

微生物转化法生产香兰素*

周庆礼^{1,2} 黄艳凤¹ 韩英素¹ 王昌禄¹

(天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津,300222) (陕西科技大学生命科学与工程学院,咸阳,712081)

摘要 实验室保藏的一株链霉菌 L1936,能以阿魏酸和香兰素为唯一碳源生长,并能将阿魏酸转化为香兰素。研究中发现,阿魏酸是生产香兰素的较佳底物,添加量可达每升数克。发酵至 16 h 后添加阿魏酸,此时链霉菌 L1936 对阿魏酸的转化能力最强。此株链霉菌不仅能耐受高浓度的香兰素,而且具有一种与其他菌株完全不同的代谢流。在转化阿魏酸时,当香草酸的积累量达到 200 mg/L 时,就开始积累香兰素作为代谢的主要过量合成产物。流加 2 次底物阿魏酸使之浓度达 13 g/L,产物浓度达到 7.12 g/L。相应的摩尔转化率为 69.9%。

关键词 链霉菌,生物转化,阿魏酸,香兰素

在食品中,香兰素是使用最广泛的风味剂。而香兰素(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛)则是其中最重要的风味成分。每年以石油化学品和工业纸浆废液为原料,采用化学方法合成的香兰素约有 12 000 t^[1]。目前采用提取、蒸馏等方法从香兰豆中所获得的天然风味剂已远不能满足人们的需求,而且价格相当昂贵。因此,以天然物质(包括酚芪、丁香酚、阿魏酸)为底物用微生物转化法生产香兰素备受瞩目^[2]。据报道,阿魏酸、丁香酚都能经香兰素而被降解,但与丁香酚相比较,阿魏酸因其对微生物的毒性作用小,并在自然界广泛分布,不失为一种较好的底物^[3,4]。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

标准品阿魏酸、香兰素、香草酸、香兰醇、愈创木酚,购于 SIGMA 公司,其他材料市售。

1.2 菌种与培养条件

链霉菌 L1936 实验室保藏菌种,保藏于 -80℃ 甘油管中。

发酵培养基为(g/L):葡萄糖 1,酵母膏 1, Na₂HPO₄ 4, KH₂PO₄ 1, NaCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.05 g/L。培养温度 37℃,190

r/min。阿魏酸以 10% 阿魏酸钠盐溶液(pH 7.2)的形式添加至所需浓度。

1.3 在芳香类物质上的生长

链霉菌 L1936 在以阿魏酸和香兰素为唯一碳源生长的实验是在 37℃,190 r/min 条件下进行。将阿魏酸和香兰素分别溶于 2 mL 乙醇中,然后用蒸馏水定容,无菌过滤后添加到培养基中(酵母膏 1 g/L, Na₂HPO₄ 4 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NaCl 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.05 g/L),将培养好的斜面制成菌悬液分别接入上述培养基中。定时取样,用分光光度计在 600 nm 处测定吸光度值。

1.4 HPLC 法定量分析酚类代谢物

色谱柱 Shim-pack Vp-ODS(5 μm, 4.6 mm × 150 mm, 日本)接 C₁₈保护柱(4.6 mm × 150 mm);流动相为 V(甲醇):V(水):V(冰乙酸)=40:60:0.5;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 280 nm;柱温为室温;进样量为 5 μL。采用外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 链霉菌在酚类物质上的生长

阿魏酸和香兰素都对菌体有一定的毒性,特别是香兰素能抑制菌体的生长代谢。链霉菌 L1936 能利用阿魏酸和香兰素为唯一碳源生

第一作者:博士研究生,副教授。

* 2003 年度天津市自然科学基金重点项目

收稿时间 2003-10-12

长,而且生长量受物质浓度的影响。阿魏酸在 10 mmol/L 时仍利于链霉菌 L1936 的生长,但在浓度达到 20 mmol/L 时 L1936 生长速率下降(如图 1)。香兰素浓度在 5 mmol/L 时链霉菌 L1936 的生长速率最大。当浓度增长到 10 mmol/L 时它的生长受阻,20 mmol/L 时则对链霉菌 L1936 产生毒性作用(如图 2)。

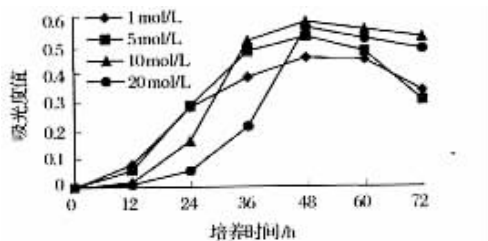


图 1 链霉菌以阿魏酸为碳源时的生长情况

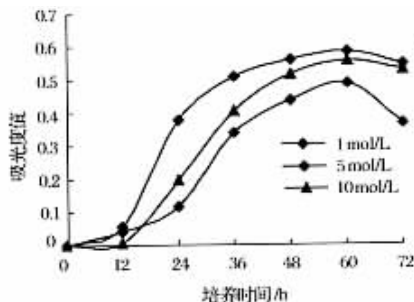


图 2 链霉菌以香兰素为碳源时的生长

2.2 阿魏酸的添加时间对发酵的影响

分别在转接后 0、8、16 h 三个不同时间向发酵培养基中加入 3 g/L 的阿魏酸,190 r/min, 37℃振荡培养,发酵结束后检测培养基中香兰素的产量。由图 3 可知,阿魏酸在由种子培养转接发酵培养后立即添加,此时香兰素的产量最低,而在进入稳定期时(16 h)添加产量最高。香兰素为链霉菌 L1936 的次级代谢产物。

在菌体合成阶段,负责次级代谢产物合成的酶处于抑制状态,因而不产生次级代谢产物。一旦生长至稳定期,这些酶便被激活或合成。在稳定期添加阿魏酸,此时葡萄糖基本耗尽,菌体数量达到最大,酶活力较强,转化阿魏酸的能力也强,香兰素才能得到最大量积累。

2.3 阿魏酸的添加量对香兰素发酵的影响

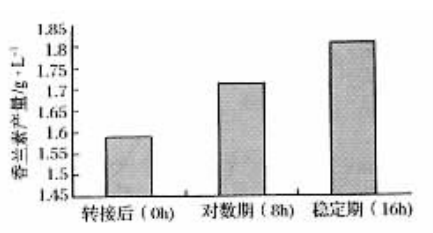


图 3 在不同时间添加阿魏酸

香兰素产量的变化情况

当阿魏酸的添加量为 1 g/L 时,香兰素的最大产量为 186 mg/L(见图 4)。阿魏酸则迅速降解,但香草酸的生成先于香兰素,这主要是由于醛具有较强的活力,香兰素总是很快地被转化为香草酸。然而香草酸只是积累到一定的水平,然后细胞开始不断积累香兰素作为过量合成产物。当阿魏酸的添加量增大时,这种现象就更明显。阿魏酸的添加量为 8 g/L,香草酸只积累到 200 g/L,香兰素产量则达到 4.08 g/L(见图 5)。一旦阿魏酸耗尽,积累的香兰素会进一步分解,使得香草酸的量有一定的增长。香兰素的积累量由阿魏酸的添加量所决定,而发酵液中阿魏酸的量并不影响香兰素的积累。这可由补加阿魏酸的实验可知(见图 6),当最初的 6 g/L 阿魏酸转化后,再添加 7 g/L 阿魏酸,香兰素浓度会进一步提高。在转化的过程中,香兰素的积累速度保持恒定。香兰素的最高浓度可达 7.12 g/L,摩尔转化率为 69.9%。阿魏酸耗尽后,所形成的香兰素和香草酸都会进一步降解。

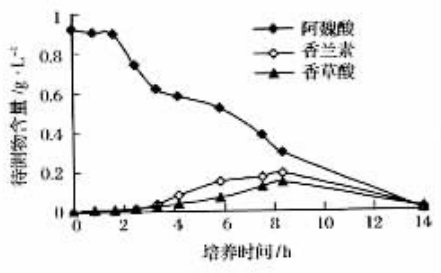


图 4 阿魏酸添加量为 1 g/L 时的产量曲线

3 结 论

在对发酵生产香兰素的机制进行研究的过程中,人们发现香兰素虽然作为代谢中间产物

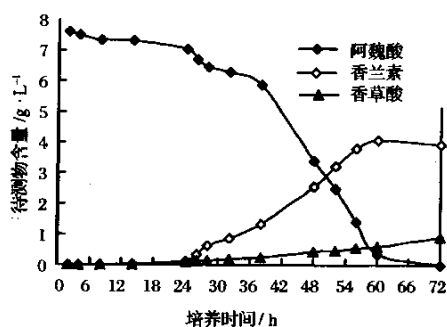


图5 阿魏酸添加量为8 g/L时的产量曲线

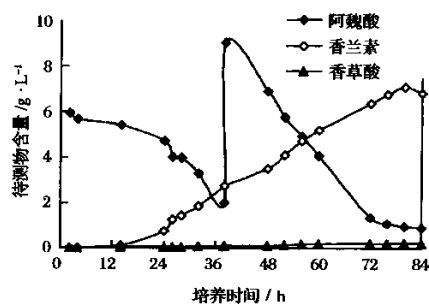


图6 阿魏酸分批添加量为6 g/L和7 g/L时的产量曲线

存在,但是很少会积累下来。比如 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *P. putida* 这2株菌都不能积累香兰素而转向积累香草酸。这主要是由于醛具有非常高的化学活性,在生物体系中很少积累。对于链霉菌L1936,当阿魏酸的添加浓

度较低时,同时积累香草酸和香兰素,它的特性没有明显地表现出来。当阿魏酸的添加浓度较高时,就可明显地表现它独特的代谢流,链霉菌L1936能够积累香兰素作为其过量合成产物。

链霉菌L1936的独特之处不仅在于它能耐受香兰素的毒性作用,更在于它能将香兰素积累到接近香兰素的结晶浓度1%(在20℃时)。在摇瓶试验中,香兰素产量的进一步提高可通过优化培养基或是通过高密度培养来实现。

参 考 文 献

- 1 Nicholas J W, Arjan N, Craig B F et al. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11 :490 ~ 496
- 2 Priefert H, Jrabenhorst J, Sterbuechel A. Biotechnological production of vanillin[J]. Appl Microbial Biotechnol, 2001, 56 :296 ~ 314
- 3 Rosazza J P N, Huang Z, Dostal L et al. Biocatalytic transformation of ferulic acid: an abundant aromatic natural product[J]. J Ind Microbiol, 1995, 15 :457 ~ 471
- 4 Li T, Rosazza J P N. Biocatalytic synthesis of vanillin[J]. Appl Environ Microbiol, 2000
- 5 Sutherland J B, Crawford D L, Pometto A L. Metabolism of cinnamic *p*-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*[J]. Can J Microbiol, 1983, 29 :1253 ~ 1257

Bioconversion for Vanillin from Ferulic Acid

Zhou Qingli^{1, 2} Huang Yanfeng¹ Han Yingsu¹ Wang Changlu¹

¹ College of Food and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222)

² College of Food and Bioengineering, Shanxi University of Science and Technology, Xianyang, 712081)

ABSTRACT Natural vanillin is of high interest to the flavor and fragrance industry. The present work describes the strain of *Streptomyces* L1936 isolated from microorganisms, capable of growing on ferulic acid and vanillin as the carbon source. Ferulic acid was found to be an excellent precursor for the conversion to vanillin. Strain L1936 could produce the highest amounts of vanillin when ferulic acid was added 16 h after inoculation. This strain is remarkable not only for its tolerance towards vanillin, but also for its completely different metabolic flux. During the metabolism of ferulic acid, this strain accumulated vanillic acid only to a level of around 200mg/L and then started to accumulate vanillin as the principal metabolic product. After ferulic acid was sequentially added into the medium for two times, the concentration of vanillin reached 7.12 g/L with a molar yield of 69.9%.

Key words vanillin, ferulic acid, bioconversion, *Streptomyces*