

原位转移技术用于酵母合成 2-苯乙醇

关昂¹, 王航², 孟春¹, 石贤爱¹, 郭养浩¹

(1. 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 福建省医疗仪器和医药技术重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 研究了酵母转化 L-苯丙氨酸(Phe)合成 2-苯乙醇(Pea)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, 以优化补料策略将糖浓度控制在 0.1~0.3 g/L, 使副产物乙醇浓度小于 1%, 而 Pea 的最高终浓度仅为 3.85 g/L, 因产物抑制效应无法获得更高浓度. 采用大孔树脂 FD0816 作为原位转移产物的介质, Pea 最终总浓度达到 12.80 g/L, 平均生成速率为 0.38 g/(L·h), 比未添加树脂的培养体系分别提高了 232% 和 35.7%. 采用乙醇溶液对发酵用的树脂进行动态洗脱, Pea 洗脱率达到 95% 以上, 洗脱液中 Pea 浓度达到 60 g/L.

关键词: 生物合成; 2-苯乙醇; 产物原位转移; 大孔树脂

中图分类号: O621.3⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0128-05

1 前言

2-苯乙醇(2-Phenylethanol, Pea)具有柔和、愉快而持久的玫瑰香味, 被广泛用于化妆品、食用香料、烟草等行业. 全球 2-苯乙醇的年产量近万吨, 绝大部分采用化学合成方法生产. 随着消费理念的改变, 人们对“天然”香料、香精的需求逐渐增多^[1]. 各国的法律对化学合成的添加剂的限制更严格, 食品和化妆品的生产越来越倾向于使用天然产物. 在美国和欧洲, 标记为天然产物的必须是采用物理方法从天然材料中提取或采用微生物和酶生物催化转化法生产的产品. 从植物中提取的天然 2-苯乙醇价格昂贵, 无法满足需求, 而用微生物发酵生产天然 2-苯乙醇周期短、原料便宜, 具有大规模生产的潜在能力. 关于 2-苯乙醇生物合成技术的研究已在国内引起关注. 梅建凤等^[2]通过培养基优化使 2-苯乙醇终浓度达到 4.815 g/L, 摩尔产率达到 0.63.

酵母转化 L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, Phe)生成 2-苯乙醇是典型的具有严重产物抑制效应的微生物反应过程^[3,4]. 目标产物 Pea 浓度过低阻碍了生物催化合成 2-苯乙醇技术路线的工业化进程. 产物原位转移(*In situ* Product Removal, ISPR)技术可用于解决生物催化过程的产物抑制效应. 已报道的用于 2-苯乙醇生物合成过程的 ISPR 技术有液-液萃取、微胶囊吸附等^[5-11], 其中水/有机溶剂两相体系的研究居多. 王成涛等^[6]采用油酸和 PPG-1500 原位产物转移发酵技术, Pea 产量达到 2.21 g/L. Stark 等^[7]利用含有亚油酸的油水两相体系进行生物合成, Pea 的最终总浓度达到了 12.6 g/L, 然而, 在强烈搅拌和供氧条件下, 亚油酸与水易形成乳化状态,

导致后续分离纯化步骤繁杂. Etschmann 等^[11]利用 PPG1200/水两相体系进行 2-苯乙醇的生物合成, 得到了 10.2 g/L 的 2-苯乙醇和 2.3 g/L 的乙酸苯乙酯高产率, 但未报道有关 2-苯乙醇富集纯化的实验数据. 对于大容量发酵液中低浓度 2-苯乙醇的富集纯化, 目前适用的工业技术以树脂吸附为最佳. 大孔树脂有可能作为 Pea 的原位转移介质, 也可以作为 Pea 的富集纯化材料. 以大孔树脂为 Pea 的原位转移介质的 ISPR-Pea 生物合成的偶联体系未见报道.

本工作在考察了不同树脂对 Pea 的吸附特性及添加树脂对酵母发酵特性影响的基础上, 重点研究了大孔树脂 FD0816 作为 ISPR 介质时的酵母催化合成-产物原位分离偶联体系的生物催化过程特性.

2 实验

2.1 材料与仪器

2.1.1 菌种及试剂

酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain)为本研究所保藏菌种. 2-苯乙醇和 L-苯丙氨酸标准品购自 Sigma 公司. 培养基中底物 L-苯丙氨酸购自丽珠集团福州福兴医药有限公司. 其他试剂均为分析纯.

2.1.2 培养基

培养基组成(g/L): 葡萄糖 10, 尿素 2, CaCl₂ 0.2, MgSO₄ 0.33, KH₂PO₄ 1, pH 5.0. L-苯丙氨酸按实验要求加入.

2.1.3 主要仪器

气相色谱仪(GC-17C, 日本岛津公司), 高效液相色

收稿日期: 2008-09-12, 修回日期: 2008-12-22

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(编号: 2008J0150); 福建省科技创新平台建设基金资助项目(编号: 2006F10101)

作者简介: 关昂(1984-), 男, 河南省驻马店市人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 郭养浩, 通讯联系人, Tel: 0591-22866379, E-mail: yanghaoguo@yahoo.com.cn.

谱仪(125c, 美国 Waters 公司), 5 L 全自动发酵罐(B.Braun.B5, 德国贝朗公司), 可见光分光光度计(Spectrum SP-1105, 上海光谱仪器有限公司).

2.2 实验方法

2.2.1 树脂静态吸附 Pea/Phe 的实验方法

树脂静态吸附 Pea 的过程特性实验: 采用 pH 为 5.0 的培养基, 配制不同初始浓度的 Pea 溶液, 分别取 100 mL 放入 250 mL 三角烧瓶中, 然后分别加入 10 g FD0816 树脂. 30 °C 下 200 r/min 恒温振荡, 每间隔 30 s 取样, 测定溶液中的 Pea 浓度. 在所设定的树脂量 100 g/L 条件下, 以溶液中的 Pea 浓度对吸附时间标绘, 可得树脂静态吸附 Pea 过程特性.

等温吸附平衡实验: 配制不同初始浓度(C_0)的 Pea 溶液, 树脂添加量 100 g/L, 30 °C 下 200 r/min 恒温振荡 12 h. 此时, Pea 吸附处于平衡状态, 取样测定溶液中 Pea 的平衡浓度 C_{eq} . 根据物料衡算关系可计算处于平衡吸附状态时树脂对 Pea 的吸附量 $Q=(C_0-C_{eq})\times 1\text{ L}/100\text{ g}$. Phe 的等温吸附平衡实验方法相同.

2.2.2 酵母培养方法

补料分批培养在 5 L 全自动发酵罐中进行, 600 r/min, 30 °C, pH 值通过添加 2 mol/L NaOH 溶液控制在 5.0 ± 0.1 , 溶氧浓度通过调节压缩空气流量控制在 30% 以上. 接种量为 1%, 接种 1 h 后加入底物 L-苯丙氨酸, 初始浓度为 10 g/L. 采用连续补糖策略, 补糖液为 50% (ω) 的葡萄糖溶液, 补糖速率适时调整, 控制培养基中糖浓度为 0.1~0.3 g/L. 定期采样, 分析底物 Phe、产物 Pea 和副产物乙醇的浓度及菌体浓度.

带 ISPR 的补料分批培养: 自制不锈钢骨架的绢布网格置于发酵罐的挡板间隙, 接种前将再生的树脂置于绢布网格中, 在反应 1 和 14 h 时 2 次加入 L-苯丙氨酸, 以保证反应过程中 L-苯丙氨酸浓度高于 0.5%. 其他操作同上.

树脂吸附 Pea 量的确定方法: 实验结束后, 取出树脂, 装柱, 用 95% 乙醇洗脱至 Pea 未检出, 分步收集洗脱液, 测定洗脱液中 Pea 浓度 C_{totPea} , 该浓度值与洗脱液体积的乘积即为树脂吸附的 Pea 量:

$$C_{totPea}V_{tot}=C_{aqPea}V_{tot}+M_{res}Q_{res}.$$

式中, C_{aqPea} 为水相中的 Pea 浓度(g/L), 用 HPLC 检测, M_{res} 为树脂质量(g), Q_{res} 为单位质量树脂吸附 Pea 的量(mg/g).

2.2.3 分析方法

样品预处理方法: 取 1 mL 发酵液样品以 12000 r/min 离心 30 s, 上清液用 0.45 μm 微膜过滤.

乙醇含量测定采用气相色谱法, 岛津 AC20 毛细管柱, 氮气为载气, 流速 1.5 mL/min, 柱温 110 °C, FID 检测器, 进样量为 1 μL , 正丁醇为内标.

Pea 和 Phe 含量测定采用高效液相色谱法, Waters 125c 工作站, Beckman C-18 反相柱 $\phi 4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, 流动相为甲醇/水(体积比 1:1), 检测波长 210 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL .

葡萄糖浓度用葡萄糖试剂盒(北京北化医药公司)测定, 菌体浓度用细胞干重法测定.

3 结果与讨论

3.1 酵母合成 2-苯乙醇的补料分批培养过程

典型的酵母合成 Pea 的补料分批培养过程见图 1. 从图 1(a)可以看出, 在接种后 2~3 h, 酵母生长进入对数生长期, 同时目标产物 Pea 很快累积. 生物催化合成反应持续至第 14 h. 纵观整个培养过程, 酵母的生长与目标产物的合成几乎是同步的. Pea 的平均生成速率为 0.28 g/(L·h), 底物摩尔转化率 $Y_{Pea/Phe}$ 为 0.85.

副产物乙醇的累积对酵母代谢活性有不利影响. Pea 的生成是与菌体生长相关的过程, 在酵母培养过程

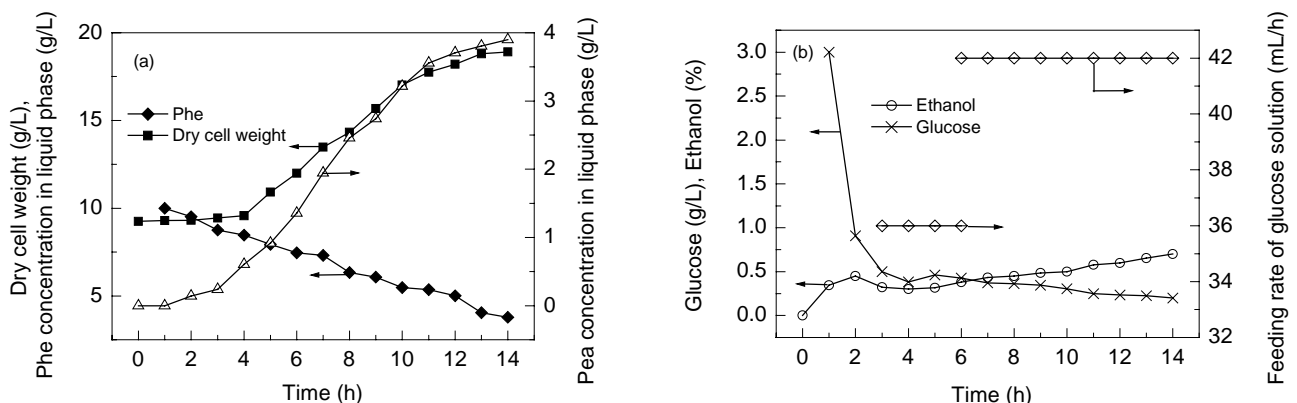


图 1 补料分批培养过程

Fig.1 The process of fed-batch culture

中, 必须供应适量的糖作为碳源和能源, 此时乙醇的生成是不可避免的. 酵母合成 2-苯乙醇过程中, 副产物乙醇的累积(大于 1 g/L 时)更加剧了 Pea 的抑制效应^[4]. 本工作通过合理地控制补糖速率, 使酵母培养过程大部分时间段(3~14 h)糖浓度维持在 0.1~0.3 g/L 范围内, 培养液中的乙醇浓度始终小于 1% [见图 1(b)], 基本可排除乙醇累积的干扰.

在补料分批培养过程中, Pea 产生的抑制效应十分显著. 随 Pea 浓度增加, 酵母生长速度变慢, 产物累积速度也逐渐变缓. 生物转化 14 h 时 Pea 浓度达到 3.85 g/L, 酵母浓度和 Pea 浓度均不再增加. 此时酵母浓度未达最高浓度[66.2 g/L, 见图 4(b)], 且培养液中还有一定浓度的糖及其他营养物质, 但酵母生长已停止. 实验表明, 水相中 Pea 浓度累积至 3.85 g/L 时, 菌体生长和目标产物 Pea 的生物合成均完全受到抑制. Pea 的严重抑制作用致使常规的微生物培养工艺无法获得高产量的目标产物.

Pea 对酵母生物合成的影响主要表现在两个方面, 一是改变细胞膜的通透性使营养物质进入细胞所需能量增加, 二是渗透到细胞内使胞内酶受到抑制或失活. 这两种作用不仅与 Pea 浓度有关, 也与作用时间有关. 随发酵时间的延长及产物 Pea 的累积, 整个过程朝着不利于目标产物合成的方向进行. 因此要获得高的目标产物产量必须采取 ISPR 技术.

3.2 添加树脂的酵母合成 2-苯乙醇补料分批培养过程

3.2.1 树脂对底物 Phe 和产物 Pea 的吸附特性

作为微生物转化过程的 ISPR 介质需满足 2 个条件, 必要条件是对产物具有较大的吸附量, 而对底物的吸附量要尽可能小; 充分条件是生物相容性好. 本工作根据 Pea 亲酯性的特点, 从多种大孔树脂中筛选出了对 Pea 吸附量最大的 FD0816(筛选实验数据未示), 并对 FD0816 的 Pea 和 Phe 吸附特性进行了考察.

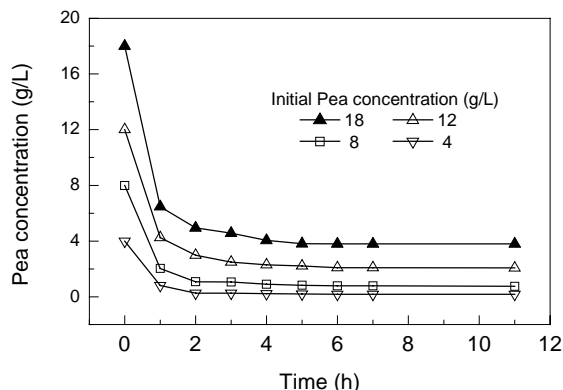


图2 FD0816对Pea的静态吸附曲线

Fig.2 Static adsorption curves of Pea on FD0816

本工作测定了不同初始 Pea 浓度时 FD0816 对 Pea 的静态吸附曲线, 见图 2, 表明在不同 Pea 初始浓度时, 大孔树脂 FD0816 对 Pea 的吸附速度均很快, 在 5 min 内基本趋于吸附平衡. 对 Pea 的快速吸附保证了在酵母催化合成 2-苯乙醇过程中, 树脂能快速地移走所产生的目标产物, 可有效地减弱产物抑制效应.

在特定的吸附条件下, 大孔树脂对溶质的吸附存在动态平衡. 在吸附平衡时, 树脂中溶质的吸附量取决于水相中溶质的平衡浓度. 按 2.2.1 节所述方法进行等温吸附平衡实验, 吸附平衡时树脂 FD0816 对 Pea(或 Phe) 的吸附量与水相中 Pea(或 Phe) 浓度的关系示于图 3. 从图可以看出, 相同水相平衡浓度(如 2 g/L)时, 树脂对产物 Pea 的吸附量(101 mg/g)远大于对底物 Phe 的吸附量(20 mg/g), 前者约为后者的 5 倍.

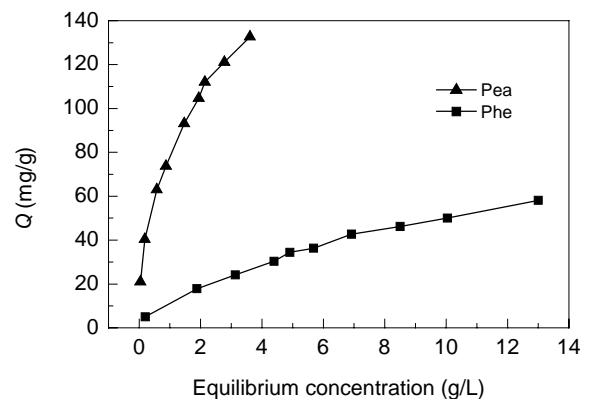


图3 FD0816对Pea和Phe的吸附特性

Fig.3 Adsorption characteristics of Pea and Phe on FD0816

大孔树脂 FD0816 具有较好的生物相容性. 本实验中, 树脂的添加量为 100 g/L, 未观察到添加树脂对菌体代谢产生不利影响. 实验表明, 大孔树脂 FD0816 具备了作为 2-苯乙醇生物合成过程中产物原位分离介质的必要和充分条件.

3.2.2 添加树脂酵母合成 2-苯乙醇的补料分批培养过程

图 4 为典型的添加树脂的酵母合成 Pea 的补料分批培养过程, 可分为 2 个阶段. 在第一阶段(0~14 h), 菌体的生长曲线与不加树脂的培养过程(图 1)相似. 在酵母生长的同时, 底物 Phe 被转化为 Pea, 生物反应器中总 Pea 浓度不断增加. 接种后 14 h, 底物 Phe 的浓度下降至 4.0 g/L, 按底物摩尔转化率 $Y_{\text{Phe}/\text{Pea}}=0.85$ 计算, 产物浓度应为 5.1 g/L, 而此时 HPLC 检测水相中 Pea 浓度仅为 0.8 g/L. 水相中 Pea 浓度低是所添加的树脂快速吸附 Pea 的结果, 生成的 Pea 大部分富集于树脂中. 在 14~15 h 补加 Phe, 使反应体系中 Phe 浓度提高至约 10 g/L; 在第 2 阶段(15~30 h), 酵母依然保持较高的代谢活性,

酵母继续增殖, 底物 Phe 继续被转化为 Pea. 随着生物催化反应的进行, 水相中 Pea 浓度不断累积, 直至其最高浓度(3.83 g/L), 此时, 酵母浓度也同时达到最高值

(66.2 g/L). 在酵母培养的 30 h 内, 56.5 g Phe 被消耗, 共生成 38.4 g Pea, 底物摩尔转化率 $Y_{\text{Pea/Phe}}$ 达到 0.92. 以总发酵液体积计, 最终 Pea 总浓度达到 12.80 g/L.

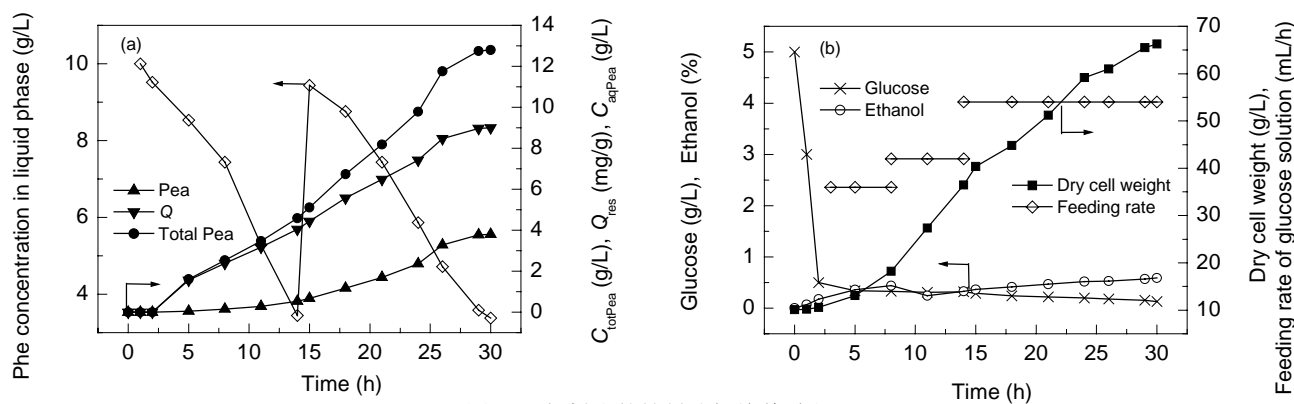


图 4 添加树脂的补料分批培养过程

Fig.4 The process of fed-batch culture with the addition of FD0816 in a 5 L fermentor

表 1 为未添加树脂(图 1)与添加树脂的酵母合成 2-苯乙醇补料分批培养过程(图 4)的比较, 表中数据为 5 批次实验数据平均值. 尽管 2 个培养过程水相 Pea 最高浓度 C_{maxaqPea} 都达到了 3.83 g/L, 但添加树脂的培养过程 Pea 总浓度 C_{maxTPea} 达到了 12.80 g/L, 添加树脂的培养过程 Pea 产量与未添加树脂相比提高了 2.32 倍. 添加树脂后, 水相中的 Pea 浓度明显下降, 2-苯乙醇的生物合成速率显著提高, 2-苯乙醇的平均生成速率 r_{avPea} 高达 0.38 g/(L·h), 比不添加树脂的培养过程提高了 35.7%. 实验表明, 添加大孔树脂 FD0816 可以有效地原位移走产物 2-苯乙醇, 削弱了产物抑制效应, 不仅有利于提高目标产物终产量, 还显著提高了生物合成效率.

表 1 添加与不添加树脂的酵母合成 2-苯乙醇过程的比较
Table 1 The summarization of fed-batch culture with and without resin addition

Resin	C_{maxTPea} (g/L)	C_{maxaqPea} (g/L)	Q_{rea} (mg/g)	r_{avPea} [g/(L·h)]	$Y_{\text{Pea/Phe}}$ (mol/mol)
Without (15 h)	3.85	3.85	—	0.28	0.85
With (30 h)	12.80	3.83	8.97	0.38	0.90

本工作采用大孔树脂作为 ISPR 介质, 酵母合成过程的 Pea 终浓度达到 12.80 g/L, 与已报道的最高产物浓度(12.6 g/L)^[7]相近; 以总实际发酵体积计的 2-苯乙醇的平均生成速率高达 0.38 g/(L·h), 高于文献[7]的 0.13 g/(L·h)和文献[11]的 0.33 g/(L·h).

3.2.3 Pea 的洗脱与富集

发酵结束后收集树脂, 用乙醇溶液进行动态洗脱, Pea 洗脱率可达 95% 以上, 洗脱液中 Pea 浓度达到 60~70 g/L, 比发酵液中的 Pea 浓度提高了 15 倍以上. 大孔树脂 FD0816 是商品化产品, 可多批次循环使用, 操作成本低, 具备了大规模应用的可能性.

对于带 ISPR 培养工艺中大容量水相培养基中残留的低浓度 Pea 用大孔树脂进行动态吸附和动态洗脱, 工艺简单, 可获得高浓度的 Pea 洗脱液, 为后续的分选纯化单元操作提供了良好的基础. 而采用水/有机溶剂两相 ISPR 技术时, 对水相培养基中低浓度 Pea 的提取需另设一套独立的操作单元. 因此, 使用大孔树脂作为原位萃取材料的优势非常明显.

4 结论

采用补料分批培养工艺进行 2-苯乙醇的酵母合成, 在优化条件下, 2-苯乙醇的最高浓度仅达到 3.85 g/L. 此时, 酵母的生长和 2-苯乙醇的合成活性完全受到抑制. 大孔树脂 FD0816 具有对 2-苯乙醇吸附量大和生物相容性好的特点. 采用 FD0816 作为原位转移产物 2-苯乙醇的介质, 2-苯乙醇的最终总浓度达到 12.80 g/L, 平均生成速率达到了 0.38 g/(L·h), 底物摩尔转化率为 0.90. 本研究结果为 2-苯乙醇的生物合成提供了一种新型的、具有潜在应用价值的酵母合成-ISPR 偶联技术.

参考文献:

- [1] Serra S, Fuganti C, Brenna E. Biocatalytic Preparation of Natural Flavours and Fragrances [J]. Trends Biotechnol., 2005, 23(4): 193-198.
- [2] 梅建凤, 闵航, 吕镇梅. 利用酵母细胞生物催化合成 2-苯乙醇 [J]. 催化学报, 2007, 28(11): 993-998.
- [3] Seward R, Willetts J C, Dinsdale M G, et al. The Effects of Ethanol, Hexan-1-ol, and 2-Phenylethanol on Cider Yeast Growth, Viability, and Energy Status; Synergistic Inhibition [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1996, 102: 439-443.
- [4] Stark D, Zala D, Munch T, et al. Inhibition Aspects of the Bioconversion of L-Phenylalanine to 2-Phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 32(2): 212-223

- [5] Stark D, Von Stockar U. *In situ* Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology during the Last Twenty Years [J]. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2003, 80: 149–175.
- [6] 王成涛, 孙宝国, 曹雁平, 等. 酵母菌转化生产天然香料 2-苯乙醇的研究 [J]. *现代化工*, 2008, 28(8): 38–43.
- [7] Stark D, Munch T, Sonnleitner B, et al. Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol. Prog.*, 2002, 18: 514–523
- [8] Stark D, Kornmann H, Münch T, et al. Novel Type of *in situ* Extraction: Use of Solvent Containing Microcapsules for the Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 83(4): 376–385.
- [9] Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Production of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethylacetate from L-Phenylalanine by Coupling Whole-cell Biocatalysis with Organophilic Pervaporation [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92(5): 624–634.
- [10] 陆军, 张伟国. 两相体系生物转化 L-苯丙氨酸生成 2-苯乙醇 [J]. *化工进展*, 2008, 27(3): 417–420.
- [11] 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: 440–443

Biosynthesis of 2-Phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* sp. Strain with ISPR Technology

GUANG Ang¹, WANG Hang², MENG Chun¹, SHI Xian-ai¹, GUO Yang-hao^{1,2}

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
2. Fujian Provincial Key Lab of Medical Measurement and Pharmaceutical Biotechnology, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The bioconversion characteristics of L-phenylalanine (Phe) to 2-phenylethanol (Pea) by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in normal fed-batch culture and ISPR-fed-batch culture were studied respectively. In the normal fed-batch culture, the glucose concentration was controlled in 0.1~0.3 g/L and then the byproduct ethanol concentration was lower than 1%, but the final Pea concentration was lower than 3.85 g/L. Higher Pea concentration could not be attained due to the product inhibition. Macroporous resin FD0816 was chosen as a product *in situ* extraction material, the final Pea concentration reached 12.80 g/L, and Pea average production rate 0.38 g/(L·h), which were improved by 232% and 35.7% respectively as compared with that without resin addition. The resin used in fermentation was dynamically eluted by ethanol solution, the stripping rate was more than 95% and Pea concentration in eluent achieved 60 g/L.

Key words: biosynthesis; 2-phenylethanol; *in situ* product removal; macroporous resin