

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017601

引用格式:黄筱萍,刘兰,熊大维,等.酵母静息细胞耦合原位分离技术连续转化2-苯乙醇[J].食品与发酵工业,2018,44(10):20-24.

HUANG Xiao-ping, LIU Lan, XIONG Da-wei, et al. Continuous bioconversion of 2-phenylethanol by yeast resting cells coupled with in situ product removal technique[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(10): 20-24.

酵母静息细胞耦合原位分离技术连续转化2-苯乙醇

黄筱萍, 刘兰, 熊大维, 金丹凤, 黄国昌, 顾斌涛, 李鹏

(江西省科学院 微生物研究所, 江西 南昌, 330029)

摘 要 以酵母静息细胞作为酶载体, 大孔吸附树脂为分离介质, 微滤膜分离菌体, 采用原位产物分离技术进行连续转化合成2-苯乙醇(2-phenylethanol, 简称2-PE)。在5 L发酵罐中优化了转化条件, 通过补料和控制产物浓度实现连续转化合成2-苯乙醇。单罐运行144 h, 2-苯乙醇产量达24.06 g/L, 摩尔转化率和平均转化速率分别为79.34%和0.166 g/(L·h)。双罐运行144 h, 2-苯乙醇产量达29.86 g/L, 比单罐产量提高24.1%; 摩尔转化率和平均转化速率分别达81.83%和0.204 6 g/(L·h), 静息细胞重复使用10批次, 2-PE产量和平均转化速率没有明显下降。

关键词 2-苯乙醇; 酵母静息细胞; 连续生物转化; 原位产物分离

2-苯乙醇(2-phenylethanol, 简称2-PE)是一种具有玫瑰气味的芳香醇, 广泛应用于日化、食品和医药领域中。2-PE和乙醇对酵母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^[1-4]。通过原位产物分离(in situ product removal, ISPR)技术从发酵液中萃取和吸附产物2-PE, 维持产物浓度在较低水平, 避免产物抑制, 是提高2-PE产量的一种主要方法^[5-6]。采用有机溶剂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, 有机溶剂黏度大, 产品分离复杂, 在实际生产应用中必然会增加发酵工艺的复杂性和成本^[7-8]。ESCHMANN等在酵母细胞培养过程中用聚丙二醇1200作为萃取剂, 有机相和水相中的2-PE产量分别达到26.5 g/L和0.3 g/L^[9]。在发酵培养基中添加大孔树脂进行产物吸附可有效提高2-PE的产量^[10]。关昂等采用大孔树脂FD0816为吸附介质, 2-PE终浓度达到12.8 g/L^[11], WANG等以FD0816树脂作为萃取剂对*S. cerevisiae* GivR-UV3进行半连续培养, 通过控制葡萄糖流量和更换发酵液中的树脂, 2-PE总产量达32.5 g/L^[12], 在发酵液中加入树脂进行ISPR生物转化, 虽然取得了较高的产量, 但树脂需要灭菌和经常更换, 菌体与树脂

难分离, 且发酵液易污染杂菌, 难以实现真正的连续转化培养。本研究采用酵母静息细胞作为酶的载体, 进行静息细胞生物转化-微滤膜分离菌体-大孔吸附树脂吸附产物的ISPR技术合成转化2-PE, 可有效解决生长细胞转化液组分复杂副产物多、易污染、树脂难分离、操作复杂、以及有机废水排放量大等问题, 大幅提高2-PE的产量^[13]。产物吸附在树脂柱中, 树脂无需分离和灭菌, ISPR运行不需要在无菌条件下进行, 细胞可多批次重复使用, 可进行连续转化合成2-PE, 具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

菌种 *Saccharomyces cerevisiae* H003 由本实验室筛选获得, 现保存于江西省科学院微生物研究所。

1.1.1 主要试剂

L-苯丙氨酸购自河北冀海生物科技有限公司, 纯度99.5%; 2-PE标准品(Sigma公司); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯, HZ-816大孔树脂(上海华震科技有限公司)。

1.1.2 主要设备

2695高效液相色谱仪, 美国Waters公司; HC-C₁₈反相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 美国Agilent公司; 7890B气相色谱仪(FID检测器), 美国Agilent公司; DB-WAX毛细管柱(30 m × 0.53 mm × 1.0 μm), 美国Agilent公司; H2500R-2高速冷冻离心机, 湖南湘仪; 5 L发酵罐, 上海保兴生物技术公司; 平板

第一作者: 硕士, 研究员(本文通讯作者, E-mail: plahxp@163.com)。

基金项目: 江西省重大研发项目(20181ACF60024); 重点研发项目(20161BBE50098); 江西省科学院产学研合作资金项目(2017-YCXF-09)

收稿日期: 2018-05-15, 改回日期: 2018-05-29

式微滤装置, Pellicon2 Mini Cassette 微滤膜(孔径 $0.45\ \mu\text{m}$), 美国 KOCH 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基和细胞培养

斜面培养基(麦芽汁琼脂培养基值 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 值为 $5.8 \sim 6.2$;

从斜面挑取 1~2 环菌苔至 30 mL 种子液中, 于 $28\ ^\circ\text{C}$ 、180 r/min 摇瓶培养 24 h, 接种至 150 mL 种子液中于相同条件进行扩大培养 20 h 后, 接入装有 3 L 种子液的发酵罐中进行增殖培养 20 h, 培养条件 $28\ ^\circ\text{C}$ 、转速 300 r/min 、通气量 0.25 vvm 。

1.2.2 静息细胞制备

细胞培养液于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 $0.1\ \text{mol/L}$ ($\text{pH}\ 5.1$) 的 K_3PO_4 缓冲液洗涤细胞 2 次, 将菌体重悬于缓冲液中, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.3 5 L 罐静息细胞转化条件

用 $0.1\ \text{mol/L}$ ($\text{pH}\ 5.1$) 的 K_3PO_4 缓冲液配制不同浓度的静息细胞液, 加入底物 L -苯丙氨酸 (L -Phe) 和辅助底物乙醇, 于 $28\ ^\circ\text{C}$ 、200~400 r/min 、通气量 0.2~0.5 vvm 进行转化 24 h。

1.2.4 5 L 生物反应器-微滤膜系统-树脂柱产物吸附串联 ISPR 连续转化试验

取一定量的树脂预处理后用 $0.1\ \text{mol/L}$ ($\text{pH}\ 5.1$) 的 K_3PO_4 缓冲液分装两根树脂柱, 连接 5 L 生物反应器-超滤膜系统-树脂柱吸附装置。将 2.5~3.0 L $0.8\ \text{g/L}$ 静息细胞液置于 5 L 生物反应器中, 加入 L -Phe $10\ \text{g/L}$ 和乙醇 $16\ \text{g/L}$, 于优化的条件下进行转化。当转化液中产物浓度高于 $2.8\ \text{g/L}$ 时, 启动超滤膜系统和树脂柱装置进行产物原位分离, 超滤膜浓液返回反应器中, 清液进入树脂柱进行产物吸附, 通过树脂柱的清液再经在线过滤器后泵回反应器中, 当反应器中转化液的 2-PE 浓度低于 $0.5\ \text{g/L}$ 结束料液循环。当转化液中产物浓度再次高于 $2.8\ \text{g/L}$ 时, 再进行新的循环吸附。如此连续转化至转化速率低于 $0.15\ \text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 时, 终止转化。细胞离心分离或微滤膜分离后悬浮于缓冲液中, 用于下一批次的转化。由于静息细胞在转化过程中仍有少量的出芽生殖, 需对细胞浓度进行监控, 当细胞浓度高于 $1.1\ \text{g/L}$ 时, 适量分流一部分细胞至罐外或移至另一反应器中, 同时补入适量的缓冲液和底物进行转化, 如此 2 个反应罐切换操作, 实现连续转化吸附的生产过程。

1.2.5 静息细胞重复利用活性比较

每次转化结束后, 将静息细胞离心或用微滤膜过滤收集菌体细胞, 重新悬浮于缓冲液中, 置 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。待下一批次转化时使用。采用多次使用的细胞与新制备的细胞在相同转化条件下进行 ISPR 的试验, 测定转化速率的变化和催化稳定性。

1.2.6 产物的洗脱和收集

吸附在树脂柱中的 2-PE 用 1.5~2.5 倍树脂柱体积的乙醇洗脱, 洗脱流速为 $3.0 \sim 4.5\ \text{m}^3/[\text{m}^3(\text{柱容})\cdot\text{h}]$, 得至约 2.0 倍树脂柱体积的 2-PE 粗品。

1.2.7 反相高效液相色谱法测定 L -PHE 含量

样品经 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 稀释, 于 HPLC 分析。流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 50\%:50\%$, 流速为 $1.0\ \text{mL/min}$, 检测波长 $260\ \text{nm}$, 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$, 进样量 $10\ \mu\text{L}$ 。

1.2.8 气相色谱法测定 2-PE 和乙醇含量条件^[14]

样品经 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 稀释, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 聚醚有机滤膜过滤。分析条件: 载气 (N_2)、氢气、空气流速分别为 5、30、300 mL/min ; 进样器和检测器温度均为 $250\ ^\circ\text{C}$, 升温程序: $80\ ^\circ\text{C}$ (2 min) \rightarrow 升温速率 ($20\ ^\circ\text{C/min}$) $\rightarrow 220\ ^\circ\text{C}$ (3 min); 进样方式: 分流进样, 分流比: 10:1; 检测器: FID; 进样量: $1\ \mu\text{L}$ 。

2 结果和分析

2.1 细胞浓度对转化合成 2-PE 的影响

利用酵母细胞静息细胞转化合成 2-PE, 细胞作为艾氏途径催化反应酶的载体, 细胞浓度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 $0.1\ \text{mol/L}$ ($\text{pH}\ 5.1$) 的 K_3PO_4 缓冲液配制不同的细胞浓度, 加入 L -Phe $8\ \text{g/L}$ 、乙醇 $16\ \text{g/L}$, 于 $28\ ^\circ\text{C}$ 、200 r/min 、0.3 vvm 条件下转化 24 h, 结果见图 1。

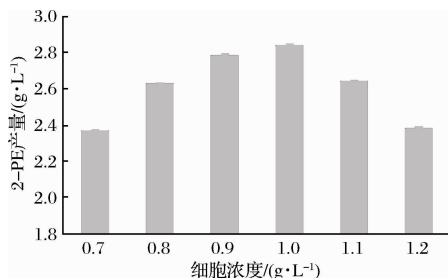


图 1 细胞浓度对转化合成 2-PE 合成的影响

Fig. 1 Effect of cell concentration on 2-PE production by bioconversion

结果表明, 细胞浓度低于 $0.8\ \text{g/L}$ 时, 2-PE 产量

较低,当初始细胞浓度为 1.0 g/L 时,2-PE 产量达到最高,继续提高细胞浓度不能增加 2-PE 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,因此细胞量控制在 0.8 ~ 1.1 g/L 比较合适。

2.2 搅拌速率和通气量对转化合成 2-PE 的影响

在静息细胞的转化过程中需要一定的氧的参与,搅拌速率对底物与产物的传质有一定的影响,分别考察了在不同的通气量和搅拌速率下对产物生成的影响。图 2 为静息细胞浓度为 1.0 g/L, *L*-Phe 8 g/L,乙醇 16.5 g/L,于 28℃、300 r/min、不同通气量条件下转化 24 h 的 2-PE 产量。图 3 为在相同条件下,静通气量为 0.3 vvm,不同搅拌速率转化合成 2-PE 产量。

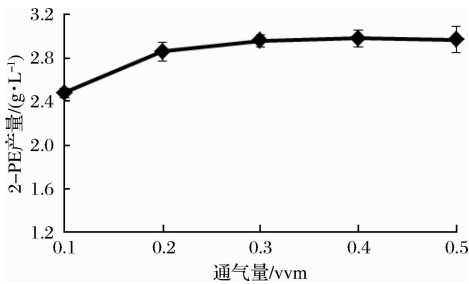


图 2 通气量对 2-PE 产量的影响

Fig. 2 The effect of ventilate volume on 2-PE bioconversion

当通气量达 0.2 vvm,2-PE 产量明显提高,通气量达到 0.3 vvm 时,2-PE 产量达到最高,继续提高通气量,产量没有提高。当搅拌速率为 300 r/min 时产量明显增加,继续增加搅拌速率,产量变化不大,优化

的通气量和搅拌速率为 0.3 vvm 和 300 r/min。

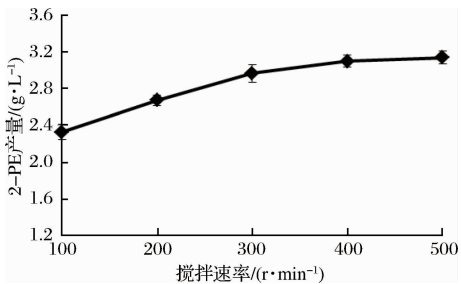


图 3 搅拌速率对 2-PE 产量的影响

Fig. 3 The effect of stir speed on 2-PE bioconversion

2.3 单罐产物原位转移转化试验

在 5 L 反应罐中加入 0.8 g/L 静息细胞悬浮液 3.0 L,加入底物和辅助底物,在优化的转化条件下进行转化反应。用缓冲液装填 2 支树脂柱,每柱装有大孔树脂 550 g,柱体积为 744.5 mL。每 20 ~ 24 h 开启 ISPR 装置进行原位产物分离,定时取样测定底物、辅助底物及产物浓度,根据浓度的变化适当补加底物和辅助底物,使底物和辅助底物浓度分别控制在 3 ~ 10 g/L 和 5 ~ 16 g/L 之间,同时监控细胞浓度,当罐内细胞浓度高于 11 g/L 时,将适当的细胞移出罐外,同时补入适当的缓冲液以控制细胞浓度在 7 ~ 11 g/L 之间。转化结束后离心收集细胞,置 4℃ 冰箱保存。用约 1.5 倍树脂柱体积的纯水置换树脂柱中的转化液,再用约 1.5 ~ 2.0 倍树脂柱体积的乙醇洗脱产物。表 1 为分别连续运行不同时间的底物添加量、产量、摩尔转化率和平均转化速率。

表 1 静息细胞单罐运行 ISPR 转化合成 2-PE 试验结果

Table 1 The result of ISPR continuous bioconversion of 2-PE by resting cell in single bioreactor

时间/ h	底物	结束后转化液				洗脱液		2-PE 总量/g	折算产量/ (g·L ⁻¹)	摩尔转 化率/%	平均转化 速率/ [g·(L·h) ⁻¹]
	<i>L</i> -Phe/ g	2-PE/ (g·L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g	2-PE/ (g·L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g				
74.0	66	0.43	3.25	1.4	16.43	2.35	38.61	40.01	13.34	81.96	0.18
97.3	87	0.31	3.44	1.07	20.77	2.47	51.3	52.37	17.46	81.39	0.179
122.5	105	0.57	3.59	2.05	23.44	2.53	59.3	61.35	20.45	79.00	0.167
145.2	123	0.78	5.27	4.11	23.39	2.91	68.06	72.18	24.06	79.34	0.166

随着转化时间的延长,2-PE 产量亦显著增加,连续运行 145 h 后,2-PE 总产量达 72.18 g,折算产量达 24.06 g/L,摩尔转化率为 79.34%。平均转化速率随着转化时间的延长略有下降,这可能是因为随着转化时间的延长,罐内细胞浓度增加,在 66 h 后细胞浓度可达到 11 g/L 以上,在 ISPR 运行过程中,需将细胞浓液分流一部分体积的细胞至罐外,再另补加相同体积的缓冲液以维持罐内较适的细胞浓度,转化时间越

长,移出罐外的细胞越多,而移出罐外的细胞液中含有较高浓度的 *L*-Phe,这对摩尔转化率和平均转化速率会有一定的影响,为提高 ISPR 的运行稳定性和细胞的利用率,可以采用双罐同时运行的方式进行连续 ISPR 运行。

2.4 双罐产物原位转移转化试验

在单罐运行 ISPR 装置中增加 1 个转化罐,ISPR 运行 68 h 将约 1 L 左右静息细胞浓液转移至第 2 罐

中,在 2 个罐中分别补入适量的缓冲液和底物等在相同的条件下进行转化反应应用,之后每 20 ~ 24 h 转入

少量的细胞至第 2 罐中,至体积达到 3 L 左右结束转化,结果见表 2。

表 2 静息细胞双罐运行 ISPR 转化合成 2-PE 试验结果

Table 2 The result of ISPR continus bioconversion of 2-PE by resting cell in double bioreactors

时间/ h	底物	结束后转化液			洗脱液			2-PE 总量/g	折算产量/ (g · L ⁻¹)	摩尔转 化率/%	平均转化 速率/ [g · (L · h) ⁻¹]
	L-Phe/ g	2-PE/ (g · L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g	2-PE/ (g · L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g				
121.3	114	0.95	6.13	5.82	23.12	2.74	63.35	69.17	23.06	82.04	0.190
144.7	148	0.87	6.56	5.71	21.67	3.87	83.86	89.57	29.86	81.83	0.206

双罐 ISPR 分别运行了 121.3 h 和 144.7 h,在相同时间内产量比单罐有显著提高,产量分别增加 12.75% 和 24.10%,随着转化时间增加,产量有可能得到更大幅度的提高。摩尔转化率和平均转化速率也明显提高,摩尔转化率均达 80% 以上,平均转化率达 0.2 g/(L · h)。

2.5 静息细胞重复利用活性比较

表 3 不同使用批次的静息细胞连续转化 2-PE 结果

Table 3 The result of ISPR bioconversion of 2-PE by different batch resting cell

试验罐*	底物	结束后转化液			洗脱液			2-PE 总量/g	折算产量/ (g · L ⁻¹)	摩尔转 化率/%	平均转化 速率/ [g · (L · h) ⁻¹]
	L-Phe/ g	2-PE/ (g · L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g	2-PE/ (g · L ⁻¹)	体积/ L	2-PE 量/g				
1	70	0.77	3.21	2.47	26.14	1.50	39.21	41.68	16.67	80.51	0.174
2	70	1.06	3.57	3.78	25.02	1.50	37.53	41.31	16.53	79.80	0.172

注: * 试验罐 1 为新制静息细胞液,试验罐 2 为重复使用 10 批次的静息细胞液。

重复利用 10 次的静息细胞液与新制备的静息细胞液在单罐中连续运行 96 h,最终 2-PE 产量分别达 16.67 g/L 和 16.53 g/g,平均转化速率亦未明显下降,这表明静息细胞在进行重复利用,生物活性没有明显下降,在实际生产中可大大降低细胞培养和静息细胞制备的次数。

3 小结

通过在 5 L 发酵罐中转化条件的优化,确定了酵母静息细胞优化的转化条件为:细胞浓度 8 ~ 11 g/L,通气量 0.3 vvm,搅拌速率 300 r/min。在优化的条件下进行 ISPR 连续生物转化 2-PE,单罐分别连续运行 72、96、120、145 h,随着转化时间的增加,2-PE 产量逐渐增加,最高罐产量达 24 g/L,摩尔转化率均在 80% 左右,平均转化速率在 0.165 ~ 0.18 g/(L · h) 之间。双罐运行 144 h,2-PE 在产量达 29.86 g/L,摩尔转化率和平均转化速率上比单罐运行均有所提高,静息细胞重复使用 10 批次,产量和平均转化速率没有明显下降。

取上述试验置冰箱保存的重复使用 10 批次的静息细胞液(浓度 8 g/L)2.5 L,新制备静息细胞液(浓度 8 g/L)2.5 L 分别加入 5 L 罐中进行 ISPR 转化试验,在相同的条件下进行单罐转化 96 h,运行期间细胞未移出罐外,运行 52 h 和 80 h 后,在 2 罐中分别加入缓冲液约 400 mL 和 300 mL,表 3 为 2 罐的细胞转化合成 2-PE 的产量和转化速率。

由于静息细胞生物转化的优势,目前在天然化合物的生物合成、药物前体化合物转化等领域已展开了静息细胞生物转化合成的研究^[15-16],而生物转化合成 2-PE 还主要集中在采用生长细胞培养转化^[10-12]。生长细胞在发酵液中加入树脂进行 ISPR 生物转化合成 2-PE,虽然可获得较高的产量,但树脂需要灭菌,反复的高温灭菌会影响树脂的吸附效率,树脂难以回收;且培养液中含大量糖、酵母粉等有机物,易污染杂菌,有机废水排放量大,导致生长细胞在实际生产过程中进行 ISPR 技术难以实现。采用酵母静息细胞转化合成 2-PE 的优势在于转化液组分非常简单(只含底物、乙醇和少量无机盐)、副产物少、产品易于分离纯化;细胞可以重复利用,不用频繁培养和制备细胞,大大减少了发酵有机废水排放,是一种清洁的生产工艺。尤其是静息细胞可长时间保持生物活性,无需在无菌条件下运行,操作简单,这是实现 ISPR 连续运行的关键,在未来工业上的应用具有明显的优势。

参 考 文 献

[1] 陈先锐,王肇悦,何秀萍. 酵母菌合成 2-苯乙醇的研究

- 进展[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 151–163.
- [2] YIN S, ZHOU H, XIAO X, et al. Improving 2-phenylethanol production via Ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(5): 762–767.
- [3] KIM TY, LEE SW, OH MK. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 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] 李会静, 于炜婷, 戴小敏, 等. 微生物转化生产 2-苯乙醇的原位产物转移技术的研究进展[J]. *化工进展*, 2012, 31(3): 633–638.
- [6] 丁东栋, 崔志峰, 徐翔, 等. 生物转化法合成 2-苯乙醇的研究进展[J]. *工业微生物*, 2017, 47(2): 53–60.
- [7] 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.
- [8] KIM B, CHO BR, HAHM JS. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(1): 115–124.
- [9] 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]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(12): 440–443.
- [10] 荣绍丰, 付艳丽, 王涛, 等. 大孔树脂对发酵液中 2-苯乙醇的吸附研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(5): 693–697.
- [11] 关昂, 王航, 孟春, 等. 原位转移技术用于酵母合成 2-苯乙醇[J]. *过程工程学报*, 2009, 9(1): 128–132.
- [12] WANG HD, GUAN QF, MENG A. et al. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Sacharomycescerevisiae* and process enhancement[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(1): 26–31.
- [13] 黄筱萍, 黄国昌, 金丹凤, 等. 酿酒酵母静息细胞转化合成 2-苯乙醇的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(12): 1316–1323.
- [14] 刘兰, 黄筱萍, 金丹凤, 等. 酵母细胞转化液中乙醇、2-苯乙醇的气相色谱法分析[J]. *江西科学*, 2016, 34(2): 169–172.
- [15] 杨大娇, 任天宝, 王风芹, 等. 静息细胞在发酵工业中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(8): 187–191.
- [16] 王丹, 张强, 李旺, 等. 酵母静息细胞催化丙酮酸乙酯不对称还原制(S)-乳酸乙酯[J]. *催化学报*, 2011, 32(6): 1035–1039.
- [17] RAVASIO D, WENDLAND J, WALTHER A. Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbygossypii* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14: 844.

Continuous bioconversion of 2-phenylethanol by yeast resting cells coupled with in situ product removal technique

HUANG Xiao-ping, LIU Lan, XIONG Da-wei, JIN Dan-feng,
HUANG Guo-chang, GU Bing-tiao, LI Peng

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

ABSTRACT Using the yeast resting cells and macroporous adsorptive resins respectively as enzyme carriers and separation medium, continuous transformation of 2-phenylethanol was carried out with the aid of in situ product removal techniques. Meanwhile, the strains were separated through microfiltration membrane. The transformation conditions were optimized in 5 L fermentor, and continuous bioconversion of 2-phenylethanol was fulfilled by feeding and controlling product concentration. The concentration of 2-phenylethanol was 24.06 g/L after running 144 h in single tank. The molar conversion rate was 79.34 %, and the average space-time yield was 0.166 g/(L · h). After running 144 h in double tanks, the concentration of 2-phenylethanol reached 29.86 g/L, which was higher than single tank production by 24.1 %. The molar conversion rate and the average space-time yield were up to 81.83 % and 0.204 6 g/(L · h), respectively. After repeated use of resting cells for 10 times, the production and average conversion rate of 2-PE did not decrease obviously.

Key words 2-phenylethanol; resting cell; continuous bioconversion; in situ product removal