

香料 2,3-丁二酮的合成现状及展望

练敏¹, 纪晓俊¹, 黄和^{1,2}, 任潇¹, 胡南^{1,2}, 李霜^{1,2}

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京 210009;

2. 江苏省工业生物技术创新中心, 江苏南京 211816)

摘要:介绍了香料 2,3-丁二酮合成的国内外研究现状,其中着重介绍了微生物发酵法生产中的菌种、工艺以及目标产物的检测方法,并对利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮存在的问题提出了一些解决方法,以期减少环境压力,提高香料安全。

关键词:2,3-丁二酮;合成;微生物发酵法

中图分类号:TQ224.24

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)08-0029-04

Present production and prospect of flavor 2,3-butanedione

LIAN Min¹, JI Xiao-jun¹, HUANG He^{1,2}, REN Xiao¹, HU Nan^{1,2}, LI Shuang^{1,2}

(1. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. Jiangsu Provincial Innovation Center for Industrial Biotechnology, Nanjing 211816, China)

Abstract: The production of flavor 2,3-butanedione both at home and abroad is introduced, and the microbial fermentation is especially introduced, including the microbial strains, fermentation process and product determination. Also, some research focus is raised to enhance its production. Some research emphasis is pointed out for the fermentative production process so as to reduce the environmental pollution and increase the flavor safety.

Key words: 2,3-butanedione; synthesis; microbial fermentation

2,3-丁二酮又名双乙酰,是一种黄色至浅绿色且具有强烈奶油香味的重要香料。在乳制品中,2,3-丁二酮被认为是起重要作用的物质,也是奶油、干酪、奶酪以及许多需要奶味的非乳制品中的一种重要风味物质^[1]。此外,2,3-丁二酮还可用作明胶的硬化剂和照相的粘结剂,医药、农药和精细化学品合成的中间体,其应用范围越来越广泛,越来越受到人们的重视^[2]。

本文通过介绍香料 2,3-丁二酮合成的国内外研究现状,并对利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮提出了一些解决方法,以期减少环境压力,提高香料安全。

1 合成方法介绍

1.1 提取法

该法采用的是从含有 2,3-丁二酮的精油中提取,如在精油中加入磷酸,生成结晶加合物,加水后释出 2,3-丁二酮。这种制备方法由于采用天然物作原料,产品安全性高,符合环保要求,但由于原料昂贵,产品成本太高而无法实现工业化生产^[2-3]。

1.2 化学法

传统的 2,3-丁二酮化学合成法是以甲乙酮为原料采用不同的氧化剂进行氧化制备,如亚硝酸钠氧化法、二氧化硒臭氧氧化法、空气氧化法^[3],但分别由于污染严重、原料成本昂贵、氧化条件苛刻等原因而难以实现工业化生产^[2,4-5]。国内普遍采用的甲乙酮肟化法污染严重,所用原料亚硝酸酯毒性大,沸点低,制备过程中产生大量的硫酸氢钠难以回收,对环境危害较大^[4]。近期国内研究较多的以异丁醛为原料工艺路线,采用的是在气化条件下用空气催化氧化异丁醛,然后经冷凝分离得到 2,3-丁二酮产品,虽然普遍认为该工艺优于传统合成工艺,但该工艺也存在反应复杂、副反应多以及污染严重等问题^[4]。

1.3 微生物发酵法

目前,提取法生产 2,3-丁二酮的产量已远不能满足人们的需要;而石化途径获得的 2,3-丁二酮纯度低,仅 80% 左右,作为香料使用时,由于对其中 20% 左右的杂质难以进行安全性评估,这势必会对香料的安全性和人类健康构成很大威胁^[6]。

收稿日期:2008-04-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20606018);国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2007CB707805)资助项目

作者简介:练敏(1984-),女,硕士生;黄和(1974-),男,教授,博士生导师,主要从事生物质可再生资源的利用及微生物代谢工程研究,通讯联系人,biotech@njut.edu.cn。

如今,利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮在国际上已成为研究热点^[2]。与化学法相比,该法虽然产量较低,但却保证了香料食用的安全性,且对环境友好、原料可再生,是一条前景光明的生产路线。微生物发酵法的特点是工艺条件温和,所用原料价格低廉,不会对环境造成危害,同时产品风味自然、逼真、安全性高,可视同天然产品,符合人们崇尚自然的趋势。但能合成 2,3-丁二酮的微生物发酵产率普遍较低,一般在 2~4 g/L,这是目前 2,3-丁二酮不能采用微生物发酵法大规模生产的重要原因^[2]。现代生物技术的发展加深了人们对微生物生理和代谢过程的认识,目前,研究人员已研究清楚 2,3-丁二酮的形成机理和代谢途径,这使得利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮在经济上和技术上都可行,加

之随着人们安全和环保意识的增强,迫切需要天然、安全、卫生的食品添加剂,以利于消费者的身体健康以及保护居住环境,这使利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮成为今后的必然趋势。

2 微生物发酵法研究概况

2.1 菌种

能够代谢产生 2,3-丁二酮的微生物很多,所有 V-P 反应呈阳性的微生物都可以产生 2,3-丁二酮^[2],如乳酸菌属、芽孢杆菌属、肠杆菌属以及某些酵母等^[7-8],部分研究见表 1。乳制品中呈奶香的 2,3-丁二酮主要是由柠檬酸利用菌包括乳酸乳球菌属中双乙酰亚种、明串珠菌、乳杆菌在牛奶中发酵形成^[9]。

表 1 微生物发酵法合成 2,3-丁二酮的研究概况

菌种	底物	发酵工艺	2,3-丁二酮产量/g·L ⁻¹	文献
<i>Lactobacillus . casei</i> subsp. <i>casei</i>	MRS 培养基	培养基中添加适量 FeCl ₃	0.69	[10]
<i>Lactococcus . lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylaetis</i>	新鲜奶酪	选用新鲜的奶酪为培养基、初氧体积分数 100%	0.02	[11]
<i>Lactococcus . lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	葡萄糖、酵母膏等	油醇、酯醇气相 + 固定化	1.80	[12]
<i>Lactococcus . lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	乳清、柠檬酸盐、酵母膏等	控制气压为 0.2 MPa	0.04	[13]
<i>Lactococcus . lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylaetis</i>	MRS 培养基 + 15% (质量分数) 甘油	诱变后在有氧条件下发酵	0.03	[14]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	牛奶	诱变后在有氧条件下发酵	0.02	[15]
<i>Lactobacillus . rhamnosus</i>	MRS 培养基 + 葡萄糖 + 丙酮酸	混合底物发酵	0.05	[16]
<i>Bacillus licheniformis</i>	农副产品	液态深层发酵	40.00	[17]
<i>Bacillus licheniformis</i>	农副产品	菌种诱变 + 液态深层发酵	25.00	[2]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	葡萄糖	菌种诱变 + 液态深层发酵	1.05	[18]

2.2 代谢途径

微生物发酵产 2,3-丁二酮的底物通常有葡萄糖、柠檬酸以及牛奶等。关于乳酸菌是如何代谢利用柠檬酸形成 2,3-丁二酮一直是研究人员关注的焦点。在乳酸菌的柠檬酸代谢途径中(图 1),柠檬酸在柠檬酸裂解酶的作用下裂解为乙酸和草酰乙酸,乙酸分泌到细胞外,草酰乙酸则经脱羧形成丙酮酸,丙酮酸进一步形成乙酰-CoA 和乙醛-TPP,两者反应生成 2,3-丁二酮^[19]。柠檬酸转变为丙酮酸的过程中没有还原当量的产生,这就导致了丙酮酸经过不需要消耗还原当量的途径转变为乙偶姻或者 2,3-丁二酮^[20-22]。在乳酸菌的葡萄糖代谢途径中(图 1),葡萄糖经 EMP 途径生成的重要中间代谢产物丙酮酸,可以在 α -乙酰乳酸合成酶的作用下合成 α -乙酰乳酸,再在酸性条件下,非酶自然氧化脱羧生成

2,3-丁二酮,而且该非酶氧化作用占主导^[19,23]。

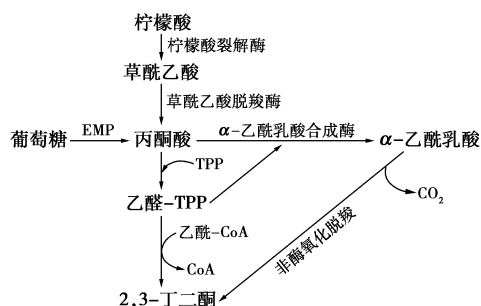


图 1 乳酸菌生物合成 2,3-丁二酮的柠檬酸途径和葡萄糖途径

2.3 检测方法

过去,在食品行业中,2,3-丁二酮的检测方法主要有苯胺化处理色谱法^[24]、比色法^[25]。在这些

工作的基础上,一些改进的方法也逐渐被采用。熊晓辉等^[26]曾用固相微萃取-气相色谱法分别测定泡菜、血浆中的2,3-丁二酮。刘绍从等^[27]利用PLOT柱分离、气相色谱-质谱联用对酿酒发酵产品中微量的2,3-丁二酮含量进行了检测,该方法简单快速,符合定量分析的要求。此外,因发酵乳中2,3-丁二酮类物质可以和邻苯二胺反应生成2,3-二甲基吡嗪,利用生成物中的盐酸盐在335 nm波长下有一最大吸收峰的特征,可对2,3-丁二酮进行定量测定^[28]。吕嘉桢等^[29]根据乳品中成分的复杂性及2,3-丁二酮含量的特殊性,研究了以鲜奶为溶剂绘制2,3-丁二酮标准曲线和紫外分光光度法测定乳品中2,3-丁二酮含量的测定方法,得到了比较满意的结果。孔鲁裔^[30]则对紫外分光光度法测定啤酒中2,3-丁二酮含量做了详细论述,对方法本身及其他可能造成检测结果偏差的因素进行了分析与归纳,并就提高检测准确度提出了建议。

目前,我国尚无针对2,3-丁二酮产品质量的相关国家标准,这就为一些不规范生产厂家提供了可趁之机。因此,笔者认为在建立2,3-丁二酮产品质量国家标准的基础上,针对微生物发酵法生产2,3-丁二酮过程,建立一套适用精确的检测方法对促进我国2,3-丁二酮的规范生产具有重要的意义。

2.4 高产策略

2.4.1 菌种选育及代谢调控

各菌株生产2,3-丁二酮的能力有差异,有些菌株产生痕量的2,3-丁二酮,却能产生大量的乙偶姻,目前微生物发酵过程中2,3-丁二酮的产量均相对较低^[31]。为了提高微生物发酵生产2,3-丁二酮的能力,国外一些学者对微生物中2,3-丁二酮的生成途径、代谢调控方式进行了一系列的深入研究^[11-17](表1)。

华朝丽等^[32]利用瑞士乳杆菌与丁二酮乳链球菌混合培养制备酮香型酸奶,利用正交实验设计优化,2,3-丁二酮的产量为34.19 mg/kg,此时的菌种比例为2:1,接种量为4%。胡文效等^[2,17]利用农副产品如玉米、豆饼等廉价原料,利用高抗产物阻遏的地衣芽孢工程菌株诱变菌,应用酶工程、发酵工程和生化工程技术,先液体发酵制备2,3-丁二酮,再经常压蒸馏浓缩,馏出物加入氧化剂氧化,装入精馏塔精馏,控制回流比,得到高纯度的单体香料2,3-丁二酮,其产量已高达40 g/L,这是目前国内外报道的最高产量。于鹏等^[33]以乳酸乳球菌乳酸亚种丁二酮变种为出发菌株,采用亚硝基胍进行诱变选育,得

到高产2,3-丁二酮菌株,其产量达到0.72 mg/L,比原始菌株产量提高了12.9倍。宋焕禄等^[34]将Hansen公司D/L-乳酸菌及英国Ncimb公司的乳酸乳球菌NCIMB 8763分别在牛奶培养基和MRS培养基中利用柠檬酸盐发酵生产2,3-丁二酮,结果表明,Hansen公司D/L-乳酸菌株能够发酵柠檬酸盐产生2,3-丁二酮,最高产量为98 mg/L,而乳酸乳球菌NCIMB 8763则产生很少量的2,3-丁二酮。赵玲等^[18]以原养型产气肠杆菌为出发菌株,采用紫外线诱变,并结合亮氨酸平板和2,3-丁二酮平板筛选方法,获得耐高浓度底物葡萄糖的高产2,3-丁二酮突变菌,其2,3-丁二酮产量比出发菌株提高18.7倍,达到了1.045 g/L。

2.4.2 基因工程技术的应用

对于已经固定生产工艺的菌种而言,一些外部因素,如最适生长温度、转速、溶氧等已经很难改变,因此2,3-丁二酮的产量要进一步提高,主要依靠改变菌种的特性,通过菌种筛选、调控或基因工程改造的方法改变菌种代谢途径,可以促进目标产物2,3-丁二酮的形成。Benson等^[20]通过在*Lactococcus lactis*中超量表达编码合成代谢中 α -乙酰乳酸合成酶的基因*ilvBN*,增强了丙酮酸到 α -乙酰乳酸的代谢通量,2,3-丁二酮的产量从无提高到0.1 mmol/L。Christophe等^[21]则通过失活*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 突变株中编码乳酸脱氢酶基因,抑制丙酮酸至乳酸的代谢支路,提高了2,3-丁二酮的生物合成能力。Felipe等^[22]则在有氧的条件下通过在*Lactococcus lactis*中过量表达编码NADH氧化酶的基因*nox*,从而抑制丁二酮还原酶的活性,并且调节了菌体内NADH/NAD的比值,切断2,3-丁二酮至乙偶姻代谢支路的同时还抑制了丙酮酸的其他代谢支路,从而达到了过量合成2,3-丁二酮的目的。

3 展望

在无序的生产和恶性的竞争下,国际上规定的含量(质量分数,下同)大于95%的2,3-丁二酮,其含量一降再降。目前国内市场上2,3-丁二酮的含量层出不穷,有75%、80%、85%,价格也不断下降,其安全性实在令人担心;同时因其原料为石化产品,余下的15%~25%杂质难以进行相关安全性评估,这对香料的安全性构成很大威胁。目前,相关部门正在紧急呼吁规范2,3-丁二酮的生产和使用,利用微生物发酵法合成2,3-丁二酮是响应这一呼吁的必然趋势,虽然存在各种挑战,但该法迎合了人们回

归自然的普遍需求,是获得天然香料 2,3-丁二酮的一种新途径。

为此,笔者认为为了克服化学法生产 2,3-丁二酮对环境和人类健康安全带来的威胁,应进一步利用微生物发酵法生产 2,3-丁二酮的优势,在今后的研究过程中应该从以下几个方面展开:

(1)重视菌株的选育。在前人研究的基础上,理性选育高产菌株,如:利用代谢组学方法指导菌种的筛选、调控及改造。着重选育副产物少、耐高浓度产物及适合高密度培养的菌株。

(2)在公认安全(GRAS)的菌株以及原始高产菌株中,强化表达与 2,3-丁二酮生物合成相关的关键酶或构建与 2,3-丁二酮积累相关的中心代谢网络及附属支撑网络,利用所构建的基因工程重组菌大量合成 2,3-丁二酮。

(3)在对发酵过程进行动力学分析的基础上利用数学工具模拟优化发酵过程,以更好地优化发酵工艺。

(4)积极开发高效率、低成本的分离提取工艺,以获得高纯度的 2,3-丁二酮,满足人们对安全香料的强烈需求。

(5)建立相应国家标准,进一步规范香料 2,3-丁二酮的生产和使用。

参考文献

- [1] Braneni A L, Keenan T W. Diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei* [J]. Applied Microbiology, 1971, 22(4): 517 - 521.
- [2] 胡文效,姜兴涛,魏彦锋,等. 发酵法生产 2,3-丁二酮[C]//2004 年中国香料香精学术研讨会论文集. 北京:中国香料香精化妆品工业协会,2004:92 - 97.
- [3] 王平书,郭钢,张岩. 丁二酮的制备[J]. 山东化工,1998,26(4): 20 - 21.
- [4] 谢存明,闫延平,李自力. 丁二酮制备新工艺研究[J]. 河南化工,1998,23(8): 11 - 13.
- [5] 谢海燕,尹笃林,银董红,等. 丁酮气相催化氧化制丁二酮[J]. 湖南化工,2000,30(4): 22 - 23.
- [6] 韦宏. 亟需规范 2,3-丁二酮的生产和使用[J]. 国内外香化信息,2006,20(9): 21 - 21.
- [7] Chuang L F, Collins E B. Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast [J]. Journal of Bacteriology, 1968, 95(6): 2083 - 2089.
- [8] Suomaleinen H, Ronkainen P. Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation [J]. Nature, 1968, 220(5169): 792 - 793.
- [9] 杨丽杰,王俊沪. 乳酸乳球菌中双乙酰代谢之路的调控[J]. 中国乳品工业,2004,32(5): 24 - 29.
- [10] Tsutomu K, Yukari W, Hideki S. Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(10): 3040 - 3042.
- [11] Naima B, Clair-Yves B, Georges C, et al. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1893 - 1897.
- [12] Ishii N, Matsumura M, Kataoka H, et al. Diacetyl fermentation coupled with pervaporation using oleyl alcohol supported liquid membrane [J]. Bioprocess Engineering, 1995, 13(3): 119 - 123.
- [13] Boumerdassi H, Desmazeaud M, Monnet C, et al. Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 through oxygen control [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(5): 775 - 781.
- [14] Boumerdassi H, Monnet C, Desmazeaud M, et al. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6): 2293 - 2299.
- [15] Christophe M, Georges C. Selection and properties of α -acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus* [J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 601 - 606.
- [16] Jyoti B D, Suresh A K, Venkatesh K V. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(5): 509 - 514.
- [17] 胡文效,魏彦锋,渊辛华. 微生物发酵制备单体香料 2,3-丁二酮的方法:中国,1880462A[P]. 2006 - 04 - 19.
- [18] 赵玲,王静云,包永明. 丁二酮高产菌株的选育及发酵动力学分析[J]. 生物技术,2007,17(5): 59 - 64.
- [19] 郑应福,阚振荣,赵春海. 高产双乙酰乳球菌的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2005(S): 186 - 189.
- [20] Benson K H, Godon J J, Renault P, et al. Effect of *ilvBN*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 45(1/2): 107 - 111.
- [21] Christophe M, Frederic A, Georges C. Diacetyl and α -acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in α -acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5518 - 5520.
- [22] Felipe L, Kleerebezem M, Hugenholtz J, et al. Cofactor engineering: A novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(15): 3804 - 3808.
- [23] Snoep J L, Teixeira de Mattos M J, Starrenburg C, et al. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(14): 4838 - 4841.
- [24] 赵大云,丁霄霖. 雪里蕻腌菜风味物质的研究 [J]. 食品与机械, 2001, 82(2): 22 - 24.
- [25] 张学群. 啤酒工艺指标控制与检测手册 [M]. 北京:轻工业出版社,1993:417.
- [26] 熊晓辉,吴昊,熊强,等. SPME-GC 法快速检测泡菜风味物质丁二酮的研究 [J]. 中国调味品,2003,27(11): 37 - 40.
- [27] 刘绍从,吕刚,赵好力宝,等. POLT 柱分离 GC-MS 法测定酿酒发酵产品中的微量丁二酮和苯乙烯 [J]. 分析测试学报,2006,25(1): 127 - 129.

