

生物转化烯丙基酚类化合物 生产天然香料的研究

李巧峰¹, 余旭亚^{1*}, 孟庆雄¹, 王亚明²

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650224;

2. 昆明理工大学化工学院, 云南昆明 650224)

摘要: 烯丙基苯酚类化合物是常见的芳香化合物, 是香料生产的常用原料。生物转化已成为生产天然香料的一个重要方法。生物转化过程以其环境友好性、产品是“天然的”等优点, 越来越被大家关注。综述了烯丙基苯酚类化合物的生物转化及其生产相关香料的最新进展, 并以香草醛为例阐述了生物转化生产高附加值天然香料的潜力。同时, 展望了研究生物转化的代谢机制及其工艺优化的现实意义。

关键词: 生物转化, 烯丙基苯酚, 天然香料, 香草醛

Research in biotransformation of allyl-phenol compounds to produce natural flavors

LI Qiao-feng¹, YU Xu-ya^{1*}, MENG Qing-xiong¹, WANG Ya-ming²

(1. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

2. College of Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: Allyl-phenol compounds is a kind of common aromatic compounds that are often used as starting compounds for the production of various flavors. Recently, biotransformation has emerged as an important approach for producing natural flavors in high quantities. Because the biotransformation processes are environmentally friendly and the products are considered 'natural', flavor production using this method is attracting more and more attention. The recent advances in the synthesis, biotransformation of allyl-phenol compounds and its production of relevant natural flavors were reviewed. Using vanillin as a model to show recent progress in high-value natural flavor production, and the significance of future research in metabolic mechanism character and optimization of biotransformation to improve the yields of target products for scale-up and industrial use were discussed.

Key words: biotransformation; allyl-phenol compounds; natural flavors; vanillin

中图分类号: TS264.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0447-06

面对全球人口健康、资源紧缺、环境污染、粮食危机等问题, 从天然植物中提取和化学合成香料已经不能满足社会发展和消费者的需求。生物转化生产天然香料以其效率高、反应温和及无污染等优点日益成为研究的热点。利用廉价而有效的原料来生物转化合成天然香料是最有前途的发展方向, 烯丙基苯酚类化合物作为一种常见的合成香料的原料成为很好的选择。本文就烯丙基苯酚类化合物的生物转化生产天然香料的研究进行了综述。

1 相关概述

1.1 烯丙基苯酚类化合物的合成

收稿日期: 2010-04-13 * 通讯联系人

作者简介: 李巧峰(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药。

基金项目: 国家自然科学基金项目(6392-20070009)。

烯丙基苯酚类化合物是一类重要的有机化工原料。它的来源首先是从植物原料中提取, 后来主要以苯酚衍生物和烯丙基溴为原料^[1-3]。该法因需在水无氧条件下, 所用催化剂氢化钠是易燃、易爆物质, 反应收率低等缺点, 不适合大批量生产。

随着发展观的提出, 追求清洁生产、绿色合成等新型合成路线成为必然。两相催化反应应运而生, 此类反应不需无水无氧条件, 反应速度快、反应条件温和、产品收率高、副反应少、节约原材料、减少了有害试剂的排放、环境污染小。近年来, 此法已在香料工业上合成了一些新化合物, 改进了某些化合物合成工艺条件。目前生物科学迅猛发展, 应用生物转化法从天然合成烯丙基苯酚类化合物将是一个重要的发展领域。

1.2 天然香料

伴随人们消费观念的改变和化学合成物质的安全性及环境问题,化学法合成香料的用量逐渐减少,而天然香料的应用日益广泛。天然香料以其绿色、安全、环保等特点,日益受到人们的钟爱。我国自然资源丰富,是盛产天然香料的大国。据不完全统计,我国有400多种香料植物,目前已生产的天然香料有120多种。其中,薄荷油、桂油和茴香油的产量已稳居世界第一。无论在香料植物资源上,还是目前已经形成商品的天然香料的品种和数量上,我国在国际上均已占有一定的地位,已成为天然香料的生产大国之一。

由于提取、加工的工艺落后,香料资源只有部分被开发利用,很多植物性天然香料只能做到初步提取,而且收率和纯度都较低,甚至有一些产品被运到国外进行深加工。这不仅导致中国市场植物性天然香料紧缺,而且严重浪费我国的宝贵资源。

香料广泛应用于食品、饮料、化妆品等行业。2009年6月我国天然香料进出口情况调查显示,大部分香料还是以进口为主,只有一小部分是出口,而且出口量不是很大^[4]。今天世界市场上的大部分香料是化学合成的。从植物原料中提取的香料,含量大于5%,即可归类为“天然的”香料。使用不同方法生产的香料,其价格也不同,香草醛的生产就是个典型的例子。从香兰豆提取出来的香草醛价格是1200~4000美元/kg。相比之下,由愈创木酚化学合成的香草醛价格却不到15美元/kg。近年来,根据FDA和欧洲立法,利用生物技术获得的产品也可视为“天然的”,只要生物转化过程的底物是天然来源的就可以^[5],因此,生物技术生产香料越来越成为研究的热点^[6-10]。

1.3 生物转化

目前,化学合成法仍然占香料生产的主导地位,此法往往会造成环境污染和因缺乏底物选择性而导致非目标反应混合物的形成,使功效降低,下游成本提高。根据欧洲相关法规,这些香料的用途仅限于食品、饮料和化妆品领域,尽管价格昂贵,但在全球市场的需求量仍很可观。另外,从植物中直接提取生产天然香料存在很多的问题,如植物原料中香料化合物的浓度通常较低,提取过程复杂,成本很高,采集植物原料受到天气条件和植物疾病的影响^[11]。因此,天然香料还不能满足巨大的市场需求,需要开发新的可替代资源^[12]。

生物转化是生产天然香料的一个新兴领域。一般来说,生物转化具备以下优势:a.反应条件温和;b.区域选择性高或产物立体特异性高;c.几乎不会造成环境污染^[9,13-14]。基于这些重要优势,生物转化生产香料的研究越来越多。目前,主要有三种生物合成香料的方式:植物组织培养法、游离酶催化法和微生物转化法。植物组织培养生物转化生产香料的研究已很成熟,但由于成本高,植物组织生长缓慢和芳香化合物产量低,使得植物细胞转化只能有效利用在系统研究目标化合物的生化途径上,限制了其工业化发展^[15]。游离酶催化和微生物转化具有较高的

底物选择性,副产品少,产物分离过程简单等优点,被公认是最有发展潜力的方法。其中,使用全细胞催化已成为大规模合成香料、精细化学品和食品添加剂的一个重要工具^[4,9,16-17]。

微生物学、发酵工程、分子生物学和生物化学的发展,不仅加深了研究者对天然香料分子生化途径的认识,而且可以指导工业化设计流程,包括工艺放大、工艺优化、产品回收等方面的快速发展。已经成功地利用生物细胞及其酶的生物转化,重新合成了单独的香料化合物如醇、醛、酮、酸、酯、芳香化合物和萜类化合物、内酯、吡嗪等^[18]。

2 生物转化烯丙基苯酚类化合物

生物转化烯丙基苯酚类化合物已成为生物技术生产香料的一个重要分支^[19-26]。根据侧链C=C的位置不同,植物香料中烯丙基苯酚类化合物分为1-烯丙基苯酚和2-烯丙基苯酚两类,它们是烯丙基苯酚类化合物中一类重要的化合物。这两类烯丙基苯酚类化合物有不同的结构类似物,如图1所示。

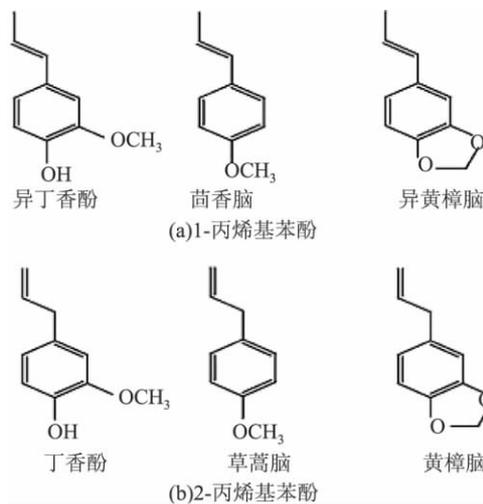


图1 两类烯丙基化合物的结构类似物

这些化合物完全是从植物精油中提取的^[23]。在化学工业中,它们作为起始原料被广泛用于合成食品防腐剂和香料等。同时,它们对大多数微生物通常有毒性^[24]。近来已有报道,通过生物转化这些化合物可以生产高附加值的香料,如提取自丁香树 *Aromaticum* 精油的丁香酚和异丁香酚可以转化为香草醛。许多研究者都集中在中间产物鉴定和关键酶分离上,目的是要阐明烯丙基苯酚类化合物的代谢机制^[19,22,25-27]。已有报道许多有价值的芳香化合物如香草醛、香草酸、茴香醛、松柏醇和松柏醛^[19-23,24-32]。下面主要介绍生物转化两类烯丙基苯酚类化合物的最新研究进展,并以香草醛为例,讨论了生物转化法生产高附加值天然香料的可行性,以为天然香料的绿色生产、批量生产提供一定的理论基础。表1显示了微生物转化生产的几种典型香料。

2.1 生物转化的反应类型:环氧二醇途径

已有报道,许多微生物可以催化烯丙基苯酚类化合物的侧链氧化。这是生物合成重要香料产品的第一步,如香草醛、松柏醇、松柏醛等。这些微生物

表1 微生物转化生产的几种典型香料

化合物类型	香料	底物	微生物	价格(美元/kg)	参考文献
香草醛	香草香味	阿魏酸 丁香酚	<i>Serratia Amycolatopsis Pseudomonas</i>	1000	[23 40]
苯甲醛	樱桃香味	异丁香酚 L-苯丙氨酸	<i>Ischnoderma</i>	500	[1 40]
γ-萘内酯	桃香味	蓖麻油酸	<i>Candida Yarrowia Sporobolimyces</i>	500	[36 40]
2-苄基甲醇	玫瑰香味	L-苯丙氨酸	<i>Saccharomyces Kluyveromyces</i>	1000	[40-41]

包括:黑曲霉、红球菌、棒状杆菌、假单胞菌、克雷伯菌、肠杆菌、沙雷氏菌、节杆菌、芽孢杆菌属^[19 21-22 25-26 30-31 33-36]。最常见的烯丙基苯酚类化合物有丁香酚、异丁香酚、草蒿脑、茴香脑、樟脑和异黄樟脑,如图1所示。根据侧链双键 C=C 位置的不同,这些化合物被分为 1-丙烯基苯酚和 2-丙烯基苯酚两类。以前的研究提出这两类化合物是通过环氧-二醇代谢途径转化的^[26]。这意味着环氧结构和二醇结构都存在于这个代谢途径。两类化合物的代谢途径仅有一点不同就是:1-丙烯基苯酚生物转化总是通过苯甲酸的取代,而 2-丙烯基苯酚首先转化为丙烯酸,再生成相应的肉桂酸衍生物^[25]。这个转化途径已经很好地阐述了异丁香酚、丁香酚和茴香脑的代谢,故以它们为例来讨论 1-丙烯基苯酚(异丁香酚和茴香脑)和 2-丙烯基苯酚(丁香酚)这两类化合物的研究进展。

2.2 1-丙烯基苯酚的环氧-二醇途径:异丁香酚和茴香脑

已有小鼠和植物中异丁香酚的代谢报道^[36-37],但很少有集中在微生物转化途径上的研究。菌株 *Bacillus subtilis* HS8 能转化异丁香酚,其产物通过 GS-HPLC 鉴定为异丁香酚二醇^[22]。通过鉴定,异丁香酚环氧和异丁香酚二醇都是菌株 *Bacillus pumilus* S-1 的生物转化产物,从而提出了异丁香酚是 55kDa 单体,催化 1,2 香草醛的转化途径^[19]。这些研究发现更好地推动我们证实了已有假设的微生物转化异丁香酚为香草醛的代谢途径,如图 2 所示。近来,已从 *Pseudomonas putida* 菌株中纯化出了异丁香酚降解酶^[27]。此酶位的 C=C 双键氧化断裂。在体内,这个酶催化氧气或水分子中的一个氧原子整合到异丁香酚的侧链 C=C 双键中,说明这是一种单加氧酶。这个酶的编码基因和侧翼区也已分离到。这个结果证明,异丁香酚的转化途径是通过主要中间体的鉴定而建立的。

最近,报道了 *Arthrobacter* sp.TA13 和 *P.putida* JYR-1 这两株菌转化茴香脑的研究^[25-26]。因为检测到的中间产物是茴香脑环氧或茴香脑二醇,与异丁香酚转化途径类似,这也是一个环氧-二醇转化途径。

2.3 2-丙烯基苯酚的环氧途径:丁香酚

已经发现许多细菌、真菌能降解丁香酚,如 *Corynebacterium Pseudomonas Byssochlamys Penicillium* 和 *Rhodococcus*^[33-36]。微生物转化丁香酚的中间产物是松柏醇、松柏醛和阿魏酸。

2.4 烯丙基苯酚生产的高附加值香料:香草醛

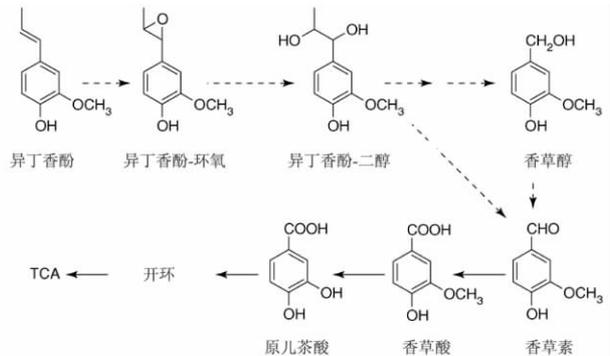


图2 微生物转化异丁香酚为香草醛的环氧-二醇代谢途径

香草醛(C₈H₈O₃, 4-羟基-3-甲氧基-苯甲醛),是世界香料市场中最重要香料,广泛应用在食品、饮料、化妆品和制药行业^[36]。目前,世界市场中香草醛的消费已超过每年 12000t。然而,大于 80% 的香草醛还是以化学合成为主,此方法需要许多前体,如木质素、愈疮木酚、丁香酚或羟苯醛。利用生物技术的方法生产香草醛已有广泛研究,一些底物也已经测出,如阿魏酸、丁香酚、异丁香酚、香草酸、木质素、酚芪类和果糖^[36, 38-42, 50]。其中,从阿魏酸生产香草醛产量最大可达到 20g/L,摩尔浓度大于 50%^[43]。然而,通过核磁共振方法测定¹³C 的天然丰度,比较大数用于此反应的阿魏酸与天然香草醛中¹³C 的天然丰度,结果显示,用于此反应的阿魏酸不是天然的,用此生产的香草醛也就不能归为天然香料^[34-45]。许多研究者试图通过酶催化玉蜀黍或糖甜菜浆来生产阿魏酸,但是,阿魏酸的产量太低以致此工艺无法继续下去^[14 46]。

2.4.1 生物转化生产香草醛 许多生物转化丁香酚的工艺仅能积累微量的香草醛,见表 2。菌株 *Pseudomonas* sp.HR199 和 *Rhodococcus opacus* PD 630 生物转化丁香酚的主要产物是阿魏酸、香草酸或松柏醇。为了提高香草醛的产量,提出了代谢工程。菌株 *P.simplicissimum* CBS170.90 中的香草醇氧化酶基因 vaoA 在 *R.opacus* PD630 和 *Amycolatopsis* sp.HR167 这两种菌株中也有表达,同时,松柏醇脱氢酶基因 calA 和松柏醛脱氢酶基因 calB 在 *Pseudomonas* sp.HR199 中也有表达^[20 35]。这些重组菌种先将丁香酚转化为阿魏酸,最后转化为香草醛。可见,生产香草醛的工艺是可控的,是可以生物学手段来指导生产的。

到目前的研究发现, *P.putida* I58、*Pseudomonas chlororaphis*、*B.subtilis* HS8 这些菌株从异丁香酚生产香草醛比丁香酚的产量要更高,见表 2 中菌株 *B.pumilus* S-1 生物转化异丁香酚生产香草醛的

表2 微生物转化丁香酚和异丁香酚生产香草醛总结

底物	微生物	产量(g/L)	摩尔产量(%)	参考文献
丁香酚	<i>Pseudomonas sp.</i> HR199	0.3	89.3	[9]
丁香酚	<i>Amycolatopsis sp.</i> HR167	Trace	NA	[8]
丁香酚	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	Trace	NA	[22]
异丁香酚	<i>Pseudomonas putida</i> I58	Trace	NA	[8]
异丁香酚	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.2	12.9	[21]
异丁香酚	<i>Bacillus subtilis</i> HS8	1.36	14.7	[10]
异丁香酚	<i>Bacillus pumilus</i> S-1	3.8	40.5	[7]
异丁香酚	<i>Bacillus fusiformis</i> CGMCC1347	8.1	17.5	[11]
异丁香酚	<i>Bacillus fusiformis</i> SW-B9	32.5	5.8	[10]
异丁香酚	<i>Pseudomonas putida</i> IE27	16.1	71	[9]

总结。

近年来,应用水-有机溶剂两相体系生物转化异丁香酚已经有报道,实验菌株有 *Bacillus fusiformis* CGMCC1347、*B.fusiformis* SW-B9 和 *P.putida* IE27^[21,30-31]。用 60% (v/v) 异丁香酚/有机溶剂为底物, pH = 4.0, *B.fusiformis* SW-B9 生物转化大于 72h, 香草醛的产量可达 32.5g/L^[30]。这是目前为止,生物转化异丁香酚为香草醛产量最高的记录。

然而,生物转化生产香草醛存在的一个主要问题是香草醛过氧化为香草酸或还原为香草醇。这两个反应都会导致香草醛浓度的降低。为了解决这个问题,提高香草醛的产量,有人提出了通过优化工艺条件(添加吸附树脂或抗氧化剂)或代谢工程(抑制相关酶的活性如香草醛脱氢酶)来阻止这些副反应的发生,已经取得了一定的成效^[19,31,36]。

2.4.2 酶催化合成香草醛和微生物转化类似,此法转化异丁香酚为香草醛的产量比丁香酚转化的要高。酶催化丁香酚和异丁香酚生产香草醛是另一个生物转化法生产香草醛的方法。已经报道了苯乙烯双加氧酶、香草醇氧化酶或脱氢酶和脂肪氧化酶的活性^[36,41-42,47],而且有通过香草醇氧化酶的两步催化转化木焦油醇和香兰素胺合成为香草醇,再转化为香草醛的报道^[41-42]。另外,从大豆中分离的天然脂质氧化酶能转化异丁香酚为香草醛,通过添加粉状活性炭或过氧化物 H₂O₂,香草醛产量为 2.46g/L,摩尔产量为 13.3%^[47]。

3 挑战与展望

生物转化比化学合成环境污染更小,能生产出目标的对映体香料。随着消费者日益追求天然的、绿色的、健康的产品,生物转化生产香料已经成为近年研究的热点。然而,在大部分生物转化工艺中,目标产物的产量和浓度明显太低,致使生物转化工艺不能快速发展。

越来越多文献报道表明,代谢机制、分子操作、代谢工程和工艺优化可以指导目标产物产量的提高^[19,13,44]。其一,基因修饰具有高产能力的菌株。许多中间产物的鉴定和各自代谢途径越来越明晰,更进一步的研究将主要集中在参与这些途径的酶和基因的分离纯化上,描述与生物转化有关的酶或基因将有助于提高生产菌株的性能。关键酶的分子进化将是一个提高产量的重要工具。蓖麻油酸生产 γ -萘内酯就是一个很好的例子。通过构建一株缺少能降

解内酯的酰基-CoA 氧化酶活性的菌株,仅仅轻微改变了生产菌株的生长,与野生型相比,却获得了 10 倍的内酯产量的增长^[49]。其二,生物转化条件优化将是另一个重要的改进方面。例如,两相生物转化体系,由水相和有机相组成,已经成功应用在许多生物转化或降解工艺中^[40-52]。应用两相体系,可以降低底物毒性,并将底物转移到细胞膜。利用这个方法将异丁香酚生物转化为香草醛已经获得很大改进,香草醛的产量已经达到 30g/L^[30]。随着世界市场对天然香料越来越大的需求,生物技术生产香草醛和其他香料,如苯甲醛、 γ -萘内酯、2-苯乙醇、羧酸类等,将会引起生物学家和化学家越来越多的关注。因为不同的对映体或立体异构体有不同的选择特性,决定了它们特异的生物转化过程和产物分离方法^[5]。这将促进产量提高、工艺优化和目标产物回收率提高推进工业规模化发展。

参考文献

- [1] Upasani R B, Chiang L Y, Goshorn N D P. Synthesis and solid state magnetic properties of polyphenoxy nadieals derived from poly 2-(3,4-ditert-butyl-4-hydmyphenyl) isobutyl methacrylate [J]. Polym Prep, 1990, 31(1): 605-606.
- [2] Nishinaga, Akina, Yannazaki. Oxidation of phenols and hydrazones with tert-butyl hydroperoxide and catalysis by Co (salen) [J]. Nippon Kagaku Kai Shi, 1985(3): 378-386.
- [3] Lajob A. An unusual synthesis of 2- β -di-tert-butyl-4-iso-propenylphenol [J]. Org Prep Proced Int, 1985, 14(3): 197-198.
- [4] Attacks market guiding price of natural spice in July of 2009 in London. Information incense at home and abroad, Market data 2009 β .
- [5] Serra S, Molecolare, Sezione A. et al. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances [J]. Trends Biotechnol 2005, 23, 193-198.
- [6] Krings U, Berger R G. Biotechnological production of flavors and fragrances [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 1-8.
- [7] Xiao Z J, Xie N Z, Liu P H, et al. Tetramethylpyrazine production from glucose by a newly isolated *Bacillus* mutant [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2006, 73: 512-518.
- [8] Xiao Z J, Liu P H, Qin JY, et al. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2007, 74(1): 61-68.

- [9] Xiao Z, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria [J]. Crit Rev Microbiol 2007, 33: 127-140.
- [10] Vandamme E J, Soetaert W. Bio-flavors and fragrances via fermentation and biocatalysis [J]. Chem Technol Biotechnol, 2002, 77: 1323-1332.
- [11] Longo M A, Sanroman M A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies [J]. Food Technol Biotechnol 2006, 44: 335-353.
- [12] Dignum M J W, Kerler J, Verpoorte R. Vanilla production: technological, chemical, and biosynthetic aspects [J]. Food Rev Int 2001, 17: 199-219.
- [13] Schmid A, Dordick J S, Hauer B. Industrial bio-catalysis today and tomorrow [J]. Nature 2001, 409: 258-268.
- [14] Mathew S, Abraham T E. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid [J]. Crit Rev Microbiol, 2006, 32: 115-125.
- [15] Hrazdina G. Aroma production by tissue cultures [J]. Agric Food Chem 2006, 54: 1116-1123.
- [16] Straathof A J, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations [J]. Curr Opin Biotechnol 2002, 13: 548-556.
- [17] Xu P. Efficient whole-cell biocatalytic synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid [J]. Adv Synth Catal 2007, 349: 1614-1618.
- [18] Labuda I. Flavor Compounds [J]. Encyclopedia of Microbiology 2009: 305-320.
- [19] Hua D et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin in a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites [J]. Biotechnol 2007, 130: 463-470.
- [20] Overhage J. Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis sp.* HR167 [J]. Biotechnol 2006, 125: 369-376.
- [21] Yamada M. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73: 1025-1030.
- [22] Zhang Y M, Xu P, Han S. Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8 [J]. Appl Microbiol Biotechnol 2006, 73: 771-779.
- [23] Shimoni E. Biotransformation of propenylbenzenes by an *Arthrobacter sp.* and its *t*-anethole blocked mutants [J]. Biotechnol 2003, 105: 61-70.
- [24] Koeduka T. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103: 10128-10133.
- [25] Ryu J. Identification of syn- and anti-anethole-2,3-epoxides in the metabolism of trans-anethole by the newly isolated bacterium *Pseudomonas putida* JYR-1 [J]. Agric Food Chem 2005, 53: 5954-5958.
- [26] Shimoni E et al. The trans-anethole degradation pathway in an *Arthrobacter sp.* [J]. Biol Chem 2002, 277: 11866-11872.
- [27] Yamada M, Okada Y, Yoshida T, et al. Purification, characterization and gene cloning of isoeugenol-degrading enzyme from *Pseudomonas putida* IE27 [J]. Arch Microbiol, 2007, 187: 511-517.
- [28] Furukawa H, Hiroshi M, Toyokazu Y, et al. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity [J]. Biosci Bioeng, 2003, 96: 401-403.
- [29] Overhage J, Steinbuechel A, Priefert H, et al. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. [J]. Appl Environ Microbiol 2003, 69: 6569-6576.
- [30] Zhao L Q, Sun Z H, Zheng P Z. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis* [J]. Biotechnol Lett 2005, 27: 1505-1509.
- [31] Zhao L Q, Song Z H. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8 [J]. Process Biochem 2006, 41: 1673-1676.
- [32] Cooper B. Microorganism for preparation of coniferyl aldehyde [P]. US Patent 4981795.
- [33] Jin J F, Mazon H van den Heuvel, Janssen R H H, et al. Discovery of a eugenol oxidase from *Rhodococcus sp.* strain RHA1 [J]. FEBS 2007, 274: 2311-2321.
- [34] Kasana RC, Sharma U K, Sharma N, et al. Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin (dagger) [J]. Curr Microbiol 2007, 54: 457-461.
- [35] Plaggenborg R, Overhage J, Loos A, et al. Potential of *Rhodococcus* strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72: 745-755.
- [36] Priefert H, Rabenborst J, Steinbuechel. Biotechnological production of vanillin [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 296-314.
- [37] Badger D A, Smith R L, Bao J, et al. Disposition and metabolism of isoeugenol in the male Fischer 344 rat [J]. Food Chem Toxicol 2002, 40: 1757-1765.
- [38] Barghini P. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions [J]. Microb Cell Fact 2007(6): 13-23.
- [39] Bloem A, Bertrand A, Lonvaud-Funel A, et al. Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria [J]. Lett Appl Microbiol 2007, 44: 62-67.
- [40] Ghosh S, Sachan A, Sen S K, et al. Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637 [J]. Ind Microbiol Biotechnol 2007, 34: 131-138.
- [41] Van den Heuvel R H, Van den Berg W A, Rovida S, et al. Laboratory-evolved vanillyl alcohol oxidase produces natural vanillin [J]. Biol Chem 2004, 279: 33492-33500.
- [42] Van den Heuvel R H, Fraaije M W, Laane C, et al. Enzymatic synthesis of vanillin. Agric [J]. Food Chem, 2001, 49: 2954-2958.
- [43] Hua D, Ma C Q, Song L F, et al. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. Appl [J]. Microbiol Biotechnol 2007, 74: 783-790.
- [44] Fronza G. The positional δ (180) values of extracted and

synthetic vanillin [J].*Helv Chim Acta* 2002 84: 351-359.

[45] Tenaillon E J. Authentication of the origin of vanillin using quantitative natural abundance ^{13}C NMR [J].*Agric Food Chem*, 2004 52: 7782-778.

[46] Mathew S, Abraham T E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications [J].*Crit Rev Biotechnol* 2004 24: 59-83.

[47] Li Y H, Sun Z H, Zhao L Q, et al. Bioconversion of isoeugenol into vanillin by crude enzyme extracted from soybean [J].*Appl Biochem Biotechnol* 2005 125: 1-10.

[48] Dordick J S, Khmelnsky Y L, Sergeeva M V. The evolution of biotransformation technologies [J].*Curr Opin Microbiol*, 1998,

1: 311-318.

[49] Groguenin A, et al. Genetic engineering of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds [J].*Mol Catal B Enzym* 2004 28: 75-79.

[50] Pfruender H, Jones R, Weuster-Botz D. Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system [J].*Angew Chem Int Ed Engl* 2004 43: 4529-4531.

[51] Tao F, Yu B, Xu P, et al. Biotransformation in biphasic systems containing organic solvents [J].*Appl Environ Microbiol*, 2006 72: 4604-4609.

[52] Xu P, Yu B, Li F L, et al. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles [J].*Trends Microbiol* 2006 14: 398-405.

(上接第 382 页)

表 3 血清 LPL 和 HL 活性

指标	空白组	高脂组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
LPL (U/mL)	1.700 ± 0.267	0.912 ± 0.109 [◆]	1.675 ± 0.106 ^{◆*}	1.585 ± 0.165 ^{◆*}	1.077 ± 0.158 ^{◆*}
HL (U/mL)	0.700 ± 0.089	0.413 ± 0.016 [◆]	0.585 ± 0.076 ^{◆*}	0.597 ± 0.060 ^{◆*}	0.487 ± 0.054 [◆]

表 4 体脂含量

指标	空白组	高脂组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
体脂含量 (%)	0.621 ± 0.105	1.518 ± 0.113 ^{◆◆}	0.998 ± 0.065 ^{◆**}	1.076 ± 0.033 ^{◆**}	1.112 ± 0.084 ^{◆**}

高、中、低剂量组与空白组比,体脂含量显著升高 ($p < 0.05$, $p < 0.01$);与高脂组比,体脂含量显著降低 ($p < 0.01$)。随着花色苷剂量的增加,体脂含量降低,但组间无显著差异 ($p > 0.05$)。

3 结论

3.1 本实验在给高脂血症大鼠喂饲不同剂量花色苷后,TC、TG 及 LDL-C 水平均有显著降低, HDL-C 有所升高; LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C、AI 有显著降低。资料表明,体内血浆中血清 TC、TG、LDL-C 的升高可致发生动脉粥样硬化的机率增高,而 HDL-C 的升高可使发生动脉粥样硬化的机率降低^[7]。LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C、AI 与动脉硬化和心脑血管等由高血脂引起的一系列病症表现为负相关。根据本实验数据说明,笃斯越桔花色苷有降血脂、降低动脉粥样硬化及冠心病等高血脂病的发生机率的可能。

3.2 喂饲不同剂量笃斯越桔花色苷的三组中,脂蛋白脂酶和肝脂酶的活性都比高脂组高,接近但没有达到空白对照组脂蛋白脂酶活性。脂蛋白脂酶为甘油三酯代谢的关键酶,其功能状态既受脂蛋白脂酶基因的影响,也受机体代谢因素的制约。脂蛋白脂酶因活性和含量而改变其脂解功能,从而影响全身脂质代谢和分布。HL 属于与血液循环中内源性 TG 代谢有关的酶之一,与 LPL 在功能上有相似之处,然而却是两种不同性质的酶。HL 主要作用于 VLDL、 β -VLDL 及 VLDL 残粒中的 TG。HDL 中积累的未酯化胆固醇在 HL 作用下由肝摄取,在 HDL3 转化为 HDL2 的过程中可防止肝外组织过量胆固醇的积累,其中 HL 起重要作用。HL 在血浆胆固醇平衡机制中

起一定作用^[8]。本实验数据说明,笃斯越桔花色苷能提高高脂血症大鼠的脂蛋白脂酶和肝脂酶活性,增强甘油三酯及胆固醇的代谢,从而降低大鼠体内脂肪的积累,这与本研究中观察到的不同剂量花色苷组的实验动物体脂含量均显著低于高脂组动物相一致。

参考文献

- [1] 王二雷. 笃斯越桔花色素分离纯化技术及其抗氧化活性研究[D]. 吉林大学, 2008: 1-2.
- [2] Lau F C, Hale S B, Joseph J A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging [J]. *Neuro Aging*, 2005, 26 (1): 128-132.
- [3] Yiw G, Fischer J, Krewer G, et al. Phenolic compounds from blueberry can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis [J]. *J Agric Food Chem* 2005 53: 7320-7329.
- [4] 李颖畅, 孟宪军, 孙靖靖, 等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化作用 [J]. *食品与发酵工业* 2008(10): 46-47.
- [5] 崔德山编译. 乌饭树紫黑浆果的加工与利用 [M]. 食品文摘, 1999: 7-9.
- [6] Weiguang Y, Casimir C Akon, Joan Fischer, et al. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis [J]. *Food Research International* 2006 39(5): 628-638.
- [7] 郝杰, 李琳, 吕礁, 等. 胆固醇/高密度脂蛋白-胆固醇比值在脑梗死中的价值研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2008(6): 41-42.
- [8] 刘玮玮. 植物甾醇酯对高脂血症大鼠降血脂功能的研究 [D]. 浙江大学, 2007: 16-17.