

# 产圆柚酮菌种筛选及发酵条件优化

潘奕丞, 刘晓旋, 钱敏\*, 王启轩, 白卫东, 赵文红\*

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广州 510225)

**摘要:** 为了利用生物转化法合成绿色无毒的圆柚酮, 从富含瓦伦西亚橘烯和圆柚酮的脐橙果皮中分离菌株, 通过菌株的初筛、复筛选出能将瓦伦西亚橘烯转化成圆柚酮的特定菌株, 利用 16S rDNA 测序对所筛菌株进行鉴定, 并进行遗传稳定性测试和发酵条件优化。结果表明所筛菌株为山梨木糖假丝酵母; 在吐温 80 添加量为 4.00 g/L、瓦伦西亚橘烯添加量为 30.00  $\mu$ L、pH 为 4.00, 硫酸亚铁添加量为 0.50 g/L, 苹果酸添加量为 30.00 g/L 组成的发酵液下发酵 48 h, 山梨木糖假丝酵母利用瓦伦西亚橘烯生成圆柚酮的产量最高, 为 60.58 mg/L。此外, 该研究发现镁离子的存在对山梨木糖假丝酵母利用瓦伦西亚橘烯合成圆柚酮起抑制作用, 亚铁离子起促进作用, 为圆柚酮的工业化生产提供进一步的理论基础。

**关键词:** 圆柚酮; 瓦伦西亚橘烯; 山梨木糖假丝酵母; 生物转化

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2025)11-0048-0011

doi: 10.19804/j.issn1006-2513.2025.11.007

## Screening of nootkatone-producing strains and optimization of fermentation conditions

PAN Yicheng, LIU Xiaoxuan, QIAN Min\*, WANG Qixuan, BAI Weidong, ZHAO Wenhong\*

(College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

**Abstract:** To use biotransformation method to produce non-toxic nootkatone, strains were isolated from the navel orange peels rich in valencene and nootkatone. Through primary and secondary screening, strains capable of converting valencene into nootkatone were selected. The screened strains were identified by 16S rDNA sequencing and subjected to genetic stability tests and fermentation condition optimization. The results indicated that the most efficient strain was identified as *Starmerella sorbosivorans*. The optimal fermentation conditions were as follows: 4.00 g/L Tween 80, 30.00  $\mu$ L valencene, pH 4.00, 0.50 g/L ferrous sulfate, 30.00 g/L malic acid and fermentation duration 48 h. Under the above conditions, the highest nootkatone yield reached 60.58 mg/L. Furthermore, the presence of magnesium ions was found to inhibit nootkatone synthesis by *Starmerella sorbosivorans* from valencene, while ferrous ions promoted it. These findings provide a foundation for the industrial production of nootkatone.

**Keywords:** nootkatone; valencene; *Starmerella sorbosivorans*; biotransformation

收稿日期: 2025-02-20

基金项目: 功能性内酯与手性香料绿色制备关键技术研发与示范 (2022B0202050003); 仲恺农业工程学院研究生创新基金 (KJ CX2024017)

作者简介: 潘奕丞 (2000-), 男, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全。E-mail: 2657378337@qq.com

\*通信作者: 钱敏 (1983-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 食品化学、食品加工与安全控制。E-mail: 35884770@qq.com

赵文红 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物。E-mail: 848060091@qq.com

圆柚酮 ((+)-nootkatone), 又称诺卡酮、香柏酮, 于 20 世纪 60 年代在阿拉斯加黄雪松的木质成分中首次发现, 是一种具有挥发性的双环倍半萜化合物<sup>[1]</sup>, 其熔点为 36~37 °C, 常温状态下为白色粉末状晶体, 不易溶于水, 易溶于乙醇和其他有机溶剂<sup>[2]</sup>。圆柚酮普遍存在于自然界各种柑橘类水果中, 如柠檬<sup>[3]</sup>、橙子<sup>[4]</sup>, 在其他植物中也有所存在, 如诺特卡柏<sup>[5]</sup>、香根草<sup>[6]</sup>、益智仁等<sup>[7]</sup>。圆柚酮在高浓度时呈现持久浓郁的柑橘味香气, 低浓度时呈现显著柚子香气<sup>[8]</sup>。圆柚酮含量最多的阿拉斯加黄柏生长周期较长, 生长速度缓慢<sup>[9]</sup>。此外, 相对含量较高的葡萄柚中提取 1 公斤圆柚酮需要 40 万公斤的原料<sup>[10]</sup>。因此天然存在的圆柚酮含量较低, 无法满足人们的工业需求, 且还存在香气阈值较高、经济价值低的异构体<sup>[8]</sup>, 如 4-表圆柚酮、异圆柚酮和 4-表异圆柚酮。因此天然提取法获得的柑橘精油成分复杂, 不同批次的香气差异较大<sup>[11]</sup>。并且从天然物质中提取圆柚酮的难度和成本较高, 其提取和应用也会受到制约<sup>[3]</sup>。然而化学合成圆柚酮都会采用污染环境的化学试剂, 包括重金属、致癌物、易燃物、强氧化物等, 又需要对环境付出高昂的维护成本, 使圆柚酮的工业生产变得十分复杂<sup>[12]</sup>。同时在合成过程中使用到对人体有害的化学品, 使其在食品或化妆品中的应用受到限制<sup>[13]</sup>。近些年来, 随着人们对食品质量安全的普遍提高, 消费者更加倾向于接受天然来源的食品添加剂产品, 根据我国 GB 29938-2020《食品安全国家标准食品用香料通则》的相关规定, 采用酶法或微生物法制造的香料可视为天然来源。

从瓦伦西亚橘烯到圆柚酮的生物转化法有细菌、丝状真菌和植物的全细胞系统、细胞提取物或纯化酶等方式<sup>[13]</sup>。植物全细胞系统对瓦伦西亚橘烯生物转化, 除柑橘类物种外一些小球藻种也有此转化能力。Fraatz 等<sup>[8]</sup>用担子菌侧耳属真菌实现了圆柚酮的高效转化, 在分析菌丝体转化圆柚酮时, 乌柏将被鉴定为最高效的生物转化器。将菌体基因导入宿主细胞, 使细胞色素 P450 酶在宿主中表达, 进而将瓦伦西亚橘烯转化为圆柚酮。

目前已有研究表明, 从原料中进行内源性微

生物的培养, 经筛选和纯化后, 可有效获取具有针对功能的菌株。例如, 卢玥等<sup>[14]</sup>从新鲜果皮中提取产香酵母, 舒学香等<sup>[15]</sup>从猕猴桃果皮中提取内源性酵母, 都可以获得针对提升果酒香气的菌株。本文从富含瓦伦西亚橘烯和圆柚酮的脐橙果皮中进行菌株的发酵和筛选, 旨在筛选出可利用成本较低且获取相对容易的瓦伦西亚橘烯为底物合成圆柚酮的菌株, 为圆柚酮大规模生产和商业化提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脐橙: 广州市海珠区万绿水果(江湾店); 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(BR): 海博生物科技有限公司; 牛肉膏(BR)、蓖麻油酸、圆柚酮(>99%): 上海麦克林生化科技股份有限公司; 蛋白胨(BR)、胰蛋白胨(BR)、酵母浸粉(BR)、D-山梨醇(BR): 北京索莱宝科技有限公司; 酵母提取粉(BR)、技术琼脂粉(BR): 广东环凯微生物科技有限公司; 硫酸铵(BR)、蔗糖(BR): 广州化学试剂厂; 柠檬酸氢二铵(BR)、果糖(BR)、乳糖(BR)、氯化钠(BR)、氯化镁(BR)、氯化钙(BR)、乳酸锌(BR)、硫酸亚铁(BR): 天津市大茂化学试剂厂; 葡萄糖(BR): 广东光华化学厂有限公司; D-(+)-木糖(BR)、甘露醇(BR)、木薯淀粉(BR): 上海源叶生物科技有限公司; 苹果酸(BR): 东莞市华井生物科技有限公司; 甘油(BR)、氯化钾(BR)、乙酸乙酯(BR): 天津市百世化工有限公司; 瓦伦西亚橘烯(≥70%): 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 吐温 80(TW80)(BR)、磷酸氢二钠(BR): 天津市永大化学试剂有限公司; 柠檬酸(BR): 天津市福晨化学试剂厂; 真菌菌种鉴定试剂盒: 生工生物工程(上海)股份有限公司

### 1.2 仪器与设备

7820A 气相色谱仪、6890-5973N 气质联用仪: 安捷伦科技(中国)有限公司; TG16-W 微量高速台式离心机: 长沙湘仪离心机仪器有限公司; BSA224S-CW 电子分析天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; SW-CJ-1FD 洁净工

作台：苏州安泰空气技术有限公司；LS-28HD 立式压力蒸汽灭菌锅：江阴滨江医疗设备有限公司；DJS-2013R-2 双层恒温振荡器：上海世平实验设备有限公司；B104LED 生物显微镜：重庆奥特光学仪器有限公司；MIX-25 迷你混合仪：杭州迷欧仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品处理

所购买脐橙于常温避光条件下进行存储，并尽快进行实验。

#### 1.3.2 实验方法

**1.3.2.1 圆柚酮标准溶液的配制** 准确称取 100.00 mg 圆柚酮标品，用乙酸乙酯溶解后转移至 10.00 mL 容量瓶中定容，配置成质量浓度为 10.00 g/L 的圆柚酮母液。移取 0.00、50.00、100.00、150.00、200.00、250.00、300.00  $\mu$ L 液至 10.00 mL 容量瓶中，用乙酸乙酯进行定容，配置成浓度为 0.00、50.00、100.00、150.00、200.00、250.00、300.00 mg/L 的标准溶液。将不同浓度的标准溶液用 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤至 2.00 mL 气相色谱小瓶中密封，在  $-20$   $^{\circ}$ C 条件下保存。

**1.3.2.2 脐橙表面无菌化处理** 用无菌水浸泡脐橙 30 s，随后在 70.00% 乙醇中浸泡 2.00 min，再用 2.50% NaClO 溶液（含浓度为 1.10 g/L 的 TW 80 浸泡 5 min 后转移至 70.00% 乙醇浸泡 30 s，最后使用无菌水充分洗涤脐橙 3 次，将无菌化处理后的脐橙置于无菌封口袋中，在  $4$   $^{\circ}$ C 下保藏备用。

**1.3.2.3 脐橙表面无菌化的检测** 取 1.00 mL 最后一次洗涤的无菌水至 10.00 mm 一次性培养皿中，加入约 15.00 mL 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基（YPD）固体培养基，摇晃均匀，等待培养基凝固后，在  $28$   $^{\circ}$ C 下培养 3 d，取培养基上菌落进行内源性微生物的提取。

**1.3.2.4 脐橙果皮内源性微生物的提取** 将无菌化处理后的脐橙果皮剥下，用无菌剪将其剪为 2.00 mm 的薄片，放置于 100.00 mL 无菌生理盐水中，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下震荡 24 h 进行内源性微生物的提取。

**1.3.2.5 脐橙果皮内源性微生物的分离** 移取 1.00 mL 震荡后生理盐水于 100.00 mL 的 YPD 液

体培养基，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下富集 48 h，随后将富集后的培养基进行在  $4$   $^{\circ}$ C，10000 r/min 下离心 5 min，去除上层培养基，用无菌生理盐水洗涤 2 次，并用无菌生理盐水将其 OD<sub>600</sub> 调成 0.60~0.80，同时用生理盐水稀释 10、100、1000 倍。吸取 100.00  $\mu$ L 稀释后不同倍数的生理盐水涂抹于 YPD 固体培养基中，在  $28$   $^{\circ}$ C 条件下培养 3 d，选取菌落总数适宜的培养基进行单菌落挑取。

**1.3.2.6 产圆柚酮菌株的初筛** 挑取单菌落于 30.00 mL YPD 液体培养基中，加入 30.00  $\mu$ L 瓦伦西亚橘烯，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 下培养 48 h，选取发酵液无恶臭的单菌落进行复筛。

**1.3.2.7 产圆柚酮菌株的纯化** 挑取发酵液无恶臭味的单菌落在 YPD 固体培养基中进行划线，在  $28$   $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h，挑取培养基中最大的单菌落再进行平板划线，在  $28$   $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h，重复 3 次，进行菌体纯化。

**1.3.2.8 产圆柚酮菌株的复筛** 挑取纯化后的单菌落置于 30.00 mL YPD 液体培养基中，加入 30.00  $\mu$ L 瓦伦西亚橘烯，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 下培养 48 h，吸取 1.00 mL 发酵液于 5.00 mL 离心管中，加入 1.00 mL 乙酸乙酯，涡旋 30 s，每 10 s 上下颠倒 2 次，随后在 10000 r/min 条件下离心 6 min，用 1.00 mL 无菌注射器吸取上层澄清液，经过 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤于 2.00 mL 气相色谱小瓶中密封，放置于  $-20$   $^{\circ}$ C 进行保藏。将萃取液用 GC-MS 进行检测，选取产物中含圆柚酮的菌株与 100.00 mL YPD 培养基培养 12 h，移取富集液进冻存管中，与 30.00% 甘油管 1:1 混合并涡旋，于  $-80$   $^{\circ}$ C 冰箱保藏备用。

**1.3.2.9 菌种形态鉴定** 吸取 10.00  $\mu$ L 甘油管菌于 50.00 mL YPD 培养基中，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下活化 48 h，吸取活化后培养基 1.00 mL 于 100.00 mL YPD 中进行培养，在  $28$   $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下富集培养 24 h。将 5 滴无菌生理盐水滴于洁净载玻片上，吸取 10.00  $\mu$ L 富集后培养基与其混合均匀，在酒精灯下低温烘干，随后用次甲基蓝溶液染色 30 s，使用无菌水洗涤多余染料后用显微镜观察菌株形态。

**1.3.2.10 菌种鉴定** 用无菌接种环粘取甘油管菌于 YPD 固体培养基上进行划线，在  $28$   $^{\circ}$ C 条件

下培养 48 h, 刮取菌体至无菌离心管中, 按真菌菌种鉴定试剂盒说明进行操作, 提取目标菌体粗 DNA, 选择相应引物扩增特异片段, 送测序。测序结果在 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上进行比对分析, 一般将在 NCBI 上比对得到的同源性在 97% 以上且同源性最高的物种判断为样品的种属。

**1.3.2.11 产圆柚酮菌株的遗传稳定性分析** 重复 1.3.2.9 的方法进行菌株活化, 挑取最大的单菌落于 50.00 mL YPD 培养基中培养 12 h, 将其视为第一代菌, 随后吸取 1.00 mL 第一代菌发酵液于新的 50.00 mL YPD 培养基中培养 12 h, 将其视为第二代菌, 共培养 20 代, 选取 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 代菌于 30.00 mL YPD 培养基中进行圆柚酮的转化试验, 菌种接种量为 10.00 g/L, 瓦伦西亚橘烯质量浓度为 1.00 g/L, 发酵 48 h。将发酵液进行萃取, 萃取方法同 1.3.2.8, 用气相色谱进行圆柚酮质量浓度的测试。

**1.3.2.12 pH 值对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: YPD 培养基 50.00 g/L、TW 80 添加量为 4.00 g/L, 用 0.10 mol/L 的柠檬酸溶液和 0.20 mol/L 的磷酸氢二钠缓冲液将培养基 pH 分别调节为 3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00。每 250.00 mL 锥形瓶装液体积 30.00 mL, 高压蒸汽灭菌 0.10 MPa, 121 °C, 15 min。冷却后, 接种质量浓度为 10.00 g/L 的湿酵母, 于 28 °C, 150 r/min 生物转化 48 h, 取发酵后培养基进行圆柚酮产量的检测。

**1.3.2.13 氮源种类对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 葡萄糖添加量为 20.00 g/L、TW 80 添加量为 4.00 g/L, 氮源分别为酵母提取粉、酵母浸粉、蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、柠檬酸氢二铵, 添加量均为 30.00 g/L, 调 pH 为 4.00, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。

**1.3.2.14 碳源种类对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 牛肉膏添加量为 30.00 g/L、TW 80 添加量为 4.00 g/L, 碳源分别为葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、D-(+) 木糖、D- 山梨醇、苹果酸、甘露醇、甘油、蓖麻油酸、木薯淀粉, 添加量均为 30.00 g/L、pH 为 4.00, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。

**1.3.2.15 金属盐种类对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 牛肉膏添加量为 30.00 g/L、苹果酸添加量为 20.00 g/L、TW80 添加量为 4.00 g/L、金属盐分别为氯化钾、氯化钠、氯化镁、氯化钙、硫酸亚铁、乳酸锌, 对应金属离子添加量均设置为 100.00 mg/L, pH 为 4.00, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。

**1.3.2.16 硫酸亚铁添加量对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 牛肉膏添加量为 30.00 g/L、苹果酸添加量为 20.00 g/L、TW80 添加量为 4.00 g/L, pH 为 4.00, 硫酸亚铁添加量分别为 0.00、0.25、0.5、0.75、1.00 g/L, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。探究不同苹果酸添加量对圆柚酮产量的影响。

**1.3.2.17 苹果酸添加量对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 牛肉膏添加量为 30.00 g/L、TW 80 添加量为 4.00 g/L、硫酸亚铁添加量为 0.50 g/L, pH 为 4.00, 苹果酸添加量分别为 0.00、10.00、20.00、30.00、40.00 g/L, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。探究不同苹果酸添加量对圆柚酮产量的影响。

**1.3.2.18 牛肉膏添加量对圆柚酮产量的影响** 生物转化基质配方: 苹果酸添加量为 30.00 g/L、TW 80 添加量为 4.00 g/L、硫酸亚铁添加量为 0.50 g/L, pH 为 4.00, 牛肉膏添加量分别为 0.00、15.00、30.00、45.00、60.00 g/L, 装液量、灭菌方法及接种量同 1.3.2.12。探究不同牛肉膏添加量对圆柚酮产量的影响。

### 1.3.3 分析检测

**1.3.3.1 气相色谱 (GC) 条件** 参考刘慧<sup>[2]</sup>的方法并稍作修改。色谱柱: HP-5MS (30.00 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 柱子氮气流量 1.00 mL/min; 检测器: 火焰离子化检测器 (FID); 进样口温度: 250 °C, 压力 4.96 psi, 进样量 1.00 μL; 升温程序: 初始温度 50 °C, 以 20 °C/min 升至 160 °C, 保持 3 min 再以 13 °C/min 升至 210 °C, 保持 1 min; 后运行温度 220 °C, 时间 3 min; 载气: 高纯氮气, 分流比 1: 50。氢气流量 35.00 mL/min, 空气流速 350.00 mL/min, 尾吹流量 21.00 mL/min。

**1.3.3.2 圆柚酮气相色谱标准曲线的建立** 利用

GC 测定不同质量浓度圆柚酮峰面积，以圆柚酮质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，利用 Excel 进行线性回归分析。所得回归方程如图 1 所示，圆柚酮峰面积与其质量浓度在一定范围内成线性关系，且  $R^2 > 0.99$ ，表明该回归方程拟合程度好，可用于后续实验定量分析。

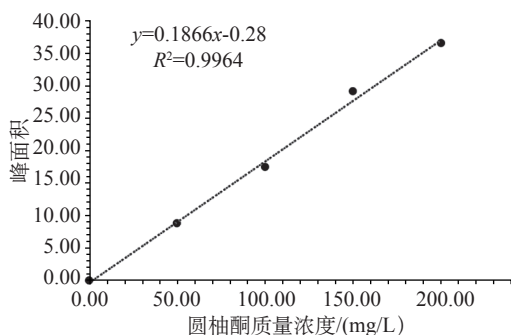


图 1 圆柚酮标准曲线

Figure 1 Standard curve for nootkatone

**1.3.3.3 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 条件** 根据气相结果，推测瓦伦西亚橘烯出峰温度为 160 °C 左右，圆柚酮出峰温度为 200 °C 左右，为更为全面检测发酵液成分组成，选取 DB-Wax 色谱柱进行分离，将初始温度定为 50 °C，随后以 10 °C/min 进行缓慢升温，以在可以鉴定到瓦伦西亚橘烯和圆柚酮的前体下，挖掘菌体发酵所产生的其他成分。

GC 条件：色谱柱：DB-Wax (30.00 m × 0.25 mm × 0.25 μm)；进样口温度：250 °C。升温程序：初始温度 100 °C，保持 3 min。随后以 10 °C/min 升至 210 °C，保持 3 min，后运行温度 220 °C，时间 3 min；载气为高纯氮气，采用不分流进样方式。

MS 条件：电子轰击 (electron impact, EI) 离子源，电子能量为 70.00 eV，四极杆温度 150 °C，离子源温度 230 °C，质谱接口温度 280 °C，扫描范围 35.00 ~ 500.00 amu。

## 1.4 技术路线

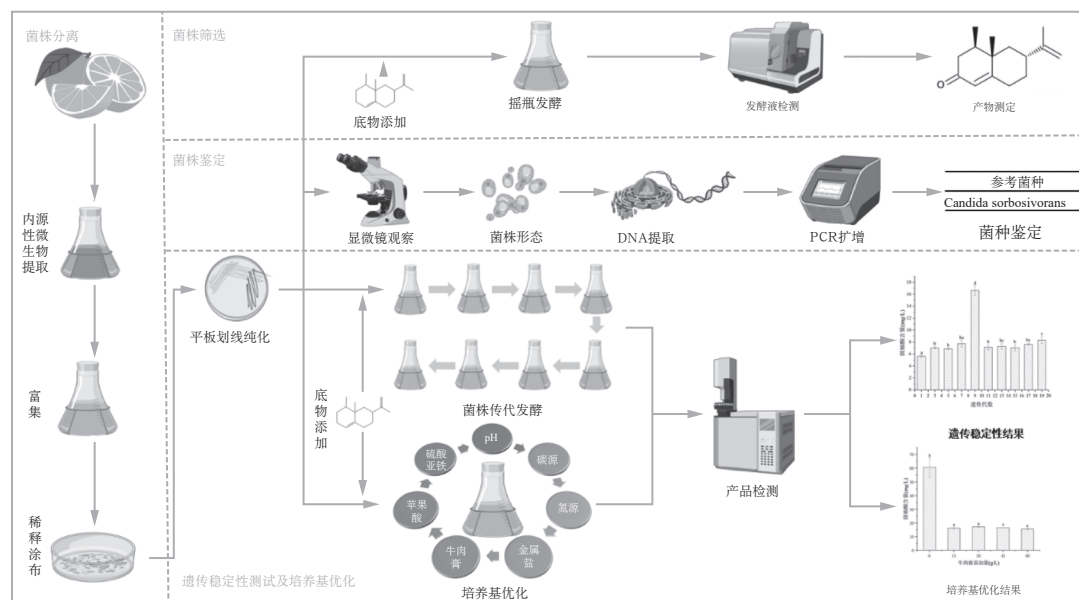


图 2 技术路线图

Figure 2 Technical roadmap

## 1.5 数据处理

实验所得结果用 Excel 2021 进行整理，并用 Origin 2021 和 PowerPoint 2021 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种的筛选和鉴定

#### 2.1.1 菌种的初筛

以发酵液无恶臭的单菌落为指标进行菌种筛

选。通过分离得到脐橙果皮内源性微生物如图3所示,挑取单菌落置于 YPD 培养基中进行初筛,培养一段时间后,选取六组无恶臭味的培养液进行单菌落纯化。

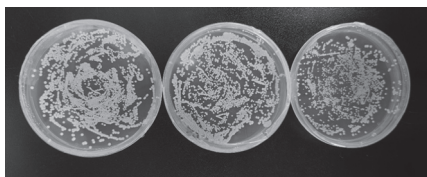


图3 橙皮内源性微生物分离菌落  
Figure 3 Isolated microbial colonies from the orange peel endogenous microorganism

### 2.1.2 GC-MS 分析结果

将筛选出的菌种进行瓦伦西亚橘烯生物发酵实验,进一步筛选出具有产圆柚酮能力的菌株。通过 GC-MS 对复筛菌株发酵液进行测定,发现其中一株菌发酵液在 11.15 min 出峰的物质与圆柚酮匹配度达到 91%,判断该物质为圆柚酮,证明该菌株具备催化瓦伦西亚橘烯合成圆柚酮的能力,将该菌株暂时命名为 P1。

### 2.1.3 菌种鉴定

复筛选出的菌落形态如图5所示,单菌落均呈突起卵圆形,表面光滑湿润,颜色呈乳白色。经染色后镜检结果如图6所示,单菌外观呈现椭

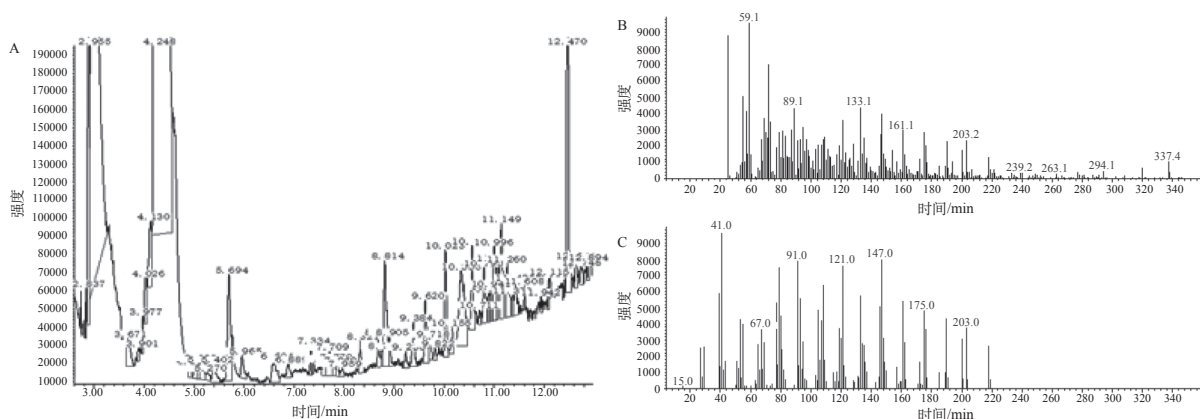


图4 GC-MS 测试结果  
Figure 4 GC-MS test results

表1 GC-MS 数据整理表  
Table 1 GC-MS result

RT/min	中文名称	CAS 号	匹配度	相对百分含量 /%
3.9	<i>g</i> - 瑟林烯	000515-17-3	89	0.07
3.98	$\beta$ - 橄榄烯	000489-29-2	98	0.16
4.13	瑟琳-4,7-二烯	103827-22-1	95	0.91
4.25	佛术烯	010219-75-7	99	65.55
5.04	诺卡烯	005090-61-9	81	0.13
5.70	苯乙醇	000060-12-8	91	1.01
5.97	(+)- <i>P</i> -薄荷-1-烯-9-醇	018479-68-0	86	0.2
8.81	9-羟基吡啶基富烯	1000163-46-6	97	0.92
10.80	反油酸乙酯	006114-18-7	98	0.38
11.15	圆柚酮	004674-50-4	91	0.74
11.26	芥酸酰胺	000112-84-5	83	1.48
12.47	邻苯二甲酸异丁酯	017851-53-5	91	2.50

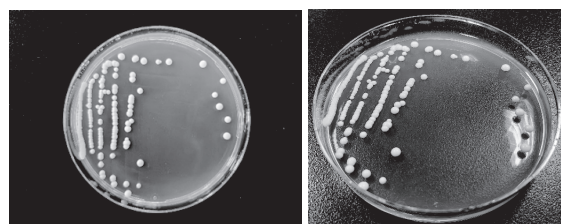


图5 P1 菌平板菌落形态  
Figure 5 Colony morphology of strain P1 on agar plate

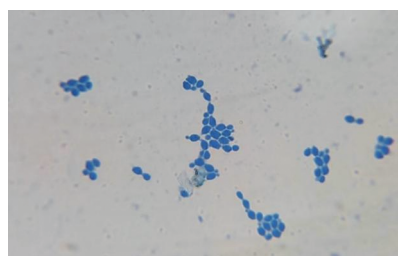


图6 P1 菌镜检结果  
Figure 6 The microscopic observation of strain P1

圆形且可看出为芽孢繁殖, 结合 16S rDNA 分析结果, 判断该菌株为山梨木糖假丝酵母。研究发现山梨木糖假丝酵母具备稳定性好、立体选择性严格、且产物光学纯度较高的优点, 常用于制备 (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯<sup>[16]</sup>。而该菌种鉴定结果表明山梨木糖假丝酵母可能存在特定的细胞色素氧化酶 CYP450 和氧合酶, 能将瓦伦西亚橘烯氧化生成圆柚酮<sup>[2]</sup>。同时结合气质数据结果, 发现中间产物并不存在诺卡醇, 而是存在较特殊的中间体诺卡烯, 与目前合成通路的研究<sup>[17-19]</sup>有所差异, 猜测山梨木糖假丝酵母具备较特殊的蛋白酶和代谢通路将瓦伦西亚橘烯转化为圆柚酮。

表 2 菌种鉴定报告  
Table 2 Strain identification report

样品名称	同源性	参考菌种
P1	348/348 (100%)	<i>Starmerella sorbosivorans</i>

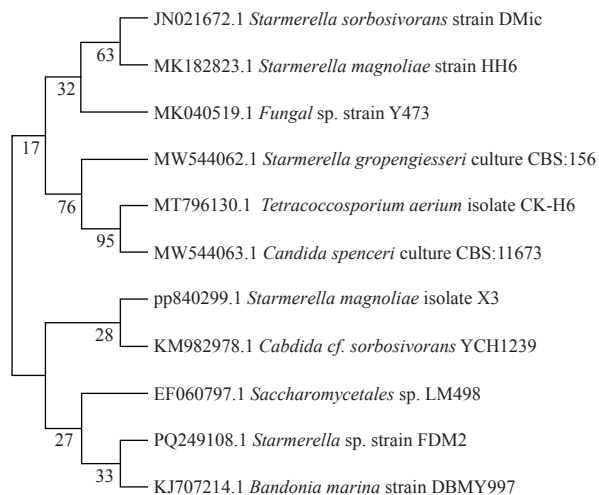


图 7 P1 菌种进化树

Figure 7 The evolutionary tree of P1 bacterial strains

## 2.2 菌株的遗传稳定性分析

以原始菌稀释涂布所得的最大单菌落为研究对象, 连续培养传代 20 次并进行发酵实验, 结果如图 7 所示, 当菌株为第一代时, 圆柚酮质量浓度最低, 为 5.63 mg/L, 其原因可能是菌种刚从 -80 °C 复苏, 其酶活性低于传代后的<sup>[18]</sup>。当遗传第九代时圆柚酮质量浓度最高, 为 16.63 mg/L, 与其他代数菌株相比呈现出显著性差异 ( $P <$

0.05), 其原因可能是当遗传代数增多时菌株碱基对发生变化, 导致 DNA 对错配基因进行修复时发生大量突变, 而使菌株催化瓦伦西亚橘烯转化为圆柚酮的能力提高。除第 1 代与第 9 代菌圆柚酮产量有较大波动外, 其余圆柚酮产量没有呈现出显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 证明该菌株遗传相对稳定。

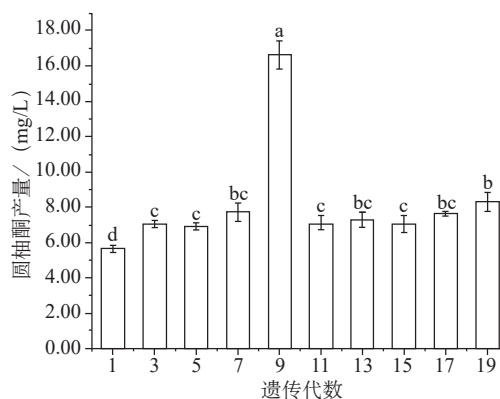


图 8 遗传代数对圆柚酮产量的影响

Figure 8 Influence of successive generations on nootkatone yield

注: 不同小写字母表示组间差异显著,  $P < 0.05$ , 下同

## 2.3 发酵条件的优化

### 2.3.1 pH 对圆柚酮产量的影响

pH 的变化可以改变营养物质的电离程度<sup>[19]</sup>, 从而影响细胞对营养物质的吸收, 且 pH 值的不同会影响酶活性<sup>[20]</sup>, 对菌体生长和圆柚酮产量造成影响。结果如图 9 所示, 当 pH 为 4 时, 圆柚酮产量最高, 为 8.50 mg/L, 与其他条件呈现出显著性差异 ( $P < 0.05$ )。因此发酵培养基 pH 确定为 4, 在此条件下圆柚酮转化能力更强。

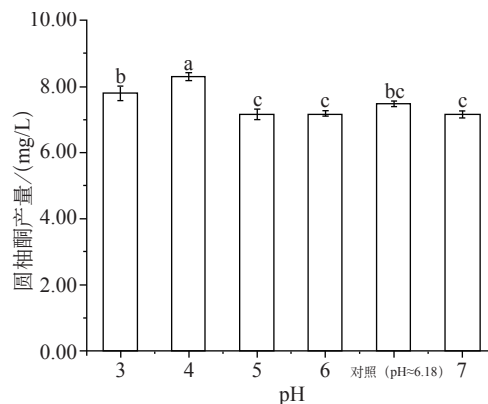


图 9 pH 对圆柚酮产量的影响

Figure 9 The effect of pH on the yield of nootkatone

### 2.3.2 氮源种类对圆柚酮产量的影响

氮源是指可以作为构成生物体的蛋白质、核酸以及其它氮化合物的原料,包括无机氮和有机氮<sup>[21]</sup>。微生物生长和酶的合成需要氮源的供应,不同类型氮源对微生物生长及酶的合成起着不同的影响。结果如图 10 所示,有机氮源相比于无机氮源更有益于圆柚酮菌转化,且呈现出显著性差异( $P<0.05$ ),其原因可能是微生物对有机氮源利用率较高,生长较为旺盛<sup>[22]</sup>。实验选取 7 种不同氮源进行圆柚酮产量测定,结果显示当唯一氮源为牛肉膏时,山梨木糖假丝酵母合成圆柚酮产量最高,达到 10.39 mg/L,可能是由于牛肉膏富含菌体所需的必需氨基酸、维生素等营养物质,而微生物体内的转氨和脱氨作用需要氨基酸的参与,并且维生素能参与细胞内生命活动,提高酵母菌株产酶效果,进而提高其催化效率<sup>[23]</sup>。因此后续实验选取牛肉膏作为唯一氮源。在不同氮源下,李晓<sup>[24]</sup>实验结果表明蛋白胨是最有利于瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮的一种氮源与本研究结果一致。

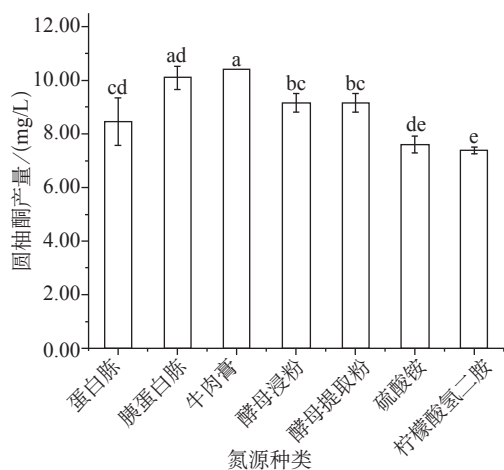


图 10 氮源种类对圆柚酮产量的影响

Figure 10 The effect of nitrogen sources on the yield of nootkatone

### 2.3.3 碳源种类对圆柚酮产量的影响

碳源是合成微生物细胞内大分子化合物所必需的营养素,在细胞生长繁殖过程中提供能量的同时又为次级代谢产物提供前体物质<sup>[21]</sup>。实验分别选取 11 种碳源进行发酵,结果如图 11 所示,所有碳源均可促使山梨木糖假丝酵母将瓦伦西亚

橘烯转化生成圆柚酮,但不同碳源转化率不同,其中苹果酸作为唯一碳源时,圆柚酮产量最高,为 12.93 mg/L,与其他类型碳源呈现出显著性差异( $P<0.05$ ),其原因可能是该酵母线粒体中存在苹果酸脱氢酶,可以直接利用苹果酸产生更多的能量,并且能减少线性电子传递时生成还原氢过程中对细胞的损伤<sup>[25]</sup>。使用发酵碳源会产生克拉布特里效应,酵母利用碳源发酵时会产生大量乙醇而抑制细胞生长<sup>[26]</sup>,而使用苹果酸可以避免乙醇对酵母的线粒体产生损伤<sup>[27]</sup>,因此,酵母将保持完整的线粒体并发展出高呼吸活性,为天然产物的合成,提供了充足能量和平衡辅因子的条件。后续选取苹果酸作为唯一碳源。

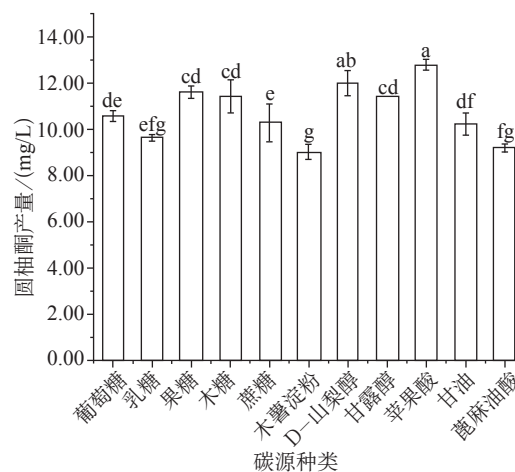


图 11 碳源种类对圆柚酮产量的影响

Figure 11 The effect of carbon sources on the yield of nootkatone

### 2.3.4 金属盐种类对圆柚酮产量的影响

除了碳源和氮源外,金属微量元素也是微生物生长所需要的必备成分,可参与微生物的代谢途径,促进酶活性,进而加速代谢反应<sup>[21]</sup>。此外,金属离子还能发挥调节细胞内外渗透压的作用,维持细胞的内稳态,平衡渗透压<sup>[28]</sup>。结果如图 12 所示,当添加金属盐为硫酸亚铁时,圆柚酮产量达 19.21 mg/L,远高于其他金属盐,呈现出显著性差异( $P<0.05$ ),其原因可能是  $Fe^{2+}$  提供 CYP450 酶系需要的电子<sup>[29]</sup>,在 CYP450 酶将瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮这一代谢过程中起着重要作用<sup>[10]</sup>。其余金属盐添加组除氯化镁对圆柚酮产量造成显著性降低外( $P<0.05$ ),均与对照

组未呈现出显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 其原因可能是  $Mg^{2+}$  对反应的相关酶具有抑制作用, 减少了圆柚酮的生成, 而其余金属离子的加入对山梨木糖假丝酵母无影响。后续实验所添加金属盐为硫酸亚铁。

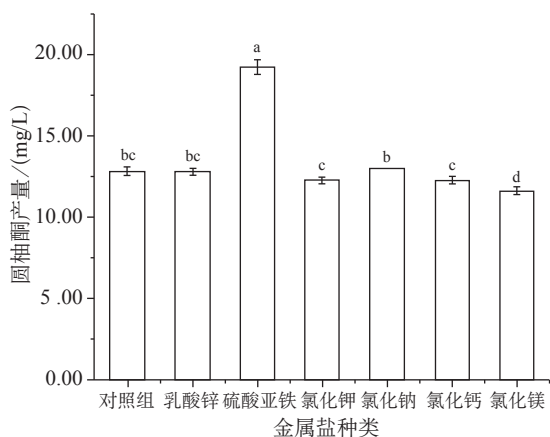


图 12 金属盐种类对圆柚酮产量的影响  
Figure 12 The effect of metal salts on the yield of nootkatone

### 2.3.5 铁离子添加量对圆柚酮产量的影响

微生物在生长繁殖过程中, 需要一些无机盐和微量元素来保证其生理过程地进行, 这部分物质常作为酶的辅基和激活剂<sup>[21]</sup>。结果如图 13 所示, 随着硫酸亚铁添加量的升高, 圆柚酮产量逐步上升, 当硫酸亚铁添加量为 0.75 g/L 时, 圆柚酮产量最高, 达 20.56 mg/L, 随着硫酸亚铁添加量进一步增加到 1.00 g/L, 圆柚酮产量下降到 19.89 mg/L, 其原因可能是酵母内部的 CYP450 酶能将  $Fe^{2+}$  氧化得到电子<sup>[29]</sup>, 随着硫酸亚铁添加

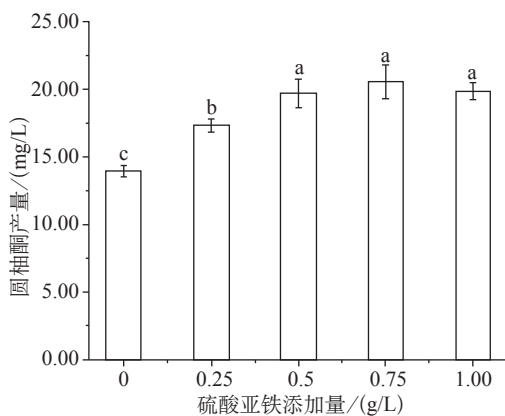


图 13 硫酸亚铁添加量对圆柚酮产量的影响  
Figure 13 The effect of ferrous sulfate amount on the yield of nootkatone

量的增加, CYP450 酶催化能力提高, 造成圆柚酮含量的升高, 但添加的硫酸亚铁具备杀菌作用<sup>[30]</sup>。当硫酸亚铁质量浓度提高至一定程度, CYP450 酶催化能力达到饱和, 因此硫酸亚铁添加量在 0.50~1.00 mg/L 区段内圆柚酮产量没有呈现出显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 后续实验硫酸亚铁添加量确定为 0.50 g/L。

### 2.3.6 苹果酸添加量对圆柚酮产量的影响

结果如图 14 所示, 未添加苹果酸时, 圆柚酮产量为 18.53 mg/L, 随着苹果酸的添加, 圆柚酮产量呈现出先下降, 后上升再下降的趋势, 其原因可能是当未添加苹果酸时, 发酵体系中缺失碳源, 导致酵母不能生长繁殖, 进入全细胞催化模式<sup>[31]</sup>。随着苹果酸的添加, 碳源和氮源优先被利用于生长繁殖, 酵母进入繁殖状态, CYP450 酶生成量降低, 导致圆柚酮产量下降<sup>[32]</sup>。当苹果酸的质量浓度进一步提高时, 酵母繁殖速度进一步提高, 在相同时间内, 菌体浓度更高, 导致整体发酵液中酶的含量更高, 因此圆柚酮产量较高, 并且说明该酵母菌株有较强的降酸能力, 能分解苹果酸为其提供能量。当苹果酸添加量到达 40.00 g/L 时, 过高的苹果酸会让发酵液渗透压升高, 导致酵母体内水分浓度降低, 酶分子无法与自由水结合来发挥生物催化活性, 从而影响酶催化合成圆柚酮<sup>[33]</sup>, 因此呈现下降趋势。当苹果酸添加量为 30.00 g/L 时, 圆柚酮产量最高, 为 20.39 mg/L。因此后续实验确定苹果酸质量浓度为 30.00 g/L。

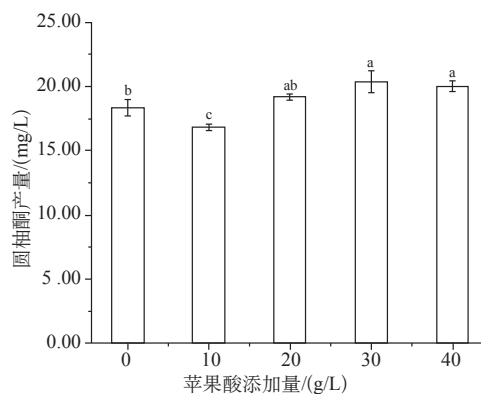


图 14 苹果酸添加量对圆柚酮产量的影响  
Figure 14 The effect of malic acid on the yield of nootkatone

### 2.3.7 牛肉膏添加量对圆柚酮产量的影响

氮源在菌体发酵过程中主要有两种生理功能，一是构成细胞物质，二是提供细胞活动所需要的能量<sup>[21]</sup>。实验结果如图 15 所示，在不添加牛肉膏时，圆柚酮产量高达 60.58 mg/L，与其他实验组呈现出显著性差异 ( $P < 0.05$ )，远高于添加牛肉膏为氮源时瓦伦西亚橘烯转化生成圆柚酮的产量，其原因可能是未添加牛肉膏时，酵母进入全细胞转化圆柚酮<sup>[31]</sup>，培养基中苹果酸被消耗后产生的能量直接供应于酶催化反应。而加入牛肉膏后，酵母利用其进行生长繁殖，导致酵母倾向于生长繁殖，导致酵母体内相关催化酶的转化含量下降，圆柚酮产量低于未添加牛肉膏组。因此实验确定不添加牛肉膏进行发酵时，圆柚酮产量最高。

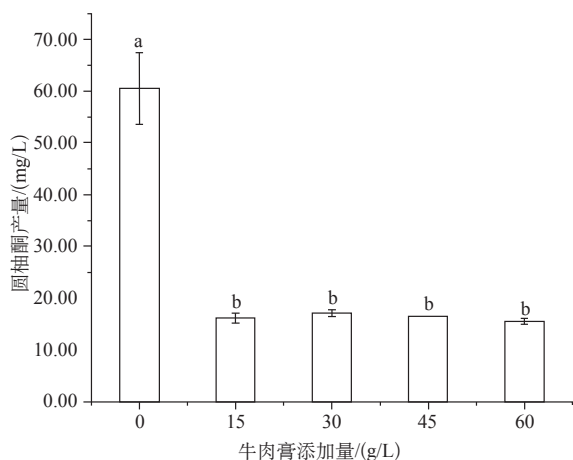


图 15 牛肉膏添加量对圆柚酮产量的影响

Figure 15 The effect of beef extract on the yield of nootkatone

李晓等<sup>[24]</sup>利用解脂耶氏酵母实现了瓦伦西亚橘烯到圆柚酮的高效生物转化，在乳糖为 40.00 g/L，蛋白胨为 15.00 g/L， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 0.60 g/L 条件下圆柚酮产量最高，产量高达 457.32 mg/L，转化率为 49%。Girhard 等<sup>[34]</sup>研究表明枯草芽孢杆菌的细胞色素 CYP109B1 对瓦伦西亚橘烯的转化能产生六种氧化产物，其中圆柚醇和圆柚酮含量较多，并在水性环境下能促使细胞酶 CYP109B1 对瓦伦西亚橘烯的生物催化而提高圆柚酮产量。

本实验筛选出圆柚酮转化菌为山梨木糖假丝酵母，培养基最佳条件 pH 为 4.00，苹果酸为 30.00 g/L，硫酸亚铁为 0.50 g/L，TW 80 为 4.00 g/L

时，圆柚酮产量为 60.58 mg/L。稍高于刘慧<sup>[2]</sup>的 59.78 mg/L，但相比于其他转化菌，圆柚酮的产量偏低，山梨木糖假丝酵母将瓦伦西亚橘烯转化为圆柚酮的能力较弱，且培养基组分碳源、氮源不一致，是由于不同微生物生长条件不一致。

### 3 结论

本实验从富含瓦伦西亚橘烯和圆柚酮的脐橙果皮中进行菌株的分离，筛选出高产圆柚酮的菌种，然后进行鉴定，最后通过培养条件的优化以提高圆柚酮的产量。从脐橙果皮中筛选出产圆柚酮的菌种，通过菌株形态观察和 16S rDNA 测序对所筛菌株进行菌种鉴定，确定所筛菌株为山梨木糖假丝酵母。通过遗传稳定性测试，发现当菌株遗传第 9 代时圆柚酮产量最高，且除第 1 代与第 9 代菌外其余代菌所转化的圆柚酮产量没有呈现出显著性差异，确定该酵母具备稳定催化瓦伦西亚橘烯合成圆柚酮能力。对筛选菌株进行培养条件优化，在吐温 80 为 4.00 g/L，瓦伦西亚橘烯为 30.00  $\mu\text{L}$  的基础下，当 pH 调整为 4.00 时，该菌株圆柚酮产量为 8.50 mg/L；在所添加金属盐选择硫酸亚铁且质量浓度达到 0.50 g/L 时，圆柚酮质量浓度提升至 19.39 mg/L；当唯一碳源选择苹果酸且添加量为 30.00 g/L，圆柚酮产量升高至 20.39 mg/L；当不添加任何氮源进行发酵时，山梨木糖假丝酵母催化瓦伦西亚橘烯生成圆柚酮的产量最高，为 60.58 mg/L。此外，该研究发现，硫酸亚铁对圆柚酮的生产具有促进作用，在相同研究中也存在相似的情况，同时发现镁离子的存在可抑制山梨木糖假丝酵母利用瓦伦西亚橘烯合成圆柚酮，后续可根据该现象进行转录组和蛋白组分析，利用亚铁离子的促进作用以及镁离子的抑制作用精确定位相关基因和催化酶，为圆柚酮的工业化生产提供进一步的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Erdtman H, Hirose Y, Theander O. The chemistry of the natural order Cupressales. 46. The structure of nootkatone [J]. Acta Chemica Scandinavica, 1962, 16: 1311-1314.
- [2] 刘慧. 酿酒酵母合成植物倍半萜类圆柚酮代谢途径的设计与构建 [D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [3] Villafañe E, Tolosa D, Bardón A, et al. Toxic effects of *Citrus aurantium* and *C. Limon* essential oils on *Spodoptera*

- frugiperda (Lepidoptera : Noctuidae) [J]. Natural Product Communications, 2011, 6 (9) : 1389–1392.
- [4] Castillo–Araiza C O, Palmerin–Carreño D, Prado–Barragán A, et al. On the conceptual design of a partitioning technology for the bioconversion of (+) –valencene to (+) –nootkatone on whole cells : Experimentation and modelling [J]. Chemical Engineering and Processing : Process Intensification, 2017, 122 : 493–507.
- [5] Ramachandran R, Schaefer B. (+) –nootkatone, the flavor of grapefruit [J]. ChemTexts, 2024, 10 (4) : 11.
- [6] Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, et al. Unravelling the scent of vetiver : Identification of character–impact compounds [J]. Chemistry & Biodiversity, 2014, 11 (11) : 1821–1842.
- [7] Liao J F, Zhao X Y. Recent research progress on the chemical constituents, pharmacology, and pharmacokinetics of alpinia oxyphylla fructus [J]. Molecules, 2024, 29 (16) : 3905.
- [8] 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.
- [9] Beier C M, Sink S E, Hennon P E, et al. Twentieth–century warming and the dendroclimatology of declining yellow–cedar forests in southeastern Alaska [J]. Canadian Journal of Forest Research, 2008, 38 (6) : 1319–1334.
- [10] Liu T, Li W, Chen H F, et al. Systematic optimization of HPO–CPR to boost (+) –nootkatone synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70 (49) : 15548–15559.
- [11] 王帅斌. 高速逆流色谱分离益智中诺卡酮香味物质的研究 [D]. 北京 : 北京工商大学, 2009.
- [12] Shaffer G W, Eschinas E H, Purzycki K L, et al. Oxidations of valencene [J]. The Journal of Organic Chemistry, 1975, 40 (15) : 2181–2185.
- [13] Fraatz M A, Berger R G, Zorn H. Nootkatone : A biotechnological challenge [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83 (1) : 35–41.
- [14] 卢玥, 杨易坤, 郑若欣, 等. 产香酵母的筛选鉴定、生长特性及其混菌发酵果酒应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2025, 31 (2) : 282–294.
- [15] 舒学香, 周文, 吴霞, 等. 猕猴桃果酒酿造专用酵母菌株的筛选 [J]. 中国酿造, 2021, 40 (8) : 99–104.
- [16] 郑裕国, 孙丽慧, 舒学香, 等. 山梨木糖假丝酵母及其在制备 (s) –4–氯–3–羟基丁酸乙酯中的应用 : 201210594514.5 [P]. 2012–12–31.
- [17] Makhubela I M, Zawaira A, Brady D, et al. Multifactorial optimization enables the identification of a greener method to produce (+) –nootkatone [J]. Journal of Biotechnology, 2024, 393 : 41–48.
- [18] Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Young D I, et al. A bacterial cytokine [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95 (15) : 8916–8921.
- [19] 袁麒, 王旭苹, 杨怀谷, 等. 不同 pH 条件下乳清蛋白–桑椹多酚复合营养粉的制备及其理化性质 [J]. 现代食品科技, 2023, 39 (5) : 164–174.
- [20] 张磊, 罗泽华, 杨明川, 等. 雪茄烟叶原料发酵微生物多样性及酶活变化研究 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23 (10) : 171–180.
- [21] 周德庆. 微生物学教程 (第4版) [M]. 北京 : 高等教育出版社, 2020.
- [22] 梁安健, 石沁兰, 王金丽, 等. 产蛋白酶波茨坦短芽孢杆菌的鉴定及产酶条件优化 [J]. 现代食品科技, 2024, 40 (5) : 73–83.
- [23] 张晓瑞, 刘晓晖, 付博, 等. 烟草中淀粉降解菌的筛选、鉴定及发酵工艺优化 [J]. 食品与机械, 2021, 37 (2) : 34–41.
- [24] 李晓. 瓦伦西亚橘烯生物转化生成圆柚酮的研究 [D]. 武汉 : 华中农业大学, 2019.
- [25] Ivanov B, Asada K, Edwards G E. Analysis of donors of electrons to photosystem I and cyclic electron flow by redox kinetics of P700 in chloroplasts of isolated bundle sheath strands of maize [J]. Photosynthesis Research, 2007, 92 (1) : 65–74.
- [26] Johnston M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells [J]. Trends in Genetics, 1999, 15 (1) : 29–33.
- [27] 李雪梅, 康萌, 万静之, 等. 酒精性肝病中的铁死亡机制研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2024, 36 (1) : 66–69, 76.
- [28] 相启森, 岳田利, 袁亚宏, 等. 金属离子对褐黄孢链霉菌生长和纳他霉素生物合成的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 : 自然科学版, 2010, 38 (1) : 209–215.
- [29] 魏琦. 雄烯二酮 11 $\alpha$  羟化的球孢白僵菌菌株筛选及其转化工艺研究 [D]. 武汉 : 华中农业大学, 2007.
- [30] 蒋武成, 萧克宇, 徐文元. 硫酸亚铁对某些病原菌的杀灭试验 [J]. 湖南农学院学报, 1991, 17 (2) : 197–200.
- [31] 向梦杰. 合成谷蓝工程菌株的构建及全细胞催化 [D]. 福州 : 福建师范大学, 2021.
- [32] 田景芝. 蜂蜜酒酵母菌株的筛选及发酵工艺的研究 [D]. 福州 : 福建农林大学, 2010.
- [33] 徐晓敏. 毕赤酵母表面展示脂肪酶 CALB 全细胞催化合成肉桂醇酯 [D]. 广州 : 华南理工大学, 2018.
- [34] 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]. Microbial Cell Factories, 2009, 8 : 36.

《中国食品添加剂》杂志—中国科技核心期刊、RCCSE中国核心学术期刊

欢迎投稿!