

## 多粘类芽孢杆菌同步糖化发酵玉米粉生产(*R,R*)-2,3-丁二醇\*

# Simultaneous Saccharification and (*R,R*)-2,3-butanediol Fermentation from Corn Flour by *Paenibacillus polymyxa*

李 亿<sup>1,2</sup>, 李检秀<sup>1,2</sup>, 刘海余<sup>1</sup>, 黄艳燕<sup>2</sup>, 陆 琦<sup>2</sup>, 谢能中<sup>2</sup>, 黄日波<sup>1,2\*\*</sup>

LI Yi<sup>1,2</sup>, LI Jianxiu<sup>1,2</sup>, LIU Haiyu<sup>1</sup>, HUANG Yanyan<sup>2</sup>, LU Qi<sup>2</sup>, XIE Nengzhong<sup>2</sup>, HUANG Ribo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005;2. 广西科学院,非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物炼制重点实验室,广西生物质产业化工程院,广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】对多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 的玉米粉同步糖化发酵工艺进行优化,以获得低成本、高效的(*R,R*)-2,3-丁二醇生产技术。【方法】研究玉米粉浓度、氮源种类和氮源浓度对菌体生长、耗糖能力以及(*R,R*)-2,3-丁二醇产量、产率、得率和转化率的影响,并在此基础上进一步考察培养基中其它成分对(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响。【结果】优化后的培养基组分为玉米干粉 140 g/L,酵母粉 30 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.8 g/L,微量元素溶液 2 mL/L。使用优化后的培养基进行同步糖化发酵,发酵 50 h 后(*R,R*)-2,3-丁二醇产量达到 56.28 g/L(光学纯度为 98.3%),对葡萄糖的得率为 0.44 g/g,产率为 1.13 g/(L·h)。【结论】(*R,R*)-2,3-丁二醇生产技术低价高效,可为其工业化生产提供参考。

**关键词:** (*R,R*)-2,3-丁二醇 多粘类芽孢杆菌 同步糖化 发酵工艺 低价碳源

中图分类号:Q815 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2016)01-0041-06

**Abstract:**【Objectives】In this study, corn flour simultaneous saccharification and fermentation process was optimized to achieve a low-cost and efficient (*R,R*)-2,3-butanediol production technology. 【Methods】The effects of different types and concentrations of nitrogen, and different concentrations of corn flour on cell growth, consumption of sugar, (*R,R*)-2,3-butanediol production, productivity, yield and conversion rate were investigated based on corn flour simultaneous saccharification and fermentation. Furthermore, the effects of other components in the medium on (*R,R*)-2,3-butanediol fermentation were observed. 【Results】The optimized composi-

收稿日期:2015-11-13

修回日期:2016-01-26

作者简介:李 亿(1988-),男,硕士研究生,主要从事合成生物学与发酵工程研究。

\* 国家自然科学基金项目(31400079,21466007,31160023),中科院微生物生理与代谢工程重点实验室开放课题(KLIM-201304)和广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 14125008-2-22)资助。

\*\* 通讯作者:黄日波(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事微生物生物技术以及酶工程研究,E-mail:rbhuang@gxas.cn.

tion of culture medium was as follows: 140 g/L dried corn flour, 30 g/L yeast extract, 3 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.8 g/L  $\text{MgSO}_4$  and 2 mL/L trace element solution. Under abovementioned conditions, up to 56.28 g/L (*R,R*)-2,3-butanediol (optical purity >98.3%) could be achieved within 50 h with the yield on glucose of 0.44 g/g and the conversion rate of 1.13 g/(L·h). This is the highest production of (*R,R*)-2,3-butanediol titer so far reported from low-cost carbon source. **【Conclusion】** This study develops a technology utilizing low-cost carbon to produce (*R,R*)-2,3-butanediol efficiently, which provides meaningful guidance for its future industrial production.

**Key words:** (*R,R*)-2,3-butanediol, *Paenibacillus polymyxa*, simultaneous saccharification, fermentation process, low-cost carbon source

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.006

## 0 引言

**【研究意义】**2,3-丁二醇(2,3-butanediol)在化工、能源、食品、医药等领域具有广泛的应用价值,其微生物发酵生产是现代生物化工的重要课题。2,3-丁二醇氧化脱氢可生成高价值食品风味剂2,3-丁二酮,或者选择性氧化获得3-羟基-2-丁酮<sup>[1-2]</sup>,后者可作为医药中间体和食用香料,目前应用前景较好;2,3-丁二醇与乙酸反应生成的二乙酸-2,3-丁二醇酯是水果香气物质的重要成分;另外,2,3-丁二醇脱水可生成甲乙酮、1,3-丁二烯,前者可作为一种高价值的液体燃料添加剂和低沸点溶剂,后者可用于合成橡胶和树脂;此外,2,3-丁二醇可作为液体燃料、辛烷值提升剂,或可用于合成聚酯、聚氨酯等高附加值产品<sup>[3-4]</sup>。据专家推测,2,3-丁二醇关键下游产品潜在的市场容量达到3200万t/年,价值430亿美元<sup>[5]</sup>。2,3-丁二醇存在3种立体异构体,分别是(*R,R*)-2,3-丁二醇、(*S,S*)-2,3-丁二醇和*meso*-2,3-丁二醇<sup>[6-7]</sup>。单一构型的(*R,R*)-2,3-丁二醇不仅具有混旋型2,3-丁二醇的基本功能,而且在不对称合成方面优势突出,是合成手性试剂和手性配体的重要前体,在高价值手性电子材料、医药和农药中间体的合成中应用广泛<sup>[8-10]</sup>。此外,(*R,R*)-2,3-丁二醇凝固点较低(-60℃),是一种优良的高级抗冻剂<sup>[8-9]</sup>。传统的(*R,R*)-2,3-丁二醇化学合成法存在使用化石原料、环境污染严重和手性拆分成本高昂等问题,难以实现大规模低成本生产<sup>[11]</sup>。开发微生物法利用可再生资源高效合成光学纯(*R,R*)-2,3-丁二醇的研究有利于提升该产业竞争力和拓展下游产业链。**【前人研究进展】**多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*,过去称为*Bacillus polymyxa*)是到目前为止发现的唯一能够高效生产光学纯(*R,R*)-2,3-丁二醇(光学纯度大于98%)的天然微生物<sup>[12-13]</sup>。目前关于*P. polymyxa*发酵制备(*R,R*)-2,3-丁二醇的报道大多使用传统的葡萄糖和蔗糖作为碳源,高昂的原料成本限制了(*R,R*)-2,3-丁二醇的工业化生

产<sup>[6]</sup>,所以寻找既低价又有效的原料是推进其产业化生产的必经之路。目前有文献报道利用纤维素水解液为碳源发酵生产(*R,R*)-2,3-丁二醇,但最终产物浓度都不高<sup>[14-16]</sup>;另外,*P. polymyxa*能利用菊芋发酵产生36.9 g/L(*R,R*)-2,3-丁二醇,光学纯度大于98%<sup>[17]</sup>,但其仍未达到工业化应用的要求。**【本研究切入点】**玉米粉是工业中一种较廉价的原料。在美国和加拿大常利用廉价易得的玉米粉大批量生产价格较低的燃料乙醇<sup>[18]</sup>;另外,玉米粉也可用于生产乳酸<sup>[19-20]</sup>、丁酸<sup>[21]</sup>等有机酸。因此,本文从低廉的玉米粉出发,研究其高效发酵生产(*R,R*)-2,3-丁二醇的工艺条件。**【拟解决的关键问题】**本研究对*P. polymyxa*高产菌株利用玉米粉同步糖化发酵生产(*R,R*)-2,3-丁二醇的条件进行优化,以获得低成本高效的(*R,R*)-2,3-丁二醇生产技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

发酵菌种为*P. polymyxa* DSM 365,购自德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ)。

### 1.2 酶与试剂

利可来耐高温淀粉酶 *supra* (酶活力 $\geq 135$  KNU/g)、复合糖化酶 DX (标准酶活力为500 AGU/mL)均购自诺维信公司;市售的普通玉米粉(含水量约8%,淀粉含量为75%);酵母粉和蛋白胨均购自OXOID公司,其余试剂为国产分析纯。

### 1.3 培养基

微量元素溶液:  $\text{FeSO}_4$  0.4 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5.0 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.8 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.04 g/L,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04 g/L,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.08 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L, biotin 0.01 g/L(文献[12])。种子培养基: 葡萄糖 50 g/L, 酵母粉 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, 微量元素

溶液 2 mL, pH 值 6.5。初始发酵培养基: 玉米粉 140 g/L, 酵母粉 30 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6 g/L, 微量元素溶液 2 mL, pH 值为 6.5。以上培养基除微量元素溶液采用无菌的 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤除菌外, 其余一律 115 $^\circ\text{C}$ , 20 min 灭菌, 糖与其它成分分开灭菌。

#### 1.4 玉米粉液化处理

称取一定量的玉米干粉(扣除含水量), 分别装入若干个 250 mL 三角瓶中, 加入适量水溶解之后按 0.4 KNU/g 玉米干粉的比例添加高温淀粉酶, 95 $^\circ\text{C}$  水浴, 振荡 30 min。

#### 1.5 同步糖化发酵

种子培养: 从 -80 $^\circ\text{C}$  冰箱取出甘油保藏菌, 接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 $^\circ\text{C}$ , 250 r/min 培养 14 h, 连续活化两次。发酵培养: 按 10% 的接种量转接二级种子到发酵培养基中(250 mL 三角瓶装液量为 60 mL), 并按 3 AGU/g 玉米干粉的比例加入复合糖化酶, 37 $^\circ\text{C}$ , 230 r/min, 发酵 50 h。

#### 1.6 检测方法

##### 1.6.1 还原糖浓度的测定

将发酵液于 12 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液, 然后加入 5 mol/L 的 HCl 酸化, 沸水浴 15 min, 迅速冷却后用 5 mol/L 的 NaOH 中和, 然后参照文献[22]的还原糖浓度测定方法测定。

##### 1.6.2 (R,R)-2,3-丁二醇光学纯度的测定

采用气相色谱仪(Agilent 7890A)测定。色谱柱为 Agilent CycloSil-B 手性毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ); 采用 FID 氢火焰检测器, 氮气作为载气, 流速为 1.6 mL/min。起始柱温为 100 $^\circ\text{C}$ , 保留 1 min; 然后先以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$  程序升温至 120 $^\circ\text{C}$ , 保留 0 min; 再以 6 $^\circ\text{C}/\text{min}$  程序升温至 130 $^\circ\text{C}$ , 保留 0

表 1 玉米粉对 (R,R)-2,3-丁二醇发酵的影响

Table 1 Effect of corn flour on the production of (R,R)-2,3-butanediol

玉米粉 Dried Corn flour (g/L)	残还原糖含量 Residual sugar (g/L)	(R,R)-2,3-丁二醇含量 (R,R)-2,3-butanediol (g/L)	产率 Productivity (g/(L·h))	得率 <sup>a</sup> Yield <sup>a</sup> (g/g)	转化率 <sup>b</sup> Conversion rate <sup>b</sup> (%)
80	7.1 $\pm$ 0.1	25.5 $\pm$ 0.7	0.51 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	70.5 $\pm$ 2.0
100	7.7 $\pm$ 0.5	37.2 $\pm$ 0.5	0.74 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.00	80.4 $\pm$ 1.2
120	10.2 $\pm$ 0.4	47.6 $\pm$ 0.2	0.95 $\pm$ 0.00	0.44 $\pm$ 0.00	87.2 $\pm$ 0.4
140	15.5 $\pm$ 1.3	55.2 $\pm$ 0.5	1.10 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.00	87.0 $\pm$ 0.9
160	25.1 $\pm$ 3.5	57.8 $\pm$ 0.8	1.16 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.01	79.8 $\pm$ 1.1

注: a 得率等于 (R,R)-2,3-丁二醇质量(g)除以(初始淀粉质量(g)乘以 1.11); b 转化率等于 (R,R)-2,3-丁二醇摩尔数(mol)除以葡萄糖摩尔数(mol)

Note: a (R,R)-2,3-butanediol(g)/(initial starch(g)  $\times$  1.11); b (R,R)-2,3-butanediol (mol)/glucose (mol)

min; 最后以 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$  程序升温至 230 $^\circ\text{C}$ , 进样口温度为 200 $^\circ\text{C}$ , 检测器温度 240 $^\circ\text{C}$ 。

#### 1.6.3 乙偶姻和 (R,R)-2,3-丁二醇浓度的测定

采用气相色谱仪(Agilent 7890A)测定。色谱柱为 Phenomenex ZB-WAXplus 毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ); 采用 FID 氢火焰检测器, 氮气作为载气, 流速为 1.6 mL/min。起始柱温为 100 $^\circ\text{C}$ , 保留 1 min, 然后以 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$  程序升温至 180 $^\circ\text{C}$ , 保留 3 min, 进样口温度为 250 $^\circ\text{C}$ , 检测器温度为 250 $^\circ\text{C}$ , 内标物为乙腈。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米粉浓度对 (R,R)-2,3-丁二醇发酵的影响

玉米粉的主要成分是玉米淀粉, 此外还含有少量的维生素、微量元素、生长因子等, 因此玉米粉的用量对菌体生长及 (R,R)-2,3-丁二醇的发酵有着重要影响。

由表 1 可知, (R,R)-2,3-丁二醇的产量随着玉米粉浓度的增加而升高。当玉米粉浓度低于 120 g/L 时, (R,R)-2,3-丁二醇产量、得率等均不高, 经济效益不佳; 玉米粉浓度为 140 g/L 时, 得率、转化率虽与 120 g/L 时的相近, 但 (R,R)-2,3-丁二醇产量较高, 达到 55.2 g/L。当玉米粉浓度高于 140 g/L 时, (R,R)-2,3-丁二醇得率及转化率开始下降, 说明糖浓度过高会抑制菌体生长和 (R,R)-2,3-丁二醇的发酵, 因而确定最佳玉米粉浓度为 140 g/L。

### 2.2 氮源对 (R,R)-2,3-丁二醇发酵的影响

氮源物质为微生物提供氮素来源, 是核酸和蛋白质及某些含氮代谢物合成的重要元素, 对微生物生长繁殖和发酵都起着重要作用。本实验控制氮源浓度为 20 g/L, 分别以酵母粉、蛋白胨、牛肉膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、尿素作为氮源, 考察各种氮源对 (R,R)-2,3-丁二醇发酵的影响(表 2)。

由表 2 可知,蛋白胨、牛肉膏、酵母粉作为氮源时,(*R,R*)-2,3-丁二醇产量、得率及还原糖转化率均优于无机氮源,可能是由于有机氮源营养丰富,所含的多种维生素、微量元素、蛋白质、游离氨基酸及生长因子等能促进菌体生长和产物的合成。当以酵母粉作为氮源时,(*R,R*)-2,3-丁二醇产量、得率、转化率等指标均是最高的,因此选择酵母粉作为最适氮源。

### 2.3 酵母粉浓度对(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响

酵母粉营养丰富,能提供菌体生长所需的各种维生素、蛋白质、微量元素、生长因子等,是一种常用的有机氮源。本实验在初始玉米粉浓度为 140 g/L 时,考察酵母粉浓度对菌株产(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响(表 3)。

由表 3 可知,随着酵母粉浓度的增加,(*R,R*)-2,3-丁二醇产量、得率、还原糖转化率呈先上升后下降的趋势。当酵母粉浓度为 30 g/L 时,(*R,R*)-2,3-丁二醇产量(57.3 g/L)、得率(0.45 g/g 葡萄糖)等指标达到最大值,而当酵母粉浓度超过 30 g/L 时,(*R,R*)-2,3-丁二醇产量、得率却开始下降,这可能是由于营养过于丰富,导致菌体过度生长而消耗过多的碳源,减少了流向(*R,R*)-2,3-丁二醇合成路径的碳架物质,阻碍代谢流量向最大转化率的方向变化。因此,我们确定酵母粉的最适浓度为 30 g/L。

### 2.4 无机盐对(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响

无机盐是微生物生长繁殖和产物合成所必需的营养物质,如磷酸盐、铵盐、硫、钠、钾、镁等化合物,它们在微生物中的作用主要是作为生理活性物质的组成部分或生理活性的调节物。本实验在以 140 g/L

玉米粉、30 g/L 酵母粉分别作为碳源和氮源的情况下,以不加无机盐作为空白对照,考察添加不同浓度的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  对(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响。

由图 1 可知,低浓度的无机盐离子对(*R,R*)-2,3-丁二醇的合成是有促进作用的,而浓度过高则起抑制作用,当  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  为 3 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为 3 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为 2 g/L、 $\text{MgSO}_4$  为 0.8 g/L 时,(*R,R*)-2,3-丁二醇的产量最高。

### 2.5 (*R,R*)-2,3-丁二醇的发酵过程曲线

在优化培养基的基础上测定 *P. polymyxa* 发酵产(*R,R*)-2,3-丁二醇的发酵曲线,定时取样,以了解在最佳条件下菌体的(*R,R*)-2,3-丁二醇合成情况,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,(*R,R*)-2,3-丁二醇的浓度随着糖的消耗而逐渐升高,在 0~10 h,糖耗速率较快,发酵 5 h 后(*R,R*)-2,3-丁二醇开始积累而且浓度不断提高,这表明在发酵前期,菌体的生长繁殖也伴随着(*R,R*)-2,3-丁二醇的合成,Magee 等<sup>[23]</sup>认为可能是菌体生长和代谢过程中产生的副产物有机酸致使培养基 pH 值降低,当有机酸达到一定浓度时,(*R,R*)-2,3-丁二醇合成代谢途径被激活,以阻止环境的进一步酸化对菌体造成伤害。发酵 50 h 后,糖基本耗完,(*R,R*)-2,3-丁二醇浓度达到 56.28 g/L,得率为 0.44 g/g 葡萄糖,产率为 1.13 g/(L·h),转化率为 88.7%,光学纯度为 98.3%。在 0~35 h,乙偶姻浓度极低,而在 35~50 h,乙偶姻积累较多,有研究<sup>[24-25]</sup>认为这与发酵液的溶氧变化有关:发酵前期发酵液营养较为丰富,菌体生长旺盛,消耗过多的氧

Table 2 Effect of different nitrogen resources on the production of (*R,R*)-2,3-butanediol

氮源 Nitrogen resources	残还原糖含量 Residual reducing sugar(g/L)	( <i>R,R</i> )-2,3-丁二醇含量 ( <i>R,R</i> )-2,3-butanediol (g/L)	产率 Productivity (g/(L·h))	得率 Yield (g/g)	转化率 Conversion rate(%)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	75.9±1.1	12.2±0.7	0.24±0.01	0.10±0.01	19.2±1.2
$\text{H}_2\text{NCONH}_2$	43.4±0.2	34.0±0.8	0.68±0.02	0.27±0.01	53.7±1.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40.2±0.2	35.3±0.5	0.71±0.01	0.28±0.00	55.6±0.8
蛋白胨 Tryptone	10.9±1.5	48.2±1.8	0.96±0.04	0.38±0.01	75.9±2.8
牛肉膏 Beef extract	9.3±1.0	53.0±1.1	1.06±0.02	0.42±0.01	83.6±1.8
酵母粉 Yeast extract	10.2±1.7	54.2±1.1	1.08±0.02	0.43±0.01	85.5±1.7

表 3 酵母粉对(*R,R*)-2,3-丁二醇发酵的影响

Table 3 Effect of yeast extract on the production of (*R,R*)-2,3-butanediol

酵母粉浓度 Yeast extract (g/L)	残还原糖含量 Residual reducing sugar(g/L)	( <i>R,R</i> )-2,3-丁二醇含量 ( <i>R,R</i> )-2,3-butanediol (g/L)	产率 Productivity (g/(L·h))	得率 Yield (g/g)	转化率 Conversion rate(%)
15	13.8±0.7	48.7±1.0	0.97±0.02	0.38±0.01	76.8±1.6
20	12.2±1.4	53.3±0.4	1.07±0.04	0.42±0.02	84.0±3.2
25	11.2±0.9	54.0±0.6	1.08±0.01	0.43±0.00	85.2±1.0
30	11.1±1.4	57.3±1.2	1.15±0.02	0.45±0.01	90.4±1.9
40	9.4±0.1	48.9±0.9	0.98±0.02	0.39±0.01	77.0±1.4

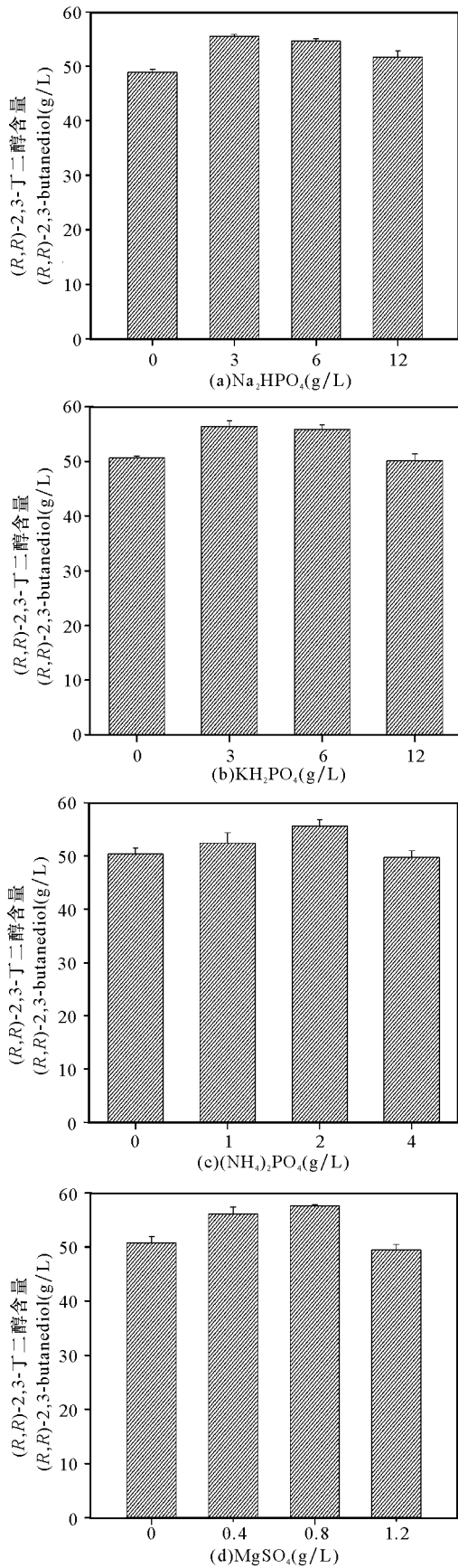


图1 无机盐对(R,R)-2,3-丁二醇发酵的影响

Fig. 1 Effect of inorganic salts on the production of (R,R)-2,3-butanediol

气致使发酵液处于缺氧状态,胞内过量的 NADH 会促使乙偶姻还原为 (R,R)-2,3-丁二醇;而到发酵后期营养消耗殆尽,菌体不再生长甚至自溶导致发酵液溶氧增加,从而有利于乙偶姻的积累。

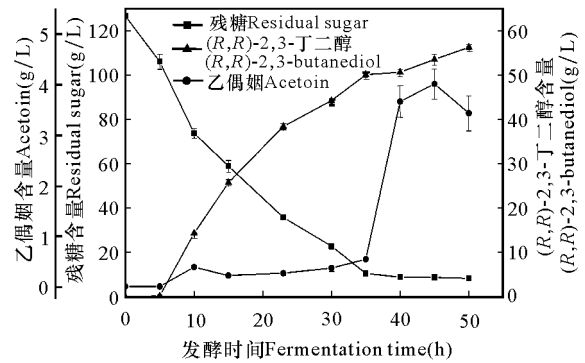


图2 *P. polymyxa* 利用玉米粉同步糖化发酵产 (R,R)-2,3-丁二醇的过程曲线

Fig. 2 Fermentation profile of (R,R)-2,3-butanediol production by *P. polymyxa*

### 3 讨论

单一构型的 (R,R)-2,3-丁二醇由于在不对称合成方面的突出优势而具有特殊用途,因此微生物发酵生产光学纯 (R,R)-2,3-丁二醇成为当前研究的热门课题。目前关于 *P. polymyxa* 高效生产 (R,R)-2,3-丁二醇的报道大多使用蔗糖和葡萄糖,如 Häbeler T 等<sup>[12]</sup> 利用 *P. polymyxa* DSM 365 以蔗糖为碳源,通过批次补料发酵,获得浓度高达 111 g/L 的 (R,R)-2,3-丁二醇;此外 Dai 等<sup>[26]</sup> 利用 *P. polymyxa* CJX518 以葡萄糖为碳源,进行批次补料发酵 54 h,获得 71.71 g/L 的 (R,R)-2,3-丁二醇,得率为 0.4 g/g 葡萄糖。但由于以上研究成本过高,不利于 (R,R)-2,3-丁二醇的大规模工业化生产。基于降低成本的考虑,近年来也有研究者使用低价的菊芋、木糖、纤维素水解液等发酵生产 (R,R)-2,3-丁二醇,如 Gao J 等<sup>[16]</sup> 以菊芋为碳源,采用一步法发酵 42 h, (R,R)-2,3-丁二醇浓度高达 36.92 g/L,产率为 0.88 g/(L·h); Adlakha N 等<sup>[15]</sup> 利用 *P. polymyxa* ICGEB2008 以纤维素水解液为碳源发酵 80 h, (R,R)-2,3-丁二醇的产量为 21 g/L,产率为 0.27 g/(L·h),得率为 0.33 g/g 总糖; Marwoto B 等<sup>[27]</sup> 以 15 g/L 木糖为碳源,利用 *P. polymyxa* 批次发酵 24 h, (R,R)-2,3-丁二醇产量为 3.5 g/L,产率为 0.15 g/(L·h),得率为 0.23 g/g 木糖。以上研究均使用低价原料作为底物,但发酵效率、产量或者转化率较低,达不到产业化生产要求。本研究以玉米粉为碳源,利用 *P. polymyxa* DSM 365 进行同步糖化

发酵 50 h, (R,R)-2,3-丁二醇的浓度为 56.28 g/L (光学纯度为 98.3%), 得率为 0.44 g/g 葡萄糖, 产率为 1.13 g/(L·h)。本研究以低价易得的玉米粉作为原料同步糖化发酵生产 (R,R)-2,3-丁二醇, 可为未来低成本高效产业化生产 (R,R)-2,3-丁二醇提供有价值的参考。

#### 参考文献:

- [1] FAVERI D D, TORRE P, MOLINARI F, et al. Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter hansenii* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(5): 708-719.
- [2] XIAO Z J, XU P. Acetoin metabolism in bacteria [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2007, 33(2): 127-140.
- [3] HAVEREN J V, SCOTT E L, SANDERS J. Bulk chemicals from biomass [J]. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2008, 2(1): 41-57.
- [4] XIAO Z J, WANG X M, HUANG Y L, et al. Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1): 88.
- [5] KÖPKE M, MIHALCEA C, LIEW F, et al. 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 5467-5475.
- [6] JI X J, HUANG H, OUYANG P K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(3): 351-364.
- [7] SYU M J. Biological production of 2,3-butanediol [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(1): 10-18.
- [8] YAN Y, LEE C C, LIAO J C. Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7: 3914-3917.
- [9] YU B, SUN J B, BOMMAREDDY R R, et al. Novel (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase from potential industrial strain *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 4230-4233.
- [10] QI G, KANG Y, LI L, et al. Deletion of *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase gene *budC* for enhanced D-2,3-butanediol production in *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 16. DOI: 10.1186/1754-6834-7-16.
- [11] JI X J, NIE Z K, LI Z Y, et al. Biotechnological production of 2,3-butanediol [J]. *Prog Chem*, 2010, 22(12): 2450-2461.
- [12] HäßLER T, SCHIEDER D, PFALLER R, et al. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 237-244.
- [13] 张帆, 李理想, 马翠卿. 芽胞杆菌发酵产 2,3-丁二醇的研究进展及展望 [J]. *生物加工过程*, 2014, 12(3): 79-86.  
ZHANG Z, LI L X, MA C Q. Research advance and prospeds of fermentation of 2,3-butanediol by *Bacillus* sp. [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(3): 79-86.
- [14] HESPELL R B. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains [J]. *Curr Microbiol*, 1996, 32(5): 291-296.
- [15] LAUBE V M, GROLEAU D, MARTIN S M. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa* [J]. *Biotechnol Lett*, 1984, 6(4): 257-262.
- [16] ADLAKHA N, YAZDANI S S. Efficient production of (R,R)-2,3-butanediol from cellulosic hydrolysate using *Paenibacillus polymyxa* ICGEB2008 [J]. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(1): 21-28.
- [17] GAO J, XU H, LI Q J, et al. Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce (R,R)-2,3-butanediol [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(18): 7076-7082.
- [18] SCHMID M. *Synthetic Biology: Industrial and Environmental Applications* [M]. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012: 19-26.
- [19] HANG Y D. Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* [J]. *Biotechnology Letters*, 1989, 11(4): 299-300.
- [20] FIELDS M L, HAMAD A M, SMITH D K. Natural lactic acid fermentation of corn meal [J]. *Journal of Food Science*, 1981, 46(3): 900-902.
- [21] HUANG Y L, WU Z T, ZHANG L K. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 51-59.
- [22] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [23] MAGEE R J, KOSARIC N. The microbial production of 2,3-butanediol [J]. *Adv Appl Microbiol*, 1987, 32: 89-161.
- [24] CELINSKA E, GRAJEK W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-current state and prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 715-725.
- [25] MOES J, GRIOT M, KELLER J, et al. A Microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27(4): 482-489.
- [26] DAI J J, CHENG J S, LIANG Y Q, et al. Regulation of extracellular oxidoreduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* CJX518 [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 433-440.
- [27] MARWOTO B, NAKASHIMADA Y, KAKIZONO T, et al. Enhancement of (R,R)-2,3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(2): 109-114.

(责任编辑:米慧芝)