

生物制造不同立体构型2,3-丁二醇: 合成机理与实现方法

沈梦秋^a, 纪晓俊^{a,*}, 聂志奎^a, 夏志芳^a, 杨 晗^a, 黄 和^{a,b,#}

^a南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816

^b南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏南京 210009

摘要: 总结了不同 2,3-丁二醇立体异构体的生物合成机制, 以及有利于这些立体异构体高效合成的一些策略, 包括构建全细胞催化剂及利用合成生物学技术重建代谢途径等先进方法; 同时指出, 未来的研究重点是进一步利用合成生物学的方法, 以提高不同立体构型 2,3-丁二醇的生物合成能力, 并建立这些异构体高效可行的分离方法。

关键词: 2,3-丁二醇; 立体构型; 合成机理; 全细胞催化; 合成生物学

收稿日期: 2012-08-10. 接受日期: 2012-10-18. 出版日期: 2013-02-20.

*通讯联系人. 电话/传真: (025)83172094; 电子信箱: xiaojunji@njut.edu.cn

#通讯联系人. 电话/传真: (025)83172094; 电子信箱: biotech@njut.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金 (21006049); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2011CBA00807); 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2011AA02A207); 国家杰出青年科学基金 (21225626); 江苏省自然科学基金重点项目 (BK2011031); 长江学者和创新团队发展计划 (IRT1066); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

Biotechnological production of 2,3-butanediol stereoisomers: synthetic mechanism and realized methods

SHEN Mengqiu^a, JI Xiaojun^{a,*}, NIE Zhikui^a, XIA Zhifang^a, YANG Han^a, HUANG He^{a,b,#}

^aCollege of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, Jiangsu, China

^bState Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: 2,3-Butanediol, an important fine chemical, has been widely used in many areas. Containing two chiral centers, the molecule of 2,3-butanediol contains three stereoisomers, namely (*S,S*)-, (*R,R*)-, and *meso*-2,3-butanediol, which are especially crucial in providing chiral groups for the synthesis of fine chemicals and high-value pharmaceuticals. In this review, the synthetic mechanisms of different 2,3-butanediol stereoisomers are firstly revisited. Some strategies for efficient and economical pure 2,3-butanediol stereoisomers production, including constructing whole cell biocatalysts and constructing metabolic pathways using the emerging synthetic biology methods, are summarized. It is also pointed out that the focus of future research should be placed on improving the biosynthetic capability of different stereoisomers using the synthetic biology methods, and establishing efficient downstream separation methods for economical 2,3-butanediol stereoisomers recovering process.

Key words: 2,3-butanediol; stereoisomer; synthetic mechanism; whole cell catalysis; synthetic biology

Received 10 August 2012. Accepted 18 October 2012. Published 20 February 2013.

* Corresponding author. Tel./Fax: +86-25-83172094; E-mail: xiaojunji@njut.edu.cn

Corresponding author. Tel./Fax: +86-25-83172094; E-mail: biotech@njut.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21006049), the National Key Basic Research and Development Program of China (973 Program, 2011CBA00807), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2011AA02A207), the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (21225626), the Key Project of Jiangsu Natural Science Foundation (BK2011031), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT1066), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

1. 前言

步入21世纪,由于日益严重的资源、能源和环境压力,人类社会的可持续发展面临前所未有的挑战,促使传统的化工、制药、食品、材料等工业制造领域的生产技术必须发生根本性变革.生物制造提供了更好的技术选择和解决方案,并已逐渐渗透到传统制造业中,生物制造能够减少能耗、物耗和污染物排放,大幅度降低生产成本,加速传统产业升级,将推进“绿色制造”,发展绿色GDP^[1].

手性化学品广泛应用于医药、农业、食品、材料等领域,在国计民生中占据极其重要的地位.研究和制造和使用光学纯的化学品,对于保障我国国民健康和保护生态环境具有重要意义.以手性化学品为代表的精细化学品具有很高的产品附加值,但其制造过程存在资源消耗大、能耗高、污染重等问题,其生产水平已成为衡量一个国家或地区化工发展水平的重要标志.生物制造具有高度的选择性和独特的环境优势,因而可为手性化学品生产提供更好的技术选择和解决方案,在工业可持续发展中显示巨大的潜力.

2,3-丁二醇是一种重要的化工原料,广泛应用于化工、食品、燃料以及航空航天等多个领域,具有良好的应用前景^[2];同时,通过特定的化学反应,2,3-丁二醇可以衍生出多种重要的化学品如3-羟基丁酮(又称乙偶姻,广泛应用于香料领域)^[2]、甲乙酮(优良溶剂)及1,3-丁二烯(在合成橡胶、聚酯及聚亚胺酯等领域广泛应用)^[3,4],因此被视作一种极具潜力的平台化合物.2,3-丁二醇分子内含有两个手性碳原子,在精细化学品以及手性药物合成方面具有极其重要的应用价值.在前期研究的基础上,本文介绍了微生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的代谢机理,总结了不同立体构型2,3-丁二醇的生物制造实现方法,并对未来研究的重点方向进行了展望.

2. 不同立体构型2,3-丁二醇: 重要应用与生产方法

2,3-丁二醇存在3种立体异构体: (*S,S*)-2,3-丁二醇(右旋型)、(*R,R*)-2,3-丁二醇(左旋型)及*meso*-2,3-丁二醇(内消旋型),其结构如图1所示^[5].

这3种立体异构体除了具有混旋型2,3-丁二醇的一般功能外,还具有一些特殊功能.首先,3种单一立体构型的2,3-丁二醇由于存在各自不同的手性基团及空间构型,成为精细化学品、手性试剂及手性药物等高价值物质合成过程中的重要构件分子^[6],例如, (*R,R*)-2,3-丁二醇可用于合成药物阿司匹林的关键中间体丁二醇-对甲苯磺酸酯^[7],同时其还可以用于合成光学活性的2-甲基-1,4-丁二醇,2-甲基-1,4-丁二醇及其衍生物是合成各种手性近晶型聚酯液晶材料及手性天然生物活性物质的重要中间体^[8,9];其次, (*R,R*)-2,3-丁二醇的凝固点低至-60 °C,可作为优良的抗冻剂^[10];另外, (*S,S*)-2,3-丁二醇对动物体内腺苷酸环化酶活性具有抑制作用,因而可用作探究环细胞内腺苷酸信号通路机制的重要参考因子^[11].由此可见,不同立体构型的2,3-丁二醇具有卓越的应用前景;但如何专一并大量生产高纯度的2,3-丁二醇立体异构体一直是阻碍其工业化生产的关键因素.

目前,不同立体构型2,3-丁二醇的生产主要采用化学合成法:首先由石油裂解物中分离得到1-丁醇,后者脱水得1-丁烯,再经加成得2-氯-丁烷,再消除得2-丁烯,再与次溴酸反应生成3-溴-2-丁醇;然后在碱液中水解可得到2,3-丁二醇的外消旋混合物;最后通过外消旋体的拆分得到不同立体构型的2,3-丁二醇^[12].上述化学合成法过程繁琐,易产生污染环境的多种废液,而且最后通过化学法进行手性拆分,不仅成本高而且实现难度大,因而降低了大规模生产不同2,3-丁二醇立体异构体的可行性.相对而言,生物制造因具有原料来源可再生、工艺简单、环境友好等优点而广受青睐^[2].利用微生物卓越的代谢功能进行2,3-丁二醇的生物制造已成为当前研究的热点;在对微生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的代谢机理逐渐清晰的基础上,进一步利用合成生物学等先进技术手段构建高产高纯度单一构型2,3-丁二醇的工程菌株是当前该领域研究

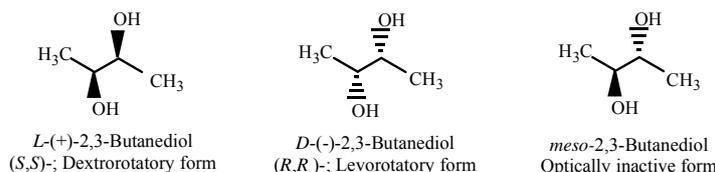


图1 2,3-丁二醇三种立体异构体

Fig. 1. Three stereoisomers of 2,3-butanediol.

与关注的焦点. 本课题组在微生物发酵生产2,3-丁二醇方面做了不少工作, 通过研究菌种选育、遗传改造、培养基优化、发酵策略改良等方面, 提高了产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)发酵生产混旋型2,3-丁二醇的能力^[13-18]; 同时, 利用合成生物学手段进行2,3-丁二醇立体异构体生物合成的研究也正在进行中, 目前已完成了产(*R,R*)-2,3-丁二醇基因工程菌的构建, 并在初步发酵过程中显示出较强的产物合成能力.

3. 微生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的代谢机理

3.1. 产不同立体构型2,3-丁二醇的微生物

许多微生物都能够以单糖为底物通过发酵生成2,3-丁二醇, 但它们的生产能力相差较大^[19]. 在细菌中, 具有良好生产潜力的2,3-丁二醇合成菌株主要集中于克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、类芽孢杆菌属(*Panobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)及沙雷氏菌属(*Serratia*)^[20]; 在真菌中, 一些酵母也具有生物合成2,3-丁二醇的能力, 但生产力相对较低, 应用前景受限^[21].

微生物合成2,3-丁二醇立体异构体的种类和比例取决于微生物种类及培养发酵条件, 目前已知的微生物一般都生成两种2,3-丁二醇立体异构体的混合物^[20,21], 至今还未发现单一生成某种构型2,3-丁二醇的微生物. 例如, 克雷伯氏菌属主要产生*meso*-2,3-丁二醇, 同时产生少量的(*S,S*)-2,3-丁二醇, 而类芽孢杆菌属则主要产生(*R,R*)-2,3-丁二醇, 同时产生少量的*meso*-2,3-丁二醇. 由于不同立体构型2,3-丁二醇的物理化学性质十分相近, 分离非常困难, 因此, 实现单一立体构型2,3-丁二醇的生物制造很有必要.

3.2. 不同立体构型2,3-丁二醇生物合成的代谢途径及机理

微生物中典型的2,3-丁二醇合成途径是以糖类为底物经糖酵解生成丙酮酸, 再经由 α -乙酰乳酸、3-羟基丁酮等前体最终转化成2,3-丁二醇. 此过程中伴随有副产物乙醇、乙酸、乳酸、甲酸、丁二酸等生成^[21]. 2,3-丁二醇合成途径中的关键酶有 α -乙酰乳酸合成酶(α -ALS)、 α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC)和2,3-丁二醇脱氢酶(又称3-羟基丁酮还原酶, BDH或AR)三种^[22,23]. 另外, 在蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)及尿素微球菌(*Micrococcus urea*)中发现了另一种2,3-丁二醇合成途径, 被称为2,3-丁二醇循

环. 该途径中的关键酶是乙酰羟基丁酮合成酶(AACSase)和乙酰羟基丁酮还原酶(AACRase). 前者催化生成乙酰羟基丁酮, 后者将乙酰羟基丁酮转化成2,3-丁二醇的前体物质乙酰丁二醇, 最后经转化生成2,3-丁二醇^[24,25].

长期以来, 微生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的代谢途径及机理一直是科学家们研究及争论的焦点; 争论的关键围绕着2,3-丁二醇合成途径中立体特异性酶的种类及内消旋化合物的生成机制展开. 早在1960年, Taylor等^[26]就假设, 存在3-羟基丁酮消旋酶和两种立体特异性的2,3-丁二醇脱氢酶(即(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶和(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶), 以此解释微生物能生成不同2,3-丁二醇立体异构体的原因; 但是, 他们一直没能证明有3-羟基丁酮消旋酶的存在. 1983年, Voloch等^[22]在研究*K. pneumoniae*中2,3-丁二醇立体异构体生成机制时同样认为存在3-羟基丁酮消旋酶, 并在酶学水平上证实由该菌内的 α -乙酰乳酸反应生成3-羟基丁酮仅为*R*-3-羟基丁酮, 进而提出, 由3-羟基丁酮消旋酶催化引起了*S*-3-羟基丁酮的生成, 并进一步合成(*S,S*)-2,3-丁二醇, 然而他们也仅能在新配制的无细胞提取物中检测到极少量的3-羟基丁酮消旋酶活性, 并不足以作为该酶存在的有力证据. 也有些与上述3-羟基丁酮消旋酶假说不同的观点, 1978年, Höhn-Bentz等^[27]发现, 2,3-丁二醇生产菌的无细胞提取物均能将双乙酰转化为3-羟基丁酮及2,3-丁二醇, 故提出可能存在双乙酰还原酶, 催化双乙酰反应生成*S*-3-羟基丁酮, 再由(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶催化合成(*S,S*)-2,3-丁二醇. 综上所述, 合成过程中必定存在不同立体特异性的2,3-丁二醇脱氢酶, 但对于*S*-3-羟基丁酮及*meso*-2,3-丁二醇的合成机理仍不十分清楚.

随后, 日本山梨大学的Ui教授等^[23,28]建立了2,3-丁二醇及3-羟基丁酮所有立体异构体的制备、分离与定量检测方法; 再通过观察不同立体构型化合物之间的转化关系和对相关酶蛋白的分离鉴定, 分别提出了典型菌株*K. pneumoniae*和*P. polymyxa*中不同立体构型2,3-丁二醇的生物合成模型^[29,30], 得到了绝大部分研究者的认可.

*K. pneumoniae*主要产生*meso*-2,3-丁二醇, 并生成部分(*S,S*)-2,3-丁二醇. Ui等^[29]提出, 该菌中不同立体构型2,3-丁二醇的生成依赖于3种具有立体特异性的2,3-丁二醇脱氢酶, 分别为*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶(*R*-3-羟基丁酮生成型)、*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶(*S*-3-

羟基丁酮生成)及(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶. 如图2所示^[29], *S*-3-羟基丁酮和*R*-3-羟基丁酮分别经由特异性识别不同构型3-羟基丁酮的 *meso*-2,3-丁二醇脱氢酶的催化生成*meso*-2,3-丁二醇, 而(*S,S*)-2,3-丁二醇则由(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶催化*S*-3-羟基丁酮转化生成. 该模型还假设(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶可催化双乙酰生成*S*-3-羟基丁酮, 由于双乙酰在细胞内是由 α -乙酰乳酸经过非酶氧化过程产生的, 产量相对较少, 因此*K. pneumoniae* 多产生*meso*-2,3-丁二醇而少产生(*S,S*)-2,3-丁二醇. Ui等^[29]在实验过程中并未发现3-羟基丁酮消旋酶的存在; 他们推测, 先前Voloch 等^[22]在无细胞提取物中发现的少许3-羟基丁酮消旋酶活性可能是由于*S*-3-羟基丁酮与 *R*-3-羟基丁酮在经由中间体*meso*-2,3-丁二醇发生相互转化过程而引起的.

*P. polymyxa*主要产生(*R,R*)-2,3-丁二醇, 同时还有很少量的*meso*-2,3-丁二醇. 在Ui等^[30]建立的新模型(见图3)中, 他们证明*P. polymyxa*中不同立体构型2,3-丁二醇的生物合成途径基于两种酶的存在: (1) 新发现的依赖于NADPH的双乙酰还原酶, 催化双乙酰生成*S*-3-羟基丁酮的单向反应; (2) (*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶, 该酶既可分别催化*R*-3-羟基丁酮与(*R,R*)-2,3-丁二醇之间及*S*-3-羟基丁酮与*meso*-2,3-丁二醇之间的可逆

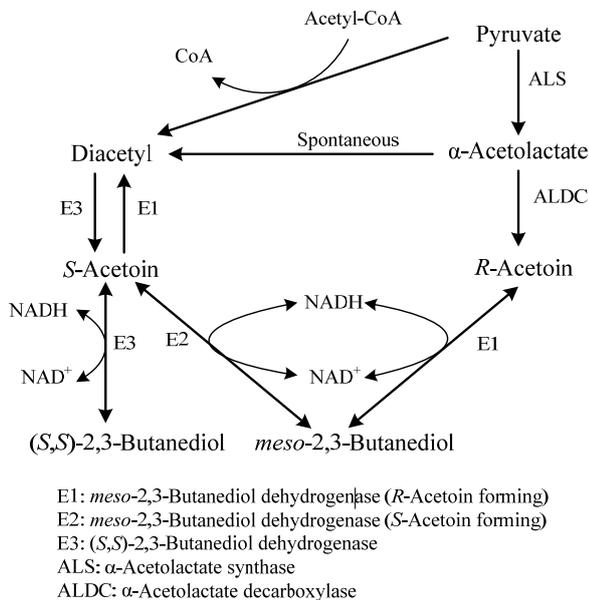


图2 肺炎克雷伯氏菌中2,3-丁二醇立体异构体的合成机制模型

Fig. 2. Proposed mechanism for the biosynthesis of 2,3-butanediol stereoisomers in *Klebsiella pneumoniae*.

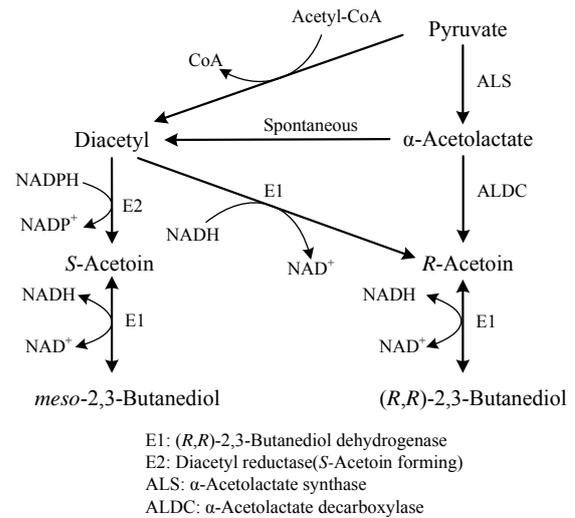


图3 多粘类芽孢杆菌中2,3-丁二醇立体异构体的合成机制模型

Fig. 3. Proposed mechanism for the biosynthesis of 2,3-butanediol stereoisomers in *Panebacillus polymyxa*.

转化, 同时又具备催化双乙酰还原生成 *R*-3-羟基丁酮的能力. 这两种酶均经分离后在体外进行了立体特异性催化的检测, 相应酶的活性与模型阐述一致. 在该模型建立过程中, 同样没能在*P. polymyxa*中发现3-羟基丁酮消旋酶的存在^[30].

除了上述以2,3-丁二醇经典代谢途径为基础的立体异构体合成机制外, Ui 等^[31]还在1997年提出了一种涉及2,3-丁二醇循环的立体异构体合成机制; 以*B. cereus* YUF-4为实验菌株, 通过其无细胞提取物在体外进行由乙酰羟基丁酮(AAC)至乙酰丁二醇(ABD)的模拟反应, 如图4所示. 人们发现该菌内存在两种不同立体特异性的乙酰羟基丁酮还原酶(AACRase)催化该还原反应: (1) 以NADPH为辅酶, 催化乙酰乙偶姻生成(*3R,4R*)-乙酰丁二醇; (2) 以NADH为辅酶, 催化乙酰乙偶姻生成(*3S,4R*)-乙酰丁二醇. 然后这两种不同构型的乙酰丁二醇在乙酰丁二醇水解酶的催化下分别生成(*R,R*)-2,3-丁二醇和 *meso*-2,3-丁二醇, 使得拥有2,3-丁二醇循环的微生物体内合成不同立体构型2,3-丁二醇^[31].

对不同2,3-丁二醇立体异构体合成途径和机理的研究远不止于此, 在Ui等提出较系统的2,3-丁二醇立体异构体合成机制的基础上, 各国研究者不间断地鉴定和分析不同微生物中立体特异性的2,3-丁二醇脱氢酶及其编码基因, 均可为构建产生单一立体构型2,3-

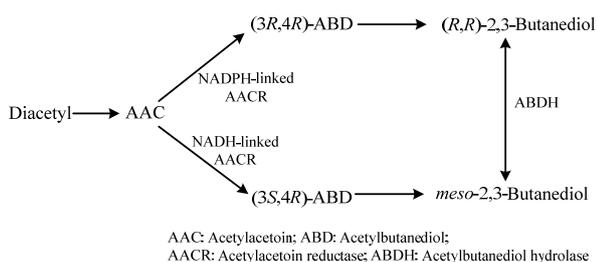


图4 蜡状芽孢杆菌中2,3-丁二醇立体异构体的合成机制模型

Fig. 4. Proposed mechanism for the biosynthesis of 2,3-butanediol stereoisomers in *Bacillus cereus*.

丁二醇菌株的遗传改造提供指导。2000年, González等^[32]从酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中鉴定了一种以NADH为辅酶的(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶,其催化活性较弱,但这是真核生物中鉴定的第一种2,3-丁二醇脱氢酶。2008年, Nicholson^[33]鉴定了*B. subtilis* 168菌株中2,3-丁二醇脱氢酶编码基因*ydjL*,该基因编码的酶催化3-羟基丁酮生成的产物随后被证实为(*R,R*)-2,3-丁二醇,故*ydjL*为一种(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因。2010年,Ui课题组^[34]利用结晶学、定点突变及动力学分析等技术手段对*K. pneumoniae* IAM 1063的*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶及解糖短杆菌(*Brevibacterium saccharolyticum*) C-1012的(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶进行分析,从酶蛋白的晶体结构角度出发,探讨了这两种酶立体专一性差异的本质。2011年,Yu等^[35]从*P. polymyxa* ATCC 12321中鉴定了一种2,3-丁二醇脱氢酶,经过体外酶蛋白特性分析,证实该酶为一种新型的(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶,且比以往发现的立体特异性2,3-丁二醇脱氢酶的催化活性更高。同年,Takeda等^[36]从一株分支杆菌属(*Mycobacterium*)菌株中纯化得到NADH依赖型的(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶,将其基因序列与浅黄分支杆菌(*Mycobacterium gilvum*)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)及*Mycobacterium vanbaalenii*等的基因组序列进行同源性对比,推测在分支杆菌属的基因组中广泛分布着2,3-丁二醇脱氢酶的编码基因。

随着研究的不断深入,有关微生物中不同立体构型2,3-丁二醇合成途径及关键酶类的研究层出不穷,不断完善了不同微生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的机理解析,并为实现专一立体构型2,3-丁二醇的合成奠定了基础。

4. 不同构型2,3-丁二醇生物制造的实现方法

由于自然存在的产生2,3-丁二醇微生物通常无法合成高纯度单一立体构型的2,3-丁二醇,因此越来越多的研究者设法利用基于基因工程改造的全细胞催化技术,以及新兴发展起来的合成生物学技术手段,来实现2,3-丁二醇不同立体异构体的高纯度生产。表1所示即近年来利用上述技术手段尝试单一立体构型2,3-丁二醇生产的实例。

4.1. 全细胞催化技术

在2,3-丁二醇3种立体异构体中, (*S,S*)-2,3-丁二醇由于其前体双乙酰在天然途径中大多由非酶氧化过程生成,浓度偏低,因此目标产物较难通过糖类物质的直接发酵得到较高浓度的积累,于是科学家们设法利用基于特异性表达(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶的全细胞催化获得高纯度的(*S,S*)-2,3-丁二醇。全细胞催化技术是指利用完整的生物有机体作为催化剂进行化学转化的过程,该过程又称为生物转化。在生物制造的范畴中,现已通过全细胞催化的方法获得了一些传统生物法难以得到的化学品^[37-39],特别是具有光学活性的纯物质。例如,王丹等^[40]自行筛选得到酵母菌BTY 18-6,以该菌的静息细胞为催化剂,可在水相中将丙酮酸乙酯不对称还原成(*S*)-乳酸乙酯,对映体纯度为92.1%。另外,敬科举等^[41]则以克隆有NADPH依赖型醛基还原酶基因的重组大肠杆菌为全细胞催化剂,催化4-氯乙酰乙酯的不对称还原,得到了几乎是光学纯的(*R*)-(+)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯。在各国科学家的不断努力下,全细胞催化技术日趋成熟。

在研究全细胞催化技术用于(*S,S*)-2,3-丁二醇生产的过程中,逐渐分化出两条不同技术路线。一条路线是以2,3-丁二醇的混旋物为底物,通过全细胞催化达到手性拆分的目的,从中拆分出较高纯度的(*S,S*)-2,3-丁二醇。2002年,Yamada-Onodera等^[42]将多形汉森酵母(*Hansenula polymorpha*) D1-1菌株的甘油脱氢酶编码基因克隆至*E. coli* HB101,该重组菌可分别将(*R,R*)-2,3-丁二醇和*meso*-2,3-丁二醇催化生成*R*-3-羟基丁酮和*S*-3-羟基丁酮。因此,以110 mmol/L外消旋2,3-丁二醇混合物为底物,经过重组菌的催化作用,除了生成2种立体构型的3-羟基丁酮之外,最终可拆分得到15 mmol/L的(*S,S*)-2,3-丁二醇,ee值为92%。Xiao等^[43]将源自*B. subtilis*的(*R,R*)-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因*ydjL*与源自短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)的NADH氧

表1 生物合成不同立体构型2,3-丁二醇的实现方法及研究水平
 Table 1 Research progress on the biosynthesis of different 2,3-butanediol stereoisomers

Product	Purity (%)	Concentration (g/L)	Yield (g/g)	Substrate	Crucial enzyme	Host strain	Ref.
(S,S)-2,3-BD	95	3.70	0.37	Racemic AC	(S,S)-2,3-BDH from <i>Brevibacterium saccharolyticum</i> C-1012	<i>E. coli</i> JM109	[45]
(S,S)-2,3-BD	92	1.35	0.14	2,3-BD mixture	Glycerol dehydrogenase from <i>Hansenula polymorpha</i> DL-1	<i>E. coli</i> HB101	[42]
(S,S)-2,3-BD	98	2.20	0.93	Diacetyl	meso-2,3-BDH (R-AC forming) from <i>K. pneumoniae</i> IAM 1063; (S,S)-2,3-BDH from <i>Br. Sacchar-olyticum</i> C-1012	<i>E. coli</i> JM109	[46]
(S,S)-2,3-BD	>99	2.40	0.12	2,3-BD mixture	(R,R)-2,3-BDH from <i>B. subtilis</i> 168; NADH oxidase from <i>Lactobacillus brevis</i> CICC 6004	<i>E. coli</i> BL21	[43]
(S,S)-2,3-BD	96.9	12.50	0.36	Glucose	Native	<i>K. pneumonia</i> CICC 10011; <i>B. subtilis</i> 168	[44]
(S,S)-2,3-BD	>99	26.80	0.67	Diacetyl	(S,S)-2,3-BDH from <i>Enterbacter cloacae</i> ssp. <i>dissolvens</i> SDM	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	[47]
(R,R)-2,3-BD	>99	6.10	0.31	Glucose	sADH from <i>Thermoanaerobacter brockii</i>	<i>E. coli</i> JCL260	[10]
	>99	5.80	0.30	Glucose	sADH from <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> JCL260	
	>99	5.10	0.29	Glucose	sADH from <i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>E. coli</i> JCL260	
(R,R)-2,3-BD	92	1.98	0.034	Glucose	Acetoin reductase from <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	[51]
(R,R)-2,3-BD	>98	1.80	0.033	Glucose	Native	<i>Bacillus licheniformis</i> BL5	[53]
	>98	6.50	0.23	Glucose	Native	<i>B. licheniformis</i> BL8	
	>98	6.08	0.23	Glucose	Native	<i>B. licheniformis</i> BL8	
	>98	6.91	0.22	Xylose	Native	<i>B. licheniformis</i> BL8	
meso-2,3-BD	98	17.70	0.18	Glucose	ALS, ALDC and meso-BDH from <i>Klebsiella pneumoniae</i> IAM 1063	<i>E. coli</i> JM109	[48]
meso-2,3-BD	—	1.12	0.29	Glucose	meso-BDH from <i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i> YYC202 (DE3) <i>ldhA'ilyC'</i>	[49]
meso-2,3-BD	—	13.00	0.43	Glucose	meso-BDH from <i>K. pneumoniae</i> 14sp-N	<i>E. coli</i> JM109 <i>ldhA'pta'adhE'poxB'</i>	[50]
meso-2,3-BD	99	15.70	0.31	Glucose	meso-sADH from <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> W3110	[52]
	99	6.90	0.21	Crude glycerol	KCTC 2242		
meso-2,3-BD	—	5.50	0.80	Cellodextrin	meso-BDH from <i>K. pneumoniae</i> ; cellodextrinase from <i>Saccharophagus</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ldhA'pta'ackA'poxB'</i>	[54]

AC—Acetoin; 2,3-BD—2,3-Butanediol; ALS— α -Acetolactate synthase; ALDC— α -Acetolactate decarboxylase; BDH—2,3-Butanediol dehydrogenase; sADH—Secondary alcohol dehydrogenase.

化酶编码基因 nox 共表达于*E. coli*, 构建出一种全细胞催化剂. 其中 NADH 氧化酶的过表达可提供足量的 NAD^+ , 而(R,R)-2,3-丁二醇脱氢酶则可在 NAD^+ 充足的情况下分别将 meso-2,3-丁二醇和(R,R)-2,3-丁二醇转化成 S-3-羟基丁酮和 R-3-羟基丁酮. 因此, 利用该重组菌进行全细胞催化, 可从 2,3-丁二醇外消旋混合物中拆分得到高纯度的(S,S)-2,3-丁二醇, 最终在 10 h 催化过程中, 从 20 g/L 的 2,3-丁二醇外消旋混合物中拆分出 2.4 g/L 的(S,S)-2,3-丁二醇, ee 值高达 99% 以上. 2011 年, Liu 等^[44]利用 *K. pneumoniae* 固定化细胞和 *B. subtilis* 固定化细胞的两步催化, 从葡萄糖出发得到 (S,S)-2,3-丁二醇. 葡萄糖先经过 *K. pneumoniae* 细胞的作用生成 meso-2,3-丁二醇和 (S,S)-2,3-丁二醇的混合物; 其中 meso-2,3-丁二醇经 *B. subtilis* 细胞的催化作用转化成

S-3-羟基丁酮, 而(S,S)-2,3-丁二醇因不被转化而得到积累. 利用这种手性拆分的策略, 最终得到 12.5 g/L (S,S)-2,3-丁二醇 (ee 值为 96.2%), 相对于葡萄糖的转化率为 0.36 g/g. 综上不难发现, 利用全细胞催化剂进行手性拆分受限于混旋底物中(S,S)-2,3-丁二醇的浓度和比例, 难以实现产物高度积累, 其应用前景并不广泛.

另一条路线是将全细胞催化剂以(S,S)-2,3-丁二醇的前体双乙酰或 3-羟基丁酮为底物直接催化得到目标产物, 可通过增加底物浓度及改善细胞催化效率来提高目标产物的积累量. 2001 年, Ui 等^[45]初次利用全细胞催化技术生产(S,S)-2,3-丁二醇. 他们将来自 *B. saccharolyticum* C-1012 菌株的(S,S)-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因过表达于大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 中, 以工业级 3-羟基丁酮的外消旋混合物为底物, 利用

(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶特异性识别并催化*S*-3-羟基丁酮的特性, 重组菌最终由1%的3-羟基丁酮混旋物转化生成0.37%的(*S,S*)-2,3-丁二醇. 2004年, Ui等^[46]又将来自*B. saccharolyticum*的双乙酰还原酶编码基因与来自*K. pneumoniae*的(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因克隆至*E. coli*中, 首次完整地建立了(*S,S*)-2,3-丁二醇的转化途径, 以双乙酰为底物, 重组菌由3 g/L的双乙酰转化生成2.2 g/L的(*S,S*)-2,3-丁二醇, 相对于双乙酰的得率为0.73 g/g, 进一步提高了催化效率. 2012年, Li等^[47]将来自*Enterobacter cloacae* ssp. *dissolvens*菌株的(*S,S*)-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因克隆至*E. coli*. 以此重组菌制得的全细胞催化剂能将底物双乙酰转化生成(*S,S*)-2,3-丁二醇, 在分批及流加转化过程中, 目标产物产量分别可达16.1和26.8 g/L (ee值>99%), 相对于双乙酰的最高转化率达0.79 g/g, 生产强度最高达2.7 g/(L·h). 该研究中新构建的重组菌能打破以往重组菌无法耐受双乙酰致使目标产物产量不高的束缚, 得到的(*S,S*)-2,3-丁二醇产量是目前最高水平, 为(*S,S*)-2,3-丁二醇的生物制造提供了新的希望.

综上所述, 与基于生物催化的手性拆分相比, 以全细胞催化直接将合适的前体转化成(*S,S*)-2,3-丁二醇的方法能够获得更高浓度的产物积累, 同时后期需分离的反应液成分比手性拆分的简单, 因此具有更广阔的研究与应用前景.

4.2. 合成生物学技术

合成生物学以基因工程理论为基础, 可以实现基因在同源或异源生物体内的拼接和再表达, 定向改造微生物遗传特性, 并可以进一步建立生物细胞反应器, 使细胞高效率地积累相关产物. 与全细胞催化相比, 利用合成生物学技术构建的产生2,3-丁二醇立体异构体菌株能够利用相对廉价的碳水化合物为底物, 避免了利用外消旋混合物、双乙酰或3-羟基丁酮等相对昂贵的前体代谢物为底物, 具有其独特的优势. 因此, 除了(*S,S*)-2,3-丁二醇因其前体在生物体内浓度低而未开发出合适的生物学合成路线外, 科学家已经利用合成生物学方法, 建立了生产(*R,R*)-2,3-丁二醇和*meso*-2,3-丁二醇这两种立体异构体的技术路线. 最早利用合成生物学技术实现2,3-丁二醇立体异构体单一合成的是日本山梨大学的Ui教授, 他在早年对各种立体特异性2,3-丁二醇脱氢酶的系统研究的基础上, 构建了多株基因工程菌生产

有关单一构型的2,3-丁二醇, 1997年, Ui等^[48]将*K.*

pneumoniae IAM 1063菌株基因组中编码2,3-丁二醇合成的相关酶类(包括 α -乙酰乳酸合成酶、 α -乙酰乳酸脱羧酶和*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶)的基因片段完整地克隆至*E. coli* JM109, 首次在*E. coli*中构建了*meso*-2,3-丁二醇的合成途径, 最终重组菌在24 h的摇瓶发酵过程中, 添加4%的葡萄糖生成*meso*-2,3-丁二醇10.7 g/L, 相对于葡萄糖的得率为0.27 g/g; 若以10%的葡萄糖为底物, 则最高产量达17.7 g/L, 相对于葡萄糖的得率为0.18 g/g, ee值达到了98%. 在Ui等开创了2,3-丁二醇立体异构体代谢途径构建的先河之后, 国内外研究者们利用合成生物学技术, 陆续构建了不同2,3-丁二醇立体异构体的生物合成途径, 不断刷新着高纯度立体异构体生物合成的研究记录.

在*meso*-2,3-丁二醇的高纯度合成方面, Nielsen等^[49]将*E. coli*的 α -乙酰乳酸合成酶编码基因(*ilvB*)、乳球乳酸菌(*Lactococcus lactis*)的 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因(*aldB*)连同*S. cerevisiae*的2,3-丁二醇脱氢酶编码基因(*bdh*)共表达于*E. coli*中, 该菌株经遗传改造后获得了更高的丙酮酸积累量, 为其体内重建的2,3-丁二醇合成途径提供了充足的前体, 最终以该工程菌进行发酵得到*meso*-2,3-丁二醇的浓度为1.12 g/L, 相对于葡萄糖的得率为0.29 g/g. Li等^[50]在敲除了*E. coli* JM109菌株中混合酸途径副产物合成的相关基因*ldhA* (编码乳酸脱氢酶), *pta* (编码磷酸转乙酰酶), *adhE* (编码乙醛脱氢酶及乙醇脱氢酶)和*poxB* (编码丙酮酸氧化酶)的基础上, 在该四基因突变菌株内导入一个三基因串联共表达载体, 从而构建了一条适合在低氧条件下生产*meso*-2,3-丁二醇的新途径. 经过初步优化, 当提供3%的溶氧, 该工程菌生长及耗糖速率远高于同样导入重组质粒的非突变菌株, 而当溶氧继续降至1%, 工程菌虽生长缓慢却仍表现出较高的2,3-丁二醇得率, 52 h发酵生产的*meso*-2,3-丁二醇浓度达13.0 g/L, 相对于葡萄糖的得率达0.43 g/g, 是同样导入重组质粒的非突变菌株菌株转化率的2.15倍, 可以视作高纯度立体构型*meso*-2,3-丁二醇工业化生产的一种新思路.

在(*R,R*)-2,3-丁二醇合成方面, 2009年, Yan等^[10]通过筛选4种次级醇脱氢酶(sADH)对*R*-3-羟基丁酮的立体特异性, 从中挑选出3种单一生成(*R,R*)-2,3-丁二醇的次级醇脱氢酶, 然后以这3种酶基因为重要组成元件, 分别在*E. coli*中构建(*R,R*)-2,3-丁二醇生物合成途径, 对比3种工程菌发酵情况后, 发现最高的目标产物浓度可达6.1 g/L (ee值>99%), 相对于葡萄糖的得率为

0.31 g/g. 这是目前报道最早的利用途径构建生产高纯度(*R,R*)-2,3-丁二醇的研究. 2011年, Siemerink等^[51]发现, 丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824菌株可生成*S*-3-羟基丁酮及*R*-3-羟基丁酮, 但由于缺乏2,3-丁二醇脱氢酶而无法生成2,3-丁二醇; 于是将拜氏梭菌(*C. beijerinckii*) NCIMB 8052的3-羟基丁酮还原酶编码基因导入上述菌株中, 最终由启动子 P_{thl} 控制的重组菌发酵得到1.98 g/L的(*R,R*)-2,3-丁二醇(ee值为92%), 相对于葡萄糖的得率为0.034 g/g; 而由另一启动子 P_{adc} 控制的重组菌则经发酵得到(*R,R*)-2,3-丁二醇1.8 g/L(ee值为91%), 相对于葡萄糖的得率为0.033 g/g. 虽然该研究得到的重组菌产生(*R,R*)-2,3-丁二醇的能力较弱, 但为生产单一立体构型2,3-丁二醇异构体工程菌株宿主的选择提供了新思路.

随着对生物制造2,3-丁二醇立体异构体研究的日益深入, 在设法提高立体异构体产率的同时, 其制造过程中的经济性也逐渐成为关注与研究的焦点. 为此, 除了将合成生物学技术运用至2,3-丁二醇立体异构体的途径构建之外, 人们试图以廉价原料替代精细碳源葡萄糖, 并经过改造和优化提高菌体对这些原料的利用率. Lee等^[52]将来自*K. pneumoniae*的乙酰乳酸脱羧酶编码基因(*budA*)及*meso*-2,3-丁二醇脱氢酶编码基因(*meso-budC*)克隆至*E. coli*内, 构建基因工程菌生产*meso*-2,3-丁二醇, 并尝试以粗甘油作为重组菌的发酵底物, 重组菌以粗甘油为底物最多能在48 h内生产6.9 g/L的*meso*-2,3-丁二醇, 相对于粗甘油的得率为0.21 g/g; 虽然以粗甘油为底物的*meso*-2,3-丁二醇产量不及葡萄糖, 但作为以廉价原料替代精细碳源的首次尝试, 对未来的工业化生产具有重大意义. 在此基础上, 若进一步优化发酵条件或尝试其他廉价原料, 可望实现基于合成生物技术的单一立体构型2,3-丁二醇规模化生产的新突破. Wang等^[53]采用原生质体转化的方法分别敲除了两株嗜热地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的乳酸脱氢酶编码基因(*ldh*), 其中一株利用葡萄糖, 另一株则可利用木糖. 经过优化, 这两种工程菌均可在50 °C和pH=5的极端环境下生产(*R,R*)-2,3-丁二醇, 以葡萄糖为底物的菌株生产强度达2.65 g/(L·h), 相对于葡萄糖的得率为0.23 g/g; 而以木糖为底物的菌株生产强度也达2.35 g/(L·h), 相对于木糖的得率为0.22 g/g, ee值均超过98%. 该研究旨在开发极端环境2,3-丁二醇生产菌的应用可能性; 同时, 该过程能以来源于廉价木质纤维素的木糖为底物, 为利用该菌株低成本

生物制造2,3-丁二醇立体异构体提供了可能. Shin等^[54]将2,3-丁二醇合成操纵子的引入与宿主菌副产物合成途径相关基因的敲除相结合, 构建出一株专一性产生*meso*-2,3-丁二醇的*E. coli*基因工程菌, 同时在该菌胞质中过表达来自*Saccharophagus*的纤维素糊精酶, 重组菌便能以纤维素糊精(纤维素部分水解的产物)为底物专一地生产*meso*-2,3-丁二醇, 最终生成*meso*-2,3-丁二醇5.5 g/L, 3-羟基丁酮2.7 g/L. 这两种产物相对于纤维素糊精的总得率达0.8 g/g. 该研究提供了一种直接以廉价原料纤维素为底物生产单一立体构型2,3-丁二醇的新思路, 即通过共表达可降解底物的水解酶的策略提高生产菌对多糖原料的利用率, 是降低生产成本的一种有力措施.

综合上述利用合成生物学方法生产高纯度(*R,R*)-2,3-丁二醇及*meso*-2,3-丁二醇的研究, 可总结出3条思路. 思路1是单一构型2,3-丁二醇代谢途径的构建, 向代谢途径清晰、遗传操作方法成熟的宿主菌中引入活性较高的合成途径, 并使外源蛋白的表达与宿主代谢相互协调匹配, 构建生产能力强的2,3-丁二醇立体异构体的代谢途径. 思路2是在前者的基础上, 对宿主菌进行进一步的代谢工程改造, 通过基因敲除减弱或阻止丁二酸、乙醇、乳酸、乙酸等副产物的生成, 并设法利用辅酶工程和代谢工程相结合的方式解决可能会出现氧化-还原失衡、代谢-滞留等生长缺陷, 实现维持菌体正常生长和最大限度积累产物的双目标. 思路3是将工程菌进一步改造, 使其具备利用廉价原料的能力, 从可利用生物柴油副产物粗甘油、五碳糖等逐渐到半纤维素及纤维素类物质等, 尽量降低目标产品的生产成本. 通过上述3种思路的整合应用, 有望构建出以廉价的生物质原料高产高纯度2,3-丁二醇立体异构体的微生物细胞工厂.

5. 总结与展望

不同立体构型的2,3-丁二醇因其独特的结构特点而具有独特的功能, 传统化学合成及手性拆分因其过程繁琐、成本高而限制了2,3-丁二醇立体异构体的生产及应用. 这迫使人们将目光从传统的化学制造投向新兴的生物制造. 利用全细胞催化、合成生物学等技术手段实现不同2,3-丁二醇立体异构体的高纯度生产, 必将迎来生物制造的新突破. 但降低成本和提高发酵效率等难题有待解决. 展望未来, 生物制造不同立体构型2,3-丁二醇的研究, 应重点着眼于以下几个方面.

首先, 应尝试利用合成生物学技术, 进一步改造和优化产生 2,3-丁二醇立体异构体的菌株. 目前所使用的合成生物学技术手段仅局限于较传统的代谢工程层面, 今后可在替换更效率的 DNA 调控元件, 优化 DNA 元件、分子模块、宿主细胞间的互作关系, 及提高基因工程菌细胞的环境适应能力等方面深入研究, 构建生物制造不同立体构型 2,3-丁二醇的高效细胞工厂; 另外, 生物制造 (S,S)-2,3-丁二醇目前基本采用生物催化或手性拆分方法, 底物多为 3-羟基丁酮、双乙酰等相对昂贵的化学品, 而构建以葡萄糖为底物的完整生物合成途径尚未见报道, 未来关于该立体构型 2,3-丁二醇的生物制造, 可重点围绕 2,3-丁二醇生物合成过程的中间产物, 设计并合成具有特定催化功能的 DNA 元件, 组装全新的 (S,S)-2,3-丁二醇生物合成模块, 并在此基础上优化其生产性能.

其次, 增强菌体对廉价原料的适用范围及利用率.

然后, 在上述研究的基础上, 降低基因工程菌发酵过程中的成本. 利用基因工程菌进行发酵需要昂贵的诱导剂, 因此可寻找高效的组成型启动子替代诱导型启动子, 在保证高效生产的同时实现工程菌的非诱导发酵.

最后, 急需开发效率高成本低的不同立体异构体的分离提取方法.

参 考 文 献

- Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, Britovsek G, Cairney J, Eckert C A, Frederick W J Jr, Hallett J P, Leak D J, Liotta C L, Mielenz J R, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T. *Science*, 2006, 311: 484
- Ji X J, Huang H, Nie Z K, Qu L, Xu Q, Tsao G T. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2012, 128: 199
- Garg S, Jain A. *Bioresour Technol*, 1995, 51: 103
- van Haveren J, Scott E L, Sanders J. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2007, 2: 41
- Syu M J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55: 10
- Liu R, Högberg H E. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, 12: 771
- Luo Y F, Li Y Ch. *Chin J Org Chem* (罗云富, 李援朝. 有机化学), 2002, 22: 262
- Ceskis B, Lebedavia K V, Moiseankov A M. *Izv Akad Nauk SSSR Ser Khim*, 1988, (4): 865
- Shigeki I, Takehiro T, Hiroyuki I. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, 1992, 91: 623
- Yan Y, Lee C C, Liao J C. *Org Biomol Chem*, 2009, 7: 3914
- Hasanuzzaman M, Yoshimura M. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010, 34: 743
- Ji X J, Nie Zh K, Li Zh Y, Gao Zh, Huang H. *Progr Chem* (纪晓俊, 聂志奎, 黎志勇, 高振, 黄和. 化学进展), 2010, 22: 2450
- Ji X J, Huang H, Zhu J G, Ren L J, Nie Z K, Du J, Li S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1751
- Ji X J, Nie Z K, Huang H, Ren L J, Peng C, Ouyang P K. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89: 1119
- Ji X J, Huang H, Li S, Du J, Lian M. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 731
- Ji X J, Huang H, Du J, Zhu J G, Ren L J, Li S, Nie Z K. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 5214
- Ji X J, Huang H, Du J, Zhu J G, Ren L J, Hu N, Li S. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 3410
- Nie Z K, Ji X J, Huang H, Du J, Li Z Y, Qu L, Zhang Q, Ouyang P K. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163: 946
- Ji X J, Huang H, Ouyang P K. *Biotechnol Adv*, 2011, 29: 351
- Maddox I S. *Biotechnology*, 1996, 6: 269
- Celińska E, Grajek W. *Biotechnol Adv*, 2009, 27: 715
- Voloch M, Ladisch M R, Rodwell V W, Tsao G T. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25: 173
- Ui S, Masuda H, Muraki H. *Agric Biol Chem*, 1984, 48: 2837
- Juni E, Heym G A. *J Bacteriol*, 1956, 72: 452
- Lopez J, Fortnagel P. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 279: 554
- Taylor M B, Juni E. *Biophys Acta*, 1960, 39: 448
- Höhn-Bentz H, Redler F. *Arch Microbiol*, 1978, 116: 197
- Ui S, Masuda H, Muraki H. *Agric Biol Chem*, 1984, 48: 2835
- Ui S, Matsuyama N, Masuda H, Muraki H. *J Ferment Technol*, 1984, 62: 551
- Ui S, Masuda T, Masuda H, Muraki H. *J Ferment Technol*, 1986, 64: 481
- Ui S, Hosaka T, Watanabe K, Mimura A. *J Ferment Bioeng*, 1998, 85: 79
- González E, Fernández M R, Larroy C, Solà L, Pericàs M A, Parés X, Biosca J A. *J Biol Chem*, 2000, 275: 35876
- Nicholson W L. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 6832
- Otagiri M, Ui S, Takusagawa Y, Ohtsuki T, Ohtsuki T, Kurisu G, Kusunoki M. *FEBS Lett*, 2010, 584: 219
- Yu B, Sun J, Bommarreddy R R, Song L, Zeng A P. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 4230
- Takeda M, Muranushi T, Inagaki S, Nakao T, Motomatsu S, Suzuki I, Koizumi J. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75: 2384
- Mei J F, Min H, Lü Zh M. *Chin J Catal* (梅建凤, 闵航, 吕镇梅. 催化学报), 2007, 28: 993
- Wang J, Tian J, Xu J H. *Chin J Catal* (王净, 田晶, 许建和. 催化学报), 2006, 27: 297
- Liu Ch Q, Zhang Sh R, Zhang P. *Chin J Catal* (刘春巧, 张淑荣, 张鹏. 催化学报), 2006, 27: 361
- Wang D, Zhang Q, Li W, Qi N Ch, Guo Ch X, Yang Zh R, Zhang J. *Chin J Catal* (王丹, 张强, 李旺, 戚南昌, 郭春晓, 杨志荣, 张杰. 催化学报), 2011, 32: 1035
- Jing K J, Xu Zh N, Lin J P, Cen P L. *Chin J Catal* (敬科举, 徐志南, 林建平, 岑沛霖. 催化学报), 2005, 26: 993
- Yamada-Onodera K, Yamamoto H, Kawahara N, Tani Y. *Acta Biotechnol*, 2002, 22: 355

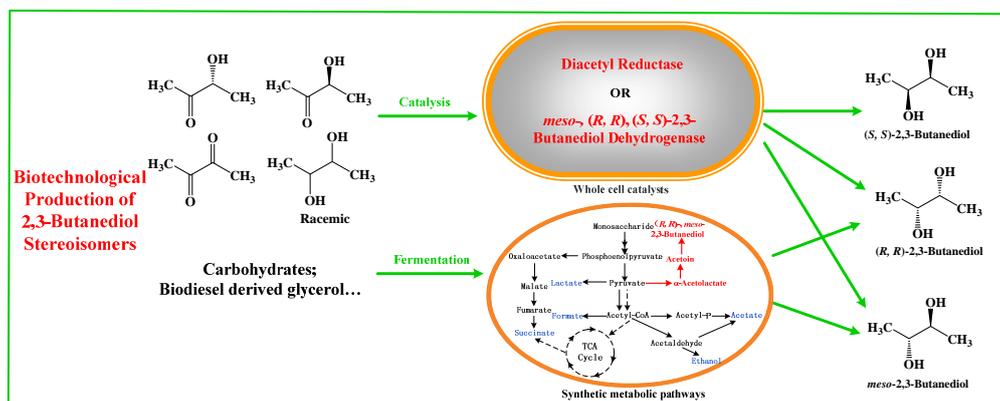
- 43 Xiao Z J, Lü C J, Gao C, Qin J Y, Ma C Q, Liu Z, Liu P H, Li L X, Xu P. *PLoS One*, 2010, 5: e8860
- 44 Liu Z, Qin J Y, Gao C, Hua D L, Ma C Q, Li L X, Wang Y, Xu P. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 10741
- 45 Ui S, Takusagawa Y, Ohtsuki T, Mimura A, Ohkuma M, Kudo T. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32: 93
- 46 Ui S, Takusagawa Y, Sato T, Ohtsuki T, Mimura A, Ohkuma M, Kudo T. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39: 533
- 47 Li L, Wang Y, Zhang L, Ma C, Wang A, Tao F, Xu P. *Biore-sour Technol*, 2012, 115: 111
- 48 Ui S, Okajima Y, Mimura A, Kanai H, Kudo T. *J Ferment Bi-oeng*, 1997, 84: 185
- 49 Nielsen D R, Yoon S H, Yuan C J, Prather K L J. *J Biotechnol*, 2010, 5: 274
- 50 Li Z J, Jian J, Wei X X, Shen X W, Chen G Q. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 2001
- 51 Siemerink M A J, Kuit W, Eggink G, vander Oost J, Kengen S W M. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 2582
- 52 Lee S, Kim B, Park K, Um Y, Lee J. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166: 1811
- 53 Wang Q, Chen T, Zhao X, Chamu J. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1610
- 54 Shin H D, Yoon S H, Wu J, Rutter C, Kim S W, Chen R R. *Bi-oresour Technol*, 2012, 118: 367

Graphical Abstract

Chin. J. Catal., 2013, 34: 351–360 doi: 10.3724/SP.J.1088.2013.20737

Biotechnological production of 2,3-butanediol stereoisomers: synthetic mechanism and realized methods

SHEN Mengqiu, JI Xiaojun*, NIE Zhikui, XIA Zhifang, YANG Han, HUANG He*
Nanjing University of Technology



The biological routes for the production of pure 2,3-butanediol stereoisomers, including using the methods of whole cell catalysis and the emerging synthetic biology, was reviewed. In contrast to the conventional chemical methods, the biological methods own their great advantages.