



香兰素生物合成的研究进展

党玥 陈雪峰* 刘欢 赵圆圆 孟广燕 朱蓉静

陕西科技大学食品与生物工程学院 陕西 西安 710021

摘要: 香兰素是一种十分重要的香料, 在较多行业中用途广泛。天然来源的香兰素受诸多因素的限制, 不能满足市场需求, 因此化学法合成的香兰素是主要原料来源。近年来, 随着自然资源的不断枯竭以及人们对环境保护意识的增强, 通过微生物转化适宜的底物生物合成香兰素逐渐变为研究热点。本文综述了以丁香酚、异丁香酚和阿魏酸为底物的细菌、真菌生产香兰素的相关研究进展, 阐述丁香酚、异丁香酚、阿魏酸产香兰素代谢途径的研究, 以及生物技术在这一领域的运用。香兰素的生物合成具有广阔的发展和 market 应用前景。

关键词: 丁香酚, 异丁香酚, 阿魏酸, 生物合成, 香兰素

Research progress on vanillin biosynthesis

DANG Yue CHEN Xue-Feng* LIU Huan ZHAO Yuan-Yuan MENG Guang-Yan
ZHU Rong-Jing

School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an,
Shaanxi 710021, China

Abstract: As a vital spice, vanillin is widely used in diverse industries. Natural vanillin cannot meet the demand of market due to many restrictions. Therefore, chemical synthesis of vanillin is the main source for market. With the continuous depletion of natural resources and the improvement of people's awareness of environmental protection in recent years, the biological production of vanillin by microbial transformation using suitable substrates has gradually become a research hotspot. This article reviewed the related research progresses on vanillin production by bacteria and fungi with eugenol, isoeugenol and ferulic acid as substrates and also presented the investigation of the metabolic pathways of vanillin produced by eugenol, isoeugenol and ferulic acid as well as the application of biotechnology in this field. The biosynthesis of vanillin heralds vast potentials for development and considerable market prospects.

Keywords: Eugenol, Isoeugenol, Ferulic acid, Biosynthesis, Vanillin

Foundation items: Science and Technology Plan of Weiyang District in Xi'an (201937); Scientific Research Plan of Microbial Pharmaceutical Engineering Laboratory in Xi'an (203061701)

*Corresponding author: E-mail: chenxf@sust.edu.cn

Received: 06-12-2019; Accepted: 23-02-2020; Published online: 28-05-2020

基金项目: 西安市未央区科技计划(201937); 西安市微生物药物工程实验室科研计划(203061701)

*通信作者: E-mail: chenxf@sust.edu.cn

收稿日期: 2019-12-06; 接受日期: 2020-02-23; 网络首发日期: 2020-05-28

香兰素(vanillin)又称香草醛、香兰醛, 化学名为 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛, 是世界上使用最广泛的调味料之一, 在食品、药品、化妆品、农业等领域被广泛应用^[1]。香兰素具有“食品香料之王”的美称^[2], 可在食品中起到助香、增味的作用, 也可作为食品防腐添加剂使用; 在医药方面, 香兰素具有保健、医疗的作用, 同时也是合成多种药物的重要原料; 香兰素在化妆品、香水等领域可作为调香剂, 在农业生产中也可作为农作物的催熟剂和增产剂, 还可以用作导电剂、氧化助剂、消泡剂等^[3-4]。目前我国的香兰素年消费量在 2 000–2 500 t^[2]。

1 香兰素的生产方式

1.1 天然提取法

从香子兰荚果中提取的香兰素为天然制品, 但原料香子兰荚果的供应有限, 该提取方法劳动强度大、加工周期长、制品的价格也十分昂贵^[2], 使得天然提取法获得的香兰素远远不能满足市场需求。

1.2 化学合成法

化学合成法产香兰素(丁香酚法、木质素法、4-甲基愈创木酚法、愈创木酚二甲基苯胺法、愈创木酚-乙醛酸法等)在当今市场上占主导地位, 其中木质素法和愈创木酚-乙醛酸法最为常用^[5]。通过化学合成法生产的香兰素价格低廉, 每千克的市场价格约为 15 美元, 但该法制得的香兰素在很多方面都不如天然提取的香兰素^[6]。例如, 反应过程中会导致不必要的外消旋混合物的形成, 同时也缺乏底物选择性^[3-4]。由于不环保的工艺过程, 该法生产的香兰素在全球范围内受到食品和制药行业的限制^[7]。

1.3 微生物转化法

由于天然提取法与化学合成法存在种种不足, 致使人们越来越重视微生物转化法生产香兰素, 其中, 丁香酚、异丁香酚和阿魏酸是该法生产香兰素的主要底物^[1]。天然底物经生物转化产生的香兰素被称为“天然香兰素”, 其在价格以及品质方面都比化学合成的香兰素占有优势; 此外, 微生物具有生长迅速且易于进行基因工程改造优化等优点, 为生产香兰素的生物技术法提供了合适的平台; 利用微生物生产香兰素

并借助代谢工程改造等技术进一步提高香兰素的产量将是一种非常具有发展前景的研究方向^[6]。

2 以丁香酚为底物微生物转化产香兰素

丁香酚(eugenol), 又名 4-烯丙基-2-甲氧基苯酚, 是印尼丁香油的主要成分, 具有原料易得、工业合成简单且效率高等优点。丁香酚作为一种廉价的原料被广泛用于药品、食品、香料、抗氧化剂等, 有望成为生态友好型化学合成物质的主要成分^[8]。

2.1 代谢途径的研究

早在 1977 年, Tadasa^[9]首次报道了棒状杆菌能够将丁香酚转化为香兰素, 该菌能以丁香酚为唯一的碳源和能源得到阿魏酸与香兰素, 并进一步代谢形成香草酸和原儿茶酸, 原儿茶酸再通过邻位裂解进一步分解代谢。Rabenhorst^[10]分离出一株新的假单胞菌 HR199 菌株, 该菌株可以利用丁香酚产生松柏醇、松柏醛、阿魏酸和香草酸, 但未被检测到作为中间体的香兰素。

丁香酚的分解代谢途径在真菌中研究得较少, 在细菌假单胞菌中已被较为详细地描述, 分解代谢途径中的酶及其相应的结构基因也已得到鉴定^[6]。假单胞菌中丁香酚的分解代谢依次通过松柏醇、松柏醛、阿魏酸、香兰素、香草酸、原儿茶酸进行, 原儿茶酸通过邻位裂解再进一步分解, 其具体代谢路径及相关的编码基因如图 1 所示。

2.2 以野生菌进行生物转化

目前已发现恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌(*Serratia*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* sp.)、球形菌(*Arthrobacter globiformis*)等可将丁香酚或异丁香酚转化为香兰素^[11-13]。

Ashengroph 等^[14]分离出一株食树脂假单胞菌(*Pseudomonas resinovorans* SPR1), 该菌株能够将丁香酚转化为香兰素及相关酚醛芳香产物。在进一步优化条件之前, 经过 30 h 和 60 h 的生物转化后分别产生 0.24 g/L 香兰素(转化率为 10%)和 1.1 g/L

香草酸(转化率为 44%)。近年, Singh 等发现了一株新的芽孢杆菌沙福芽孢杆菌,在优化各种培养条件下使用该菌株的静息细胞,经 96 h 的生物转化后得到单一的代谢物香兰素 0.12 g/L^[15],转化途径

如图 2 所示。静息细胞具有反应时间较短,可自由改变反应液中底物与菌体的比例,生物量积累快,产物易分离提取等优点^[16-17],在生物转化产香兰素的应用中可使香兰素的浓度有所提高。

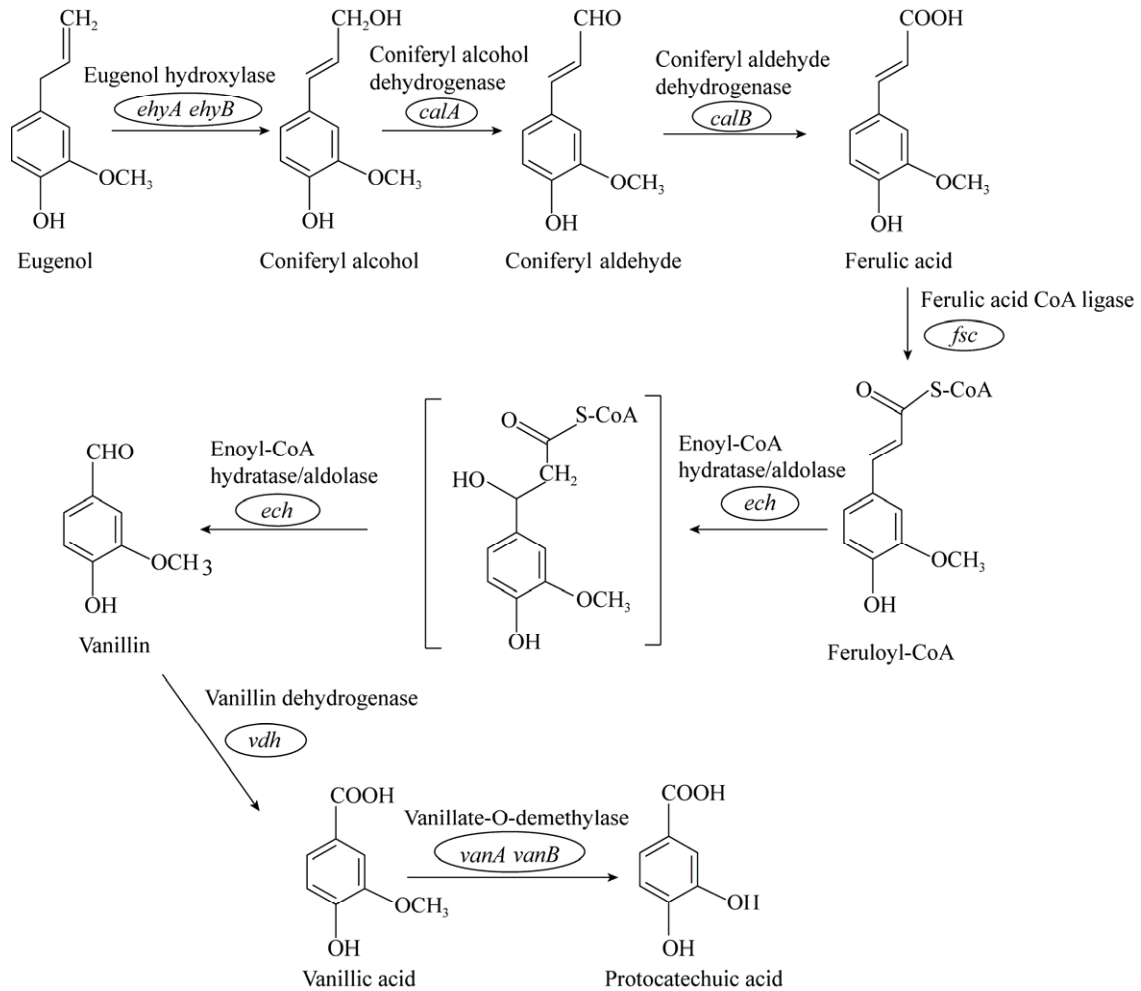


图 1 假单胞菌中丁香酚的降解途径^[6]

Figure 1 Eugenol degradation pathway in *Pseudomonas*^[6]

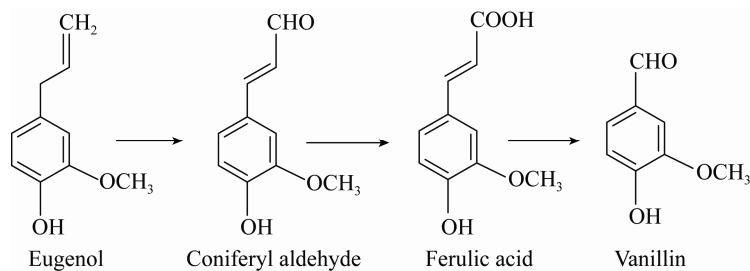


图 2 沙福芽孢杆菌 SMS 1003 中丁香酚的代谢途径

Figure 2 Metabolic pathway of eugenol in *Bacillus safensis* SMS 1003

2.3 通过代谢工程菌进行生物转化

从丁香酚到香兰素的生物转化途径中,产率大多比较低,只能得到微量的香兰素。为了提高香兰素的产率,研究人员对菌株进行了代谢工程的改造研究与运用。Overhage 等^[18]通过在香兰素脱氢酶基因(*vdh*)中插入 ω 因子使其失活从而构建假单胞菌 HR199 突变菌株,在含 6.5 mmol/L 丁香酚的培养基中可以积累 2.9 mmol/L 的香兰素,但由于另一种与松柏醛脱氢酶具有相似活性的香兰素脱氢酶 VDH-II 的存在,累积的香草醛被进一步降解。因此,仅使 *vdh* 失活并不是解决方案,需要进一步的基因操作。研究人员 Banerjee 等提出通过灭活、敲除或阻断钼酸盐转运体(提供 VDHs 的辅助因子)的操作将有助于在生物转化过程中增加香兰素的产量^[3]。

此外,研究人员还建立了从丁香酚到香兰素的两步生物转化过程^[19],如图 3 所示。第一步,先用重组大肠杆菌 XL1-Blue (pSKvaomPcalAmcalB)将丁香酚转化为阿魏酸,阿魏酸最大浓度可达 14.7 g/L;第二步,再用大肠杆菌(pSKechE/Hfcs)将阿魏酸转化为香兰素,香兰素产率为 0.3 g/L^[19-20]。

Plaggenborg 等^[21]在红球菌 (*Rhodococcus opacus*) PD630 基因工程菌中建立了丁香酚的生物转化代谢途径:将简青霉(*Penicillium simplicissimum*) CBS 170.90 的香草醇氧化酶基因(*vaoA*)与假单胞菌 HR199 中的松柏醇脱氢酶基因(*calA*)和松柏醛脱氢酶基因(*calB*)在红球菌 PD630 中表达,重组菌株将丁香酚转化为阿魏酸,阿魏酸可转化为香兰

素。Overhage 等将简青霉(*Penicillium simplicissimum*) CBS 170.90 的香草醇氧化酶基因(*vaoA*)克隆到革兰氏阳性菌的载体中,并在拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis*) HR167 中表达。*Amycolatopsis* HR167 (pRLE6SKvaom)在实验中表现出非常高的香兰素耐受性,研究人员提出通过额外表达 *calA* 和 *calB* 可建立丁香酚定量转化为香兰素的工程菌株^[22]。

3 以异丁香酚为底物微生物转化产香兰素

异丁香酚(isoeugenol),又名 4-丙烯基-2-甲氧基苯酚,与丁香酚互为同分异构体,两者均可以经化学法或微生物法生成香兰素。异丁香酚也存在天然来源,但工业上主要是通过丁香酚在 KOH 或 NaOH 作用下进行异构化而得^[23]。微生物转化和酶促转化已被广泛应用于研究异丁香酚到香兰素和相关代谢物的生物转化。研究发现有些菌株因底物不同时香兰素产量存在较大差异,在粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)中异丁香酚生物转化产香兰素的收率高于丁香酚产香兰素^[12]。在微生物发酵法生产香兰素中异丁香酚比丁香酚更具有优势^[24]。

3.1 代谢途径的研究

研究表明,在细菌和真菌中异丁香酚通过环氧化物-二醇途径生物转化为香兰素。Hua 等^[25]提出的异丁香酚在芽孢杆菌菌株 S-1 中的具体代谢过程如图 4 所示。该菌株能将异丁香酚高效生物转化为香兰素,150 h 内由 10 g/L 的异丁香酚可转化得到 3.75 g/L 的香兰素,摩尔产率为 40.5%。

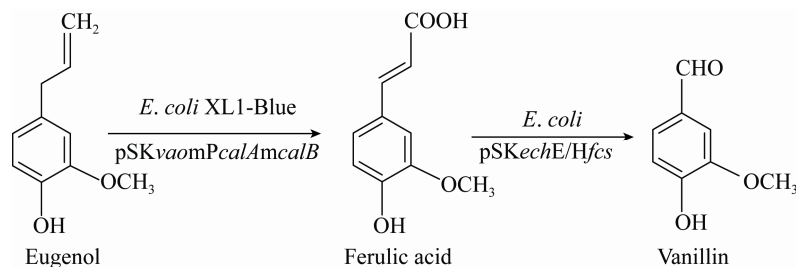


图 3 两步生物转化合成香兰素代谢途径

Figure 3 A two-step biotransformation for vanillin synthesis

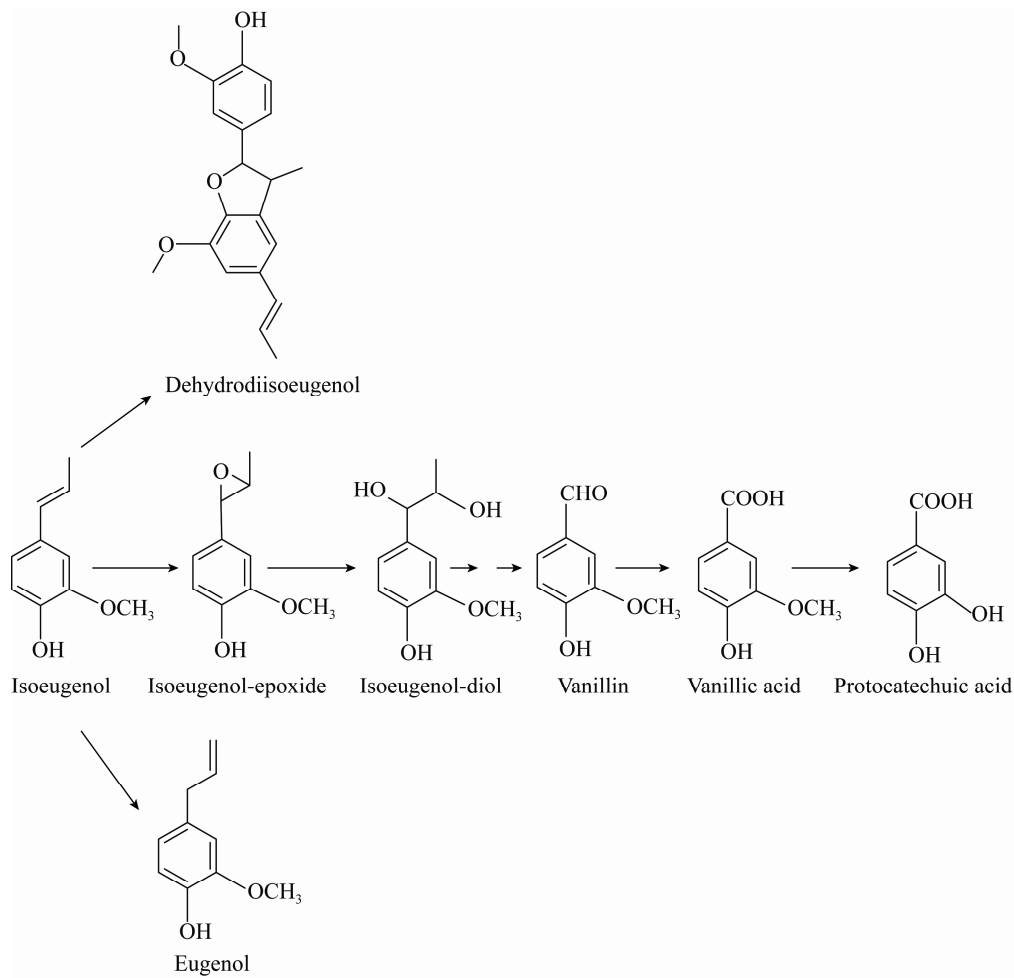


图 4 芽孢杆菌菌株 S-1 中异丁香酚的代谢途径^[25]

Figure 4 Metabolic pathway of isoeugenol in *Bacillus* strain S-1^[25]

3.2 以野生菌进行的生物转化

Abraham 等在黑曲霉(*Aspergillus niger*) ATCC 9142 中首次完成了以异丁香酚为底物产香兰素的生物转化,但因香兰素会进一步降解为香草酸和香草醇,转化率仅为 10%^[26]。Shimoni 等^[27]发现枯草芽孢杆菌 B2 能以异丁香酚为唯一碳源生长,该菌株可产生 0.61 g/L 的香兰素(摩尔产率为 12.4%);此外,离子交换树脂 XAD-2 的使用可有效改善菌株 B2 在异丁香酚中的生长特性。Furukawa 等^[28]研究发现恶臭假单胞菌 I58 可利用异丁香酚直接降解为香兰素,转化率为 14%。Zhao 等^[13]首次从土壤中分离到的一株新型梭状芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*) CGMCC1347 能以 60% (体积比)异丁香

酚为底物和溶剂,在两相体系以及适宜的培养条件下获得 32.5 g/L 的香兰素。由于异丁香酚难溶于水,DMSO 的加入可增强其溶解度,使得香兰素的产率有所提高,香草酸的生成也因此受到抑制^[29]。Yamada 等^[29]类比 Zhao 等^[13]的方法提出,添加 10% (体积比) DMSO 的单相体系比两相体系更有利于香兰素的高效生产。

Zhao 等^[30]用海藻酸钠成功地固定化了梭状芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*) CGMCC1347 细胞,固定化细胞经重复使用 6 次后,香兰素平均浓度可达到 39.26 g/L。以异丁香酚为底物产香兰素的生物转化过程中静息细胞的使用也可使香兰素的产量有所提高^[31],在念珠菌(*Candida galli*) PGO6^[32]、

阿氏丝孢酵母(*Trichosporon asahii*) MP24^[33]中均利用了静息细胞。

3.3 酶转化法

在香兰素生物合成的研究过程中已发现了一些新酶,这些发现为提高香兰素的产量提供了新的科学机会。酶法具有高效性、专一性、环境友好、立体选择性强、反应条件温和等优点,采用酶法制备香兰素生成的副产物也较少,但酶法也具有不稳定、成本高、不易分离等缺点^[34]。随着研究的深入,可以通过适宜的方法降低生产成本,分离出所需的酶并利用酶促反应高效地合成香兰素。

据报道,异丁香酚可在粘质沙雷氏菌菌株(*Serratia marcescens*) DSM 30126 中经一步发酵获得香兰素^[12]。孙敏等^[35]直接采用粘质沙雷氏菌 AB 90027 离体酶催化氧化异丁香酚获得了 10.90% 的香兰素产率,并认为在酶的作用下异丁香酚可以通过阿魏酸和香兰素两条途径被开环降解,能够降解香兰素的酶主要为胞外酶。

Yamada 等^[36]从恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) IE27 中纯化出一种异丁香酚降解酶,并对该酶基因进行了克隆与分析,研究发现异丁香酚降解酶是一种单加氧酶,首次报道了异丁香酚单加氧酶催化双键裂解形成香兰素。研究人员将恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) IE27 的异丁香酚单加氧酶基因插入载体 pET21a 中,并将重组质粒导入不具备香兰素降解活性的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中,该细胞在 20 °C 培养 6 h 条件下可由 230 mmol/L 的异丁香酚产生得到 28.3 g/L 的香兰素且不形成香草酸,摩尔转化率为 81%^[37]。

Ryu 等^[38]研究发现,硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*) Jin1 的异丁香酚单加氧酶的氨基酸序列与来自恶臭假单胞菌 IE27 的异丁香酚单加氧酶具有 81.4% 的相似性,含有异丁香酚单加氧酶的基因区域在单步反应中可将异丁香酚转化为香兰素;其中 *iem* 与 *iemR* 参与异丁香酚向香兰素的转化过程,推测 *Iem* 可能是一种单组

分酶,这为微生物生产天然香兰素提供了一种简单的生物催化路线。

2012 年,赵丽青等^[39]对从土壤中筛选获得的纺锤芽孢杆菌 CGMCC1347 生产异丁香酚单加氧酶的发酵条件进行了研究,在最适培养条件下,经过 16 h 的培养后,该菌株能将 2% 的异丁香酚转化生成 2.49 g/L 的香兰素,异丁香酚单加氧酶酶活可达到 3.79 U/L。为了有效地提高异丁香酚单加氧酶的活性,Zhao 等^[40]将两亲性短肽 18A 与异丁香酚单加氧酶融合,成功构建了活性聚集体 IEM720-18A,然后在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达,通过优化培养条件,香兰素的浓度可以达到 14.5 mmol/L,该研究为异丁香酚生物转化产香兰素提供了一种新的方法。

4 以阿魏酸为底物微生物转化产香兰素

阿魏酸(ferulic acid),化学名称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸,广泛存在于药用、食用植物中^[41]。阿魏酸具有对底物毒性较小、产率高、来源丰富等优点,但以该物质为底物生产香兰素的不足之处在于原料价格相对于丁香酚高。

目前已发现能以阿魏酸为底物产香兰素的菌株有:恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、拟无枝酸菌(*Amycolatopsis*)、食酸丛毛单胞菌(*Delftia acidovorans*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、红球菌(*Rhodococcus opacus*)、少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)、链霉菌(*Streptomyces*)、朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)等,其中可通过阿魏酸生物转化一些拟无枝酸菌(*Amycolatopsis*)和链霉菌(*Streptomyces*)中的某些菌株得到较高产量的香兰素(超过 10 g/L),基本可以用于工业化生产^[42]。但因利用放线菌为宿主发酵得到的产物不易分离及纯化等原因使得下游的加工成本过高^[43]。因此,需继续发掘高产、耐受底物能力强、易分离纯化的菌株,并深入掌握对基因工程改造目标菌株的应用。

4.1 代谢途径的研究

研究表明,许多假单胞菌中含有香兰素合成以及进一步降解的基因,且代谢途径大致相同^[43]。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) BF13 中阿魏酸降解途径的关键酶及其相应的基因如图 5 所示。

4.2 以野生菌进行的生物转化

4.2.1 单一菌的转化

赵希景^[46]从漳州古雷半岛潮间带沉积物中筛选到的海洋放线菌 B-32 可在 1 g/L 阿魏酸的发酵液中获得 0.71 g/L 的香兰素,该研究为海洋放线菌在工业化生产中的运用提供了理论依据。Chen 等^[47]筛选到枯草芽孢杆菌 B7-S 能利用阿魏酸产香兰素,转化率可达到 63.30%;此外,该菌株的细胞表面在诱导阿魏酸耐受性中起着重要的作用。王兴林等^[48]从土壤中筛选出一株广温拟无枝酸菌(*Amycolatopsis eurytherma*)的变种 CCTCC M 2011265,该菌株对底物阿魏酸具有较高的耐受性,经过发酵罐放大实验香兰素最大浓度可达 8.63 g/L (摩尔转化率为 56.2%)。

在转化过程中分批补料发酵方式以及树脂的加入有利于香兰素产量的增加^[49]。除分批补料法外, Vyrides 等^[50]采用盐单孢菌株(*Halomonas*) B15 的静息细胞法作为提高阿魏酸生物转化为香兰素的策略,48 h 后可由 0.5 g/L 的阿魏酸获得 0.245 g/L 香兰素,转化率为 49%。

4.2.2 多菌株的联合转化

1996 年, Lesage-Meessen 等以阿魏酸为底物对“两步生物转化法”产香兰素进行了研究:阿魏酸首先由黑曲霉(*Aspergillus niger*)转化为香草酸,再利用朱红密孔菌(*P. cinnabarinus*)将香草酸还原为香兰素;但由于香草酸氧化体系中产生的甲氧基对苯二酚在 *P. cinnabarinus* 的培养基中占主导地位,使得香草酸还原成香兰素的量较少,导致香兰素的含量相对较低^[51]。为了提高香兰素的产量,研究者对丝状真菌 *P. cinnabarinus* 将香草酸转化为香兰素进行了进一步的研究。研究表明,在 *P. cinnabarinus* 的培养物中加入纤维二糖可降低甲氧基对苯二酚的水平,使香兰素的产量有所增加,达到 0.725 g/L^[52]。

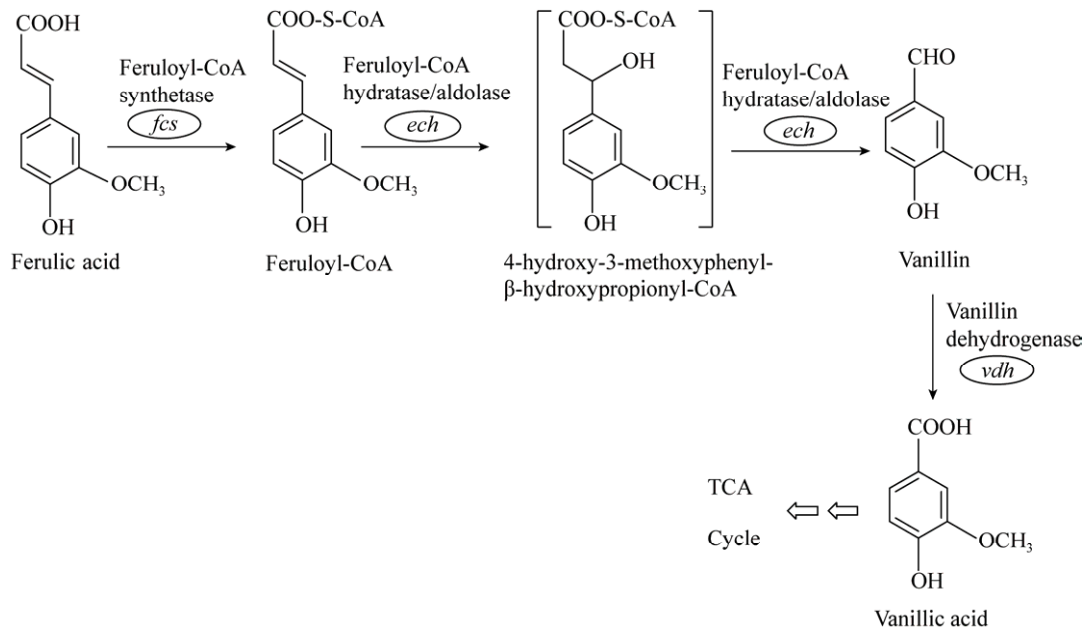


图 5 荧光假单胞菌 BF13 中阿魏酸降解的示意路径^[44-45]

Figure 5 Schematic pathway for the degradation of ferulic acid in *P. fluorescens* BF13^[44-45]

郑丽蓉等^[53]也对“两步生物转化法”进行了研究,利用黑曲霉 CGMCC0774 和朱红密孔菌 CGMCC1115 联合转化阿魏酸产香兰素,通过对黑曲霉 ⁶⁰Co 诱变得得到了一株对底物耐受性强且不降解产物的突变株,香兰素的浓度可达到 1.07 g/L。

4.3 以代谢工程手段进行的生物转化

随着对阿魏酸生物转化产香兰素相关酶的研究不断增多,对应编码基因的鉴定和表征不断清晰,基因工程菌的构建技术不断成熟。因研究人员对大肠杆菌的生理生化特征以及遗传背景了解逐渐深入且大肠杆菌本身不含有香兰素合成及降解的基因,所以基因工程在大肠杆菌中广泛应用^[43]。大肠杆菌的一个主要缺点是重组菌株的遗传不稳定性会导致香兰素的产量迅速下降^[54]。Barghini 等^[55]利用具有低拷贝数载体的大肠杆菌菌株 JM109 的静息细胞和表现出低活性驱动分解代谢基因表达的启动子,获得了较高的香兰素产量。

di Gioia 等^[45]使荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* BF13)中编码香兰素脱氢酶的 *vdh* 基因失活,同时转入一个阿魏酰辅酶 A 合成酶(*fcs*)和水合酶/醛缩酶(*ech*)的低拷贝重组质粒,在优化培养条件和生物转化参数后可使香兰素产率提高至 8.41 mmol/L(相当于约 1.28 g/L)。

Graf 等^[56]对非致病性恶臭假单胞菌菌株 KT2440 进行了遗传优化, *tac* 启动子系统的引入增强了阿魏酰辅酶 A 合成酶(*fcs*)和烯酰辅酶 A 水合酶/醛缩酶(*ech*)结构基因的染色体表达,进一步的遗传工程提高了香兰素的初始转化率,仅 3 h 摩尔产量可高达 86%。

Fleige 等^[57]通过同源重组完成了拟无枝酸菌属 ATCC39116 的香兰素脱氢酶基因(*vdh*)的精确缺失,使香兰素的降解降低 90%以上,该突变使香兰素的最终浓度超过 2.2 g/L,摩尔产量为 80.9%;香兰素的合成代谢基因 *ech* 和 *fcs* 的组成型和增强型表达使得香兰素的浓度进一步提高,最终得到香

兰素浓度为 19.3 g/L,摩尔收率为 94.9%;此外,使用改进的进料策略可使香兰素的浓度达到 22.3 g/L,这是截至目前报道的由 *Amycolatopsis* sp. ATCC39116 产生的最高的香兰素浓度。

2019 年, Luziatelli 等^[58]开发了一种新的大肠杆菌菌株 FR13,将携带编码阿魏酰辅酶 A 合成酶、阿魏酰辅酶 A 水合酶/醛缩酶的假单胞菌基因整合到大肠杆菌染色体中,在优化生物过程变量并使用两相(固液)系统控制阿魏酸的释放后,使香兰素的产量达到 28.10±0.05 mmol/L,由此他们提出,重组无质粒的大肠杆菌菌株在工业规模化生产香兰素中具有较大潜力。

5 展望

本课题组主要从事微生物合成方面的研究^[59-62],目前已筛选获得可利用阿魏酸和丁香酚产香兰素的菌株,后期将通过合成生物学的方法对其香兰素代谢合成途径进行改造,以期进一步提高香兰素产量。

我们实验室在丁香酚产香兰素生物转化过程的研究中发现存在以下问题:(1) 丁香酚对微生物的生长存在一定的抑制作用,从土壤中筛选到的菌种能耐受丁香酚的浓度并不高;(2) 产物香兰素会进一步代谢产生其他物质;(3) 香兰素对微生物的生长也存在一定的抑制作用。

基于以上问题,我们认为可以从以下几个方面进行深入研究:(1) 对高产菌株中的关键酶性质、作用机制以及是否存在特殊的调控基因或途径进行深入的研究,借助基因工程技术对酶进行定向改造得到性能显著的菌株;(2) 通过抑制参与香兰素降解的酶活性来阻止其进一步转化,但该方法在假单胞菌中具有一定的局限性,因为在该菌株中存在类似的脱氢酶也能使香兰素进一步降解,因此可以在日益增长的基因数据库中寻找更适合生产的替代基因;(3) 利用微生物的全细胞、静息细胞、固定化细胞及其细胞酶制剂等提高产物的产量并减少副产物的产生。

REFERENCES

- [1] Han ZC, Long LK, Ding SJ. Expression and characterization of carotenoid cleavage oxygenases from *Herbaspirillum seropedicae* and *Rhodobacteraceae bacterium* capable of biotransforming isoeugenol and 4-vinylguaiaicol to vanillin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1869
- [2] Lyu XJ. The development of vanillin industries[J]. *Modern Food*, 2019(7): 14-16 (in Chinese)
吕晓婕. 香兰素行业发展状况[J]. *现代食品*, 2019(7): 14-16
- [3] Banerjee G, Chattopadhyay P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(2): 499-506
- [4] Klaus T, Seifert A, Häbe T, et al. An enzyme cascade synthesis of vanillin[J]. *Catalysts*, 2019, 9(3): 252
- [5] Wang FS. The optimization and scale-up of enzymatic conversion of isoeugenol to vanillin[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2005 (in Chinese)
王丰收. 酶法转化异丁香酚制备香草醛的工艺优化与放大研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2005
- [6] Gallage NJ, Møller BL. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its *De Novo* biosynthesis in the vanilla orchid[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 40-57
- [7] Horvat M, Fiume G, Fritsche S, et al. Discovery of carboxylic acid reductase (CAR) from *Thermothelomyces thermophila* and its evaluation for vanillin synthesis[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 44-51
- [8] Rahim EA, Sanda F. Synthesis and functionality of eugenol-based polyacetylenes[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, 1242: 012003
- [9] Tadasa K. Degradation of eugenol by a microorganism[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41(6): 925-929
- [10] Rabenhorst J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 46(5/6): 470-474
- [11] Li YH, Zheng P, Sun ZH. Recent advances in biotechnological production of vanillin[J]. *Industrial Microbiology*, 2004, 34(4): 46-57 (in Chinese)
李永红, 郑璞, 孙志浩. 生物技术方法生产香草醛研究进展[J]. *工业微生物*, 2004, 34(4): 46-57
- [12] Rabenhorst J, Hopp R. Process for the preparation of vanillin: USA, 5017388[P]. 1991-05-21
- [13] Zhao LQ, Sun ZH, Zheng P, et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(19): 1505-1509
- [14] Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, et al. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid[J]. *New Biotechnology*, 2011, 28(6): 656-664
- [15] Singh A, Mukhopadhyay K, Sachan SG. Biotransformation of eugenol to vanillin by a novel strain *Bacillus safensis* SMS1003[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, 37(4): 291-303
- [16] Wang HL. Vanillin production of biotransformation[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2008 (in Chinese)
王洪亮. 微生物转化生产香兰素[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2008
- [17] Yang DJ, Ren TB, Wang FQ, et al. The research progress of resting cell fermentation production of industry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(8): 187-191 (in Chinese)
杨大娇, 任天宝, 王凤芹, 等. 静息细胞在发酵工业中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(8): 187-191
- [18] Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, et al. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(6): 820-828
- [19] Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6569-6576
- [20] Overhage J, Priefert H, Steinbüchel A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4837-4847
- [21] Plaggenborg R, Overhage J, Loos A, et al. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 745-755
- [22] Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H. Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis* sp. HR167[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 125(3): 369-376
- [23] Ji GP. Improvement of isomerization of eugenol by carbonyl iron[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 1996(4): 9-12 (in Chinese)
计国平. 羰基铁催化丁香酚异构化反应的改进[J]. *香料香精化妆品*, 1996(4): 9-12
- [24] Zhu HX, Deng SS, Zhang HB, et al. Progress in biosynthesis research of vanillin[J]. *Fine Chemicals*, 2004, 21(2): 125-128 (in Chinese)
朱慧霞, 邓胜松, 张洪斌, 等. 香兰素生物合成法的研究进展[J]. *精细化工*, 2004, 21(2): 125-128
- [25] Hua DL, Ma CQ, Lin S, et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130(4): 463-470

- [26] Abraham WR, Arfmann HA, Stumpf S, et al. Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds[J]. *Bioflavour*, 1988, 87: 399-414
- [27] Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 78(1): 1-9
- [28] Furukawa H, Morita H, Yoshida T, et al. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(4): 401-403
- [29] Yamada M, Okada Y, Yoshida T, et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(5): 1025-1030
- [30] Zhao LQ, Fang JM, Chen WB, et al. Repeated batch biotransformation from isoeugenol to vanillin by immobilized *Bacillus fusiformis* cells in CSTR reactor[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2012, 209-211: 1170-1173
- [31] Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, et al. Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(1): 1-12
- [32] Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, et al. *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid[J]. *Current Microbiology*, 2010, 62(3): 990-998
- [33] Ashengroph M, Amini J. Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(6): 358
- [34] Wang LZ, Zhang PY, Mao HF. Research advances in preparation of vanillin from eugenol[J]. *Journal of Shanghai Institute of Technology (Natural Science)*, 2016, 16(2): 125-131 (in Chinese)
王立志, 章平毅, 毛海舫. 丁香酚制备香兰素研究进展[J]. *上海应用技术学院学报: 自然科学版*, 2016, 16(2): 125-131
- [35] Sun M, Yao RS, Gao WX. Biotransformation of isoeugenol and biosynthesis of vanillin[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2006, 4(2): 33-36 (in Chinese)
孙敏, 姚日生, 高文霞. 异丁香酚的生物转化及香兰素的合成[J]. *生物加工过程*, 2006, 4(2): 33-36
- [36] Yamada M, Okada Y, Yoshida T, et al. Purification, characterization and gene cloning of isoeugenol-degrading enzyme from *Pseudomonas putida* IE27[J]. *Archives of Microbiology*, 2007, 187(6): 511-517
- [37] Yamada M, Okada Y, Yoshida T, et al. Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(4): 665-670
- [38] Ryu JY, Seo J, Unno T, et al. Isoeugenol monooxygenase and its putative regulatory gene are located in the eugenol metabolic gene cluster in *Pseudomonas nitroreducens* Jin1[J]. *Archives of Microbiology*, 2010, 192(3): 201-209
- [39] Zhao LQ, Xiao XD, Sun ZH, et al. Optimization of fermentation conditions for isoeugenol monooxygenase from *Bacillus fusiformis* CGMCC1347[J]. *Industrial Microbiology*, 2012, 42(4): 60-64 (in Chinese)
赵丽青, 肖向东, 孙志浩, 等. 纺锤芽孢杆菌 CGMCC1347 发酵生产异丁香酚单加氧酶的条件优化[J]. *工业微生物*, 2012, 42(4): 60-64
- [40] Zhao LQ, Jiang YZ, Fang HY, et al. Biotransformation of isoeugenol into vanillin using immobilized recombinant cells containing isoeugenol monooxygenase active aggregates[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 189(2): 448-458
- [41] Catarine Santos Rodrigues C, Latércia Tranches Dias A, de Oliveira Silva E. Unprecedented derivatization of ferulic acid through selective methoxylation by *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, 37(3): 233-237
- [42] Gao R, Yang W, Song PF, et al. Research progress on production of tobacco flavor by microbial fermentation[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(2): 92-96 (in Chinese)
高锐, 杨威, 宋鹏飞, 等. 微生物制备烟用香料的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(2): 92-96
- [43] Yang WW, Wu QL, Tang HZ, et al. Biosynthesis of natural vanillin—the queen of food ingredients[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(6): 1087-1095 (in Chinese)
杨文文, 吴秋林, 唐鸿志, 等. “香料皇后”——天然香兰素生物合成的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(6): 1087-1095
- [44] Calisti C, Ficca AG, Barghini P, et al. Regulation of ferulic catabolic genes in *Pseudomonas fluorescens* BF13: involvement of a MarR family regulator[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(3): 475-483
- [45] di Gioia D, Luziatelli F, Negroni A, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(4): 309-316
- [46] Zhao XJ. Screening and fermentation conditions of a marine actinomycete producing vanillin[J]. *China New Technologies and New Products*, 2017(6): 13-14 (in Chinese)
赵希景. 一株产香兰素的海洋放线菌的筛选及发酵条件的研究[J]. *中国新技术新产品*, 2017(6): 13-14
- [47] Chen P, Yan L, Wu ZR, et al. A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20400
- [48] Wang XL, Zheng P, Liu Q. Biotransformation of ferulic acid to vanillin by *Amycolatopsis* sp.[J]. *Industrial Microbiology*, 2013, 43(5): 33-38 (in Chinese)
王兴林, 郑璞, 刘琼. *Amycolatopsis* sp. 转化阿魏酸生产

- 香草醛[J]. 工业微生物, 2013, 43(5): 33-38
- [49] Hua DL, Ma CQ, Song LF, et al. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(4): 783-790
- [50] Vyrides I, Agathangelou M, Dimitriou R, et al. Novel *Halomonas* sp. B15 isolated from Larnaca Salt Lake in Cyprus that generates vanillin and vanillic acid from ferulic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(8): 1291-1296
- [51] Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, et al. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 50(2/3): 107-113
- [52] Bonnin E, Grangé H, Lesage-Meessen L, et al. Enzymic release of cellobiose from sugar beet pulp, and its use to favour vanillin production in *Pycnoporus cinnabarinus* from vanillic acid[J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41(2): 143-151
- [53] Zheng LR, Zheng P, Sun ZH, et al. Study on vanillin bioconversion by combining two filamentous fungi[J]. Food Science, 2007, 28(2): 155-158 (in Chinese)
郑丽蓉, 郑璞, 孙志浩, 等. 两株丝状真菌联合转化生产香草醛的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 155-158
- [54] Ruzzi M, Luziatelli F. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance biological production of vanillin from ferulic acid[J]. Animal Science and Biotechnologies, 2008, 65(1/2): 4-8
- [55] Barghini P, di Gioia D, Fava F, et al. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions[J]. Microbial Cell Factories, 2007, 6: 13
- [56] Graf N, Altenbuchner J. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 137-149
- [57] Fleige C, Meyer F, Steinbüchel A. Metabolic engineering of the actinomycete *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 towards enhanced production of natural vanillin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(11): 3410-3419
- [58] Luziatelli F, Brunetti L, Ficca AG, et al. Maximizing the efficiency of vanillin production by biocatalyst enhancement and process optimization[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 279
- [59] Chen XF, Cai GQ, Fan H, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of glycosyl transferase from *Nostoc flagelliforme*[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2018, 36(1): 39-44 (in Chinese)
陈雪峰, 蔡国强, 范华, 等. 发菜中糖基转移酶基因的克隆及原核表达[J]. 陕西科技大学学报, 2018, 36(1): 39-44
- [60] Cai GQ, Chen XF, Fan H, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of GDP-mannose 4,6-dehydratase from *Nostoc flagelliforme*[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 31-36 (in Chinese)
蔡国强, 陈雪峰, 范华, 等. 发菜中 GDP-甘露糖 4,6-脱水酶基因的克隆及原核表达[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 31-36
- [61] Cai GQ. Cloning expression and functional identification of salt stress-related genes from *Nostoc flagelliforme*[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2018 (in Chinese)
蔡国强. 发菜响应盐胁迫相关基因的克隆表达与功能鉴定[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2018
- [62] Fan H. Cloning and prokaryotic expression of polysaccharide metabolism-related differently expressed genes from *Nostoc flagelliforme* under salt stress[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2017 (in Chinese)
范华. 盐胁迫下发菜多糖代谢相关差异表达基因的克隆与原核表达[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2017