

微生物法转化丁香酚产松柏醛

张慧, 郑璞*, 陈鹏程

(江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 以丁香酚为底物, 对实验室筛选的能降解丁香酚的 141 株菌进行转化试验, 转化液进行高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测分析, 确定其中 1 株赤霉菌 ZH-34 能转化丁香酚积累松柏醛。对发酵培养条件进行初步优化, 得出发酵培养条件为酵母膏 3 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 摇瓶装液量为 70 mL/500 mL, 底物浓度为 1 g/L, 在该底物浓度下能转化丁香酚获得 1.02 g/L 的松柏醛, 摩尔转化率为 94.4%; 间歇添加丁香酚转化 50 h, 可获得 3.76 g/L 松柏醛, 1.35 g/L 松柏醇和微量的香草醛。

关键词 丁香酚; 发酵培养优化; 松柏醛; 香草醛

微生物在合成香料物质中扮演着重要的角色, 目前微生物合成的香料物质主要是添加底物如丁香酚、异丁香酚、阿魏酸转化获得^[1]。丁香酚是丁香油的主要成分, 从丁香 (*Syzygium aromaticum*) 植物中提取获得^[2], 来源较广, 价格便宜 (目前市场价格是 5 \$/kg), 其通过微生物转化获得的产物有松柏醇、松柏醛、阿魏酸、香草醛、香草酸、原儿茶酸等^[3]。目前, 国外有用丁香酚作为底物, 由微生物合成相关产物的报道, 降解丁香酚获得相应产物菌株有 *Corynebacterium* sp.^[4], *Pseudomonas resinovorans* SPRI^[5], *Pseudomonas* sp.^[6], *Byssoschlamys fulva* V107^[7], *Pseudomonas fluorescens* E118^[8], *Pseudomonas nitroreducens* Jn1^[2], *Bacillus cereus* strain PN24^[9], *Geobacillus* sp. AY 946034^[10]。

松柏醛 (coniferyl aldehyde), 又称阿魏醛, 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$, 不易溶于水, 纯品为淡黄粉末, 主要存在于针叶植物木质素中, 为生物合成木质素的中间体, 化学合成法主要有香草醛与乙醛缩合法, 酸或碱分解木质素法; 松柏醛主要用作调香剂, 抗真菌剂; 前列腺素合成抑制剂, 且具有消肿作用。本研究以丁香酚作为底物, 对实验室筛选的能降解丁香酚的 141 株菌进行转化试验, 转化液进行分析后, 确定其中 1 株赤霉菌 ZH-34 能转化丁香酚积累较多的松柏醛。并对发酵培养条件进行了初步优化, 以期获得一种微生物转化丁香酚高产松柏醛的方法。

第一作者: 硕士研究生 (郑璞教授为通讯作者, E-mail: zhengpu@jiangnan.edu.cn)。

收稿日期: 2016-04-05, 改回日期: 2016-05-31

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂

菌株: 实验室筛选出的 141 株菌。

试剂: 松柏醛、松柏醇、阿魏酸、香草醛、香草酸, 色谱纯, 阿拉丁试剂有限公司; 丁香酚, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 北京百灵威科技有限公司; 实验所用培养基成分均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, 自然 pH;

种子培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 酵母膏 3, 自然 pH;

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, pH7.2。

1.1.3 主要仪器与设备

AIRTECH 超净工作台; 日立 L2000 高效液相色谱仪; HYL-C 组合式摇床; GI54DWS 立式压力蒸汽灭菌锅; GSP-9080MBE 恒温培养箱; Amethyst C_{18} -H 色谱柱; CPS4 电子天平; BCD-206DB 海尔冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 实验筛选菌株对丁香酚的转化

实验室筛选出的 141 株降解丁香酚的菌株分别转接到种子培养基中, 在 30 ℃、转速 110 r/min 的条件下, 培养 18~24 h 按 8% 的接种量转接到发酵培养基中, 相同条件下培养 20 h, 再添加 1 g/L 的丁香酚, 转化 18~24 h 后, 通过 HPLC 法分析转化结果。

1.2.2 摇瓶培养

斜面种子转接到种子培养基中,在 30℃,转速 110 r/min 下,培养 18~24 h 按 8% 的接种量转接到发酵培养基中,相同条件下培养 24~28 h,再添加 1 g/L 的丁香酚,转化 24~36 h, HPLC 检测转化结果。

1.2.3 发酵培养基氮源的确定

按 1.2.2 的方法,进行转化实验。分别以 2 g/L 的牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NH_4NO_3 、玉米浆作为发酵培养基的唯一氮源,确定最佳的氮源后,设 1、3、5、8、10 g/L 的氮源浓度梯度,确定最佳的氮源浓度。

1.2.4 发酵培养基碳源的确定

按 1.2.2 的方法,进行转化实验。按 1.2.3 确定的氮源,分别设 5 g/L 的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、甘油作为发酵培养基的唯一碳源,确定适合的碳源后,设 5、10、20、30、40、50 g/L 不同碳源浓度进行最佳浓度实验,确定最佳的碳源浓度。

1.2.5 装液量对菌株转化丁香酚产松柏醛的影响

按 1.2.2 的方法,进行转化实验。发酵培养基按 1.2.3 确定的氮源,1.2.4 确定的碳源,分别设 500 mL 摇瓶的装液量为 30、50、70、90、120 mL,添加 1 g/L 的丁香酚进行转化,确定摇瓶的最佳装液量。

1.2.6 底物浓度对菌体转化丁香酚产松柏醛的影响

按 1.2.2 的方法,进行转化实验。发酵培养基按 1.2.3 确定的氮源,1.2.4 确定的碳源,1.2.5 确定的装液量,分别设 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 的初始丁香酚浓度进行转化,每隔 5 h 取样检测,共转化 50 h,确定最佳的底物转化浓度。

1.2.7 间歇添加丁香酚产松柏醛方法

按 1.2.2 的方法,进行转化实验。发酵培养基按 1.2.3 确定的氮源,1.2.4 确定的碳源,1.2.5 确定的装液量,按 1.2.6 确定的底物浓度,首次添加丁香酚转化 6、14、22、30、38 h 分别添加 1 g/L 的丁香酚,添加之前取样检测,最后一次添加后的 12 h 和 22 h,分别取样检测转化结果。

1.3 HPLC 检测方法

发酵液 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进行 HPLC 检测,色谱柱:Amethyst C_{18} -H(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 反相色谱柱,检测波长 280 nm,柱温 30℃,流动相为 0.1% 的乙酸水溶液和乙腈,按表 1 进行梯度洗脱,进样量 20 μL 。

表 1 HPLC 梯度洗脱方法

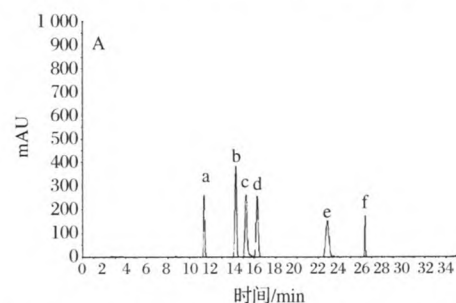
Table 1 HPLC gradient elution method

时间/min	乙腈/%	0.1% 乙酸/%	流速/(mL \cdot min $^{-1}$)
0~4	10	90	1.0
4~20	25	75	0.9
20~30	70	30	1.0
30~35	10	90	1.0

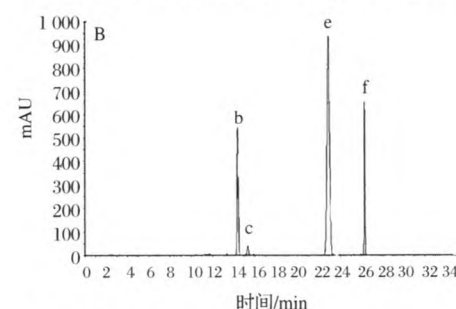
2 结果与分析

2.1 降解丁香酚菌株的转化结果

实验室筛出的 141 株降解丁香酚的菌株进行转化实验,转化液经 HPLC 检测分析(见图 1),除赤霉菌 ZH-34 菌株能积累产物外,其余菌株降解丁香酚生成的产物不均一旦含量少;根据转化液中分离组分和标样中物质保留时间的一致性,初步确定赤霉菌 ZH-34 菌株能够转化 1 g/L 丁香酚生成 0.28 g/L 松柏醇、0.66 g/L 松柏醛和微量的香草醛。



a-香草醛; b-松柏醇; c-香草醛; d-阿魏酸; e-松柏醛; f-丁香酚



保留时间b:14.32min; c:14.38min; e:22.85min; f:26.39min

图 1 混合标样(A)和转化液(B)的 HPLC 结果

Fig. 1 HPLC chromatograms of standards (A) and transformation liquid (B)

2.2 发酵培养基氮源的确定

酵母膏作为氮源明显优于其他氮源(见表 2),转化 1 g/L 的丁香酚生成 0.83 g/L 的松柏醛,故选酵母膏作为氮源;体系中随着酵母膏浓度的增加,松柏醛的量增加(见图 2),当酵母膏浓度大于 3 g/L 时,体系中松柏醛的量减少;副产物松柏醇和香草醛的量处

在较低的位置,受氮源浓度的影响不大。说明较高浓度的氮源,不利于产物松柏醛的积累,故采用 3 g/L 的酵母膏作为最佳的氮源浓度。

表 2 氮源对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Table 2 The effect of different nitrogen source on coniferyl aldehyde production for ZH-34

氮源	松柏醇/ (g · L ⁻¹)	松柏醛/ (g · L ⁻¹)	香草醛/ (g · L ⁻¹)	丁香酚/ (g · L ⁻¹)
牛肉膏	0.019	0.100	0.008	0.634
酵母膏	0.102	0.830	0.004	0.026
蛋白胨	0.071	0.600	0.005	0.021
NH ₄ Cl	0.005	0.003	0.003	0.628
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.000	0.001	0.001	0.642
KNO ₃	0.098	0.510	0.002	0.621
NH ₄ NO ₃	0.000	0.002	0.001	0.592
玉米浆	0.035	0.145	0.007	0.489

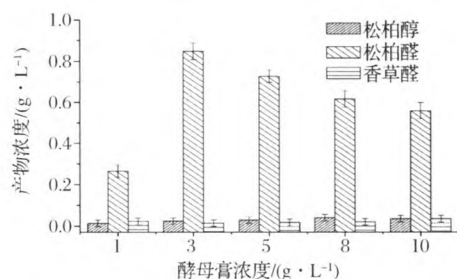


图 2 酵母膏浓度对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Fig. 2 The effect of yeast extract concentrations on coniferyl aldehyde production for ZH-34

2.3 发酵培养基碳源的确定

葡萄糖作为碳源时能转化 1 g/L 的丁香酚生成 0.84 g/L 的松柏醛,而麦芽糖、蔗糖、甘油、淀粉作为碳源也能转化丁香酚生成松柏醛,但产量明显低于葡萄糖作为碳源(表 3)。

表 3 碳源对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Table 3 The effect of different carbon sources on coniferyl aldehyde production for ZH-34

碳源	松柏醇/ (g · L ⁻¹)	松柏醛/ (g · L ⁻¹)	香草醛/ (g · L ⁻¹)	丁香酚/ (g · L ⁻¹)
葡萄糖	0.019	0.843	0.015	0.009
果糖	0.102	0.729	0.013	0.026
麦芽糖	0.071	0.687	0.034	0.037
蔗糖	0.035	0.401	0.016	0.051
淀粉	0.056	0.689	0.009	0.012
甘油	0.098	0.591	0.008	0.026

当使用葡萄糖作为碳源时,随着葡萄糖含量的增高,转化体系中松柏醛的量增高(见图 3),当葡萄糖

浓度高于 10 g/L 时,转化体系中的松柏醛和香草醛的量不增加反而呈明显减少趋势,说明高浓度的葡萄糖不利于菌体转化丁香酚生成产物,故选用 10 g/L 的葡萄糖作为最佳碳源浓度。

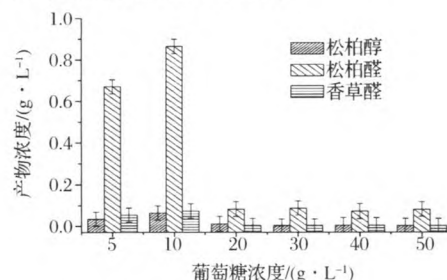


图 3 葡萄糖浓度对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Fig. 3 The effect of concentration of glucose on coniferyl aldehyde production for ZH-34

2.4 装液量对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

绝大多数微生物生长是需氧的过程,氧气对微生物的生长和代谢物的合成起着关键作用^[11]。当装液量为 30 mL 时,转化体系中积累少量的松柏醛(见图 4),推测装液量少时,摇瓶中具有足够的氧气,使菌体迅速降解丁香酚及其副产物,无法积累较高的产物。随着装液量的增加,转化体系中产物松柏醛的量增加,装液量 70 mL/500 mL 的体系转化 1 g/L 的丁香酚生成 0.91 g/L 的松柏醛,之后随着装液量的继续增加松柏醛的量开始减少,说明菌体在转化丁香酚是生成松柏醛的过程中需要适量的氧气。

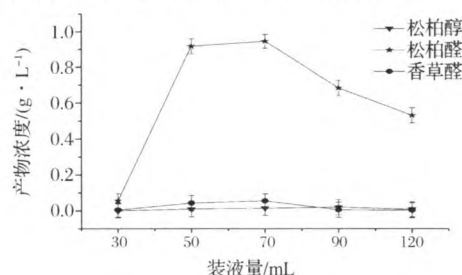


图 4 装液量对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Fig. 4 The effect of liquid volume on coniferyl aldehyde production for ZH-34

2.5 底物浓度对 ZH-34 丁香酚产松柏醛的影响

丁香酚为油状不溶于水的化合物,高浓度的丁香酚对细胞具有毒性,抑制细胞的生长和酶的活力。不同的浓度底物添加后,每隔 5 h 取样检测(结果见图 5)。当底物浓度为 0.5 g/L 时,转化 5 h 后,丁香酚已消耗完毕,生成 0.15 g/L 的松柏醛;转化 10 h 取样再次检测时,体系中只有微量的香草醛剩余。丁香酚浓度为 1、1.5、2、2.5 g/L 时,随着转化时间的延长松

柏醛的量不断增加,转化 50 h 生成松柏醛的浓度分别为 1.02、1.08、0.46、0.42 g/L,摩尔转化率为 94.4%、66.6%、21.3% 和 15.6%,故选最佳的底物浓度为 1 g/L。

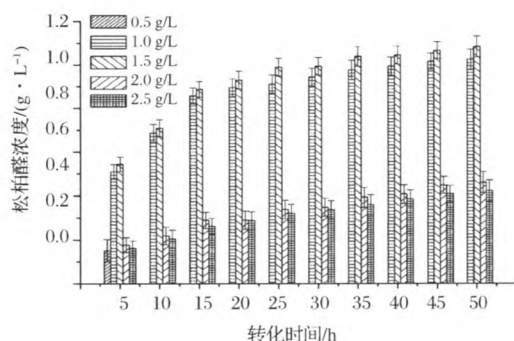


图5 底物浓度对 ZH-34 转化丁香酚产松柏醛的影响

Fig.5 The effect of substrate concentrations on coniferyl aldehyde production for ZH-34

2.6 间歇添加丁香酚产松柏醛

设初始底物浓度为 1 g/L,转化 6 h 后丁香酚已消耗完毕,随着转化时间的延长和底物丁香酚的添加,主要产物松柏醛的量不断增加(见图 6)。副产物松柏醇的量也随之增加(松柏醇是松柏醛的前体物质,在松柏醇脱氢酶的作用下生成松柏醛)。最后一次添加底物后继续转化 12 h,丁香酚消耗完全,生成 3.76 g/L 松柏醛,1.35 g/L 松柏醇和微量的香草醛,之后松柏醛和松柏醇的量开始减少,体系中开始有微量的香草醛积累。

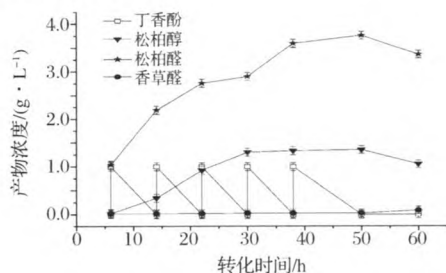


图6 Zh-34 流加丁香酚产松柏醛

Fig.6 Production of coniferyl aldehyde through feeding eugenol by the strain Zh-34

3 结论

通过对实验室筛出的 141 株降解丁香酚的菌株进行转化能力筛选,获得 1 株赤霉菌 ZH-34 能转化丁香酚生成松柏醛,并对菌株 ZH-34 转化丁香酚生成松柏醛的条件进行了初步优化,使得松柏醛的产量从 0.66 g/L 提高到了 1.02 g/L,在优化后的条件下进行

间接流加丁香酚实验,转化 60 h,可获得 3.76 g/L 松柏醛,1.35 g/L 松柏醇和微量的香草醛,获得了一种微生物转化丁香酚产松柏醛的新方法。

参考文献

- [1] KAUR B, CHAKRABORTY D. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013,169(4): 1 353 - 1 372.
- [2] UNNO T, KIM SJ, KANALY RA. Metabolic characterization of newly isolated *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 growing on eugenol and isoeugenol [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007,55(21): 8 556 - 8 561.
- [3] MISHRA S, SACHAN A, SACHAN SG. Production of natural value-added compounds: an insight into the eugenol biotransformation pathway [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013,40(6): 545 - 550.
- [4] TADAS K. Degradation of eugenol by microorganism [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977,41(6): 925 - 929.
- [5] ASHENGROPH M, NAHVLI I, ZARKESH-ESFAHANI H, et al. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid [J]. New Biotechnology, 2011,28(6): 656 - 664.
- [6] RABENHORST J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996,46(6): 470 - 474.
- [7] FURUKAWA H, WIESER M, MORITA H, et al. Synthesis of coniferyl alcohol by the *Byssoschlamys fulva* V107 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(6): 1 141 - 1 142.
- [8] FURUKAWA H, ZENNO S, IWASAWA Y, et al. Ferulic acid production from clove oil by *Pseudomonas fluorescens* E 118 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(4): 404 - 405.
- [9] KADAKOL JC, KAMANALI CM. Biodegradation of eugenol by *Bacillus cereus* strain PN24 [J]. E-Journal of Chemistry, 2010, S1: S474 - S480.
- [10] GIEDRAITYTE G, KALIEDIENE L. Biotransformation of eugenol via protocatechuic acid by *Thermophilic geobacillus* sp. AY 946034 strain [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014,24(4): 475 - 482.
- [11] WANG Xin-lin, ZHENG Pu, LIU Qiong. *Amycolatopsis* sp. 转化阿魏酸产香草醛 [J]. 工业微生物, 2013, 43(5): 33 - 37.

(下转第 90 页)

Structure and properties of type II collagen in chicken cartilage

WU Lei, ZHENG Juan², LIU Wen-tao², LI Guo-ying^{1,2*}

1(The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

2(National engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

ABSTRACT Type II collagen was extracted from chicken cartilage, and the structure and properties were examined. SDS-PAGE pattern showed that type II collagen consisted of only one α band and one β band, highly pure without other proteins, especially no band of type I collagen. Ultra violet spectrum (UV), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and circular dichroism spectrum (CD) revealed that the extracted type II collagen remained its completed secondary structures-triple helix structure. The thermal denaturation temperature was up to 40.2 °C by differential scanning calorimetry (DSC) for its high amino acid. Meanwhile, the isoelectric point of type II collagen is a weak acidic was 5.06 by Zeta potential method.

Key words chicken cartilage; Type II collagen; structure; properties

(上接第 85 页)

Degradation of eugenol into coniferyl aldehyde by *Gibberella* strain ZH-34

ZHANG Hui, ZHENG Pu*, CHEN Peng-cheng

(The key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT In this study, a *Gibberella* strain ZH-34 was isolated from 141 strains with the capability to degrade eugenol. Results showed that the optimal fermentation condition in flasks were 3 g/L of yeast extract, 10 g/L of glucose, 30 mL culture in a 500 mL flask and 1 g/L of substrate concentration. Under these conditions, 1.02 g/L of coniferyl aldehyde was obtained with a molar conversion of 94.4%. When the strain was applied to coniferyl aldehyde production from eugenol, 3.76 g/L of coniferyl aldehyde, 1.35 g/L of coniferyl alcohol and a trace amount of vanillin were produced with the intermittent addition of eugenol.

Key words eugenol; fermentation culture optimization; coniferyl aldehyde; vanillin