

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201904020



近海海洋真菌生物转化(+) - 柠檬烯

杨道茂¹, 陈煌²

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 厦门万泰沧海生物技术有限公司, 福建 厦门 361022)

摘要: 以厦门近海海域分离到的 30 株海洋真菌为出发菌株, 通过液体发酵法考察其生物转化(+) - 柠檬烯的能力, 采用气相色谱-质谱(GC-MS)技术结合 NIST 数据库对其代谢产物进行化合物分析. 结果表明: 23, 27, 36, 41 号真菌具有生物转化柠檬烯的能力, 其主要代谢产物暂定为异辣薄荷烯酮、波斯菊萜、1, 3, 8-孟三烯、香芹醇等; 在 23, 36 号真菌的代谢产物中, 异辣薄荷烯酮为唯一主要产物, 具有进一步研究开发的价值.

关键词: (+) - 柠檬烯; 海洋真菌; 生物转化; 液体发酵法; 异辣薄荷酮

中图分类号: Q 939.9; Q 949.321 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2020)01-0067-05

Biotransformation of (+)-Limonene by Offshore Marine Fungi

YANG Daomao¹, CHEN Huang²

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Innovax Biotech Limited Company, Xiamen 361022, China)

Abstract: Thirty marine fungi isolated from Xiamen City offshore district were used as starting strains to investigate their ability to biotransform (+)-limonene by liquid fermentation method, and their metabolites were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with NIST database. The results showed that strain 23, 27, 36 and 41 had the biotransformation ability of limonene. The main metabolites were tentatively identified as isopiperitenone, cosmene, 1,3,8-menthatriene, carveol, etc. The isopiperitenone was the only major product among metabolites produced from strain 23 and 36, which is valuable for further research and exploitation.

Keywords: (+)-limonene; marine fungi; biotransformation; liquid fermentation method; isopiperitenone

出于对食品安全的考虑, 消费者对天然来源产品的需求日益提高. 按照美国和欧洲的立法, 天然香料是指其原料来源于动物、植物或通过物理、酶和微生物的处理方式获得的, 且带有芳香味的化合物^[1-2]. 天然来源的化合物比化学合成的化合物具有更高的市场价值, 因此, 通过生物转化或酶解工艺获得天然生物香料就具有很高的市场研发价值^[3]. (+) - 柠檬烯为结构最简单的环状单萜类化合物, 主要分布于葡萄柚、柠檬、酸橙、橘子中, 为柑橘加工厂的副产物柠檬精油的主要成分. 研究表明, 由柠檬烯出发, 共有 6 条代谢途径可以生成一系列香料型含氧衍生物^[4-15]. 底物和转化产物的价格差异巨大^[16], 通过生物转化作用可以实现柠檬烯的结构改造, 从而达到产业增值的目的. 生物转化柠檬烯的一个关键因素是大量微生物的筛选分离. 为此, 国内外很多科学家开展了大量的菌株筛选工作, Rottava 等^[17]在

收稿日期: 2019-04-11

通信作者: 杨道茂(1975-), 男, 讲师, 博士, 主要从事生物转化及天然生物活性物质分离的研究. E-mail: ydmao@hqu.edu.cn.

基金项目: 华侨大学高层次人才科研启动基金资助项目(Z15X0004)

生物转化柠檬烯和 α -蒎烯的研究中,从405株菌株中选用193株进行生物转化柠檬烯,有8株能利用柠檬烯生成松油醇,有1株青霉属微生物最高产量达 $3\,450\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Bicas等^[18]从柑橘加工厂环境中分离到238株菌株,仅有70株能在以柠檬烯为唯一碳源的基础培养基中生长. 本文对近海海洋真菌生物转化(+)-柠檬烯进行研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1) 试剂. (+)-柠檬烯(纯度为96%,稳定型,美国Acros Organic公司);GF₂₅₄硅胶板(50 mm×100 mm,山东省青岛海洋化工有限公司);无水乙醇、乙酸乙酯、石油醚(上海国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯.

2) 仪器. N-1100型旋转蒸发仪(日本EYELA公司);GCMS-QP2010 Ultra型气质联用仪(FID检测器,附美国国家标准与技术局(NIST)11.0化学数据库,日本Shimadzu公司).

1.2 近海海域海洋真菌菌株筛选

首先,从福建省厦门市环岛路沙滩上采集海水浸泡的海藻、浮木、贝壳等材料,用无菌海水洗净. 然后,取2 g材料浸泡于10 g无菌海水中,并粉碎、静置;取1 mL上清液涂布于用海水配制的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(内含 $20\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的青霉素和链霉素)中,于30℃下培养2~3 d后,按照菌落形态的差异,挑选单菌株划线分离,直到获得单菌落为止. 最后,将各单菌落保存到斜面备用.

1.3 生物转化实验

挑选上述分离到的30株真菌置于沙保氏培养基($40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨,1 L陈海水,pH值自然)中,进行生物转化实验. 用接种环挑取实验菌的菌丝或孢子,每株真菌接种到2个250 mL的锥形瓶中,每个锥形瓶接100 mL培养基,于30℃, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下培养6 d. 然后,在其中一个锥形瓶中加入1 mL柠檬烯底物溶液($V(\text{柠檬烯}):V(\text{乙醇})=1:1$,柠檬烯的最终体积分数为0.5%)作为实验组,另外一瓶作为菌株对照组,不做其他处理. 同时,单独取一无菌培养基加入等量底物溶液,设置为底物对照组,即该培养基内只含体积分数为0.5%的底物溶液,而不接种任何菌株. 在相同条件下,锥形瓶继续培养4 d. 生物转化实验结束后,将各菌株的发酵液用滤纸过滤,滤液用100 mL乙酸乙酯萃取2次,并合并萃取液,经无水硫酸钠脱水后,用旋转蒸发仪浓缩至1.5 mL左右;将浓缩液置于1.5 mL的离心管中,用10 000g的相对离心力离心10 min,取上层有机相用于产物成分分析.

1.4 产物成分分析

将底物对照组、菌株实验组和菌株对照组样品进行薄层色谱(TLC)点板预检测. 显色剂为香草醛-硫酸-乙醇显色剂(15 g香草醛溶于250 mL体积分数为1%的浓硫酸-乙醇溶液中);展开剂为 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=15:4$ 或 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=10:1$ 的溶液.

将菌株实验组与底物对照组间存在差异的样品进行气相色谱-质谱(GC-MS)分析. GC-MS的检测条件:色谱柱为Rxi-5sil MS($30.00\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\ \mu\text{m}$),柱箱温度为60℃,进样口温度为250℃,柱流量为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流比为1:2,进样量为 $1\ \mu\text{L}$. 升温程序为:柱温60℃×3 min→升温速度 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ →柱温150℃×5 min→升温速度 $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ →柱温250℃×3 min. 质荷比(m/z)扫描范围为40~200.

2 实验结果

2.1 菌株分离纯化

在菌落初筛阶段共筛选出80株真菌,其中,65株为霉菌,15株为酵母菌. 对菌株进行编号(1~80),并保存于4℃冰箱中备用.

2.2 菌株萃取液的TLC检测

挑选出30株菌株,将其底物对照组、菌株实验组和菌株对照组的萃取液分别进行TLC实验,判断是否出现差异点. 结果表明,大部分菌株对照组的TLC板上无斑点. 在TLC的比对结果中,23,27,36,

41 号菌株可能具有生物转化(+) - 柠檬烯的能力. 菌株萃取液的 TLC 结果, 如图 1 所示. 图 1 中: Lim 为底物对照组; ct 为菌株对照组.

由图 1 可知: 培养 4 d 后, 底物对照组有 5 个明显的斑点(比移值 R_f 分别为 0.14, 0.49, 0.62, 0.75, 0.86); 当 $R_f = 0.54$ 时, 23, 36 号菌株出现 1 个明显的斑点, 与底物对照组进行比对, 推测这 2 株菌具有生物转化(+) - 柠檬烯能力.

由图 1 还可知: 41 号菌株出现的 4 个主要斑点均与底物重合, 其他部分略有些差异, 推测该菌株可能具有一定的生物转化(+) - 柠檬烯能力; 当 $R_f = 0.20$ 时, 27 号菌株的实验组出现 1 个红色斑点, 经与菌株对照组比对, 表明该红点为菌株自身代谢产物, 其余位置只出现 3 个主要斑点, 与底物对照组差异较大, 由此推测 27 号菌株可能具有一定的生物转化(+) - 柠檬烯能力.

2.3 菌株萃取液的 GC-MS 检测

将 23, 27, 36, 41 号菌株的萃取液进行 GC-MS 检测(代谢产物的 GC-MS 分析工作主要借助华侨大学材料学院宋秋玲教授课题组仪器完成), 其总离子流色谱图, 如图 2 所示. 图 2 中: δ 为相对强度; 1~6 代表可辨识的化合物峰信号; t_R 为各化合物峰的保留时间.

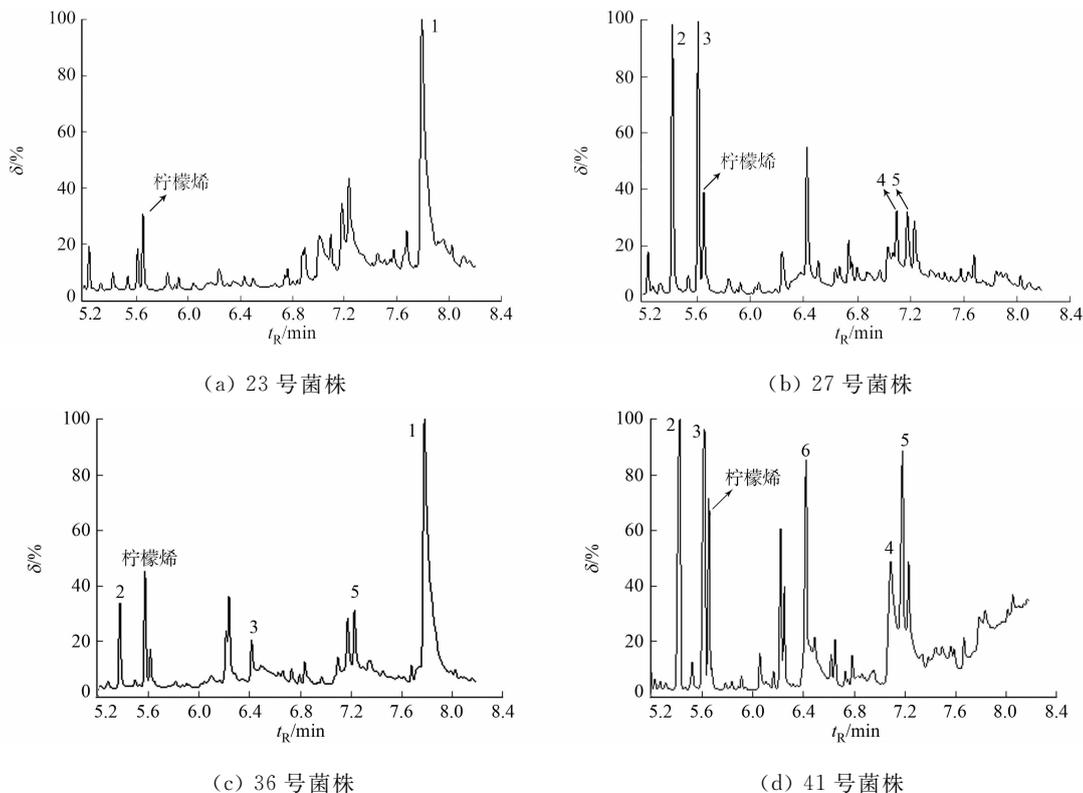


图 2 菌株萃取液的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of extracts from strains

由图 2 可知: 23, 36 号菌株的峰信号 1 ($t_R = 7.78$ min) 相对强度最大, 底物(柠檬烯)信号 ($t_R = 5.64$ min) 较弱, 表明这两株菌株能转化底物, 生成峰信号 1 所代表的化合物, 该结果与图 1 的 TLC 判断结果一致; 27, 41 号菌株中的峰信号 2 ($t_R = 5.40$ min) 和峰信号 3 ($t_R = 5.61$ min) 的相对强度均比底物信号更大, 说明 27, 41 号菌株也能转化底物, 生成其他一系列化合物, 该结果与图 1 的 TLC 判断结果一致.

通过 NIST 化学数据库检索, 并结合生物转化柠檬烯的作用机理, 暂定出 4 株菌株生物转化(+) -

柠檬烯代谢产物的化学结构,如图3所示。各菌株主要代谢产物准确的化学结构还有待进一步验证。

3 讨论

菌株来源于福建省厦门市近海海域腐烂的沉积木、海藻等组织,按照海洋真菌定义,只要是在海洋环境中分离,并能在海水盐度(或略低于海水盐度)的培养基中正常生长的真菌,都可以称为海洋真菌或海洋生真菌。因此,实验来源的真菌都属于兼性海洋真菌^[19]。

目前,关于生物转化(+)-柠檬烯的微生物报道很多,主要有以下5类:1) 细菌,如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[20-22]、海洋弧菌(*Vibrio cholerae*, *Listonella damsela*, *Vibrio alginolyticus*)^[23]; 2) 酵母菌,如解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica* ATCC 18942)^[13]; 3) 真菌,如植物内生真菌(*Phomopsis* sp.)^[6]、柑橘绿霉(*Penicillium digitatum* DSM 62840)^[10]、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* 152B)^[15]; 4) 微藻(*Chlorella*, *Oocystis*, *Chlamydomonas* 和 *Synechococcus*)^[7]; 5) 斜纹夜蛾的幼虫(*Spodoptera litura*)^[24]。然而,目前较少有关于利用海洋真菌完成生物转化(+)-柠檬烯方面的报道。

利用海洋真菌生活环境产生的独特催化特性进行生物转化(+)-柠檬烯,实验结果表明,其代谢产物与文献报道的陆地微生物代谢产物的差异较大,例如,未检测出比较常见的香芹酮、柠檬烯-1, 2-二醇、紫苏醇、紫苏酸等代谢产物。这说明利用海洋真菌生物转化柠檬烯还有待深入研究。

从厦门近海海域分离了80株真菌,其中,65株为霉菌,15株为酵母菌。在选取的30株兼性海洋真菌中,23,27,36,41号菌株具有生物转化柠檬烯的能力,但其菌株种属还有待进一步确定。4株菌株生物转化(+)-柠檬烯的主要代谢产物暂定为异辣薄荷烯酮、波斯菊萜、1,3,8-孟三烯、4-萜烯醇、二氢香芹酮、香芹醇。23,36号菌株的主要代谢产物异辣薄荷烯酮具有进一步研究开发的價值。

参考文献:

- [1] MANTZOURIDOU F T, PARASKEVOPOULOU A, LALOU S. Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 101: 1-8. DOI: 10.1016/j.bej.2015.04.013.
- [2] VESPERMANN K A C, PAULINO B N, BARCELOS M C S, *et al.* Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 1805-1817. DOI: 10.1007/s00253-016-8066-7.
- [3] CARROLL A L, DESAI S H, ATSUMI S. Microbial production of scent and flavor compounds[J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2016, 37: 8-15. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.09.003.
- [4] van der WERF M J, SWARTS H J, de BONT J A M. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2092-2102. DOI: 10.1128/AEM.65.5.2092-2102.1999.
- [5] MAROSTICA M R, PASTORE G M. Biotransformation of limonene: A review of the main metabolic pathways[J]. *Quimica Nova*, 2007, 30(2): 382-387. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200027.
- [6] BIER M C J, MEDEIROS A B P, SOCCOL C R. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media[J]. *Fungal Biology*, 2017, 121(2): 137-144. DOI: 10.1016/j.funbio.2016.11.003.
- [7] RASOUL-AMINI S, FOTOOH-ABADI E, GHASEMI Y. Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(6): 975-981. DOI: 10.1007/s10811-010-9625-4.
- [8] BICAS J L, de QUADROS C P, NERI-NUMA I A, *et al.* Integrated process for co-production of alkaline lipase and

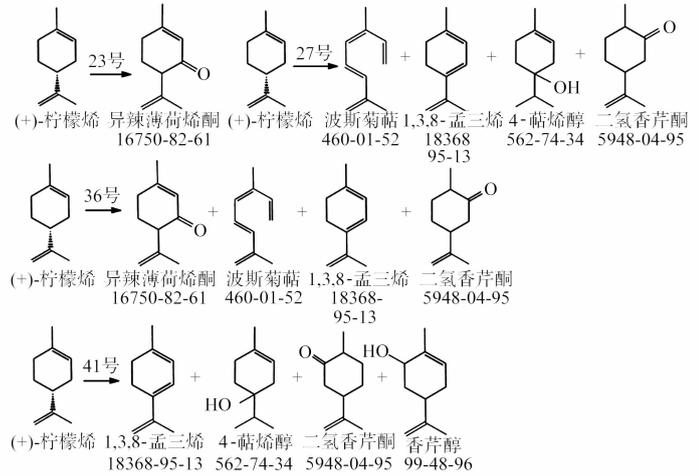


图3 暂定的菌株生物转化(+)-柠檬烯代谢产物的化学结构
Fig. 3 Tentatively identified chemical structure of metabolites by biotransformation of (+)-limonene

- R*-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 452-456. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2009. 10. 037.
- [9] BICAS J L, BARROS F F C, WAGNER R, *et al.* Optimization of *R*-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(9): 1061-1070. DOI: 10. 1007/s10295-008-0383-0.
- [10] TAI Yanan, XU Min, REN Jingnan, *et al.* Optimisation of α -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(3): 954-961. DOI: 10. 1002/jsfa. 7171.
- [11] BADEE A Z M, HELMY S A, MORSY N F S. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202)[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 849-854. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2010. 11. 046.
- [12] BICAS J L, FONTANILLE P, PASTORE G M, *et al.* Characterization of monoterpene biotransformation in two *pseudomonads*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1991-2001. DOI: 10. 1111/j. 1365-2672. 2008. 03923. x.
- [13] FERRARA M A, ALMEIDA D S, SIANI A C, *et al.* Bioconversion of *R*-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(4): 1075-1080. DOI: 10. 1590/S1517-83822014005000008.
- [14] van RENSBURG E, MOLELEKI N, van der WALI J P, *et al.* Biotransformation of (+)-limonene and (-)-piperitone by yeasts and yeast-like fungi[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(8): 779-782. DOI: 10. 1023/A: 1018344411069.
- [15] MOLINA G, BUTION M L, BICAS J L, *et al.* Comparative study of the bioconversion process using *R*-(+)- and *S*-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B[J]. Food Chemistry, 2015, 174(1): 606-613. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2014. 11. 059.
- [16] SCHWAB W, FUCHS C, HUANG F C. Transformation of terpenes into fine chemicals[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2013, 115(1): 3-8. DOI: 10. 1002/ejlt. 201200157.
- [17] ROTTAVA I, CORTINA P F, GRANDO C E, *et al.* Isolation and screening of microorganisms for *R*-(+)-limonene and (-)- β -pinene biotransformation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(3): 719-732. DOI: 10. 1007/s12010-009-8872-9.
- [18] BICAS J L, PASTORE G M. Isolation and screening of *D*-limonene-resistant microorganisms[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2007, 38(3): 563-567. DOI: 10. 1590/S1517-83822007000300034.
- [19] 牟海津. 海洋微生物工程[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2016.
- [20] CHATTERJEE T, BHATTACHARYYA D K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(5): 541-546. DOI: 10. 1007/s002530000538.
- [21] MIRATA M A, HEERD D, SCHRADER J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 764-771. DOI: 10. 1016/j. procbio. 2009. 03. 013.
- [22] van BEILEN J B, HOLTACKERS R, LUSCHER D, *et al.* Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1737-1744. DOI: 10. 1128/AEM. 71. 4. 1737-1744. 2005.
- [23] LI Houjin, LAN Wenjian, CAI Chuanghua, *et al.* Biotransformation of limonene by marine bacteria[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(7): 946-950. DOI: 10. 1016/S1872-2040(06)60046-7.
- [24] MIYAZAWA M, WADA T, KAMEOKA H. Biotransformation of (+)- and (-)-limonene by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 300-303. DOI: 10. 1021/jf970142l.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)