

## 2,3-丁二醇发酵液的双水相萃取

张江红, 江波, 李志刚, 孙丽慧, 孙亚琴, 戴建英, 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

**摘要:** 研究了从发酵液中双水相萃取 2,3-丁二醇的工艺条件, 以目标产物的分配系数和回收率为指标, 分别考察了不同双水相萃取体系以及相组成对 2,3-丁二醇分配的影响, 确定了适合于 2,3-丁二醇发酵液萃取的最佳相组成. 结果表明, 适合 2,3-丁二醇双水相萃取的体系为乙醇/硫酸铵体系, 对于絮凝后的发酵液, 采用硫酸铵浓度为 20%( $\omega$ )、乙醇浓度为 27%( $\omega$ )的双水相体系, 发酵液中 2,3-丁二醇的分配系数和回收率最高, 分别达到了 7.4 和 90.18%. 该工艺操作简单, 能够有效地分离发酵液中的 2,3-丁二醇.

**关键词:** 2,3-丁二醇; 双水相萃取; 乙醇/硫酸铵

**中图分类号:** Q815

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-606X(2008)05-0897-04

### 1 前言

2,3-丁二醇(2,3-双羟基丁烷, 2,3-Butanediol)是一种重要的化工原料和液体燃料, 被广泛应用于化工、食品、医药、燃料及航空航天等多个领域<sup>[1,2]</sup>. 其生产方法主要是生物转化法, 即以可再生资源为原料, 通过微生物代谢将单糖转化为目标产物<sup>[3,4]</sup>; 乙偶姻(3-羟基-2-丁酮, Acetoin)为 2,3-丁二醇前体物质, 在生物法制备 2,3-丁二醇的过程中, 乙偶姻也随之伴生, 乙偶姻是一种应用广泛、令人喜爱的食用香料, 是国际上常用的香料品种.

从最初 Haren 等<sup>[5]</sup>研究生物转化法生产 2,3-丁二醇至今已近百年的历史, 目前国内外 2,3-丁二醇的发酵技术已趋于成熟, 最高产物浓度可达 113 g/L(2,3-丁二醇与乙偶姻之和)<sup>[6]</sup>, 但制约其大规模工业生产的瓶颈一直是 2,3-丁二醇的分离问题. 发酵液首先要经过预处理除去其中的菌体和可溶性蛋白, 传统的分离方法是离心和膜过滤, 但前者存在成本高、能耗大, 后者存在膜污染严重、清洗困难等问题, 本实验室前期通过絮凝技术处理发酵液取得了良好的效果, 发酵液菌体和蛋白质去除率分别可达 98% 和 71.4%. 发酵液经过预处理后, 需要通过进一步的分离对产品进行纯化. 比较常用的方法有减压蒸馏或精馏、过蒸发、膜蒸馏和真空膜蒸馏, 但它们普遍存在的问题是能耗大、成本高、膜污染严重等.

溶剂萃取是 2,3-丁二醇提纯的有效方法<sup>[7]</sup>. Tsao 等<sup>[8]</sup>用二乙醚作溶剂萃取 2,3-丁二醇、乙偶姻、乙醇, 发现使用二乙醚可回收发酵液中 75% 的 2,3-丁二醇. 普通亲水性有机溶剂在一定量无机盐存在下可形成双水相体系, 这种新型双水相萃取技术与其他分离方法相比具有操作简单、条件温和、选择性高、收率高、能耗较小、

能实现快速分离、易于进行连续化操作等一系列优点而受到重视<sup>[9]</sup>, 其应用报道很多, 如利用乙醇/硫酸铵双水相体系萃取钼<sup>[10]</sup>, 分离测定铜、铬<sup>[11,12]</sup>、白藜芦醇<sup>[13]</sup>等, 利用双水相乙醇/磷酸氢二钾体系萃取甘草酸盐<sup>[14]</sup>. 董军芳等<sup>[15]</sup>用浊度法初步研究了这类体系的相平衡问题, 但是此方法直接用于发酵液中 2,3-丁二醇的分离还未见报道.

本工作以 2,3-丁二醇的分配系数和回收率为评价指标, 从 4 种新型双水相体系中选一种最佳体系, 并确定了其萃取 2,3-丁二醇的最佳相组成, 为此方法用于 2,3-丁二醇的工业化生产提供了一定的理论基础.

### 2 实验

#### 2.1 实验材料与仪器

**实验试剂:** 有机溶剂为无水乙醇、异丙醇、异丁醇; 盐为硫酸铵、磷酸氢二钾, 均为分析纯以上级别; 壳聚糖分子量 40 kDa; 发酵培养基见参考文献[16]. 实验过程中使用的其他化学试剂均为分析纯以上级别.

**主要仪器:** 5 L 自控发酵罐(BIOTECH-5BG), 漩涡混合器(XH-C, 江苏省金坛市医疗仪器厂), 葡萄糖分析仪(SBA-50B, 山东省科学院), 气相色谱仪(GC-14B, 日本岛津公司).

#### 2.2 实验方法

##### 2.2.1 发酵液的获取

发酵液以 *Klebsiella pneumoniae* CICC 10011 为菌种, 葡萄糖为底物发酵所得. 种子培养条件: 接菌量 2%( $\phi$ ), 温度 37 °C, 转速 200 r/min, 培养时间 24 h. 发酵培养条件: 在 5 L 自控发酵罐(BIOTECH-5BG)中装液量 2 L, 接种量 5%( $\phi$ ), 葡萄糖初始浓度 135 g/L, 温度

37℃, 搅拌转速 300 r/min, 通入空气维持微氧条件, 通气量 200 mL/min. 用 5 mol/L NaOH 溶液控制 pH 值 6.0. 采用批式流加的培养方式, 当葡萄糖浓度低于 30 g/L, 加入固体葡萄糖 100 g. 当发酵进行到后期(菌体浓度维持恒定, 底物消耗缓慢, 产物浓度基本不再增加), 停止发酵实验, 加入絮凝剂壳聚糖和助凝剂海藻酸钠絮凝处理, 壳聚糖用量 0.375 g/L, 海藻酸钠助凝剂用量 0.250 g/L, 发酵液 pH 5.0, 搅拌时间 30 min, 静置 1 h, 絮凝后上清液中 2,3-丁二醇浓度为 54 g/L, 乙偶姻浓度为 5 g/L, 葡萄糖浓度为 33 g/L.

### 2.2.2 双水相萃取

#### (1) 不同双水相体系的比较

采用的体系分别为乙醇/硫酸铵体系、乙醇/磷酸氢二钾体系、异丙醇/磷酸氢二钾体系、异丁醇/磷酸氢二钾体系.

双水相体系按质量配制. 系统总量为 10 g, 置于 10 mL 具塞比色管中. 加入一定质量的带菌发酵液, 再加入一定量盐, 溶解后加入一定质量的有机溶剂. 振荡 1 min, 静置 8 h, 待分相完全后, 分别取样分析上、下相中 2,3-丁二醇的浓度, 计算其分配系数(上、下相浓度之比).

#### (2) 乙醇/硫酸铵体系萃取发酵液中 2,3-丁二醇的条件优化

双水相体系采用乙醇/硫酸铵体系. 双水相体系的配制方法同上, 但加入的是絮凝上清液. 分别改变乙醇和硫酸铵的质量浓度, 考察它们对 2,3-丁二醇、乙偶姻和葡萄糖分配系数和回收率的影响, 其中回收率为上相中产物质量与体系中产物总质量之比.

### 2.2.3 分析方法

葡萄糖的测定用 SBA-50 型葡萄糖分析仪, 进样量 25  $\mu$ L.

2,3-丁二醇、乙偶姻浓度的测定采用气相色谱. 玻璃管填充柱, 色谱柱( $\phi$ 5 mm $\times$ 2 m)填料为 Chromosorb 101, 检测器为 FID, 柱温 190℃, 汽化室与检测器的温度均为 200℃, 载气为 N<sub>2</sub>, 流速 40 mL/min, 进样量 1  $\mu$ L, 采用外标法定量.

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同双水相体系对 2,3-丁二醇萃取的影响

实验所用盐浓度依次为 10%, 12.5%, 15%( $\omega$ ); 对应的乙醇加入量分别为 26%, 25%, 24%( $\omega$ ); 采用的体系分别为乙醇/硫酸铵体系、乙醇/磷酸氢二钾体系、异丙醇/磷酸氢二钾体系、异丁醇/磷酸氢二钾体系. 实验表明, 异丁醇/磷酸氢二钾体系加入异丁醇后, 体系变混浊, 部

分盐析出, 不能分相, 其他体系的分相情况如图 1 所示. 从图可以看出, 不同体系的萃取能力不同, 异丙醇/磷酸氢二钾体系较好, 即使在较低的盐浓度下, 体系的分相效果也较其他体系好; 而乙醇/硫酸铵体系只有在盐浓度达到 15%( $\omega$ )时, 才能与异丙醇/磷酸氢二钾体系达到同样的分离效果(2,3-丁二醇的分配系数  $K$  均达到 5.8).

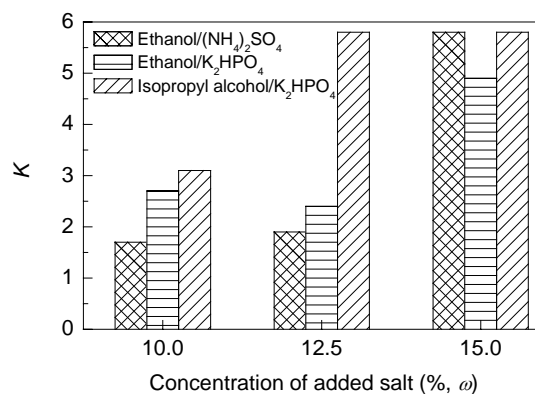


图1 不同双水相体系对 2,3-丁二醇分配系数的影响  
Fig.1 Effect of different aqueous two-phase systems on partition coefficient ( $K$ ) of 2,3-butanediol

无机盐/亲水性有机溶剂双水相体系的分相机理尚未完全明确, 但初步推断是由无机盐争夺溶液中的水分子造成的, 因此, 水合作用强的盐其分相能力较强. 高价盐的水合作用大于低价盐, 因而高价盐体系分相效果好<sup>[13]</sup>; 同时, 盐浓度的增大也会增强体系的分相能力, 从图中也可看出 2,3-丁二醇的分配系数随着盐浓度的升高有所增加. 林强等<sup>[14]</sup>在利用双水相体系萃取甘草酸盐的研究中也发现, 随着盐浓度的升高, 盐夺取了水分子, 有机溶剂分子才被释放出来, 使目标产物在上相的浓度升高, 分配系数增大. 考虑到硫酸铵易溶、价廉、易回收, 而且萃取后的硫酸铵可以作为下次发酵培养基成分重复利用, 所以选择使用乙醇/硫酸铵体系, 进一步考察其相组成对 2,3-丁二醇分配的影响.

### 3.2 乙醇和硫酸铵质量浓度对 2,3-丁二醇分配的影响

分别固定盐浓度为 20%, 22%和 25%( $\omega$ ), 加入不同量的乙醇, 直至盐饱和. 通过测定上、下相中 2,3-丁二醇的浓度, 计算 2,3-丁二醇的分配系数和回收率, 实验结果如图 2 所示. 由图可以看出, 当盐的浓度一定时, 随着醇浓度的升高, 2,3-丁二醇的分配系数和回收率都在增加. 霍清等<sup>[16]</sup>在利用双水相乙醇-磷酸氢二钾体系萃取甘草有效成分的研究中也发现, 当盐的浓度一定时, 随着醇浓度的升高, 分配系数增大. 当乙醇和硫酸铵浓度分别为 27%和 20%( $\omega$ )时, 2,3-丁二醇的回收率和分配系数均为测定的最高值, 分别为 90.18%和 7.4.

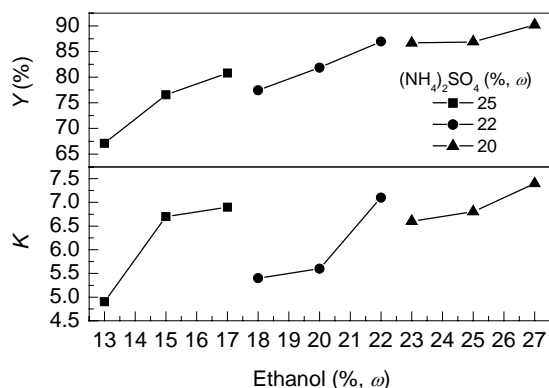


图 2 醇和盐浓度对 2,3-丁二醇的分配系数和回收率的影响  
Fig.2 Effects of different ethanol and salt concentrations on partition coefficient ( $K$ ) and recovery rate ( $Y$ ) of 2,3-BD

新型双水相体系上相为富含有机溶剂的醇相, 下相为富含无机盐的盐相. 目标产物 2,3-丁二醇分配于上相后, 乙醇沸点较低, 在后续的精馏浓缩过程中将极大地降低能耗; 同时下相作为富盐相, 一方面可通过有机溶剂析出的方法对无机盐进行回收; 同时, 还可作为发酵培养基的组分重复使用. 因此, 通过新型双水相萃取分离操作, 可以在很大程度上降低分离成本.

### 3.3 乙醇和硫酸铵质量浓度对乙偶姻分配的影响

分别固定盐浓度为 20%, 22% 和 25% ( $\omega$ ), 加入不同量的乙醇, 直至盐饱和. 通过测定上、下相中乙偶姻的浓度, 计算分配系数和收率, 实验结果如图 3 所示.

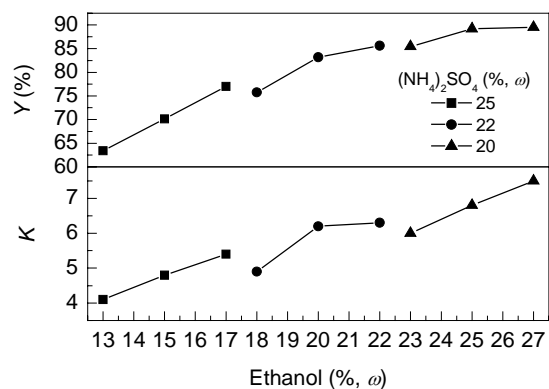


图 3 醇和盐浓度对乙偶姻的分配系数和回收率的影响  
Fig.3 Effects of ethanol and salt concentrations on partition coefficient ( $K$ ) and recovery rate ( $Y$ ) of acetoin

从图 3 可以看出, 作为 2,3-丁二醇前体物质的乙偶姻其分配规律与 2,3-丁二醇相似, 分配系数和回收率都随着醇浓度的升高而明显变大. 从结果可知, 乙醇 27%、硫酸铵 20% 时, 乙偶姻的回收率和分配系数分别为 89.53% 和 7.5, 也为测定的最高值.

### 3.4 乙醇/硫酸铵相组成对葡萄糖分配的影响

分别固定盐浓度为 20%, 22% 和 25% ( $\omega$ ), 加入不同

量的乙醇, 直至盐饱和. 通过测定上、下相中葡萄糖的浓度, 计算分配系数, 实验结果如图 4 所示.

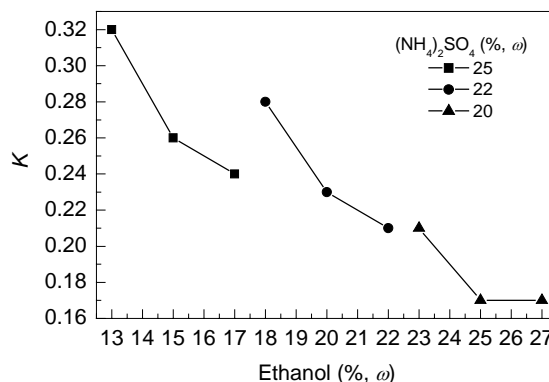


图 4 醇和盐浓度对葡萄糖的分配系数的影响  
Fig.4 Effects of ethanol and salt concentrations on partition coefficient ( $K$ ) of glucose

从图 4 可以看出, 当盐的浓度一定时, 随着醇浓度的升高, 葡萄糖的分配系数呈减小趋势, 即葡萄糖更趋于分配于下相. 当乙醇与硫酸铵浓度分别为 27% 和 20% ( $\omega$ ) 时, 葡萄糖的分配系数最低, 为 0.17, 这说明 83% 的底物葡萄糖分配于下相. 2,3-丁二醇对葡萄糖的分离选择性系数为 43.5, 产物和底物得到了有效的分离. 底物葡萄糖分配于下相将十分有利于后续操作, 一方面可以防止后续蒸馏过程中发酵液糊化, 影响产品质量; 另一方面下相中底物可以被重复利用作为发酵的培养基成分, 进一步降低了分离成本.

## 4 结论

通过考察多种分离体系的分离效果, 确定了适合发酵液中 2,3-丁二醇分离的双水相萃取体系为乙醇/硫酸铵体系, 对于絮凝上清液, 当硫酸铵浓度为 20% ( $\omega$ )、乙醇浓度为 27% ( $\omega$ ) 时, 发酵液中 2,3-丁二醇的分配系数和回收率分别达到了 7.4 和 90.18%, 乙偶姻的分配系数和回收率分别达到了 7.5 和 89.53%, 葡萄糖的分配系数最低, 为 0.17, 产物和底物得到了有效的分离. 该工艺操作简单, 能够有效地分离发酵液中的 2,3-丁二醇.

### 参考文献:

- [1] Garg S K, Jain A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review [J]. *Bioresour. Technol.*, 1995, 51: 103-109.
- [2] Syu M J. Biological Production of 2,3-Butanediol [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55: 10-18.
- [3] 马成伟, 杜彤, 孙亚琴, 等. 生物转化法生产 2,3-丁二醇 [J]. *精细与专用化学品*, 2006, 14(15): 15-18.
- [4] 马成伟, 孙亚琴, 修志龙. 葡萄糖和木糖双底物生物转化生产 2,3-丁二醇和氢气的代谢计量分析 [J]. *生物加工过程*, 2006, 4(3): 44-49.
- [5] Haren A, Walpole G S. 2,3-Butylene Fermentation by *Aerobacter*

- Aerogenes [J]. Proc. R. Soc. London, Ser. B, 1906, 77: 399–405.
- [6] Yu E K C, Saddler J N. Fed-batch Approach to Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Substrate Concentration [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 46: 630–635.
- [7] Xiu Z L, Zeng A P. Present State and Perspective of Downstream Processing of Biologically Produced 1,3-Propanediol and 2,3-Butanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78: 917–926.
- [8] Tsao G T. Conversion of Biomass from Agriculture into Useful Products [R]. USDDE, Contract No. EC-77-S-02-4298, 1978–07–31.
- [9] 刘波, 王英锋, 郭雪清. 新型萃取分离技术在生物技术中的应用 [J]. 首都师范大学学报, 2005, 26(2): 49–53.
- [10] 李全民, 张青芬, 刘奇. 硫酸铵–水杨基荧光酮–乙醇体系萃取分离钼 [J]. 分析化学, 1997, 25(10): 1143–1147.
- [11] Wang Z H, Zeng Y, Ma H M, et al. Two-phase Aqueous Extraction of Copper(II) and Its Application to Speciation Analysis of Serum Copper [J]. Microchem. J., 1998, 60(2): 143–152.
- [12] Wang Z H, Song M, Ma Q L, et al. Two-phase Aqueous Extraction of Chromium and Its Application to Speciation Analysis of Chromium in Plasma [J]. Mikrochim. Acta, 2000, 134(1): 95–99.
- [13] 李梦青, 耿艳辉, 刘桂敏, 等. 双水相萃取技术在白藜芦醇提纯工艺中的应用 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 647–649.
- [14] 林强, 霍清. 双水相体系萃取甘草酸盐的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 702–704.
- [15] 董军芳, 林金清. 乙醇–水–硫酸铵三元体系的溶解度和液相平衡 [J]. 福建化工, 2002, 4: 49–52.
- [16] 霍清, 林强, 赵玉娥. 利用双水相乙醇–磷酸氢二钾体系萃取甘草有效成分的研究 [J]. 精细化工, 2002, 19(2): 65–67.
- [17] 修志龙. 甘油连续生物歧化过程培养基和 pH 调控策略研究 [J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(4): 397–402.

## Aqueous Two-phase Extraction of 2,3-Butanediol from Fermentation Broth

ZHANG Jiang-hong, JIANG Bo, LI Zhi-gang, SUN Li-hui, SUN Ya-qin, DAI Jian-ying, XIU Zhi-long

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science and Technology,  
Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

**Abstract:** The separation of 2,3-butanediol by aqueous two-phase systems with salts and organic solvents was studied. Firstly, the phase separation ability of various salts and organic solvents was compared, and then the effect of phase composition on the extraction was investigated. According to the partition coefficient and the yield of 2,3-butanediol, the ethanol and ammonium sulphate system was proved to be the best one of four systems. The optimum phase composition was 20% ( $\omega$ ) of ammonium sulphate and 27% ( $\omega$ ) of ethanol for flocculated broths. The partition coefficient and yield of 2,3-butanediol were 7.4 and 90.18%, respectively. The process is simple and highly efficient.

**Key words:** 2,3-butanediol; aqueous two-phase extraction; ethanol and ammonium sulphate