

# 苯乙酮酸脱羧酶基因的克隆与表达及 静息细胞生物转化乙基香兰素的研究

潘晓霞<sup>1</sup>, 李静静<sup>1</sup>, 何文森<sup>1</sup>, 李大力<sup>2</sup>, 贾承胜<sup>1</sup>, 张晓鸣<sup>1</sup>, 冯 翥<sup>\*1</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 南京理工大学 化工学院, 江苏 南京 210094)

**摘要:** 对恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida* ATCC12633)中的苯乙酮酸脱羧酶基因 *mdlC* 进行克隆, 导入质粒载体 pET28a 中, 将构建得到的重组质粒 pET28a-*mdlC* 转化于宿主细胞 *E.coli* BL21(DE3), 重组大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)(pET28a-*mdlC*) 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 分析得到相对分子质量约为 57 000 的蛋白质条带。将 *E.coli* BL21 (DE3)(pET28a-*mdlC*) 和 *E.coli* BL21 (DE3)(pET30a-*mdlB*) 两株重组菌以混合静息细胞的形式作为生物催化剂, 利用各自胞内的重组酶对 3-乙氧基-4-羟基苯乙醇酸(乙基扁桃酸)脱氢氧化、脱羧合成乙基香兰素。未经优化, 催化 24 h 后反应液中乙基香兰素的质量浓度可达 1.94 g/L, 且没有副产物产生。同时研究表明, 该混合静息细胞重复使用 3 次能保持 90% 以上的催化活力, 还有效缩短了反应时间。

**关键词:** 基因克隆; 苯乙酮酸脱羧酶; 乙基香兰素; 生物转化; 静息细胞

**中图分类号:** Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)01—0015—07

## Cloning and Expression of Benzoylformate Decarboxylase Gene and Study on Biotransformation of Ethyl Vanillin by Resting Cell

PAN Xiao-xia<sup>1</sup>, LI Jing-jing<sup>1</sup>, HE Wen-sen<sup>1</sup>, LI Da-li<sup>2</sup>, JIA Cheng-sheng<sup>1</sup>,  
ZHANG Xiao-ming<sup>1</sup>, FENG Biao<sup>\*1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

**Abstract:** Benzoylformate decarboxylase gene (*mdlC*) from *Pseudomonas putida* ATCC12633 was inverted into *Escherichia coli* (*E.coli*) strain BL21 (DE3) and was efficiently expressed after induction with IPTG. The recombinant strain together with *E.coli*/pET30a-*mdlB* converted successfully (S)-4-hydroxy-3-ethoxymandelic acid (EMA) to ethyl vanillin in the forms of mixed resting cells. Without optimization, all the (S)-EMA was consumed to form ethyl vanillin (1.94 g/L) and no by product was obtained with the initial substrate concentration 5 g/L by after 24 h. The cells could maintain their enzyme activity in repeated utilization at least three times and shortened bioconversion time efficiently.

收稿日期: 2012-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071600); 江苏省自然科学基金项目(BK2011155)。

\* 通信作者: 冯 翥(1953—), 男, 江苏无锡人, 法国博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品科学研究。E-mail: bfeng@jiangnan.edu.cn

**Keywords:** gene cloning, benzoylformate decarboxylase, ethyl vanillin, bioconversion, resting cell

乙基香兰素(Ethyl vanillin),学名 3-乙氧基 4-羟基苯甲醛,具有强烈的香子兰气味,香气强度为同量香兰素的 3.5 倍<sup>[1]</sup>,且香气更为爽快、幽雅,是重要的光谱型高档香料,其香气阈值为 100<sup>[2]</sup>,广泛应用于食品、烟草、日用品中,也是重要的医药中间体。目前乙基香兰素的价格是香兰素的 2 倍左右,在食品、饮料、酒类等行业中,其添加量不到香兰素的三分之一,是取代香兰素的有效添加剂<sup>[3]</sup>。

到目前为止,乙基香兰素的天然来源尚无报道,市售产品均由化学法合成,主要以邻乙氧基苯

酚为原料,合成过程存在收率低、污染严重等问题<sup>[4]</sup>。随着生物技术的不断发展,通过生物方法获取芳香化合物已成为近年来行业研究的热点<sup>[5-7]</sup>。用生物转化法生产香兰素的研究已经有十余年的历史,研究者采用了多种生物材料,包括真菌<sup>[8]</sup>、细菌<sup>[9-10]</sup>、基因工程菌<sup>[11]</sup>、植物细胞<sup>[12]</sup>及提取得到的酶<sup>[13]</sup>,研究了各种微生物、植物细胞内合成和降解香兰素的代谢途径。但是,对乙基香兰素的生物合成少有研究。作者提出了一条全新的生物催化合成乙基香兰素的途径,见图 1。

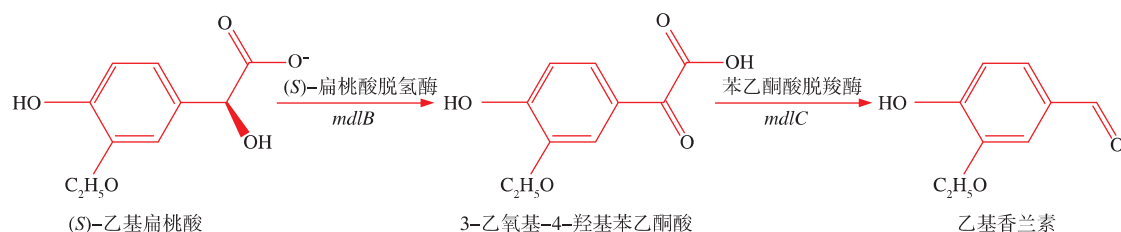


图 1 乙基香兰素生物催化途径

Fig. 1 Proposed route for synthesis of ethyl vanillin

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

恶臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida* ATCC12633); pET-28a(+): 作者所在实验室保存; 重组大肠杆菌 BL21(DE3) (pET30a-mdlB): 作者所在实验室构建; 受体大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3): 作者所在实验室保存。

### 1.2 工具酶与试剂(盒)

T4DNA 连接酶、dNTP、限制性内切酶 *Nco*I, *Bam*H : Fermentas 公司产品; Taq plus DNA 聚合酶, IPTG, 卡那霉素, 柱式质粒小量抽提试剂盒, 柱式 DNA 胶回收试剂盒及柱式 PCR 产物纯化试剂盒: 上海生工生物有限公司产品; 引物合成和 DNA 测序: 上海生工生物有限公司承担; 乙基香兰素标准品: Sigma 公司产品; 其他试剂均为分析纯国产或进口试剂。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 mdlC 基因 PCR 扩增** 根据 NCBI 数据库中 *Pseudomonas putida* 中的苯乙酮酸脱羧酶基因 *mdlC*

的序列设计引物, 引物序列如下: Primer1 为 5'-CACACCATGGTGGCTTCGGTACACGGCAC-3', 下划线部分为 *Nco*I 位点, Primer2 为 5'-CTAGGATCCTCACTTCACCGGGCTTACG-3', 下划线部分为 *Bam*H 位点, 以 *Pseudomonas putida* ATCC12633 为 DNA 模板。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min。反应结束取样 5  $\mu\text{L}$ , 用质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以标准核酸分子为对照。PCR 产物按 PCR 产物纯化试剂盒说明书所述方法进行回收。

**1.3.2 重组质粒的构建** 利用 *Nco*I 和 *Bam*H I 对质粒 pET-28a(+) 进行双酶切, 按 DNA 胶回收试剂盒说明书所述方法割胶回收线性载体片段。将纯化后的 PCR 扩增产物与线性载体片段用 T4DNA 连接酶于 16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 连接产物导入大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂布于含卡那霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 平板上。挑取单菌落至含卡那霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 振荡培养过夜, 对重组子进行菌液 PCR 和 *Nco*I/*Bam*H I 双酶切鉴定。阳

性重组质粒由上海生物工程有限公司完成测序。

**1.3.3 目的基因 *mdlC* 在大肠杆菌中的诱导表达** 重组质粒转入感受态大肠杆菌 BL21(DE3), 涂布于含卡那霉素(50  $\mu\text{g/mL}$ )的 LB 平板上。重组子鉴定同 1.2.2。挑取菌落 *E.coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*)接种于含卡那霉素(50  $\mu\text{g/mL}$ )的 LB 液体培养液中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 振荡培养至  $A_{600\text{nm}}=0.4\sim0.6$ , 添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 将温度降至 30  $^{\circ}\text{C}$ 后继续培养 6 h, 离心收集菌体, 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.0)洗涤 1~2 次后, 用等体积的超纯水重悬菌体, 取 100  $\mu\text{L}$  菌液, 加入 20  $\mu\text{L}$  5 $\times$ 上样缓冲液, 沸水浴加热 5 min 后, 取 10  $\mu\text{L}$  进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析。同时, 以未诱导的重组菌和含 pET28a(+)空载体的重组菌为对照。

**1.3.4 重组大肠杆菌发酵能力的鉴定** 以乙基扁桃酸为底物, 重组菌 *E.coli* BL21 (DE3) (pET30a-*mdlB*)为催化剂, 将乙基扁桃酸催化脱氢, 制备含有 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的转化液, 并以苯乙酮酸为底物作为对照组。

根据 1.2.3 方法诱导 18 h 后, 离心收集重组菌 *E.coli* BL21(DE3) (pET30a-*mdlB*), 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)洗涤细胞两次, 细胞重悬于含底物 5 g/L 的乙基扁桃酸的转化液 (6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.0)中, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 催化 24 h 后离心, 除去菌体, 收集含有 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的转化液。

同样的方法制备静息细胞 *E.coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*), 将收集到的菌体重悬于上述含 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的转化液中, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 催化 24 h, 用高效液相色谱 (HPLC)检测反应液中的物质的浓度。

**1.3.5 重组大肠杆菌催化合成乙基香兰素** 同 1.2.4 方法分别制备静息细胞 *E.coli* BL21 (DE3) (pET30a-*mdlB*) 和 *E.coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*), 等质量混合, 混合细胞重悬于含 5 g/L 乙基扁桃酸的转化液中, 同样的条件催化 24 h, 用 HPLC 检测反应液中的物质的浓度。

**1.3.6 分析方法** 取 5 mL 转化液, 离心除去菌体, 0.22  $\mu\text{L}$  针头过滤器过滤上清, 用高效液相色谱仪分析, 色谱条件为: 色谱柱为 Atlantis-C18 反相柱 (5  $\mu\text{m}$ , 3.9 mm $\times$ 150 mm), 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流量 0.6 mL/min, 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 流动相: V(甲醇):V(水):V(甲酸)

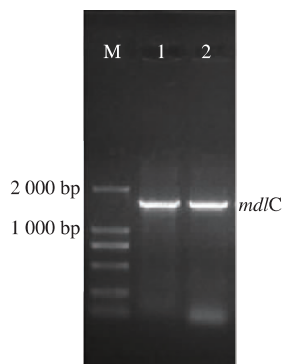
=70:30:0.1, 紫外检测器, 波长 280 nm。

**1.3.7 产物的红外分析** 反应结束后, 离心去除菌体, 将反应液调至 pH 6, 用等体积的乙酸乙酯萃取 1~2 次, 反应液中的乙基香兰素几乎全部转移至有机相, 而未反应的底物乙基扁桃酸留于水相。减压蒸馏去除有机相, 真空干燥得到淡黄色的乙基香兰素固体, 将其复溶于 45  $^{\circ}\text{C}$ 的水中, 恒温振荡至乙基香兰素全部溶解, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 析出得到白色固体。50  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥去除残留水分, 所得的固体经 KBr 压片后, 进行红外分析, 光谱扫描范围为 4 000~600  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数为 32, 分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ , 以乙基香兰素标准品作为对照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒的构建与目的基因的表达

**2.1.1 *mdlC* 基因 PCR 扩增结果** 以 *Pseudomonas putida* ATCC12633 为 DNA 模板, 经 PCR 扩增, 扩增产物经质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 2 所示, 得到一条大小约为 1 600 bp 的 DNA 条带, 与理论值(1 606 bp)相符。



M: DNA Marker; 1~2: PCR扩增产物

图 2 苯乙酮酸脱羧酶基因(*mdlC*)的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products of *mdlC* gene

**2.1.2 重组表达载体的酶切鉴定、PCR 鉴定** 以含重组质粒 pET28a-*mdlC* 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为 DNA 模板, 进行菌液 PCR 鉴定, PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 3 所示, 泳道 3~8 都出现与 *mdlC* 基因片段(泳道 1)大小一致的 DNA 特异性条带, 且 PCR 结果没有杂带显示, 经阴性对照(泳道 2)表明, 在没有模板的情况下没有特异性目的片段出现。已初步确定所挑选的菌株都插入目的基因。为了进一步确定目的片段已经连接上载体, 抽提含有目的基因的重组菌质粒, 对重组克隆载体进

行 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定, 以空载体 pET28a (+) 作为对照, 结果如图 4 所示, 泳道 1 为空载体 pET28a (+) 双酶切后得到, 在约 5 300 bp 处出现一条带, 泳道 3~8 出现两条带, 其中一条与没有连接外源基因的空质粒双酶切得到的条带大小一致, 另一条与纯化后的 PCR 产物 (泳道 2) 大小一致, 测序结果与 GenBank 中的 *mdlC* 序列一致性为 100%。以上结果显示已成功构建了重组质粒 pET28a-*mdlC*。

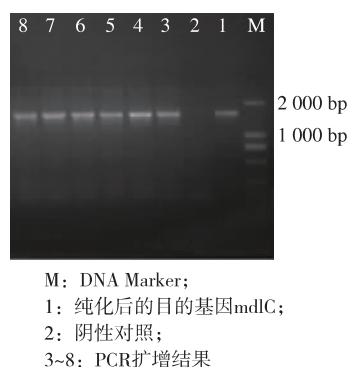


图 3 菌液 PCR 扩增的结果  
Fig. 3 Results of bacteria PCR

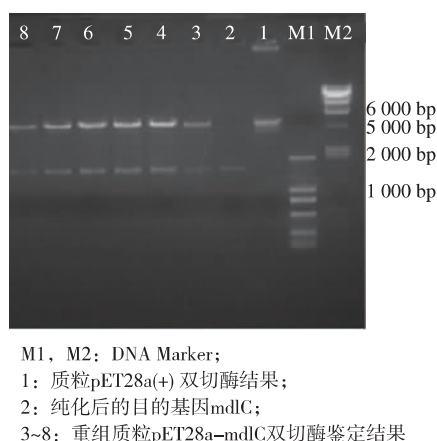


图 4 重组质粒 pET28a-*mdlC* 双切酶鉴定 (*Nco* I / *Bam* H I)  
Fig. 4 Results of pET28a-*mdlC* digested by *Nco* I and *Bam* H I

**2.1.3 诱导产物的 SDS-PAGE 分析** SDS-PAGE 电泳结果 (图 5) 显示: 含有重组质粒 pET28a-*mdlC* 的重组菌 (泳道 2) 经 IPTG 诱导在约 57 000 处产生一条明显的蛋白质电泳带, 与文献报道的重组蛋白大小相符<sup>[14]</sup>, 表明 *mdlC* 基因在宿主大肠杆菌 BL21 (DE3) 中得到有效表达。未经诱导的重组菌 (泳道 1) 和含空载体的菌株 (泳道 3、4) 并没有目的蛋白的

表达。所以本研究构建的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 在 IPTG 的诱导下能够很好地表达苯乙酮酸脱羧酶, 且只有在诱导剂存在的条件下, 基因 *mdlC* 才能够表达。

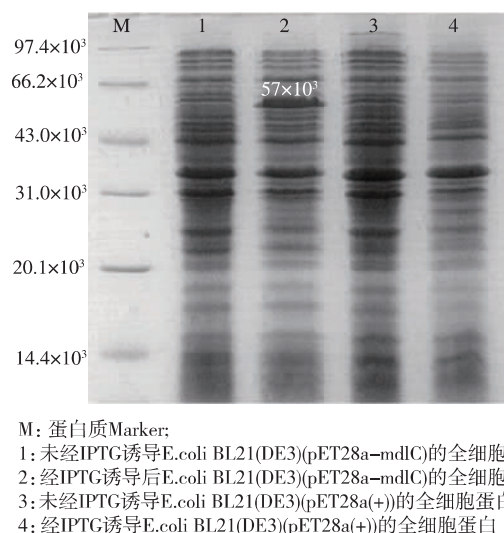
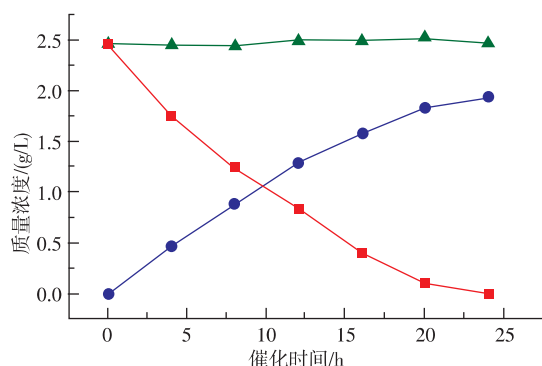


图 5 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 全细胞蛋白电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of total proteins of *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*)

**2.1.4 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 的发酵性能鉴定** 利用重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET30a-*mdlB*) 生物催化 5 g/L 乙基扁桃酸脱氢合成中间产物 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸, 催化 24 h 后得到 2.46 g/L 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸, 表明 (S)-扁桃酸脱氢酶将所有的 (S)-乙基扁桃酸全部脱氢氧化。

重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 在 IPTG 的诱导下, 成功表达了具有酶活性的苯乙酮酸脱羧酶, 如图 6 所示, 随着催化时间的延长, 反应液中 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸逐渐减少, 乙基香兰素逐渐增多, 在催化 24 h 后转化液中已经检测不到 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸, 得到乙基香兰素约 2 g/L, 即在没有优化的条件下, 苯乙酮酸脱羧酶将底物全部脱羧产生乙基香兰素和 CO<sub>2</sub>, 高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 检测显示, 没有任何副产物产生。对于阴性对照组 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a (+)), 在反应过程中, 底物 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的质量浓度保持不变, 且没有乙基香兰素产生。



(■) 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 转化过程中 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的质量浓度; (●) 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 转化过程中乙基香兰素的质量浓度; (▲) *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a(+)) 转化过程中 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的质量浓度

图 6 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) 对 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的生物转化

Fig. 6 Time courses of biotransformation with *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-*mdlC*) in the presence of 4-hydroxy-3-ethoxybenzoylformate

## 2.2 生物转化乙基香兰素

**2.2.1 混合静息细胞生物转化** 作者采用静息细胞转化法,即利用微生物整体作为反应催化剂对外源底物进行结构修饰<sup>[15]</sup>。1.2.4 所述的生物转化需要两步反应如图 1,利用细胞内的扁桃酸脱氢酶和苯乙酮酸脱羧酶联合作用催化底物合成乙基香兰素。作者提出了一种新的方法代替上述的两步法生物催化合成目的产物,分别将两株重组大肠杆菌培养至一定阶段后,加入诱导剂,使目的蛋白得到有效表达,当细胞内积累一定量的目的蛋白时,将两株重组菌离心分离,等质量混合,将其重新悬浮于转化液,使其处于不再生长但仍保持原有各种酶活的状态,添加底物 5 g/L 乙基扁桃酸,在适当的培养条件下进行转化。每隔 4 h 取样,用 HPLC 检测反应液中物质的质量浓度,发现检测不到中间产物 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸,可能是由于中间产物 3-乙氧基-4-羟基苯乙酮酸的转化速率高于乙基扁桃酸的脱氢速率,表明扁桃酸脱氢酶的催化速率是该反应速率的限制因素。底物乙基扁桃酸和产物乙基香兰素的质量浓度变化如图 7 所示,随着反应时间的延长,乙基香兰素逐渐增多,当反应 24 h 后,乙基香兰素质量浓度为 1.94 g/L,与 2.1.4 得到的结果一致,相对应的摩尔转化率为 50%。因此,利用混合细胞催化合成乙基香兰素不仅得到了与上述两步法反

应一致的结果,还缩短了一半的反应时间,提高了反应效率。

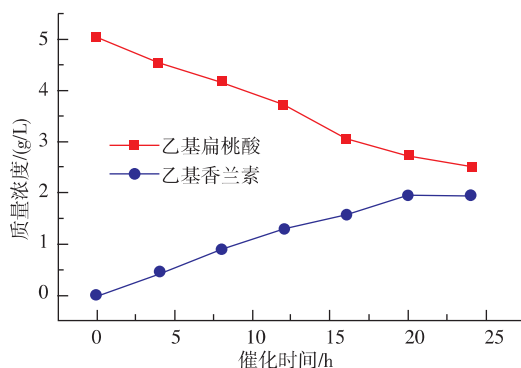


图 7 混合细胞生物催化反应液中的乙基扁桃酸和乙基香兰素的质量浓度变化

Fig. 7 Time courses of on the bioconversion of 4-hydroxy-3-ethoxybenzoic acid to ethylvanillin with resting cells of two recombinant *E. coli* strains

**2.2.2 混合静息细胞重复利用** 众多研究者曾比较生长细胞与静息细胞催化法合成目的产物,发现利用静息细胞生物转化可以有效地控制转化液的组成,以适应底物转化的最佳条件<sup>[15]</sup>,同时减少了培养基成分对转化过程的影响,减少染菌的概率<sup>[16]</sup>,便于后期转化产物的分离与提纯<sup>[17]</sup>;可以提高细胞浓度,以便缩短反应时间<sup>[18]</sup>;具有利用底物能力强,转化率高、反应时间短等优点<sup>[19-20]</sup>。作者对静息细胞的重复使用次数做了试验,结果如图 8 所示,前 3 次静息细胞保持其生物活性,乙基香兰素产率尽管有轻微减少,但均维持在 45% 以上,可能是由于在重复操作过程中,细胞有所损失,使得细胞浓度略有减少<sup>[18]</sup>。增加重复使用次数,乙基香兰素的产率逐渐下降,当重复第 6 次时,乙基香兰素产率下降至 25% 以下。

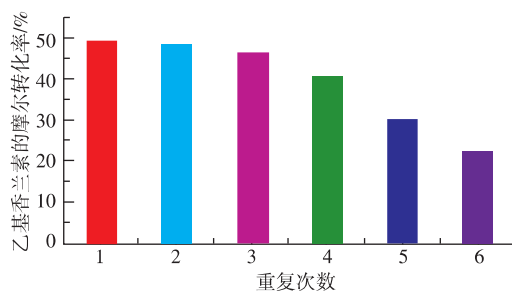


图 8 静息细胞作为生物催化剂的重复利用

Fig. 8 Repeated utilization of cells as biocatalyst

### 2.3 产物的结构鉴定

图9中A和B分别为乙基香兰素标准品和催化产物的红外光谱,可以看出,两者的峰形基本一致,主要基团的特征吸收峰为:3 356  $\text{cm}^{-1}$  为酚羟基的伸缩振动吸收峰;1 689  $\text{cm}^{-1}$  为 C=O 的伸缩振动吸收峰;1 575  $\text{cm}^{-1}$ , 1 510  $\text{cm}^{-1}$  为苯环的 C=C 骨架振动吸收峰;1 283  $\text{cm}^{-1}$ , 1 163  $\text{cm}^{-1}$  为 Ar-OH 的 C-O 伸缩振动吸收峰;1 258  $\text{cm}^{-1}$ , 1 040  $\text{cm}^{-1}$  为苯环与 OCH<sub>2</sub> 中的 C-O 伸缩振动吸收峰;836  $\text{cm}^{-1}$ , 784  $\text{cm}^{-1}$  为苯环 1、2、4 位取代特征吸收峰。

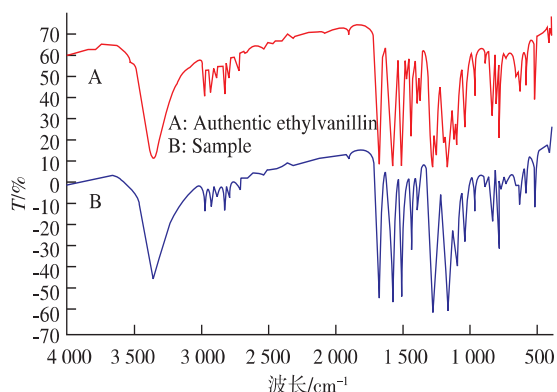


图9 乙基香兰素的红外光谱  
Fig. 9 IR spectrum of ethyl vanillin

## 3 结 语

利用基因工程技术,成功地将苯乙酮酸脱羧酶基因克隆到 pET28a(+)质粒载体上,重组质粒转入到大肠杆菌 BL21(DE3)中,能够有效的表达可溶性目的蛋白。利用混合静息细胞作为生物催化剂,对乙基扁桃酸脱氢氧化、脱羧合成乙基香兰素。同时试验表明,该混合静息细胞可以重复使用至少 3 次,有效缩短了反应时间,提高反应效率。

采用微生物静息细胞对乙基扁桃酸进行生物转化合成乙基香兰素的研究尚未见相关报道,作者在这一方面做了一些探索,提出了一种全新的合成乙基香兰素的方法。今后将在优化反应条件,提高产物的质量及作用机理方面展开进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Jung HJ, Song YS, Kim K, et al. Assessment of the anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of ethyl vanillin[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33(2): 309-316.
- [2] 唐健. 乙基香兰素的合成及应用[J]. 黑龙江日化, 1996, 2: 17-19.
- [3] 杨方政, 蔡哲斌, 张勇. 乙基香兰素的合成方法评述[J]. 化工中间体, 2010, 3: 37-40.  
YANG Fang-zheng, CAI Zhe-bin, ZHANG Yong. Synthesis and application of ethyl vanillin[J]. *Chemical Intermediated*, 2010, 3: 37-40. (in Chinese)
- [4] 游佳勇, 郑凌云, 张淑玲. 乙醛酸制备香兰素工艺条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24: 97-100.  
YOU Jia-yong, ZHENG Ling-yun, ZHANG Shu-ling. Optimization of vanillin synthesis from glyoxylic acid [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24: 97-100. (in Chinese)
- [5] 纪孝熹, 王彦林, 常小燕, 等. 乙基香兰素的合成研究[J]. 广东化工, 2010, 3: 132-133.  
JI Xiao-xi, WANG Yan-lin, CHANG Xiao-yan, et al. Study on synthesization of ethyl vanillin [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2010, 3: 132-133. (in Chinese)
- [6] 汪薇, 白卫东. 天然单体香料的生物合成研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 4: 1-4.  
WANG Wei, BAI Wei-dong. Research progress in biosynthesis of natural monomeric spice[J]. *China Brewing*, 2010, 4: 1-4.
- [7] Serra S F, Claudio B, Elisabetta, et al. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23: 193-198.
- [8] U Krings, R G Berger. Biotechnological production of flavours and fragrances [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 1998, 49: 1-8.
- [9] Lesage Meessen L, Michel Delattre, Mireille Haon M, et al. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic

- acid combining *Asperillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. **Journal of biotechnology**, 1996, 50:107-113.
- [10] Diana D G, Francesca L, Andrea N, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid[J]. **Journal of Biotechnology**, 2011, 156:309-316.
- [11] Nuttawat W, Kunticha K, Alisa SV, et al. Bioproduction of vanillin using an organic solvent-tolerant *Brevibacillus agri* 13 [J]. **Applied microbiology and biotechnology**, 2012, 93:555-563.
- [12] Mamoru Y, Yukiyoishi O, oyokazu Y, et al. Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*[J]. **Biotechnology Letters**, 2008, 30:665-670.
- [13] Podstolski A, HavkinFrenkel D. Improved vanillin production[P]. Patent application, WO 9903975, 1999.
- [14] Frost J W. Synthesis of vanillin from a carbon[P]. Patent application, WO 0017319, 2000
- [15] Amy Y T, Stephen C R, John A G. Mandelate pathway of *Pseudomonas putida*; sequence relationships involving mandelate racemase, (S)-mandelate dehydrogenase, and benzoylformate decarboxylase and expression of benzoylformate decarboxylase in *Escherichia coli*[J]. **Biochemistry**, 1990, 29:9856-9862.
- [16] 朱宏莉, 张嘉, 宋纪蓉, 等. 静息细胞法转化天麻素的研究[J]. 西北大学学报, 2007, 37:73-76.  
ZHU Hong-li, ZHANG Jia, SONG Ji-rong, et al. A study on microbial transformation of gastrodin by resting cell of *Absidia coerulea*[J]. **Journal of Northwest University: Natural Science Edition**, 2007, 37:73-76. (in Chinese)
- [17] Cruz A, Fernandes P, Cabral J, et al. Solvent partitioning and whole-cell sitosterol bioconversion activity in aqueous-organic two-phase systems[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004, 34:342-353.
- [18] Morahem A, Iraj N, Hamid Z E, et al. Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4 [J]. **Applied microbiology and biotechnology**, 2012, 166: 1-12.
- [19] Wang Z L, Zhao F S, Chen D J, et al. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-diene-dione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41:557-561.
- [20] Wang Z L, Zhao F S, Chen D J, et al. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system [J]. **Journal of molecular catalysis B-enzymatic**, 2004, 27: 147-153.
- [21] Zhang Y, Song L, Gao Q, et al. The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by *Lactobacillus brevis* growing and resting cells[J]. **Applied microbiology and biotechnology**, 2012, 94:1619-1627.

## 科技信息

卫生部关于征求《食品用香料通则》等 53 项食品安全国家标准(征求意见稿)及 2 项食品安全国家标准修改单意见的函

根据《食品安全法》及其实施条例的规定,卫生部组织制定了《食品用香料通则》等 53 项食品安全国家标准(征求意见稿)和《食品添加剂 二丁基羟基甲苯(BHT)》等 2 项食品安全国家标准修改单。现向社会公开征求意见,请于 2013 年 2 月 20 日前将意见反馈表以传真或电子邮件形式反馈。

传 真:010-52165424

电子信箱:zqyj@cfsa.net.cn

[信息来源]中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于征求《食品用香料通则》等 53 项食品安全国家标准(征求意见稿)及 2 项食品安全国家标准修改单意见的函 [EB/OL]. (2012-12-21). <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/201212/56581.htm>.