

转化异丁香酚生成香草醛纺锤芽孢杆菌的筛选*

赵丽青 朱蕾蕾 孙志浩** 郑璞

(江南大学生物催化研究室 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要:以底物异丁香酚为唯一碳源从土壤中筛选获得了一株能高效转化异丁香酚生成香草醛的芽孢杆菌。根据生理生化特性及16S rRNA序列分析鉴定其属于纺锤芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*)，初步试验表明该菌能转化2%异丁香酚生成4.20 g/L香草醛。

关键词:纺锤芽孢杆菌, 异丁香酚, 香草醛, 分离筛选, 鉴定

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0072-06

Screening and Identification of *Bacillus fusiformis* Bioconverting Isoeugenol to Vanillin*

ZHAO Li-Qing ZHU Lei-Lei SUN Zhi-Hao** ZHENG Pu

(Laboratory of Biocatalysis, School of Biotechnology, Southern Yangtze University; The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: Using isoeugenol as the sole carbon source, a novel strain, producing high amounts of vanillin from isoeugenol, was isolated from soil. According to the physiological and biochemical characteristics and its 16S rRNA gene sequence analysis, it was identified as *Bacillus fusiformis*. The initial results showed that 4.20 g/L vanillin was obtained by bioconversion of 2% isoeugenol with *Bacillus fusiformis*.

Key words: *Bacillus fusiformis*, Isoeugenol, Vanillin, Screening, Identification

香草醛(4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)是最重要的香味物质之一,广泛应用于食品、糖果、饮料、香料、化妆品及制药等行业中。市场上的香草醛主要有合成香草醛和天然香草醛2种,而前者占据了99%以上的市场份额。随着人们越来越关心健康和营养以及美国和欧盟等对化学食品添加剂使用的限制规定,天然香草醛的需求量也越来越大。从香荚兰豆荚中提取的天然香草醛价格昂贵,产量很少,不能满足日益增长的需求^[1]。利用生物转化法生产天然香草醛是最有前途的替代方法之一。

生物转化生成香草醛的潜在工业原料包括木质素、丁香酚、阿魏酸等,天然丁香酚则较为廉价易得,近年来以此进行生物转化的研究不断增多^[2-5]。

本文报道从土壤中分离筛选得到能转化异丁香酚生成香草醛的芽孢杆菌SW-B9,并对其进行了生理生化特性鉴定与16S rRNA全基因序列分析,确定其属于纺锤芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*),虽然当前对芽孢杆菌的应用等各方面的研究已较为普遍^[6,7],但国内尚未有纺锤芽孢杆菌应用方面的报道。

* 国家973项目资助(No. 2003CB716008)

Project Granted by the State Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2003CB716008)

** 通讯作者 Tel: 0510-5808498, E-mail: sunw@public1.wx.js.cn

收稿日期: 2005-04-14, 修回日期: 2005-06-08

1 材料与方法

1.1 试剂

香草醛、异丁香酚标样购于Sigma; 底物异丁香酚购于北京正元科技有限公司。

1.2 菌种与培养基

1.2.1 菌种: 枯草芽孢杆菌 AS1.836 由实验室保藏, 其他菌株由土壤分离获得。

1.2.2 培养基: 斜面培养基: LB 培养基; 富集液体培养基: 异丁香酚 2 g, 葡萄糖 5 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 5 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14 g, KH_2PO_4 5.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g, 定容至 1L, pH 7.0; 筛选培养基: 异丁香酚 2 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 5 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14 g, KH_2PO_4 5.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g, 定容至 1L, pH 7.0; 种子与发酵培养基: 葡萄糖 5 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 5 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14 g, KH_2PO_4 5.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, 定容至 1L, pH 7.0。

1.3 菌株分离筛选

1.3.1 样品采集及预处理: 从无锡某香料有限公司受到不同程度香料污染的土层采集土样, 将 10 g 土样悬浮于 30 mL 0.9% NaCl 溶液中, 用 8 层纱布过滤去除较大的杂质颗粒, 用作富集培养的接种物。

1.3.2 菌株分离培养: 经预处理的土样, 接 1 mL 于富集培养基中 37℃, 180 r/min 摇床培养 24 h, 转接至以异丁香酚为唯一碳源筛选培养基, 37℃, 180 r/min 下培养 24 h, 反复转接 4 次, 再将培养物稀释一定倍数涂布平板 (筛选培养基加 2% 琼脂), 37℃ 培养 3~5 d, 挑取不同形态的单菌落, 再接种于种子与发酵培养基中 37℃, 180 r/min 下振荡培养 24 h, 离心分离 (3,000 ×g, 10 min) 细胞并以蒸馏水洗涤 2 次, 湿菌体转至反应液中进行生物转化。

1.3.3 生物转化: 反应液: 异丁香酚 20 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 14 g, KH_2PO_4 5.2 g, 定容至 1L。将发酵液离心所得细胞, 按每 20 mL 反应液加湿菌体量 0.36 g, pH 7.0, 装液量 20 mL/250 mL 三角瓶, 28℃, 180 r/min, 振荡转化 72 h。

1.3.4 香草醛降解实验: 以 2 g/L 香草醛代替异丁香酚, 其他反应条件同 1.3.3。

1.4 底物及产物分析测定

1.4.1 TLC 法: TLC 分析方法见参考文献 [3]。

1.4.2 HPLC 法: HPLC 分析方法见文献 [4]。添加树脂实验中, 滤出树脂以 50 mL 无水乙醇在 37℃, 180 r/min 振荡下洗脱 12 h 再检测。其他样品以一定量无水乙醇溶解异丁香酚并稀释一定倍数, 用 0.45 μm 膜过滤后检测。

1.4.3 气质联用 (GC-MS): 反应 72 h 的反应液经乙酸乙酯萃取, 以 Finnigan Trace MS 和 PEG-20M (30M) 进行气质联用定性分析。色谱条件: OV-1701 毛细管色谱柱 (柱长 30 m, 内径 0.25 mm, 液膜厚度 0.25 μm), 载气为 He, 流量 0.8 mL/min, 分流流量 10 mL/min, 进样口温度 250℃, 柱温: 起始温度 90℃, 以 7℃/min 升温至 250℃, 保持 5 min。质谱条件: 接口温度 250℃, 离子源温度 200℃, 电离方式 EI, 电子能量 70 eV。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 细胞形态与生理生化特征鉴定：鉴定方法见参考文献 [8~10]。

1.5.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及分析：细菌总 DNA 的提取见参考文献 [11]。以细菌染色体 DNA 为模板，通用引物 P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 P2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增 (PE 公司, PE9700 型扩增仪), 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 循环参数为 95℃ 变性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 60℃ 复性 30 s, 共 30 个循环。PCR 产物直接委托宝生物工程 (大连) 有限公司测序。

2 结果与讨论

2.1 异丁香酚转化菌的初筛

按 1.3 方法采集土样, 共分离获得 14 株能在以异丁香酚为唯一碳源的平板上生长的形态各异的单菌落菌株。能利用异丁香酚的菌株都具有不同程度的将之转化为香草醛的能力, 在微生物代谢异丁香酚的途径中, 很可能存在一种或一种以上途径, 香草醛可能以中间代谢产物或终产物的形式出现^[2]。

2.2 转化异丁香酚生成香草醛菌株复筛

对上述 14 株初筛菌株转化异丁香酚生成香草醛的能力进行复筛, 以 HPLC 法精确测定香草醛浓度。由图 1 可知, 生成香草醛最多的是 SW-B9, 浓度达 1.17 g/L, 高于国内外其他研究者报道的微生物法转化丁香酚、异丁香酚生成香草醛的水平。转化液经 GC-MS 进一步定性分析, 确认其转化产物为香草醛 (图谱未显示)。

2.3 各初筛菌株对香草醛的降解能力

产物香草醛的进一步降解对所需的转化反应不利, 因此对初筛菌株降解香草醛能力进行测试。由图 2 可知, SW-B9 对香草醛降解与空白对照相当可以说对香草醛几乎不降解。综合转化异丁香酚生成香草醛能力及对香草醛的降解情况, 选用 SW-B9 作为出发菌株。

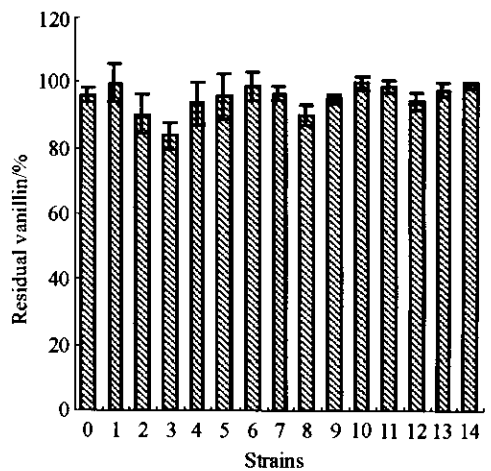
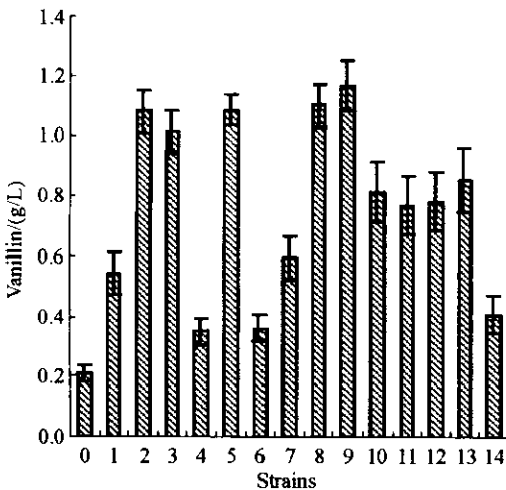


图1 各菌株转化异丁香酚生成香草醛能力复筛
0 对照未接种微生物, 1~14 菌株 SW-B1~SW-B14

图2 各菌株降解香草醛能力
0 对照未接种微生物, 1~14 菌株 SW-B1~SW-B14

2.4 生理生化鉴定

通过稀释涂布法在 LB 平板上培养获得单菌落，于 37℃ 培养不同时间，定期观察菌落形态变化。接种后培养 24 h 开始形成乳白色菌落，2 d 后菌落直径达约 2 mm，不透明，圆形，边缘整齐光滑，中间有突起褶皱。培养的细胞经扫描电镜 (Hitachi H-7000, Honshu, Japan) 观察，细胞呈杆状，周生鞭毛，无荚膜，细胞质均匀。芽孢端生，孢囊膨大，其显微摄影照片见图 3，TEM 电镜照片见图 4。

生理生化特性鉴定结果见表 1，SW-B9 VP 反应阴性，能液化明胶，特别是对四环素 (1 μg/mL) 敏感，能在 7% NaCl 下生长及脲酶阳性，鉴定结果与纺锤芽孢杆菌一致。

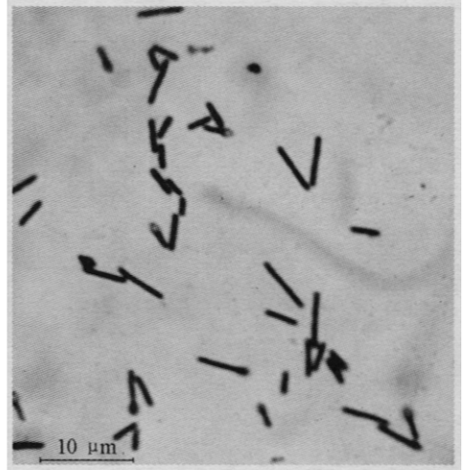


图 3 12 h 细胞及初生芽孢形态(×1,500)

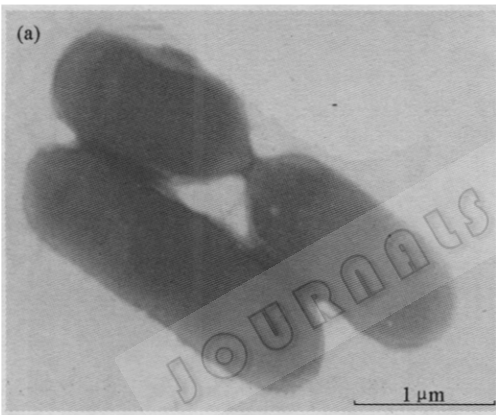


图 4a SW-B9 的细胞及其周生鞭毛 (×18,000)

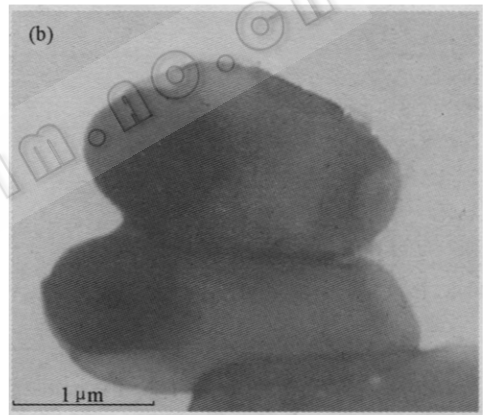


图 4b SW-B9 的芽孢 (×18,000)

表 1 生理生化特性鉴定结果对照表

生理生化特性	SW-B9	枯草芽孢杆菌	纺锤芽孢杆菌 ^[8]	球形芽孢杆菌 ^[8-10]
形态:				
细胞单生	-	+	-	+
芽孢圆形	+	-	+	+
芽孢端生	+	-	D	D
淀粉水解	-	+	-	-
酪氨酸水解	-	-	-	-
马尿酸盐水解	-	-	-	D
明胶液化	+	+	+	+
1 μg/mL 四环素抗性	-	+	-	+
2 μg/mL 四环素抗性	-	+	-	D
D-葡萄糖产酸	-	+	-	-
D-蔗糖产酸	-	+	D	-

续表 1

D-木糖产酸	-	+	-	-
D-乳糖产酸	-	-	-	-
D-麦芽糖产酸	-	+	-	-
5℃生长	-	-	-	-
17℃(或15℃)生长	+	+	+*	+
30℃生长	+	+	+	+
37℃(或40℃)生长	+	+	+*	+
50℃生长	-	+	-	-
pH6.8生长	+	+	+	+
pH5.7生长	+	+	D	D
2% NaCl生长	+	+	D	+
5% NaCl生长	+	+	D	D
7% NaCl生长	+	+	+	-
10% NaCl生长	-	+	-	-
革兰氏染色	+	+	+	+
厌氧生长	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	-
VP试验	-	+	-	-
甲基红试验	-	-	-	-
吡啶试验	-	-	-	-
过氧化氢酶	+	+	D	D
脲酶	+	-	D	-
硝酸盐还原	-	+	-	-

注: 仅知 17℃、37℃ 生长结果, + 90% 以上阳性, - 90% 以上阴性, D 不同 11% ~ 89% 阳性

2.5 16S rRNA 序列分析

提取细胞总 DNA, 以引物 P1 和 P2 扩增菌株 SW-B9 的 16S rDNA 基因, 获得 1525 bp, 将该序列 (已提交 GenBank, No. AY907676) 与 GenBank 中相关数据进行相似性分析。图 5 表明, SW-B9 与球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*)、纺锤芽孢杆菌 (*Bacillus fusiformis*) 的同源性均大于 99% (二者都属于 taxon *Bacillus sphaericus sensu lato*)。结合生理生化特性鉴定结果, 菌株 SW-B9 属于纺锤芽孢杆菌, 拟命名为纺锤芽孢杆菌

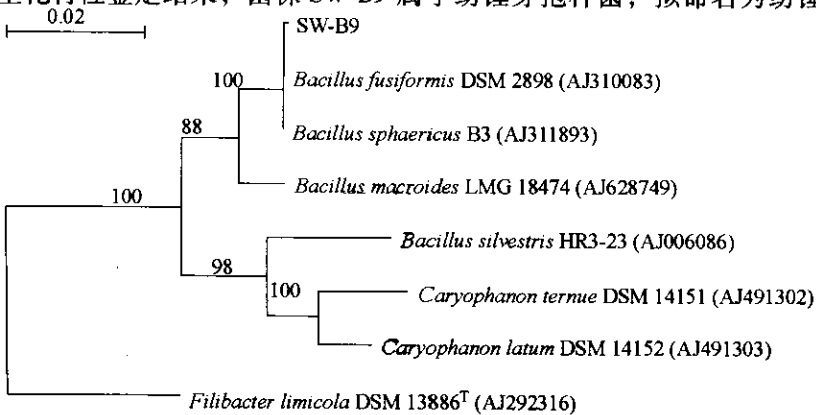


图 5 菌株 SW-B9 在芽孢杆菌属中的系统发育地位

SW-B9 (*Bacillus fusiformis* SW-B9)。

2.6 *Bacillus fusiformis* SW-B9 转化异丁香酚生成香草醛的初步试验

纺锤芽孢杆菌 SW-B9 菌株培养发酵 16 h, 经 $3,000 \times g$ 离心 10 min, 取湿菌体量 0.36 g 加入 20 mL 反应液中 (含异丁香酚 0.4 mL, 0.02 mL 吐温-80, 5 g 树脂 HD-8, 初始 pH7.0), 于 37°C , 180 r/min 转化 72 h, 香草醛产量达 4.20 g/L, 摩尔转化率为 22.7%。国内外尚未见有纺锤芽孢杆菌转化异丁香酚生成香草醛的报道。

参考文献

- [1] Priefert H, Rabenhorst J, Steinbchel A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 296 ~ 314.
- [2] Rabenhorst J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 470 ~ 474.
- [3] 孙志浩, 郑 璞, 赵丽青. 中国专利, 申请号: 200510064494.0, 2005.
- [4] Li Y H, Sun Z H, Zheng P. *Chromatographia*, 2004, **60**: 709 ~ 713.
- [5] Li Y H, Sun Z H, Zhao L Q, *et al.* *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, **125** (1): 1 ~ 10.
- [6] 陈 炜, 何秉旺, 张建华, 等. *微生物学通报*, 1997, **24** (4): 199 ~ 202.
- [7] 辛玉华, 东秀珠, 吴明强. *微生物学通报*, 2000, **27** (3): 178 ~ 181.
- [8] Fergus G P, Michael G, Carole T. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 1847 ~ 1882.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 编. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 伯杰氏细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984.
- [11] Frederich M A, Roger B, Robert E K, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. (4th Edition). John Wiley & Sons, Inc., 1999.