

微生物降解没食子酸生产焦性没食子酸的研究进展

李文君¹, 王成章^{1,2*}

- (1. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所, 生物质化学利用国家工程实验室, 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 南京 210042;
2. 中国林业科学研究院 林业新技术研究所, 北京 100091)

[摘要] 焦性没食子酸是一种用途广泛的化工原料和试剂,多以化学法由没食子酸脱羧制备。文章针对该方法导致的严重环境污染和设备腐蚀等问题,从微生物转化的角度,重点综述降解没食子酸生产焦性没食子酸的微生物菌株及其相关工艺研究,如碳源、底物浓度、pH、发酵时间对焦性没食子酸得率的影响。同时也介绍了影响没食子酸脱羧酶(GAD)活性和产量的相关因素,如pH、温度、金属离子、添加剂等。然后,文章简要概括了利用微生物处理没食子单宁加工生产过程中的废水等问题。最后,文章通过展望了今后焦性没食子酸的生产制备工艺,作出了思考,为微生物转化法生产焦性没食子酸的工业化生产提供指导和参考。

[关键词] 焦性没食子酸; 没食子酸; 微生物转化法; 没食子酸脱羧酶; 没食子酸脱羧酶活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0226-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030226

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141211.1522.009.html>

[网络出版时间] 2014-12-11 15:22

Advance on Degrading Gallic Acid to Pyrogallic Acid Applying Microorganism LI Wen-jun¹, WANG Cheng-zhang^{1,2*} (1. Institute of Chemical Industry of Forestry Products, Chinese Academy of Forestry Sciences (CAF), National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization, Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, State Forestry Administration (SFA), Key Lab. of Biomass Energy and Material, Nanjing 210042, China; 2. Institute New Technology of Forest, CAF, Beijing 100091, China)

[Abstract] Pyrogallic acid, a widely used chemical raw material and reagent, was mostly prepared by the chemistry process of gallic acid decarboxylation. Since serious environment pollution and equipment corrosion with the above method, the article reviewed microbial strains and the related technology including mostly influence factors of yield, such as carbon sources, the concentration of substrate, pH and fermentation time from the perspective of microbial transformation. At the same time, related influence factors of the gallic acid decarboxylase (GAD) activity including pH, temperature, metal ions and additives were presented. Then, the article briefly introduced the treatment of wastewater made in the production process of gallotannin and other issues applying microorganism. Finally, some views and suggestions were put forward for the process for preparing pyrogallic acid with the new method in future, which would provide the guidance and reference for the industrial production of pyrogallic acid by microbial conversion.

[Key words] pyrogallic acid; gallic acid; microbial conversion; gallic acid decarboxylases; gallic acid decarboxylases activity

五倍子是我国传统中药,有敛肺、止汗、解毒、止血等功效^[1],主要含有单宁、没食子酸、五倍子油等成分,其中没食

[收稿日期] 20140414(021)

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(863)项目(2014AA021802);国际合作项目(中俄项目)

[第一作者] 李文君,硕士,从事天然产物化学研究,Tel:13770646021,E-mail:liwenjun611@163.com

[通讯作者] *王成章,博士,研究员,从事天然产物研究与与开发,Tel:13951945535,E-mail:wangczlzs@sina.com

子酸约占 2% ~ 4%，是一种天然的多酚类化合物，具有抗氧化、抑菌等生物活性^[2]。没食子酸经过化学法脱羧反应后得焦性没食子酸，也可利用生物法在没食子酸脱羧酶 (gallic acid decarboxylases, GAD) 的作用下发生脱羧反应生成焦性没食子酸。焦性没食子酸别名焦棕酸、联苯三酚、1,2,3-三羟基苯，作为一种用途广泛的化工原料和试剂，多应用于农药、合成医药、化妆品、显影剂、热敏剂、高分子材料的助剂以及化学分析试剂等方面^[3-5]。18 世纪末，Scheele 首次通过干馏从没食子酸制得焦性没食子酸。20 世纪 90 年代采用催化剂脱羧的方法，存在产品中催化剂残留难以去除，金属杂质偏高等问题。目前没食子酸主要由没食子单宁化学法水解制取，需要使用大量的酸和碱，产生大量高浓度盐，高色度的废水，难以生化降解处理，造成严重的环境污染问题。采用生物技术，利用微生物降解没食子单宁制备没食子酸及焦性没食子酸，则能避免化学法的弊端。

微生物转化法是利用微生物代谢过程中产生的某种或者某一系列的酶对底物的特定部位或者基团进行催化反应生成所需产物^[6]。由于微生物转化法具有反应条件温和、生物量积累快、转化时间短、转化酶表达效率高、便于工业化生产等特点^[7]，日本从 20 世纪 60 年代开始研究利用微生物转化法生产焦性没食子酸，意大利、印度等国也在近年来开展了相应的研究，但我国在这方面的研究却仍处于空白，且目前的研究工作并没有实现该方法的工业性。因此，本文将着重对微生物降解没食子酸的研究进展进行介绍，希望为国

内后续的相关研究提供一定的参考。

1 降解没食子酸的菌株

目前，通过微生物将多羟基苯甲酸如没食子酸进行结构修饰，可生产没食子酸及焦性没食子酸。研究发现，某些微生物菌种可以产生脱羧酶而将多羟基苯甲酸羧基脱去^[8]；某些微生物菌种可以在特定的培养基上产生高活性没食子酸脱羧酶 (GAD)，将没食子酸降解成焦性没食子酸。Yoshida 等^[9]利用柠檬菌株 (*Citrobacter* sp. 64-1)，在厌氧条件下降解没食子酸生产焦性没食子酸，得率高达 97.4%。Kumar 等^[10]采用固定柠檬杆菌 (*C. freundii* TB3) 生物反应进行连续发酵没食子酸生产焦性没食子酸，其得率可达 98.5%。Soni 等^[11]从印度 Rajasthan 地区的土壤中利用 DEAE 纤维素离子交换柱和交联葡萄糖 G-50 凝胶过滤色谱分离得到了一种肠杆菌 *Enterobacter* spp.，该细菌可以产高活性 GAD，GAD 纯化率 14.48%。除了将筛选菌株直接接种到培养基中直接发酵没食子酸生产焦性没食子酸，Spiros 等^[12]替代微生物转化法将葡萄糖生物合成没食子酸和焦性没食子酸，利用基因工程菌 *Enterobacter coli* RB791serA:aroB/pSK6.234 来代替生物催化降解没食子酸生产焦性没食子酸，得率可达 93% ~ 97%。Grant^[8]利用产气杆菌研究了非氧化脱羧酶对多羟基苯甲酸的脱羧作用及部分脱羧酶的性质 (表 1)，主要是邻苯二酚、间苯二酚母核结构型多羟基苯甲酸和氨基苯甲酸的脱羧，微生物为黑曲霉菌、产气肠杆菌、假单胞菌、大肠埃希菌等。

表 1 非氧化脱羧酶对苯环母核型酚酸脱羧的菌株及其特性^[8]

Table 1 Non-oxidative enzymatic removal of carboxyl group directly attached to benzene ring and some properties of decarboxylases^[8]

底物	产物	微生物	最适 pH	K_m /mmol·L ⁻¹	参考文献
2,3-二羟基苯甲酸	邻苯二酚	<i>Aspergillus niger</i> (无细胞提取物)	5.2	3.5	[13]
			5.2	0.30	[14]
2,4-二羟基苯甲酸	间苯二酚	<i>A. spec.</i> (全细胞)			[15]
3,4-二羟基苯甲酸	邻苯二酚	Moulds (全细胞)			[16]
		<i>Aerobacter aerogenes</i> NCW (全细胞)			[17]
		<i>Rhodopseudo monas spec.</i> (无细胞提取物)			[18]
4,5-二羟基邻苯二甲酸	3,4-二羟基苯甲酸	<i>Pseudomonas spec.</i> (无细胞提取物)	6.0 ~ 7.0		[19]
苔藓酸	苔黑素	<i>Gliocladium roseum</i> (无细胞提取物)	6.0	0.26	[20]
2,4-二羟基-5,6-二甲苯基甲酸*	4,5-二甲基间苯二酚				
对氨基苯甲酸	苯胺	<i>Escherichia coli</i> (无细胞提取物)			[21]
邻氨基苯甲酸	苯胺				

注：* 活化能为 103 00 Cal·mole⁻¹

研究发现，有些微生物种类不仅能产生没食子酸脱羧酶同时也能产生单宁酶，即可以单宁为底物生产没食子酸和焦性没食子酸，如 *Pantoea agglomerans*^[22]，*Streptococcus gallolyticus*^[23]，*Lonepinella koalarum*^[24]，*Lactobacillus plantarum*^[25]，*L. paraplantarum*^[25] 和 *L. pentosus*^[25] 等 (表 2)。而另外一些微生物则特异性的仅产生没食子酸脱羧酶，目前也已从多种细菌中分离得到没食子酸脱羧酶，如 *C. sp. 64-1*^[9]，*C. freundii* TB3^[10]，*E. spp.*^[11]，*P. agglomerans* T71^[22]

(表 3)。除细菌外还发现一株酵母菌 *Rhodotorula glutinis* 也可以产生没食子酸脱羧酶^[26]。

2 影响微生物法生产焦性没食子酸得率的因素

微生物转化反应本质上是一个酶反应，在 GAD 催化反应中，产物焦性没食子酸得率却因为各种影响因素而具有较大差异。这种差异除了由于菌种外，也和 GAD 催化没食子酸的主要影响因素如发酵时间、温度、pH、底物添加方法、酶的抑制剂、酶的诱导剂以及生长调节剂等有关。

表 2 以单宁为底物产 GAD 的菌株

Table 2 Strains produce GAD with tannin as substrate

底物 产物	微生物	参考文献
单宁 没食子酸和	<i>Pantoea agglomerans</i>	[22]
焦性没食子酸	<i>Septococcus gallolyticus</i>	[23]
	<i>Lonepineia koalarum</i>	[24]
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	[25]
	<i>L. paraplantarum</i>	
	<i>L. pentosus</i>	

2.1 碳源对焦性没食子酸得率的影响 Yoshida 等^[9]

表 3 以没食子酸为底物产 GAD 的菌株及其特性

Table 3 Strains produce GAD with gallic acid as substrate

底物	产物	微生物	最适 pH	最大得率/%	参考文献
没食子酸	焦性没食子酸	<i>Citrobacter</i> sp. 64-1	6.0	97.4	[9]
		<i>C. freundii</i> TB3	7.3	98.5	[10]
		<i>Enterobacter</i> spp.	7.0	14.48	[11]
		<i>E. coli</i> RB791serA;aroB/Psk6.234		93~97	[12]
		<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 418	5.8		[13]
		<i>Pantoea agglomerans</i> T71	6.0		[22]
		<i>Eubacterium oxidoreducens</i>			[27]

2.2 底物浓度对焦性没食子酸得率的影响 有研究发现,菌株 *C. sp.* 64-1 在发酵没食子酸的过程中,在没食子酸的含量达到 1.0% 之前,随着没食子酸含量的增加焦性没食子酸的生成量也相应提高;但随着底物没食子酸浓度的继续增加,焦性没食子酸的产量反而开始下降^[9]。同样的, Kumar 等^[10] 在利用 *C. freundii* TB3 菌株连续发酵没食子酸的过程中也得出,液滴浓度为 20% 且流速 0.5 mL·min⁻¹ 时,产物焦性没食子酸的得率最大;在液滴浓度 < 20% 之前,随着液滴浓度的增加焦性没食子酸的产率相应增加,随着液滴浓度继续增加,焦性没食子酸的得率开始逐渐下降;而在流速小于 0.5 mL·min⁻¹ 时,焦性没食子酸的产量和流速是正相关的但随着没食子酸含量的提高流速大于 0.75 mL·min⁻¹,尤其是 1.0 mL·min⁻¹ 时,焦性没食子酸含量开始剧烈下降。由于没食子酸在低温水中的溶解度较低,室温下 1 g 没食子酸需要溶解于 87 mL 的水,故高浓度时没食子酸难以完全溶于液体培养基中,即过高的底物含量使细菌细胞生长受到了抑制也就无法被降解。

2.3 pH 对焦性没食子酸得率的影响 由于该反应本身是一个酶促反应,因此反应混合物中的 pH 对该反应条件下焦性没食子酸的产量有很大的影响:当 pH 为 5.0 时,100% 的没食子酸反应 24 h 后脱羧转化为焦性没食子酸,然后焦性没食子酸在后来的反应中逐步分解;当反应的 pH < 5.0 时,反应混合物中颜色的改变将难以观察^[9]。Grant 等^[8] 发现在 *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*) 在适宜的培养基中产焦性没食子酸的最适的 pH 为 5.8,低于或者高于这个值焦性没食子酸的产率都是下降的。在菌株降解没食子酸的过程中偏酸性的条件比较有利于焦性没食子酸的生成,这

在基础培养基 (2.0% 没食子酸, 0.2% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O (pH 6.0)) 中,以 0.2% 没食子酸和 0.5% 的其他碳源为培养基碳源,在 pH 为 6.0,温度为 28 °C 下,培养 48 h 后,分别检测其对细胞生长、酶活性以及焦性没食子酸产量的影响。结果发现,相比其他碳源组合,没食子酸和麦芽糖的组合,得到的焦性没食子酸的产量最大。细菌接种量相对较少且细胞生长初期无法很好的利用没食子酸,而麦芽糖的加入使得细菌细胞首先得到了大量的繁殖,为后续降解没食子酸奠定了量的基础。因此,在实际操作中,可以将这种碳源组合加入到培养基中来提高焦性没食子酸最终的产量。

可能与没食子酸本身有关,因为在偏酸性的条件下没食子酸较为稳定,菌株降解没食子酸产 GAD 也比较稳定,活性也会较高,故最适的 pH 在偏酸性范围内较有利用焦性没食子酸的产生。

2.4 发酵时间对焦性没食子酸得率的影响 细菌本身有生长周期,前期主要是合成自身所需的初级代谢产物,达到生长的稳定期后才开始合成可降解没食子酸的次级代谢产物 GAD,故发酵时间对焦性没食子酸得率的影响也很大,但不同菌株不同培养条件所需的发酵时间也是不同的。*C. sp.* 64-1 在优化培养基上发酵反应 8 h 后焦性没食子酸得率最大,继续发酵,焦性没食子酸的含量开始下降,生成的焦性没食子酸后来被分解了^[9]; *C. freundii* TB3 在连续发酵培养过程中当发酵时间为 36 h 时焦性没食子酸得率最大,继续发酵,其含量趋于平稳^[10]; *P. agglomerans* T71 在发酵的前 60 h 内焦性没食子酸的得率逐渐增加,而从 60 ~ 120 h 焦性没食子酸的含量不再改变,同时底物没食子酸含量则是相对应的从迅速减少到不变,说明在这个过程中 *P. agglomerans* T71 是以没食子酸为唯一的碳源,之后焦性没食子酸稳定存在^[22]。

3 影响 GAD 产率和活性的因素

目前,已从众多的微生物里发现了部分菌种可以产 GAD,其中 Soni 等^[11] 从印度 Rfjasthan 地区的土壤中利用 DEAE 纤维素离子交换柱和交联葡萄糖 G-50 凝胶过滤色谱分离得到了一种可以产生 GAD 肠杆菌 *E. spp* 并重点研究了 pH、温度、金属离子和洗涤剂 and 添加剂等对 GAD 活性的影响,且依次经过粗提、硫酸铵沉淀 (40% ~ 60%)、渗析、DEAE 纤维素离子交换柱、G-50 交联葡萄糖凝胶色谱柱,在

12% 的 SDS PAGE 测定该 GAD 的相对分子质量是 52 kDa, GAD 的得率达到了 14.48% 且纯化系数达到了 15.32; Zeida 等^[22] 通过研究也发现 *P. agglomerans* T71 也可以产生 GAD 并通过测定发现该 GAD 的相对分子质量为 320 kDa 且包含 6 个相同的子单元, 通过粗提、硫酸铵沉淀 (30% ~ 50%), DEAE 纤维素离子交换柱、硫酸铵沉淀 (40% ~ 50%), Superdex 16-60 Hi-load 等纯化后最终 GAD 得率 11% 且纯化系数达到 16.5。

3.1 pH 对 GAD 产率和活性的影响 每一种酶只能在一定限度的 pH 范围内才表现活性, 超过这个范围酶就会失去活性, 在一定条件下, 每一种酶在某一个 pH 时活力最大, 这个 pH 称为这种酶的最适 pH, 是影响 GAD 活性的一个极其重要的因素, 因此也是众多研究者考察的对象。Soni 等^[11] 利用 30 mmol·L⁻¹ pH 从 5.5 ~ 8.0 的磷酸盐的缓冲溶液来测定纯化酶的最适的 pH, 发现纯化 GAD 的最适 pH 在 6.5 ~ 7.5, 在 pH 为 7.0 时有最大活性, 低于 5.5 和高于 8.0, 80% 的酶将失去活性, 先前报道的纯化 GAD 在 pH 为 6.0 ~ 6.6 时稳定^[8, 22, 28-29] 其最适的 pH 与其他的细菌的脱羧酶的是一致的^[8, 30-32]; Soni 等^[33] 后来又通过在培养基中添加同样 pH 但不同体积的磷酸盐缓冲溶液来测定 *E. spp.* 所产 GAD 的活性, 发现当磷酸盐含量为 30 mmol·L⁻¹ 时, GAD 活性最大, 低于或者高于这个值, 酶活性都有所下降; 另外, 他们也发现该菌株在 pH 为 5 ~ 6.5 时所产生的 GAD 的量下降, 但在 pH 为 6.6 是 GAD 产量最高。

3.2 温度对 GAD 产率和活性的影响 在一定条件下, 每一种酶在某一温度时活力最大, 这个温度称为这种酶的最适温度。Soni 等^[11] 发现纯化 GAD 在 35 °C 时活性最高的故为其最适温度为 35 °C。Zeida 等^[22] 报道的纯化 GAD 的最适温度是 50 °C; Nakajima 等^[29] 得出的结果为 45 °C, 一般大多数的脱羧酶在 50 °C 下都可以稳定存在。Soni 等^[33] 在后续的研究中也考察了菌株 *E. spp.* 分别在 25, 30, 35, 40, 45 °C 下所产的 GAD 的产率, 发现当温度为 30 °C 时该菌株在该条件下有最大的产率 0.106 U·mL⁻¹。

3.3 金属离子对 GAD 产率和活性的影响 有些金属离子具有提高酶活力的作用, 是酶的促进剂; 而有些金属离子具有抑制酶活力的作用, 是酶的抑制剂。Soni 等^[11] 等利用 1 mmol·L⁻¹ 的金属离子如钙 (Ca²⁺), 镁 (Mg²⁺), 锰 (Mn²⁺), 镍 (Ni²⁺), 铁 (Fe²⁺) 和锌 (Zn²⁺) 来研究不同金属离子对 GAD 的活性的影响, 结果发现: 这些金属离子中, 只有加入 Mg²⁺ 可以使 GAD 活性增强 135%, 而其他金属离子的加入没有发现这样的增强作用。而且 Mg²⁺ 的加入对于 GAD 产率的提高也有很大的促进作用, 研究者后来单独考察了 0.01% ~ 0.09% 的 Mg²⁺ 对 GAD 产量的影响, 得出结论: 加入 0.06% Mg²⁺ 对 GAD 产量的提高有最大的促进作用^[33]。一般, 芳烃的脱羧酶不需要其他辅因素^[8, 28, 34-36]。Zeida 等^[22] 报道 Fe²⁺ 可以增强由成团泛菌 *P. agglomerans* T71 合成的 GAD 的活性。Yoshid^[28] 得到了最大 GAD 最大酶活当将 0.05% MgSO₄ 加入到含有 *Citrobacter spp.* 的培养基中后;

Brune 和 Schink^[37] 报道了 Mg²⁺ 可以增强由没食子酸居泥杆菌产生的 GAD 的活性。另外, 在含有菌株 *C. freundii* TB3 的培养基中加入 0.5 mol·L⁻¹ MgSO₄ 脱羧酶产量得以提高。

3.4 添加剂对 GAD 活性的影响 酶是化学反应中一种重要催化剂, 酶的活性往往对反应起关键作用, 目前常通过添加剂法提高酶的反应活性。Soni 等^[11] 利用 1 mmol·L⁻¹ 的抑制剂如 SDS, 聚山梨酸酯 20, Triton X-100 和 EDTA 来研究酶的活性, 添加剂抑制了 GAD 的酶活, 研究表明: 加入洗涤剂如 Triton X-100 和 EDTA 以及其他的添加剂可使 GAD 失活, 故为了获得最大的酶活, 需要将洗涤剂从缓冲区和其他的使用过的化学试剂中去除。大量的氧化剂 [K₂CrO₄, (NH₄)₂S₂O₈, H₂O₂] 可以完全抑制酶的活性, 一些其他的化合物也可以部分的抑制酶的活性^[10]。

3.5 不同氮源含量、搅拌速率和接种量对 GAD 产率的影响 利用不同的碳源含量考察其对 GAD 产量的影响, 分别测试了以硝酸铵、氯化铵、硫酸铵为培养基碳源时, 菌株 *E. spp.* 降解没食子酸产 GAD 的产量差异, 相比而言, 硫酸铵具有最大的活性 0.101 U·mL⁻¹ 当加入 0.04% 的硫酸铵时; 搅拌速率主要影响兼性厌氧菌在发酵培养过程中的溶氧量, 研究发现当搅拌速率为 150 r·min⁻¹ 时, GAD 活性最大达 0.095 U·mL⁻¹; 另外, 实验也通过考察了不同接种量如 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 对 GAD 产量的影响, 发现当将 5% 的接种量接种到 100 mL 的液体培养基中进行摇床培养时, GAD 产量最大为 0.057 U·mL⁻¹^[33]。

4 没食子酸发酵废液的处理

没食子单宁降解后, 没食子酸及焦性没食子酸大部分被提取, 废液中含有单宁、没食子酸衍生物、葡萄糖、复合低聚糖、有机酸、有色物质等。这些物质中大部分分子中均含有羟基或羧基基团, 容易氧化, 导致微生物法转化没食子单宁过程中废水颜色深, 尤其是废液中的单宁和没食子酸衍生物与河水中的铁等金属离子产生络合反应使河水变黑。据环保部门抽样监测, 没食子酸及其衍生物加工过程直排废水中 COD 均值超过 20 000 mg·L⁻¹, 悬浮物超过 400 mg·L⁻¹, 给环境带来较大的污染。随着环境保护法律法规的严格实施, 急需解决植物单宁深加工过程的环境污染问题。

没食子酸生产废水处理相关的专利共 4 篇^[38-41]。主要技术为没食子酸生产废水经石灰乳中和至中性, 澄清后, 清液用活性炭脱色, 再经生化池生化处理后可达标排放。但目前相关专利均未真正实现产业化应用。目前大部分五倍子深加工企业对于生产废水处理是采用中和、浓缩, 得到固体废渣然后进行处理的方式, 这种方式的能耗很高, 对设备危害很大, 对于企业来讲经济成本大大提高, 给企业生存发展带来很大压力。

在中药植物多酚生产废水的处理, 主要采用物化法、生物法和物化-生物法。陈立宇等^[42] 研究了有机溶剂萃取回收没食子酸生产废液中低含量没食子酸的工艺; 张凤秀等^[43] 进行了利用废没食子酸母液中的没食子酸与 (CH₂)₂SO₄ 合成 3,4,5-三甲氧基苯甲酸。国内外对没食子

酸生产废液的处理和资源化利用的研究报道较少,因此,采用生物法和膜分离,开发没食子酸废水处理新工艺,达到经济效益和环境保护双赢的局面,已成为企业和研究所亟待解决的任务。

5 微生物法降解没食子酸的前景展望

焦性没食子酸作为一种具有普遍应用的化工试剂,在其传统生产方式的高投入、高污染、低稳定性的情况下,利用微生物转化生产焦性没食子酸的方法将因其高效、专一、低投入、低污染等优点为未来焦性没食子酸的生产开辟新的途径。当然,相比利用菌种本身的性质直接优化筛选优产菌的繁琐和耗时,未来焦性没食子酸的生产应当应用基因工程技术来实现高效和快捷。

目前,随着分子生物学应用的普及,基因工程技术为微生物转化提供了新的思路和方向。只要生物细胞中存在有催化某一生化反应的酶,即使其量微不足道,应用基因重组技术,通过基因扩增与增强表达,就可以建立高效表达特定酶制剂的基因工程菌或者基因工程细胞。

除了上述直接利用各种细菌进行优化生产 GAD 及其酶学性质的研究,Spiros 等^[12]研究了利用基因工程菌将葡萄糖转化合成得到没食子酸和焦性没食子酸来代替生物催化生产焦性没食子酸的方法。他们利用基因工程技术合成 *E. coli* KL7/pSK6.161,该合成菌可以将葡萄糖转化成没食子酸,得率最高可达 48%;另外,合成的 *Escherichia coli* RB791serA:aroB/Psk6.234,该酶在厌氧条件下可以将没食子酸转化为焦性没食子酸,得率高达 93%~97%。生物合成生产没食子酸有两条可能的路线,其中氧化 DHS 生成 1 个二酮的中间物再经过酸的芳构化生成没食子酸,或者 DHS 经脱水及中间体 PCA 羟基化生成没食子酸。

利用基因工程可以将能进行该过程生物转化的相关酶从微生物、植物甚至动物细胞中克隆出来,再导入到一个微生物体中进行表达,从而产生能对底物进行转化的一系列酶,将原来复杂的几种转化过程缩短为一个转化反应。这一过程的实现将为微生物转化法生产焦性没食子酸提供连续化、工业化生产的可能,也势必会带动焦性没食子酸研究开发的新的新的高潮。因此,设计新型减压低温提取新工艺和关键装备,开展单宁生物降解菌株和产高活性没食子酸脱羧酶菌株优选,研究没食子酸生物法脱羧动力学过程及脱羧产物分离技术,开发生物法制备焦性没食子酸新途径,研究开发没食子酸生产废水处理新工艺,将是五倍子绿色加工技术升级的重要发展方向。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:206-207.
[2] 郑曙明,黄建军,吴青,等. 复方五倍子有效成分的分
离鉴定及抑菌活性研究[J]. 植物研究,2011,31(2):
231-234.
[3] 毕良武,吴在嵩,陈筋鸿,等. 塔拉粉一步法制备焦性
没食子酸的研究[J]. 林产化学与工业,1996,16(2):

7-11.

[4] 程丛球,王亚兵,卢桂安. 焦性没食子酸制备新工艺
的研究[J]. 林产化学与工业,1994,14(4):15-18.
[5] 杨雄辉,洪泽湖,李玉新,等. 国内外焦倍酚的制备以
应用[J]. 湖南化工,1993(2):12-16.
[6] 王身艳,陈建伟,张蔚学,等. 双向发酵对白芍 HPLC
指纹图谱及芍药苷含量的影响[J]. 现代中药研究与
实践,2009,23(2):6-9.
[7] 曹淑芬,李文楚. 微生物转化的研究和应用[J]. 广
东蚕业,2012,46(2):45-50.
[8] Grant D J W, Patel J C. The non-oxidative
decarboxylation of *p*-hydroxybenzoic acid, gentisic acid,
protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella*
aerogenes (*Aerobacter aerogenes*) [J]. Antonie Van
Leeuw enhoek,1969, 35(1):325-343.
[9] Yoshida H, Yamada H. Microbial production of
pyrogallol through decarboxylation of gallic acid [J].
Agric Biol Chem, 1985, 49(3):659-663.
[10] Kumar R A, Jayaraman A, Lakshmanan M, et al.
Bioconversion of gallic acid into pyrogallol by
immobilized *Citrobacter freundii* TB3 [J]. J Ferment
Bioeng, 1992, 74(3):159-162.
[11] Soni M, Sharma K P, John P J. Characterization of
pyrogallol production from gallic acid by *Enterobacter*
spp [J]. J Microbiol Biotechnol Res, 2012, 2(2):327-
336.
[12] Kambourakis S, Draths K M, Frost J W. Synthesis of
gallic acid and pyrogallol from glucose; replacing natural
product isolation with microbial catalysis [J]. J Am
Chem Soc,2000,122(37):9042-9043.
[13] Terui G, Enatsu T, Tokaku H. A new decarboxylase
specific for 2, 3-dihydroxybenzoic acid and the role
thereof in the metabolism of salicylic acid by *Aspergillus*
niger [J]. Technol Rep Univ,1952,2:283-294.
[14] Subba Rao P V, Moore K, Towers C H N.
o-Pyrocatechuic acid carboxy-lyase from *Aspergillus niger*
[J]. Arch Biochem Biophys,1967, 122:466-473.
[15] Halvorson H. Formation of resorcinol as an intermediate
in the metabolism of 2, 4-dihydroxybenzoic acid and its
corresponding aldehyde [J]. Biochem Biophys Res,
1963,10(6):440-443.
[16] Butkewitsch W. Uber die umwandlung der Chinasure
durch die pilze [J]. Biochem Z,1924,145:442-460.
[17] Pittard A J, Gibson F, Doy C H. A possible relationship
between the formation of *o*-dihydric phenols and
tryptophan biosynthesis by *Aerobacter aerogenes* [J].
Biochim Biophys Acta,1962, 57(1):290-298.
[18] Proctor M H, Scher S. Decomposition of benzoate by a

- photosynthetic bacterium[J]. *Biochem J*,1960,76(2):310-318.
- [19] Ribbons D W, Evans W C. Oxidative metabolism of phthalic acid by soil Pseudomonads(2) [J]. *Biochem J*,1960,76(2):310-318.
- [20] Pettersson G. An orsellinic acid decarboxylase isolated from *Gliocladium rosettm* [J]. *Acta Chem Scand*,1965,19:2013-2021.
- [21] McCullough W G, Piligian J T, Daniel I J. Enzymatic decarboxylation of the aminobenzoates[J]. *J Am Chem Soc*,1957,79(3):628-630.
- [22] Zeida M, Wieser M, Yoshida T, et al. Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71 [J]. *Appl Environ Microb*,1998,64(12):4743-4747.
- [23] Osawa R, Fujisawa T, Sly L I. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*[J]. *Syst Appl Microbiol*,1995,18(1):74-78.
- [24] Osawa R, Rainey F, Fujisawa T, et al. *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a new tannin-protein complex degrading bacterium[J]. *Syst Appl Microbiol*,1995,18(3):368-373.
- [25] Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya B C. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase [J]. *Process Biochem*,2003,38(9):1285-1293.
- [26] Gupta J, Jebsen C, Kneifel H. Sinapic acid degradation by the yeast *Rhodotorula glutinis*[J]. *J Gen Microbiol*,1986,132(10):2793-2799.
- [27] Haddock J D, Ferry J G. Initial steps in the anaerobic degradation of 3, 4, 5-trihydroxybenzoate by *Eubacterium oxidoreducens*; Characterization of mutants and role of 1, 2, 3, 5-tetrahydroxybenzene [J]. *J Bacteriol*,1993,175(3):669-673.
- [28] Yoshida H, Tani Y, Yamada H. Isolation and identification of a pyrogallol producing bacterium from soil[J]. *Agric Biol Chem*,1982,46(10):2539-2546.
- [29] Nakajima H, Otani C, Niimura T. Decarboxylation of gallate by cell-free extracts of *Streptococcus faecalis* and *Klebsiella pneumonia* isolated from rat feces[J]. *J Food Hygienic Soc Jpn*,1992,33(4):371-376.
- [30] Hsu T D, Lux M F, Drake H L. Expression of an aromatic-dependent decarboxylase which provides growth-essential CO₂ equivalents for the acetogenic (wood) pathway of *Clostridium thermoaceticum*[J]. *J Bacteriol*,1990,172(10):5901-5907.
- [31] Liu J, Zhang X, Zhou S, et al. Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Chlamydomonas pneumonia* AR39 [J]. *Curr Microbiol*,2007,54(2):102-107.
- [32] He Z, Wiegel J. Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum* [J]. *Eur J Biochem*,1995,229(1):77-82.
- [33] Soni M, Sharma K P, John P J. Characterization of pyrogallol production from gallic acid by *Enterobacter spp* [J]. *J Microbiol Biotechnol Res*,2012,2(2):97-104.
- [34] Nakazawa T, Hayashi E. Phthalate and 4-hydroxyphthalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*; purification and properties of 4, 5-dihydroxyphthalate decarboxylase [J]. *Appl Environ Microb*,1978,36:264-269.
- [35] Pujar B G, Ribbons D W. Phthalate metabolism in *Pseudomonas fluorescens* PHK; purification and properties of 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase[J]. *Appl Environ Microb*,1985,49(2):374-376.
- [36] Samain E, Albagnac G, Dubourguier H C. Initial steps of catabolism of trihydroxybenzenes in *Pelobacter acidigallici* [J]. *Arch Microbiol*,1986,144(3):242-244.
- [37] Brune A, Schink B. Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*; fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid[J]. *Arch Microbiol*,1992,157(5):417-424.
- [38] 周康根. 一种没食子酸生产废水的处理方法; CN 103214053 [P]. 2013-7-24.
- [39] 池祥伟. 没食子酸生产废水、废渣、废碳回收处理新技术; CN 103028591 [P]. 2013-4-10.
- [40] 彭友嵩,周康根,胡江宇. 没食子酸及其清洁、高效生产工艺技术; CN 102850211 [P]. 2013-1-2.
- [41] 刘扬林,刘淑云,刘妍妍. 一种处理没食子酸的粗制废液的方法; CN 101781068 [P]. 2010-7-21.
- [42] 陈立宇,张秀成,等. 甲基异丁基酮萃取没食子酸的研究[J]. *西北大学学报:自然科学版*,1996,26(增刊):196-198.
- [43] 张凤秀,张光先. 没食子酸废母液合成3,4,5-三甲氧基没食子酸的研究[J]. *西南农业大学学报*,1997,19(1):13-16.

[责任编辑 邹晓翠]