

doi: 10.3969/j.issn.1672-5425.2011.06.007

微生物发酵法生产 2,3-丁二醇的研究

蒋丽群^{1,2}, 郭峰¹, 方真¹, 龙运多¹, 张帆¹

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园 热带植物资源开放实验室生物能源组, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用响应面法(RSM)对产酸克雷伯氏菌发酵葡萄糖生产 2,3-丁二醇的培养基进行了优化。依次通过 Plackett-Burman 实验、最陡爬坡实验和中心复合实验确定尿素和乙酸的最佳组合为: 尿素浓度 $5.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、乙酸浓度 $0.703 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在最佳发酵条件下, 2,3-丁二醇得率达 $0.456 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 较初始条件提高了 23.2%, 达到了理论得率的 91.2%。对进一步降低 2,3-丁二醇的生产成本具有一定的指导意义, 为木质纤维素资源的开发和利用奠定了良好的基础。

关键词: 2,3-丁二醇; 葡萄糖; 响应面法; 微生物发酵

中图分类号: TQ 923

文献标识码: A

文章编号: 1672-5425(2011)06-0025-04

随着化石燃料的短缺和石油价格的增长, 应用生物方法生产化学产品的生物炼制技术倍受关注^[1-3]。

2,3-丁二醇(2,3-BD)是一种极具价值的液体燃料, 燃烧值为 $27 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$, 可以与甲醇($22 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$)、乙醇($29 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$)相媲美^[4], 在能源、食品及化工等领域应用广泛^[5-7], 且在染料、增湿和柔顺剂、炸药、香水、药物载体等领域显示出潜在的应用价值^[6,8,9]。因此, 微生物发酵法生产 2,3-BD 已成为国内外研究的热点^[10-14]。

作者在此以相对廉价的尿素为唯一氮源、以葡萄糖为底物, 采用 Plackett-Burman 实验、最陡爬坡实验以及中心复合实验相结合的响应面法对产酸克雷伯氏菌发酵产 2,3-BD 的培养基进行了优化。

1 实验

1.1 菌种与培养基

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) CICC 22912, 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

固体培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, NaCl 5, 琼脂 20。

种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, NaCl 5, 初始 pH 值 6.8~7.0。

原始发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 100, K_2HPO_4 13.7, KH_2PO_4 3.9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.6, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCl_2 0.01, EDTA 0.05。

上述培养基均在 115°C 下灭菌 20 min($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液配制完成后用孔径 $0.22 \mu\text{m}$ 的无菌双层微孔滤膜过滤备用)。

1.2 培养方法

种子培养: 将甘油管保藏的菌种转接至固体培养基, 37°C 下活化 12 h。将 1 环活化的菌种接种于装有 50 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 在转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的台式恒温摇床中, 于 37°C 恒温振荡培养 12 h, 获得种子液。

发酵培养: 将上述种子液按体积分数为 5% 的接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 在转速为 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的台式恒温摇床中, 于 37°C 恒温振荡培养 80 h。

1.3 实验设计

运用响应面法, 采用 Design-Expert 8.0.2 软件进行实验设计和数据分析, 主要由以下 3 部分组成:

(1) Plackett-Burman 实验

根据微生物生长所需要的营养条件及微生物发酵

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21076220), 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-G-075)

收稿日期: 2011-03-22

作者简介: 蒋丽群(1986-), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 研究方向: 木质纤维素的水解及生物基产品的开发; 通讯作者: 方真,

研究员。E-mail: liqun_jiang2508@126.com, zhenfang@xtbg.ac.cn。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

的影响因子的一般规律, 在单因素实验的基础上, 进行 Plackett-Burman 实验设计, 其因素与水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验的因素与水平
Tab 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiment

水平	因素/ g · L ⁻¹							
	X ₁ . 葡萄糖	X ₂ . 尿素	X ₃ . CaCl ₂	X ₄ . EDT A	X ₅ . MgSO ₄ · 7H ₂ O	X ₆ . FeSO ₄ · 7H ₂ O	X ₇ . 乙酸	X ₈ . K ₂ HPO ₄
- 1	80	3	0	0	0. 1	0	0	4. 9
+ 1	120	6	0. 01	0. 05	0. 5	0. 05	1	12. 55

(2) 最陡爬坡实验

爬坡实验的起点为单因素实验所确定的最优点, 爬坡的方向由 Plackett-Burman 实验的 *T* 值决定, *T* 为正值时爬坡方向为递增, *T* 为负值时爬坡方向为递减; 爬坡的步长由 *T* 值和单因素实验结果确定。

(3) 中心复合实验

根据响应面中心复合实验的设计原理, 以 2, 3-BD 得率为响应值, 设计 2 因素 5 水平共 13 个实验点的实验, 其中包括 4 个析因设计实验点、4 个轴点设计实验点以及 5 个中心点重复实验实验点。

1. 4 分析方法

发酵液中的葡萄糖、2, 3-BD 以及 3-羟基丁酮均采用高效液相色谱仪(岛津 CL-20A) 测定。色谱柱为 Aminex HPL-87H 型离子色谱柱(300 mm × 7. 8 mm, Bio-Rad), 柱温为 60 ℃, 流动相为 0. 005 mol · L⁻¹ H₂SO₄, 流速为 0. 6 mL · min⁻¹, 检测器为 RID-10A。按下式计算 2, 3-BD 得率(*Y*):

$$Y = \frac{m_1 + m_2}{m_3}$$

式中: *m*₁、*m*₂、*m*₃ 分别为 2, 3-BD、3-羟基丁酮、消耗的葡萄糖的质量, g。

2 结果与讨论

2. 1 Plackett-Burman 实验

以 2, 3-BD 得率为响应值, 每次实验重复 3 次, 取平均值。Plackett-Burman 实验结果见表 2, 显著性分析见表 3。

由表 3 可知, *X*₂ 和 *X*₇ 的 *P* 值小于 0. 05, 这表明, 尿素和乙酸对 2, 3-BD 得率影响显著, 可通过最陡爬坡实验和中心复合实验进一步优化。而其它不显著影响因素, 根据系数或 *T* 值的正负确定该因素为表 1 中的高或低水平, 不再进一步优化。如葡萄糖的 *T* 值为负, 则选其低水平, 即 80 g · L⁻¹。

2. 2 最陡爬坡实验

以单因素实验确定的最佳水平(即尿素浓度为 4. 50 g · L⁻¹、乙酸浓度为 0. 50 g · L⁻¹) 为起点, 分别以 0. 30 和 0. 10 为步长, 进行最陡爬坡实验, 结果

表 2 Plackett-Burman 实验结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y/g · g ⁻¹
1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	0. 382
2	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	0. 423
3	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	0. 359
4	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	0. 416
5	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	0. 343
6	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1	0. 385
7	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	0. 355
8	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1	0. 376
9	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	0. 407
10	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	+ 1	0. 393
11	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1	- 1	0. 322
12	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	0. 318

表 3 Plackett-Burman 实验的显著性分析

变量	系数	标准差	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值
<i>X</i> ₁	- 0. 006417	0. 002967	- 2. 163	0. 1193
<i>X</i> ₂	0. 026	0. 002967	8. 763	0. 0030
<i>X</i> ₃	0. 00125	0. 002967	0. 421	0. 7019
<i>X</i> ₄	0. 002917	0. 002967	0. 983	0. 3981
<i>X</i> ₅	0. 00025	0. 002967	0. 084	0. 9382
<i>X</i> ₆	0. 00475	0. 002967	1. 605	0. 2077
<i>X</i> ₇	0. 018	0. 002967	6. 067	0. 0096
<i>X</i> ₈	0. 0004167	0. 002967	0. 1404	0. 8972
<i>R</i> ²			0. 9760	
<i>R</i> ² (adj)			0. 9119	

见表 4。

由表 4 可知, 当尿素浓度为 5. 10 g · L⁻¹、乙酸浓度为 0. 70 g · L⁻¹ 时, 2, 3-BD 得率最大。

2. 3 中心复合实验

中心复合实验结果、回归方程系数显著性检验分析分别见表 5 和表 6。

由表 6 得到拟合的多元二次方程为:

表 4 最陡爬坡实验结果

Tab 4 Results of the steepest ascent experiment			
序号	尿素浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	乙酸浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Y/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	4.50	0.50	0.428
2	4.80	0.60	0.440
3	5.10	0.70	0.454
4	5.40	0.80	0.439
5	5.70	0.90	0.423

表 5 中心复合实验结果

Tab 5 Results of the central composition experiment						
序号	变量编码值		变量真实值/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		$Y/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	
	X_2	X_7	X_2	X_7	实验值	预测值
1	-1	-1	4.80	0.60	0.431	0.432
2	+1	-1	5.40	0.60	0.441	0.438
3	-1	+1	4.80	0.80	0.436	0.434
4	+1	+1	5.40	0.80	0.443	0.438
5	-1.41	0	4.68	0.70	0.430	0.429
6	1.41	0	5.52	0.70	0.431	0.436
7	0	-1.41	5.10	0.56	0.437	0.438
8	0	1.41	5.10	0.84	0.435	0.439
9	0	0	5.10	0.70	0.453	0.455
10	0	0	5.10	0.70	0.454	0.455
11	0	0	5.10	0.70	0.455	0.455
12	0	0	5.10	0.70	0.459	0.455
13	0	0	5.10	0.70	0.456	0.455

表 6 回归方程系数显著性检验

Tab 6 Significant test of regression coefficient				
变量	系数	标准差	T 值	P 值
平均值	0.46	0.001725	266.67	0.0008
X_2	0.002302	0.001364	1.69	0.1353
X_7	0.0005214	0.001364	0.38	0.7153
X_2X_7	-0.00075	0.001929	-0.39	0.7089
X_2^2	-0.011	0.001462	-7.52	0.0001
X_7^2	-0.008575	0.001462	-5.87	0.0006
R^2		0.9256		
$R^2(\text{adj})$		0.8725		

$$Y = 0.46 + 0.002302X_2 + 0.0005214X_7 - 0.00075X_2X_7 - 0.011X_2^2 - 0.008575X_7^2$$

在这个模型中, X_2^2 和 X_7^2 影响显著, 回归系数 $R^2 = 0.9256$, 表示模型拟合程度较好。

由 Design-Expert 8.0.2 绘制的响应面曲线图及等高线图见图 1。

由图 1a 可知, 响应值存在最大值。经软件分析预测, 当尿素= 0.1 (即 $5.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、乙酸= 0.03 (即 $0.703 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 预测的 2,3-BD 最大得率为 $0.456 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。即最佳的发酵条件是: 葡萄糖 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿素 $5.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙酸 $0.703 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $12.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此时, 2,3-BD 的得率达到 $0.456 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 较初始条件提高了 23.2%, 达到了理论

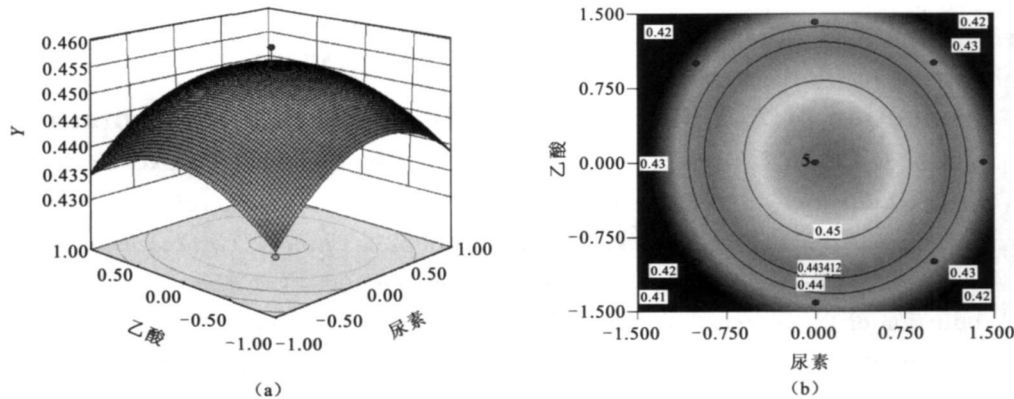


图 1 响应面图(a)及等高线图(b)

Fig.1 Response surface figure(a) and corresponding contour(b)

得率的 91.2%。

为了检验模型预测的准确性, 在最佳发酵培养条件下进行 3 组平行实验, 得到 2,3-BD 得率的平均值为 $0.454 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 与回归方程的预测值基本一致。

由图 1b 可知, 等高线图呈圆形, 表明尿素和乙酸的交互作用不显著。

3 结论

采用 Plackett-Burman 实验、最陡爬坡实验以及中心复合实验相结合的响应面法对产酸克雷伯氏菌产 2,3-丁二醇的培养基进行了优化。结果表明:

(1) 相比于酵母粉、蛋白胨或铵盐等氮源, 本实验采用较为廉价的尿素为唯一氮源, 获得了较高的 2,3-丁二醇得率, 具有经济性和工业化发展潜力。(2) 应用 Plackett-Burman 实验对影响发酵的因子进行评价, 结果发现尿素和乙酸的浓度对 2,3-丁二醇得率具有显著影响。(3) 通过中心复合实验, 建立了发酵产 2,3-丁二醇的数学模型, 经分析得到尿素和乙酸的最佳组合为: 尿素浓度 $5.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、乙酸浓度 $0.703 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(4) 在最佳发酵条件下, 2,3-丁二醇得率达到 $0.456 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 相对于原始的发酵条件, 得率提高了 23.2%, 达到了理论得率的 91.2%。

该研究对进一步以富含葡萄糖的木质纤维素水解液为发酵底物产 2,3-丁二醇的研究具有一定的指导意义, 为木质纤维素资源的开发利用奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Hatti-Kaul R, Tornvall U, Gustafsson L, et al. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals — A cradle-to-grave perspective[J]. Trends Biotechnology, 2007, 25(3): 119-124.
- [2] John R P, Nampoothiri K M, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 524-534.
- [3] van Haveren J, Scott E L, Sanders J. Bulk chemicals from biomass[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2008, 2(1): 41-57.
- [4] Flickinger M C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: How far have we come? [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1980, 22(S1): 27-48.
- [5] Bartowsky E J, Henschke P A. The 'buttery' attribute of wine-diacyetyl desirability, spoilage and beyond[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 235-252.
- [6] Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol: current state and prospects[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 715-725.
- [7] Soltys K A, Batta A K, Koneru B. Successful nonfreezing, subzero preservation of rat liver with 2,3-butanediol and type I anti-freeze protein[J]. Journal of Surgical Research, 2001, 96(1): 30-34.
- [8] Syu M J. Biological production of 2,3-butanediol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(1): 10-18.
- [9] Xiu Z L, Zeng A P. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(6): 917-926.
- [10] Petrov K, Petrova P. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(4): 659-665.
- [11] Ji X J, Huang H, Du J, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3410-3414.
- [12] Ji X J, Huang H, Du J, et al. Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21): 5214-5218.
- [13] Wang A, Wang Y, Jiang T Y, et al. Production of 2,3-butanediol from corn cob molasses, a waste by-product in xylitol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 965-970.
- [14] Zhang L Y, Yang Y L, Sun J A, et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H3Q[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1961-1967.

Production of 2,3-Butanediol by Microorganism Fermentation

JIANG Li-qun^{1,2}, GUO Feng¹, FANG Zhen¹, LONG Yun-duo¹, ZHANG Fan¹

(1. Biomass Group, Laboratory of Tropical Plant Resource Science, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Production of 2,3-butanediol from glucose by *Klebsiella oxytoca* fermentation was optimized using response surface methodology (RSM). Based on the Plackett-Burman experiment, urea and acetic acid were identified as the most significant factors. Steepest ascent experiment and central composite experiment were employed to determine their optimal levels with urea concentration of $5.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and acetic acid concentration of $0.703 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Under the optimal medium, 2,3-butanediol yield was $0.456 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, which was equivalent to 91.2% of the theoretical value and was 23.2% higher than that obtained under the initial conditions. In this work, a relatively high yield was achieved by using urea as sole nitrogen source that was less expensive, and the process may find practical applications for 2,3-butanediol production.

Keywords: 2,3-butanediol; glucose; response surface methodology; microorganism fermentation