

## 盾叶薯蓣糖化液发酵生产2,3-丁二醇

刘国兴, 王元好, 孙丽慧, 戴建英, 孙亚琴, 董悦生, 修志龙

(大连理工大学生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

**摘要:** 利用克雷伯氏杆菌以盾叶薯蓣糖化液为底物发酵生产2,3-丁二醇(2,3-BD), 考察了2,3-BD浓度、生产强度、有机酸生成及代谢流量分布情况. 结果表明, 盾叶薯蓣中的有机酸成分能促进三羧酸循环途径和乙酸途径的代谢流, 减弱琥珀酸途径的代谢流, 从而提高2,3-BD的浓度. 以盾叶薯蓣糖化液为底物, 采用批式流加方式, 补加固体葡萄糖, 发酵56 h, 发酵液中2,3-BD最终浓度达到80.20 g/L, 乙偶姻与2,3-BD浓度之和最终达到86.19 g/L, 生产强度达到1.54 g/(L·h), 比单独以葡萄糖为底物时分别提高了8.50%, 7.38%和7.69%.

**关键词:** 克雷伯氏杆菌; 盾叶薯蓣; 2,3-丁二醇; 代谢流量分布

**中图分类号:** TQ815      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0095-06

### 1 前言

2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD)作为一种重要的化工原料,是最有工业化前景的二醇类发酵产物之一<sup>[1]</sup>,可广泛应用于化工、食品、燃料及航空航天等领域<sup>[2,3]</sup>.生产2,3-BD的主要方法有化学法和生物转化法.由于化学法存在诸多问题,至今未能实现工业化生产.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>[4,5]</sup>,具有安全、环保、反应条件温和及原料可再生等优点,逐步成为国内外研究的热点.目前对生物转化法生产2,3-BD的报道较多,其碳源多为葡萄糖<sup>[6,7]</sup>,但以葡萄糖为碳源存在与人争粮、与粮争地及价格高等一系列弊端.也有报道<sup>[8,9]</sup>利用糖蜜、淀粉或甘蔗汁为碳源发酵生产2,3-BD,还有少量报道<sup>[3,10,11]</sup>是以纤维素为碳源,但最终2,3-BD的浓度都不高.因此,寻找一种既廉价又有效的非粮原料替代或部分替代粮食作物<sup>[12]</sup>是推进发酵生产2,3-BD的必经之路.

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright)俗名黄姜,是薯蓣科薯蓣属(*Dioscorea* L.)多年生藤本植物.目前全国种植面积已达100多万亩,是我国提取甾体激素类药物原料薯蓣皂苷元的主要植物.薯蓣皂苷元商品名称为薯蓣皂素.盾叶薯蓣中除含有甾体皂苷及其配基薯蓣皂苷元外,还含有45%~50%淀粉和40%~50%纤维素及其他微量化学成分.工业上生产薯蓣皂苷元的传统方法是通过酸水解法或发酵与酸水解相结合去除盾叶薯蓣中的淀粉和纤维素成分,最后得到占干物质约2%的薯蓣皂苷元.在整个处理过程中,大量淀粉水解后进入废水而浪费,同时加大了废水的处理难度<sup>[13]</sup>.

目前,文献中对盾叶薯蓣中淀粉的利用报道较少,除用于提取葡萄糖<sup>[14]</sup>、生产酒精或白酒<sup>[15,16]</sup>等外,尚未有利用盾叶薯蓣液化、糖化后发酵生产2,3-BD的报道.本工作以盾叶薯蓣糖化液为底物,采用生物转化法制备了2,3-BD,为利用廉价非粮原料发酵生产2,3-BD、深化盾叶薯蓣的综合利用和降低薯蓣皂素加工工业的污染开拓了一种新的思路.

### 2 实验

#### 2.1 原料与试剂

盾叶薯蓣干药材购自陕西省山阳县照川镇,耐高温 $\alpha$ -淀粉酶20000 U/mL,葡萄糖淀粉酶100000 U/mL(山东隆大生物工程有限公司),2,3-BD标准品(美国Sigma公司),乙偶姻标准品,酵母粉(英国OXOID公司),葡萄糖(华北制药康欣有限公司,纯度大于95%),其他化学试剂均为分析纯以上级别.

#### 2.2 盾叶薯蓣的液化、糖化

将盾叶薯蓣干药材60℃烘干至恒重,粉碎过60目(250  $\mu$ m)筛备用.称取一定量盾叶薯蓣粉,按料/水1:4( $\omega$ )调浆,在80~90℃下预糊化约30 min.加入耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(12 U/g),温度控制在90~95℃液化30 min,之后冷却降温,用8%( $\omega$ )的盐酸将pH值调至4.0~4.5,加入葡萄糖淀粉酶(120 U/g),温度控制在58~60℃糖化120 min,淀粉转化率达88.61%以上.将糖化液离心过滤,转速为8000 r/min,所得滤液用于发酵生产2,3-BD,滤渣用于提取薯蓣皂素.

#### 2.3 菌种和培养基

克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)购自中国工

业微生物菌种保藏管理中心(CICC), 编号 CICC 10011. 实验前经底物和产物耐受驯化.

种子培养基见参考文献[7]. 发酵培养基: 碳源为葡萄糖或盾叶薯蓣糖化液, 组成为(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.36,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6.61,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.26, 酵母粉 1.0, 柠檬酸 0.428, 微量元素 B 5 mL[配方(g/L): 饱和 HCl 10 mL,  $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.688,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5.4,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.17,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.47,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.06,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.47].

## 2.4 培养方法

500 mL 三角瓶中装液量 60 mL, 接种量 2% ( $\phi$ ), 培养温度 37 °C, 转速 200 r/min, 培养 24 h. 发酵罐培养在 5 L BIOTECH-5BG 全自动发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司)中进行, 装液量 1.5 L, 接种量 5% ( $\phi$ ), 发酵温度 37 °C, 转速 300 r/min, 通空气量 150 mL/min, 用 5 mol/L NaOH 控制 pH 值为 6.0.

## 2.5 分析方法

生物量的测定采用比浊法(波长 650 nm), 葡萄糖浓度用 SBA-50B 生物传感分析仪(山东省科学院)测定, 还原糖浓度用 DNS 法<sup>[17]</sup>测定. 发酵液中产物 2,3-BD、乙偶姻和乙醇用日本岛津 GC-14B 气相色谱仪测定, 玻璃管填充柱, 色谱柱  $\phi 5 \text{ mm} \times 2 \text{ m}$ , 填料为 Chromsorb 101,

检测器为 FID, 柱温 190 °C, 汽化室与检测器的温度均为 200 °C, 载气为  $\text{N}_2$ , 流速 50 mL/min, 进样量 1  $\mu\text{L}$ . 发酵液中有有机酸采用 HPLC 测定, 色谱柱为 KC-811, 流动相 A 为 4 mmol/L 高氯酸, 流动相 B 为超纯水, 紫外检测波长 210 nm, 流动相流速 1.0 mL/min, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 柱温 60 °C.

## 3 结果与讨论

### 3.1 摇瓶发酵

分别以盾叶薯蓣糖化液和葡萄糖为底物进行摇瓶实验, 初始葡萄糖浓度分别为 82 和 93.5 g/L(薯蓣糖化液中还原糖浓度 105.22 g/L), 发酵 24 h, 结果见表 1. 可以看出, 乙醇和 2,3-BD 的最终浓度及其质量转化率较接近, 乙偶姻与 2,3-BD 浓度之和及生产强度以盾叶薯蓣糖化液为底物比以葡萄糖为底物分别高出 35.12% 和 35.29%. 以薯蓣糖化液为底物发酵生产 2,3-BD 时, 菌体生长较旺盛, 发酵后期发酵液中残余糖浓度过低, 造成大量乙偶姻积累, 使薯蓣糖化液发酵液中乙偶姻浓度远高于葡萄糖发酵液中浓度. 这说明以薯蓣糖化液为底物发酵生产 2,3-BD 比以葡萄糖为底物的产物浓度和生产强度具有明显的优势.

表 1 以盾叶薯蓣糖化液和葡萄糖为底物的摇瓶发酵结果

Substrate	Substrate consumption (g/L)			Product concentration (g/L)		Acetoin and 2,3-BD	
	Reducing sugar	Glucose	Ethanol	2,3-BD	Acetoin and 2,3-BD	Yield (g/g)	Productivity [g/(L·h)]
<i>Dioscorea zingiberensis</i>	103.12	93.5	1.61	27.59	38.67	0.41	1.61
Glucose	—	66.7	1.54	26.38	28.62	0.43	1.19

### 3.2 批式发酵

利用盾叶薯蓣糖化液进行批式发酵, 结果如图 1 所示. 菌体在发酵 1.5 h 内处于延迟期, 生长速度较慢, 之后进入对数生长期, 直到 4.5 h 糖的消耗速度很低, 这时消耗的糖主要用于菌体生长. 4.5 h 后, 产物生成速度和糖消耗速度明显加快, 消耗的糖一部分用于菌体生长, 一部分用于产物生成. 10.5 h 时, 菌体 OD 值达到最大(12.48). 发酵结束时, 发酵液中残余还原糖浓度为 9.76 g/L, 葡萄糖全部消耗, 2,3-BD 浓度最终达到 31.87 g/L, 乙偶姻与 2,3-BD 浓度之和最终达到 33.39 g/L, 质量转化率为 0.32 g/g, 生产强度为 1.72 g/(L·h). 发酵进入稳定期后, 随残余糖浓度降低, 产物生成速度并未降低, 通过补加葡萄糖, 延长发酵时间, 可能进一步提高产物的浓度.

### 3.3 批式流加发酵

分别以盾叶薯蓣糖化液和葡萄糖为底物批式流加发酵, 发酵过程中补加固体葡萄糖分别共计 191.3 和

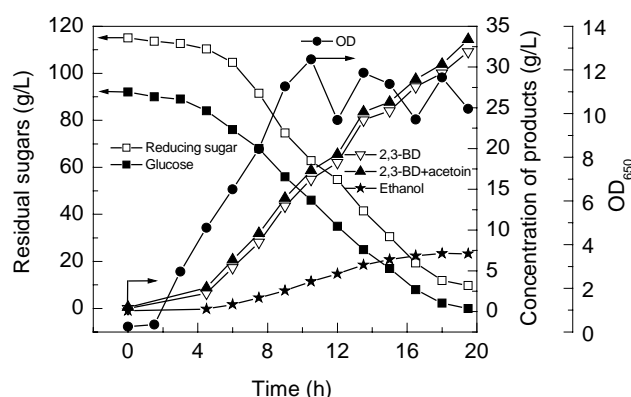


图 1 盾叶薯蓣糖化液批式发酵菌体、产物和残余糖浓度变化曲线

Fig.1 Time courses of 2,3-BD batch fermentation by *K. pneumoniae* with the saccharified hydrolyzate of *Dioscorea zingiberensis*

150.3 g/L, 维持残余葡萄糖浓度在 20~50 g/L, 结果如图 2 所示. 由图可知, 以薯蓣糖化液为底物, 菌体 OD 最高值为 14.33, 而以葡萄糖为底物, 菌体生长更为旺

盛, OD 值最高值达到 17.63, 而 2,3-BD 浓度基本相同, 分别为 31.70 g/L 和 31.85 g/L, 后者的 2,3-BD 比生成速率更低. 发酵结束时, 以薯蓣糖化液为底物的发酵液中 2,3-BD 浓度达到 80.20 g/L, 乙偶姻与 2,3-BD 的浓度之和达 86.19 g/L, 生产强度为 1.54 g/(L·h), 而以葡萄糖为底物的发酵液中 2,3-BD 最终浓度达 73.92 g/L, 乙偶姻与 2,3-BD 浓度之和最终达到 80.27 g/L, 生产强度为 1.43 g/(L·h), 前者比后者 2,3-BD 最终浓度、乙偶姻与 2,3-BD

浓度之和及生产强度分别提高了 8.50%, 7.38% 和 7.69%. 以薯蓣糖化液为底物时, 第 25 h 补加葡萄糖量过高, 造成菌体 OD 值迅速下降, 之后发酵进入稳定期. 随着发酵的进行, 底物浓度和消耗速度逐步降低, 但产物的生成速度未降低, 这说明发酵过程还存在一定潜力. 通过优化维持残余糖浓度、改变底物补加策略还可以进一步提高产物浓度.

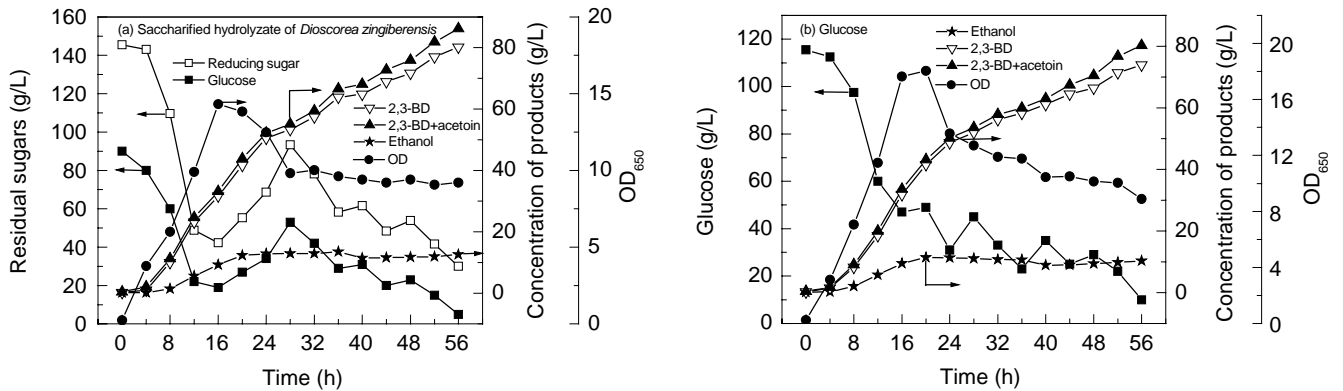


图 2 批式流加发酵菌体、产物和残余糖浓度变化曲线

Fig.2 Time courses of 2,3-BD fed-batch fermentation by *K. pneumoniae* with two kinds of substrate

### 3.4 批式流加发酵中的有机酸代谢

在批式流加发酵过程中, 以盾叶薯蓣糖化液为底物耗碱量为 0.42 mol, 以葡萄糖为底物耗碱量为 0.77 mol, 如图 3 所示. 可以看出, 以盾叶薯蓣糖化液为底物发酵时, 前 8 h 碱几乎不消耗, 从第 8 h 开始碱消耗速度迅速增加, 至 24 h 消耗速度开始降低, 32 h 后几乎不再消耗碱. 前 24 h 的碱消耗曲线与图 2(a)中菌体生长和产物生成曲线相吻合. 以葡萄糖为底物发酵生产 2,3-BD, 当菌体生长进入稳定期后, 碱消耗速度并未降低, 直至 32 h 后, 碱消耗速度开始下降, 42 h 后碱不再消耗. 这说

明在发酵开始阶段和发酵后期, 以葡萄糖和盾叶薯蓣糖化液为底物发酵生产 2,3-BD, 两者在有机酸代谢方面存在着明显的差异.

以盾叶薯蓣糖化液为底物时, 发酵液中柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸和丙酮酸初始浓度远高于以葡萄糖为底物时的浓度. 采用加标回收法对盾叶薯蓣水提液和糖化液进行有机酸定性分析, 结果证明盾叶薯蓣除含有淀粉、纤维素、薯蓣皂苷、果胶、油脂、蛋白质<sup>[18]</sup>外, 还含有柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸和丙酮酸等成分. 发酵液中的柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、丙酮酸初始浓度分别为 3.42, 4.53, 0.084, 11.86 和 0.14 g/L(图 4).

发酵开始阶段, 柠檬酸、苹果酸、延胡索酸和琥珀酸迅速下降, 4 h 时柠檬酸和延胡索酸浓度降到最低值, 分别为 2.89 和 0.014 g/L; 8 h 时苹果酸浓度降到最低值 (0.70 g/L), 到第 16 h 琥珀酸浓度降到最低值 (7.85 g/L), 但丙酮酸浓度则迅速上升, 第 4 h 丙酮酸浓度达到最大值 (0.72 g/L), 之后迅速下降; 8 h 时降至最低值 (0.17 g/L). 产生这种现象的原因是, 柠檬酸含量过高, 使柠檬酸合成酶活性受到抑制, 柠檬酸合成酶是三羧酸循环中的限速酶, 当它受到抑制时, 草酰乙酸和乙酰-CoA 的缩合反应变缓, 使整个三羧酸循环代谢减弱<sup>[19]</sup>. 另外, 过量的琥珀酸减弱了由磷酸烯醇式丙酮酸生成琥珀酸的趋势, 因此在发酵开始阶段, 丙酮酸迅速积累. 当柠檬酸、

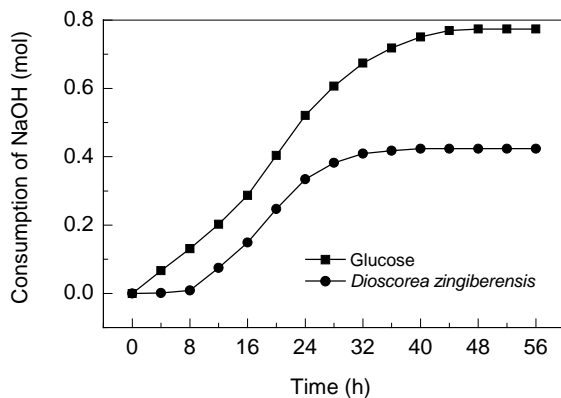


图 3 两种底物批式流加发酵中碱消耗曲线

Fig.3 NaOH consumption with two kinds of substrate during fed-batch fermentation

琥珀酸、苹果酸和延胡索酸浓度过高时，糖酵解作用的酶活性受到抑制，而异生作用的酶活性会得到促进<sup>[19]</sup>，一部分有机酸可能会作为碳源利用。随着柠檬酸、琥珀酸、苹果酸和延胡索酸浓度的降低，丙酮酸转化为乙酰-CoA 后进入三羧酸循环途径得到加强，发酵液中的柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸对三羧酸循环又有进一步的促进作用<sup>[20,21]</sup>，增强了菌体生长与产物生成的偶

联性。发酵进入稳定期后，柠檬酸、甲酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、乳酸浓度先后开始降低，只有丙酮酸、乙酸和乙醇浓度继续升高，说明在发酵稳定期，当柠檬酸、甲酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、乳酸达到一定浓度或残余糖浓度较低时，部分有机酸同样可能被作为碳源利用。

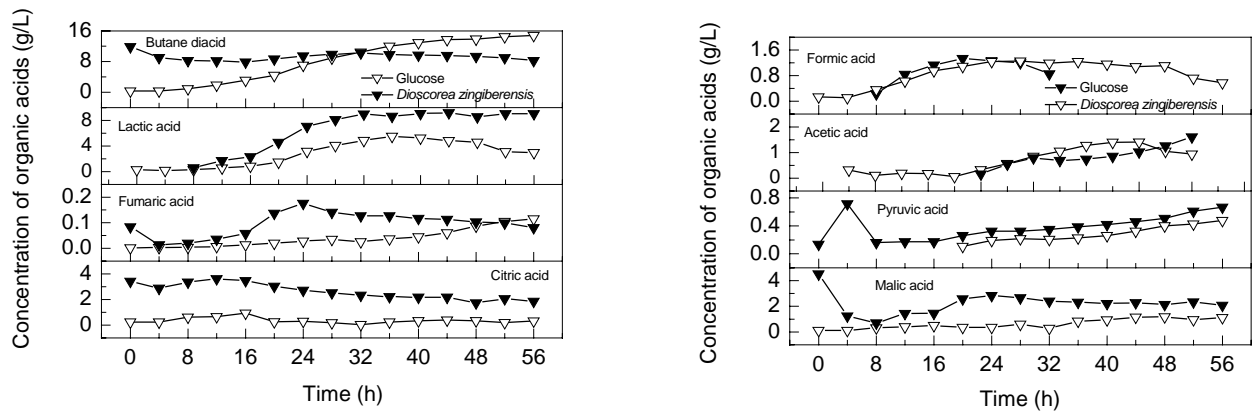


图4 两种底物批式流加发酵中各有机酸浓度变化曲线  
Fig.4 Time courses of organic acids during fed-batch fermentation with two kinds of substrate

以葡萄糖为底物时，琥珀酸积累最多，且随着时间延长逐渐增加，最高值为 14.78 g/L，丙酮酸和延胡索酸也随着发酵的进行逐渐积累，最高值分别为 0.48 和 0.12 g/L，柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸和乙酸先增加，在发酵后期又降低，其最高值分别为 0.94, 1.18, 5.52, 1.26 和 1.41 g/L(图 4)，说明在发酵后期，当发酵液中葡萄糖含量较低时，有机酸可能被当作碳源利用。这一点与

蒺藜糖化液发酵过程相类似，且两者均与图 3 中的碱消耗情况一致。

### 3.5 批式流加发酵的代谢流量分布

分别以盾叶薯蒺藜糖化液和葡萄糖为底物，批式流加发酵在对数生长期的代谢流量分布如图 5 所示，发酵终点的代谢流量分布如图 6 所示。

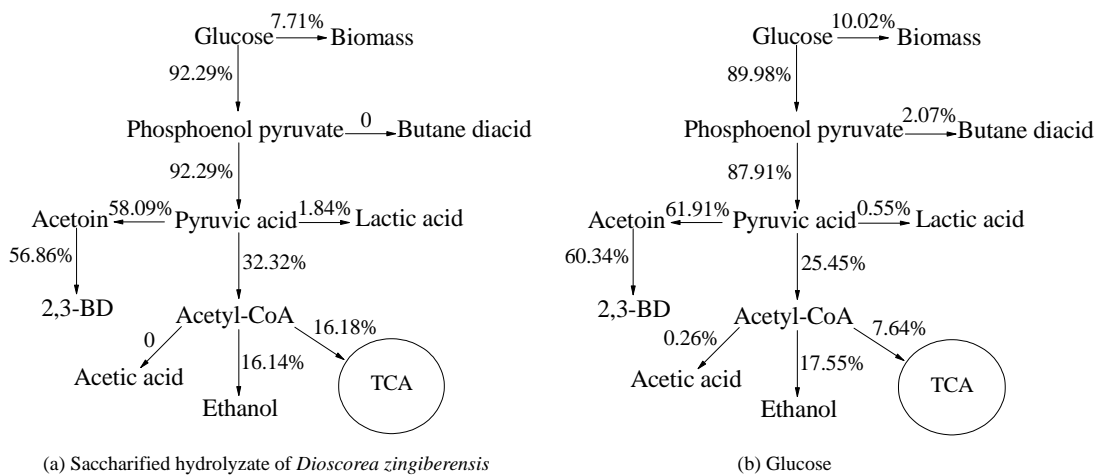


图5 批式流加发酵葡萄糖在对数生长期的代谢流量分布  
Fig.5 Metabolic flux distributions in logarithmic growth phase during fed-batch fermentation with two kinds of substrate

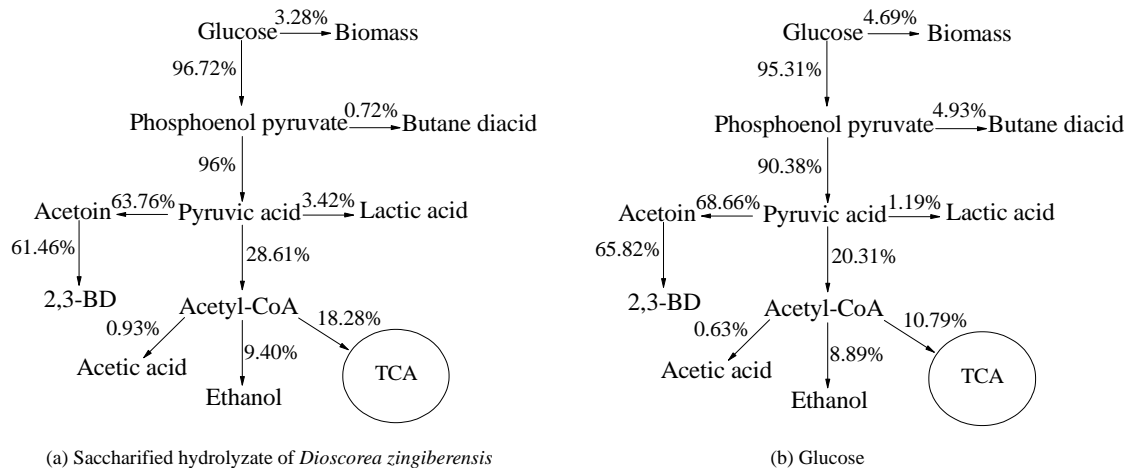


图 6 批式流加发酵葡萄糖在发酵终点的代谢流量分布

Fig.6 Metabolic flux distributions at the end of fed-batch fermentation with two kinds of substrate

从葡萄糖在克雷伯氏菌中的代谢途径<sup>[5]</sup>可以看出,三羧酸循环代谢能产生大量 ATP,乙酸的产生伴随 ATP 生成,这些对生产 2,3-BD 有利,而琥珀酸的产生伴随着 ATP 生成同时消耗了 NADH,乳酸和乙醇的生成也消耗 NADH,所以不利于 2,3-BD 的生成.由图 5, 6 可知,在对数生长期,以薯蓣糖化液为底物时,琥珀酸和乙酸途径并未消耗葡萄糖,而三羧酸循环途径消耗的葡萄糖远高于以葡萄糖为底物消耗的葡萄糖,这说明此时前者的菌体代谢所需能量主要由三羧酸循环途径提供.在发酵终点,以薯蓣糖化液为底物 2,3-BD 途径消耗葡萄糖的摩尔分数为 61.46%,生物量途径的摩尔分数为 3.28%,其他副产物途径的摩尔分数为 17.71%,而以葡萄糖为底物时其摩尔分数则分别为 65.82%, 4.69% 和 19.06%.此时,以薯蓣糖化液为底物琥珀酸途径消耗的葡萄糖少于以葡萄糖为底物,分别为 0.72% 和 4.93%,而三羧酸循环途径和乙酸途径则相反,三羧酸循环途径以薯蓣糖化液为底物和以葡萄糖为底物消耗的葡萄糖分别为 18.28% 和 0.93%,乙酸途径则分别为 10.79% 和 0.63%.这证明盾叶薯蓣中的有机酸成分有效地促进了葡萄糖在三羧酸循环途径和乙酸途径的代谢流,且减弱了琥珀酸途径的代谢流,从而提高了 2,3-BD 的浓度.

## 4 结论

(1) 以盾叶薯蓣糖化液为底物,采用批式流加方式补加固体葡萄糖,发酵 56 h,发酵液中 2,3-BD 浓度达到 80.20 g/L,乙偶姻与 2,3-BD 的浓度之和达到 86.19 g/L,生产强度为 1.54 g/(L·h),3 项指标分别比单以葡萄糖为底物时提高了 8.50%, 7.38% 和 7.69%,碱消耗量为 0.28 mol/L,比单以葡萄糖为底物时减少了 45.45%.

(2) 通过分析 2 种底物发酵过程中有机酸代谢和葡

萄糖的代谢流量分布,说明盾叶薯蓣中的有机酸成分能够有效促进三羧酸循环途径和乙酸途径的代谢流,减弱琥珀酸途径的代谢流,从而提高 2,3-BD 的浓度.

(3) 盾叶薯蓣经液化、糖化是发酵生产 2,3-BD 的良好底物.以盾叶薯蓣糖化液为底物发酵生产 2,3-BD 能获得较高浓度的 2,3-BD,同时对综合利用盾叶薯蓣、降低薯蓣皂素加工业的污染具有重要意义.

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Garg S K, Jain A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review [J]. Bioresour. Technol., 1995, 51: 103-109.
- [3] Syu M J. Biological Production of 2,3-Butanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55: 10-18.
- [4] 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.
- [5] 马成伟, 孙亚琴, 修志龙. 葡萄糖和木糖双底物生物转化法生产 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): 44-50.
- [6] Zeng A P, Biebl H, Deckwer W D. Production of 2,3-Butanediol in a Membrane Bioreactor with Cell Recycle [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, 34(4): 463-468.
- [7] Qin J Y, Xiao Z J, Ma C Q, et al. Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Using Glucose and Ammonium Phosphate [J]. Chin. J. Chem. Eng., 2006, 14(1): 132-136.
- [8] Berbert-Molina M A, Sato S, Silveira M M, et al. Ammonium Phosphate as a Sole Nutritional Supplement for the Fermentative Production of 2,3-Butanediol from Sugar Cane Juice [J]. Naturforsch., 2001, 56: 787-791.
- [9] 刘德华, 程可可, 刘宏娟, 等. 一种有粗淀粉原料生产 1,3-丙二醇和 2,3-丁二醇的方法 [P]. 中国专利: CN1710086, 2005-12-21.
- [10] Frazer F R, McCaskey T A. Effect of Components of Acid-hydrolysed Hardwood on Conversion of D-Xylose to 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Enzyme Microb. Technol., 1991, 13: 110-115.

- [11] 陈洪章, 孙付保. 一种直接酶解植物秸秆发酵生产 2,3-丁二醇的方法 [P]. 中国专利: CN101153291, 2008-04-02.
- [12] 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: CN 200810011692.4, 2008-06-02.
- [13] Wang Y X, Liu H, Bao J G, et al. The Saccharification-membrane Retrieval-hydrolysis (SMRH) Process: A Novel Approach for Cleaner Production of Diosgenin Derived from *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2008, 16: 1133-1137.
- [14] 黄进, 张肇煜, 李林, 等. 黄姜提取薯蓣皂甙元及葡萄糖的工艺研究 [J]. *农业工程学报*, 2001, 17(6): 119-122.
- [15] 徐徽, 蔡勇, 周春仙, 等. 黄姜提取皂素过程中淀粉的回收与利用 [J]. *化学工程师*, 2005, (8): 7-9.
- [16] 余盛树. 利用鲜黄姜发酵联产白酒和皂素的方法 [P]. 中国专利: CN 1389559A, 2003-01-08.
- [17] 李如亮. 生物化学实验 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998. 8-9.
- [18] 何江波. 黄姜综合利用新技术及其成分系统分析研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2003. 33.
- [19] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学, 第 3 版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 100, 157.
- [20] 管桂萍, 王红兵, 田杰生. 琥珀酸对产酸克雷伯氏菌好氧发酵甘油产 1,3-丙二醇的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(5): 14-17.
- [21] 王领民, 甘一如, 金平, 等. 有机酸对产丙二醇菌生长和生产的影响 [J]. *精细化工*, 2006, 23(5): 439-442.

## Fermentation of 2,3-Butanediol Using Saccharified Hydrolyzate from *Dioscorea zingiberensis*

LIU Guo-xing, WANG Yuan-hao, SUN Li-hui, SUN Ya-qin, DONG Yue-sheng, 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 fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from *Dioscorea zingiberensis* was investigated. The concentration and productivity of target products, organic acid metabolism and glucose metabolic flux distributions during the fermentation were analyzed. The results showed that organic acids in *Dioscorea zingiberensis* could promote metabolic flux in tricarboxylic acids cycle and acetic acid production pathway and decrease the butane diacid production pathway, thus, 2,3-butanediol production was increased. 80.20 g/L of 2,3-butanediol, 86.19 g/L of 2,3-butanediol and acetoin, corresponding to 1.54 g/(L·h) of productivity, were obtained using the hydrolyzate of *Dioscorea zingiberensis* as substrate and feeding glucose during fed-batch fermentation, which increased 8.50%, 7.38% and 7.69%, respectively, compared with that using glucose as sole substrate.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*; *Dioscorea zingiberensis*; 2,3-butanediol; metabolic flux distribution