoni C, Aquili A, Gigante A, 2015. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine Drugs*, 13(12): 7314-7338
- Nam KN, Choi YS, Jung HJ, Park JH, Park JM, Moon SK, Cho KH, Kang C, Kang I, Oh MS, Lee EH, 2010. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *International Immunopharmacology*, 10(4): 493-499
- Saibi W, Gargouri A, 2011. Purification and biochemical characterization of an atypical β -glucosidase from *Stachybotrys microspora*. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 72(3/4): 107-115
- Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Gopalan V, 2012. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*, 54: 19-30
- Takeuchi S, Goto T, Mikami KI, 2005. Genipin prevents

- fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of TNF- α production. *Hepatology Research*, 33(4): 298-305
- Wang H, Da LC, Xie Y, Xie HQ, 2013. Application of genipin for modification of natural biomaterials as a crosslinking. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 27(5): 580-585 (in Chinese)
- Wang JF, Chen JZ, Liang HZ, Rao J, Li J, 2010. Purification and characterization of geniposide-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Mycosystema*, 29(5): 683-690 (in Chinese)
- Wang Y, Yan YM, Zeng QG, Zhang ZB, Wang D, Zhu D, 2011. Producing huperzine A by an endophytic fungus from *Huperzia serrata*. *Mycosystema*, 30(2): 255-262 (in Chinese)
- Wang YH, Su J, Shen J, Chen TL, Sun QL, 2007. Studies on the microbial transformation of geniposide in gordenia. *Lishizhen Medicine and Materia Medicine Research*, 18(12): 3003-3004 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 付田, 蒲蕾, 谭健, 何开泽, 2007. 梔子京尼平苷对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用. *中药药理与临床*, 23(3): 25-27
- 付岩帅, 张鹏, 陈畅, 2011. 发酵法生产京尼平菌株的筛选与培养. *北京化工大学学报*, 38(3): 81-86
- 傅春升, 娄红祥, 张学顺, 2004. 梔子的化学成分与药理作用. *国外医药·植物药分册*, 19(4): 152-156
- 霍蕾, 苏建, 沈竞, 陈铁林, 孙启玲, 2008. 京尼平苷的微生物转化研究. *天然产物研究与开发*, 20(1): 70-73
- 刘宇, 刘畅, 刘石生, 2016. 变性剂对橡胶籽中 β -葡萄糖苷酶结构及酶活的影响. *现代食品科技*, 2016(12): 120-124+19
- 汪涯, 颜曰明, 曾庆桂, 张志斌, 汪娣, 朱笃, 2011. 一株产石杉碱甲的蛇足石杉内生真菌的分离和鉴定. *菌物学报*, 30(2): 255-262
- 王昊, 笪琳萃, 谢艳, 解慧琪, 2013. 京尼平作为交联剂在天然生物材料改性中的应用. *中国修复重建外科杂志*, 27(5): 580-585
- 王剑锋, 陈今朝, 梁华正, 饶军, 李江, 2010. 黑曲霉水解京尼平苷 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质. *菌物学报*, 29(5): 683-690
- 王永宏, 苏建, 王建芳, 廖勇, 冯杉, 孙启玲, 2007. 梔子中京尼平苷的微生物转化研究. *时珍国医国药*, 18(12): 3003-3004

(本文责编: 韩丽)