

# *Klebsiella pneumoniae* 发酵菊芋生产 2,3-丁二醇的初步研究

孙丽慧, 王旭东, 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:** 对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵菊芋块茎生产 2,3-丁二醇进行了初步研究, 通过摇瓶实验考察了不同碳源及培养基中微量元素对发酵的影响. 结果表明, 菊芋是良好的发酵 2,3-丁二醇的底物, 以其为底物时产物浓度和生产强度比葡萄糖发酵提高了 42% 以上, 培养基中不添加微量元素对菊芋发酵基本没有影响, 因而可简化培养基成分以降低生产成本. 在发酵罐批式流加实验中, 发酵 56 h 菊芋发酵的产物浓度和生产强度分别为 81.47 g/L 和 1.45 g/(L·h), 与葡萄糖发酵结果相当.

**关键词:** 2,3-丁二醇; 菊芋; 发酵

**中图分类号:** Q815

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-606X(2009)01-0161-04

## 1 前言

2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD)是一种重要的化工原料和液体燃料, 广泛应用于化工、医药、食品及航空航天等领域<sup>[1-4]</sup>. 乙偶姻是 2,3-BD 的前体, 具有令人愉快的奶油香味, 可作为食品添加剂<sup>[5]</sup>. 微生物发酵生产 2,3-BD 至今已有近百年的历史, 为获得高浓度目标产物, 国内外众多学者做了广泛研究. 秦加阳等<sup>[6]</sup>用一株克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp. LN145)以工业葡萄糖为碳源, 发酵过程中通过补加固体葡萄糖, 2,3-BD 的最大产量达到了 84.0 g/L, 摩尔转化率达到理论量的 91%, 转化速率达 1.8 g/(L·h). Zeng 等<sup>[7]</sup>利用呼吸商定量研究通氧量对产气节杆菌(*A. aerogenes*)发酵 2,3-BD 的影响, 结果表明在发酵过程中控制最佳呼吸商, 获得的 2,3-BD 浓度高达 96.0 g/L. Yu 等<sup>[8]</sup>利用 *Klebsiella pneumoniae* 得到 113 g/L 的目标产物浓度(2,3-BD+乙偶姻). 虽然以上报道所得产物浓度都很高, 但均使用葡萄糖为碳源. 目前也有文献报道<sup>[9,10]</sup>利用乳清、纤维素或甘蔗汁等为碳源发酵生产 2,3-BD, 但最终产物 2,3-BD 浓度都不高.

菊芋又名洋姜、鬼子姜, 是一种多年生高产草本植物, 其适应性和抗病能力都很强, 尤其适合在废弃土地上种植, 如沙漠、盐碱地等<sup>[11]</sup>. 菊芋地下块茎中含 10%~20% 菊粉, 菊粉是以  $\beta$ -2,1 糖苷键连接的多聚果糖, 其还原末端为一个葡萄糖残基<sup>[12]</sup>. 目前已有文献<sup>[13-15]</sup>报道利用菊芋为原料发酵生产乙醇、单细胞蛋白及微生物油脂, 但利用其生产 2,3-BD 尚未见报道. *K. pneumoniae* 发酵生产 2,3-BD 可以利用多种底物为碳源, 如己糖、戊糖、特定的二糖、糖醛酸等. 本研究以 *K. pneumoniae* 为菌种, 通过摇瓶实验考察了菊芋原料及培

养基中微量元素对发酵生产 2,3-BD 的影响, 并通过发酵罐实验进一步考察了以菊芋为原料生产 2,3-BD 的可行性.

## 2 实验

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌种

*Klebsiella pneumoniae* CICC 10011, 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心.

#### 2.1.2 原料及处理

菊芋浆: 新鲜的菊芋块茎经清洗去皮后按 1:1( $\omega$ ) 加水匀浆, 得到菊芋浆.

菊芋粉: 新鲜的菊芋块茎经清洗、去皮、晒干、打磨成粉状.

在菊芋浆或菊芋粉浸液中加入一定比例的菊糖酶 [Novozymes EC 3.2.1.7, 加酶量为 2.0 U/g(菊芋干重)], 在 55℃ 及 pH 5.0 条件下水解 12 h, 得到含果糖和葡萄糖的菊糖水解液, 根据实验需要, 适当调整菊糖水解液中糖的浓度, 于 -20℃ 保存备用.

#### 2.1.3 培养基

种子培养基见文献[16].

摇瓶发酵培养基: 对照组碳源分别为葡萄糖、果糖或葡萄糖与果糖双底物(模拟菊糖水解液, 葡萄糖与果糖质量比为 1:4), 实验组的碳源分别为菊芋浆或菊芋粉经酶水解制得的菊糖水解液, 其余培养基成分相同, 分别为 (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0, KCl 1.8, EDTA 0.51, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, 柠檬酸 0.21, 柠檬酸钠 0.294, 微量元素 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025, ZnCl<sub>2</sub> 0.075, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.038.

对照发酵罐培养基见文献[16].

菊芋发酵罐培养基: 碳源为菊芋浆经酶解所制菊糖水溶液, 其余培养基成分为(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  24,  $\text{KCl}$  1.8, EDTA 0.51,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.6, 柠檬酸 0.21, 柠檬酸钠 0.294.

## 2.2 仪器与设备

pH 电极, 5 L 自控发酵罐(BIOTECH-5BG, 上海保兴生物设备工程有限公司), 721 分光光度计, 恒温振荡培养箱, 恒温水浴锅, 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).

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 摇瓶发酵实验

按 2%( $\varphi$ )接种量将 *K. pneumoniae* 接种到含有 50 mL 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 37 °C 下 190 r/min 摇床培养 24 h.

### 2.3.2 发酵罐发酵实验

批次流加实验在 5 L 自控发酵罐中进行, 装液量 1.5 L, 接种量 5%( $\varphi$ ), 温度 37 °C, 搅拌转速 300 r/min, 通气量 150 mL/min, 用 5 mol/L NaOH 溶液控制 pH 值为 6.0, 当残余还原糖浓度低于 50 g/L 时, 补加 200 mL 368.20 g/L 的菊糖水溶液; 对照组中葡萄糖浓度低于 50 g/L 时补加一定量固体葡萄糖, 发酵共进行 56 h, 定时取样分析.

### 2.3.3 分析方法

还原糖采用 DNS 法<sup>[17]</sup>测定, 葡萄糖采用葡萄糖分析仪测定, 菌体浓度以波长 650 nm 下的光密度(OD 值)表示, 2,3-BD、乙偶姻浓度用气相色谱法检测, 色谱柱( $\phi 5$  mm $\times$ 2 m)填料为 Chromsorb 101, 柱温 190 °C, 汽化室与检测器温度均为 200 °C, 载气为  $\text{N}_2$ , 流速 50

mL/min, 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 采用外标法定量.

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同底物发酵生产 2,3-BD

采用酶水解法可将菊芋浆或菊芋粉浸液水解成含果糖与葡萄糖的菊糖水溶液. 本研究首先考察了菊糖水溶液为碳源发酵生产 2,3-BD 的情况, 同时分别以果糖、葡萄糖及葡萄糖与果糖双底物(模拟菊糖水溶液中葡萄糖与果糖的比例)为碳源的培养基作对照, 所用培养基中均添加了微量元素, 结果如表 1 所示.

由表 1 可知, *K. pneumoniae* 利用不同碳源作为底物的发酵效果依次是菊糖水溶液>葡萄糖>葡萄糖与果糖双底物>果糖. 采用葡萄糖与果糖双底物的发酵效果介于葡萄糖和果糖之间, 说明 *K. pneumoniae* 代谢葡萄糖的能力大于代谢果糖的能力. 菊糖水溶液主要包括果糖和葡萄糖, 但其发酵效果却明显好于葡萄糖与果糖双底物, 这可能是由于菊糖水溶液中除了葡萄糖和果糖外, 还含有可溶性蛋白、氨基酸、维生素和矿物质等<sup>[18]</sup>, 这些丰富的天然营养成分对发酵过程起了明显的促进作用. 该结果与已报道的研究结果一致. 周正等<sup>[19]</sup>在利用酿酒酵母 BY4742 发酵生产乙醇的研究中也同样发现, 以菊糖水溶液为底物发酵生产乙醇的产量均超过利用葡萄糖和果糖为底物的产量, 而且这种现象随着底物浓度的提高越来越明显. 任玮等<sup>[20]</sup>在利用琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)发酵生产琥珀酸的研究中也发现, 与以葡萄糖为底物相比, 菊糖水溶液发酵琥珀酸的浓度更高、发酵时间缩短、生产强度更高.

表 1 不同碳源为底物发酵生产 2,3-BD 的比较

Table 1 Comparison for the production of 2,3-BD from different carbon sources

Carbon source	Initial sugar (g/L)	Final sugar (g/L)	OD	2,3-BD (g/L)	2,3-BD+acetoin (g/L)	Productivity of 2,3-BD+acetoin [g/(L·h)]	$Y_{\text{xs}}$
Fructose	75.81	42.52 $\pm$ 0.93	7.09 $\pm$ 0.23	12.78 $\pm$ 0.53	14.98 $\pm$ 0.36	0.62	0.45
Glucose	69.20	18.85 $\pm$ 0.10	7.82 $\pm$ 0.23	19.46 $\pm$ 0.85	23.17 $\pm$ 1.35	0.97	0.46
Fructose and glucose	74.14	30.27 $\pm$ 0.31	7.59 $\pm$ 0.12	18.01 $\pm$ 0.41	20.18 $\pm$ 0.35	0.84	0.46
Jerusalem artichoke slurry	76.52	2.03 $\pm$ 0.16	8.46 $\pm$ 0.31	33.55 $\pm$ 1.69	36.12 $\pm$ 0.21	1.51	0.49
Jerusalem artichoke powder	81.14	9.26 $\pm$ 0.24	8.39 $\pm$ 0.16	31.49 $\pm$ 1.54	33.06 $\pm$ 0.98	1.38	0.46

表 2 培养基中微量元素对发酵产 2,3-BD 的影响

Table 2 Effects of trace elements in media on the production of 2,3-BD

Carbon source	Trace element	Initial sugar (g/L)	Final sugar (g/L)	OD	2,3-BD (g/L)	2,3-BD+acetoin (g/L)	Productivity of 2,3-BD+acetoin [g/(L·h)]
Fructose and glucose	Added	69.87	23.93 $\pm$ 0.16	7.75 $\pm$ 0.25	18.84 $\pm$ 1.30	21.13 $\pm$ 0.93	0.88
Fructose and glucose	None	69.87	44.55 $\pm$ 0.58	6.03 $\pm$ 0.24	8.75 $\pm$ 0.14	11.14 $\pm$ 0.16	0.46
Jerusalem artichoke slurry	Added	76.42	1.03 $\pm$ 0.09	8.52 $\pm$ 0.14	33.21 $\pm$ 0.51	36.54 $\pm$ 1.15	1.52
Jerusalem artichoke slurry	None	76.42	1.99 $\pm$ 0.13	8.68 $\pm$ 0.16	32.79 $\pm$ 0.21	36.09 $\pm$ 0.39	1.50
Jerusalem artichoke powder	Added	81.14	9.26 $\pm$ 0.24	8.39 $\pm$ 0.16	31.49 $\pm$ 1.54	33.06 $\pm$ 0.98	1.38
Jerusalem artichoke powder	None	81.14	8.71 $\pm$ 0.27	8.41 $\pm$ 0.59	31.22 $\pm$ 1.25	33.25 $\pm$ 1.32	1.39

### 3.2 微量元素对发酵的影响

由表 1 可以看出, 菊芋作为天然培养基对发酵

2,3-BD 具有明显的优势, 因此考察了培养基中微量元素对菊芋发酵 2,3-BD 的影响, 同时以葡萄糖与果糖双底

物为碳源的培养基作对照, 实验结果如表 2 所示. 由表可以看出, 采用葡萄糖与果糖双底物, 添加微量元素对发酵影响较大, 未添加微量元素时菌体密度较低, 还原糖消耗较少, 产生的 2,3-BD 和乙偶姻的量也减少; 而以菊芋浆或菊芋粉所制菊糖水溶液为底物时, 微量元素添加与否对发酵影响很小, 在发酵 24 h 后, 菌体密度、目标产物(2,3-BD 与乙偶姻)浓度及生产强度基本一致. 从该结果可知, 菊芋中含有的丰富矿物质<sup>[18]</sup>能够满足发酵所需, 因此在菊芋发酵过程中无需添加微量元素.

### 3.3 批式流加发酵生产 2,3-BD

以菊芋浆采用酶法制成的菊糖水溶液为碳源, 还原糖的初始浓度为 169.30 g/L, 发酵过程中分别在 28 和 36 h 各补加还原糖浓度为 368.20 g/L 的菊糖水溶液 200 mL, 结果如图 1 所示. 由图可以看出, 在发酵 28 h 时 2,3-BD 和乙偶姻的浓度之和就已达到 66.82 g/L. 发酵共进行了 56 h, 最终残糖浓度达 24.16 g/L, 2,3-BD 终浓度为 64.49 g/L, 2,3-BD 和乙偶姻终浓度之和为 81.47 g/L, 生产强度为 1.45 g/(L·h).

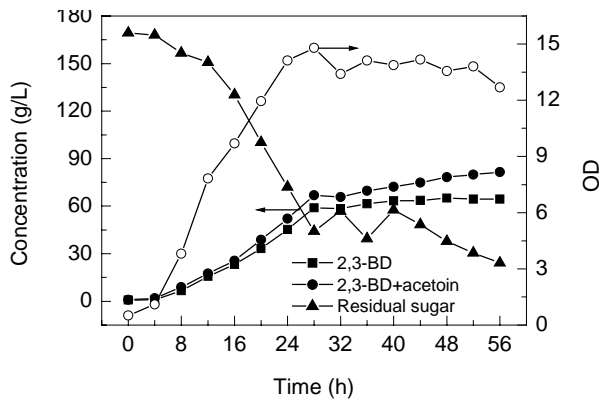


图 1 菊芋为碳源批式流加发酵生产 2,3-BD  
Fig.1 Fed-batch fermentation for 2,3-BD production using *Jerusalem artichoke* as carbon source

以葡萄糖为碳源批式流加实验结果如图 2 所示, 发酵初始葡萄糖浓度为 105.00 g/L, 发酵 56 h 时最终残糖浓度为 27.03 g/L, 2,3-BD 的终浓度为 74.72 g/L, 2,3-BD 和乙偶姻的最终浓度之和为 88.82 g/L, 生产强度为 1.59 g/(L·h).

在菊芋发酵中, 为了尽量减少补加糖液的体积, 提高了菊芋发酵中的初始糖浓度和补料液的糖浓度. 结果表明, 尽管在菊芋发酵中流加了 2 次菊糖水溶液(每次 200 mL)共 400 mL, 初始发酵液体积为 1.5 L, 相当于产物浓度被稀释; 而葡萄糖发酵过程中直接补加固体葡萄糖, 使发酵液体积增加很小, 但菊芋发酵的产物浓度和生产强度与葡萄糖发酵结果基本相当. 菊芋发酵工艺及流加策略等还有待进一步改善, 因而菊芋发酵生产

2,3-BD 还存在一定的潜力.

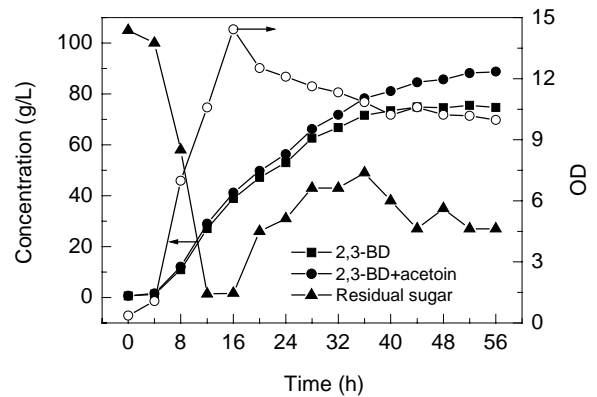


图 2 葡萄糖为碳源批式流加发酵生产 2,3-BD  
Fig.2 Fed-batch fermentation for 2,3-BD production using glucose as carbon source

## 4 结论

(1) 菊芋浆或菊芋粉都是良好的 *Klebsiella pneumoniae* 发酵生产 2,3-BD 的底物, 其产物浓度和生产强度显著高于同浓度的葡萄糖、果糖或葡萄糖与果糖双底物

(2) 菊芋中含有的微量元素完全能够满足发酵的需要, 发酵过程中无需添加微量元素. 在发酵罐批式流加实验中, 发酵 56 h, 菊芋发酵的产物浓度和生产强度分别为 81.47 g/L 和 1.45 g/(L·h), 与葡萄糖发酵结果相当.

### 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] 张江红, 孙丽慧, 修志龙. 2,3-丁二醇发酵液的絮凝除菌与絮凝细胞的循环利用 [J]. *过程工程学报*, 2008, 8(4): 779-783.
- [3] 纪晓俊, 朱建国, 高振, 等. 微生物发酵法生产 2,3-丁二醇的研究进展 [J]. *现代化工*, 2006, 26(8): 23-27.
- [4] Syu M J. Biological Production of 2,3-Butanediol [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55: 10-18.
- [5] 纪晓俊, 黄和, 杜军, 等. 3-羟基丁酮的合成及应用进展 [J]. *现代化工*, 2008, 28(4): 18-22.
- [6] 秦加阳, 肖梓军, 张兆斌, 等. 一种简单的高产 2,3-丁二醇发酵生产方法 [J]. *生物加工过程*, 2005, 3(4): 71-73.
- [7] Zeng A P, Byun T G, Possten C, et al. Use of Respiratory Quotient as a Control Parameter for Optimum Oxygen Supply and Scale-up of 2,3-Butanediol Production under Microaerobic Conditions [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44: 1107-1114.
- [8] 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.
- [9] Cao N, Xia Y, Gong C S, et al. Production of 2,3-Butanediol from Pretreated Corn Cob by *Klebsiella oxytoca* in the Presence of Fungal Cellulase [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, 63/65: 129-139.
- [10] Saha B C, Bothast R J. Production of 2,3-Butanediol by Newly Isolated *Enterobacter cloacae* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999,

- 52(3): 321–326.
- [11] 修志龙, 孙丽慧, 王旭东, 等. 一种以菊芋为原料发酵生产 2,3-丁二醇的方法 [P]. 中国专利: 200810011692.4, 2008-06-02.
- [12] 丁红梅, 董全, 谭晓琼. 菊芋的综合利用及发展前景 [J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(5): 5–8.
- [13] 华艳艳, 赵鑫, 赵金, 等. 圆红冬孢酵母发酵菊芋块茎产油脂的研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(10): 59–63.
- [14] Gao L M, Chi Z M, Sheng J, et al. Single-cell Protein Production from *Jerusalem artichoke* Extract by a Recently Isolated Marine Yeast *Cryptococcus aureus* G7a and Its Nutritive Analysis [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 77: 825–832.
- [15] Ge X Y, Zhang W G. A Shortcut to the Production of High Ethanol Concentration from *Jerusalem artichoke* Tubers [J]. Food Technol. Biotechnol., 2005, 43: 241–246.
- [16] Qin J Y, Xiao Z J, Ma C Q, et al. Production of 2,3-Butanediol by *K. pneumoniae* Using Glucose and Ammonium Phosphate [J]. Chin. J. Chem. Eng., 2006, 14(1): 132–136.
- [17] Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar [J]. Anal. Chem., 1959, 31: 426–428.
- [18] Mullin W J, Modlerh W, Famworth E R, et al. The Macronutrient Content of Fractions from *Jerusalem artichoke* Tubers (*Helianthus tuberosus*) [J]. Food Chem., 1994, 51: 263–269.
- [19] 周正, 曹海龙, 朱豫, 等. 菊芋替代玉米发酵生产乙醇的初步研究 [J]. 西北农业科学, 2008, 17(4): 297–301.
- [20] 任玮, 董晋军, 郑璞, 等. 酶水解菊芋糖浆发酵生产琥珀酸的初步研究 [J]. 工业微生物, 2008, 38(3): 1–5.

## Preliminary Study on Fermentative Production of 2,3-Butanediol from *Jerusalem artichoke* Tubers by *Klebsiella pneumoniae*

SUN Li-hui, WANG Xu-dong, DAI Jian-ying, XIU Zhi-long

(Dept. Biosci. Biotechnol., Sch. Environ. Biolog. Sci. Technol., Dalian Univ. Technol., Dalian, Liaoning 116024, China)

**Abstract:** 2,3-Butanediol production from *Jerusalem artichoke* tubers by *Klebsiella pneumoniae* was investigated. Shaking flask cultures were performed in order to study the effects of different carbon sources and trace elements on the fermentation of 2,3-BD. The results showed that *Jerusalem artichoke* was an excellent carbon source for the production of 2,3-BD, which provided more than 42% higher concentration and productivity of target products, compared with glucose used as carbon source. Moreover, there was no distinct difference between added and none trace elements in the medium. The fed-batch fermentation results showed that the concentration and productivity of target products from *Jerusalem artichoke* reached 81.47 g/L and 1.45 g/(L·h), respectively after 56 h fermentation, which were close to that from glucose.

**Key words:** 2,3-butanediol; *Jerusalem artichoke*; fermentation