

彭芷芊, 曹婷, 范刚, 等. 圆柚酮生物转化菌种筛选及培养基组分优化[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 191-199.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.023

# 圆柚酮生物转化菌种筛选及培养基组分优化

彭芷芊<sup>1</sup>, 曹婷<sup>2</sup>, 范刚<sup>1</sup>, 李晓<sup>1</sup>, 任婧楠<sup>1</sup>, 张璐璐<sup>1</sup>

1. 华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430040

**摘要** 为筛选具有特定生物转化功能的菌株, 从柑橘果园取得土样, 以生长曲线及转化瓦伦西亚橘烯生成圆柚酮的产量为指标, 进行菌株的初筛和复筛。利用 SPME-GC-MS 技术, 对菌株转化瓦伦西亚橘烯生成的产物种类及含量进行测定与分析; 通过生理生化实验以及 16S rDNA 测序对所筛菌株进行菌种鉴定, 结果表明所筛菌株为伯克霍尔德菌属, 将其命名为 *Burkholderia* sp. PZQ14。在 LB 培养基的基础上, 以圆柚酮转化量为指标, 进行培养基成分单因素试验, 再通过响应面优化试验, 探讨培养基成分不同质量浓度组合对圆柚酮转化量的影响。结果表明, 最优培养基组分为: 葡萄糖 38 g/L, 蛋白胨 25 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.60 g/L。在此条件下进行验证试验, 圆柚酮转化量为 328.69 ± 17.88 mg/L, 转化率为 35.73% ± 1.24%, 相比 LB 培养基, 圆柚酮转化量提高了 251 mg/L。

**关键词** 菌种筛选; 瓦伦西亚橘烯; 圆柚酮; 生物转化; 伯克霍尔德菌; 响应面优化

**中图分类号** Q 93-331; O 629.6<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0191-09

圆柚酮((+)-nootkatone)是一种双环倍半萜酮, 是瓦伦西亚橘烯((+)-valencene)的同类衍生物。圆柚酮是柑橘类水果的典型香气物质, 具有非常低的气味阈值<sup>[1]</sup>, 有葡萄柚气味<sup>[2]</sup>, 因此被广泛应用于商业香精和香料领域<sup>[3]</sup>。圆柚酮除了商业用途外, 有多项研究证明其在医学防治<sup>[4]</sup>、驱虫防治<sup>[5]</sup>、抑菌<sup>[6]</sup>等方面也具有很高的价值。

圆柚酮在天然产物中含量很低, 而且分离提纯难度大, 提取成本大<sup>[7]</sup>。工业上常通过化学合成<sup>[8-10]</sup>的方法来生产圆柚酮。然而根据欧洲食品法规, 通过化学合成法得到的圆柚酮不能作为天然香料进行销售和使用, 这使得合成的圆柚酮在市场流通中受到限制<sup>[11]</sup>。采用生物合成法或生物转化法生产制备的圆柚酮被认为是天然的, 可以添加到食品、化妆品中。

目前已有多项研究利用真菌、细菌和生物酶等将前体物质瓦伦西亚橘烯生物转化生成圆柚酮, 但转化技术还有限制, 且圆柚酮产量较低。天然圆柚酮主要存在于柑橘类水果果皮提取物中, 推测柑橘果树土壤中有丰富的具有多种降解作用的菌株, 故本研究以柑橘果园土壤为样本, 旨在筛选出具有

圆柚酮高转化量的菌株, 为后续圆柚酮的工业化生产提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

菌种筛选自湖北省华中农业大学柑橘果园土样。

圆柚酮(>97.0%), 购于日本东京化成工业株式会社(TCI); 瓦伦西亚橘烯(>70.0%), 购于美国 Sigma 公司。

基础培养基: 6 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.50 g/L NaCl、3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 溶于 0.85% 生理盐水中。初筛培养基: 基础培养基 + 1% 瓦伦西亚橘烯 (0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 保存)。LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl, 溶于蒸馏水。

萃取纤维头 (50/30 μm DVB/CAR/PDMS)、固相微萃取头, 美国 Supelo 公司; 6890N/5975B 气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪, 美国 Agilent 公司; THZ-C-1 全温振荡器, 苏州培英实验设备有限公司; LDZX-50KBS 高压灭菌锅, 购自上海申安医疗器械厂。

收稿日期: 2021-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671824); 中央高校基本科研业务费专项(2662020SPPY002)

彭芷芊, E-mail: 1175856764@qq.com

通信作者: 范刚, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

## 1.2 圆柚酮标准曲线的绘制

准确称取 1 g 圆柚酮标准品,以无水乙醇为溶剂,分别配制终质量浓度为 100、150、200、300 mg/L 的圆柚酮标准溶液,于相同的 GC-MS 条件下测定圆柚酮峰面积,设置 3 次平行。

## 1.3 菌种筛选

取适量土样于灭菌生理盐水中混匀,接种于初筛培养基中,37 °C、120 r/min 下培养 2~7 d 后,稀释涂布分离菌株。

初筛:挑取单菌落接种于初筛培养基中,37 °C、200 r/min 下培养,每隔 12 h 测 1 次菌液 OD<sub>600</sub> 值,绘制菌株的生长曲线,选取生长良好的菌株进行下一步试验。

复筛:将初筛菌株转接至 LB 培养基中,于 37 °C、200 r/min 下培养,待菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.7 后添加 0.1% 瓦伦西亚橘烯,继续培养至 72 h,取培养 24、48、72 h 的发酵液进行 SPME-GC-MS 检测,测定产物圆柚酮的含量。

选择圆柚酮产量高的菌株活化后转接至 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 下培养,待菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.7 后添加 0.1% 瓦伦西亚橘烯,继续培养至 72 h,取培养 24、48、72 h 的发酵液进行 SPME-GC-MS 检测,对转化产物进行测定分析。

根据对转化产物的分析,最终选择圆柚酮转化率及产量最高的菌种进行菌种鉴定。

## 1.4 GC-MS 转化产物分析

顶空萃取条件、气相色谱-质谱条件及定性分析方法参照李晓等<sup>[12]</sup>。

定量分析:圆柚酮定量采用外标法,其他产物定量采用内标法,内标物质为环己酮。圆柚酮转化率及各挥发性产物质量浓度的计算公式如下:

$$\text{圆柚酮转化率} = \frac{\text{圆柚酮浓度}}{\text{瓦伦西亚橘烯浓度}} \times 100\%$$

$$\text{各挥发性产物质量浓度} = \frac{\text{各产物的峰面积} \times \text{内标物质量}}{\text{内标物峰面积} \times \text{样品量}}$$

## 1.5 菌种形态鉴定及生理生化指标测定

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>对菌株进行多项生理生化指标测定,包括氧化酶试验、淀粉水解、明胶液化、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、丙二酸盐、运动性试验、甲基红试验、V-P 试验等项目。

## 1.6 16S rDNA 的扩增和序列分析

提取细菌 DNA 后通过 PCR 技术扩增 16S rDNA,将 PCR 产物送武汉天一辉远生物科技有限公司测序。通过 NCBI 网站的 Blast 搜索获得

与筛选菌株同源性最接近的菌株核苷酸序列,用 MEGA-X 软件构建系统发育树。

## 1.7 单因素试验确定发酵培养基成分

1) 菌株在 LB 培养基中生长曲线的测定。将菌株接种于 LB 培养基中,设置 3 个平行,37 °C、200 r/min 振荡培养,每隔 4 h 取少量菌液测定 OD<sub>600</sub> 值,以无菌的 LB 培养基为空白对照,一直测定至 72 h,绘制菌株在 LB 培养基中的生长曲线。

2) 发酵培养基中碳源对转化效果的影响。基础培养基为 LB 培养基,分别以麦芽糖、葡萄糖、可溶性淀粉、β-环糊精、甘油、α-乳糖、蔗糖作为唯一碳源,设置质量浓度为 30 g/L,待菌株培养到对数生长期后,添加 0.1% 瓦伦西亚橘烯,转化 24 h,以圆柚酮转化量及转化率为指标,考察碳源种类对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响。

3) 发酵培养基中氮源对转化效果的影响。蛋白胨作为有机氮源,被广泛应用于微生物和动物细胞培养基中,对微生物的生长发育有着重要作用。分别以 20 g/L 的蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为单一氮源,考察氮源种类对转化效果的影响,转化条件同本文“1.7 2)”。

4) 发酵培养基中金属离子对转化效果的影响。无机盐不仅是生物体内酶或者辅酶的激活剂,而且在维持细胞结构和生物大分子稳定性方面也起着关键作用。分别添加 0.5 g/L 的 CaCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,考察无机盐对转化效果的影响,转化条件同本文“1.7 2)”。

## 1.8 响应面试验确定最佳发酵培养基组分

以单因素试验结果为基础,结合 Box-Behnken 试验设计原理,以圆柚酮转化量为响应值,考察葡萄糖(A)、蛋白胨(B)、Fe<sup>2+</sup>(C)不同浓度组合对响应值的影响。响应面试验设计因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 1 Code and level of independent variables used for Box-Behnken design				g/L
水平 Levels	因素 Factors			
	A 葡萄糖 Glucose	B 蛋白胨 Peptone	C FeSO <sub>4</sub>	
-1	20	15	0.4	
0	30	20	0.5	
1	40	25	0.6	

## 1.9 数据统计与分析

本试验所有测定重复 3 次,数据均以“平均值±

标准差”表示,采用 Excel 2019、Origin 2019 与 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行分析与绘图。用 SPSS 20.0 进行 ANOVA 单因素方差分析,采用 Duncan's 法检验数据的差异显著性。

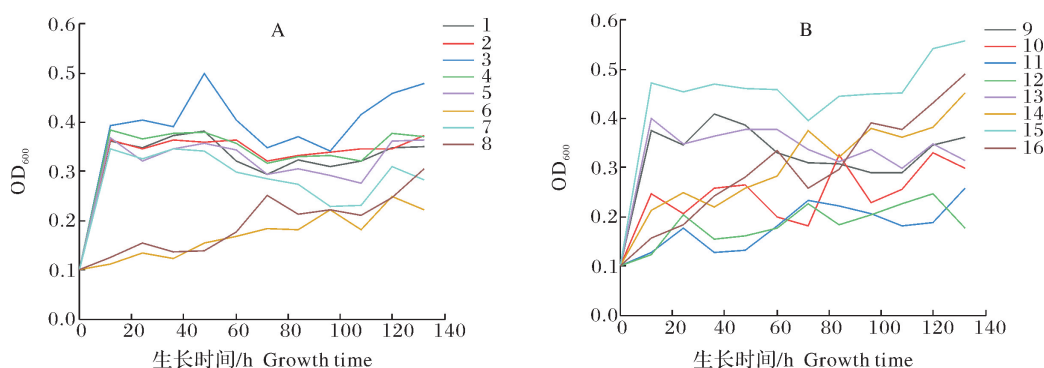
## 2 结果与分析

### 2.1 圆柚酮标准曲线及初筛菌株生长曲线的绘制

利用 GC-MS 测定不同浓度的圆柚酮峰面积,以圆柚酮浓度为横坐标,圆柚酮峰面积为纵坐标,绘制出标准曲线。利用 Excel 和 Origin 进行线性回归分析,所得的回归方程为  $y = 435876.89x -$

$3109148.40, R^2 > 0.99$ ,表明回归方程拟合度好,即该标准曲线可用于后续试验定量分析。

将土样的菌悬液在初筛培养基中培养 5 d,期间通过检测培养液的  $OD_{600}$  值来判断是否有菌生长。将培养液稀释涂布平板,从稀释比例为  $10^{-5}$  的平板中挑取了 16 个单菌落,分别在初筛培养基中培养,每隔 12 h 测培养液的  $OD_{600}$  值,绘制 16 个菌株的生长曲线。如图 1 所示,根据生长曲线,从中选出生长状况良好的菌株 1、2、3、4、5、9、13、14、15 进行下一步试验。



A: 菌株 1~8 的生长曲线; B: 菌株 9~16 的生长曲线。A: Growth curve of strains 1-8; B: Growth curve of strains 9-16.

图 1 分离出的 16 个菌株在初筛培养基中的生长曲线

Fig.1 Growth curve of 16 isolated strains in primary screening medium

### 2.2 复筛菌株转化生成圆柚酮产量的对比

将初筛选出的菌株进行富集培养,加入底物瓦伦西亚橘烯,利用 GC-MS 检测产物中圆柚酮的含量,并设置不接菌株仅加入底物的培养基作为空白对照。由图 2 可知,转化 24 h 时,转化生成圆柚酮产量较高的是菌株 3、14;转化 48 h 时,转化生成圆柚酮产量最高的是菌株 3、5、9、14;转化 72 h 时,转

化生成圆柚酮产量最高的是菌株 3、5、9、14。根据圆柚酮的产量,最后选择菌株 3、5、9、14 进行下一步试验。

### 2.3 菌株的 GC-MS 转化产物分析

对菌株 3、5、9、14 进行富集培养,待菌液的  $OD_{600}$  值达到 0.6~0.7 后,加入底物瓦伦西亚橘烯,再继续培养 72 h,并分别取培养 24、48、72 h 的发酵液,利用 GC-MS 对转化产物的种类及含量进行检测分析,其中圆柚酮作为目标产物,其含量是通过外标法计算,其他产物均采用内标法进行定量。结果如表 2 所示,这 4 株菌株生物转化的产物种类及含量大致相同,包括  $\alpha$ -松油醇、二氢香芹醇、(+)-二氢香芹酮、(+)-*p*-薄荷-1-烯-9-醇、芹子烯、 $\beta$ -紫罗酮、圆柚酮等 7 种物质,其保留指数 (RI) 分别为 1 101.44、1 105.81、1 114.19、1 203.96、1 382.14、1 387.61、1 705.19。

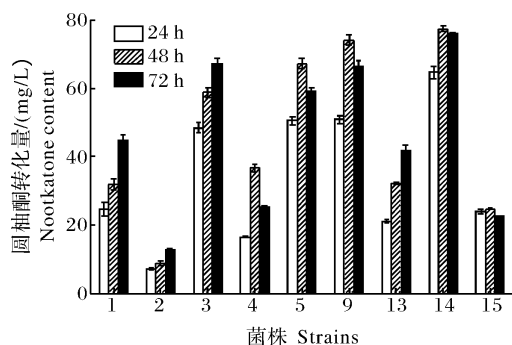


图 2 复筛菌株转化生成圆柚酮产量的比较

Fig.2 Comparison of the yield of nootkatone transformed by multiple screening strains

对于菌株 3,在最初的 24 h,主要产物有  $\alpha$ -松油醇、二氢香芹醇、(+)-二氢香芹酮、(+)-*p*-薄荷-1-

烯-9-醇、芹子烯、 $\beta$ -紫罗酮、圆柚酮,目标产物圆柚酮含量为  $48.40 \pm 9.43$  mg/L。转化 48 h 后,圆柚酮含量增加( $58.81 \pm 7.33$  mg/L);转化 72 h 后,圆柚酮含量继续增加( $67.17 \pm 1.64$  mg/L),其他大部分产物含量随着转化时间延长而减少。

对于菌株 5,在最初的 24 h,主要产物有  $\alpha$ -松油醇、(+)-二氢香芹酮、(+)-*p*-薄荷-1-烯-9-醇、芹子烯,目标产物圆柚酮含量为  $50.60 \pm 4.33$  mg/L。转化 48 h 后,圆柚酮含量增加( $67.29 \pm 5.07$  mg/L);转化 72 h 后,圆柚酮含量略有下降( $59.15 \pm 9.81$  mg/L)。每个时间段都没有检测出二氢香芹醇,且(+)-二氢香芹酮的含量相比菌株 3 检测出的更高,推测二氢香芹醇被完全氧化生成(+)-二氢香芹酮。

对于菌株 9,在最初的 24 h,主要产物有  $\alpha$ -松油

醇、(+)-二氢香芹酮、(+)-*p*-薄荷-1-烯-9-醇、芹子烯、 $\beta$ -紫罗酮、圆柚酮,目标产物圆柚酮含量为  $50.95 \pm 7.86$  mg/L。转化 48 h 后,圆柚酮含量增加( $74.24 \pm 8.80$  mg/L);转化 72 h 后,圆柚酮含量略有下降( $66.43 \pm 21.26$  mg/L),其他大部分产物含量随转化时间延长有所减少。

对于菌株 14,在最初的 24 h,主要产物有  $\alpha$ -松油醇、(+)-二氢香芹酮、(+)-*p*-薄荷-1-烯-9-醇、 $\beta$ -紫罗酮、圆柚酮,目标产物圆柚酮含量为  $64.77 \pm 3.08$  mg/L。转化 48 h 后,圆柚酮含量增加( $77.55 \pm 11.77$  mg/L);转化 72 h 后,圆柚酮含量略有下降( $76.03 \pm 7.16$  mg/L),含量趋于稳定,其他产物含量变化不大。

表 2 筛选所得菌株在 24、48、72 h 对瓦伦西亚橘烯的转化产物含量

Table 2 Concentration of valencene biotransformation products obtained during different periods (24 h, 48 h, 72 h) mg/L

菌株编号 Strains No.	时间/h Time	$\alpha$ -松油醇 $\alpha$ -Terpineol	二氢香芹醇 Dihydrocarveol	(+)-二氢香芹酮 (+)-Dihydrocarvone	(+)- <i>p</i> -薄荷-1-烯-9-醇 (+)- <i>p</i> -Menth-1-en-9-ol	芹子烯 Selinene	$\beta$ -紫罗酮 $\beta$ -Ionone	圆柚酮 Nootkatone
3	24	$1.67 \pm 0.19b$	$4.37 \pm 0.60b$	$0.81 \pm 0.39b$	$10.10 \pm 1.37b$	$1.91 \pm 0.56b$	$6.32 \pm 1.43b$	$48.40 \pm 9.43a$
	48	$3.37 \pm 0.48bc$	$3.56 \pm 0.49bc$	$0.55 \pm 0.06c$	$9.27 \pm 1.29b$	$3.44 \pm 0.50bc$	$6.49 \pm 1.53bc$	$58.81 \pm 7.33a$
	72	$1.89 \pm 1.18de$	$3.04 \pm 0.29d$	$0.46 \pm 0.02e$	$9.33 \pm 1.20b$	—	$6.05 \pm 0.20c$	$67.17 \pm 1.64a$
5	24	$5.71 \pm 1.87c$	—	$5.35 \pm 0.74c$	$11.82 \pm 0.22b$	$7.94 \pm 0.95bc$	—	$50.60 \pm 4.33a$
	48	—	—	$3.11 \pm 0.13c$	$9.86 \pm 1.33b$	$8.84 \pm 0.88b$	$6.63 \pm 2.00bc$	$67.29 \pm 5.07a$
	72	$1.24 \pm 0.80c$	—	$1.58 \pm 0.05c$	$8.41 \pm 1.89bc$	$16.95 \pm 4.31b$	—	$59.15 \pm 9.81a$
9	24	$3.32 \pm 2.63bc$	—	$4.27 \pm 0.18bc$	$9.58 \pm 0.82b$	$4.46 \pm 1.06bc$	$5.91 \pm 0.33bc$	$50.95 \pm 7.86a$
	48	$2.92 \pm 0.84cd$	—	$3.39 \pm 1.32cd$	$9.79 \pm 0.04bc$	$13.23 \pm 0.94b$	—	$74.24 \pm 8.80a$
	72	$1.98 \pm 0.72b$	—	$1.73 \pm 0.32b$	$8.85 \pm 2.88b$	—	—	$66.43 \pm 21.26a$
14	24	$5.32 \pm 1.19c$	—	$0.93 \pm 0.03d$	$8.66 \pm 0.23b$	—	$5.32 \pm 0.22c$	$64.77 \pm 3.08a$
	48	—	$3.32 \pm 0.54b$	$0.50 \pm 0.03b$	$8.32 \pm 1.74b$	$3.24 \pm 0.35b$	$5.74 \pm 0.95b$	$77.55 \pm 11.77a$
	72	$2.08 \pm 0.56bc$	$2.97 \pm 0.03bc$	$0.24 \pm 0.01c$	$8.93 \pm 0.86b$	$5.33 \pm 1.35bc$	$6.30 \pm 0.89bc$	$76.03 \pm 7.16a$

注:“—”表示未检出;同行不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。Note:“—” means not detected. Different lowercase letters in the same peer indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 菌株形态及生理生化特征鉴定

筛选所得的菌株为杆状,为革兰氏阴性菌,在平板上  $36^\circ\text{C}$  培养 24 h,菌落呈圆形光滑状、湿润、边缘整齐、淡黄色、易挑取,在液体培养基中呈浑浊。生理生化实验结果显示,氧化酶实验、明胶液化、葡萄糖、甘露醇和丙二酸盐项目为阳性,淀粉水解、麦芽糖、运动性实验、甲基红实验、V-P 实验项目为阴性,这些特征与伯克霍尔德菌属极为相似。

## 2.5 系统进化发育树的构建

经过 16S rDNA 序列分析,在 NCBI 网站上使用 Blast 比对,将获得菌株的 16S rDNA 序列进行

同源性比对,并构建菌株系统发育树。进化树结果(图 3)表明,筛选所得的菌株 PZQ14 为 *Burkholderia* sp.,属于伯克霍尔德菌属,将其命名为 *Burkholderia* sp. PZQ14。

## 2.6 单因素试验结果

以菌液的  $\text{OD}_{600}$  值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制了 *Burkholderia* sp. PZQ14 在 LB 培养基中的生长曲线,如图 4 所示。在  $37^\circ\text{C}$ 、200 r/min 的培养条件下,菌株在 4 h 进入对数生长期,24 h 进入稳定期,52 h 进入衰亡期。

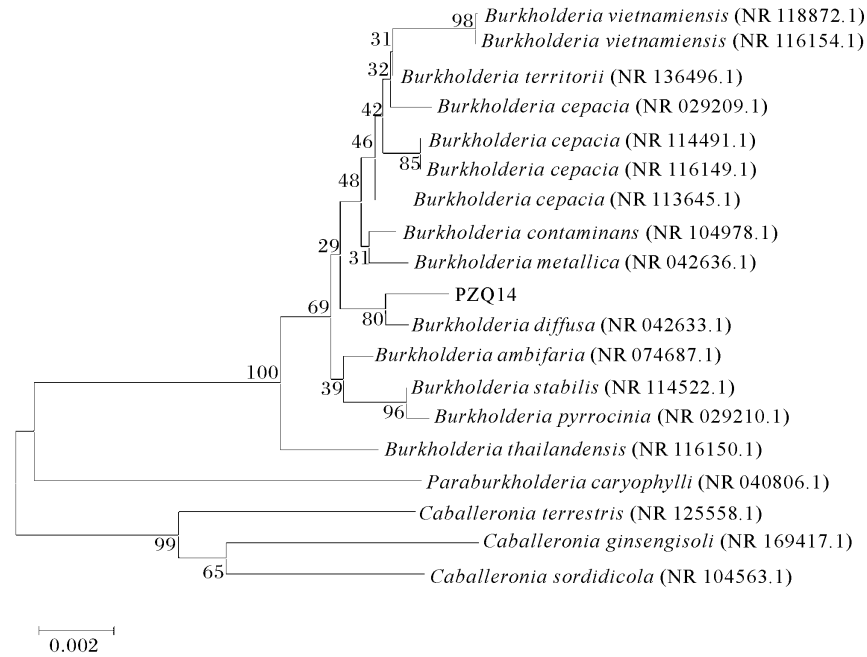


图 3 PZQ14 菌株和其他菌株之间关系的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain PZQ14 and other strains

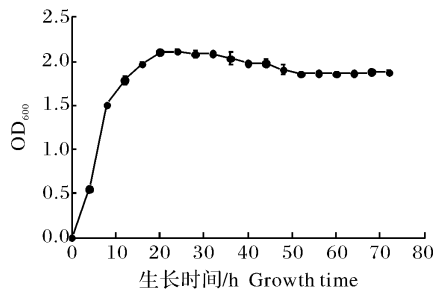


图 4 *Burkholderia* sp. PZQ14 在 LB 培养基中的生长曲线  
Fig.4 The growth curve of *Burkholderia* sp. PZQ14 in LB medium

不同碳源对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响如图 5 所示。由图 5 可见，不同碳源均能不同程度地促进生物转化生成圆柚酮，其中使用葡萄糖作为碳源时，生物转化生成圆柚酮的转化量最高，达到 101.89 mg/L，转化率达到 11.07%。因此，选择葡萄糖作为碳源。

不同氮源对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响如图 6 所示。本试验选取的 5 种氮源里，蛋白胨作为氮源时，生物转化生成圆柚酮的转化量最高，达到 251.60 mg/L，转化率为 27.35%，其他氮源的转化效果相差不大。因此，选择蛋白胨作为氮源。

不同金属离子对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响如图 7 所示。由图 7 可见，各金属离子的添加都会导致圆柚酮的产量有不同程度

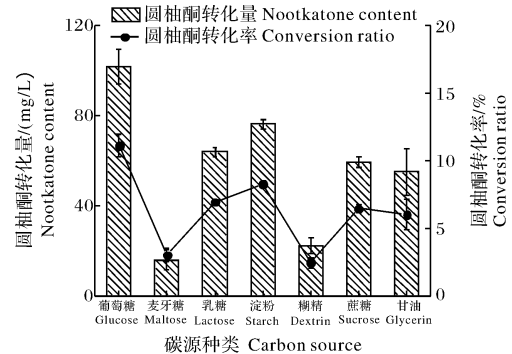


图 5 不同碳源对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响

Fig.5 Effect of different carbon sources on the conversion to nootkatone using *Burkholderia* sp. PZQ14

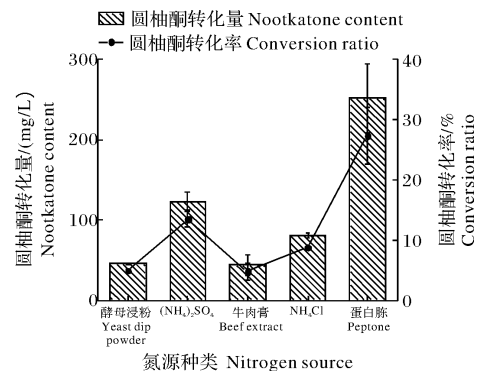


图 6 不同氮源对 *Burkholderia* sp. PZQ14 转化生成圆柚酮的影响

Fig.6 Effect of different nitrogen sources on the conversion to nootkatone using *Burkholderia* sp. PZQ14

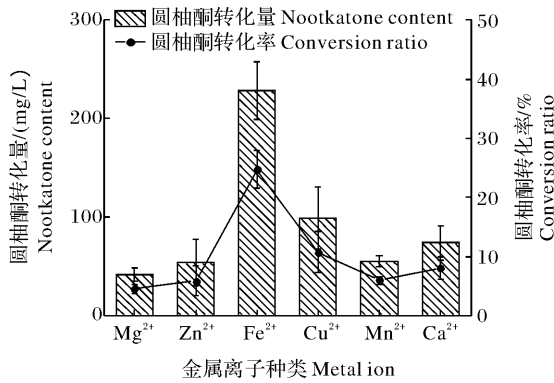


图 7 不同金属离子对 *Burkholderia* sp.

PZQ14 转化生成圆柚酮的影响

Fig.7 Effect of different metal ions on the conversion

to nootkatone using *Burkholderia* sp. PZQ14

的增加,尤其是 Fe<sup>2+</sup>,说明 Fe<sup>2+</sup> 的添加对于其转化具有明显的促进作用。因此,选择 Fe<sup>2+</sup> 添加到发酵培养基中。

### 2.7 响应面模型建立与显著性检验

响应面设计试验结果见表 3。将表 3 中的数据利用 Design-Expert 8.0 软件进行分析,建立葡萄糖(A)、蛋白胨(B)、Fe<sup>2+</sup>(C)与圆柚酮转化量(Y)的

回归模型如下:

$$Y = 117.56 + 11.05A - 20.10B + 13.65C - 8.22AB + 82.16AC - 5.35BC + 74.58A^2 + 86.72B^2 + 39.24C^2$$

表 3 响应面设计方案及结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results

试验编号 Test number	A	B	C	Y
1	40	20	0.6	370.20
2	20	20	0.4	356.88
3	20	25	0.5	282.21
4	20	15	0.5	309.72
5	40	15	0.5	371.95
6	30	20	0.5	119.36
7	30	15	0.4	276.56
8	30	20	0.5	117.35
9	30	20	0.5	113.80
10	20	20	0.6	207.48
11	40	20	0.4	190.97
12	30	20	0.5	106.33
13	40	25	0.5	311.57
14	30	20	0.5	130.97
15	30	25	0.4	250.80
16	30	25	0.6	279.76
17	30	15	0.6	326.94

表 4 响应面试验方差分析

Table 4 Analysis of variance for the Box-Behnken experiment

方差来源 Source of variance	自由度 Df	平方和 Sum of squares	均值 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	9	1.010×10 <sup>5</sup>	11 226.41	44.14	< 0.000 1	* *
A	1	976.87	976.87	3.84	0.090 9	
B	1	3 232.89	3 232.89	12.71	0.009 2	* *
C	1	1 489.94	1 489.94	5.86	0.046 1	*
AB	1	270.13	270.13	1.06	0.337 0	
AC	1	27 001.56	27 001.56	106.16	< 0.000 1	* *
BC	1	114.66	114.66	0.45	0.523 5	
A <sup>2</sup>	1	23 422.59	23 422.59	92.09	< 0.000 1	* *
B <sup>2</sup>	1	31 662.80	31 662.80	124.48	< 0.000 1	* *
C <sup>2</sup>	1	6 482.07	6 482.07	25.48	0.001 5	* *
剩余项 Residual	7	1 780.46	254.35			
失拟项 Lack of fit	3	1 457.15	485.72	6.01	0.057 9	不显著
纯误差 Pure error	4	323.31	80.83			
总和 Cor total	16	1.028×10 <sup>5</sup>				

$R^2=0.982 7$        $R^2_{Adj}=0.960 4$

注: \* 代表差异显著(P<0.05); \* \* 代表差异极显著(P<0.01)。Note: \* Significant difference (P<0.05); \* \* Extremely significant difference(P<0.01).

对模型进行方差分析,结果见表 4。由表 4 可见,回归模型极显著(P<0.000 1),失拟项不显著

(P=0.057 9>0.05),说明失拟因素不存在。根据回归方程系数(R<sup>2</sup>=0.982 7)可判断出,该模型与实

际情况具有较好的拟合度。 $P$ 值和 $F$ 值的大小在某种程度上可以作为判断各因素对响应值的影响作用强弱的参照,由此可得出影响圆柚酮转化量的强弱关系依次为:蛋白胨( $B$ ) $>$   $\text{FeSO}_4$ ( $C$ ) $>$ 葡萄糖( $A$ )。

根据模型得到的最佳培养基成分为:葡萄糖 37.64 g/L、蛋白胨 24.86 g/L、 $\text{FeSO}_4$  0.60 g/L,此条件下,圆柚酮转化量为 332.414 mg/L。参考实际操作,将优化后的培养基组分调整为:葡萄糖 38 g/L、蛋白胨 25 g/L、 $\text{FeSO}_4$  0.60 g/L,在此条件下进行 3 次验证试验,圆柚酮转化量为  $328.69 \pm 17.88$  mg/L,与预测值非常接近,说明该回归模型能较好预测培养基最佳成分,所得优化后的试验因素参数组合有较强的可行性。

### 3 讨论

已有研究报道瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮的过程分为两步,具体为:细胞色素 P450 酶区域选择性地催化瓦伦西亚橘烯烯丙基 C2-羟基化,产生中间产物顺式和反式-圆柚醇,随后这 2 种醇被非选择性醇脱氢酶(ADH)进一步氧化为圆柚酮<sup>[14]</sup>。

目前有多项研究利用细菌、真菌以及生物组织等将瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮。Palmerin-Carreno 等<sup>[15]</sup>利用解脂耶氏酵母 2.2ab 实现了瓦伦西亚橘烯到圆柚酮的生物转化,圆柚酮产量约为 773 mg/L,生物转化率和体积生产率达到 82.3%和 8.06 mg/(L·h),然而要运用到实际工业化生产还存在一定限制。利用生物酶进行生物转化具有高效性和专一性,Girhard 等<sup>[16]</sup>发现枯草芽孢杆菌的细胞色素 CYP109B1 能催化瓦伦西亚橘烯的氧化,生成圆柚醇和圆柚酮,并通过建立水-有机溶剂两相系统,使圆柚醇和圆柚酮产量达到 94 mg/L,占总产物的 97%。现有研究利用生物酶来生产圆柚酮的转化量及转化率都较低,本研究旨在筛选出圆柚酮高转化量的菌株,通过条件优化以及对转化机制的研究进一步提高圆柚酮的产量,为工业化生产圆柚酮提供理论基础。

研究首先测得菌株在基础培养基中的生长曲线,选取生长良好的菌株富集培养后加入底物瓦伦西亚橘烯转化 72 h,以测得圆柚酮的含量为指标,选取圆柚酮转化量高的菌株进行下一步试验。利用 SPME-GC-MS 技术,对筛选所得菌株转化瓦伦西亚橘烯生成的产物种类及含量进行测定与分析。对所

筛菌株进行菌种鉴定,确定其属于伯克霍尔德菌属,将其命名为 *Burkholderia* sp. PZQ14。本研究以前体物质瓦伦西亚橘烯作为唯一碳源,初筛过程中即可以去掉不符合要求的菌株,大大缩短了菌种筛选的工作量;随后再以圆柚酮产量为指标,缩小筛选范围。这种菌种筛选方式具有高度专一性,快速高效,工作量小,提高了筛菌效率。

随后通过单因素试验,确定了生物转化培养基碳源、氮源及金属离子种类。对于碳源,试验结果显示,葡萄糖作为碳源时对转化生成圆柚酮具有更明显的促进作用。李纪顺等<sup>[17]</sup>采用均匀设计试验探讨了不同碳源对越南伯克霍尔德氏菌 B418 生长的影响,结果也显示葡萄糖对菌株生长的影响最大。对于氮源,试验结果选择了蛋白胨作为最佳氮源,这与林仙菊等<sup>[18]</sup>的试验结果相符。同时,在研究不同金属离子种类对生物转化效率的影响时发现,添加  $\text{Fe}^{2+}$  相比于添加  $\text{Mg}^{2+}$ ,圆柚酮的转化量提高了 186 mg/L,这可能是因为在瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮这一代谢过程中,细胞色素 P450 酶是起主要作用的,而 CYP450 酶系的成员都含有铁血红素和半胱氨酸组合的活性中心<sup>[19]</sup>,因此  $\text{Fe}^{2+}$  的添加对其转化具有显著的促进作用。此试验结果也从侧面证明,*Burkholderia* sp. PZQ14 中含有的细胞色素 P450 酶可能对瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮起到了关键作用。

在单因素试验的基础上进行响应面优化试验,确定最佳培养基组分为:38 g/L 葡萄糖、25 g/L 蛋白胨、0.60 g/L  $\text{FeSO}_4$ ,在此条件下进行 3 次验证试验,圆柚酮转化量为  $328.69 \pm 17.88$  mg/L,相比 LB 培养基,圆柚酮转化量提高了 251 mg/L,与 Girhard 等<sup>[16]</sup>所得到的 94 mg/L 的圆柚酮产量相比,提高了 234.69 mg/L。另外,菌株生物转化生成圆柚酮的转化效率还受多种因素影响,包括添加底物的时间、底物浓度、转化时间、助溶剂种类及浓度、培养温度和转速等,后续还可以对这些转化条件进行优化,以进一步提高圆柚酮的产量。

伯克霍尔德菌属是一种广泛存在于水、土壤、植物和人体中的革兰氏阴性细菌,已有多项研究证明该菌属表现出多种酶活性。Wu 等<sup>[20]</sup>研究发现菌株 *Burkholderia cepacia* GS3C 中的细胞色素 P450 单加氧酶对十六烷生物降解活性具有显著的促进作用;Matsuda 等<sup>[21]</sup>从热带泥炭分离出 1 株 *Burkholderia* sp. KTC-1,该菌在酸性条件下以(+)-儿

茶素为唯一碳源生长,并通过菌体中(+)-儿茶素羟化酶和青花素脱氢酶的作用,将(+)-儿茶素生物转化为花旗松素。而本研究则利用伯克霍尔德菌属,实现了瓦伦西亚橘烯到圆柚酮的生物转化,也为伯克霍尔德菌属生物催化功能研究提供了参考。

后续可以对 *Burkholderia* sp. PZQ14 的基因组进行测序,通过基因组注释与分析,了解菌株的生物学特性,并筛选可能参与瓦伦西亚橘烯代谢的相关基因,再对其基因功能进行研究。此外,还可以对瓦伦西亚橘烯生物转化过程中起关键作用的酶进行分离纯化,为了解圆柚酮的生物合成及其相关酶的研究提供新的途径。

## 参考文献 References

- [1] FRAATZ M A, RIEMER S J L, STÖBER R, et al. A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone[J]. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 2009, 61(3/4): 202-207.
- [2] BERRY R E, WAGNER C J, MOSHONAS M G. Flavor studies of nootkatone in grapefruit juice[J]. *Journal of food science*, 1967, 32(1): 75-78.
- [3] DAVIES K M, DEROLE S C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2014, 26: 133-140.
- [4] BEZERRA RODRIGUES DANTAS L, SILVA A L M, DA SILVA C P Jr, et al. Nootkatone inhibits acute and chronic inflammatory responses in mice[J/OL]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2181 [2021-02-18]. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25092181>.
- [5] HABASH S S, KÖNEN P P, LOESCHCKE A, et al. The plant sesquiterpene nootkatone efficiently reduces *Heterodera schachtii* parasitism by activating plant defense[J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(24): 9627 [2021-02-18]. <https://doi.org/10.3390/ijms21249627>.
- [6] FARHA A K, YANG Q Q, KIM G, et al. Inhibition of multi-drug-resistant foodborne *Staphylococcus aureus* biofilms by a natural terpenoid (+)-nootkatone and related molecular mechanism[J/OL]. *Food control*, 2020, 112: 107154 [2021-02-18]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107154>.
- [7] XIE J C, SUN B G, WANG S B, et al. Isolation and purification of nootkatone from the essential oil of fruits of *Alpinia oxyphylla* Miquel by high-speed counter-current chromatography[J]. *Food chemistry*, 2009, 117(2): 375-380.
- [8] 陈永宽, 汪汉卿, 孔宁川, 等. 圆柚酮的合成[J]. *合成化学*, 2002, 10(5): 397-399. CHEN Y K, WANG H Q, KONG N C, et al. Synthesis of nootkatone[J]. *Chinese journal of synthetic chemistry*, 2002, 10(5): 397-399 (in Chinese with English abstract).
- [9] HUNTER G L K, BROGDEN W B. Conversion of valencene to nootkatone[J]. *Journal of food science*, 1965, 30(5): 876-878.
- [10] SALVADOR J, CLARK J H. The allylic oxidation of unsaturated steroids by tert-butyl hydroperoxide using homogeneous and heterogeneous cobalt acetate[J/OL]. *Chemical communications*, 2001: 33-34 [2021-02-18]. <https://doi.org/10.1039/B007447K>.
- [11] FRAATZ M A, BERGER R G, ZORN H. Nootkatone: a biotechnological challenge[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2009, 83(1): 35-41.
- [12] 李晓, 范刚, 任婧楠, 等. 瓦伦西亚橘烯生物转化生成圆柚酮[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 77-84. LI X, FAN G, REN J N, et al. Biotransformation of valencene into nootkatone[J]. *Food science*, 2019, 40(6): 77-84 (in Chinese with English abstract).
- [13] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. DONG X Z. *Common bacteria system identification manual* [M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [14] SCHULZ S, GIRHARD M, GAßMEYER S K, et al. Selective enzymatic synthesis of the grapefruit flavor (+)-nootkatone[J]. *Chem Cat Chem*, 2015, 7(4): 601-604.
- [15] PALMERÍN-CARREÑO D M, CASTILLO-ARAIZA C O, RUTIAGA-QUINONES O M, et al. Whole cell bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by *Yarrowia lipolytica* using a three phase partitioning bioreactor[J]. *Journal of chemical technology & biotechnology*, 2016, 91(4): 1164-1172.
- [16] GIRHARD M, MACHIDA K, ITOH M, et al. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system[J/OL]. *Microbial cell factories*, 2009, 8(1): 1-12 [2021-02-18]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-36>.
- [17] 李纪顺, 陈凯, 张广志, 等. 越南伯克霍尔德氏菌 B418 培养条件的优化[J]. *中国土壤与肥料*, 2013(5): 97-100. LI J S, CHEN K, ZHANG G Z, et al. The fermentation conditions optimization of *Burkholderia vietnamiensis* B418[J]. *Soil and fertilizer sciences in China*, 2013(5): 97-100 (in Chinese with English abstract).
- [18] 林仙菊, 叶秀云, 周智敏, 等. 洋葱伯克霍尔德菌产脂肪酶的条件研究[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(2): 69-76. LIN X J, YE X Y, ZHOU Z M, et al. Studies on the lipase-producing conditions of *Burkholderia cepacia* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(2): 69-76 (in Chinese with English abstract).
- [19] DENISOV I G, FRANK D J, SLIGAR S G. Cooperative properties of cytochromes P450[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2009, 124(2): 151-167.
- [20] WU R R, DANG Z, YI X Y, et al. The effects of nutrient amendment on biodegradation and cytochrome P450 activity of an n-alkane degrading strain of *Burkholderia* sp. GS3C[J]. *Journal of hazardous materials*, 2011, 186(2/3): 978-983.
- [21] MATSUDA M, OTSUKA Y, JIN S, et al. Biotransformation of (+)-catechin into taxifolin by a two-step oxidation: primary



stage of (+)-catechin metabolism by a novel (+)-catechin-degrading bacteria, *Burkholderia* sp. KTC-1, isolated from

tropical peat[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2008, 366(2): 414-419.

## Screening of strains for biotransformation to nootkatone and optimization of medium components

PENG Zhiqian<sup>1</sup>, CAO Ting<sup>2</sup>, FAN Gang<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, REN Jingnan<sup>1</sup>, ZHANG Lulu<sup>1</sup>

1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/  
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;  
2.Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430040, China

**Abstract** Nootkatone is a typical aroma substance of citrus fruits, and valencene is often used as a precursor substance to produce nootkatone in industry. Compared with the method of physical extraction and chemical synthesis, the biotransformation method to produce nootkatone has the advantages of high specificity, speed and efficiency, and can be added to food and cosmetics. In order to screen strains with specific biotransformation functions, soil samples were obtained from citrus orchards, and the growth curve and the yield of the nootkatone produced by the transformation of valencene were used as indicators to carry out preliminary screening and re-screening of the strains. SPME-GC-MS was used to measure and analyze the types and contents of the products produced by valencene biotransformation. The results of physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequencing showed that the screened strains were identified as *Burkholderia* sp., which was named *Burkholderia* sp. PZQ14. On the basis of LB medium, the transformation amount of nootkatone was used as an indicator to carry out a single factor test of medium composition, and then the effect of the combination of different mass concentrations of the culture medium components on nootkatone yield was investigated by response surface optimization test. The results showed that the optimal medium components were as follows: glucose concentration of 38 g/L, peptone concentration of 25 g/L, and FeSO<sub>4</sub> concentration of 0.60 g/L. The content of nootkatone was 328.69±17.88 mg/L and the transformation ratio was 35.73%±1.24% when three validation tests were conducted under these conditions. The nootkatone yield increased by 251 mg/L and the transformation ratio increased by 27.30% compared with LB medium. It will provide a new way to increase the yield of nootkatone and lay a theoretical foundation for the further industrial production of nootkatone.

**Keywords** strain screening; valencene; nootkatone; biotransformation; *Burkholderia* sp.; response surface optimization

(责任编辑:赵琳琳)