微生物制备烟用香料的研究进展

高锐¹, 杨威¹, 宋鹏飞¹, 李艳琼², 肖敏^{3*} (1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南昆明 650231; 2. 昆明医科大学海源学院, 云南昆明 651700; 3. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要 烟草香精香料在弥补卷烟因焦油降低而导致的香气成分不足的问题上发挥着重要的作用, 其中天然香料由于天然、绿色、健康而备受欢迎, 而微生物发酵产香是获取天然香料的较好方法。全面介绍了国内外微生物制备烟用香料的发展趋势, 综述了近些年微生物在制备烟用香料方面的研究进展, 并对该领域进行了展望, 以为微生物制备烟用香料的开发提供借鉴与参考。

关键词 微生物发酵; 烟草; 天然香料

中图分类号 TS264.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)02-0092-05

Research Progress on Production of Tobacco Flavor by Microbial Fermentation

GAO Rui¹, YANG Wei¹, SONG Peng-fei¹, XIAO Min^{3*} et al (1. China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650231; 3. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275)

Abstract Tobacco flavors are very important to make up for insufficient tobacco aroma caused by tar reducing. Among tobacco flavors, natural flavor is popular for healthy to human, and production of flavor by microbial fermentation is a better way to gain the natural flavor. To fully understand the development trend at home and abroad, research progress on production of tobacco flavor by microbial fermentation in recent years was reviewed, and the field was also prospected. The aim was to provide references for the development of tobacco flavor by microbial fermentation.

Key words Microbial fermentation; Tobacco; Natural flavor

烟草行业是重要的消费品制造行业, 我国是世界第一烟草消费大国, 烟草产业每年都为国家贡献了大量的税收财富^[1]。然而, 随着社会的进步, 烟草行业受到了日趋严峻的“吸烟对健康不利”的舆论压力, 提高卷烟的安全性已成为烟草行业的共同目标。目前的研究表明, 要提高卷烟的安全性, 就要减少烟气中的焦油含量, 如何在降低卷烟焦油量的同时还能保持卷烟的吃味已成为烟草行业的主攻课题^[2], 而烟草香精香料在弥补卷烟因焦油降低导致的香气成分不足的问题上发挥着重要的作用^[3]。

烟草香料按照来源, 分为来自烟草本身的香料、非烟草的天然香料和人工合成的香料^[4]。合成香料是非天然性的, 会给人体健康带来危害。天然香料主要来源于动物和植物, 动物、植物香料资源有限, 提取成本高, 远远满足不了日益增长的市场需求。微生物制备的香料是以天然原料为起始物, 使用发酵技术、酶技术产生的香料, 也属于天然香料, 且其具有生产周期短, 不受气候影响, 反应条件温和, 产品分离后形成的“三废”少, 对环境友好等多种优越性, 所以越来越受到人们的重视^[5]。笔者综述了微生物制备的几种烟用香料(香兰素、2-苯乙醇、类胡萝卜素降解香料、多糖类及其他复合香料)的生产菌株的种类、发酵优化条件、基因工程改造及香料在烟草加香中的应用, 并对利用微生物制备烟用香料的发展前景进行了展望。

1 微生物发酵生产单体烟用香料

微生物发酵生产的单体烟用香料原来大部分是采用化学合成法大量生产, 但随着人们对绿色食品的追求, 越来越多的研究者投入到利用天然原料生产天然香料的研究中, 其中微生物转化合成就是生产天然香料的研究热点。

基金项目 云南中烟工业有限责任公司科技项目(2014YL01)。

作者简介 高锐(1977—), 男, 吉林公主岭人, 工程师, 硕士, 从事烟草原料香料的应用研究。*通讯作者, 助理研究员, 在读博士, 从事微生物资源开发与应用研究。

收稿日期 2016-11-14

1.1 香兰素的微生物合成 香兰素(Vanillin, 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)香气浓郁而持久, 在烟草制品中常做定香剂, 协调烟香。利用微生物转化法生产香兰素的底物主要有丁香酚、异丁香酚和阿魏酸。丁香酚和异丁香酚对微生物具有一定的毒性, 会抑制菌体的正常生长及代谢, 转化生成香兰素的产率低。阿魏酸在自然界中含量丰富, 廉价易得, 对菌体没有毒害作用, 转化生成香兰素的产率相对较高^[6]。所以现在对阿魏酸发酵产生香兰素的研究较多。以阿魏酸为底物合成香兰素有两步法和单一菌株合成法。两部法: 第一步, 先用黑曲霉(*Aspergillus niger*)将阿魏酸转化为香草酸; 第二步, 再用朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)将香草酸还原为香兰素^[7], 该方法转化合成香兰素的产率较低。单一菌株合成法: 能将阿魏酸转化合成香兰素的菌株很多, 如*Pseudomonas fluorescens* AN103^[8]、*Amycolatopsis* sp. HR167^[9]、*Amycolatopsis* sp. ATCC 39116^[10]、*Delftia acidovorans*^[11]、*Sphingomonas paucimobilis* SYK-6^[12]、*Enterobacter* sp. Px6-4^[13]、*Rhodococcus opacus* PD630^[14]、*Streptomyces setonii*^[15]、*Corynebacterium glutamicum*、*Haematococcus pluvialis*、*Alcaligenes paradoxus*、*Polyporus versicolor*、*Rhodotorula rubra*^[16]、*Halomonas* sp. B15^[17]等, 在众多菌株中, 由于香兰素对菌体来说是一种抑制剂^[18], 大多数菌株无法耐受高浓度的香兰素, 或者部分菌株体内存在香兰素的下游代谢基因, 会将生成的香兰素继续降解, 最终导致香兰素的产量均比较低。为了提高香兰素产率及适宜工业化生产, 目前研究方向有如下几种。

1.1.1 发掘高产、高耐受香兰素的菌株。目前的研究表明, 仅放线菌中的拟无枝酸菌(*Amycolatopsis*)和链霉菌(*Streptomyces*)2个属的几个菌株能将底物阿魏酸转化生成较高产量(超过10.00 g/L)的香兰素。Hua等^[19]利用*Streptomyces* sp. V-1以阿魏酸为底物, 借助吸附树脂的作用, 经55 h的发酵最终获得19.20 g/L的香兰素, 总摩尔得率为54.50%。Mu-

heim 等^[20]利用 10 L 的生物反应器发酵西唐链霉菌 (*Streptomyces setonii*) (后来经鉴定是拟无枝酸菌 *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116), 获得 13.90 g/L 香兰素的高产量。转化阿魏酸产生香兰素的高产菌株都是放线菌, 这可能是因为这些放线菌是在接近植物的土壤环境中腐生, 在长期进化中, 获得分解利用包括阿魏酸在内的羟基肉桂酸的能力, 从而能将阿魏酸高效转化成香兰素^[21]。

1.1.2 优化发酵条件。发酵培养基、pH、底物阿魏酸浓度及发酵菌株的起始浓度等是影响香兰素产率的重要因素。Ma 等^[21-22]的研究结果显示, 当发酵液起始 pH 8.0, 培养基中葡萄糖浓度 10.00 g/L, 酵母提取物 8.00 g/L, 添加 100.00 mg/L 香草酸时, *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 和 *Streptomyces* sp. V1 的产率最高, 最终香兰素的浓度是分别是 9.18 和 9.09 g/L, 转化率分别高达 96.10% 和 95.20%, 这是迄今为止以阿魏酸为底物, 利用微生物转化法生产天然香兰素获得的最高转化率。另外, 高浓度 (>10 mmol/L) 的底物阿魏酸不利于菌株密度提高, 会降低香兰素产率, 所以分批流加底物优于一次性加入。Pérez - rodríguez N 等^[23]研究了培养基组分、一次性加料和分批流加底物、补充香草酸、种子起始浓度对 *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 转化阿魏酸的影响, 发现种子起始浓度是影响阿魏酸转化生成香兰素的最强因子, 当种子起始浓度处于中间值 (5.00 ~ 10.00 g/L) 时香兰素的产率最高, 其原因还有待进一步研究。虽然这些放线菌转化合成香兰素的产率较高, 但是, 由于这些菌株菌丝体十分密集, 使得发酵液非常黏稠, 对产物提纯造成极大的困难, 从而导致下游的加工过程成本过高。所以有的研究者把视线转移到易操作的菌株大肠杆菌和假单胞菌的基因工程改造上。

1.1.3 基因工程改造目标菌株。目前的研究表明, 很多假单胞菌本身就拥有合成香兰素的关键基因 *fcs* (编码 Feruloyl - CoA 合成酶) 和 *ech* (编码 Enoyl - CoA 水合酶), 但同时也有进一步降解香兰素的基因, 所以有研究者通过基因工程手段, 增强合成基因 *fcs* 和 *ech* 的表达, 降低香兰素降解基因 *vdh* (编码香兰素脱氢酶) 的活性, 从而提高香兰素的产率。2011 年, Di Gioia 等^[24]转入一个含有 *fcs* 和 *ech* 基因的低拷贝重组质粒到荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* BF13) 中, 并将菌株的降解基因 *vdh* 失活, 发酵获得约 1.30 g/L 香兰素。Graf 等^[22]认为, 要解决香兰素降解的问题, 降低 *vdh* 的活性还不够, 所以, 他们不仅将假单胞菌 (*Pseudomonas putida* KT2440) 的香兰素降解基因 *vdh* 敲出, 还使钼离子转运载体失活 (在假单胞菌中钼离子是某些氧化还原酶的辅助因子, 所以失活钼离子转运载体, 降低钼离子的摄入, 就可能降低这些酶的活性, 从而降低这些酶分解利用香兰素), 来减少香兰素降解, 且通过引入 tac 启动子系统, 增强 *fcs* 和 *ech* 基因的表达, 使假单胞菌转化阿魏酸合成香兰素的转化率 3 h 就达到 86.00%。另外, 不只假单胞菌中存在香兰素降解基因 *vdh*, 拟无枝酸菌中也有, 敲出该基因后, 拟无枝酸菌转化阿魏酸合成香兰素的产率也得到了提高^[25]。

1.1.4 异源表达香兰素合成关键基因生产香兰素。大肠杆

菌作为外源基因表达的宿主, 遗传背景清楚, 目的基因表达水平高, 抗污染能力强, 培养条件简单, 技术操作简单, 大规模发酵经济, 适用于工业化生产。所以, 有的研究者利用基因工程手段, 将与香兰素合成有关的关键基因导入大肠杆菌中进行异源表达生产香兰素。Yoon 等^[26-27]将关键基因 *fcs* 和 *ech* 导入大肠杆菌中异源表达, 优化后得到 1.12 g/L 的香兰素。在此基础上, 该课题组还引入重组质粒使 *gltA* 基因 (编码柠檬酸合成酶) 过量表达, 并对 TCA 循环进行了一系列改造, 中断部分 TCA 循环, 最终, 经过 24 h 的转化, 得到 5.14 g/L 香兰素, 摩尔转化率为 86.60%^[28]。不过, 由于重组大肠杆菌本身没有香兰素合成关键基因 (*fcs* 和 *ech*), 它携带这 2 个基因的遗传不稳定性成为该思路的一个缺陷^[24]。

尽管目前微生物转化合成香兰素的产率普遍低于传统的化学法, 但相信随着高生物技术手段的发展, 微生物转化合成香兰素将实现低成本、高效益的工业化生产, 成为市场主导的香兰素来源。

1.2 2-苯乙醇的微生物合成 2-苯乙醇具有清甜玫瑰气息, 轻甜柔和, 可改善烟草口味^[29]。许多发酵生产的食品中都含有 2-苯乙醇, 如可可、咖啡、面包、啤酒、奶酪等。人们发现, 酵母菌都能产生杂醇油, 而 2-苯乙醇是杂醇油的重要组成部分^[30], 所以, 许多酵母菌具有从头合成或生物转化 L-苯丙氨酸生成 2-苯乙醇的能力, 如马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)、发酵毕赤酵母 (*Pichia fermentation*)、酸酒酵母 (*Saccharomyces vini*)、产阮球拟酵母 (*Torulopsis utilis*)、芽枝状枝霉 (*Cladosporium lodosporioides*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、酿酒酵母 (*saccharomyces cerevisiae*) 和异常汉逊酵母等 (*Hansenula anomala*)。另外, 其他真菌如黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、猴头菌 (*Hericium erinaceus*) 等也具有该能力, 只是产率较低^[31]。

微生物合成 2-苯乙醇的途径有苯丙酮酸途径和艾氏途径, 苯丙酮酸途径在微生物中广泛存在, 但是由于代谢途径过长、支路多以及各种各样的抑制作用, 使得最终 2-苯乙醇的产量很低^[30]。目前, 一般都是通过艾氏途径调控 2-苯乙醇的合成。艾氏途径是 L-苯丙氨酸通过转氨基作用 (转氨酶催化) 生成苯丙酮酸, 继而经过脱羧酶和氧化脱氢酶作用生成 2-苯乙醇。2-苯乙醇对微生物细胞有一定的毒性, 当质量浓度为 2.00 ~ 3.00 g/L 时, 能抑制多种细菌及真菌的生长, 这是制约 2-苯乙醇微生物合成生产的关键因素^[32]。为了提高 2-苯乙醇的产量, 目前广泛采用的较为有效的方法有如下几种。

1.2.1 高产菌株的筛选。不同的菌种转化 2-苯乙醇的能力是不同的, 因此在对转化途径及培养条件细致研究之前, 选育出 1 株高产、稳定的菌株意义重大^[13]。Albertazzi E 等^[33]筛选到 2 株高产菌 *Hansenula anomala* CBS 110 和 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 739, 在 L-苯丙氨酸 2.00 g/L、pH 4.5 的条件下发酵 24 h, 2-苯乙醇产量分别为 1 728.00 和 1 573.00 mg/L。Fabre 等^[34]从 21 种酵母菌中筛选到 1 株高产菌 *Kluyveromyces marxianus*, 在 30 °C、125 r/min 条件下培养

192 h后2-苯乙醇产量达1.85 g/L。Celińska等^[35]发现,解脂耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica* NCYC3825)具有很强的产2-苯乙醇能力,在没有优化培养基的情况下,产量高达2.00 g/L。

1.2.2 发酵培养基和发酵条件的优化。除了优良的菌种,发酵条件优化也是提高2-苯乙醇的方法之一。培养基、发酵温度、L-苯丙氨酸浓度等都是影响产率的重要因素。碳源和氮源是培养基的主要成分,其种类和浓度对生物转化率有显著影响,是培养基优化的主要因素,过量的碳源将导致酵母发酵产生乙醇,乙醇可与2-苯乙醇对菌株产生协同抑制效应^[36-37],所以,分批补料培养体系,可以控制副产物乙醇的浓度,降低抑制效应;L-苯丙氨酸既可做转化底物,也可以是菌株的氮源,过量的L-苯丙氨酸不仅造成浪费而且会增加下游分离纯化的负担,L-苯丙氨酸浓度也是影响2-苯乙醇产量的重要因素。王航等^[38]对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* R-UV3)转化生产2-苯乙醇的碳氮源及补料进行优化,结果是葡萄糖为最佳碳源,以呼吸商 1.1 ± 0.1 为补糖控制依据,1.00 g/L 脲为氮源,8.00 g/L的L-苯丙氨酸,2-苯乙醇的最终浓度为4.39 g/L,摩尔转化率为80.00%。Etschmann等^[39]通过优化培养基成分和培养温度,使得*Kluyveromyces marxianus* CBS600在糖30.00 g/L,L-苯丙氨酸9.00 g/L,温度32.5℃条件下,发酵39 h后2-苯乙醇质量浓度为5.60 g/L,较没优化前提高了87.00%。

1.2.3 原位萃取分离技术。原位萃取分离技术(ISPR)是指将生物细胞的代谢产物快速移走的提取方法,以防止代谢产物抑制细胞的生长。在2-苯乙醇发酵中常用的提取方法是溶剂萃取和吸附法。Etschmann等^[40]在培养*Kluyveromyces marxianus* CBS600过程中,在优化培养条件的基础上,通过使用聚丙二醇1200作为提取剂消除终产物2-苯乙醇对细胞生长的毒性,使有机相中的2-苯乙醇产量提高到26.50 g/L。虽然有有机相-水相萃取技术效果明显,但是也伴随着黏度大、产品不易分离和毒性大等缺点。因此,有人采用固相-水相吸附技术从水相中吸附2-苯乙醇以提高其产量,关昂等^[41]研究了酵母酿酒(*Saccharomyces cerevisiae*)转化L-苯丙氨酸合成2-苯乙醇的常规和带原位转移的补料分批培养过程特性:在常规培养中,2-苯乙醇的最高终浓度仅为3.85 g/L,而采用大孔树脂FD0816作为原位转移产物的介质时,2-苯乙醇的最终总浓度达到12.80 g/L,较原先提高了232.00%。后来的研究中,当水相中的2-苯乙醇的浓度高于2.70 g/L时,就更更换吸附树脂,使2-苯乙醇的最终浓度达到了32.50 g/L^[37]。大孔树脂结构稳定,无挥发性气味,价格低廉,且在萃取过程中不会影响产品的质量,工艺路线也简单易行。所以,在工业生产天然2-苯乙醇中有良好的应用前景。

1.2.4 基因工程改造目标菌株提高2-苯乙醇产率。在酿酒酵母中,基因ARO8、ARO9(编码转氨酶)和ARO10(编码脱羧酶)是转化L-苯丙氨酸合成2-苯乙醇的关键基因^[42-43],所以增强这些基因的表达可能提高2-苯乙醇的产

率。2014年, Kim等^[44]通过过表达酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的ARO9、ARO10基因及内源转录因子Aro80,并敲出基因ALD3(编码苯乙醛氧化酶,该酶存在会与苯乙醛脱羧反应形成竞争从而减少2-苯乙醇的生成),最终2-苯乙醇的浓度达到4.80 g/L。2015年, Yin等^[45]分别把携带有基因ARO8和ARO10的表达载体导入酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),2-苯乙醇的产率比未引入载体的分别提高了9.30%和16.30%,当同时引入这2个表达载体,并采用分批补料发酵法发酵60 h后,2-苯乙醇的浓度提高到2.61 g/L。但他们发现,只导入ARO9表达载体时并不能增强转氨酶活性,不能提高2-苯乙醇的合成。所以,可能基因ARO8比ARO9对2-苯乙醇合成的影响更大。

另外,国内华宝香化科技发展(上海)有限公司经过多年的创新研发,成功完成了以烟草(烟梗、烟末)为原料,用微生物(产朊假丝酵母、酿酒酵母、中国克鲁维酵母中的一种)发酵降解烟草中的木质素、果胶和多酚类化合物生成2-苯乙醇,并于2004年7月28日获得了发明专利授权(ZL专利号02137575.5,授权公告CN1159447C)^[46]。

2 微生物发酵产生复合烟用香料

微生物发酵除可生产单一的香料外,还可生产复合香料。复合香料由多种成分有机组合在一起,其香韵协调、独特,能赋予卷烟特殊香气风格,所以微生物发酵产生复合香料也是当前研究的一个热点。目前,微生物发酵产生的复合烟用香料主要有类胡萝卜素降解香料、多糖类香料等。

2.1 微生物降解类胡萝卜素产香 类胡萝卜素是一类在自然界中广泛存在的、由8个异戊二烯单元相连,且分子两端各含有1个不饱和和己烯环的一类四萜化合物的总称。类胡萝卜素降解后可形成许多不同的香味物质,如大马酮、巨豆三烯酮、紫罗兰酮、二氢猕猴桃内酯、柠檬醛等^[47],这些物质的香气阈值低,即使含量不大,对烟草香气影响也较大,且该类物质香气淡雅,是高档卷烟凸显风格的重要物质。降解类胡萝卜素的方法有高温氧化降解、热裂解、化学氧化降解、微生物降解等,其中,微生物降解因其条件温和、选择性强、效率高而越来越受到关注。Zorn等^[48]从含有萜烯类物质较多的基质中分离到10多株具有β-胡萝卜素降解能力较强的丝状真菌和酵母菌,这些菌株能转化合成萜烯类化合物,产生的香味物质主要为二氢猕猴桃内酯和β-紫罗兰酮。蒿洪欣等^[49]从常年落花的土壤中分离到了6株芽孢杆菌属细菌能降解类胡萝卜素,且产生香味物质2-庚酮、棕榈酸、邻苯二甲酸酐等。樊明涛课题组^[50-53]从沙棘汁中分离到了1株可降解类胡萝卜素产香的巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii* TS-82),并优化该菌株培养条件、分离纯化降解酶,研究了该酶催化降解β-胡萝卜素的效率(40.40%),催化降解虾青素的效率(51.12%)。

2.2 微生物发酵产生多糖类物质 多糖是一种广泛存在于植物、动物和微生物组织中的重要的生命有机组成部分,具有多种生物活性。真菌多糖作为烟草添加剂,经高温裂解或美拉德反应可产生一定的香气,极大地改善抽吸口感和烟气

对喉部的刺激,从而提升烟品质^[54],而且这些香气物质随烟气进入人体后也可产生抗肿瘤、抗氧化的药理作用。对真菌多糖在烟草加香方面研究较多的是许春平课题组,该课题组分别从硬毛盖孔菌(*Funalia trogii*)、二年残孔菌(*Abortiporus biennis*)、柞柳核纤孔菌(*Inocutis tamaricis*)及肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*)发酵液中提取胞外多糖,分析结果显示,肺形侧耳胞外多糖和二年残孔菌胞外多糖都富含葡萄糖和甘露糖;卷烟加香试验中,柞柳核纤孔菌在烟气中的转移率是1.40%~1.70%,硬毛盖孔菌胞外多糖的转移率是1.58%~3.39%,肺形侧耳胞外多糖的转移率为1.26%~12.40%;感官呼吸试验后发现,肺形侧耳多糖具有增加卷烟香气量、增强回甜感、提高主流烟气细腻度、掩盖杂气等作用(在卷烟中的最佳用量为0.04%),柞柳核纤孔菌多糖不仅具有减轻刺激性、增加回甜感、改善余味等效果(在卷烟中的最佳用量为0.07%),还有清除自由基的作用,在3.00 g/L时对DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)的清除率达到34.66%,二年残孔菌胞外多糖能增加清香香韵,减轻刺激性;另外,烟气中具有杀菌、抗病毒、抗肿瘤等作用的香叶基香叶醇含量显著升高^[55-58]。微生物发酵产生多糖类物质作为增香剂添加在烟草中,不仅可提升烟草香韵品质,还有保健的作用,符合人们的消费理念,具有很好的市场前景。

2.3 微生物发酵产生的其他类烟用复合香料 除了类胡萝卜素降解产生的香料、多糖类香料外,微生物发酵产生的其他类香料复杂多样,它们大多是来自于香料作物内生菌发酵产生。植物内生菌在与植物长期协同进化的过程中相互依存和相互作用,不仅对宿主植物有促进生长、防止病害和内生固氮等有益的生物学作用,而且由于基因的转移或植物成分的诱导,使内生菌产生具有与宿主相同或相似的物质。因此,利用香料作物内生菌发酵生产香料也是开发烟用香料的一条途径。2006年,杨黎华等^[59]从香料植物香茅草[*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf]中筛选到1株产生香味物质的内生真菌XCJ-1,从这株菌的发酵提取物检出74种化合物,其中有乙缩醛二乙醇、柠檬烯、月桂烯、月桂醛等多种香料物质,经卷烟加香试验表明,由该菌株发酵制备的生物香料具有增加烟香,柔和烟气,增加细腻性,略降低刺激性,明显改善烟气质的作用^[60]。周丽娟等^[61]从荔枝中分离得到的内生酵母菌能够发酵产生苯乙醇、糠醛、2,3-丁二醇等香气物质,朱宇等^[62]从西瓜中分离的株内生酵母菌,能够将苯、胺、酚等物质转化生成酸、醇等香气物质,这2株菌发酵干果提取液制取的香料,加入卷烟中,具有柔和烟气、提高烟气细腻性、甜润感的作用。庞登红等^[63]分离到的西红柿内生酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisis*)发酵葡萄汁,产生了苯乙醇和一些酯类香气物质,将该香料加入卷烟后,卷烟香气量增加、刺激性降低、烟气更加细腻,赋予卷烟甜香香韵,且具有清除卷烟烟气中自由基的作用。这些植物内生菌发酵产生的复合香料,由多种香味成分有机组合而成,其香韵协调、独特,能赋予卷烟特殊香气风格,难以仿制,是烟用香料开发的重要途径。但是,目前的研究比较随机、分散、不够深入,今后应

该对潜力菌株的特征、发酵条件,产生的致香物质种类及含量进行深入研究,达到工业应用的要求。

3 总结与展望

开发天然的烟用香料来弥补降焦减害后卷烟的低吃味,形成独特的卷烟风味,是提升卷烟品牌竞争力的重要任务。由于微生物制备烟用香料具有生产周期短、不受气候限制、对环境友好等优点,因此利用微生物制备烟用香料的研究方兴未艾。目前,虽然微生物制备烟用香料的研究取得了一定成果,但还远不能满足市场的需求,今后应该在以下几方面积极开展研究来推动微生物制备烟用香料的发展:①烟用香料有多种类型,而目前能通过微生物发酵生产的只有香兰素、苯乙醇等少数几种,今后应该扩大范围,筛选更多的生产香料的菌株,丰富微生物生产制备的天然香料种类。②对已有的菌株,充分利用基因工程、发酵工程等技术手段,深入研究开发,尽快产业化。③加强微生物制备的香料在卷烟加香中的应用研究,形成独特的香气风格和口味特征,提高香料的调制和供应能力,满足卷烟发展的需求。相信随着技术的发展,研究的深入,微生物制备烟用香料具有很大的发展前景。

参考文献

- [1] 王慧英. 专卖制度下我国烟草产业的改革与发展[J]. 上海经济研究, 2009(4): 22-28.
- [2] 杨君, 高宏建, 张献忠, 等. 烟草香味物质及其精油应用研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2012(3): 45-49.
- [3] 叶荣飞, 赵瑞峰. 我国烟草香精香料的研究现状[J]. 清远职业技术学院学报, 2011, 4(3): 34-37.
- [4] 叶荣飞, 赵瑞峰. 烟草香气物质来源[J]. 广东农业科学, 2011, 38(5): 51-53.
- [5] 苏林. 微生物生态学技术制备天然香精香料[J]. 中国食品添加剂, 2009(6): 197-201.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] GASSON M J, KITAMURA Y, MCLAUCHLAN W R, et al. Metabolism of ferulic acid to vanillin [J]. The journal of biological chemistry, 1998, 273(7): 4163-4170.
- [9] ACHTERHOLT S, PRIEFERT H, STEINBÜCHEL A. Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2000, 54(6): 799-807.
- [10] FLEIGE C, HANSEN G, KROLL J, et al. Investigation of the *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 vanillin dehydrogenase and its impact on the biotechnical production of vanillin [J]. Applied and environmental microbiology, 2013, 79(1): 81-90.
- [11] PLAGGENBORG R, STEINBÜCHEL A, PRIEFERT H. The coenzyme A-dependent, non-beta-oxidation pathway and not direct decarboxylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(1): 9-16.
- [12] MASAI E, HARADA K, PENG X, et al. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 [J]. Applied and environmental microbiology, 2002, 68(9): 4416-4424.
- [13] GU W, LI X M, HUANG J W, et al. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter* sp. Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 89(6): 1797-1805.
- [14] 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.
- [15] MUHEIM A, LERCH K. Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin [J]. Applied microbiology and biotechnology, 1999, 51(4):456-461.
- [16] 陈朋, 李红玉, 刘超群. 微生物转化合成香兰素[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2):385-388.
- [17] VYRIDES I, AGATHANGELOU M, DIMITRIOU R, et al. Novel *Halo-monas* 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.
- [18] 赵建芬, 韦寿莲, 严子军. 香兰素的抑菌性及其应用的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(6):73-76.
- [19] HUA D L, MA C Q, SONG L F, et al. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2007, 74(4):783-790.
- [20] MUHEIM A, MULLER B, MUNCH T, et al. Microbiological process for producing vanillin; US 6235507 B1 [P]. 2001-05-22.
- [21] MA X K, DAUGULIS A J. Effect of bioconversion conditions on vanillin production by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation[J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2014, 37(5):891-899.
- [22] 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, 98:137-149.
- [23] PÉREZ-RODRÍGUEZ N, DE SOUZA OLIVEIRA R P, AGRASAR A M T, et al. Ferulic acid transformation into the main vanilla aroma compounds by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100(4):1677-1689.
- [24] 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.
- [25] FLEIGE C, HANSEN G, KROLL J, et al. Investigation of the *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 vanillin dehydrogenase and its impact on the biotechnical production of vanillin[J]. Applied and environmental microbiology, 2013, 79(1):81-90.
- [26] YOON S H, LI C, LEE Y M, et al. Production of vanillin from ferulic acid using recombinant strains of *Escherichia coli*[J]. Biotechnology bioprocess engineering, 2005, 10(4):378-384.
- [27] YOON S H, LI C, KIM J E, et al. Production of vanillin by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology letters, 2005, 27(22):1829-1832.
- [28] LEE E G, YOON SH, DAS A, et al. Directing vanillin production from ferulic acid by increased acetyl-CoA consumption in recombinant *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and bioengineering, 2009, 102(1):200-208.
- [29] 黄映凤. 烟用香精香料的分析研究[D]. 杭州:浙江大学, 2007.
- [30] 荣绍丰, 付艳丽. 微生物转化法生产 β -苯乙醇的研究进展[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2009, 9(4):266-270.
- [31] 刘东亚. 微生物转化发酵法生产天然香料 β -苯乙醇的研究[D]. 无锡:江南大学, 2006.
- [32] 黄友和, 杨尚彤, 周志强, 等. 植物和微生物合成2-苯乙醇的研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(4):41-44.
- [33] ALBERTAZZI E, CARDILLO R, SERVI S, et al. Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components[J]. Biotechnology letters, 1994, 16(5):491-496.
- [34] FABRE C E, BLANC P J, GOMA G. Screening of yeasts producing 2-phenylethyl alcohol[J]. Biotechnology techniques, 1997, 11(7):523-525.
- [35] CELI NSKA E, KUBIAK P, BIALAS W, et al. *Yarrowia lipolytica*: The novel and promising 2-phenylethanol producer[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2013, 40(3/4):389-392.
- [36] STARK D, ZALA D, MÜNCH T, et al. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme and microbial technology, 2003, 32(2):212-223.
- [37] WANG H, DONG Q F, GUAN A, et al. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement [J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2011, 112(1):26-31.
- [38] 王航, 董清风, 孟春, 等. 酿酒酵母转化生成2-苯乙醇分批补料工艺优化[J]. 过程工程学报, 2010, 10(4):767-771.
- [39] ETSCHMANN M M W, SELL D, SCHRADER J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm[J]. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 2004, 29(1/2/3/4/5/6):187-193.
- [40] ETSCHMANN M M W, SCHRADER J. An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2006, 71(4):440-443.
- [41] 关昂, 王航, 孟春, 等. 原位转移技术用于酵母合成2-苯乙醇[J]. 过程工程学报, 2009, 9(1):128-132.
- [42] IRAQUI I, VISSERS S, CARTIAUX M, et al. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily[J]. Molecular and general genetics, 1998, 257(2):238-248.
- [43] VURALHAN Z, MORAIAS M A, TAI S L, et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and environmental microbiology, 2003, 69(8):4534-4541.
- [44] KIM B, CHO B R, HAHN J S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway[J]. Biotechnology and bioengineering, 2014, 111(1):115-124.
- [45] YIN S, ZHOU H, XIAO X, et al. Improving 2-phenylethanol production via ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Current microbiology, 2015, 70(5):762-767.
- [46] 华宝香化科技发展(上海)有限公司. 微生物发酵法生产香料苯乙醇的工艺; CN 02137575.5 [P]. 2003-03-19.
- [47] 孙九喆, 李永宽, 郑峰洋, 等. 香料生物合成及其在卷烟料液中的应用[J]. 农产品加工·学刊, 2008(4):64-66.
- [48] ZORN H, LANGHOFF S, SCHEIBNER M, et al. Cleavage of β , β -carotene to flavor compounds by fungi[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2003, 62(4):331-336.
- [49] 高洪欣, 许园园, 刘冬, 等. 降解类胡萝卜素产香细菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(9):152-156.
- [50] 王树林, 樊明涛. 沙棘源微生物降解类 β -胡萝卜素芳香成分的研究[C]//第五届国际沙棘协会大会. 西宁:国际沙棘协会, 2011:70.
- [51] 麻俊侠, 樊明涛, 王树林, 等. β -胡萝卜素降解葡萄球菌化学成分培养基营养素的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(5):137-141.
- [52] ZHU M M, HE J, WANG S L, et al. *In vitro* study on the carotenoid cleavage enzyme from *Staphylococcus pasteurii* cleaving different substrates[J]. Journal of food and nutrition reasearch, 2014, 2(7):411-418.
- [53] 朱明明, 贺静, 樊明涛, 等. 细菌类胡萝卜素裂解酶酶解虾青素工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(8):1-5.
- [54] 魏玉磊. 烟草中糖对主流烟气成分的影响研究[J]. 食品工业, 2010(3):62-63, 64.
- [55] 王吉中, 杨琛琛, 耿卢婧, 等. 硬毛盖孔菌胞外多糖组分分析及其在卷烟烟气中的转移率[J]. 烟草科技, 2012(6):52-54.
- [56] 许春平, 杨琛琛, 袁鹭, 等. 提取桉柳核纤孔菌发酵多糖开发烟用香料[J]. 农产品加工·学刊, 2012(12):29-32.
- [57] 许春平, 史超文, 毛多斌. 发酵肺炎链球菌胞外多糖的成分分析及在卷烟中的应用[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2013, 28(1):41-44.
- [58] 曹健, 张惠杰, 许春平. 二年残孔菌胞外多糖组分分析及其在卷烟中的应用[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(2):279-284.
- [59] 杨黎华, 李祖红, 陈东, 等. 香茅草产香内生真菌的筛选及香气成分分析[J]. 生物技术, 2006, 16(5):53-56.
- [60] 刘丽芬, 李祖红, 李雪梅, 等. 香茅草产香菌发酵液的挥发性成分分析及在卷烟中的应用[J]. 烟草科技, 2007(11):35-39.
- [61] 周丽娟, 郑琳, 刘煜宇, 等. 荔枝产香内生菌的挥发性成分分析及其在卷烟中的应用研究[J]. 精细化工, 2010, 27(10):1013-1015.
- [62] 朱宇, 郑琳, 刘煜宇, 等. 西瓜内生菌的挥发性成分分析及其发酵香料在卷烟中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4):2093-2097.
- [63] 庞登红, 董爱君, 朱巍, 等. 特色烟用甜香型葡萄香料的制备及其在降低卷烟由基中的应用[J]. 生物加工过程, 2012, 10(2):24-28.