生物制备香原料

Biosynthesis Fragrance

尹开云

MUSÉE DELUXKING

云南芳香技术研究院

定义

- 将生物酶和微生物用于香料生产称为生物法合成香料，这类香料已经被欧盟和美国的食品法规界定为“天然香料”。
- 20世纪20年代的酒精、甘油和丙酮等发酵工程，属于厌氧发酵。
- 20世纪40年代初，随着青霉素的发现，抗生素发酵工业逐渐兴起。由于青霉素产生菌是需氧型的，微生物学家就在厌氧发酵技术的基础上，成功地引进了通气搅拌和一整套无菌技术，建立了深层通气发酵技术。它大大促进了发酵工业的发展，使有机酸、微生素、激素等都可以用发酵法大规模生产。
- 1957年，日本用微生物生产谷氨酸成功，如今20种氨基酸都可以用发酵法生产。氨基酸发酵工业的发展，是建立在代谢控制发酵新技术的基础上的。科学家在深入研究微生物代谢途径的基础上，通过对微生物进行人工诱变，先得到适合于生产某种产品的突变类型，再在人工控制的条件下培养，就大量产生人们所需要的物质。

- 氨基酸发酵是抗生素以外最大宗的微生物工程产品。其中，产量最大的要数谷氨酸（即味精）的生产，但是我国谷氨酸的生产在原料的利用率和转化率方面都比国外低约10个百分点，这样，成本就高了。比如，用甜菜和糖蜜作原料时，我国每生产一吨味精的成本是2400美元，而国外只用一半的钱就可以生产相同的量。日本是世界上最大的味精出口国，味之素公司、旭化成公司、协和发酵公司和武田制药厂都是当今生产味精的主要厂商，而我国上海天厨味精厂等一些久享盛名的味精生产厂，虽然产品也远销国外，但在生产效率等方面，与国外还有相当的差距。80年代中期，日本味精就曾以低于我国味精一半的价格出现在广州市场，他们还有如特鲜味精（肌苷酸）等产品，使我国味精面临严峻挑战。
- 用发酵法生产维生素，我国生产的品种有B2、B6、B12、vc。我们生产vc用的两步发酵法新工艺，居世界领先地位，已经在全国推广。
- 我国在用微生物方法生产甾体激素方面也有一定基础，有了系列产品，其中上海药物所成功地把喜树碱（治疗癌症药物，但毒性较大）转化为10—羟基喜树碱（毒性小），提高了对癌症的疗效，也属国际首例。

微生物发酵的优势

1、工业化生产，免受自然环境的不利影响。（微生物发酵生产香料香精是在工厂内进行，可以免受土壤、气候、温度和季节等自然环境条件的不利影响，因而能够大规模地常年进行工业化生产。）

2、常温常压，生产过程容易控制。（微生物发酵生产香料香精，不需要高温、高压和催化剂，在常温常压的条件下进行，因而生产条件容易得到保证，生产过程容易得到控制，有利于产品质量的稳定和提高。）

3、生产周期短，产量收获高 微生物的特点之一就是繁殖快，代谢旺。（微生物每完成一代的繁殖时间只需十几分钟至几个小时。）

4、变废为宝，减少环境污染。（可利用秸秆、麦麸、粉饼、酒糟等培养微生物，实现综合利用，变废为宝）

5、成本低，效益高。（微生物发酵生产香料香精，不需昂贵设备，原材料来源广泛，又节约大量耕地，能源消耗低，人员管理也非常有限，因此成本很低。而生产周期短，产 品产量大，质量稳定，因而经济效益很高。）

6、可用于开发新产品或者为老产品找到新的工艺路线。

生物合成香原料目录

- 香兰素
- 苯乙醇
- 内酯化合物
- 吡嗪类化合物

国内某公司产业化的生物发酵香料



用于生物合成生产香料的微生物

- 枯草芽孢杆菌（用于全程合成吡嗪类香料）
- 拟孢长喙壳菌（用于生产带果味和花香的萜烯化合物）
- 念珠长喙壳菌（乙酸异丁酯，乙酸异戊酯，香茅醇，香叶醇）
- 哈茨木霉菌株（内酯化合物6-戊基-α-吡喃酮，椰子香气）
- 谷氨酸棒杆菌Corynebacterium glutamicum（四甲基吡嗪，3g/L）
- 假单胞菌Pseudomonas（2-甲氧基-3-异丁基吡嗪）
- 黄曲霉（2-羟基-3,6-二异丁基吡嗪）
- 红酵母（在以蓖麻油为主要碳源的发酵培养基中，培养48h后可获得0.87g/Lγ-癸内酯）
- 酵母菌（β-苯乙醇，前体物质L-苯丙氨酸，2.2g/L）

- 2017年透明质酸的全球销售额近20亿美元，透明质酸的发酵生产也不断趋于成熟，结合代谢工程和合成生物学调控技术，实现了透明质酸合成途径的优化以及水蛭透明质酸酶的特定水平表达；通过透明质酸边合成边水解，实现了特定枯草芽孢杆菌发酵合成特定分子量的透明质酸。

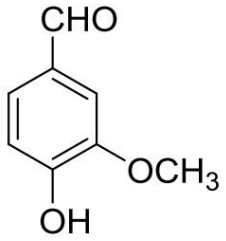
香兰素Vanilla

- 制备方法：微生物发酵、酶工程、细胞工程。
- 细菌、霉菌、酵母菌都可用于生产香兰素。
- 阿魏酸、丁香酚、异丁香酚、香草醇、香草胺、松柏醇、黎芦醇等化合物为前体，发酵可获得香兰素。
- 2018年，国内水平：15g/L

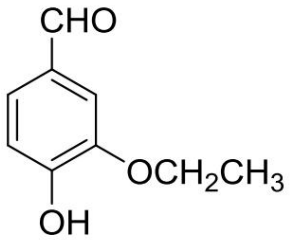
香兰素的生物合成

Vanillin can be used as perfume and food additive， because of the pleasant odour of the vanilla, there is about 2% in the vanilla bean.





Vanillin



Ethyl Vanillin

The molecular structure of vanillin was confirmed in 1874

Ethyl vanillin is a artificial flavor

香兰素的来源与使用量

- **Vanillin Industry**

Raw material	Method	Output （t）	Price （$/Kg）
Vanilla been(2.0%)		≥2000	1500
Ferulic acid	Biological	20	650
4-Methyl guaiacol	Chemical	～50	65
Eugenol	Biological or Chemical	～400	70
Lignin	Chemical	1000	60
Guaiacol	Chemical	14000	11
Ethyl guaiacol	Chemical	5000	12

香兰素的生物合成

表 1　发酵法生产天然香兰素的菌种和原料底物

原料底物	微生物种类	香兰素浓度	参考文献
葡萄糖	*E. coli* KL7	4.2 g/L	[1]
木质素	*Phanerochaete chrysosporium*	痕量	[2]
1,2-二苯乙烯酚	*Pseudomonas paucimobilis*	痕量	[3]
香兰酸	*Pycnoporus cinnabarinus*	1.58 g/L	[4]
丁香酚	*Pseudomonas sp.*	2.6 g/L	[5]
异丁香酚	*Serratia marcescens*	3.8 g/L	[6]
芳香氨基酸	*Proteus vulgaris*	痕量	[7]
阿魏酸	KX-02 *Streptomyces*	15 g/L	本研究

1996 年德国哈门及雷默股份有限公司利用土壤丝菌 DSM9992 菌株将阿魏酸转化为香兰素，产物浓度为 11.5 g/L；1999 年法国农业科学院使用丝状真菌、黑曲霉和朱红密孔菌，以甜菜、甜菜渣作原料生产香兰素，产物浓度为 0.763 g/L；同年，瑞士使用西唐链霉菌，以阿魏酸为原料，摇瓶结果达到 6.4 g/L。美国、日本等国对香兰素也进行了大量的研究。我国几所大学(山东大学、东北农业大学、陕西科技大学、山西科技大学等) 对香兰素发酵制备也进行过广泛的研究。

香兰素的生物合成

以天然米糠油来源的阿魏酸为原料，生物转化制备香兰素的方法被广泛研究，其代谢途径可以简化为下列反应式，见图 1。

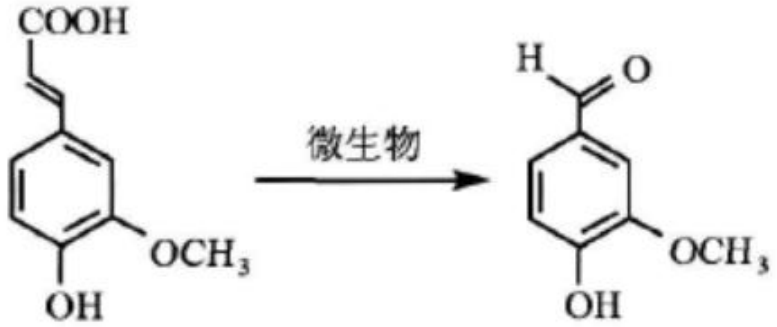


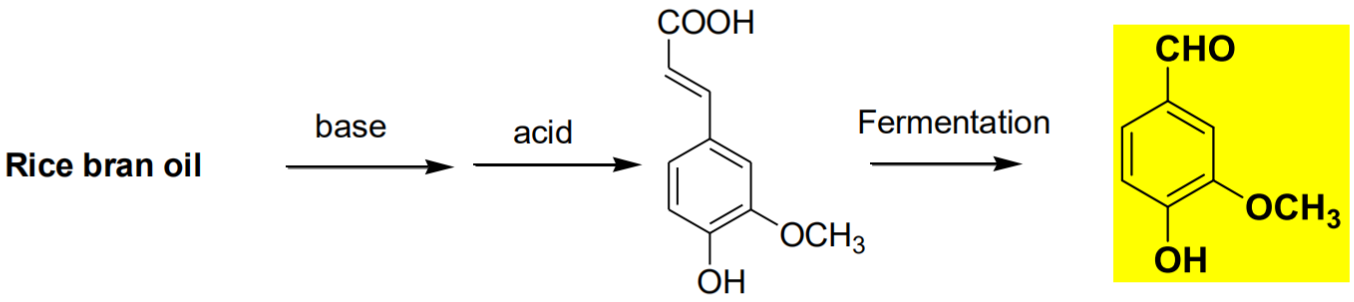
图 1　阿魏酸转化为香兰素反应式

目前国际市场上，合成香兰素价格约为 10 美元/千克，天然香荚兰豆提取的香兰素约为 4 000 美元/千克，生物转化制备的天然香兰素价格约为 1 000 美元/千克。由于天然香荚兰豆的资源受到自然条件

米糠油-阿魏酸-香兰素工艺

➢ **Other Concept for Natural Vanillin in the market**

Raw materials **Processing method** **Product**



From plants **Ferment and neutral reaction** **Natural vanillin**

香兰素的生物合成

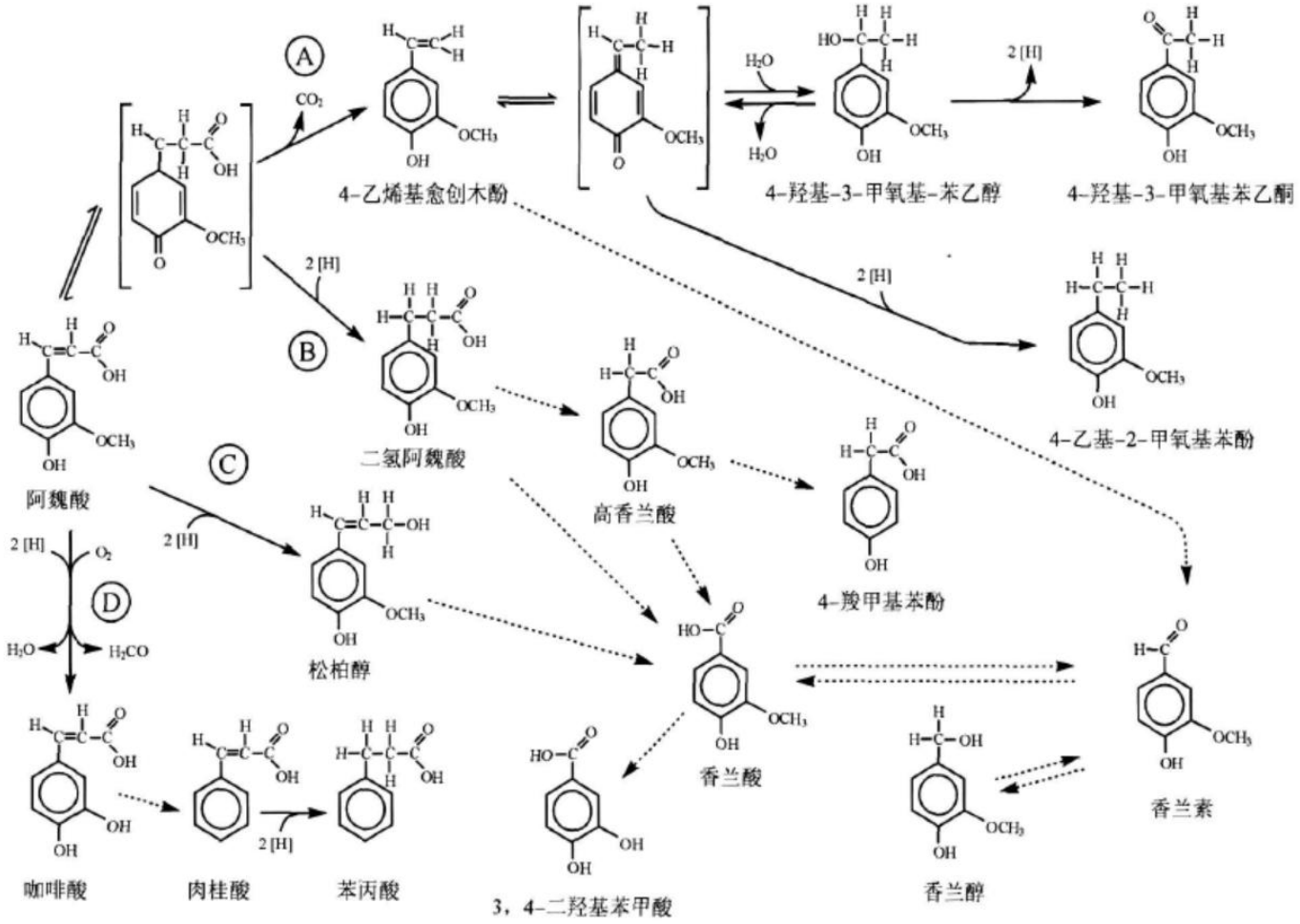
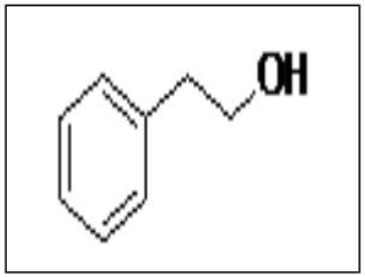


图 3　阿魏酸生成香兰素的代谢途径

天然苯乙醇

β-苯乙醇，常温下是一种带有**玫瑰花香气**的**无色透明液体**。沸点为219.8℃。其分子式$C_8H_{10}O$，分子量122.16，化学结构式如下：









天然β-苯乙醇存在于自然界中很多植物，如**玫瑰、风信子、茉莉、水仙、黄兰、百合等的精油**中，尤其是玫瑰精油。

苯乙醇的来源

- 植物原料提取法

可以从玫瑰花中提取，但生产周期长、生产成本昂贵，种植受气候和环境影响，无法进行大规模工业化生产，因此仅用于高档香料中。

- 化学合成法

工业规模化学合成β-PE的方法众多，主要以苯、甲苯和苯乙烯为原料进行合成，原料为苯或苯乙烯，致癌性强，对健康和环境有危害。且香气留存时间与柔和度等方面比较差，大多不能用于中高端香料。

- 生物发酵法

微生物转化合成β-苯乙醇具有生产成本低、周期短、污染少、环境温和等优点，生物转化的β-苯乙醇因其为天然添加剂，对人类的健康将带来无法估价的益处。特别是我国L-苯丙氨酸产业已进入年产千吨级水平，使得微生物转化合成β-苯乙醇更具有开发价值。

2-苯乙醇的生物合成

为了提高微生物的转化能力，瑞士化学及生物化学工程实验室 Serp D 等人开发了一系列 ISPR 技术，一种是固定化溶剂方法分离回收代谢产物，用化学和机械性能稳定的聚乙烯合成树脂作为载体截留有机溶剂（癸二酸二丁酯）形成吸附剂，有效地减轻了产物抑制并从发酵液中回收得到了产物 2－PE[17]。另一项ISPR技术以油酸作为溶剂进行双液相分批培养酿酒酵母，水相中的产物浓度为 2.1g/L，尽管这种方式对酵母还存在一定程度的影响，但发酵液中总浓度达到了 12.6g/L，油酸相中的 2－PE 高达 24g/L 平均体积产率为 0.26g/L·h，取得了较好的结果[18]。还有一种新型的 ISPR 方法，可以连续地从发酵液中分离 2－苯乙醇，发酵液与内置于发酵罐中的透滤柱（外壁为藻朊酸基树脂，内装癸二酸二丁酯溶剂）相接触进行分离，新的工艺结合了一般萃取和膜分离的优点，尤其是生物细胞与溶剂被水凝胶层相隔离，在间歇培养酿酒酵母发酵时，产物 2－PE 的浓度从 3.8g/L 提高到了 5.6g/L[19]。

生物转化 L－苯丙氨酸成为 2－PE 最有前途的方法就是利用生长酵母菌通过 Ehilich 途径，采用各种ISPR技术，从发酵液中及时回收分离产物，保持较低的产物浓度不致于出现严重的产物抑制，以便酵母菌能继续代谢 2－PE，最大限度地提高细胞生产水平。这些 ISPR 技术包括液－液萃取发酵技术（Liquid－liquid extraction fermentation）、溶剂固定化技术（Immobilization）、CO_2 超临界萃取（Extraction with supercritical CO_2）、吸附技术（Sorption）、全蒸发技术（Pervaporation）等。随着这些新的 ISPR 技术的不断开发与完善，可以最大限度地减少产物抑制，提高生物发酵生产 2－PE 的技术水平。

发酵法制备天然苯乙醇

目前全球β-苯乙醇年产量近万吨，基本采用化学合成的方法生产，只有极少部分从玫瑰精油中提取，其价格与合成β-苯乙醇相差巨大，天然β-苯乙醇(99%)售价超过3000元/kg，而合成β-苯乙醇只有25元/kg左右。

发酵法生产的天然β-苯乙醇粗品的含水量偏高，纯度大致在99%，其中主要杂质（丁酸、戊酸、丁醇、异丁酸）的含量均在30ppm以上，对于香气成分还有较大的影响，采用高真空精密精馏技术可将其中的关键杂质降至10ppm以下，纯度提高至99.9%以上 ，香气品质接近天然提取的产品

γ-癸内酯的生物合成

γ－癸内酯（GDL）广泛应用于食品和饮料中，具有类似于桃子的水果香气，它是香料工业中可由生物技术方法制取的主要香料产品之一。用微生物合成γ－癸内酯一般由羟基酸经β－氧化得到具有旋光活性的较纯的产物，羟基的位置和立体结构决定产物的构成，化学合成品则为消旋体。近年来有大量的相关报导，大部分使用各种酵母（如 *Sporidiobolus salmonicolor* 和 *Yarrowia lipolytica*），以蓖麻油或蓖麻醇酸为前体物质进行发酵，经过微生物水解、氧化修饰、内酯化等反应生成内酯化合物。

结论

- 生物技术方法使用的原料来源主要是糖、淀粉、植物油脂和氨基酸等，最适合用于制备天然资源来源缺乏、具有光学活性和/或立体选择性以及化学法制备污染大或安全性不好的香料，如：（R）-（+） -α-紫罗兰酮、MCP等。香料质量的一个重要的要求是产品具有纯正的香气，不能有任何异味，而发酵后续产品的处理很难把握。
- 为了竞争，生物法香料的生产水平应该在10克/升以上，而价格应该在50-1000美元/公斤。

谢谢！

Merci