



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104357332 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201410552706.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.10.17

C12N 1/14(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12P 33/00(2006.01)

申请公布号 CN 104357332 A

C12R 1/685(2006.01)

(43)申请公布日 2015.02.18

审查员 邵旭倩

(83)生物保藏信息

CCTCC No:M 2014398 2014.09.05

(73)专利权人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号

(72)发明人 梅建凤 金航 李靛 陈虹

应国清 王鸿 易喻

(74)专利代理机构 杭州天正专利事务有限公司

司 33201

代理人 黄美娟 李世玉

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

黑曲霉JH-2及在生物转化合成积雪草酸中应用

(57)摘要

本发明提供了一株糖苷酶产生菌——黑曲霉(*Aspergillus niger*)JH-2,及其在生物转化提高积雪草中积雪草酸含量应用;所述黑曲霉是发酵工业中常用菌种,无毒无害,使用安全,转化培养基成分简单,仅需5种盐类成分,生产成本低;黑曲霉JH-2生长迅速、抗杂菌能力强、容易培养,批次稳定;本发明以积雪草干粉为原料,投入到培养基中转化,既免去积雪草苷分离提取操作,也免去了酶的分离纯化步骤,工艺简单,易于工业化应用;积雪草粉经生物转化处理后,积雪草酸的含量最高可以提高3倍以上。

1. 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) JH-2, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 邮编: 430072, 保藏编号: CCTCC No: M2014398, 保藏日期 2014 年 9 月 5 日。

2. 一种权利要求 1 所述黑曲霉 JH-2 在生物转化合成积雪草酸中应用, 其特征在于所述的应用是以积雪草为原料, 以黑曲霉 JH-2 为酶源, 以发酵培养基为反应介质, 在 28~32℃ 进行微生物转化反应, 反应结束后, 过滤, 取滤饼干燥, 即获得富集积雪草酸的积雪草。

3. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述黑曲霉 JH-2 在接种发酵培养基前先经过活化和扩大培养, 所述活化和扩大培养方法为: (1) 活化培养: 将黑曲霉 JH-2 菌种接种于斜面培养基, 于 28℃ 培养 3 天, 获得斜面孢子菌体; 所述的斜面培养基为 PDA 培养基; (2) 种子扩大培养: 挑取步骤 (1) 活化培养后黑曲霉 JH-2 斜面孢子至种子培养基中, 于 30℃、200r/min 振荡条件下培养 2 天, 得到种子液; 所述种子培养基为 PDB 培养基。

4. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述发酵培养基组成为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4~6g/L、NaCl 3~5g/L、 KH_2PO_4 3~5g/L、 MgSO_4 0.5~1.0g/L、 MnSO_4 0.5~1.0g/L, 溶剂为去离子水, pH 4.0~6.0。

5. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述发酵培养基组成为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6g/L、NaCl 5g/L、 KH_2PO_4 5g/L、 MgSO_4 1.0g/L、 MnSO_4 1.0g/L, 溶剂为去离子水, pH 5.0。

6. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述转化反应的条件为: 在体积装液量 20~40%、28~32℃、200r/min 条件下培养 4~6 天。

7. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述积雪草的用量以发酵培养基体积计为 0.04~0.1g/mL。

8. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述积雪草在加入前先粉碎过 75 目筛, 再于 160℃ 干热灭菌 2h。

9. 如权利要求 2 所述的应用, 其特征在于所述滤饼干燥条件为 85℃ 干燥 24h。

黑曲霉JH-2及在生物转化合成积雪草酸中应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一株产糖苷酶的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 及其在生物转化提高积雪草中积雪草酸含量应用。

(二) 背景技术

[0002] 积雪草 [*Centella asiatica* (L.) Urb], 又名胡薄荷、连钱草、崩大碗、遍地香, 为伞形科积雪草属植物, 具有清热利湿, 解毒消肿之功效。我国民间常用于治疗感冒、扁桃体炎、传染性肝炎、痢疾、跌打损伤、疔疮肿毒、外伤出血等。积雪草中含有三萜皂苷和黄酮类物质, 其中起作用的药理成分主要是皂苷及其皂苷元类, 包括积雪草苷、积雪草酸、羟基积雪草苷和羟基积雪草酸等, 因此这些物质提取和纯化一直是中药积雪草现代化应用研究的重点。近年来的研究表明, 以积雪草酸和羟基积雪草酸等苷元出发, 合成一系列苷元衍生物的药理作用明显优于其原始皂苷, 可大大提高积雪草酸、羟基积雪草酸等苷元的利用率。

[0003] 积雪草中的积雪草苷和积雪草酸的含量, 因产地不同有很大差异, 我国产地的积雪草, 积雪草苷含量一般为0.17%~1.14%之间, 而积雪草酸含量大概只有0.1%左右。研究表明, 积雪草苷在人体十二指肠和结肠吸收较差, 在空肠和回肠段吸收略有提高, 积雪草苷在大肠部分转化为苷元后吸收则显著增加, 而积雪皂苷元可以直接被吸收进入动物血液中, 积雪草苷可在人的肠道中被一些微生物降解成积雪草酸, 发挥其药理作用, 但转化率相对较低, 大部分积雪草苷不能充分发挥其药理作用。采用化学或生物的方法, 可以将积雪草苷上的糖基水解, 从而转化为积雪草酸。常用化学方法是酸碱水解法, 但酸碱水解容易破坏积雪草苷的苷元的结构, 导致转化得率不高, 其工业化应用存在一定的困难。生物转化也可以实现这一转化反应, 由一种特异性的糖苷酶, 在温和的条件下, 便可专一性地水解积雪草苷上的葡萄糖残基, 得到积雪草酸。近些年来有报道采用微生物转化积雪草苷的粗提物, 可以取得较好的转化率, 但报道的方法都需要对积雪草苷进行粗提, 这就增加了工艺的复杂性。由此可见, 如直接以积雪草为原料, 利用微生物发酵法处理积雪草, 将其中的积雪草苷转化为积雪草酸, 积雪草酸的含量可大幅提高, 而且微生物分泌的酶对积雪草中的糖类物质降解, 也有利于积雪草酸的提取。经过转化处理的积雪草, 即可作为中药材应用于临床治疗, 疗效将显著提高; 也可以作为积雪草酸提取的原料。

(三) 发明内容

[0004] 本发明目的是提供一株糖苷酶产生菌——黑曲霉 (*Aspergillus niger*) JH-2, 及其在生物转化提高积雪草中积雪草酸含量的应用, 经转化处理的积雪草中, 积雪草酸的含量可以提高3倍以上, 工艺具有成本低、流程简单、转化率高等优点。

[0005] 本发明采用的技术方案是:

[0006] 本发明提供一株新菌株——黑曲霉 (*Aspergillus niger*) JH-2, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 邮编: 430072, 保藏编号: CCTCC No: M2014398, 保藏日期2014年9月5日。

[0007] 本发明所述黑曲霉JH-2,是从以积雪草粉为微生物来源的富集培养物中分离和筛选得到的优良菌株,本发明所述积雪草[Centella asiatica(L.)Urb],又名胡薄荷、连钱草、崩大碗、遍地香,为伞形科积雪草属植物,具有清热利湿,解毒消肿之功效,按照《中国药典》为伞科植物积雪草的干燥全草,夏、秋二季采收,除去泥沙,晒干。

[0008] 所述黑曲霉JH-2的菌落特征如下:在平板培养基上,30℃条件下培养3天,菌落初期为白色,后变成黄色直至黑褐色绒毛状,背面中央略带黄褐色。分生孢子头黑褐色放射状,顶囊球形,直径700~800μm,双层分生孢子小梗,长短不一。分生孢子褐色球形,直径2.5~4.0μm。

[0009] 所述黑曲霉JH-2的28s rRNA的部分核苷酸序列如下(SEQ ID NO:1所示):
GGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGAGTCCGCATTGTAA
TTTGCAGAGGATGCTTTGGGTGCGGCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCCTC
TTGGGCGGGTGTCCGTGCCGTGTAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTA
AATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGAGACGATAGCGACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGA
AAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCACCAGACTCGCCCGGGGTTTCAGCCGGC
ATTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTGGAATGTAGTA
CCCTCCGGGGTACCTTATAGCCAGGGGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGG
CATAATGGTCGTAAACG。

[0010] 本发明还涉及所述的黑曲霉(*Aspergillus niger*)JH-2在生物转化合成积雪草酸中的应用,用该菌株发酵处理积雪草粉,其中的积雪草酸的含量可以提高3倍以上,所述的应用是以中药材积雪草粉为原料,以黑曲霉JH-2为酶源,以发酵培养基为反应介质,在28~32℃进行微生物转化反应,反应结束后,过滤,取滤饼干燥,即获得积雪草酸含量提高3倍以上的积雪草。

[0011] 进一步,所述转化反应条件为:在体积装液量20~40%、28~32℃、200r/min条件下培养4~6天。

[0012] 进一步,所述积雪草的用量以发酵培养基体积计为0.04~0.1g/ml。

[0013] 进一步,所述积雪草在加入前先粉碎过75目筛,再于160℃干热灭菌2h。

[0014] 进一步,所述滤饼干燥条件为85℃干燥24h。

[0015] 具体的,所述黑曲霉JH-2在生物转化合成积雪草酸中应用为:将黑曲霉JH-2菌种孢子或经过扩大培养的种子液接种至发酵培养基中,加入经粉碎过75目筛、160℃干热灭菌2h的积雪草粉,在体积装液量20%情况下于28~32℃、200r/min培养4~6天后,过滤除去培养基,滤饼经85℃、24h烘干即为富含积雪草酸的积雪草。

[0016] 本发明所述发酵培养基组成如下:(NH₄)₂SO₄4~6g/L,NaCl 3~5g/L,KH₂PO₄3~5g/L,MgSO₄0.5~1.0g/L,MnSO₄0.5~1.0g/L,pH 4.0~6.0。优选发酵培养基组成为:(NH₄)₂SO₄6g/L,NaCl 5g/L,KH₂PO₄5g/L,MgSO₄1.0g/L,MnSO₄1.0g/L,溶剂为去离子水,pH 5.0。

[0017] 所述黑曲霉JH-2菌株在转化培养前,通常需要先经斜面培养基活化培养,或再经过种子培养基扩大培养,然后用孢子或种子液接入发酵培养基进行生物转化,具体的,所述斜面活化、种子扩大培养及生物转化培养的方法如下:

[0018] (1)将黑曲霉JH-2菌种孢子接种于斜面培养基,于28~32℃恒温培养箱中培养3~5d,得到活化后的黑曲霉JH-2菌种;所述的斜面培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA培

培养基),其组成和配制方法为:马铃薯100~200g/L(马铃薯洗净去皮,切成小块,加5倍质量水煮沸20~30min,4层纱布过滤去除马铃薯块)、蔗糖10~20g/L、琼脂15~20g/L,溶剂为水,pH 4.0~6.0,高压蒸汽121℃灭菌15~20min。

[0019] (2)用接种环挑取步骤(1)活化培养后黑曲霉JH-2斜面孢子2环,接种至种子培养基中,于28~32℃、150~250r/min振荡条件下培养2~3天,得到种子液;所述的种子培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDB培养基),其组成和配制方法为:马铃薯100~200g/L(马铃薯洗净去皮,切成小块,加5倍质量水煮沸20~30min,4层纱布过滤去除马铃薯块)、蔗糖10~20g/L,溶剂为水,pH 4.0~6.0,高压蒸汽121℃灭菌15~20min。

[0020] (3)用接种环挑取步骤(1)活化培养后黑曲霉JH-2斜面孢子2环,或步骤(2)制备的种子液按5~10%的体积浓度接入发酵培养基,加入粉碎并过75目筛、经160℃干热灭菌2h的积雪草粉,在体积装液量20~40%的条件下于28~32℃、150~250r/min振荡条件下培养4~6天,过滤除去培养基,滤饼经85℃、24h烘干即为富含积雪草酸的积雪草。

[0021] 微生物有着非常强大的酶系和分解转化物质的能力,一些糖苷酶能将积雪草苷的葡萄糖残基水解而使其转化为积雪草酸。生物转化法比酸碱水解法更有专一性,不会对产物积雪草酸以及羟基积雪草酸的苷元结构造成破坏,具有转化率高、条件温和和工艺简单等优点。本发明直接以积雪草为原料,采用微生物发酵法处理积雪草粉,细胞产生的特异性糖苷酶将其中的积雪草苷转化为积雪草酸,从而提高了积雪草酸的含量,而且菌体产生的纤维素酶等水解酶,对积雪草中纤维素的降解,也有利于积雪草苷和积雪草酸的释放,可以提高有效成分的提取收率,降低药品的生产成本。

[0022] 本发明的有益效果主要体现在:(1)本发明提供一株新菌株--黑曲霉(*Aspergillus niger*) JH-2,黑曲霉是发酵工业中常用菌种,无毒无害,使用安全;(2)转化培养基成分简单,仅需5种盐类成分,生产成本低;(3)黑曲霉JH-2生长迅速、抗杂菌能力强、容易培养,批次稳定;(4)本发明以积雪草干粉为原料,投入到培养基中转化,既免去积雪草苷分离提取操作,也免去了酶的分离纯化步骤,工艺简单,易于工业化应用;(5)积雪草粉经生物转化处理后,积雪草酸的含量最高可以提高3倍以上。

(四)附图说明

[0023] 图1积雪草苷转化为积雪草酸的化学反应式;

[0024] 图2标准品积雪草苷和积雪草酸的HPLC图谱;

[0025] 图3未经生物转化处理的积雪草乙醇提取物HPLC图谱;

[0026] 图4经生物转化处理的积雪草乙醇提取物HPLC图谱。

(五)具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0028] 实施例1:转化微生物菌株的富集和分离

[0029] 250mL三角瓶中加入约10g未经干热灭菌中药材积雪草粉(市售),加10mL无菌水,搅拌均匀,置于28℃的恒温箱培养5d,进行将积雪草苷转化微生物菌株的富集培养,富集培养至积雪草粉上长满霉菌。

[0030] 将长满霉菌的富集培养物用无菌水稀释后涂布于平板培养基上,于28℃的生化培养箱中培养2d,挑取形态和颜色不同的霉菌菌落转接斜面培养基上,置于28℃恒温培养3d,获得孢子丰富的斜面菌株12株,分别编号为JH-1~JH-12,保藏于4℃冰箱中备用。

[0031] 所述的平板培养基和斜面培养基均为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),按如下组成和方法配制:马铃薯洗净去皮切成小块,称取200 g,加自来水1000mL,煮沸30min,4层纱布过滤去除马铃薯块,滤液补足到1000mL,再加入蔗糖20g、琼脂18g,pH自然(实测6.5),加热琼脂溶化后分装试管或于三角瓶中,经高压蒸汽121℃灭菌20min后搁置斜面或倒入无菌培养皿。

[0032] 实施例2:转化微生物菌株的筛选

[0033] 积雪草粉预处理:积雪草粉粉碎过75目筛,然后在160℃干热灭菌2h。

[0034] 用接种环分别挑取实施例1获得的各个菌株斜面菌种的孢子2环,接入20mL转化培养基中(50mL三角瓶装),加入1g的预处理后的积雪草粉,于30℃、200r/min振荡条件下发酵培养6d后,用布氏漏斗抽滤,滤纸上的积雪草粉及菌体于85℃烘干24h,烘干后,将所有干物质置于50mL三角瓶中,加入20mL的体积浓度95%乙醇水溶液,静置提取1h,然后在25℃、100KHz超声条件下提取1h。提取完成后,抽滤,得乙醇提取液,用0.45μm微孔滤膜过滤,滤液进行HPLC法分析。以不接种菌种孢子,但加入积雪草粉,在相同条件下培养后获得的积雪草粉的乙醇提取液作为对照。

[0035] HPLC法分析未经生物转化处理和经生物转化处理的积雪草中积雪草酸的含量,由此比较不同菌株转化积雪草苷为积雪草酸的能力大小,经过比较,一个编号为JH-2的菌株转化处理积雪草后,积雪草酸含量提高的幅度最大,积雪草酸含量达到1.12mg/g,较未经转化样品时的0.90mg/g的1.24倍。

[0036] JH-2菌株在平板培养基上,30℃条件下培养3天,菌落初期为白色,后变成黄色直至黑褐色绒毛状,背面中央略带黄褐色。分生孢子头黑褐色放射状,顶囊球形,直径700~800μm,双层分生孢子小梗,长短不一。分生孢子褐色球形,直径2.5~4.0μm,这些性状均符合曲霉属(*Aspergillus*)的菌种的特征。该菌株交由生工生物工程(上海)有限公司进行28S rDNA测序,测得序列大小为556bp(核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示)。将该序列在GenBank上进行BLAST比对,与50株黑曲霉菌株的28S rDNA序列有99%以上的相似度。综合JH-2菌株的形态特征和28S rDNA的序列分析,可以确定JH-2菌株为黑曲霉,命名为黑曲霉(*Aspergillus niger*) JH-2,该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号CCTCC M 2014398,保藏日期:2014年9月5日。

[0037] 所述的发酵培养基按如下组成配制:蔗糖10g/L,蛋白胨10g/L,NaCl5g/L,KH₂PO₄5g/L,MgSO₄1g/L,MnSO₄1g/L,溶剂为水,pH自然(实测值为6.5)。

[0038] HPLC分析比较表明,经干热灭菌的积雪草粉中,积雪草苷和积雪草酸的含量无显著性降低。

[0039] 所述的HPLC分析条件为:LC-20AD高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司),色谱柱为Phenomenex Luna C18键合硅胶柱(5μm,250mm×4.6mm),柱温25℃;流动相为乙腈和水混合梯度洗脱(0-25min,95%-65%乙腈;26-50min,65%-0%乙腈;51-55min 0%乙腈);流速1mL/min,检测波长210nm,进样量20μL,由相同分析条件下的标准品积雪草酸质量浓度-峰面积标准曲线,计算出样品中的积雪草酸质量浓度,再计算出积雪草样品中积雪草酸的

含量。

[0040] 实施例3:黑曲霉JH-2菌株在提高积雪草中积雪草酸的含量中的应用1

[0041] 以实施例2筛选获得的黑曲霉JH-2为转化菌种,经种子扩大培养,转化处理积雪草,积雪草酸的含量提高的幅度与实施例2相当,表明该菌种转化积雪草的性能稳定,具体工艺步骤如下:

[0042] (1)将4℃冰箱中保藏的黑曲霉JH-2斜面菌种接种于新鲜斜面培养基,斜面于28℃生化培养箱中培养3天。所述的斜面培养基组成和制备方法同实施例1。

[0043] (2)用接种环挑取步骤(1)活化培养后黑曲霉JH-2孢子2环至种子培养基中,于30℃、200r/min振荡条件下培养2天,得到种子液。所述种子培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB),按如下组成和方法配制:马铃薯洗净去皮,切成小块,称取200g,加自来水1000mL煮沸30min,4层纱布过滤去除马铃薯块,滤液补足到1000mL,再加入蔗糖20g,pH自然(实测6.5),250mL的三角瓶装50mL种子培养基,八层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌20min。

[0044] (3)步骤(2)种子液以5%的体积比(即1mL)接种至20mL发酵培养基,再加入1g经160℃干热灭菌2h的积雪草粉,于30℃、200r/min振荡条件下培养6天。所述的发酵培养基组成如下:蔗糖10g/L,蛋白胨10g/L,NaCl 3g/L,KH₂PO₄3g/L,MgSO₄0.5g/L,MnSO₄0.5g/L,溶剂为水,pH自然(实测值为6.5),50mL的三角瓶装20mL转化培养基,八层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌20min。

[0045] (4)转化培养结束后,培养物用布氏漏斗抽滤,滤纸上的积雪草粉以及菌体混合物于85℃烘箱中烘干24h,烘干物即为经转化处理的积雪草粉。同样条件下,以未经转化处理的积雪草粉(即原料积雪草粉)为对照,采用实施例2所述方法及条件对处理后的积雪草粉进行HPLC分析。

[0046] HPLC分析表明,按本实施例方法,黑曲霉JH-2转化处理的积雪草中,积雪草酸的含量为1.14mg/g,是未转化处理时0.90mg/g的1.27倍,3批次实验结果无显著性差异,表明JH-2菌株转化积雪草为积雪草酸的发酵性能稳定。

[0047] 实施例4:黑曲霉JH-2菌株在提高积雪草中积雪草酸的含量中的应用2

[0048] 以黑曲霉JH-2为产酶菌种,经过转化培养基组成和初始pH优化后,转化处理积雪草,积雪草酸的含量较实施例3有显著提高,具体工艺步骤如下:

[0049] (1)将4℃冰箱中保藏的黑曲霉JH-2斜面菌种接种于新鲜斜面培养基,斜面于28℃生化培养箱中培养3天。所述的斜面培养基组成和制备方法同实施例1。

[0050] (2)用接种环挑取步骤(1)活化培养后黑曲霉JH-2孢子2环至种子培养基中,于30℃、200r/min振荡条件下培养2天,得到种子液。所述种子培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB),其组成和制备方法同实施例3。

[0051] (3)步骤(2)种子液以5%的体积比(即1mL)接种至20mL发酵培养基,再加入1g经160℃干热灭菌2h的积雪草粉,于30℃、200r/min振荡条件下培养6天。所述的发酵培养基组成如下:(NH₄)₂SO₄6g/L,NaCl 5g/L,KH₂PO₄5g/L,MgSO₄1g/L,MnSO₄1g/L,pH 5.0,50mL的三角瓶装20mL转化培养基,八层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌20min。

[0052] (4)转化培养结束后,培养物用布氏漏斗抽滤,滤纸上的积雪草粉和菌体混合物于85℃烘箱中烘干24h,烘干物即为经转化处理的积雪草粉。同样条件下,以未经转化处理的积雪草粉(即原料积雪草粉)为对照,采用实施例2所述方法及条件对处理后的积雪草粉进

行HPLC分析。

[0053] HPLC分析表明,按本实施例方法,经黑曲霉JH-2转化处理的积雪草中,积雪草酸的含量为2.60mg/g,是未转化处理时0.90mg/g的2.89倍。

[0054] 实施例5:黑曲霉JH-2菌株在提高积雪草中积雪草酸的含量中的应用3

[0055] 以黑曲霉JH-2为产酶菌种,在实施例4的基础上,优化了接种量、料液比和转化时间,转化处理积雪草,积雪草酸的含量较实施例4又有一定提高,具体工艺步骤如下:

[0056] (1) 将4℃冰箱中保藏的黑曲霉JH-2斜面菌种接种于新鲜斜面培养基,斜面于28℃生化培养箱中培养3天。所述的斜面培养基组成和制备方法同实施例1。

[0057] (2) 用接种环挑取步骤(1)活化培养后黑曲霉JH-2孢子2环至种子培养基中,于30℃、200r/min振荡条件下培养2天,得到种子液。所述种子培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB),其组成和制备方法同实施例3。

[0058] (3) 步骤(2)种子液以10%的体积比(即2.5mL)接种至25mL发酵培养基,再加入1g经160℃干热灭菌2h的积雪草粉,于30℃、200r/min振荡条件下培养5天。所述的发酵培养基组成同实施例4。

[0059] (4) 转化培养结束后,培养物用布氏漏斗抽滤,滤纸上的积雪草粉和菌体混合物于85℃烘箱中烘干24h,烘干物即为经转化处理的积雪草粉。同样条件下,以未经转化处理的积雪草粉(即原料积雪草粉)为对照,采用实施例2所述方法及条件对处理后的积雪草粉进行HPLC分析。

[0060] HPLC分析表明,按本实施例方法,黑曲霉JH-2转化处理的积雪草中,积雪草酸的含量为2.73mg/g,是未转化处理时0.90mg/g的3.03倍。

说明书核苷酸和氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学
 <120> 黑曲霉 JH-2 及在生物转化合成积雪草酸中应用
 <130>
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 556
 <212> DNA
 <213> *Aspergillus niger*

[0001] <400> 1
 ggattgcctc agtaacggcg agtgaagcgg caagagctca aattfgaaag ctggctcctt 60
 cggagtcctc attgtaattt gcagaggatg ctttgggtgc ggccccgctc taagtgcctt 120
 ggaacgggcc gtcagagagg gtgagaatcc cgtcttgggc gggtgtccgt gccgtgtaa 180
 gctccttcga cgagtcgagt tgtttgggaa tgcagctcta aatgggtggt aaatttcac 240
 taaagctaaa tactggccgg agacgatagc gcacaagtag agtgatcgaa agatgaaaag 300
 cactftgaaa agagagttaa acagcaectg aaattgttga aaggaagcg cttgcgacca 360
 gactcgcctc cggggctcag ccggcattcg tccgggtgta ctccccgtg ggcgggccag 420
 cgtcggtttg ggcggccggt caaaggcccc tggaatgtag taccctccgg ggtacctat 480
 agccaggggt gcaatgcggc cagcctggac cgaggaacgc gcttcggcac ggacgtggc 540
 ataatggtcg taaacg 556

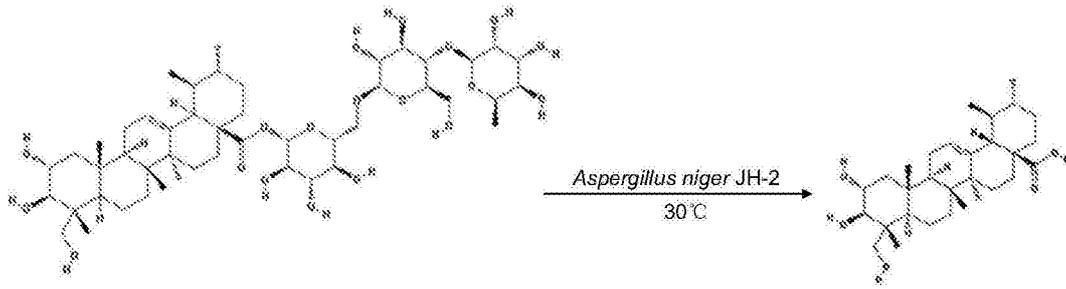


图1

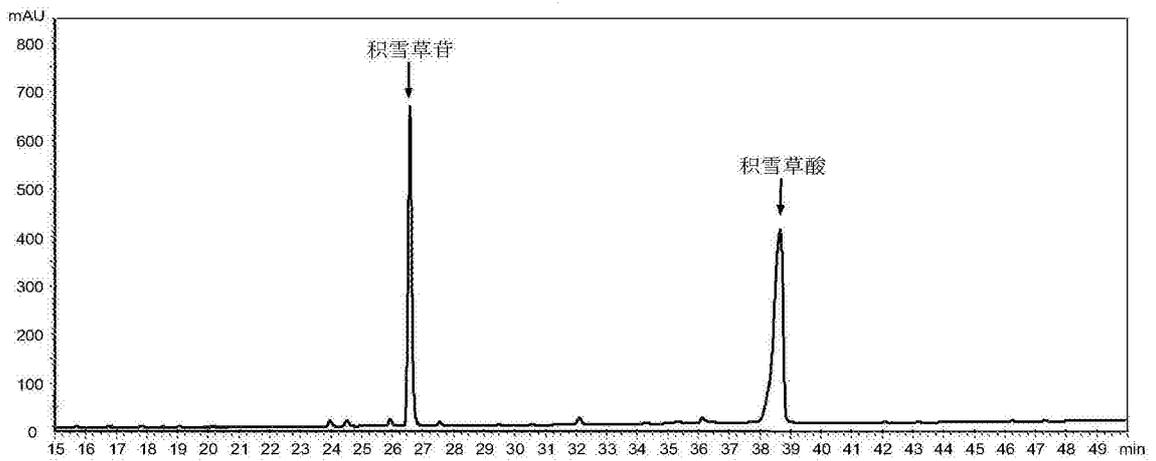


图2

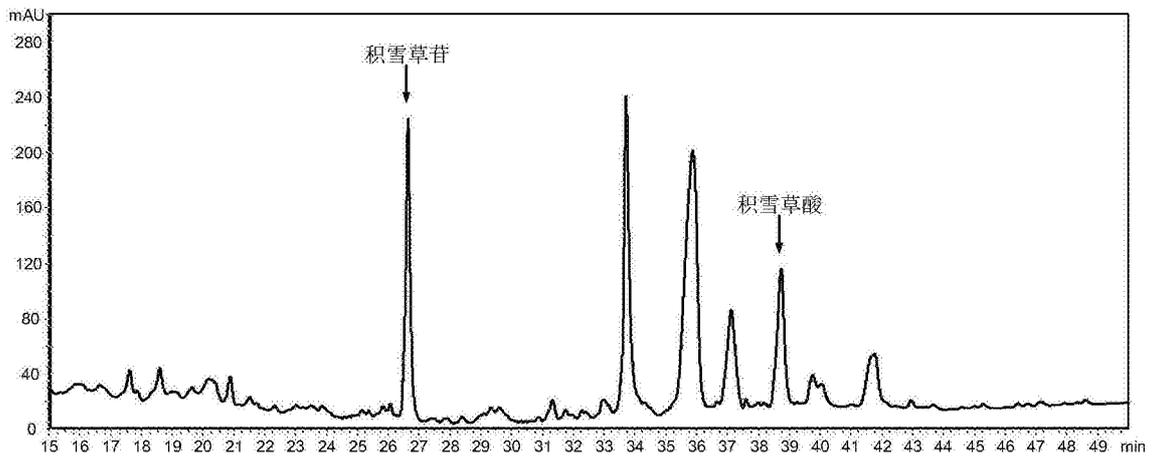


图3

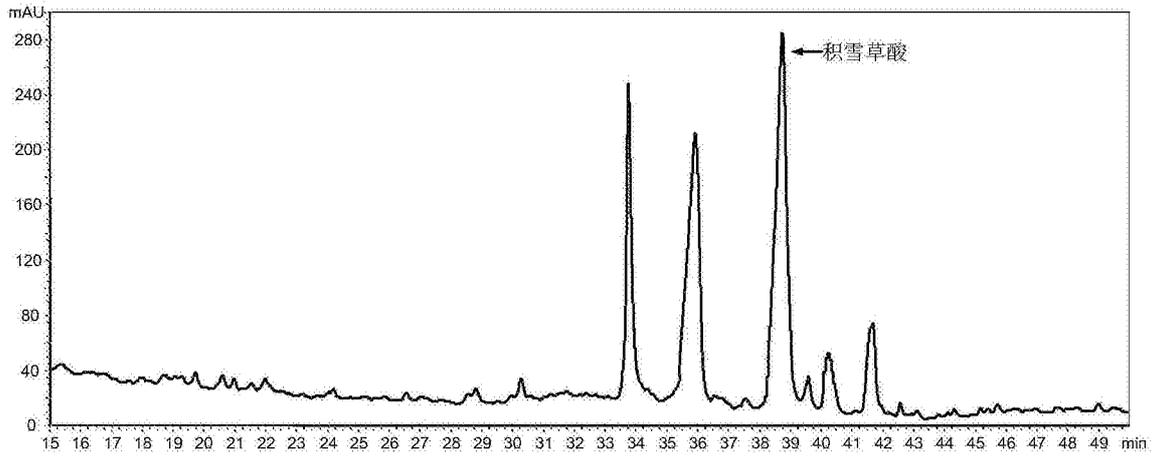


图4