

“香料皇后”——天然香兰素生物合成的研究进展

杨文文 吴秋林 唐鸿志* 许平

(上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要: 香兰素是世界上最重要的香料之一, 广泛应用于食品饮料、香精香料和医药工业等领域中, 全球每年的需求量超过 16 000 t。鉴于人们对纯天然绿色食品的追求日益增长, 天然香兰素高效的生产方法也成为研究的热点。通过对各种香兰素生产方法的比较, 明确提出微生物合成方法的主导地位, 综述了香兰素的生物合成途径以及合成关键基因和酶等方面的研究进展, 分析探讨了不同生物合成途径的优劣之处, 并展望了利用微生物高产天然香兰素存在的瓶颈以及有潜力的发展方向。

关键词: 香兰素, 天然香料, 阿魏酸, 丁香酚, 合成途径

Biosynthesis of natural vanillin—the queen of food ingredients

YANG Wen-Wen WU Qiu-Lin TANG Hong-Zhi* XU Ping

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Vanillin is one of the most important flavoring compounds, and it is widely used in the food industry, spice fragrance, and medicine industry, etc. The annual worldwide consumption is estimated over 16 000 tons. Due to people's increasing concern for natural food, the production of natural vanillin has become the major point of scientific research. By comparing different production methods of vanillin, we concluded that the microbial transformation to vanillin is the most promising method. Research developments on different biosynthetic

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31100034, 30900042, 31121064); 上海市晨光计划项目(No. 10CG10)

*通讯作者: Tel: 86-21-34206647; ✉: tanghongzhi@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2012-07-30; 接受日期: 2012-09-12

pathways for vanillin, as well as the genes and enzymes involved, were discussed. In addition, the advantages and disadvantages of each pathway were compared and explained. Finally, the existing bottlenecks in biosynthesis of high-yield natural vanillin with the help of genetic and metabolic engineering, and the potential development direction in this field were elucidated.

Keywords: Vanillin, Natural spices, Ferulic acid, Eugenol, Synthetic pathway

香兰素(Vanillin, 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)主要存在于天然植物香荚兰中, 是世界上最重要的香料之一^[1]。香兰素独特的无法用人工方法复合而成的香气, 使得她在许多领域得到广泛应用。香兰素大部分应用于食品工业中, 是高档食品不可缺少的调香原料, 在香精香料、饮料和医药工业中也发挥重要作用, 全球每年的需求量超过 16 000 t^[1]。市场上供应的香兰素有两种——合成香兰素和天然香兰素。化学法合成的香兰素, 供大于求, 市场价格较低, 每公斤不到 15 美元^[2], 这种香兰素不仅香型单一, 而且合成过程中污染严重而无法被人们接受。天然香兰素主要是从天然香荚兰中提取, 但是香荚兰种植区域有限, 产量受气候影响大, 劳动强度大, 得到的天然香兰素价格极其昂贵, 每公斤售价高达 4 000 美元, 约为合成香兰素的 300 倍^[2]。目前最具潜力的生物合成法具有原料天然且廉价易得, 生产过程清洁无污染, 快速高效等优点, 利用生物技术手段(微生物转化法)生产天然香兰素已成为一种值得推广的新渠道^[3]。但是如何达到工业化生产需要的高产量, 并且使下游的产物分离纯化过程简单化、经济化, 实现更高的经济效益, 仍是

天然香兰素价格居高不下的主要限制因素, 这也是现阶段科学研究领域的瓶颈, 亟待突破性的创新研究。

1 香兰素生产方法的比较

1.1 化学合成法生产香兰素

据统计, 现今市场上绝大部分(约 90%)的香兰素产品是利用化学合成法生产的, 供大于求, 其原料主要是木质素和愈创木酚。

以木质素为原料: 木质素来源广泛, 纸浆废液中含有量也极其丰富, 其主要以木质素磺酸盐的形式存在。以其为原料, 在碱性条件下水解再经氧化可得到香兰素, 如图 1 所示。该方法具有原料丰富、工艺简单、操作方便等优点, 收率为 10%–15%左右^[4]。

以愈创木酚为原料, Riedel 反应法: 愈创木酚首先与乙醛酸缩合生成 3-甲氧基-4-羟基扁桃酸钠, 再经氧化、酸化生成香兰素^[4], 如图 2 所示。

1.2 植物提取法生产香兰素

香兰素以游离态和葡萄糖苷的形式广泛存在于自然界植物中, 尤其在香荚兰豆中, 含量约为 20 g/kg (干重)。世界香荚兰产地目前主要集中在

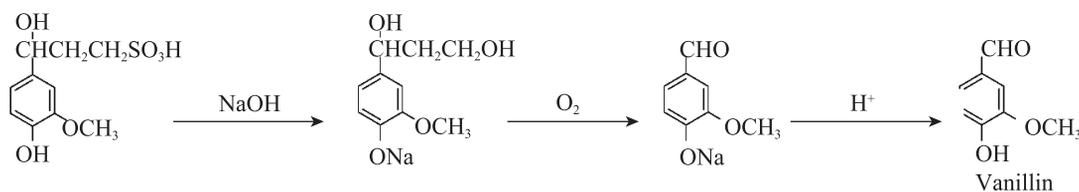
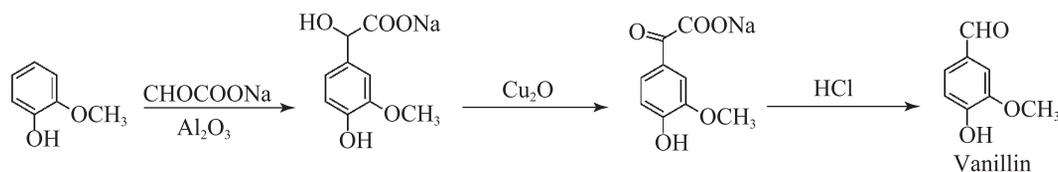


图 1 以木质素为原料合成香兰素途径^[4]

Fig. 1 The synthesis pathway of vanillin from lignin^[4]

图2 以愈创木酚为原料合成香兰素途径^[4]Fig. 2 The synthesis pathway of vanillin from guaiacol^[4]

马达加斯加、印度尼西亚、科摩罗、留旺尼、乌干达、墨西哥和塔希提等岛屿国或地区^[5]。香兰素的深加工产品主要是香荚兰浸剂，方法是先将香荚兰切碎放入浸提器中，用95%的乙醇在50℃–60℃条件下浸提，过滤后即可。这种方法成本高、费时，且溶剂会残留。采用超临界溶剂萃取技术^[6]，无毒、无溶剂残留、在加工过程中也不接触空气，因此香兰素不会发生水解、氧化和酯化等反应，收率也较高。

1.3 生物转化法生产香兰素

植物细胞培养法: 1991年Knuth等提出，香草愈伤组织细胞悬浮培养物会分泌出一种复杂的带香荚兰香味的物质，在不加前体物的条件下用活性炭连续提取14d后，可以得到0.099g/L香兰素^[7]。另有研究者尝试利用组织培养香荚兰(Vanilla)和辣椒(Capsicum)来生产香兰素，产量都非常低，离工业化应用还有很大的距离。

酶法转化: 酶促反应具有高效、专一，反应条件温和，能耗低，污染小等优点。在香兰素的生产中，也有酶法合成的报道。van den Heuvel等发现利用香草醇氧化酶(Vanillyl-alcohol oxidase, VAO)可以生产香兰素，底物木焦油醇在VAO的催化下经香草醇氧化合成香兰素^[8]。

以天然原料为底物的微生物转化法: 鉴于香兰素广泛应用于食品工业中，其是否天然、健康备受消费者的关注。以天然原料为底物，利用生物技术，经微生物转化生产的香兰素经欧洲和美国的食品法规认可为天然的香兰素^[9–10]。经过数

十年的研究，迄今已报道的利用微生物转化法生产天然香兰素的最高产量达到19.2g/L^[11]。

综合比较上述3种香兰素生产方法，化学合成法生产的香兰素香型单一，在生产过程中易掺杂影响香兰素的香味和色泽，污染也非常严重，由此得到的香兰素被认为“非天然”。从植物香荚兰中提取的香兰素是天然的，但由于香荚兰的种植区域有限，产量受气候影响大，作物种植及加工处理劳动强度太大^[12]，生产的天然香兰素远不能满足市场的需求。而且，在组织培养中香荚兰生长非常缓慢，因此香荚兰对于大规模的香兰素生产并不理想。生物合成途径具有原料廉价易得，反应条件温和，节约能源，反应专一性高，产物易分离提取等优点。微生物，鉴于其生长快速和容易进行分子遗传学改造等优点，是生产香兰素的理想选择。中国是香兰素的出口大国，“十五”期间就开始研究微生物转化法生产香兰素，并且取得了较好的成果。2004年周庆礼等研究发现，链霉菌L1936不仅能耐受高浓度的香兰素，而且具有一种与其他菌株完全不同的代谢流，其在转化底物阿魏酸的过程中，当香草酸的积累量达到200mg/L时，就开始积累香兰素作为代谢流的主要产物；他们通过流加2次底物使之浓度达到13g/L，最终产物香兰素浓度达到7.12g/L，相应的摩尔转化率为69.9%^[13]。2005年张莉力等以阿魏酸为底物，以葡萄糖和果糖为碳源，分别对朱红秘孔菌的生长和香兰素的生成两个阶段采用高密度培养基和普通培养基进行培养发酵，并通

通过对香兰素生成阶段的发酵条件的优化后,最终生成 0.403 g/L 香兰素,相应的摩尔转化率为 28.8%^[14]。微生物转化法生产香兰素无论从经济性还是安全性方面更加具有吸引力。

2 香兰素的合成途径及相关基因研究

利用微生物转化法生产香兰素的底物主要为丁香酚和阿魏酸。工业上,丁香酚主要是从丁香油等植物精油中提取得到的,售价比较低廉,每千克约 5 美元;但是,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^[2]。阿魏酸是肉桂酸的衍生物,是细胞壁的组成成分之一,在很多谷物作物中的含量非常丰富^[15-16]。麦麸和玉米麸皮中含量分别为 4-7 g/kg 和约 30 g/kg (干重),水稻胚乳中含量为 12 g/kg,甜菜(约 5 g/kg)也是阿魏酸的一个很好的来源,酿酒工业的副产物之一——大麦的废颗粒也含有少量的阿魏酸,约 0.1 g/kg。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,且以其为底物进行转化合成香兰素的产量相对较高^[2],不失为一种理想的原料物质。因此,利用微生物

的转化能力来进行天然香兰素的生产,并借助基因工程改造等生物技术手段提高香兰素的产量,是一个非常具有潜力的研究方向。

2.1 以丁香酚为底物合成香兰素的代谢途径和基因研究

很多细菌和真菌,如 *Corynebacterium*、*Pseudomonas*、*Byssochlamys*、*Penicillium* 和 *Rhodococcus* 等均能够降解丁香酚^[17],部分也被用于香兰素的生产研究,如 Ashengroph 等分离到一株食树脂假单胞菌(*Pseudomonas resinovorans* SPR1),它能以丁香酚为唯一碳源和能源,在未进行深入优化之前经 30 h 发酵获得 0.24 g/L 香兰素^[18]。另一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. HR199)也能以丁香酚为底物,依次在丁香酚羟化酶(*ehyA* 和 *ehyB* 编码),松柏醇脱氢酶(*calA* 编码)和松柏醛脱氢酶(*calB* 编码)的催化作用下生成阿魏酸,进而生成产物香兰素^[19-20],如图 3 所示。

2.2 以阿魏酸为底物合成香兰素的代谢途径及相关基因研究

两步法合成香兰素:1996 年研究者提出了两步转化法,如图 4 所示。第一步,先用黑曲霉

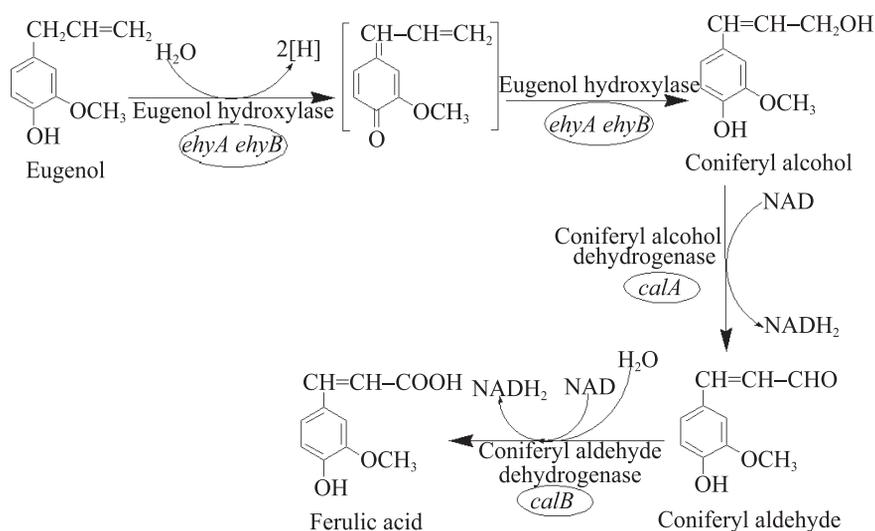
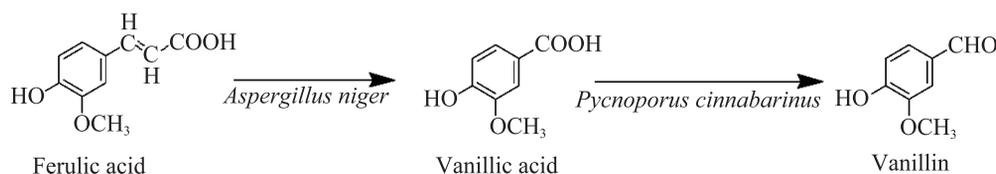


图 3 *Pseudomonas* sp. HR199 中丁香酚至阿魏酸代谢途径^[20]

Fig. 3 Routes for the catabolism of eugenol to ferulic acid in *Pseudomonas* sp. strain HR199^[20]

图4 两步法合成香兰素代谢途径^[21]Fig. 4 A two-step method for vanillin synthesis^[21]

(*Aspergillus niger*)将阿魏酸转化为香草酸,转化率为88%;第二步,再用朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)将香草酸还原为香兰素,产率为22%,在这一步中,香草酸主要发生脱羧反应生成2-甲氧基对苯二酚,仅极少部分的香草酸被还原生成香兰素,所以香兰素的产率很低^[21]。

后来陆续有优化两步法生产香兰素的报道。在培养基中加入纤维二糖可改变菌株的代谢路径,降低甲氧基对苯二酚的水平从而积累香兰素^[22]。在转化过程中加入大孔吸附树脂吸附香兰素,减轻其对菌体的毒害,也有利于香兰素产量的提高^[23]。

单一菌株以阿魏酸为底物生产香兰素:自20世纪90年代,研究者们筛选到大量能将阿魏酸转化为香兰素的菌株,如 *Pseudomonas fluorescens* AN103^[24], *Pseudomonas* sp. HR199^[20], *Amycolatopsis* sp. HR167^[25], *Delftia acidovorans*^[26], *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6^[27], *Enterobacter* sp. Px6-4^[28], *Rhodococcus opacus* PD630^[29]和 *Streptomyces setonii*^[2]等等。

研究发现,很多假单胞菌中均含有香兰素合成及进一步降解的相关基因,而且微生物体内阿魏酸至香兰素的代谢途径基本类似,主要由 Feruloyl-CoA 合成酶(*fcs* 编码)和 Enoyl-CoA 水合酶(*ech* 编码)进行催化。以 *Pseudomonas* sp. HR199 为例^[20],底物阿魏酸在 CoA 和 ATP 存在的条件下经 Feruloyl-CoA 合成酶的催化生成 Feruloyl-CoA,再在 Enoyl-CoA 水合酶的催化作用下经过一个中间物然后生成香兰素,同时释放出乙酰-CoA。生成的香兰素继续被氧化成香草酸

等下游物质。具体途径及相关基因如图5所示。

在众多的香兰素生产菌株中,仅有极少数可以达到工业化应用的水平。由于香兰素对菌体来说是一种抑制剂^[30],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,通常不超过1 g/L。据研究发现,目前仅 *Amycolatopsis* 和 *Streptomyces* 两个属的多个菌株能将底物阿魏酸转化生成较高产量(超过10 g/L)的天然香兰素^[11,31-32],基本可应用于工业化生产。

2000年 Rabenhorst 等利用 *Amycolatopsis* 菌株,以阿魏酸为底物,通过对发酵条件的全面优化并借助吸附树脂减小香兰素对菌体的毒害作用,获得11.5 g/L的香兰素^[31]。*Amycolatopsis* sp. HR167 中阿魏酸至香兰素的代谢途径及相关的编码基因与图5中所示的相应部分一致^[25]。

1999年, Muheim 和 Lerch 以阿魏酸代替毒性较强的丁香酚,利用西唐链霉菌(*Streptomyces setonii*)进行生物转化合成香兰素;他们惊奇地发现,该链霉菌具有与假单胞菌不同的代谢方式:发酵前期,菌体将阿魏酸转化成香草酸,当香草酸浓度积累到0.2 g/L后,菌体开始积累香兰素,他们通过摇瓶实验得到6.41 g/L香兰素^[2]。另外,他们利用10 L的生物反应器进行发酵,获得13.9 g/L的高产量^[32]。但链霉菌中香兰素合成途径中的关键基因,以及酶水平的研究仍未深入进行,该代谢途径的推测如图6所示^[2]。

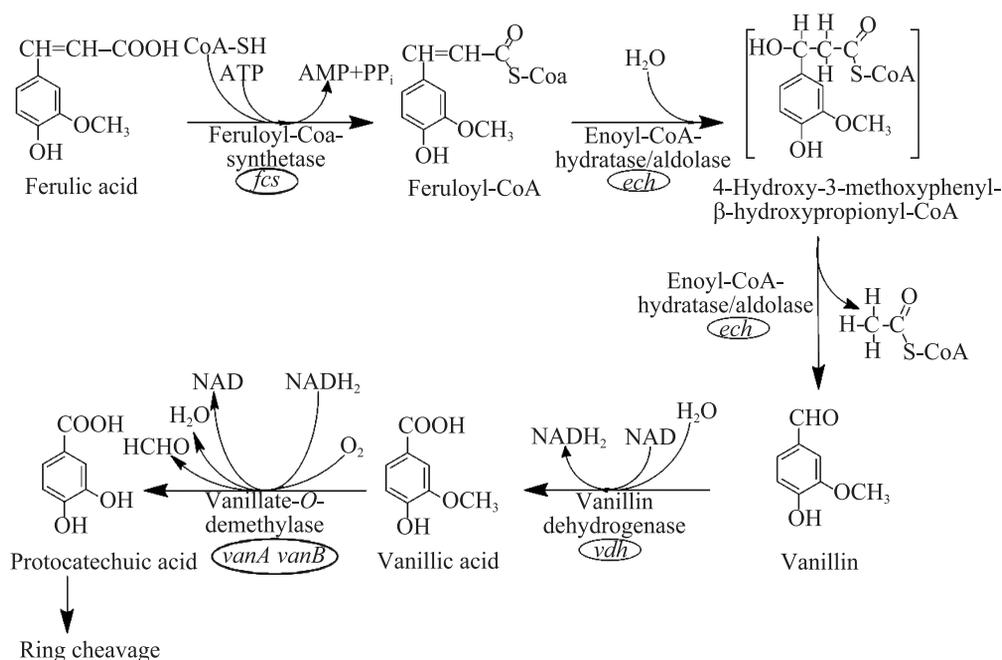


图5 *Pseudomonas* sp. HR199 中香兰素合成及代谢途径^[20]

Fig. 5 Routes for vanillin synthesis and further metabolism in *Pseudomonas* sp. HR199^[20]

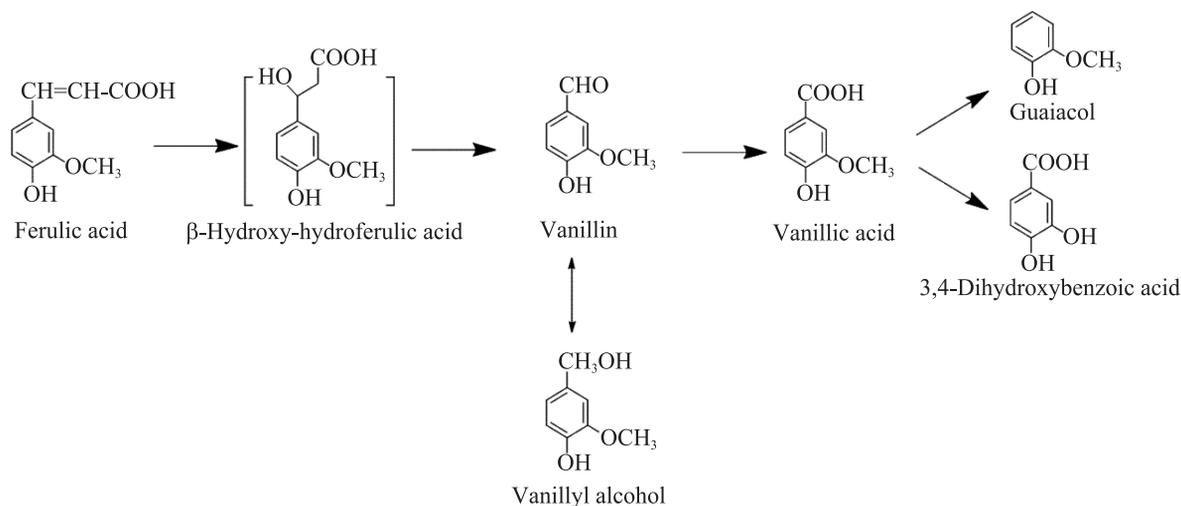


图6 *Streptomyces setonii* 中阿魏酸至香兰素代谢途径^[21]

Fig. 6 Metabolism pathway of vanillin from ferulic acid in *Streptomyces setonii*^[21]

2007年, 本课题组Hua等利用*Streptomyces* sp. V-1以阿魏酸为底物, 借助吸附树脂的作用, 经55h的发酵最终获得19.2 g/L的香兰素, 总摩尔得率为54.5%^[11]。这是迄今为止利用微生物转化法, 以阿魏酸为底物生产天然香兰素获得的最高产量。

上述所列的几种香兰素高产菌株——*Amycolatopsis*和*Streptomyces* (其香兰素产量高于

10 g/L)^[33]均为革兰氏阳性菌, 虽然可以通过优化获得产量可观的香兰素, 但是在工业应用中, 利用这些菌株进行发酵面临的重大难题是下游的产物分离纯化过程。由于放线菌的菌丝体十分密集使得发酵液非常粘稠, 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, 造成整体的经济效益较低, 成品香兰素的市场售价居

是产量方面亟需大幅度提升。

通过基因工程及代谢工程手段生产香兰素, 不仅为工业应用提供了除原始菌株生产香兰素之外更广阔的选择空间, 而且为研究学者们开辟了崭新的研究领域。尽管目前该领域的研究仍处于实验室阶段, 但借助日新月异的高新生物技术手段, 更强大且实用的代谢改造新思路将会打破僵局, 实现工业化香兰素的低成本、高效益生产。

3 展望

近十几年来, 利用微生物转化法生产天然香兰素得到愈来愈多的关注, 从代谢途径到分子水平关键基因的研究已取得了很多重要的研究成果, 但仍存在许多科学问题需要深入的探索研究, 而且高效益的工业化生产也亟待进一步的优化。目前, 在酶学水平上, 香兰素合成途径中关键酶的理化性质与催化机理的相关工作鲜有报道, 能否甚至如何将这些酶应用于酶工程项目均处于未知状态。因此, 今后的研究方向应更加倾向于对这些关键酶的基本酶学性质、与底物结合位点和酶活性中心的寻找以及具体的作用机制等方面的深入挖掘, 丰富并完善香兰素合成相关领域中资源匮乏的酶学研究体系。

此外, 香兰素合成相关的调控基因及其调控机制等方面的研究也应该引起更多的关注, 尤其对高产菌株中是否存在特殊的调控机制和产物耐受机制等问题的回答更加迫在眉睫, 这些工作的创新性开展将在基因工程改造及香兰素产量提升等方面起到指导性的作用。总之, 借助先进的分子生物学和基因工程等技术手段, 对微生物转化法生产香兰素领域进行全面的探究与创新已成为必然的趋势, 更加廉价的天然香兰素必将在各个社会领域发挥更广泛、更有价值的作用。

参考文献

[1] Brochado AR, Matos C, Møller BL, et al. Improved

vanillin production in baker's yeast through in silico design[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 84–98.

- [2] Muheim A, Lerch K. Towards a high yield bioconversion of ferulic acid to vanillin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(4): 456–461.
- [3] Oddou J, Stentelaire C, Lesage-Meessen L, et al. Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 53(1): 1–6.
- [4] 李真顺, 迟玉杰. 香兰素的合成方法及应用[J]. *中国食品添加剂*, 2004(6): 101–106.
- [5] Priefert H, Rabenhorst J, Steinbüchel A. Biotechnological production of vanillin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(3/4): 296–314.
- [6] 符史良, 周江, 黄茂芳, 等. 超临界 CO₂ 萃取香草兰的工艺研究和成分分析[J]. *食品与机械*, 2002(2): 12–14.
- [7] Knuth ME, Carlos S, Sahai OP, et al. Flavor composition and method: United States: 5057424[P]. 1991.
- [8] van den Heuvel RHH, van den Berg WAM, Rovida S, et al. Laboratory-evolved vanillyl-alcohol oxidase produces natural vanillin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(32): 33492–33500.
- [9] Lesage-Meessen L, Stentelaire C, Lomascolo A, et al. Fungal transformation of ferulic acid from sugar beet pulp to natural vanillin[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(3): 487–490.
- [10] Berger RG. Biotechnology of flavours-the next generation[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(11): 1651–1659.
- [11] Hua DL, Ma CQ, Song LF, et al. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(4): 783–790.
- [12] Odoux E. Vanilla curing[A]//Odoux E, Grisoni M. *Vanilla*[M]. New York: CRC Press, 2010: 173–188.
- [13] 周庆礼, 黄艳凤, 韩英素, 等. 微生物转化法生产香兰素[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(3): 18–20.
- [14] 张莉力, 迟玉杰. 微生物转化阿魏酸生产香兰素的研究[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(2): 47–49.
- [15] Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism[J]. *Journal of the Science*

- of Food and Agriculture, 2000, 80(7): 1033–1043.
- [16] Di Gioia D, Sciubba L, Ruzzi M, et al. Production of vanillin from wheat bran hydrolyzates via microbial bioconversion[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84(10): 1441–1448.
- [17] Xu P, Hua DL, Ma CQ. Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(12): 571–576.
- [18] Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, et al. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid[J]. New Biotechnology, 2011, 28(6): 656–664.
- [19] Priefert H, Overhage J, Steinbuchel A. Identification and molecular characterization of the eugenol hydroxylase genes (*ehyA/ehyB*) of *Pseudomonas* sp. strain HR199[J]. Archives of Microbiology, 1999, 172(6): 354–363.
- [20] Overhage J, Priefert H, Steinbuchel A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4837–4847.
- [21] 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.
- [22] Lesage-Meessen L, Haon M, Delattre M, et al. An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling methoxyhydroquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus* with cellobiose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(4): 393–397.
- [23] Lomascolo A, Asther M, Navarro D, et al. Shifting the biotransformation pathways of L-phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334. 85 using HP20 resin[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 32(4): 262–267.
- [24] Gasson MJ, Kitamura Y, McLauchlan WR, et al. Metabolism of ferulic to vanillin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(7): 4163–4170.
- [25] Achterholt S, Priefert H, Steinbuchel 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.
- [26] Plaggenborg R, Steinbuchel A, Priefert H. The coenzyme A-dependent, non-beta-oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(1): 9–16.
- [27] 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.
- [28] Gu W, Li X, Huang J, 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Rabenhorst J, Hopp R. Process for the preparation of vanillin and microorganisms suitable therefor: United States, 6133003[P]. 2000.
- [32] Muheim A, Muller B, Munch T, et al. Microbiological process for producing vanillin: United States, US 6235507 B1[P]. 2001.
- [33] Gounaris Y. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2010, 25(5): 367–386.
- [34] Yoon SH, Li C, Lee YM, et al. Production of vanillin from ferulic acid using recombinant strains of *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Bioengineering, 2005, 10(4): 378–384.
- [35] Yoon SH, Li C, Kim JE, et al. Production of vanillin by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(22): 1829–1832.
- [36] Lee EG, 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.
- [37] Ruzzi M, Luziatelli F, Di Matteo P. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance biological production of vanillin from ferulic acid[J]. Animal Science and Biotechnologies, 2008, 65(1/2): 4–8.
- [38] 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.
- [39] Hansen EH, Moller BL, Kock GR, et al. De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2765–2774.