

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-096

2-苯乙醇生物合成的研究进展

严伟¹, 高豪¹, 蒋羽佳¹, 钱秀娟¹, 周杰^{1,2}, 董维亮^{1,2}, 章文明^{1,2}, 信丰学^{1,2}, 姜岷^{1,2}

(¹ 南京工业大学生物与制药工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816; ² 南京工业大学江苏先进生物与化学制造协同创新中心 (SICAM), 江苏 南京 211816)

摘要: 2-苯乙醇 (2-PE) 是一种具有玫瑰香味的重要香料化合物, 广泛应用于化妆品、香水、食品等行业。传统的2-PE生产主要是从植物原料中提取或化学合成。然而, 这些方法无法满足消费者对天然香料日益增长的需求。以发酵法或酶法生产的L-苯丙氨酸为前体, 利用酵母细胞将其转化为2-PE, 产品既符合环境友好的要求, 又满足“天然”产品的定义, 可以取代从玫瑰或其他植物精油中提取的天然2-PE。因此, 生物法合成2-PE已经引起人们的广泛关注。本文综述了生物法合成2-PE的现状和发展前景, 指出相对于传统的化学合成和天然植物提取, 生物转化比较具有优越性。并对2-PE的合成途径、全局调控机制、提高2-PE产量的策略以及农工废弃物作为原料的利用进行了系统的论述。此外, 本文还讨论了原位产物分离技术在2-PE生物合成中的应用。

关键词: 2-苯乙醇; 生物合成; 全局调控; 代谢工程; 原位萃取

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Research progress in 2-phenylethanol production through biological processes

YAN Wei¹, GAO Hao¹, JIANG Yujia¹, QIAN Xiujuan¹, ZHOU Jie^{1,2}, DONG Weiliang^{1,2},
ZHANG Wenming^{1,2}, XIN Fengxue^{1,2}, JIANG Min^{1,2}

(¹State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China; ²Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China)

Abstract: 2-Phenylethanol (2-PE), an important flavor and fragrance compound with a rose-like smell has been widely used in the cosmetics, perfume, and food industries. Furthermore, it is also an important raw material for the derivatives synthesis for the synthesis of other flavors or pharmaceutical compounds, such as 2-phenylethylacetate (2-PEAc) and phenylacetaldehyde (PA). Conventional production of 2-PE is mainly through the extraction from plant materials, such as hyacinths, jasmine and lilies. However, the extraction process is very complicated and the harvest of

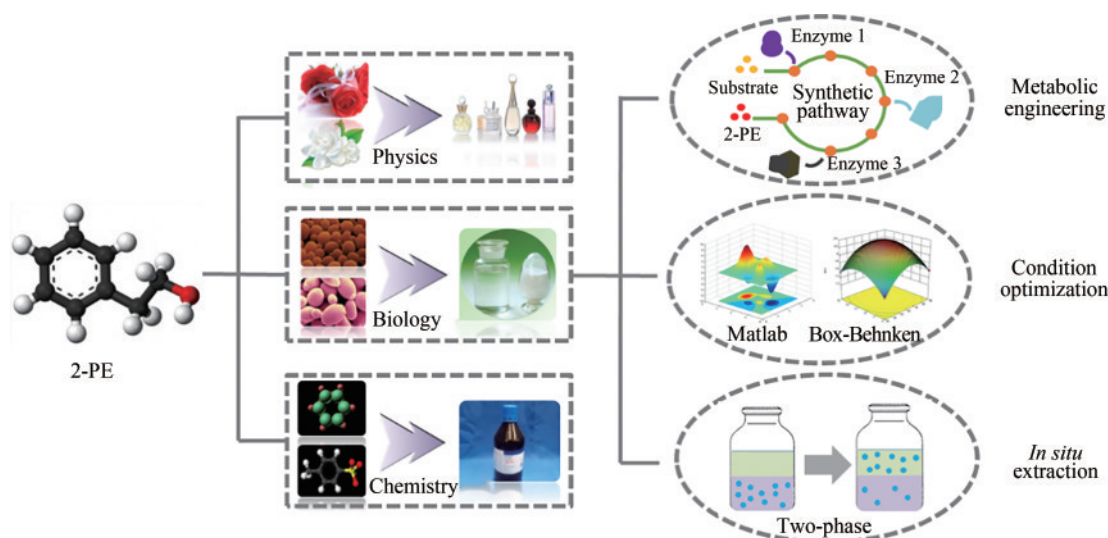
收稿日期: 2020-12-31 修回日期: 2021-03-10

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0902200); 国家自然科学基金 (22178169, 21978130, 22078151, 22008113); 江苏省自然科学基金 (BK20200683)

引用本文: 严伟, 高豪, 蒋羽佳, 钱秀娟, 周杰, 董维亮, 章文明, 信丰学, 姜岷. 2-苯乙醇生物合成的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1030-1045

Citation: YAN Wei, GAO Hao, JIANG Yujia, QIAN Xiujuan, ZHOU Jie, DONG Weiliang, ZHANG Wenming, XIN Fengxue, JIANG Min. Research progress in 2-phenylethanol production through biological processes[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 1030-1045

flowers is greatly influenced by the weather, plant diseases, and trade restrictions, which hinders its further application. On the other hand, 2-PE can also be chemically synthesized through ethylene oxidation of benzene or reduction of styrene oxide. Chemical synthesis processes are generally operated under harsh conditions, such as high temperature, high pressure, and strong acid or alkali environments, producing many undesirable by-products, such as ethylbenzene and styrene. This not only increases the downstream costs, but also seriously debases the grade of 2-PE. The increasing demand for environmental friendly processes and the preference for “natural” products from consumers have considerably stimulated the development of biological production of flavors and fragrances. Biological synthesis of 2-PE has attracted extensive attention because it meets the requirements of environmental friendliness and also satisfies the definition of “natural” products. However, the toxicity of 2-PE to cells is a critical limiting factor for the biosynthesis of 2-PE. In this review, we have comprehensively summarized the current status and perspectives for biological 2-PE production in terms of its advantages over classical chemical synthesis and extraction from natural plants. A comprehensive description of 2-PE synthetic pathways and global regulation mechanisms, strategies to increase 2-PE production, and the utilization of agro-industrial wastes as feedstocks has been systematically discussed. Furthermore, the application of *in situ* product removal techniques in 2-PE biosynthesis has also been highlighted.



Keywords: 2-phenylethanol; biological production; regulatory network; metabolic engineering; ISPR techniques

1 2-苯乙醇概述

2-苯乙醇 (2-PE) 是一种具有玫瑰花香味的脂肪醇，因其具有温和的、淡雅的玫瑰花般的气味，被认为是食品和化妆品工业中的重要香料成分^[1]。此外，它还可被用作合成其他香料或药物化合物的底物，如苯乙酸、苯乙醛和乙酸苯乙酯等^[2-3]。在自然界中，2-PE主要从玫瑰、茉莉花、番茄和荞麦等花卉和植物组织的精油中提取^[4-5]。然而，

由于这些植物中的2-PE浓度非常低，因此萃取过程非常复杂，并且花卉的收获也会受到天气、植物病害和贸易限制等因素的影响。从玫瑰或其他植物的精油中提取天然2-PE的成本非常高，如提取天然2-PE的原料玫瑰精油国际市场的价格就已达3500~6000美元/kg^[6]。所有这些因素都是导致天然2-PE的供应不足和成本过高的主要原因^[7]。

目前，全球市场上2-PE的年产量已经超过10 000 t，其主要生产方法是苯-环氧乙烷合成法和

氧化苯乙烯加氢法, 国际市场上苯-环氧乙烷合成法产品占 40%, 氧化苯乙烯加氢法产品占 60%。苯-环氧乙烷合成法生产的产品所含微量杂质不同, 香气差异较大, 大多不能用于香料, 国内主要采用氧化苯乙烯加氢法^[8]。化学合成过程一般在高温、高压、强酸或强碱环境等恶劣条件下操作, 会产生许多不良副产物, 如乙苯、苯乙烯等, 这不仅增加了下游成本, 而且严重降低了 2-PE 的级别^[9]。对环保工艺日益增长的需求以及消费者对“天然”产品的偏好极大地刺激了香料和香料生物生产工艺的发展^[10]。许多具有 2-PE 生产能力的野生型菌株已经被分离并鉴定, 其中大多数是真核生物, 包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、季也蒙毕赤酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*) 等^[11-19]。然而, 除了叶微杆菌 (*Microbacterium foliorum*)、变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 和嗜冷杆菌 (*Psychrobacter sp.*) 外, 很少有原核生物可以合成 2-PE。生物转化过程通常在温和的条件下进行, 产物选择性高。此外, 根据美国食品和药物管理局以及相关的欧洲法规规定, 如果用于生产过程的底物是天然的, 则生物生产的 2-PE 会被认为是“天然的”^[20]。目前, 利用生物转化法生产 2-PE 已取得重大突破。其中, 合成生物学着力于构建“非自然存在下的生化系统”, 通过利用不同的生物元件, 构建全新的菌株代谢网络, 从而高效合成人类需求的代谢产物。通过使用有效的代谢工程策略可以调节不同酶的基因表达水平, 以找到最佳平衡, 进而改善代谢通量并减少代谢负担或其他副作用, 从而将廉价的葡萄糖或苯丙氨酸转化为高附加值的 2-PE。本文作者全面综述 2-PE 合成的各种途径、调控机制以及提高 2-PE 产量的策略。同时, 讨论了农工废弃物作为 2-PE 生产原料的利用和原位产物分离 (ISPR) 技术的应用。

2 微生物中 2-苯乙醇的生物合成路径

目前, 2-PE 的生物合成主要有 3 种途径 (图 1)。其中, 艾氏途径是最重要的途径, 在氮限

条件下, L-苯丙氨酸 (L-Phe) 通过三步酶催化反应转化为 2-PE。第 2 个途径是莽草酸途径, 它是葡萄糖等碳水化合物为底物从头合成 2-PE。然而, 这种复杂的反应途径具有强烈的反馈抑制作用, 导致 2-PE 生产效率低下。最后一种是苯乙胺途径, 它与艾氏途径类似, 在植物中起着更重要的作用。

2.1 艾氏途径

艾氏途径广泛存在于各种微生物中, 它负责将支链氨基酸 (亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸)、芳香族氨基酸 (苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸) 和含硫氨基酸 (蛋氨酸) 分解代谢成相应的杂酸或高级醇^[21]。该途径最初是由艾氏 (Ehrlich) 描述的, 因此用其名字进行命名^[22]。如图 1 所示, 在该途径中, L-Phe 首先被转氨酶 (ARO8, ARO9, BAT1/TWT1 和 BAT2/TWT2) 氨基化为苯丙酮酸, 然后被苯丙酮酸脱羧酶 (YDR380w/ARO10, YDL080C/THI3, PDC1, PDC5 和 PDC6) 脱羧为苯乙醛, 最后通过醇脱氢酶 (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 和 ADH5) 或甲醛脱氢酶 (SFA1) 还原为 2-PE^[21]。

在艾氏途径中关键酶的表达水平会受到相关转录因子的调控和氮调控策略的调节。其中, Zn₂CyS₆ 家族转录激活因子 ARO80 是 2-PE 合成中最重要的调控因子之一。研究表明, ARO80 可以与 *aro9* 和 *aro10* 的启动子组成性结合, 在芳香族氨基酸的存在下, ARO80 可以激活 *aro9* 与 *aro10* 的表达。在芳香族氨基酸作为唯一氮源条件下, 芳香族氨基酸通过氨基酸通透酶 Gap1 进入细胞, Aro80 接受芳香族氨基酸的诱导信号后与 *aro9* 和 *aro10* 基因启动子上的 CCG 重复序列结合, 激活艾氏途径关键酶基因的表达^[23-24]。除 ARO80 以外, 与碳代谢有关的锌簇蛋白 CAT8 同样是艾氏途径中一个重要的激活因子, 它在调节受芳香醇影响的基因 (如 *Adh2*) 的差异表达中起着重要作用^[25-27]。同时, CAT8 的表达还会受到具有两个 Cys₂His₂ 锌指结构的转录因子 MIG1 的调控, CAT8 的过表达或 MIG1 的缺失可以有效增加 *aro9* 和 *aro10* 的转录, 从而使更多的苯丙氨酸转化为苯乙醛^[28]。

此外, 艾氏途径中关键酶的表达水平也会受

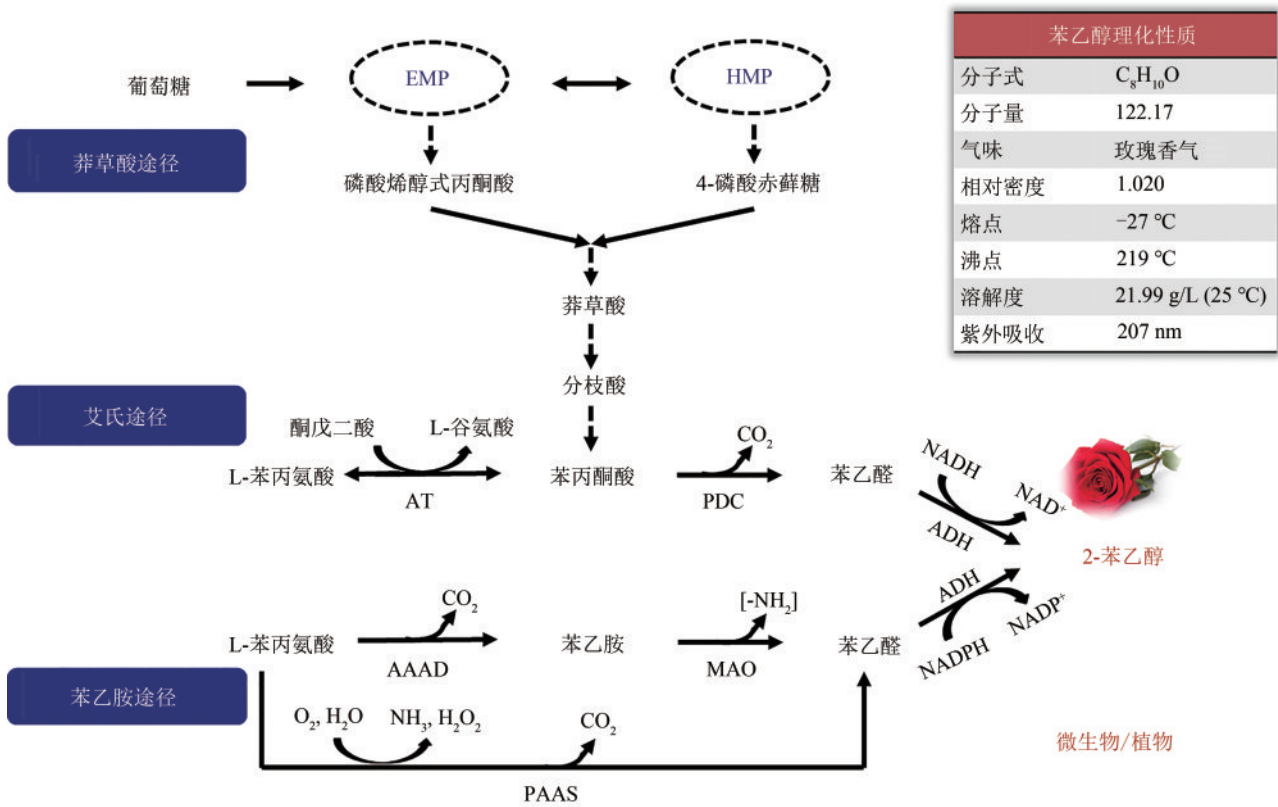


图1 2-苯乙醇的生物合成途径

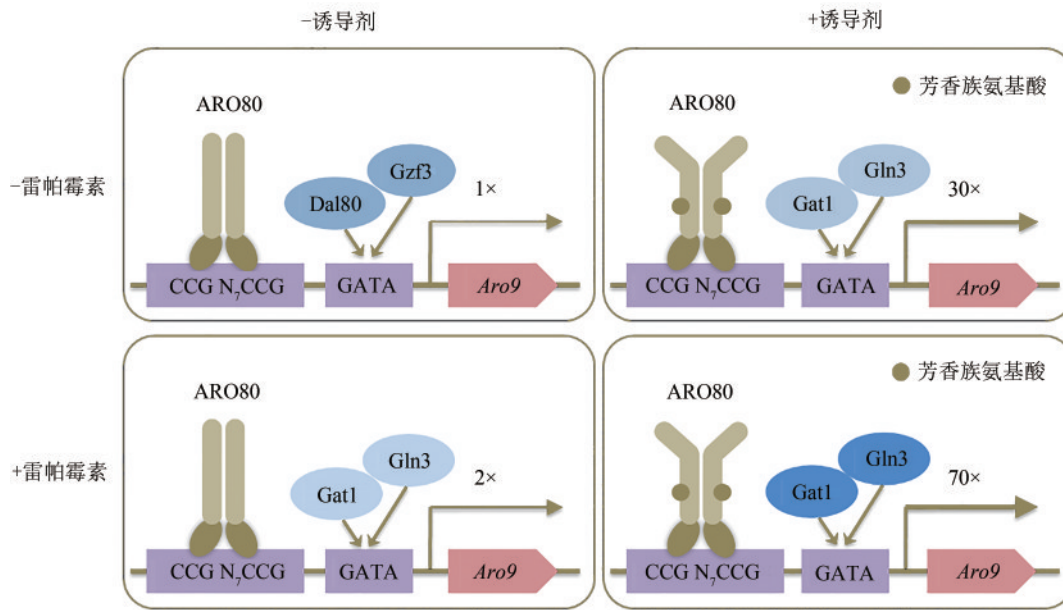
EMP—糖酵解途径；HMP—磷酸戊糖途径；AT—转氨酶；PDC—苯丙酮酸脱羧酶；ADH—醇脱氢酶；AAAD—芳香族氨基酸脱羧酶；MAO—单胺氧化酶；PAAS—苯乙醛合酶

Fig. 1 2-PE synthetic pathways

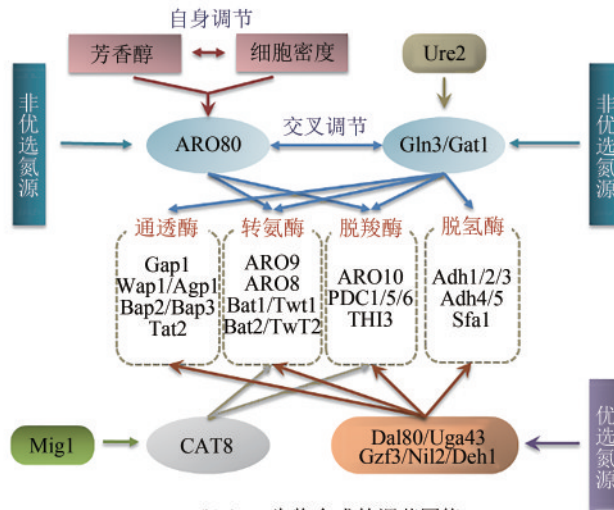
EMP—glycolytic pathway; HMP—pentose phosphate pathway; AT—transaminase; PDC—phenylpyruvate decarboxylases; ADH—alcohol dehydrogenases; AAAD—aromatic amino acid decarboxylase; MAO—monoamine oxidase; PAAS—phenylacetaldehyde synthase

到氮源种类的影响。当培养基中存在优选氮源（铵或天冬酰胺）时，氮分解代谢物阻抑（NCR）的全局氮调控会严重限制酵母使用非优选氮源（亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和脯氨酸）的能力^[29]。从分子生物学的角度来看，目前已经鉴定出4个可以影响NCR敏感基因的转录和翻译水平的GATA因子，其中包括两个激活因子（Gln3和Gat1/Nil1）以及两个阻遏因子（Dal80/Uga43和Gzf3/Nil2/Deh1）^[30]。当优选氮源存在时，Gln3和Gat1被隔离在细胞质中，无法参与靶基因的转录调控。当无优选氮源存在时，Gln3和Gat1就会转移到细胞核中，从而激活NCR敏感基因的表达[图2(a)]。另外，Gln3还会受到pr病毒样URE2蛋白的负调控，携带失活URE2的细胞即使在优选氮源存在时也能够利用非优选氮源^[31]。此外，雷帕霉素也可以影响到氮调控，经过雷帕霉素处理

可以模拟氮饥饿环境，从而导致Gln3和Gat1的核定位和NCR敏感基因的激活。研究表明，影响艾氏途径中关键酶表达水平的转录调控系统和NCR调节呈现复杂的互补调节和部分自身调节，ARO80是ARO80靶启动子招募GATA因子所必需的，而GATA因子也可通过氨基酸通透性的转录调控间接影响ARO80的活性^[30]，两者之间相互协作共同调控艾氏途径中关键酶的表达。此外，芳香醇的合成还会受到细胞密度的正反馈调节^[32]。一般来说，由于芳香醇是群体感应分子，可以使酵母在氮饥饿的情况下转变为丝状体，因此高密度的细胞每个细胞可以产生更多的芳香醇。转录组分析显示，在高细胞密度时^[32]，*aro9*和*aro10*的转录水平显著增强。图2(b)显示了通过艾氏途径合成2-PE的总体调控图，但其调控机制尚不清楚。



(a) ARO80和GATA激活因子对芳香氨基酸和雷帕霉素的转录调控模型
(a) Model for transcriptional regulation of *Aro9* by ARO80 and GATA activators in response to aromatic amino acids and rapamycin



(b) 2-PE生物合成的调节网络
(b) The general regulatory network for 2-PE synthesis

图2 苯乙醇生物合成的代谢网络调控

(Gap1/Wap1/Agp1/Bap2/Bap3/Tat2—氨基酸通透酶; ARO9/ARO8/Bat1/Twt1/Bat2/Twt2—转氨酶; ARO10/PDC1/PDC5/PDC6/THI3—苯丙酮酸脱羧酶; Adh1/2/3/4/5—醇脱氢酶; Sfa1—醛脱氢酶)

Fig. 2 Regulatory network of 2-PE synthesis

(Gap1/Wap1/Agp1/Bap2/Bap3/Tat2—amino acid permease; ARO9/ARO8/Bat1/Twt1/Bat2/Twt2—transaminase; ARO10/PDC1/PDC5/PDC6/THI3—phenylpyruvate decarboxylases; Adh1/2/3/4/5—alcohol dehydrogenases; Sfa1—formaldehyde dehydrogenase)

2.2 莽草酸/苯丙酮酸途径

莽草酸/苯丙酮酸途径是酵母等微生物中从头合成2-PE的途径。该途径将碳水化合物代谢与芳香族化合物合成联系起来，其中包括3种芳香族氨基酸（苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸）和其他芳香

族次级代谢物。首先葡萄糖经过糖酵解途径和磷酸戊糖途径被转化为磷酸烯醇式丙酮酸和4-磷酸赤藓糖，这两种物质再经过4步酶促反应转化为莽草酸，接着莽草酸经过代谢转化为苯丙酮酸。苯丙酮酸随后如艾氏途径^[33]所述（图1）通过脱羧和脱氢被转化为2-PE。米曲霉、马克思克鲁维醇

母和酿酒酵母等均表现出具有利用葡萄糖合成2-PE的能力,但是由于其生物合成途径复杂,代谢支路多且存在多种反馈抑制因子,2-PE的产量很低。在最佳生长条件下,芳香族氨基酸的胞内浓度足以使苯丙氨酸和酪氨酸敏感的同工酶基本上失活^[34]。因此,寻找能够增加L-Phe或苯丙酮酸池的优质菌株是提高利用莽草酸途径合成2-PE效率的关键。

2.3 苯乙胺途径

苯乙胺途径是与艾氏途径相类似的途径,该途径首先是在酿酒酵母和米曲霉中得到研究^[15, 33]。在该途径中,L-Phe首先被脱羧成苯乙胺,然后被氧化脱氨成苯乙酸,最后被还原成2-PE(图1)。苯乙胺途径在诸如番茄等植物中起着非常重要的作用^[35]。并且,在矮牵牛花和玫瑰花瓣中已经发现了该途径的替代方法,其中L-Phe可以通过苯乙醛合酶(PAAS)一步转化为L-苯乙醛。所有这些天然途径的研究与发现为构建基因工程菌株提供了有效酶的良好来源。

3 提高生物合成2-苯乙醇产量的策略

培养基成分和培养条件对2-苯乙醇的合成影响很大。为提高2-苯乙醇生产的经济性,研究人员对菌种诱变选育、基因编辑、培养基组成优化、发酵条件优化等常规策略进行了广泛研究,并取得了很大进展。

3.1 底盘菌株的筛选与构建

2-苯乙醇可由许多微生物进行合成。然而,由于其产量仍然太低,现在并不适合于工业化生产。但是对于艾氏途径和莽草酸途径的研究为利用基因编辑等技术提高2-PE的产量提供了广阔的前景。例如:通过过量表达ARO8和ARO10,*S. cerevisiae* S288在培养60 h后可以合成2.61 g/L 2-PE,比原始菌株高出36.8%^[36]。为了加快L-Phe在酿酒酵母中的转运速度,Chen等^[37]通过过量表达MT2和*S. cerevisiae* YS58来源的Gap1基因来提高芳香族氨

基酸转运体的表达水平,2-PE产量分别增加了26.5%和25.3%。此外,ARO80、GLN3、GAT1和CAT8等全局调控因子的引入,使2-PE产量分别显著增加58%、34.7%、30.6%和62%^[7, 28, 37]。最近,在最佳发酵条件下,一个由L-Phe转运体Gap1、转氨酶ARO8、苯丙酮酸脱羧酶ARO10、醇脱氢酶ADH2和谷氨酸脱氢酶GDH2组装而成的人工构建菌株*S. cerevisiae* YS58(G1-A8-A10-A2)-GDH在5 L发酵罐中的2-PE合成产量达到6.3 g/L(转化率为95%),显示出2-PE产业化的良好前景^[38]。

除艾氏途径外,利用莽草酸途径从头合成2-PE同样具有重要意义。Aoki和Uchida^[15]获得了一株经过化学诱变处理的突变株*Z. rouxii* NISL3355,使2-PE产量提高了约38倍。类似地, Kim等^[39]获得了一株马克思克鲁维酵母的抗苯丙氨酸类似物(对氟苯丙氨酸)抗性突变体,该突变体在不添加L-Phe的情况下从20 g/L葡萄糖中可以产生1.3 g/L 2-PE。相比于传统的诱变选育等方法,通过基因工程改造对于2-PE的合成则更加有效。最近,Daran等^[40]在酿酒酵母中过量表达ARO4、ARO7、3ABP、TKL1、ARO10、PYK1^{D146N}、EcaroL、ARO3^{K222L},并敲除*aro3*和*aro8*,最终使得2-PE的产量达到1.59 g/L。类似地,Xu等^[41]通过过量表达*ylPAR4*、*ylARO10*、*ylARO7*、*ylPHA2*、*scARO7*^{G141S},并敲除*ylPYK*,使得*Y. lipolytica* YL35以葡萄糖为底物可以合成2.42 g/L 2-PE,为目前利用莽草酸途径合成2-PE的最高产量。

虽然酵母具有天然的2-PE合成途径,但发酵过程通常很长(2~4 d),这增加了设备成本和能源消耗,进一步限制了工业化的可扩展性。因此,除了酵母以外,大肠杆菌也取得了重大突破^[42]。由于艾氏途径不完整,野生的大肠杆菌无法合成2-PE,通过引入玫瑰来源的PAAS基因,经过发酵48 h该克隆菌株可以产0.34 g/L 2-PE。Guo等在大肠杆菌MG1655中共表达*aro8*、*KDC*和*yigB*使2-PE的产量增加到0.28 g/L^[43]。同样的,Atsumi等^[44]通过在大肠杆菌BW25113中共表达*kivD*和*ADH2*也获得了类似的结果,2-PE产量最终可以达到0.88 g/L。在艾氏途径中,提高还原力NAD(P)H是合成2-PE的一个重要因素。在全细胞转化系统中,

Hwang等^[45]将来源于枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶引入大肠杆菌,通过氧化葡萄糖来促进NAD(P)H的再生,从而使2-PE的产量提高了3倍。在另一项研究中,将来源于枯草芽孢杆菌的谷氨酸脱氢酶在大肠杆菌BW25113(31G)中过表达,以加速还原力的再生,最终工程菌株的2-PE产量提高了250%。为了改善辅因子与还原力不足的问题,Wang等^[46]开发了一种辅因子自给自足的系统,将谷氨酸脱氢酶与转氨酶和乙醇脱氢酶偶联,可同时再生共底物(2-酮酸)和氧化还原力[NAD(P)H],最终使生物催化效率提高了3.8倍。和酵母一样,大肠杆菌同样拥有莽草酸途径,通过引入一条从L-Phe到2-PE的路线,可以使其利用葡萄糖从头合成2-PE。Guo等^[47]通过过量表达 $aroG^{obr}$ 、 $pheA^{obr}$ 、 kdc 、 $yjgB$ 和 $aro8$ 等基因,最终获得可以利用葡萄糖合成1016 mg/L 2-PE的工程菌株DG02。Koma等^[48]在大肠杆菌中进一步引入了T7启动子来增强*Azospirillum brasilense*来源的苯丙酮酸脱羧酶基因($ipdC$)和*Lactobacillus brevis*来源的乙醇脱氢酶基因($adhC$)的表达,同时敲除内源的苯乙醛脱氢酶基因($feaB$)。该工程菌株最终利用葡萄糖合成7.7 mmol/L(0.94 g/L) 2-PE。Kang等^[49]优化了莽草酸途径中4种关键酶 $aroF^{obr}$ 、 $pheA^{obr}$ 、 kdc 和 $adh1$ 的协同表达,重组大肠杆菌可以利用葡萄糖合成285 mg/L 2-PE。

生物转化在2-PE生产中显示出广阔的前景。然而,和其他醇类物质一样,高浓度的2-PE对微生物细胞有一定的毒性,当发酵液中的2-PE浓度达到一定程度时,就会抑制微生物的生长,而且2-PE和乙醇联合作用产生的毒性比它们各自产生的毒性作用累加要高。2-PE的抑菌作用机理很复杂,但通常认为主要是由其物化特性引起,而不是对特定受体的抑制。抑制作用的主要部位可能是原生质膜,影响糖类和氨基酸运输系统,此外,由于膜的通透性增加,加速了离子和小分子代谢产物跨膜向胞外扩散,扰乱了跨膜质子电势。因此,该特性导致的生产力受限仍然是一个显著的瓶颈,这促使研究人员去寻求性能更优的菌株^[50]。商业上用于从葡萄糖生产甘油的菌株*Candida glycerinogenes* WL2002-5表现出4 g/L的高2-PE耐受性。利用该菌株通过分批发酵可以产生5 g/L

2-PE,是目前使用野生型菌株合成2-PE的最高产量^[51]。另外,2-PE的生产已经实现了与随机突变相结合的巨大进展。例如,经过紫外线辐射处理后,*S. cerevisiae* CWY13210的突变菌株与原始菌株相比,2-PE耐受性和产量分别提高了50%和9.1%^[52]。同样,通过紫外线照射获得的*S. cerevisiae* BD-25-39突变体可以合成5.4 g/L 2-PE,比原始菌株提高10.2%^[53]。值得注意的是,由于2-PE具有亲脂性,仍然难以完全消除其所引起的毒性。因此,仍然需要更有效的诱变和筛选方法。此外,引入一些耐受性因子,例如与膜相关的热休克蛋白HSP12,可以保护脂质体膜的完整性,避免其受到不利环境的影响^[54]。

3.2 培养基成分的优化

在工业发酵过程中,发酵培养基的成分对于代谢产物的效价和产率至关重要。如上所述,氮源的利用遵循特定的顺序^[55]。因此,L-Phe总是作为唯一氮源来激活艾氏途径。但是,少量的有机氮源,如酵母提取物则有利于细胞生长而不抑制艾氏途径^[53, 56]。有趣的是,Barbosa等^[57]发现,通过添加少量无机氮源,如磷酸二铵(DAP),可显著减少乙醇和乙酸的形成,并增加2-PE的产量。这可能是由于氮源的加入促进了NADH的再生,但其机制仍有待进一步阐明。碳源的主要功能是维持菌株生长并提供必要的辅因子,如2-酮酸和NADH^[58]。一般情况下,随着碳源的增加,2-PE的产量也会增加,但这种提高是有限的^[58]。此外,不同的碳源可以改变L-Phe的消耗百分比、2-PE和2-苯乙基衍生物的摩尔产率^[59]。通过与果糖、蔗糖、麦芽糖和糖蜜进行比较,发现葡萄糖是*S. cerevisiae* CWY132合成2-PE的最适碳源^[56]。但是为了降低成本,廉价的碳源(如粗甘油和其他工业废料)则具有更好的价值。此外,维生素和矿物质对生产2-PE也有很大影响。例如,与初始条件相比,*K. marxianus* CBS 600在发酵条件优化后需要的维生素剂量是初始条件的80倍,这表明在生物转化条件下优化后的代谢压力更大^[11]。在恶劣条件下, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 都可以通过增加膜稳定性来保护细胞^[60]。当 $MgSO_4$ 添加量增加到0.4 g/L时,

2-PE产量提高了1.65倍。当 KH_2PO_4 增加到6 g/L时, 2-PE的产量也出现了类似的增加^[56, 61]。

3.3 发酵过程参数优化

一般来说, 香料的合成过程对培养温度非常敏感。高温可以增强一些与酒精产生有关的酶的表达, 如BAT1/2^[62]。然而, 超过最佳温度范围, 醇类的生成量将显著降低。以酿酒酵母为例, 当培养温度从30 °C增加到40 °C时, 2-PE产量下降到1/3~1/23^[16]。在20~35 °C的培养温度下, L-Phe的消耗量在80.5%~90.1%之间变化; 当温度升高到40 °C时, L-Phe的消耗量显著降低21.9%^[14]。除了温度之外, pH也会通过影响酶活性从而影响芳香物质的产量和成分^[63]。艾氏途径中的关键酶如ARO8和ARO9是碱性上调的, 而ARO10则是相反的碱性下调^[64]; 因此, 需要采用折中的pH来平衡整个艾氏途径。此外, pH也会改变基质的离子状态, 影响吸附剂对2-PE的吸附容量^[65]。在以氨基酸为唯一氮源且葡萄糖受限的有氧条件下, 氨基酸主要转化为杂酸^[66]。然而, 在厌氧条件下, 氨基酸几乎完全转化为杂醇^[67]。杂酸(和杂醇)的分布与培养条件密切相关。基于此, Tian等^[68]在发酵培养基中加入了一些抗坏血酸以提高系统的还原水平, 抑制副产物的产生。在这一改良系统中生产的2-PE与标准2-PE样品表现出最接近的香气相似性^[68]。

除培养条件外, 发酵方式对2-PE产量也有影响。据文献记载, 2-PE的合成过程与细胞生长密切相关^[69], 当葡萄糖浓度超过一定水平时, 在有氧条件下会产生大量乙醇。乙醇的积累对2-PE的

产生有很大的协同抑制作用^[50]。为了防止发酵过程中产生比1 g/L高的乙醇, Rong等^[70]利用活性干酵母生产2-PE。在该体系中, 酵母降解乙醇以提供还原力NADH, 最终可以利用8 g/L的L-Phe合成7.6 g/L的2-PE。

3.4 统计实验设计

鉴于培养基组成和培养条件对2-PE生产的影响, 需要进行更合理的优化研究。近年来, 统计实验设计如单因素优化、遗传算法、Box-Behnken中心组合设计、响应面法等已被广泛使用(表1)。Etschmann等^[11]利用遗传算法优化了13种培养基成分和培养温度, 最终, 利用*K. marxianus* CBS 600将2-PE的产量提高了87%。Mei等^[61]采用单因素、正交设计、Box-Behnken中心组合设计和响应面法对培养基成分进行优化, 利用*S. cerevisiae* BD将2-PE的产量由1.19 g/L提高到4.18 g/L。统计方法的采用不仅减少了工作量, 而且评估了多个参数之间的相互作用, 特别是在利用复杂的农产工业废物方面。例如, 当Plackett-Burman设计、steepest ascent设计和Box-Behnken设计结合起来优化可发酵培养物的培养基成分、酸碱度和发酵时间时, 2-PE产量提高了3.3倍^[71]。

4 利用农业和工业废料生物合成2-苯乙醇

农业和工业废物被认为是复杂碳水化合物、蛋白质、脂类和各种营养物质的储存库^[72]。将这些废物生物转化为增值产品, 如2-PE, 不仅可以

表1 基于统计设计的2-PE发酵工艺优化

Tab. 1 Statistics-based optimized fermentation processes for 2-PE production

菌株	方法	条件优化	2-PE产量/(g/L)	发酵体积	参考文献
产甘油假单胞菌 WL2002-5	单因素设计	培养基成分、温度	5.0	3 L	[51]
马克思克鲁维酵母 CBS600	遗传算法	培养基成分、温度	5.6	50 mL	[11]
酿酒酵母 CWY132	单因素设计	培养基成分、接种量	3.52	2 L	[56]
酿酒酵母	单因素、正交设计、Box-Behnken 中心复合设计和响应面方法	培养基成分	4.82	30 mL	[61]
马克思克鲁维酵母	中心复合材料设计与响应面方法	L-苯丙氨酸浓度、pH、温度	0.47	50 mL	[71]
酿酒酵母	Plackett-Burman 设计, steepest ascent 设计与 Box-Behnken 设计	培养基成分、pH、发酵时间	1.55	50 mL	[72]

防止废物处置造成的环境污染，还可以增加经济价值。例如，葡萄含有复杂的成分，包括糖、有机酸、酚类化合物、蛋白质、维生素等，当使用它作为碳源并供应 5 g/L L-Phe 时，利用 *K. marxianus* CBS 6556 可以合成 0.77 g/L 2-PE^[73]。糖蜜是一种众所周知的工业废料，富含混合糖和微量元素。当使用甜菜糖蜜作为碳源并添加 7 g/L L-Phe 时，利用 *K. marxianus* CBS 600 可以合成 0.89 g/L 2-PE^[74]。在使用 *K. marxianus* ATCC 10022 进行固态发酵时，以 L-Phe 及干燥的固体甘蔗渣为原料可合成 2-PE 10.2 mg/g^[75]。当在甘蔗糖蜜废水中添加 6 g/L L-Phe 时，使用微生物混合培养物可获得 0.99 g/L 2-PE^[63]。另外，季也蒙毕赤酵母、发酵单胞菌和酿酒酵母等都可以利用乳清培养基通过分批发酵的方式合成 1.17~3.28 g/L 2-PE^[76]。烟草废料是一种众所周知的可再生资源，因为它含有丰富的芳香族化合物，是合成香料的潜在前体。在不添加任何 L-Phe 的情况下使用酿酒酵母可以从 39.28 g/L 烟草废料和 10 g/L 葡萄糖中产生 1.55 g/L 2-PE^[71]。此外，木薯废水、番茄、辣椒渣等也都含有丰富的碳水化合物和营养物质，为 2-PE 的生产提供了可替代的底物^[77-79]。然而，应该指出的是，由于这些农用工业废物中成分复杂且未知，2-PE 的产量仍然很低且不稳定。

5 2-苯乙醇原位产物分离技术

香料生产的瓶颈之一是由于其疏水特性会使得脂质膜结构成为优先结合的目标，导致跨膜梯度的崩溃，从而丧失细胞活力^[80]。不同的微生物对于香料的细胞毒性表现出不同的耐受水平。例如，2.0 g/L 外源 2-PE 可以完全抑制马克思克鲁维酵母的生长^[81]；而酿酒酵母则可以耐受高达 4 g/L 的 2-PE^[17]。为了减轻细胞毒性增加 2-PE 的产量，有机溶剂萃取、疏水吸附、有机渗透汽化、环糊精 (CDs) 络合和超临界 CO₂ 萃取等 ISPR 技术已被广泛用于去除发酵液中的 2-PE。表 2 列举了已发表文献中关于原位产物分离 (ISPR) 技术在 2-PE 生产中的应用。

5.1 液-液萃取

液-液萃取法 (LLE) 采用有机溶剂从有机相中连续提取疏水产品，因其简单、廉价、易扩展等特点而被广泛应用于香精生产。例如，当使用油酸作为萃取剂时，使用酿酒酵母可以获得 12.6 g/L 2-PE，与没有使用提取技术相比，2-PE 的含量增加了 8.6 g/L^[69]。用油醇作为萃取剂，使 *K. marxianus* CBS 600 的 2-PE 产量提高了 3 倍^[74]。此外，聚丙二醇 1500 和 1200 (PPG 1500 和 PPG 1200) 等高分子萃取剂在 2-PE 分离中同样表现出良好的萃取性能。在以 PPG 1500 为萃取剂的补料分批发酵中，萃取剂中的 2-PE 浓度超过 22 g/L，总浓度达到 7.5 g/L^[82]。当以 PPG 1200 为萃取剂时，有机相中 2-PE 含量为 26.5 g/L，2-PE Ac 含量为 6.1 g/L，2-PE 总质量浓度达到 10.5 g/L。

在液-液萃取中，发酵液被泵入抽提装置以连续回收 2-PE [图 3(a)]。2-PE 生产可以得到显著改善，但仍存在一些缺陷。首先，有机溶剂会对细胞活力和代谢活性造成严重的毒性。因此，理想的萃取剂应具有良好的生物相容性和较高的分配系数。其次，乳状液的形成将影响液体和溶剂相的分离^[83]。最后，也是最重要的一点，液-液分离系统中使用的有机溶剂，特别是高碳含量的有机溶剂，很难蒸发从而去除 2-PE，残留的溶剂会严重影响 2-PE 的质量^[81]。因此，寻找合适的有机溶剂是液-液分离操作的关键。考虑到 2-PE 的脂溶性，使用一些脂肪酸/油脂作为萃取剂可作为一种 2-PE 回收的方法。菜籽油首先被证实可以将 2-PE 的整体浓度提高 2.7 倍^[84]。此外，疏水中空纤维膜可以被用来阻挡催化介质中的有机溶剂，从而避免乳状液的形成^[85]。但需要注意的是，该膜易受污染。

近年来，不相容离子液体 (ILS) 因其可忽略的蒸气压、不可燃性和高热稳定性而成为绿色非有机溶剂受到越来越多的关注^[86]。通过对 9 种离子液体的生物相容性、分配系数 (K_d) 和萃取效率的综合考察，发现 3 种基于 [NTf₂]⁻ 的离子液体具有很大的提高 2-PE 产量的潜力。使用基于 [NTf₂]⁻ 的 ILS^[87]，观察到 2-PE 的总产量增加了 3.5 倍。此外，[NTf₂]⁻、[TCM]⁻ 和 [TCB]⁻ 基离子液体可以有效地从水相中回收 2-PE^[88-89]。

表2 用于2-PE生产的不同的原位产物分离 (ISPR) 技术

Tab. 2 Different *in situ* product removal (ISPR) techniques for 2-PE production

技术	优势	劣势	材料	2-PE产量	参考文献
超临界CO ₂ 萃取	高效萃取力	剧毒,需要先去 除细胞	超临界二氧化碳	可以提取90%以上的2-PE	[100]
液-液萃取	低成本,简单,高 效,易扩展	有毒性,形成乳 状液难以蒸发和 去除	聚丙二醇 1500	共 7.5 g/L, 有机相 22 g/L	[82]
			聚丙二醇 1200	共 10.2 g/L, 有机相 26.5 g/L	[101]
			油酸	共 12.6 g/L, 有机相 24 g/L	[69]
			油醇	共 3.0 g/L	[74]
			菜籽油	共 9.79 g/L, 有机相 18.5 g/L	[84]
			OMA[Tf2N], BMIM [Tf2N]和 MPPyr[Tf2N]	对照组 1 g/L, OMA[Tf2N] 3 g/L, BMIM[Tf2N] 5 g/L, MPPyr[Tf2N] 3 g/L	[87]
液-固萃取	无乳状液,简单, 高效	额外工作量,高 成本,不易放大	将癸二酸二丁酯固定 在聚乙烯聚合物基质中	共 12.8 g/L, 有机相 20.5 g/L	[83]
			将癸二酸二丁酯包埋 于海藻酸盐基水凝胶中	共 5.6 g/L, 有机相 47.2 g/L	[102]
疏水吸附	特异性强,操作 简单,可放大,无 毒,低成本,可再生	吸附容量低,缺 乏吸附材料	大孔树脂	水相中 2.7 g/L, 每克水合树脂 含 84 mg 2-PE	[93]
			非极性大孔树脂 D101	水相中 3.15 g/L, 每克树脂 D101 含 45.3 mg 2-PE	[65]
			树脂 HZ818	水相为 1.6 g/L, 共 6.6 g/L	[92]
			Hytrel®8206	水相 1.4 g/L, 聚合物相 97 g/L, 162 mg/g 2-PE	[81]
			聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)微球	水相为 1.65 g/L, 聚合物相为 5.4 g/L	[103]
			颗粒活性炭	每克吸附剂 182.06 mg 2-PE	[104]
有机渗透汽化	特异性强	分离能力低,成 本高	聚辛基甲基硅氧烷 (POMS)膜	5.23 g/L	[60]

5.2 液-固萃取

为了进一步提高萃取效率, 研究了一种液-固萃取系统 (LSE)。在这个系统中, 有机溶剂被包裹到聚合物基质中, 这不仅解决了微生物毒性和乳状液的问题, 而且还简化了下游的加工过程 [图3(b)]。将癸二酸二丁酯包埋在聚乙烯的聚合物基质中后, 不仅没有形成乳状液, 2-PE的产率还提高了1倍^[83]。通过将癸二酸二丁酯嵌入到海藻酸盐微胶囊中, 设计了一条将LSE体系与膜工艺相结合的新工艺。在该体系中, 不会形成乳状液, 使用 *S. cerevisiae* GIV2009, 最终2-PE浓度提高到5.6 g/L, 比使用单相时提高了1.8 g/L^[90]。虽然LSE的性能优于LLE, 但溶剂固定化会增加成本, 使生产过程复杂化。

5.3 疏水吸附

原位产物吸附 (ISPA) 是一种常见的 ISPR 技

术, 它使用树脂或其他吸附介质来避免底物或产物的抑制 [图3(c)]。ISPA 因其操作相对简单、易放大、对有毒物质不敏感、易于再生和成本低而被广泛应用于生物技术过程^[91]。为了回收2-PE, 人们研究了各种树脂。非极性大孔树脂 D101 对2-PE的吸附能力较强, 对L-Phe的吸附能力较低。在添加2 g/L水合树脂 D101的条件下, *S. cerevisiae* BD可获得6.17 g/L 2-PE产量^[65]。当使用7% (干重) 的交联聚苯乙烯树脂 HZ818时, 用 *S. cerevisiae* P-3 从12 g/L L-Phe中得到6.6 g/L 2-PE, 摩尔产率为0.744, 比对照^[92]提高了66.2%。当大孔树脂 FD 0816作为连续生物转化系统的吸附剂时, 摩尔产率最高, 为0.90^[93]。然而, 树脂对2-PE的吸附容量很低, 而且吸附过程受发酵液的影响很大^[94]。该文对几种聚合物吸附剂进行了测试, 以确定具有较高选择性的吸附剂。例如: 将 Hytrel®8206应用于固-液两相分离生物反应器系统,

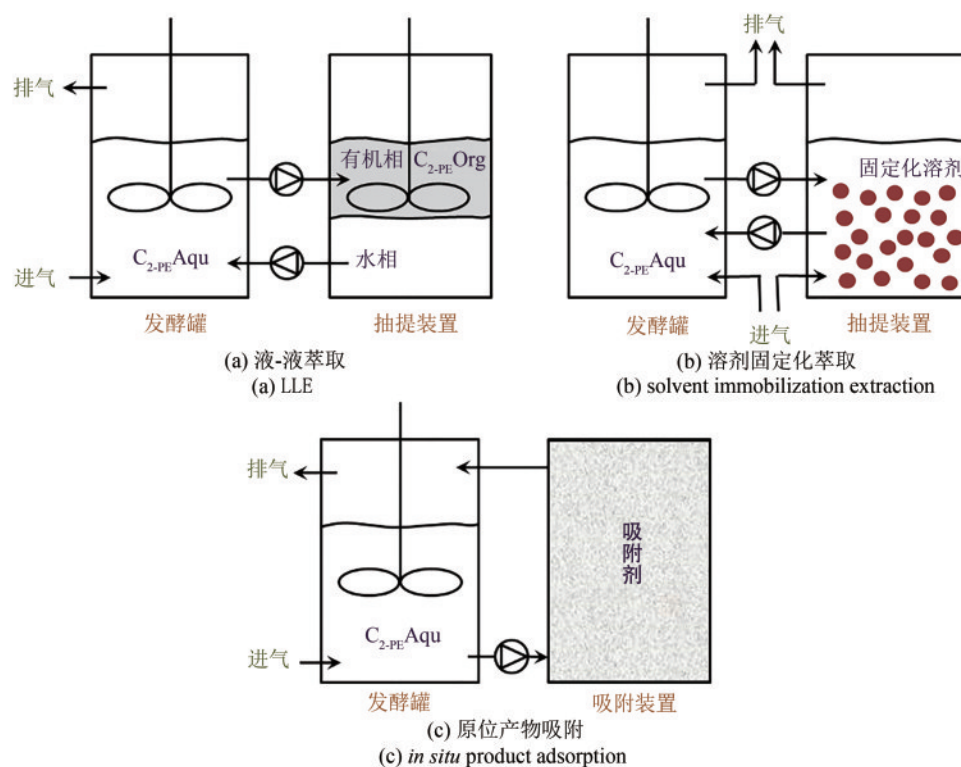


图3 应用于2-PE生产中的ISPR技术

Fig. 3 ISPR techniques for 2-PE production

在3 L的发酵体积内可获得13.7 g/L 2-PE。当采用半连续反应器结构时，2-PE的最高浓度为20.4 g/L，水相为1.4 g/L，聚合物相为97 g/L^[81]。

5.4 其他分离技术

5.4.1 有机渗透汽化

渗透汽化是一种膜分离过程，在膜分离过程中，一层致密的无孔膜将液体溶液从气相中分离出来。在装有聚辛基甲基硅氧烷（POMS）膜的有机渗透汽化装置中，分批培养获得了2.2 g/L和1.3 g/L的双倍2-PE浓度^[60]。然而，这些膜很容易被污染，仍然需要探索更合适的膜材料^[95]。

5.4.2 与环糊精(CDs)络合

CDs是具有疏水内部和亲水外部的超分子主体化合物。众所周知，CDs及其衍生物与许多有机化合物形成包合物。在最佳条件下， β -CD对2-PE的萃取率为1 mol/mol^[96]。

5.4.3 超临界CO₂萃取

超临界流体（SCFs）具有高吸附能力、高扩散系数和低黏度等特点，被广泛应用于从土壤、

水和沉淀物中提取有机污染物^[97]。无毒和不可燃的二氧化碳（CO₂）是目前工业中使用的最流行和最便宜的超临界流体材料^[98]。特别是超临界CO₂在玫瑰混凝土挥发油的提取过程中表现出优异的性能^[99]。然而，直接利用超临界CO₂萃取是不可能的，因为CO₂对细胞活力有很大的影响。因此，在提取^[93]之前进行细胞分离是必要的。

6 小结与展望

由于植物提取的局限性和化学合成工艺的缺陷，生物合成2-PE受到越来越多的关注。虽然在机理认识和提高2-PE效价方面取得了很大突破^[105]，但在经济上仍不具备工业化的可行性。为了将实验室研究成果转化为工业过程，底盘菌种开发、生物过程优化和ISPR技术设计之间的深度集成综合开发是必要的。

在自然界中，许多真菌可以自主合成2-PE，但产量仍然很低。代谢工程对于改善2-PE的生产至关重要，它可以减轻反馈抑制，增强前体转运，

提高关键酶活性, 并干扰副产物的形成。通过对 2-PE 合成途径的改造或引入耐受因子, 选择耐受性好、产 2-PE 能力强的菌株可能是获得较好的 2-PE 生产候选菌株的唯一途径。此外, 目前对 2-PE 合成的调控机制还没有进行深入研究。更好地理解艾氏途径/莽草酸途径涉及的生物化学, 特别是酶及其代谢调节, 是指导进一步遗传修饰的基础。

培养基组成和培养条件对 2-PE 的生产有很大影响。从经济的角度来看, 高增值产品的生产率和产品质量远比实际产量重要。然而, 培养基成分的改变无疑会增加生物催化法合成 2-PE 的生产成本, 不利于该技术的工业化应用。因此, 进一步研究利用农业或工业副产品为主要原料, 如制糖工业的副产品糖蜜, 可以节约生产成本, 有利于该工艺的工业化应用。目前报道的不利用原位产物分离技术的 2-PE 最高生产率只有 $0.12 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ [53], 为了更好地实现 2-PE 商业化生产, 更多的研究应该集中在 2-PE 的生产率上。

ISPR 技术已广泛应用于 2-PE 生产中, 尤其是 LLE 和 ISPA。然而, LLE 系统中残留有机溶剂的去除困难限制了其应用。与 LLE 相比, ISPA 具有更大的工业放大潜力。在实际生产中, ISPR 技术必定会增加生产过程的复杂性和成本, 因此, 仍需进一步研究开发更多的高容量吸附材料运用于完整细胞的原位产物分离技术, 如合成聚合物。随着生物技术和跨学科快速发展, 采用更先进的发酵方式, 如将不同的生物材料应用到微生物发酵过程中, 设计使用可以同时合成并分离 2-PE 的新型反应器等, 同时结合 ISPR 技术, 使用优质菌株, 将进一步提高 2-PE 的生产效率。此外, 对“天然”香料日益增长的需求将使得利用生物法合成 2-PE 的商业前景更加广阔。

参 考 文 献

- [1] SCOGNAMIGLIO J, JONES L, LETIZIA C S, et al. Fragrance material review on phenylethyl alcohol[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50:S224-S239.
- [2] BIAECKA F E, KRZYCZKOWSKA J, STOLARZEWICZ I, et al. Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass[J]. Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic, 2012, 74:241-245.
- [3] ÇELİK D, BAYRAKTAR E. Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 17:5-13.
- [4] AUBERT C, BAUMANN S, ARGUEL H. Optimization of the analysis of flavor volatile compounds by liquid-liquid microextraction (LLME). Application to the aroma analysis of melons, peaches, grapes, strawberries, and tomatoes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(23):8881-8895.
- [5] HORBOWICZ M, WICZKOWSKI W, SAWICKI T, et al. Methyl jasmonate stimulates biosynthesis of 2-phenylethylamine, phenylacetic acid and 2-phenylethanol in seedlings of common buckwheat[J]. Acta Biochimica Polonica, 2015, 62(2): 235-240.
- [6] KOVACHEVA N, RUSANOV K, ATANASSOV I. Industrial cultivation of oil bearing rose and rose oil production in Bulgaria during 21st century, directions and challenges[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2010, 24(2): 1793-1798.
- [7] KIM B, CHO B-R, HAHN J-S, et al. Biotechnology, bioengineering, metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 111:115-124.
- [8] ME J F. Production of β -phenylethanol by bioconversion[J]. Microbiology, 2005, 32:114-118.
- [9] KIRM I, MEDINA F, SUEIRAS J E, et al. Hydrogenation of styrene oxide in the presence of supported platinum catalysts to produce 2-phenylethanol[J]. Journal of Molecular Catalysis. A, Chemical, 2007, 261(1):98-103.
- [10] CARROLL A L, DESAI S H, ATSUMI S. Microbial production of scent and flavor compounds[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 37: 8-15.
- [11] ETSCHMANN M M W, SELL D, SCHRADER J, et al. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2004, 29:187-193.
- [12] CELIŃSKA E, KUBIAK P, BIAŁAS W, et al. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(3/4): 389-392.
- [13] MASUO S, OSADA L, ZHOU S M, et al. *Aspergillus oryzae* pathways that convert phenylalanine into the flavor volatile 2-phenylethanol[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 77: 22-30.
- [14] HUANG C-J, LEE S-L, CHOU C-C, et al. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions[J]. Food Research International, 2001, 34:277-282.
- [15] AOKI T. Enhanced formation of 2-phenylethanol in *Zygosaccharomyces*

- romyces rouxii* due to prephenate dehydrogenase deficiency[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54:273-274.
- [16] ESHKOL 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, 2010, 106:534-542.
- [17] CHREPTOWICZ K, WIELECHOWSKA M, RYBAK E, et al. Production of natural 2-phenylethanol: from biotransformation to purified product[J]. Food & Bioproducts Processing, 2016, 100:275-281.
- [18] YAN W, ZHANG X Y, QIAN X J, et al. Comprehensive investigations of 2-phenylethanol production by high 2-phenylethanol tolerating *Meyerozyma* sp. strain YLG18[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020,140:109629.
- [19] YAN W, GAO H, QIAN X J, et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*[J]. Biotechnology Advances, 2021, 46:107674.
- [20] SERRA S, FUGANTI C, BRENNER E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(4): 193-198.
- [21] DICKINSON J R. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278:8028-8034.
- [22] EHRLICH F. Über die bedingungen der fuselölbildung und über ihren zusammenhang mit dem eiweißaufbau der Hefe [J]. European Journal of Inorganic Chemistry, 1907, 40:1027-1047.
- [23] IRAQUI I, VISSERS S, André Bruno, et al. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Cell Biology, 1999, 19:3360-3371.
- [24] LEE K, HAHN J S. Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Microbiology, 2013, 88(6):1120-1134.
- [25] WUSTER A, BABU M M. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast[J]. Molecular BioSystems, 2010, 6(1):134-141.
- [26] SCHÜLLER H J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Genetics, 2003, 43(3):139-160.
- [27] WALTHER K, SCHÜLLER H J. Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene *ADH2* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 147:2037-2044.
- [28] WANG Z Y, BAI X J, GUO X N, et al. Regulation of crucial enzymes and transcription factors on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(1):129-139.
- [29] RAI R, TATE J J, GEORIS I, et al. Constitutive and nitrogen catabolite repression-sensitive production of Gat1 isoforms[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(5): 2918-2933. [PubMed]
- [30] LJUNGDAHL P O, DAIGNAN-FORNIER B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2012, 190(3): 885-929.
- [31] SALMON J M, BARRE P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(10):3831-3837.
- [32] CHEN H, FINK G R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols[J]. Genes & Development, 2006, 20(9): 1150-1161.
- [33] SHEN L, NISHIMURA Y, MATSUDA F, et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(1):34-39.
- [34] HERRMANN K M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism[J]. Plant Physiology, 1995, 107(1): 7-12.
- [35] TIEMAN D, TAYLOR M, SCHAUER N, et al. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(21): 8287-8292.
- [36] 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.
- [37] CHEN X, WANG Z, GUO X, et al. Regulation of general amino acid permeases Gap1p, GATA transcription factors Gln3p and Gat1p on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 242: 83-91.
- [38] WANG Z, JIANG M, GUO X, et al. Reconstruction of metabolic module with improved promoter strength increases the productivity of 2-phenylethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1):60.
- [39] KIM T Y, LEE S W, OH M K. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2014, 61/62: 44-47.
- [40] HASSING E J, DE GROOT P A, MARQUENIE V R, et al. Connecting central carbon and aromatic amino acid metabolisms to improve *de novo* 2-phenylethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 165-180.
- [41] GU Y, MA J B, ZHU Y L, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for *de novo* synthesis of five aromatic-derived

- natural products and chemicals[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 2096-2106.
- [42] WANG Y Q, ZHANG H, LU X Y, et al. Advances in 2-phenylethanol production from engineered microorganisms[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(3):403-409.
- [43] GUO D, ZHANG L, PAN H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine[J]. Microbiology, 2017, 6 (4): 1-5.
- [44] ATSUMI S, HANAI T, LIAO J C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels[J]. Nature, 2008, 451(7174): 86-89.
- [45] HWANG J Y, PARK J, SEO J H, et al. Simultaneous synthesis of 2-phenylethanol and L-homophenylalanine using aromatic transaminase with yeast Ehrlich pathway[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5):1323 - 1329.
- [46] WANG P C, YANG X W, LIN B X, et al. Cofactor self-sufficient whole-cell biocatalysts for the production of 2-phenylethanol[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44:143-149.
- [47] GUO D Y, ZHANG L H, KONG S J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate from glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(23):5886-5891.
- [48] KOMA D, YAMANAKA H, MORIYOSHI K, et al. Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(17):6203-6216.
- [49] KANG Z, ZHANG C, DU G, et al. Biotechnology, metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethanol from renewable glucose[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172:2012-2021.
- [50] WANG H, DONG Q, GUAN A, et al. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(1): 26-31.
- [51] LU X Y, WANG Y Q, ZONG H, et al. Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5[J]. Bioengineered, 2016, 7(6): 418-423.
- [52] 崔志峰,车智博,杨霄,等. 2-苯乙醇耐受性高产酵母菌株的选育[J]. 浙江工业大学学报, 2008, 36:427-431.
- CUI Z F, CHE Z B, YANG X, et al. Screening of the *Saccharomyces cerevisiae* strain for resistance and higher production of 2-phenylethanol[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2008, 36:427-431.
- [53] MEI J F. Breeding of yeast strain for production of 2-phenylethanol by biotransformation[J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33:22-24.
- [54] WELKER S, RUDOLPH B, FRENZEL E, et al. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function[J]. Molecular Cell, 2010, 39:507-520.
- [55] ETSCHMANN M, BLUEMKE W, SELL D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 1-8.
- [56] CUI Z F, YANG X, SHEN Q J, et al. Optimisation of biotransformation conditions for production of 2-phenylethanol by a *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 mutant[J]. Natural Product Research, 2011, 25(7): 754-759.
- [57] BARBOSA C, FALCO V, MENDES-FAIA A, et al. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2009, 108:99-104.
- [58] GETHINS L, GUNESER O, DEMIRKOL A, et al. Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Yeast, 2015, 32(1): 67-76.
- [59] CHUNG H, LEE S L, CHOU C C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90:142-148.
- [60] ETSCHMANN M M W, SCHRADER J. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 92:624-634.
- [61] MEI J F, LU Z. Biocatalytic synthesis of 2-phenylethanol by yeast cells[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2007, 28:993-998.
- [62] SAERENS S M G, VERBELEN P J, VANBENEDEN N, et al. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 80(6): 1039-1051.
- [63] MU L, LIU X. Production of 2-phenylethanol by microbial mixed cultures allows resource recovery of cane molasses wastewater[J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2014, 23: 1356-1366.
- [64] GHOSH S, KEBAARA B W, ATKIN A L, et al. Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23):7211-7218.
- [65] MEI J, HANG M. Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using an *in situ* product adsorption technique[J]. Process Biochemistry, 2009, 44:886-890.
- [66] BOER V M, TAI S L, VURALHAN Z, et al. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and non-preferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures[J]. FEMS Yeast Research, 2007, 7(4): 604-620.[LinkOut]
- [67] VURALHAN Z, MORAIS M A, TAI S L, et al. Identification

- and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8):4534-4541.
- [68] TIAN X, YE R, WANG J W, et al. Effects of aroma quality on the biotransformation of natural 2-phenylethanol produced using ascorbic acid[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18:286-290.
- [69] STARK D, MUNCH T, SONNLEITNER B, et al. Bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Progress, 2002, 18:514-523.
- [70] RONG S F, DING B M, ZHANG X L, et al. Enhanced biotransformation of 2-phenylethanol with ethanol oxidation in a solid-liquid two-phase system by active dry yeast[J]. Current Microbiology, 2011, 63(5): 503-509.
- [71] GARAVAGLIA J, FLÔRES S H, PIZZOLATO T M, et al. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(9): 1273-1279.
- [72] WANG Q, SONG Y F, JIN Y R, et al. Biosynthesis of 2-phenylethanol using tobacco waste as feedstock[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2013, 31(6): 292-298.
- [73] SARKAR N, GHOSH S K, BANNERJEE S, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview[J]. Renewable Energy, 2012, 37:19-27.
- [74] ETSCHMANN M M W, SELL D, SCHRADER J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(7): 531-536.
- [75] MARTÍNEZ O, SÁNCHEZ A, FONT X, et al. Bioproduction of 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* through the solid-state fermentation of sugarcane bagasse[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2018, 102(11): 4703-4716.
- [76] CHREPTOWICZ K, STERNICKA M K, KOWALSKA P D, et al. Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(2): 153-160.
- [77] OLIVEIRA, GOMES S D, SENE L, et al. Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2013, 11: 158-164.
- [78] GÜNEŞER O, DEMIRKOL A, KARAGÜL YÜCEER Y, et al. Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*[J]. Bio-process & Biosystems Engineering, 2015, 38(6): 1143-1155.
- [79] OLIVEIRA S M M, GOMES S D, SENE L, et al. Production of natural aroma by yeast in wastewater of cassava starch industry[J]. Engenharia Agrícola, 2015, 35:721-732.
- [80] SIKKEMA J, DE BONT J A, POOLMAN B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(2): 201-222.
- [81] GAO F, DAUGULIS A J. Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2009, 104(2): 332-339.
- [82] HUA D L, LIANG X H, CHE C C, et al. Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using polypropylene glycol 1500[J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25:5951-5955.
- [83] SERP D, STOCKAR U V, MARISON J B. Bioengineering, Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 82: 103-110.
- [84] CHREPTOWICZ K, MIERZEJEWSKA J. Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil[J]. New Biotechnology, 2018, 42: 56-61.
- [85] MIHAL M, MARKOS J. Investigation of 2-phenylethanol production in fed-batch hybrid bioreactor: membrane extraction and microfiltration[J]. Purification Technology, 2012, 95: 126-135.
- [86] QUIJANO G, COUVERT A, AMRANE A. Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology[J]. Biore-source Technology, 2010, 101(23): 8923-8930.
- [87] SENDOVSKI M, NIR N, FISHMAN A. Bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic ionic liquid aqueous system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(4): 2260-2265.
- [88] KROLIKOWSKI M, PACHLA J, RAMJUGERNATH D, et al. Extraction of 2-phenylethanol (PEA) from aqueous phases using tetracyanoborate-based ionic liquids[J]. Journal of Molecular Liquids, 2016, 224:1124-1130.
- [89] OKUNIEESKA P, DOMANSKA U, WICKOWSKI M, et al. Recovery of 2-phenylethanol from aqueous solutions of biosynthesis using ionic liquids[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 188:530-538.
- [90] STARK D, ZALA D, MUNCH T, et al. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32:212-223.
- [91] SOTO M L, MOURE A, DOMINGUEZ H, et al. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 105: 1-27.
- [92] HUA D L, LIN S, LI Y F, et al. Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via *in situ* product adsorption[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2010, 28(4): 259-266.

- [93] WANG H, DONG Q, MENG C, et al. A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2011, 48(4/5): 404-407.
- [94] FABRE, FLAVORIST. Extraction of 2-phenylethyl alcohol: by techniques such as adsorption, inclusion, supercritical CO₂, liquid-liquid and membrane separations[J]. *Perfumer & Flavorist*, 1996, 21:27-40.
- [95] LIPNIZKI F, HAUSMANN S, TEN P K, et al. Organophilic pervaporation: prospects and performance[J]. *Chemical Engineering Journal*, 1999, 73:113-129.
- [96] JI H B, LONG Q P, CHEN H Y, et al. β -Cyclodextrin inclusive interaction driven separation of organic compounds[J]. *AICHE Journal*, 2010, 57:2341-2352.
- [97] HERRERO M, MENDIOLA J A, CIFUENTES A, et al. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(16): 2495-2511.
- [98] TANIGUCHI M, TSUJI T, SHIBATA M, et al. Extraction of oils from wheat germ with supercritical carbon dioxide[J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1985, 49:2367-2372.
- [99] REVERCHON E, PORTA G D, GORGOGNONE D J F. Supercritical CO₂ extraction of volatile oil from rose concrete[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 1997, 12:37-41.
- [100] FABRE C E, CONDORET J S, MARTY A J B. Bioengineering, extractive fermentation of aroma with supercritical CO₂[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2015, 64:392-400.
- [101] 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(4): 440-443.
- [102] 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]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(4): 376-385.
- [103] ACHMON Y, GOLDSHTEIN J, MARGEL S, et al. Hydropho-

bic microspheres for *in situ* removal of 2-phenylethanol from yeast fermentation[J]. *Journal of Microencapsulation*, 2011, 28(7): 628-638.

- [104] CARPINE D, DAGOSTIN J L A, SILVA V R D, et al. Adsorption of volatile aroma compound 2-phenylethanol from synthetic solution onto granular activated carbon in batch and continuous modes[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 117:370-377.
- [105] HUA D, XU P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 654-660.



通讯作者: 信丰学(1982—),男,博士,教授。研究方向为生物化工与生物能源。

E-mail: xinfengxue@njtech.edu.cn



通讯作者: 姜岷(1972—),男,博士,教授。研究方向为生物转化与生物催化。

E-mail: jiangmin@njtech.edu.cn



第一作者: 严伟(1993—),男,博士。研究方向为代谢工程及合成生物学。

E-mail: 15051801815@163.com