

# 葡萄糖和木糖双底物生物合成 2,3-丁二醇的条件优化

张根林<sup>1</sup>, 邓辉<sup>1</sup>, 鲁建江<sup>1</sup>, 孙守玲<sup>1</sup>, 李春<sup>1,2</sup>

(1. 石河子大学化学化工学院, 新疆 石河子 832000; 2. 北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

**摘要:** 针对利用葡萄糖和木糖合成 2,3-丁二醇的 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 菌, 优化培养基组成与发酵条件, 围绕五、六碳糖共代谢的特点, 探讨简单可行的代谢调控方法. 结果表明, 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖为碳源, 5.75 g/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  为氮源, pH 值维持在 5.5, 培养温度 38 °C, 2,3-丁二醇浓度可达 19.24 g/L. 确定了 pH 值调控和外源添加维生素 C 的调控方式, 通过调节发酵过程中 pH 值于 5.5 左右, 使 2,3-丁二醇的产量提高了 16.4%; 添加 60 mg/L 维生素 C 调节培养基的氧化还原状态, 可使 2,3-丁二醇的产量提高 44.3%, 批次发酵 48 h, 2,3-丁二醇终浓度可达 33.47 g/L.

**关键词:** 2,3-丁二醇; 葡萄糖; 木糖; *Klebsiella pneumoniae*

**中图分类号:** TQ923      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1009-606X(2009)06-1174-04

## 1 前言

2,3-丁二醇(2,3-Butanediol)是重要的化工原料和液体燃料<sup>[1]</sup>, 在聚酯、香料、药物、航空航天等领域有广泛的应用前景<sup>[2]</sup>. 2,3-丁二醇的生产方法有化学法和生物发酵法 2 种, 化学法以石油裂解时产生的四碳类碳氢化合物为原料, 在高温、高压下水解制备; 生物发酵法采用可再生资源为原料, 是目前研究的热点. 利用天然微生物转化底物为 2,3-丁二醇仍然存在产物浓度低和底物转化率不高等问题.

能够合成 2,3-丁二醇的菌种有克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏杆菌(*Klebsiella oxytoca*)、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilic*)等<sup>[3]</sup>, 一般以葡萄糖等六碳糖为底物. 秦加阳等<sup>[4]</sup>利用 *Klebsiella pneumoniae* LN145, 以工业葡萄糖为原料, 发酵过程中通过补加固体葡萄糖的方式, 使 2,3-丁二醇的发酵产量达到了 84.0 g/L. 孙丽慧等<sup>[5]</sup>以含果糖和葡萄糖的菊芋块茎水解液为原料, *Klebsiella pneumoniae* 发酵 56 h 后 2,3-丁二醇浓度达到 81.47 g/L. Ma 等<sup>[6]</sup>通过 *Klebsiella pneumoniae* SDM 连续葡萄糖补加方式发酵 38 h, 使 2,3-丁二醇产量达 150.0 g/L. 但近年来发现某些菌株可利用木糖及阿拉伯糖等五碳糖为碳源, 将其转化为 2,3-丁二醇<sup>[7,8]</sup>. 如冯燕青等<sup>[9]</sup>利用一株 *Klebsiella oxytoca* ZU-03, 以木糖为原料, 2,3-丁二醇的最大产量达到 36.22 g/L. Ma 等<sup>[10]</sup>研究 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 发酵特性时发现, 此菌株也能利用葡萄糖和木糖合成 2,3-丁二醇. 因此, 本工作针对影响菌体生长、代谢途径及目标产物的发酵条件与过程调控两方面优化发酵工艺, 以提高产物浓度和发酵

水平.

## 2 材料与方 法

### 2.1 菌种

菌株 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 从新疆盐碱土壤中分离, 保存于新疆兵团化工绿色过程重点实验室.

### 2.2 培养基

菌种保存: LB 固体培养基.

种子培养基(g/L): 葡萄糖 40, 蛋白胨 10, 酵母粉 3, NaCl 5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.

基础发酵培养基: 参考 Nakashimada 等<sup>[11]</sup>的培养基, 碳源改为 40 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖.

### 2.3 实验方法

种子培养: 将保藏的菌种转接至固体 LB 培养基, 38 °C 活化 12 h, 然后接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 38 °C 温度下 150 r/min 培养 12 h, 获得种子细胞.

摇瓶发酵: 将种子液以 2%( $\varphi$ )的接种量接入装有 50 mL 基础发酵培养基的 300 mL 三角瓶中, 在 38 °C 温度下 150 r/min 发酵 48 h, 定时取样分析.

发酵培养: 将种子液以 2%( $\varphi$ )的接种量接入装有 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐(BIOTECH-5BG, 上海保兴生物设备工程有限公司)中, 在 38 °C 温度下 200 r/min 发酵 48 h, 定时取样分析.

### 2.4 分析方法

#### 2.4.1 生物量的测定

菌体生物量通过测定发酵液在 600 nm 波长下的吸光度  $\text{OD}_{600}$  来表征.

#### 2.4.2 糖的测定

葡萄糖浓度用 SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定。

木糖浓度采用岛津 LC-10A 液相色谱仪测定,测定条件为:示差折光检测器, Aminex HPX-87H 有机酸色谱柱,流动相为 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,流速 0.8 mL/min。

### 2.4.3 代谢产物分析

2,3-丁二醇、乙酸和乙醇浓度采用日本岛津公司的 GC-2010 气相色谱仪测定,色谱柱为 DB-WAX 柱(美国 Bio-Rid 公司),FID 检测器。载气为氮气,柱流量 5 mL/min,柱温 200 °C,进样口温度 200 °C,检测器温度为 210 °C。

## 3 结果与讨论

### 3.1 葡萄糖和木糖浓度对 2,3-丁二醇合成的影响

一般生产 2,3-丁二醇主要以葡萄糖为底物,*Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 也能利用木糖合成 2,3-丁二醇。以葡萄糖与木糖复合总浓度为 100 g/L 设计不同浓度比例,在温度 38.0 °C 及 pH 值 7.0 条件下摇瓶发酵 48 h,不同葡萄糖和木糖浓度比例对产 2,3-丁二醇的影响见表 1。

表 1 葡萄糖与木糖浓度比对产 2,3-丁二醇的影响

Table 1 Effect of concentration ratio of glucose to xylose on production of 2,3-butanediol

Glucos/xylose	2,3-Butanediol (g/L)	Acetate (g/L)	Ethanol (g/L)
1:9	9.62±0.12	1.62±0.05	2.23±0.08
2:8	11.50±0.23	1.55±0.06	2.32±0.10
3:7	13.22±0.25	1.26±0.05	2.44±0.09
4:6	12.05±0.16	1.39±0.08	2.36±0.12
5:5	14.40±0.22	1.22±0.05	2.61±0.08
6:4	15.82±0.14	1.08±0.09	2.68±0.07
7:3	8.80±0.14	1.06±0.08	2.99±0.12
8:2	6.76±0.16	1.13±0.08	4.46±0.08
9:1	4.62±0.10	1.27±0.06	4.26±0.10

表 1 表明,在所选糖比例范围内,当葡萄糖与木糖浓度分别为 60 和 40 g/L 时,*Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 菌株合成 2,3-丁二醇的效果较好。在不同葡萄糖与木糖比例下,副产物乙酸和乙醇的合成也发生变化。与木糖浓度为 40 g/L 时相比,当培养基含有 90% 和 10% 木糖时,发酵结束后乙酸的产量分别为 1.62±0.05 和 1.27±0.06 g/L,而乙醇的产量分别为 2.23±0.08 和 4.26±0.10 g/L。可以看出,随葡萄糖浓度增加和木糖浓度降低,乙酸产量呈降低趋势,乙醇产量呈增加趋势,这可能与菌株对 2 种糖的代谢有一定偏向性有关。在葡萄糖与木糖混合酸发酵中,葡萄糖主要通过糖酵解途径代谢,而木糖代谢需经过磷酸戊糖途径。Marwoto 等<sup>[12]</sup>研究证实,在含木糖的培养基中,菌体细胞内与乙酸形成有关的乙酸激酶活性比在葡萄糖为碳源的培养基中

高,而向乙醇方向代谢的磷酸酮酶的活性较低。

### 3.2 无机氮源对 2,3-丁二醇发酵的影响

在发酵温度 38 °C、初始 pH 7.0、葡萄糖与木糖浓度分别为 60 和 40 g/L 时,根据前期研究,按照 12:1 的碳氮比例,考察无机氮源对 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 菌摇瓶发酵生产 2,3-丁二醇的影响,结果见图 1。图 1 表明,相同氮浓度下,以硝酸铵为氮源时,2,3-丁二醇浓度最低,而以 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为氮源时 2,3-丁二醇浓度最高。细胞中氮含量仅次于碳和氧,氮是组成核酸和蛋白质的重要元素,对微生物生长有重要作用,NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 有利于菌体生长与代谢可能是由于其作为氮源的同时还作为磷源起作用。

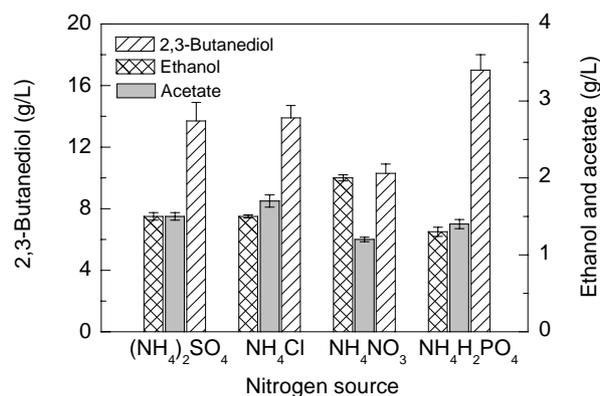


图 1 无机氮源对产 2,3-丁二醇的影响

Fig.1 Effect of nitrogen source on production of 2,3-butanediol

### 3.3 初始 pH 值与 pH 调控对产 2,3-丁二醇的影响

产 2,3-丁二醇代谢途径中有乙醇、乙酸、乳酸等副产物和 3-羟基丁酮等中间代谢产物,各种产物的生成均有特定的酶催化,相关酶的最适催化 pH 值各不相同,因此发酵液的 pH 值会影响产物的代谢<sup>[3,13]</sup>。在前述条件下采用不同初始 pH 值培养基发酵培养 48 h,获得图 2 所示的结果。表明在高 pH 值条件下培养 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li,不利于 2,3-丁二醇的合成,这是因为发酵液偏碱性,较易生成有机酸。随发酵培养基 pH 值升高,乙酸和乙醇浓度均呈上升趋势,发酵效率最佳时 pH 值为 5.5,2,3-丁二醇浓度达 16.50 g/L。据文献<sup>[7]</sup>报道,由于碱性条件有利于有机酸生成,菌株向 2,3-丁二醇的代谢流分配降低,相反,在酸性条件下有机酸产量可下降至碱性条件下的 1/10。在已发现的 2,3-丁二醇菌株中,大部分都符合这一规律,如 Raspoet 等<sup>[14]</sup>发现地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 在 pH 值为 6.0 时 2,3-丁二醇的产量最高,Jansen 等<sup>[15]</sup>发现 *K. oxytoca* 以木糖为碳源,pH 值为 6.0 时 2,3-丁二醇的产量也最高。*Aerobacter indologenes* 在厌氧条件下以 2% 的葡萄糖为底物,如 pH

值控制在 6.3 或以下, 2,3-丁二醇产量会提高 3.7 倍<sup>[16,17]</sup>.

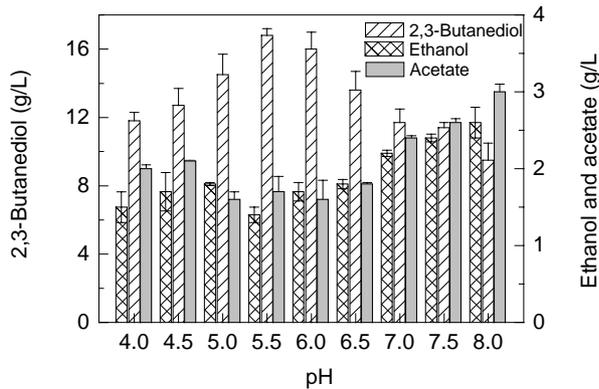


图2 初始 pH 对 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 代谢途径的影响  
Fig.2 Effect of initial pH on metabolism of *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li

本研究发现, 发酵 24 h 时发酵液的 pH 值降至 5.0, 发酵结束时降至 3.7, 说明在发酵过程中生成了有机酸等酸性物质. 为减少副产物产生, 在 5 L 发酵罐中利用 1 mol/L NaOH 溶液连续自动调节 pH 值于 5.5 左右, 结果见图 3. 发酵过程调节 pH 使 2,3-丁二醇的发酵浓度由 16.50 g/L 提高到 19.24 g/L, 提高了 16.4%.

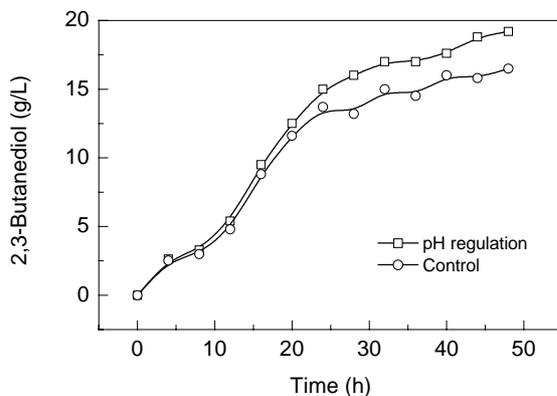


图3 pH 调控对产 2,3-丁二醇的影响  
Fig.3 Effect of pH regulation on production of 2,3-butanediol

### 3.4 添加维生素 C 对 2,3-丁二醇发酵的影响

以葡萄糖和木糖为底物发酵合成 2,3-丁二醇一般均需经丙酮酸、 $\alpha$ -乙酰乳酸、3-羟基丁酮, 最终转化为 2,3-丁二醇, 其中 3-羟基丁酮是 2,3-丁二醇合成的中间产物, 3-羟基丁酮到 2,3-丁二醇这一步是可逆的<sup>[18,19]</sup>. 此过程中起催化作用的酶是 3-羟基丁酮还原酶, 此酶以 NADH 或 NADPH 为辅酶, 需要还原性气氛, 所以可通过调节培养基的氧化还原状态影响酶的催化活性及 NADH 的再生效率, 进而影响 2,3-丁二醇的合成. 张延平等<sup>[20]</sup>曾在发酵产 1,3-丙二醇过程中通过外加还原剂的

方式调控细胞内 NADH/NAD 再生系统, 发现添加 150 mg/L 维生素可使 1,3-丙二醇的合成浓度提高 20%~30%. 因此, 在基础培养基中添加不同量的还原性物质维生素 C, 研究其对菌株代谢过程的影响. 图 4 表明, 与不加维生素 C 相比, 添加 60 mg/L 维生素 C 有利于 2,3-丁二醇生产, 可使 2,3-丁二醇产量提高 44.3%.

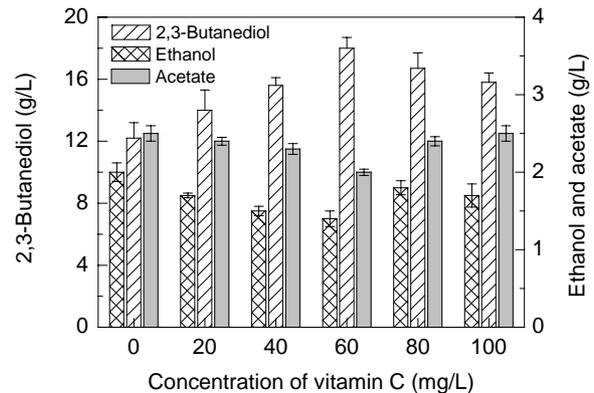


图4 维生素 C 对 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 代谢合成 2,3-丁二醇的影响  
Fig.4 Effect of vitamin C on production of 2,3-butanediol with *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li

### 3.5 批次发酵

在温度 38 °C、葡萄糖浓度 60 g/L、木糖浓度 40 g/L、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  浓度 5.75 g/L、添加 60 mg/L 维生素 C 的条件下, 控制发酵液 pH 于 5.5, 在发酵罐中发酵 48 h, 以 2 种糖为原料, *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 发酵产 2,3-丁二醇的结果如图 5 所示. 从图看出, 批次发酵中, 菌体生物量( $\text{OD}_{600}$ )在发酵 24 h 即达 8.12, 之后趋于稳定, 2,3-丁二醇的合成与菌体的生长呈一定的正相关, 副产物乙醇和乙酸分别为 2.54 和 4.66 g/L(图中未列出). 菌株对葡萄糖与木糖的利用速度相似, 发酵 36 h 后两者同时消耗完毕, 此时的 2,3-丁二醇浓度达 30.08 g/L, 发酵

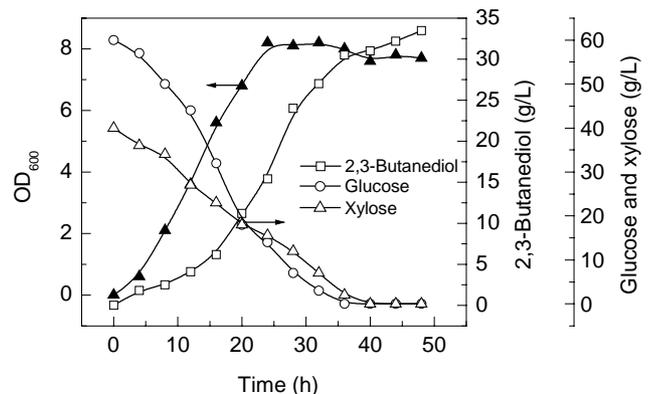


图5 *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 批次发酵生产 2,3-丁二醇  
Fig.5 Batch fermentation for production of 2,3-butanediol with *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li

结束时达 33.47 g/L, 2,3-丁二醇对糖的转化率为 0.33 g/g.

## 4 结论

(1) *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li 利用葡萄糖与木糖共代谢发酵生产 2,3-丁二醇, 2 种糖的利用速度相当, 优化后的发酵条件为 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖为碳源, 5.75 g/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  为氮源, pH 值维持在 5.5, 2,3-丁二醇产量达 19.24 g/L.

(2) 调节发酵体系的氧化还原状态有利于改善发酵过程. 添加 60 mg/L 维生素 C 可使 2,3-丁二醇的产量提高 44.3%, 达 33.47 g/L, 2,3-丁二醇对糖的转化率达 0.33 g/g.

### 参考文献:

- [1] Grover B P, Garg S K, Verma J. Production of 2,3-Butanediol from Wood Hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae* [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 1990, 6(3): 328–332.
- [2] Syu M J. Biological Production of 2,3-Butanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55(1): 10–18.
- [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] 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.
- [5] 孙丽慧, 王旭东, 戴建英, 等. *Klebsiella pneumoniae* 发酵菊芋生产 2,3-丁二醇的初步研究 [J]. 过程工程学报, 2009, 9(1): 161–164.
- [6] Ma C Q, Wang A L, Qin J Y, et al. Enhanced 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* SDM [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 82(1): 49–57.
- [7] Garg S, Jain A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review [J]. Bioresour. Technol., 1995, 51(2): 103–109.
- [8] Saha B C. Hemicellulose Bioconversion [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2003, 3: 279–291.
- [9] 冯燕青, 夏黎明. *Klebsiella oxytoca* 发酵木糖生产 2,3-丁二醇的研究 [J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 103–106.
- [10] Ma B B, Xu X L, Zhang G L, et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li under Different Aeration Strategies [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2009, 152: 127–134.
- [11] Nakashimada Y, Kanai K, Nishio N. Optimization of Dilution Rate, pH and Oxygen Supply on Optical Purity of 2,3-Butanediol Produced by *Paenibacillus polymyxa* in Chemostat Culture [J]. Biotechnol. Lett., 1998, 20(12): 113–118.
- [12] Marwoto B, Nakashimada Y, Kakizono T, et al. Metabolic Analysis of Acetate Accumulation during Xylose Consumption by *Paenibacillus polymyxa* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 64(1): 112–119.
- [13] Goleau D, Laube V M, Martin S M. The Effect of Various Atmospheric Conditions on the 2,3-Butanediol Fermentation from Glucose by *Bacillus polymyxa* [J]. Biotechnol. Lett., 1985, 7(1): 53–58.
- [14] Raspoet D, Pot B, Deyn D, et al. Differentiation between 2,3-Butanediol Producing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus polymyxa* Strains by Fermentation Product Profiles and Whole-cell Protein Electrophoretic Patterns [J]. Syst. Appl. Microbiol., 1991, 14(1): 1–7.
- [15] Jansen N B, Flickinger M C, Tsao G T. Production of 2,3-Butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 [J]. Biotechnol. Bioeng., 1984, 26(4): 362–369.
- [16] Mickelson M N, Werkman C H. Influence of pH on the Dissimilation of Glucose by *Aerobacter indologenes* [J]. J. Bacteriol., 1938, 36: 67–76.
- [17] 张刚, 杨光, 李春, 等. 生物法生产 2,3-丁二醇研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(6): 133–140.
- [18] 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): 44–50.
- [19] Ui S, Hosaka T, Mizutani K, et al. Acetylacetoin Synthase as a Marker Enzyme for Detecting the 2,3-Butanediol Cycle [J]. J. Biosci. Bioeng., 2002, 93(2): 248–251.
- [19] 张延平, 杜晨宇, 饶治, 等. 维生素 C 和 E 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的调控 [J]. 过程工程学报, 2005, 5(2): 197–200.

## Optimization of Cofermentation of Glucose and Xylose for Sythesis of 2,3-Butanediol

ZHANG Gen-lin<sup>1</sup>, DENG Hui<sup>1</sup>, LU Jian-jiang<sup>1</sup>, SUN Shou-ling<sup>1</sup>, LI Chun<sup>1,2</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China;

2. School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The production conditions of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li from glucose and xylose were optimized, and the regulation methods for 2,3-butanediol fermentation were also determined based on the metabolic features of hexose and pentose. The results displayed that suitable culture conditions were defined as glucose of 60 g/L, xylose of 40 g/L, ammonium dihydrogen phosphate of 5.75 g/L and pH of 5.5, and the concentration of 2,3-butanediol reached 19.24 g/L under the conditions when the strain was cultured at 38 °C. The yield of 2,3-butanediol was increased by 16.4% after maintaining the pH about 5.5 in the fermentation process. And 60 mg/L of vitamin C was added into medium to regulate the redox state of system, which made the yield of 2,3-butanediol improved by 44.3% of 2,3-butanediol fermentation. 33.47 g/L of 2,3-butanediol was obtained in batch fermentation for 48 h under optimum culture conditions.

**Key words:** 2,3-butanediol; glucose; xylose; *Klebsiella pneumoniae*