

# 酵母生物转化合成 2-苯乙醇的培养条件优化

崔志峰, 沈情佳, 杨 霄, 车智博, 汪 琨

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州, 310032)

**摘 要** 通过单因素试验和均匀设计试验对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 生物转化合成 2-苯乙醇的培养基组成及培养条件进行优化研究。优化后培养基组成及培养条件为: 葡萄糖 30.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L, *L*-苯丙氨酸 5.8 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L, 酵母氮碱 0.17 g/L; 最佳初始 pH 5~6, 接种密度  $1.21 \times 10^7$  /mL, 最适培养温度 28~30 °C, 200 r/min 振荡培养 36 h。优化后 2-苯乙醇产量达到 3.98 g/L, 比优化前的 1.9 g/L 提高了 109 %。原料 *L*-苯丙氨酸的摩尔转化率从最初的 51.4 % 提高到了 92.7 %。

**关键词** 酿酒酵母 2-苯乙醇, 培养条件优化, 均匀设计

2-苯乙醇(PEA)是一种具有玫瑰花香的芳香醇, 大量应用于日用化学和食品工业中玫瑰香型和其他类型的香精配方, 尤其在化妆品中用量最大。2-苯乙醇通常用苯或苯乙烯通过化学途径合成, 但存在产品品质差等诸多弊端。目前市场上天然 2-苯乙醇的价格是化学合成的 2-苯乙醇的 250 倍之多<sup>[1]</sup>。但是, 从玫瑰精油中提取天然 2-苯乙醇由于生产周期长, 成本高而无法进行大规模的工业化生产来满足市场的需要。利用酵母菌生物转化是生产天然 2-苯乙醇的一条有效途径<sup>[2]</sup>。

由于 2-苯乙醇对酵母生长有抑制作用, 目前酵母生物转化生产 2-苯乙醇单相分批培养的最高产量为 3.8 g/L<sup>[3]</sup>。Stark 等人利用酿酒酵母 *S. cerevisiae* Giv2009, 通过补料分批培养并结合油酸原位产物提取(In Situ Product Removal), 使 2-苯乙醇的产量提高到 12.6 g/L, 摩尔转化率达到 91%<sup>[3]</sup>。Etschmann 等人则利用 *K. marxianus* CBS600 酵母菌株, 以聚丙二醇代替油酸作为抽提相, 使 2-苯乙醇产量达到 10.2 g/L, 摩尔转化率为 82%<sup>[4]</sup>。国内新近报道了 1 株酿酒酵母诱变株, 经过分批培养其产量达到 5.4 g/L<sup>[5]</sup>。培养基成分和发酵条件对发酵产量也有重要影响, 如董函竹等人在发酵生产 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸培养条件的研究中, 通过均匀设计实验使产量提高了 30 %<sup>[6]</sup>。

研究通过单因素及均匀设计试验对本实验室获得的 2-苯乙醇高产酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 的发酵培养基及培养条件进行优

化, 旨在为工业化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 株

*Saccharomyces cerevisiae* CWY132, 浙江工业大学生物与环境工程学院实验室筛选并通过诱变育种得到的 2-苯乙醇高产菌株<sup>[7]</sup>。

### 1.2 培养基及培养条件

#### 1.2.1 固体琼脂培养基

葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 腺嘌呤 0.04 g/L, 琼脂 20 g/L, 自然 pH。121 °C 下高压灭菌 20 min。

#### 1.2.2 液体种子培养基

葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 腺嘌呤 0.04 g/L, 自然 pH。121 °C 下高压灭菌 20 min。

#### 1.2.3 生物转化培养基

葡萄糖 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L, 酵母氮碱 0.17 g/L, *L*-苯丙氨酸 5 g/L, pH 5.0, 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶。121 °C 下高压灭菌 20 min(苯丙氨酸用过滤灭菌)。

### 1.3 酵母菌培养

从固体琼脂培养基上挑取 1 环酵母菌接入种子培养基, 在 28 °C, 200 r/min 条件下摇床培养 16~20 h 至对数期。测定上述种子液的酵母细胞浓度, 并按需要的接种量转接入生物转化培养基中, 200 r/min 振荡培养 36 h 后测定 2-苯乙醇含量。

### 1.4 2-苯乙醇的含量测定

#### 1.4.1 标准曲线的制作

2-苯乙醇含量测定色谱条件: Agilent 1100 高效

第一作者: 博士, 副教授。

收稿日期: 2007-11-20

液相色谱仪;Agilent C18 柱(4.6 mm×250 mm);柱温 25 ℃;梯度洗脱:前 15 min 内由超纯水:乙腈(95:5)均匀过度到 100% 的乙腈;保持 100% 乙腈洗脱 5 min。流速 1 mL/min,进样量 20 μL,检测波长 254 nm。2-苯乙醇保留时间 10.75 min,如图 1。

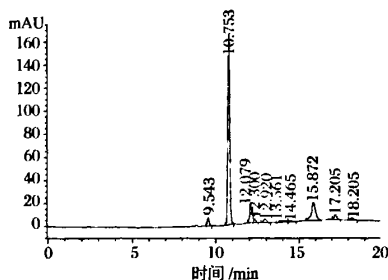


图 1 PEA 标准品(1 g/L)的液相图谱

用 2-苯乙醇标准品( $\geq 98\%$ , 上海双香助剂厂)分别配置浓度为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 g/L 的水溶液,进行液相色谱分析,以 2-苯乙醇浓度为横坐标  $x$ ,峰面积为纵坐标  $y$  绘制标准曲线(图 2)。

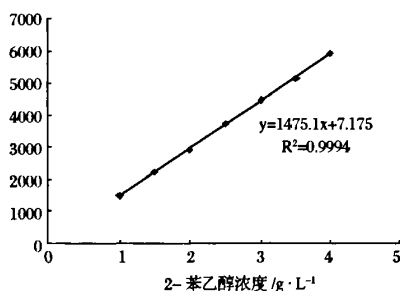


图 2 PEA 标准曲线

#### 1.4.2 发酵液的前处理及检测

取 1 mL 发酵液经过 10 000 r/min 离心 10 min 后,吸取上清液进行液相分析。将所得峰面积代入方程  $y = 1475.1x + 7.175$ ,求得 2-苯乙醇浓度(含量)。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳源对 2-苯乙醇产量的影响

在发酵培养基的基础上添加不同种类的糖类(添加量均为 20 g/L),观测不同种类碳源对 2-苯乙醇产量的影响。结果如图 3 所示,添加葡萄糖时 2-苯乙醇产量最高,达到  $1.90 \pm 0.05$  g/L;糖蜜次之,为  $1.64 \pm 0.10$  g/L;果糖、蔗糖、麦芽糖略低,均在 1.50 g/L 左右。木糖最低,仅  $0.28 \pm 0.05$  g/L,且菌体的生长明显受限。因此,在其他实验中所用的发酵培养基都是以葡萄糖作为碳源。

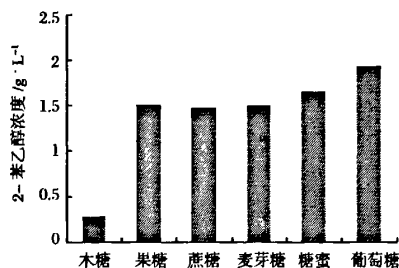


图 3 碳源的影响

### 2.2 pH 对 2-苯乙醇产量的影响

将发酵培养基调成不同的初始 pH(pH4,5,6,7 和 8),测试不同 pH 条件下 2-苯乙醇的产量。结果显示,在测试范围内,pH 对产量的影响并不十分显著,pH 5~6 之间产量略高如图 4。

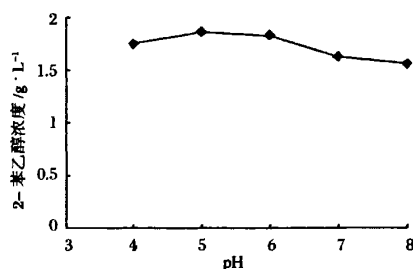


图 4 pH 的影响

### 2.3 装样量对 2-苯乙醇产量的影响

装样量分别为 25 mL/250 mL、50 mL/250 mL、75 mL/250 mL、100 mL/250 mL 三角瓶时的结果如图 5 所示。50 mL/250 mL 的装样量时产量最高,25 mL/250 mL 时产量略低。装样量对 2-苯乙醇产量的影响较明显,主要是由于装样量的多少会改变通气量而对酵母发酵有明显影响。以下的实验中采用 50 mL/250 mL 的装样量。

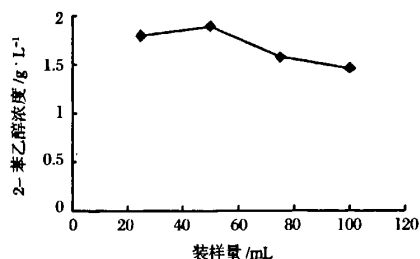


图 5 装样量的影响

### 2.4 接种量对 2-苯乙醇产量的影响

在发酵培养基中分别接入  $1 \times 10^6$  /mL、 $2 \times 10^6$  /mL、 $3 \times 10^6$  /mL、 $4 \times 10^6$  /mL 的接种密度,观测其对

2-苯乙醇产量的影响,结果如图 6 所示。在测试范围内,产量随接种密度的增加而增长,接种密度对 2-苯乙醇产量的影响较为显著。

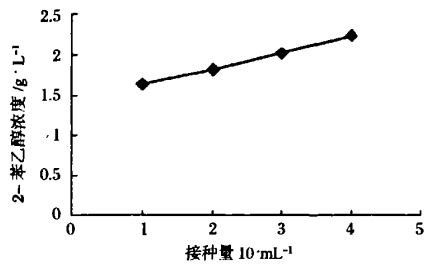


图 6 接种量的影响

2.5 培养温度对 2-苯乙醇产量的影响

培养温度对产量的影响见图 7。结果显示 28 ℃ 和 30 ℃ 时产量最高,达到  $2.2 \pm 0.07$  g/L。

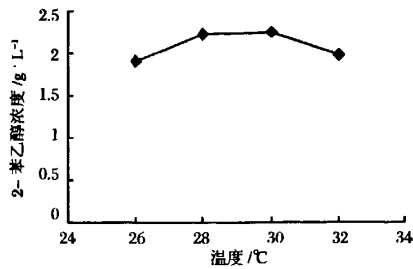


图 7 培养温度的影响

2.6 均匀设计试验结果

2.6.1 试验方案及试验结果

上述单因素试验表明碳源和接种量对 2-苯乙醇的产量有较大的影响。因此,在均匀设计试验中选取葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、L-苯丙氨酸和接种量为受试因子,4 因素 6 水平均匀设计表及试验结果见表 1。

表 1 均匀设计方案及试验结果

	葡萄糖(g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	L-苯丙氨酸/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	接种密度 $\times 10^{-6}/\text{mL}$	2-苯乙醇浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
N1	16	2	5	6	$2.57 \pm 0.16$
N2	24	8	8	4	$1.54 \pm 0.06$
N3	12	4	9	10	$2.21 \pm 0.02$
N4	28	0	7	12	$3.41 \pm 0.02$
N5	32	6	4	8	$0.88 \pm 0.06$
N6	20	10	6	14	$1.76 \pm 0.08$

2.6.2 试验数据的回归分析及验证试验

用 DPS 软件对表 1 的数据进行逐步回归分析,得到如下回归方程:  $Y = 3.40 - 0.2813 \times X_2 + 0.0406 \times X_2 \times X_2 - 0.0106 \times X_1 \times X_2 - 0.0055 \times X_2 \times X_4$ ,  $R = 0.9998$ ,  $F = 1055.7$ ,  $P = 0.0231$ 。方程较为显著。配比为:葡萄糖 30.1 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0 g/L, L-苯丙氨酸 5.8 g/L, 接种密度  $12.1 \times 10^6/\text{mL}$ 。以此培养条件做验证试验,2-苯乙醇的产量达到  $3.98 \pm 0.10$  g/L, 苯丙氨酸的摩尔转化率达到 92.7 %。

2.6.3 葡萄糖与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  交互作用

葡萄糖与硫酸铵具有一定的交互作用,见图 8。这一点得到了方程中“ $X_1 \times X_2$ ”的系数的支持。硫酸铵对产量具有较为显著的影响( $-0.2813 \times X_2$ ),当  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  加入量较大时(8~10 g/L),随葡萄糖的增大 2-苯乙醇的产量增长明显。而产量的极大值出现在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为 0 g/L 时,此时葡萄糖与产量的关系不十分显著。

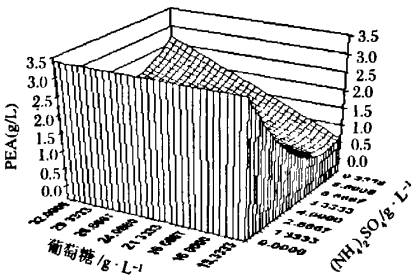


图 8 硫酸铵与接种量交互作用

苯丙氨酸为唯一氮源时 2-苯乙醇的产量最高。优化后酿酒酵母 CWY132 生物转化产 2-苯乙醇的培养基组成及培养条件:葡萄糖 30.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L, L-苯丙氨酸 5.8 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L, 酵母氮碱(YNB)0.17 g/L; 初始 pH 5~6, 温度 28~30 ℃, 接种密度  $1.21 \times 10^7/\text{mL}$ , 200 r/min 振荡培养 36 h。该培养条件下 2-苯乙醇的产量达到 3.98 g/L, 比初始条件的 1.9 g/L 提高了 109 %。原料 L-苯丙氨酸的摩尔转化率从最初的 51.4 % 提高到了 92.7 %。这一产量水平已达到或略微超过国外报道的单相分批培养条件下的最高产量 3.8 g/L [3]。如果要进一步提高 2-苯乙醇产量,产物 2-苯乙醇对酵母的抑制

3 讨论

优化结果中  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的最优值为 0,即以 L-

作用是一个主要的限制因素。采用优化的培养条件并结合多次补料分批培养和原位产物抽提技术有望进一步提高 2-苯乙醇产量。

#### 参 考 文 献

- 1 Etschmann M M W, Bluemke W, Sell D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 1~8
- 2 杨 霄, 崔志峰. 酵母生物转化生产 2-苯乙醇的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 140~144
- 3 Stark D, Münch T, Sonnleitner B, et al. Extractive bio-conversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Prog, 2002, 18: 514~523
- 4 Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm[J]. Journal of Molecular Catalysis B, 2004, 29: 187~193
- 5 梅建凤, 闵 航. 生物转化法合成 2-苯乙醇菌种的诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 22~24
- 6 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养条件的优化研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 110~113
- 7 崔志峰, 杨 霄, 汪 琨, 等. 酿酒酵母 CWY132 及其在微生物发酵制备 2-苯乙醇中的应用. 2007, CN 101016517 A.

## Optimization of the Medium and Conditions for the Production of 2-phenylethanol by Yeast

Cui Zhifeng, Shen Qingjia, Yang Xiao, Che Zhibo, Wang Kun

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**ABSTRACT** The medium and fermentation conditions for the production of 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 were studied with the single factor test and uniform design experiments. The optimized culture medium contains: glucose 30.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g, L-phenylalanine 5.8 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, YNB 0.17 g per liter; initial pH 5~6, and  $1.21 \times 10^7$  /mL inoculation. The yeast grown at 28~30℃ and 200 r/min for 36 h. Under this condition, the yield of 2-phenylethanol reached up to 3.98 g/L, increased by 109 % compared with the original 1.9 g/L. The molar conversion rate of L-phenylalanine to 2-phenylethanol rises to 92.7 % from the original 51.4 %.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, 2-phenylethanol, medium optimization, uniform design

(上接第 51 页)

## The Structure Composition Analysis and Elucidation of Anthocyanins in Waxberry

Du Qizhen, Jiang Hua, Xu Yuanjin

(Institute of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

**ABSTRACT** The anthocyanins in waxberry were extracted by the mixture solvent composed of methanol-formic acid (9 : 1, v/v) and pre-purified by cation exchange resin column chromatography. The waxberry was then separated by countercurrent chromatography with a solvent system composed of water-n-butanol-tert butyl methyl ester-acetonitrile-trifluoroacetic acid (5 : 2 : 1.5 : 1 : 0.001, v/v), and purified with  $\text{C}_{18}$  column chromatography to yield cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (I) and delphinidin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (II). The chemical structure was elucidated by ESI-MS,  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ . The composition analysis of anthocyanins in three waxberries showed that cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside was the main anthocyanin monomer, more than 90% of the total anthocyanins.

**Key words** waxberry, anthocyanin, structure elucidation, composition analysis.