研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2017.12.014

酿酒酵母静息细胞转化合成 2–苯乙醇

黄筱萍， 黄国昌， 金丹凤， 刘 兰， 熊大维

（江西省科学院 微生物研究所，江西 南昌 330029）

摘要：利用酿酒酵母静息细胞转化合成 2–苯乙醇，确定了静息细胞转化菌龄、转化液缓冲液体系和辅酶 NADH 再生辅助底物。在单因子试验基础上，用 Plackett–Burm 设计从影响转化 6 个因素中筛选出影响细胞转化的显著因素：辅助底物乙醇质量浓度、转化液 pH 和转化温度，以 Box–Benhnken 试验设计结合响应面法分析确定显著因子的最优水平。结果表明，最佳转化条件为乙醇质量浓度 16.5 g/L、pH 5.1、转化温度 26 ℃，2–苯乙醇产量为 3.49 g/L（转化率 58.8%），比优化前提高了 49.14%，静息细胞重复使用 8 次，2–苯乙醇产量无明显下降。转化液中加入 10%的大孔吸附树脂对产物进行原位产物吸附，转化 40 h，2–苯乙醇总质量浓度达 9.34 g/L，L–苯丙氨酸转化率为 83.9%，产量比未加入大孔树脂提高了 171.5%。

关键词：2–苯乙醇；静息细胞；响应面法；大孔树脂

中图分类号：Q 939.97　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2017)12—1316—08

Study on Bioconversion of 2–Phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* Resting Cell

HUANG Xiaoping， *HUANG Guochang*， *JIN Danfeng*， *LIU Lan*， *XIONG Dawei*

（Institution of Microbiology，Jiangxi Academy of Sciences，Nanchang 330029，China）

Abstract：The bioconversion conditions on the production of 2-phenylethanol with *Saccharomyces cerevisiae* resting cell were optimized. Incubation time of resting cell，buffer solution and co-substrate of coenzyme NADH regeneration were determined. Based on the results of single factor test and Plackett-Burm design，three factors including concentration of co-substrate ethanol，pH and reaction temperature were picked out as prominent factors affecting bioconversion of 2-phenylthanol. The optimal bioconversion conditions were determined by Box-Benhnken design and response surface analysis，i.e.，ethanol concentration 16.5 g/L，pH 5.1，temperature 26 ℃，The yield of 2-phenylethanol reached 3.49 g/L，increased by 49.14% compared with the original condition. The cell could maintain their bioconversion activity in repeated utilization at least eight times. After 40 h bioconversion，9.34 g/L of 2-phenylethanol and 83.9% of transformation ratio were obtained under the condition of adding 10% macroporous resin in situ product removal，the yield of 2-phenylethanol increased 171.5%

Keywords：2-phenylethanol，resting cell，bioconversion，macroporous resin

收稿日期：2015–04–30

基金项目：江西省科技支撑计划重点项目(20161BBE50098)；江西省科学院所配套项目(20151BB13031)。

作者简介：黄筱萍(1965—)，女，江西南昌人，农学硕士，研究员，主要从事微生物学方面的研究。E–mail：plahxp@163.com

引用本文：黄筱萍，黄国昌，金丹凤，等. 酿酒酵母静息细胞转化合成 2–苯乙醇[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(12)：1316–1323.

2-苯乙醇(2-Phenylethanol，2-PE)是一种具有玫瑰香味的芳香醇，亦是芳香族化合物中最重要的香料品种之一，广泛应用于食品香精、化妆品和日化产品中。天然 2-PE 是从植物(主要是玫瑰花)中提取，由于其含量太低、成本高，无法满足大规模工业化生产[1]。利用微生物转化 L-苯丙氨酸生成 2-PE 是取代天然 2-PE 产品的有效途径，酵母菌通过 Ehrlich 途径转化培养基中的 L-苯丙氨酸 (L-Phe) 为 2-PE 可大幅度提高 2-PE 的产量[2]。酵母在自身生长代谢过程中会产生大量的乙醇，乙醇和 2-PE 联合作用对菌体产生的毒性是生物转化法生产 2-PE 中产物浓度不高的主要原因，也是制约生物法生产天然 2-PE 的技术关键[2-4]。目前采用两相萃取技术原位转移 2-PE 可一定程度解决产物抑制效应[5-7]，但分离纯化困难，提取精制收率低。利用树脂吸附技术原位转移 2-PE 亦可提高 2-苯乙醇产量[8-9]。本研究所采用的酵母静息细胞转化合成 2-PE 的方法是利用已经培养好的酵母细胞，重新悬浮于缓冲溶液中催化 L-Phe 转化成 2-PE。以菌体细胞作为酶的载体，根据酶的特性添加促进 Ehrlich 途径中酶活的离子和辅酶 NADH 再生辅助底物，在单因子试验基础上，利用 SAS 软件进一步优化转化条件，探讨各因素的交互效应，得到较优条件组合。酵母静息细胞催化反应专一性强，底物转化率高，生成的副产物少，细胞可以重复利用，无需在无菌条件下进行操作[10-11]。在静息细胞转化过程中添加大孔树脂进行原位产物吸附可显著提高 2-PE 的产率，并使下游提取精制易于实施。目前静息细胞的研究在许多领域已经展开，如天然化合物的生物合成、药物前体化合物转化、乳酸、乙酸的生产等领域[12-15]。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

菌种 *Saccharomyces cerevisiae* SH003：由作者所在实验室筛选获得，现保存于江西省科学院微生物研究所；斜面培养基(麦芽汁琼脂培养基 g/L)：葡萄糖 30，蛋白胨 5，酵母粉 3，麦芽汁 3，pH 自然；细胞增殖培养基(g/L)：葡萄糖 30，蛋白胨 5，酵母粉 3，麦芽汁 3，pH 5.8~6.2；L-苯丙氨酸：河北冀海生物科技有限公司，纯度 99.5%；2-苯乙醇标准品：Sigma 公司，纯度 98.5%；甲醇：色谱纯；超纯水自制，其他试剂均为国产分析纯；SHIMADZU LC-20A 高效液相色谱仪；Agilent HC-C18 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；Sartorius practum 224-1CN 分析天平，湖南湘仪高速冷冻离心机 H2500R-2。

1.2 实验方法

1.2.1 静息细胞制备 从斜面挑取 1~2 环菌苔至 30 mL 细胞增殖培养液中，于 28 ℃、180 r/min 培养 18 h，再以 2%的接种体积分数接种于细胞增殖培养液中，于 28 ℃、180 r/min 培养 24 h，进行细胞扩增培养，冷冻离心(8 000 r/min，15 min)，用 0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.8)洗涤细胞两次，将菌体重悬于 0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液中，4 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 静息细胞转化方法 用 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液配制不同浓度的静息细胞液，加入底物 L-苯丙氨酸和辅助底物，于 28 ℃、200 r/min 反应 24 h，10 000 r/min 离心 10 min，上清液采用高效液相色谱法检测 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇质量浓度。

1.2.3 静息细胞转化条件优化方法

1)单因素优化：取不同培养时间的酵母菌体离心，制成静息细胞进行转化合成 2-苯乙醇，对制备静息细胞的菌体菌龄进行优化，测定静息细胞浓度和不同的缓冲液体系对合成转化 2-苯乙醇的影响。

2)静息细胞辅酶辅助底物再生体系的构建：通过添加不同的辅助底物还原糖(如葡萄糖、蔗糖、D-甘露糖、D-木糖、阿拉伯糖等)或醇类(如甲醇、乙醇、丙醇)进行还原型辅酶 NADH 再生。

3)Plackett-Burman 试验设计筛选影响静息细胞转化的关键因子：采用 SAS 软件中多因素二水平试验设计，以 2-苯乙醇产量作为响应用值 Y，对影响转化的因子如细胞浓度、底物质量浓度、糖质量浓度、pH、温度、转化时间进行全面考察，筛选出主要影响因子。

4)Box-Benhnken 试验设计结合响应面法分析筛选显著因子的最优水平：以 Plackett-Burman 设计结果为基础，选择影响转化 2-苯乙醇的显著因子为自变量，以苯乙醇产量为响应值，进行三因素三水平试验，采用 SAS 软件对所得数据进行回归和图形分析，得出优化组合条件，再进行验证实验，检验模型的可行性。

5)静息细胞重复利用：将首次转化结束的静息细胞离心，洗涤，重新悬浮，加入底物和辅助底物，在相同的条件下进行转化，验证静息细胞催化稳定性。

1.2.4 大孔树脂 HZ816 对 2-苯乙醇和 L-苯丙氨酸的静态吸附率与解吸率测定　准确量取 4 g/L L-苯丙氨酸和 2 g/L 2-苯乙醇混合溶液 100 mL 加入具塞磨口三角瓶中,加入 1 g 预处理好的树脂,于 25 ℃、100 r/min 振荡 3 h,真空抽滤,滤液测定 2-苯乙醇和 L-苯丙氨酸质量浓度。计算树脂的吸附率(mg/g)。收集吸附饱和的树脂,用滤纸吸干表面水,加入具塞磨口三角瓶中,准确量取 10 mL 95%乙醇,于 25 ℃、100 r/min 振荡 4 h,计算树脂解吸率(%)。

$$吸附率(mg/g)=(c_1-c_2)\times V/m$$

式中,c_1 为吸附前质量浓度(mg/mL),c_2 为吸附后质量浓度(mg/mL),V 为溶液体积(mL),m 为树脂质量(g)。

$$解吸率(\%)=c\times V\times 100/m$$

式中,c 为解吸液质量浓度 (mg/mL),V 为解吸液体积(mL),m 为吸附质量(mg)。

1.2.5 转化液中加入大孔树脂吸附 2-苯乙醇试验　准确称取 3 g 树脂加入 30 mL 静息细胞转化液中,加入底物 L-苯丙氨酸和辅助底物,于 26 ℃、200 r/min 反应 40 h,真空抽滤,滤液 10 000 r/min 离心 5 min 后检测得 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇质量浓度。树脂加入具塞磨口三角瓶中,加入 30 mL 95%的乙醇,于 25 ℃、100 r/min 振荡 4 h,5 000 r/min 离心 5 min,上清液检测得 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇质量浓度。

1.2.6 反相高效液相色谱法测定 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇含量 [16]　发酵液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,稀释,用 0.22 μm 聚醚水性滤膜过滤后 HPLC 分析。流动相为 v(甲醇):v(水)=50%:50%,流速为 1.0 mL/min,检测波长 260 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2 结果与讨论

2.1 菌龄对静息细胞转化的影响

静息细胞的转化依赖胞内酶的活性,菌体在不同的生长阶段相应酶表达活性相差较大,考察了细胞不同生长阶段的转化能力。转化条件:分别取在扩增培养液中生长不同时间的菌体,用 0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 5.5)配制成 10%的菌体浓度,加入 8 g/L L-苯丙氨酸,辅助底物 20 g/L 葡萄糖进行转化,结果见图 1。

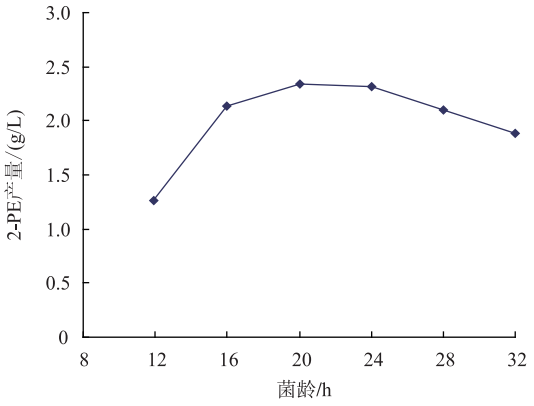


图 1　菌龄对静息细胞转化 2-苯乙醇的影响

Fig. 1　Effect of incubation time on 2-phenylethanol production by resting cell

随着菌体培养时间的增加,2-苯乙醇产量也逐渐增加,当菌龄达 16 h 时,2-苯乙醇的增加渐缓,20 h 产量达到最高,达 2.34 g/L,随后逐渐降低。这可能与菌体衰老自溶,胞内酶释放和活性降低有关,因此选用菌龄为 20 h 的菌体制备静息细胞进行转化实验。

2.2 细胞浓度对转化合成 2-苯乙醇的影响

利用酵母细胞静息细胞转化合成 2-苯乙醇,真正起作用的是细胞内艾氏反应途径的酶系,菌体量直接影响参与反应的酶量,进而影响其催化转化的反应速率和转化率。用 pH 5.5、0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液配制不同的细胞浓度,加入 L-苯丙氨酸 8 g/L,辅助底物葡萄糖 20 g/L 进行转化反应,结果见图 2。当细胞浓度为 10% 时,2-苯乙醇产量达到最高,继续提高细胞浓度不能增加 2-苯乙醇的产量,这可能是由于过多的菌体导致溶氧供应不足,同时影响溶液的传质效率,不利于转化进行,因此在转化过程中细胞浓度控制在 10%比较合适。

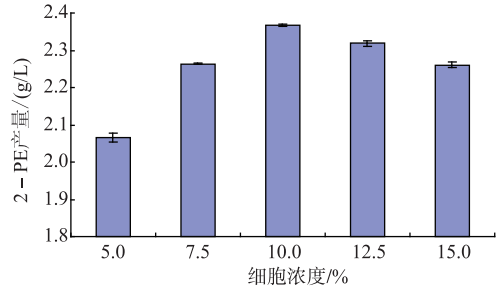
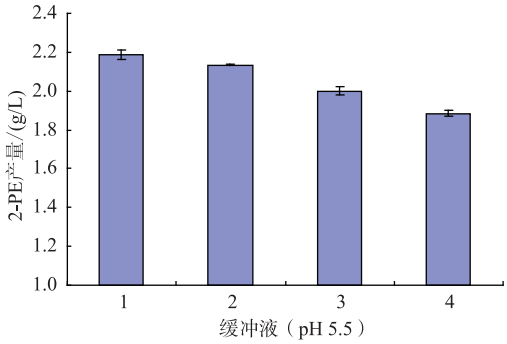


图 2　细胞浓度对转化合成 2-苯乙醇合成的影响

Fig. 2　Effect of cell concentration on 2-phenylethanol production by bioconversion

2.3 缓冲液体系对酵母静息细胞转化合成 2–苯乙醇的影响

分别配制 pH 5.5 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液，0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液和 0.1 mol/L 磷酸钠与磷酸钾混合缓冲液，在细胞浓度为 10%、L–苯丙氨酸为 6 g/L、辅助底物葡萄糖为 10 g/L 进行转化，考察不同配比的缓冲液对静息细胞转化合成 2–苯乙醇的影响，结果见图 3。



1. 0.1 mol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4 缓冲液；2. 0.1 mol/L KH_2PO_4/Na_2HPO_4 缓冲液；3. 0.1 mol/L NaH_2PO_4/K_2HPO_4 缓冲液；4. 0.1 mol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 缓冲液

图 3 不同缓冲液对转化合成 2–苯乙醇的影响

Fig. 3 Effect of buffer solution on 2 –phenylethanol production by bioconversion

PO_4^{3+}对细胞内电子传递和还原性辅酶氧化起着重要调节作用，静息细胞在 K^+浓度较高的缓冲液中转化合成 2–苯乙醇能力较高，转化合成 2–苯乙醇的质量浓度高 10%左右，这表明 K^+也可能对艾氏代谢途径的酶活具有一定的调节作用，有利于细胞的转化合成。

2.4 静息细胞辅酶再生辅助底物筛选

酵母菌通过艾氏途径转化合成 2–苯乙醇发生了氧化还原反应，即苯乙醛在脱氢酶的作用下生成了 2–苯乙醇，由于细胞中脱氢酶在还原苯乙醛时要不断消耗作为电子供体的还原型辅酶 NADH，活性细胞需要不断再生 NADH 以保持细胞内正常的氧化还原状态[17–18]。静息细胞自身没有再生辅酶能力，在转化液中直接添加辅酶 NADH 可提高脱氢酶活性，但其价格昂贵。因此添加辅助底物构建与细胞自身代谢耦合的辅酶再生系统是实现静息细胞转化合成 2–苯乙醇和重复利用的必要手段。

实验设计在转化液通过添加辅助底物如还原糖和醇类进行还原型辅酶再生。在细胞浓度为 10%，L–苯丙氨酸为 8 g/L，辅助底物质量浓度 20 g/L 条件下进行转化，表 1 为添加不同辅助底物对转化合成 2–苯乙醇的影响，对照为不添加辅助底物。

表 1 不同辅助底物对转化合成 2–苯乙醇的影响

Table 1 Effect of co –substrates on 2 –phenylethanol production by resting cells

辅助底物		2–PE 产量/(g/L)	转化率/%
名称	质量浓度/(g/L)		
对照	0	0.07±0.01	0.01
葡萄糖	20	2.26±0.12	38.06
蔗糖	20	2.46±0.17	41.43
D–甘露糖	20	2.54±0.08	42.78
D–木糖	20	0.16±0.02	2.69
甲醇	20	0.07±0.02	1.18
甘油	20	0.11±0.04	1.85
乙醇	10	2.68±0.14	45.14
	20	2.79±0.11	46.99
	30	2.82±0.09	47.5
	40	2.88±0.11	48.51
乙醇+葡萄糖	10+10	2.74±0.14	46.15
乙醇+L 蔗糖	10+10	2.67±0.21	44.97

从表 1 可以看出，在不添加辅助底物时，基本上没有 2–苯乙醇的产生，这表明静息细胞内的 NADH 质量浓度极低，制约了乙醇脱氢酶的活性。不同的辅助底物对合成 2–苯乙醇的影响很大，乙醇、D–甘露糖、蔗糖和葡萄糖对转化合成 2–苯乙醇有明显的促进作用，而木糖、甲醇和丙醇没有促进作用，其中乙醇的促进作用最为显著，乙醇+葡萄糖、乙醇+蔗糖混合辅助底物的效果与乙醇相似，增加乙醇质量浓度至 40 g/L，2–苯乙醇产量无明显增长。

高质量浓度的 2–苯乙醇对生长细胞有一定的毒性，可能是影响了原生质膜的通透性，扰乱跨膜质子电势及糖类和氨基酸的运输系统，乙醇和 2–苯乙醇的联合作用产生的毒性比它们各自产生的毒性累加作用要高[17–18]，而在静息细胞中添加高质量浓度的乙醇对产物的合成没有抑制作用，这也表明了静息细胞转化 L–苯丙氨酸为 2–苯乙醇主要依赖艾氏途径的酶活性。

2.5 Plackett–Burman 试验设计筛选影响静息细胞转化的关键因子

Plackett–Burman 法是一种近饱和的二水平试验设计方法，选用实验次数 N=12 的实验设计，对静息细胞细胞浓度、底物质量浓度、糖质量浓度、转化

液 pH、温度、转化时间进行全面考察,另设 3 个虚拟变量用于估计误差,每个因素取高(1),低(-1)两个水平,应用 SAS(V9 版)软件分别计算各因素的效应值,响应值 Y 为 2-苯乙醇产量,实验设计见表 2,各因素主效应分析结果见表 3。

表 2 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计与水平

Table 2 N=12 Plackett-Burman experimental design and response value

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	Y/(g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1.42
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	3.02
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.27
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.49
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	3.11
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	2.01
7	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1.04
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	2.55
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	2.16
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.58
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1.36
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.29

表 3 N=12 Plackett-Burman 实验因素水平及各因素的主要效应分析

Table 3 N=12 Plackett-Burman experimental factors levels and main effect of various factors

代码	因素	水平		T 值	$Pr>\|t\|$	显著性
		-1	1			
X_1	转化温度/℃	24	28	5.805 0	0.028 4*	3
X_2	L-苯丙氨酸质量浓度/(g/L)	8	12	-1.333 6	0.313 9	6
X_3	虚拟			-5.373 6	0.032 9	
X_4	乙醇质量浓度/(g/L)	10	20	8.405 3	0.012 9**	1
X_5	反应时间/h	18	24	2.078 8	0.173 2	5
X_6	虚拟			-5.922	0.027 3	
X_7	菌体浓度/%	8	12	-4.275 3	0.050 6	4
X_8	虚拟			1.451 3	0.283 8	
X_9	pH 值	5.5	6.5	-6.511 1	0.022 8*	2

注:* 差异显著(P<0.05);** 差异极显著(P<0.01)。

从表 3 可以看出,6 个因素对转化效率的影响的主要因素主次关系依次为 $X_4>X_9>X_1>X_7>X_5>X_2$,乙醇质量浓度、pH 和转化温度对 2-苯乙醇产量影响显著,细胞浓度对 2-苯乙醇产量有一定影响,反应时间和 L-苯丙氨酸浓度影响不显著,系数 R^2=0.972 7,表明拟合程度良好。选择乙醇质量浓度、pH 和转化温度 3 个因素作进一步响应面分析,其他因素正效应取较高水平,负效应取较低水平,即 L-苯丙氨酸为 8 g/L,反应时间为 24 h,菌体浓度为10%。

2.6 响应面设计与分析

根据 Plackett-Burman 实验确定的实验因素与水平,设计了三因素三水平的响应面分析实验,共有 15 个实验点,12 个分析因子,3 个为零点,零点实验重复 3 次估计误差,以 2-苯乙醇产量为响应变量,实验设计和分析结果见表 4-5。

二次模型中回归系数的显著性检验表明:因素 X_1 和 X_2 对产 2-苯乙醇效果的线效应极显著,因素 X_3 对产 2-苯乙醇效果的线效应显著;因素 X_1^2、X_2^2 对产 2-苯乙醇效果的曲面效应用极显著,因素 X_3^2 对产 2-苯乙醇效果的曲面效应用显著;因素X_1X_2、X_1X_3 和 X_2X_3 对产 2-苯乙醇效果的交互影响不显著。对试验数据进行多次拟合回归,以 2-苯乙醇产

量（Y）为因变量，乙醇质量浓度（X_1）、转化温度（X_2）、pH（X_3）为自变量，建立回归方程模型为：Y_1=3.458+0.145 8X_1–0.222X_2–0.095X_3–0.195X_1^2–0.233X_2^2–0.157X_3^2。

表 4　中心组合试验方案与结果

Table 4　Design and results of Box–Behnken

序号	X_1 乙醇质量浓度/(g/L)	X_2 转化温度/℃	X_3 pH	Y/(g/L)
1	−1(10)	−1(24)	0(5.3)	3.163
2	−1	1(32)	0	2.657
3	1(20)	−1	0	3.416
4	1	1	0	2.883
5	0(15)	−1	−1(4.7)	3.340
6	0	−1	1(6.0)	3.163
7	0	1	−1	2.935
8	0	1	1	2.834
9	−1	0(28)	−1	3.112
10	1	0	−1	3.340
11	−1	0	1	2.758
12	1	0	1	3.213
13	0	0	0	3.491
14	0	0	0	3.491
15	0	0	0	3.390

表 5　回归与方差分析结果

Table 5　Results of regression and variance analysis

来源	自由度	平方和	均方	F 值	Pr>F
固归模型	9	1.025 0	0.113 9	19.812 6	0.002 1**
X_1	1	0.169 0	0.169 0	29.390 8	0.002 9**
X_2	1	0.392 6	0.392 6	68.292 9	0.000 4**
X_3	1	0.072 0	0.072 0	12.526 6	0.016 6*
X_1X_2	1	0.000 2	0.000 2	0.030 5	0.868 1
X_1X_3	1	0.013 0	0.013 0	2.254 8	0.193 5
X_2X_3	1	0.001 4	0.001 4	0.250 5	0.637 9
X_1^2	1	0.140 6	0.140 6	24.466 3	0.004 3**
X_2^2	1	0.200 7	0.200 7	34.906 0	0.002**
X_3^2	1	0.090 9	0.090 9	15.816 1	0.010 6*
残差	5	0.028 7	0.005 7		
失拟性	3	0.021 9	0.007 3	2.139 9	0.334 2
纯误差	2	0.006 8	0.003 4		
总计	14	1.053 8			

注：* 差异显著（P<0.05）；** 差异极显著（P<0.01）。

试验各因素对 2-苯乙醇产量影响显著程度大小依次为：转化温度>乙醇质量浓度>pH，模型回归 F 值为 19.812 6，P=0.002 1（P<0.01），表明该模型极显著；多元相关系数 R^2=0.972 7，表明模型对试验实际情况拟合较好，通过软件求出回归模型的极值点，即最佳转化条件为转化温度为 26.04 ℃，乙醇质量浓度为 16.71 g/L，pH 5.11，产 2-苯乙醇的理论最大值为 3.55 g/L。为检验响应面法的可靠性，在最佳转化条件下进行验证试验，考虑到实际操作的方便，调整最佳培养条件为：转化温度为 26 ℃，乙醇质量浓度为 17 g/L，pH 5.1，在此条件下进行 3 次平行试验，2-苯乙醇平均产量达 3.54 g/L，与理论预测值相近，说明响应用面法优化酿酒酵母静息细胞转化合成 2-苯乙醇的转化条件是可行的。

2.7　静息细胞重复利用实验

与生长细胞相比，采用静息细胞转化最大的特点就是在于菌体细胞可以重复使用，在上述优化的转化条件下进行菌体重复利用实验，结果见图 4。

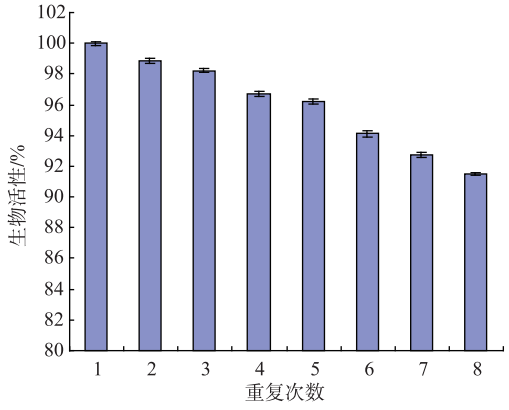


图 4　静息细胞作为生物催化剂的重复利用

Fig. 4　Repeated utilization of resting cell as biocatalyst

静息细胞第 1 次平均转化合成 2-苯乙醇产量为 3.54 g/L，以第 1 次转化静息细胞的生物活性为 100%计，前 3 次重复利用试验中，静息细胞的生物活性变化很小，均保持在 98%以上，细胞重复使用第 4 次其活性开始下降，随后静息细胞的生物活性保持较平稳的状态，重复利用第 8 次，其生物活性仍达 91.6%，表明在优化的转化条件下，静息细胞可以多次重复使用，2-苯乙醇产率无明显下降。

2.8　树脂对底物 L-苯丙氨酸和产物 2-苯乙醇的吸附特征

从多种树脂（数据未列出）中筛选出对产物吸附容量较大，对底物吸附容量低的大孔树脂 HZ816，表 6 为该树脂对底物和产物的吸附率。

表 6　HZ816 树脂对 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇的静态吸附率

Table 6　Static adsorption capability of L-Phe and 2-PE on HZ816

溶液	L-Phe 质量浓度/(g/L)	2-PE 质量浓度/(g/L)	吸附率/(mg/g)	
			L-Phe	2-PE
原液	4.067±0.011	2.012±0.008		
吸附后清液	4.009 2±0.003 6	0.976 9±0.021	5.8	103.5

树脂 HZ816 对 2-PE 的吸附率为 103.5 mg/g，对底物 L-Phe 的吸附率仅为 5.8 mg/g，对产物的吸附量是底物的约 18 倍，是一种较理想的产物分离树脂。用 10 倍树脂体积的 95%乙醇静态洗脱 2-PE，洗脱液中 2-PE 量为(98.3±3.8) mg，2-PE 的洗脱率为 95%。

2.9　大孔树脂提高静息细胞转化 2-苯乙醇产量试验

在静息细胞转化液中加入 10%大孔树脂，在最适转化条件下转化 40 h，转化 18 h 补加底物 L-Phe 和辅酶辅助底物乙醇，实验设计和结果见表 7。

表 7　大孔树脂 HZ816 对静息细胞转化合成 2-PE 产量的影响

Table 7　Effect of macroporous resin HZ816 on 2-PE bioconversion by resting cell

样品号	配料		补料		2-PE 产量/(g/L)			转化率/%
	L-Phe 质量浓度/(g/L)	HZ816 质量分数/%	L-Phe 质量浓度/(g/L)	乙醇质量浓度/(g/L)	转化液	洗脱液	合计	
1	8	0	0	0	3.441±0.078	0	3.441	57.955
2	8	10	0	8	0.389±0.112	4.758±0.371	5.347	90.056
3	8	10	7	8	1.102±0.206	8.241±0.336	9.343	83.924
4	8	10	12	10	0.936±0.363	8.403±0.324	9.339	62.916

在转化液中加入大孔树脂，可大大提高 2-PE 产量，转化液中 2-苯乙醇质量浓度较低，大量的产物 2-PE 被吸附在树脂中。在 L-Phe 质量浓度为 8 g/L 时，加入树脂的转化液中 2-PE 产量提高 55.4%，转化率达 90%，树脂对 2-PE 的吸附率为 82.4 mg/g，比其在水溶液中的吸附率(103.5 mg/g)低，这可能是高浓度的菌体降低了树脂对产物的吸附。提高底物质量浓度至 15 g/L 时，产量达 9.34 g/L，比未加树脂产量提高 171.5%，继续提高底物质量浓度，2-PE 产量没有提高，这可能是树脂吸附已达饱和，需要进一步增加树脂的添加量。

3　结　语

通过酿酒酵母静息细胞转化合成 2-苯乙醇，确定了培养 20 h 的菌体为制备静息细胞最适菌龄；0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液有利于 2-苯乙醇的合成；乙醇作为辅酶辅助底物可有效还原乙醇脱氢酶辅酶 NAD 为 NADH，与糖类作为辅助底物相比，乙醇作为辅助底物便于后期产物的分离纯化。

通过 Plackett-Burman 设计法和响应面试验建立了酵母静息细胞转化条件的二次多项式模型，得到静息细胞最佳转化条件为：乙醇质量浓度为 16.7 g/L，转化温度为 26 ℃，pH 5.1，2-苯乙醇产量为 3.49 g/L，比优化前产量提高了 49.1%。此外，静息细胞作为生物催化剂重复利用 8 次，其生物催化活性仍保持 91.5%。在转化液中加入树脂进行产物原位转移，可大大提高 2-苯乙醇产量，在底物质量浓度为 15 g/L 时，2-PE 产量达 9.34 g/L，底物转化率为 83.9%，比未加树脂产量提高了 171.5%。与生长细胞相比，静息细胞具有转化合成 2-苯乙醇操作简便，无需在无菌条件下进行操作，转化液组成简单，细胞可多次重复使用，易于产业化，对未来工业应用有潜在的优势。

参考文献：

[1] LU Jian, LU Shaoming, MA Jifeng. Situation and development prospects of the β-phenylethanol[J]. **Guangdong Chemical Industry**, 2012, 39(11): 123-124. (in Chinese)

[2] YIN S, ZHOU H, XIAO X, et al. Improving 2-phenylethanol production via ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. **Curr Microbiol**, 2015, 70(5): 762-767.

[3] KIM T Y, LEE S W, OH M K. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces*

marxianus[J]. **Enzyme Microbial Technol**，2014，61：44-47.

[4] ESHIOL N，SENDOVSKI M，BAHALUL M. et al. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. **Journal of Applied Microbiology**，2009，106(2)：534-542.

[5] STARK D，MUNCH T，SONNLEITNER B，et al. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology Progress**，2002，18(3)：514-523.

[6] 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]. **Appl Microbiol Biotechnol**，2006，71(12)：440-443.

[7] LI Huijing，YU Weiting，DAI Xiaomin，et al. In situ product removal used in 2-phenylethanol production by microbial conversion [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**，2012，31(3)：633-638.(in Chinese)

[8] GUAN Ang，WANG Hang，MENG Chun，et al. Biosynthesis of 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain with ISPR technology[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**，2009，9(1)：128-132.(in Chinese)

[9] RONG Shaofeng，FU Yanli，WANG Tao，et al. Research on the extraction of 2-phenylethanol in fermented broth by macroporous adsorption resin[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2010，29(5)：693-697.(in Chinese)

[10] YANG Dajiao，REN Tianbao，WANG Fengqin，et al. The research progress of resting cell fermentation production of industry[J]. **Food and Fermentation Industries**，2013，39(8)：187-191.(in Chinese)

[11] WANG Dan，ZHANG Qiang，LI Wang，et al. Asymmetric reduction of ethyl pyruvate catalyzed by yeast resting cells to (S)-ethyl lactate[J]. **Chinese Journal of Catalysis**，2011，32(6)：1035-1039.(in Chinese)

[12] ZHU Hongli，ZHANG Jia，SONG Jirong，et al. A study on microbial transformation of gastrodin by resting cell of *Absidia coerulea*[J]. **Journal of Northwest University：Natral Science Edition**，2007，37(1)：73-76.(in Chinese)

[13] LIU Fengli，MU Wanmeng，JIANG Bo，et al. The optimization of bioconversion conditions for the production of phenyllactic acid with resting cells[J]. **Science and Technology of Food Industry**，2008，8(8)：67-70.(in Chinese)

[14] PAN Xiaoxia，LI Jingjing，HE Wensen，et al. Cloning and expression of benzoylformate decarboxylase gene and study on biotransformation of ethyl vanillin by resting cell[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2013，32(1)：15-21.(in Chinese)

[15] TSUGE Y，KAWAGUCHI H，SASAKI K，et al. Two-step production of D-lactate from mixed sugars by growing and resting cells of metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**，2014，98：4911-4918.

[16] WANG Hang，DONG Qingfeng，MENG Chun，et al. Breeding for high -yield 2 -phenylethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Fuzhou University：Natural Science**，2010，38(1)：153-156.(in Chinese)

[17] YANG Zhonghua，YAO Shanjing，XIA Haifeng，et al. Asymmetric reduction of 2-octanone to 2-octanol by yeast in aqueous phase[J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering**，2004，55(8)：1301-1305.(in Chinese)

[18] ZHANG Chong，XING Xinhui. Research progress in cofactor regeneration systems[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**，2004，20(6)：811-816.(in Chinese)

[19] RAVASIO D，WENDLAND J，WALTHER A. Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbya gossypii*[J]. **FEMS Yeast Res**，2014，14：833-844.

[20] WANG Hang，MENG Chun，SHI XianAi，et al. Effects of 2-phenylethanol on physiological and biochemical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology China**，2012，39(6)：749-755.(in Chinese)

[21] DU Shan，WANG Xuehua，YANG Zhengmao，et al. Study on metabolic pathways of β-phenyl ethanol bioconversion and regulation[J]. **Food and Fermentation Industries**，2014，40(1)：168-172.(in Chinese)