

生物转化法生产 β -苯乙醇

梅建凤¹* 陈虹²

(浙江工业大学药学院 杭州 310014)¹ (浙江树人大学生物与环境工程学院 杭州 310015)²

摘要: β -苯乙醇是一种多功能的精细化学品, 在食品、日化和轻工等领域有着广泛的应用, 全球每年近万吨的 β -苯乙醇产品基本都是采用化学方法合成, 随着人们对天然添加剂的日益需求, 迫切需要开发其可以替代的新型生产技术, 生物转化法是获得天然 β -苯乙醇的最佳途径。概述了生物转化法生产 β -苯乙醇的方法, 着重介绍 β -苯乙醇合成的代谢途径、转化的微生物种类和 β -苯乙醇对酵母细胞毒性问题。

关键词: β -苯乙醇, 生物转化, 发酵

中图分类号: TQ923 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0114-05

Production of β -Phenylethanol by Bioconversion

MEI Jian-Feng¹* CHEN Hong²

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)¹

(College of Biological and Environmental Engineering Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015)²

Abstract: β -phenylethanol is an all-purpose fine chemical, and takes on extensive applications in food, daily chemical and light industries. The world's annual production of nearly ten thousand tons is synthesized by chemical means. On account of the demands for the natural additives increasingly, it is need to develop a new-type production technology urgently. Bioconversion method is the best way to get natural β -phenylethanol. The paper described the production technique of β -phenylethanol by bioconversion, and focused on the pathway of biosynthesis of β -phenylethanol, microbes and cytotoxicity of β -phenylethanol to yeast cell involved in bioconversion.

Key words: β -phenylethanol, Bioconversion, Fermentation

β -苯乙醇 (PEA) 是一种具有淡雅细腻玫瑰气味的芳香醇, 自然存在于许多植物的精油中, 如风信子、茉莉、茶叶、黄兰、水仙和百合等的精油; β -苯乙醇也是一些发酵食品, 如面包、葡萄酒、苹果酒、干酪和酱油的自然风味物质。玫瑰芳香气味的受欢迎, 使得 β -苯乙醇在食品、化妆品、烟草和日化用品中有着广泛的应用, 它不仅是所有玫瑰香型香气的基本组分, 而且具有协合及增效作用, 是多种香型配方所需的组分^[1]。

目前, 全球 β -苯乙醇的年产量近万吨, 基本上都是采用廉价的化工原料化学合成方法生产, 仅有很少一部分从玫瑰油中提取。化学合成的 β -苯乙醇市场价格约为 3.50 \$/kg, 而天然 β -苯乙醇价格却高达 1,000 \$/kg 以上^[2]。随着人们生活水平的提高和对健康的关注, 越来越重视食品的安全性, 更崇尚“绿色”和“天然”, 食品生产也越来越倾向使用天然添加剂。在美国和欧洲, 能被标记为“天然”的调味剂和芳香剂必须是采用物理方法从天然材料中提取和酶催化或者微生物发酵法生产^[3]。从玫瑰或其它植物的提炼油中提取 β -苯乙醇的成本非常高, 必须寻找其新的天然来源。

* 通讯作者 Tel: 0571-88320389, E-mail: mrion@z-jut.edu.cn

收稿日期: 2004-06-15, 修回日期: 2004-08-01

1 β-苯乙醇的化学合成

从 1876 年发现 β-苯乙醇以来，已有多种化学合成方法报道。目前主要生产方法有苯-环氧乙烷合成法和氧化苯乙烯加氢法，国际市场上苯-环氧乙烷合成法产品占 40%，氧化苯乙烯加氢法产品占 60%。苯-环氧乙烷合成法产品所含微量杂质不同，香气差异较大，大多不能用于香料，国内主要采用氧化苯乙烯加氢法，而苯-环氧乙烷合成法生产的 β-苯乙醇产品质量尚未达到标准。

化学合成方法生产的 β-苯乙醇，常含有不良气味的副产物，如联二苯，β-氯代乙苯，氯乙醇等，这些杂质难以用蒸馏、精馏、重结晶等物理方法去除，因而产物的纯化是一个非常突出的问题。不同质量等级的 β-苯乙醇有不同的用途，只有经过较高成本的纯化后，β-苯乙醇产品才能达到食用和日用香料的质量标准。

2 生物转化法生产 β-苯乙醇

许多发酵食品，如面包、葡萄酒、苹果酒、啤酒、黄酒、干酪、酱油以及乌龙茶等都带有芬芳的香味，香味物质都是由酵母在发酵过程中自然形成。在发酵过程中，大多数酵母菌能产生杂醇油，而 β-苯乙醇是杂醇油的重要组成部分，也是决定发酵食品品质的一个关键因素，例如，清酒中 β-苯乙醇浓度为 20~70 mg/L，黄酒中高于 100 mg/L。酵母细胞可以从头开始合成，也可以通过氨基酸分解途径转化培养基中的 L-苯丙氨酸为 β-苯乙醇。

2.1 合成 β-苯乙醇的代谢途径

2.1.1 苯丙酮酸途径：在一些酵母细胞中，β-苯乙醇可以通过合成芳香族氨基酸的莽草酸途径从头合成^[4]。即经过莽草酸途径形成分枝酸后，分枝酸在变位酶作用下，转变成预苯酸，经过脱水、脱羧后形成苯丙酮酸；苯丙酮酸脱羧产生苯乙醛，苯乙醛脱氢便生成 β-苯乙醇，代谢途径见如图 1。

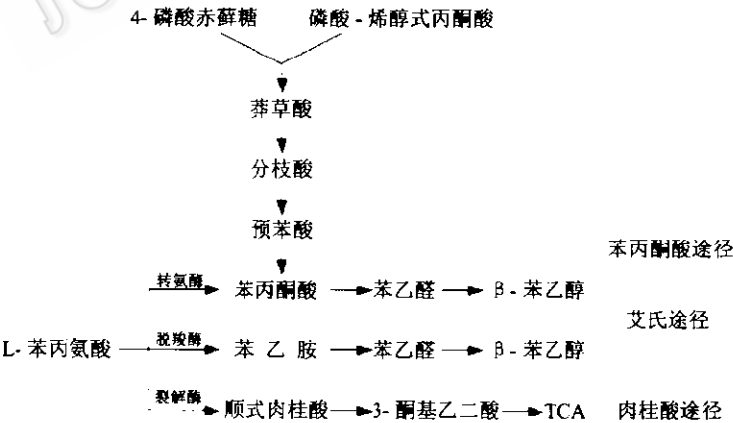


图 1 L-苯丙氨酸的代谢途径

2.1.2 艾氏途径：在哺乳动物细胞中，L-苯丙氨酸分解转变为酪氨酸，酪氨酸再经过尿黑酸降解为延胡索酸和乙酰乙酸。而在微生物细胞中，L-苯丙氨酸的分解代谢可能存在几种途径。其中之一是肉桂酸途径，降解过程的第一步是苯丙氨酸脱去氨基产生顺式肉桂酸，如在掷孢酵母（*Sporobolomyces roseus*）和黏红酵母（*Rhodotorula glutinis*）

细胞中。对于把氨基酸仅作为氮源利用的微生物来说,肉桂酸已没有进一步降解的必要;而对于能够利用氨基酸作为碳源的微生物,肉桂酸则经过原儿茶酸进一步降解为 3-酮基乙二酸,3-酮基乙二酸最终进入到 TCA 循环中^[5]。

在微生物细胞中,L-苯丙氨酸分解的另一条途径是通过氨基酸的转氨作用生成苯丙酮酸,或在脱羧酶作用下形成苯乙胺,再脱羧或胺氧化形成苯乙醛,进而生成 β -苯乙醇,代谢途径见图 1。这个途径首先是由 Ehrlich 在 1907 年发现,后来便以他的名字命名,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 L-苯丙氨酸具体代谢途径见文献 [6]。

在酵母细胞中, β -苯乙醇合成走哪一条途径取决于培养基中氮源的种类,只有当 L-苯丙氨酸作唯一氮源存在时,艾氏途径才能占优势。如果环境中存在其它更容易利用的氮源存在,即使在较高的 L-苯丙氨酸浓度条件下,L-苯丙氨酸仍有一部分通过其它途径被代谢,如通过肉桂酸途径降解为 3-酮基乙二酸而进入 TCA 循环,而且这个降解途径不能完全被抑制,所以任何条件下,L-苯丙氨酸不能完全转化为 β -苯乙醇^[7]。

2.2 合成 β -苯乙醇的微生物 多种酵母具有从头合成 β -苯乙醇的能力,如马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 发酵 5 d,可产生浓度为 400 mg/L 的 β -苯乙醇^[8];发酵毕赤酵母 (*Pichia fermentans*) 发酵 16 h,可形成浓度为 505.5 mg/L 的 β -苯乙醇^[9]。此外,还有酿酒酵母 (*Saccharomyces vini*)、产朊球拟酵母 (*Torulopsis utilis*)、芽枝状枝霉 (*Cladosporium cladosporioides*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、酿酒酵母、异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*) 等,都能在生长过程中从头合成一定量的 β -苯乙醇^[10]。

常规发酵培养液中,酵母从头合成 β -苯乙醇最终浓度都非常低,所以,从头合成 β -苯乙醇的发酵方法不是一种经济有效的发酵生产过程,但在培养基中加入 L-苯丙氨酸,可以大大提高 β -苯乙醇的产量。如在培养基中 L-苯丙氨酸浓度为 6.0 g/L 时,酿酒酵母 Giv 2009 菌株发酵 48 h,转化产生的 β -苯乙醇浓度可达 2.35 g/L^[7];在培养基中 L-苯丙氨酸浓度为 9.0 g/L 时,马克斯克鲁维酵母 CBS 600 菌株发酵 39 h,转化产生的 β -苯乙醇浓度为 5.6 g/L^[11],摩尔转化率达到 0.83。显然,利用 L-苯丙氨酸为前体,生物转化法生产 β -苯乙醇是实际可行的生产工艺。但涉及的一个问题是,这种产品能否标称“天然”,如欧洲的立法规定,如果对终产品要标称“天然”,则也要求作为前体的原料也必须是“天然”。目前,市场上的 L-苯丙氨酸基本上都是采用微生物发酵法或酶法生产,无疑是天然产品,且市场价格便宜,可满足大规模生物转化法生产 β -苯乙醇的需要。

不少真菌也具有从头合成或转化 L-苯丙氨酸为 β -苯乙醇的能力,如火木层孔菌 (*Phellinus igniarius*)、平滑层孔菌 (*P. laevigatus*)、杨木层孔菌 (*P. tremulae*)、安息香薄皮孔菌 (*Ischnoderma benzoinum*)、帚状地霉 (*Geotrichum penicillatum*)、猴头菌 (*Hericium erinaceus*)、硬黑孔菌 (*Nigroporus durus*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等,但合成或转化能力相对较低^[2, 12]。

3 β -苯乙醇对细胞的毒性

和其它醇类物质一样,高浓度 β -苯乙醇对微生物细胞有一定的毒性。培养基中加入较高浓度的 L-苯丙氨酸前体,酵母能够转化形成 β -苯乙醇达到的浓度就等于抑制细胞生长的浓度;此外,酵母在发酵中自身也会产生大量的乙醇,而且乙醇和 β -苯乙醇

联合作用产生的毒性比它们各自产生的毒性作用累加要高。所以在要求达到高产量生产 β -苯乙醇工艺过程中，必须考虑 β -苯乙醇和乙醇对酵母的毒性^[13]。

克服 β -苯乙醇和乙醇对酵母细胞的毒性，可以借鉴高浓度乙醇发酵技术。从菌种角度考虑，不同的酵母菌或同种不同菌株对 β -苯乙醇的耐受性不同，例如，浓度为 2.0 g/L 的 β -苯乙醇就能完全抑制马克斯克鲁维酵母的生长，而对于酿酒酵母，达到相同的抑制效果时， β -苯乙醇浓度需 4.0 g/L 以上^[1, 7]。因而可以选育耐高浓度 β -苯乙醇和乙醇的酵母菌株作为生产菌种，或采用克拉布特里阴性酵母，如马克斯克鲁维酵母和异常汉逊酵母；从发酵工艺角度考虑，一方面，控制葡萄糖浓度可以阻止克拉布特里阳性酵母产生乙醇，如采用补料分批发酵^[7]；另一方面则是开发一种从发酵培养基中连续回收 β -苯乙醇技术，即原位产物分离技术 (*In situ* product removal, 简称 ISPR)，就是在水相的发酵培养基中加入水不溶性的有机溶剂， β -苯乙醇溶解到有机溶剂中，发酵液中的 β -苯乙醇浓度降低，从而降低对酵母细胞的毒害作用，有利于 L-苯丙氨酸向 β -苯乙醇转化反应的进行，图 2 是 Etschmann 设计的 ISPR 工艺简图^[14]。采用 ISPR 技术发酵， β -苯乙醇的转化率可以大幅度提高，如采用 ISPR 工艺，酿酒酵母转化生成的 β -苯乙醇浓度可达 12.6 g/L，而分批补料发酵只能达到 3.8 g/L^[15]。

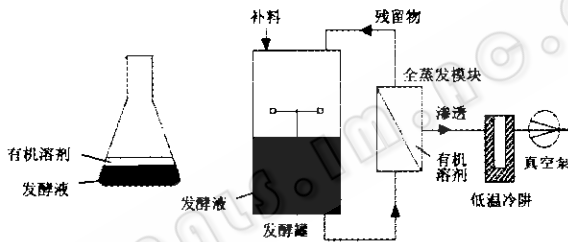


图 2 摇瓶和发酵罐生产 β -苯乙醇的原位分离技术示意图

无论如何， β -苯乙醇对酵母细胞的毒性问题总能解决。如果难以获得耐受高浓度 β -苯乙醇的酵母，则最重要的研究目标就是为 ISPR 寻找一种有效、工业可行的技术，便于整合全部生产过程。在实际生产中，ISPR 技术必定会增加生产过程的复杂性和成本，所以仍需进一步研究开发运用于完整细胞的原位产物分离技术。

4 展望

在当今生物技术迅速发展并转化为商品的时代，生物化工产业的发展十分迅猛，据有关方面预测，未来将有 20% ~ 30% 的化学工艺过程将会被生物技术过程所取代。同时，随着石油等非再生资源日益减少、世界人口和环境压力的增加，应用现代生物技术改造和替代传统化工工艺的趋势越来越引起人们的重视，为传统技术或常规技术所不能解决的重大问题带来新的曙光。生物转化法生产 β -苯乙醇顺应了这一要求，而人们对天然添加剂的青睐，促成天然 β -苯乙醇高价格，这些原因使得生物转化法生产 β -苯乙醇成为一个颇有吸引力的研究课题。

参考文献

[1] Fabre C E, Blanc P J, Goma G. *Perfume and Flavor*, 1998, **23**: 43 ~ 45.
[2] Etschmann M M W, Bluenke W, Sell D, *et al.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **59**: 1 ~ 8.
[3] US Food and Drug Administration, Code of federal regulations 21CFR101, 22. 2001.

- [4] Genomenet. [http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget? path: sce00400](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?path:sce00400), 2003-04-18/2004-06-10.
- [5] Large P J. Yeast, 1986, **2**: 1 ~ 34.
- [6] Genomenet. [http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget? path: sce00360](http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?path:sce00360), 2003-04-18/2004-06-10.
- [7] Stark D, Dissertation, EPFL Lausanne, 2001.
- [8] Fabre C E, Duviau V J, Blanc P J, *et al.* Biotechnology Letters, 1995, **17**: 1207 ~ 1212.
- [9] Huang C J, Lee S L, Chou C C. Food Research International. 2001, **34**: 277 ~ 282.
- [10] Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Biotechnology Letters. 2003, **25**: 531 ~ 536.
- [11] Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, **29**: 187 ~ 193.
- [12] Lomascolo A, Lesage-Meessen L, Haon M, *et al.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, **17**: 99 ~ 102.
- [13] Stark D, Zala D, Münch T. Enzyme and Microbial Technology, 2003, **32**: 212 ~ 223.
- [14] Etschmann M, Schrader J, Sell D. [http://kwi.dechema.de/biovt/images/poster_ pe02_ e. pdf](http://kwi.dechema.de/biovt/images/poster_pe02_e.pdf), 2003-11-24/ 2004-06-10.
- [15] Serp D, Stockar U V, Marison I W. Biotechnology and Bioengineering, 2003, **82**: 103 ~ 110.