

pH与溶氧控制对解淀粉芽胞杆菌发酵粗甘油生产2,3-丁二醇的影响

杨套伟¹, 饶志明¹, 张显¹, 徐美娟¹, 许正宏²

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

杨套伟, 饶志明, 张显, 等. pH与溶氧控制对解淀粉芽胞杆菌发酵粗甘油生产2,3-丁二醇的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1860-1864.

Yang TW, Rao ZM, Zhang X, et al. Effects of pH and oxygen supply on production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1860-1864.

摘要: 首次利用一株安全菌株解淀粉芽胞杆菌发酵生物柴油副产物粗甘油生产2,3-丁二醇。溶氧和pH是影响微生物法生产2,3-丁二醇的最主要因素。结果表明,发酵过程中不控制pH更有利于2,3-丁二醇合成;采用三阶段控制搅拌转速策略,2,3-丁二醇产量最大值达到38.1 g/L,生产强度达到1.06 g/(L·h),与恒定转速获得的最好结果相比,分别提高了14.8%和63.1%。采用脉冲流加发酵时,2,3-丁二醇产量达到71.2 g/L,2,3-丁二醇生产强度达到0.99 g/(L·h),这是目前报道的利用粗甘油合成2,3-丁二醇的最高产量。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌, 粗甘油, pH, 三阶段控制转速, 流加发酵, 2,3-丁二醇

Effects of pH and oxygen supply on production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*

Taowei Yang¹, Zhiming Rao¹, Xian Zhang¹, Meijuan Xu¹, and Zhenghong Xu²

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127 was used to produce 2,3-butanediol (2,3-BD) from residual glycerol

Received: March 15, 2013; **Accepted:** June 17, 2013

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-10-0459), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB725202), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A211), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21276110, 30970056), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51306A), the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20110093120001), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85910886; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxy@163.com

教育部新世纪优秀人才计划(No. NCET-10-0459), 国家重点基础研究发展计划(973计划)(No. 2012CB725202), 国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2011AA02A211), 国家自然科学基金(Nos. 21276110, 30970056), 中央高校基本科研业务费专项资金(No. JUSRP51306A), 高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20110093120001), 江苏高校优势学科建设工程资助项目资助。

网络出版时间: 2013-09-12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130912.0214.006.html>

obtained from biodiesel synthesis. Important variables for 2,3-BD fermentation, pH and dissolved oxygen, were studied. When pH was maintained constant, the yield of 2,3-BD was inhibited. The highest 2,3-BD yields were achieved by fermentation without any pH control with an optimized initial pH 6.5. Batch fermentative production of 2,3-BD by *B. amyloliquefaciens* was investigated using various oxygen supply methods by changing agitation speed. Based on the analysis of three kinetic parameters including specific cell growth rate (μ), specific glucose consumption rate (q_s) and specific 2,3-BD formation rate (q_p), a three-stage agitation speed control strategy was proposed, aimed at achieving high concentration, high yield and high productivity of 2,3-BD. Maximum concentration of 2,3-BD reached 38.1 g/L, with the productivity of 1.06 g/(L·h), which were 14.8% and 63.1% over the best results from constant agitation speeds. In a pulse fed-batch fermentation, 2,3-BD concentration and productivity were significantly improved to 71.2 g/L and 0.99 g/(L·h), respectively. To our knowledge, these results were the highest for 2,3-BD production from biodiesel-derived glycerol.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, biodiesel-derived glycerol, pH, three-stage control strategy, fed-batch, 2,3-butanediol

生物能源作为可再生能源,有望减少能源供给对石油的依赖程度^[1]。2,3-丁二醇作为一种非常重要的生物基四碳平台化合物,广泛应用于化工、能源、燃料等多个领域^[2]。近年来用糖质原料发酵生产 2,3-丁二醇取得了较好的实验室研究结果^[2-3]。然而从 2,3-丁二醇的应用前景及未来发展趋势看,开发以廉价的非粮糖质为原料发酵生产 2,3-丁二醇具有很好的发展前景^[3]。利用油脂生产生物柴油的过程中,约产生 10%的副产物甘油^[4]。将这些粗甘油转化为更有附加价值的产品,有利于降低这些副产物的处理成本^[4]。肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 能利用甘油生产 2,3-丁二醇^[5],但产生大量副产物 1,3-丙二醇,这将增加产物后续分离纯化的成本,且该菌种具有潜在致病性,不符合工业化安全生产的要求^[2]。解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 是被美国 FDA 认可的安全菌株^[6]。因此,利用安全菌株 *B. amyloliquefaciens* 发酵粗甘油生产 2,3-丁二醇具有良好应用前景。

1 材料与方 法

1.1 菌种

B. amyloliquefaciens B10-127,由本研究室筛选并保藏^[7]。

1.2 方 法

1.2.1 培养基

种子培养基^[7](g/L):葡萄糖 20,胰蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10,自然 pH 值。

发酵培养基^[7](g/L):粗甘油 100,玉米浆 20,酵母膏 5,柠檬酸铵 3,K₂HPO₄ 4,柠檬酸 5,MgSO₄ 0.2,FeSO₄·7H₂O 0.01,初始 pH 6.0。

粗甘油购自诸暨兴绿油脂有限公司,主要成分(W/W):88%甘油,0.5%灰分,0.2%甲醇,10%水。

1.2.2 培养方 法

菌种活化:将 200 μ L 冷冻保藏的菌液接种于 10 mL 种子培养基中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h。

摇瓶发酵实验:将充分活化的种子液按 4% (V/V)接种量接种到含有 50 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床培养。

发酵罐发酵实验:5 L 发酵罐,装液量 2.5 L,接种量 4% (V/V);发酵条件:通气量 0.33 vvm,发酵温度 37 $^{\circ}$ C;流加发酵时,粗甘油水溶液补料液:500 g/600 mL;采用脉冲流加发酵,每次流加 1/4 体积的母液,甘油消耗完后即刻停止发酵。

1.2.3 分析方 法

菌体量以干重(DCW)表示,产物和底物浓度检测使用高效液相色谱法,具体方法见文献^[5]。

2 结果与分析

2.1 粗甘油对 2,3-丁二醇发酵的影响

以纯甘油作为对照,考察了粗甘油是否适合作为 2,3-丁二醇发酵的直接底物。初始甘油含量为 40 g/L,结果如图 1 所示,发酵 60 h 后,菌株利用粗甘油和纯甘油的效率基本一样,分别消耗甘油 36.7 g/L 和 38.6 g/L;另外菌体生长情况基本相同,并且 2,3-丁二醇产量都在 13 g/L 左右。由此可知, *B. amyloliquefaciens* 能直接以粗甘油为底物发酵生产 2,3-丁二醇。

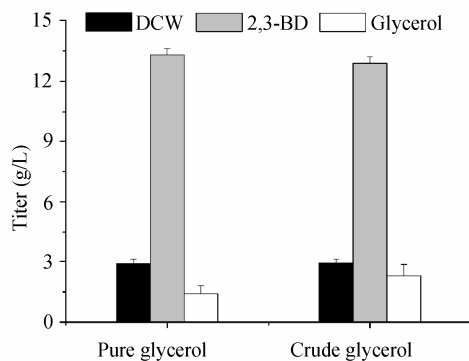


图 1 不同类型的甘油对 2,3-丁二醇发酵的影响

Fig. 1 Effects of different types of glycerol on 2,3-BD production.

2.2 pH 控制策略对 2,3-丁二醇发酵的影响

2,3-丁二醇的主要生理功能是应对有机酸抑制和维持胞内氧化还原平衡^[2]。设定初始 pH 为 5.5~7.5,考察了发酵过程中 pH 控制与否对 2,3-丁二醇发酵的影响,结果如表 1 所示,发酵过程

表 1 pH 对 2,3-丁二醇发酵的影响

Table 1 Effects of pH on 2,3-BD production

Conditions	Initial pH	Glycerol consumption (g/L)	DCW (g/L)	2,3-BD (g/L)	2,3-BD productivity (g/(L·h))
pH controlled	5.5	50 ± 3	7.05 ± 0.23	20.7 ± 1.3	0.41 ± 0.03
	6.5	61 ± 4	7.32 ± 0.25	24.3 ± 1.5	0.49 ± 0.03
	7.5	56 ± 3	7.19 ± 0.21	23.2 ± 1.4	0.47 ± 0.03
pH non-controlled	5.5	66 ± 4	7.63 ± 0.27	26.8 ± 1.3	0.54 ± 0.03
	6.5	80 ± 4	7.94 ± 0.31	33.1 ± 1.6	0.66 ± 0.03
	7.5	78 ± 4	7.91 ± 0.22	32.2 ± 1.6	0.64 ± 0.03

中不控制 pH (初始 pH 为 6.5) 更有利于菌体生长和 2,3-丁二醇的合成,这和 Biebl 等^[9]的研究结果相一致。此时,产物合成与 pH 变化曲线如图 2 所示,发酵前期 pH 迅速下降至 5.5 左右,随后 pH 上升至 6.5 附近并呈现上下波动现象。Petrov 和 Petrova^[5]在考察 pH 对 *K. pneumoniae* 发酵甘油合成 2,3-丁二醇的影响时也发现类似的现象。Petrov 和 Petrova 解释说,2,3-丁二醇是受有机酸诱导而合成的,在初始发酵阶段,菌株先合成大量有机酸,从而导致发酵环境中 pH 值大幅降低,细胞因酸性环境刺激而快速转向 2,3-丁二醇的合成,乙酸合成暂时中止, pH 因而逐渐升高; pH 升高又刺激了乙酸的合成;随后 2,3-丁二醇和乙酸合成效率交替升高,从而导致 pH 值的上下波动。所以,发酵过程中不控制 pH 更能促进 2,3-丁二醇的合成。

2.3 溶氧分阶段调控 2,3-丁二醇发酵过程

据文献报道^[2-3,10],溶氧水平对于提高 2,3-丁

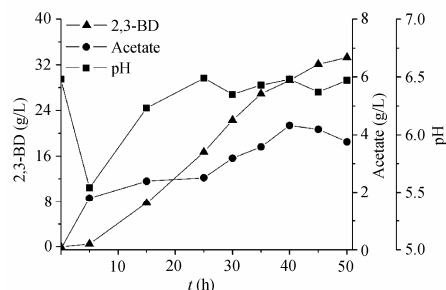


图 2 pH 与产物合成变化曲线

Fig. 2 Time profiles of pH changes and products formation under pH non-controlled.

二醇的发酵效率和降低乙偶姻等副产物的积累具有重要影响。根据 *B. amyloliquefaciens* 的生理特征, 我们提出了一种行之有效的溶氧控制策略。

2.3.1 不同搅拌转速下菌株 B10-127 发酵生产 2,3-丁二醇的动力学特征

比速率是一个相对速度, 它与生物量有密切的关系, 比速率用方程组(1)来定义, 单位为 h^{-1} 。 μ 为生长的比速率, q_s 为底物消耗的比速率, q_p 为产物形成的比速率。根据 μ 、 q_s 和 q_p 的定义式:

$$\mu = \frac{dx}{x \cdot dt} \quad q_s = -\frac{ds}{x \cdot dt} \quad q_p = \frac{dp}{x \cdot dt} \quad (1)$$

当时间间隔很小时, 可以近似用(2)式直接计算得到 μ 、 q_s 和 q_p

$$\mu = \frac{\Delta x}{x \cdot \Delta t} \quad q_s = -\frac{\Delta s}{x \cdot \Delta t} \quad q_p = \frac{\Delta p}{x \cdot \Delta t} \quad (2)$$

利用 Origin 8.0 作图软件, 对图 3(A~C)中的数据进行插值计算(时间间隔为 0.1 h), 求解得到发酵过程不同时刻的 μ 、 q_s 和 q_p ; 经平滑处理, 得到

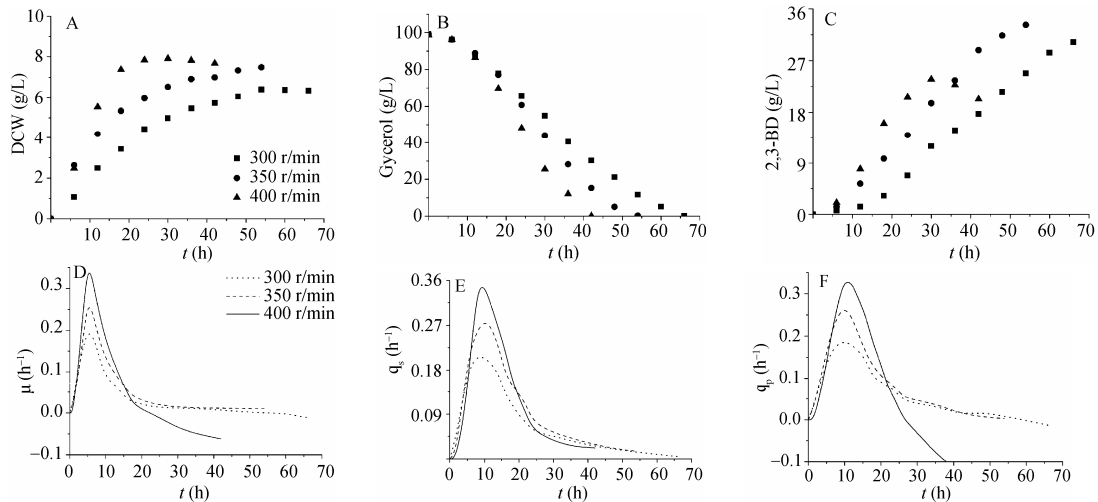


图 3 不同搅拌转速下的 2,3-丁二醇发酵过程动力学曲线

Fig. 3 Comparison of kinetic parameters in 2,3-BD fermentation at different agitation speed.

表 2 搅拌转速控制策略对 2,3-丁二醇发酵的影响

Table 2 2,3-BD production at different agitation speed

Agitation speed (r/min)	Time (h)	DCW (g/L)	Acetoin (g/L)	2,3-BD (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))
300	66 ± 2	6.5 ± 0.25	9.21 ± 0.32	30.2 ± 1.53	0.30 ± 0.01	0.46 ± 0.02
350	51 ± 2	7.7 ± 0.27	8.71 ± 0.27	33.2 ± 1.84	0.33 ± 0.01	0.65 ± 0.02
400	42 ± 2	8.9 ± 0.30	17.6 ± 0.59	23.7 ± 1.26	0.24 ± 0.01	0.56 ± 0.01
Three-stage	36 ± 1	8.5 ± 0.20	4.75 ± 0.21	38.1 ± 1.92	0.38 ± 0.01	1.06 ± 0.02

不同搅拌速度下动力学参数曲线(图 3D~F)。综合分析图 3A~F 可以发现: 菌株在不同阶段对氧的需求并不相同, 1) 在低搅拌转速下菌株的延滞期(0~4 h)较短; 2) 在较高的搅拌转速下(400 r/min), 细胞在发酵前期(4~18 h)具有较高的 μ 、 q_s 和 q_p , 即此阶段, 高转速更能促进菌体的生长和底物消耗; 3) 而 18 h 以后, 在 400 r/min 条件下(图 3D), 菌体 μ 逐渐变为负值, 此时菌体衰亡速率大于生长速率, 菌体量增长缓慢, q_p 逐渐降至负值, 主要原因是菌体衰亡导致发酵液中溶氧升高, 2,3-丁二醇开始逆向合成副产物乙偶姻^[2]。而在 350 r/min 条件下, 仍能维持较高的 μ 和 q_p 。

2.3.2 分阶段供氧控制模式的提出和实验验证

根据上述分析结果, 我们提出了一种三阶段控制转速的模式(图 4), 即 0~4 h 控制转速 300 r/min, 使菌体快速开始生长, 缩短延滞期; 在 4~18 h, 控制转速 400 r/min, 使其保持较高的 μ 、 q_s 和 q_p ; 18 h 之后, 转速将至 350 r/min, 防止细胞过早衰

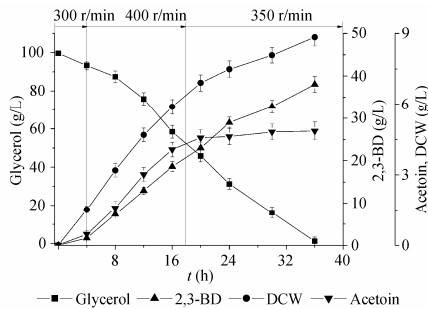


图4 分阶段控制转速条件下发酵过程曲线

Fig. 4 Time profiles of 2, 3-BD fermentation using a three-stage agitation speed control strategy.

老, 保持菌体的持续生长和较高代谢速率。由表2可知, 采用分阶段供氧控制模式, 既能够保持较高的产率(0.40 g/g), 又能保持较高的甘油消耗速度(2.78 g/(L·h)), 发酵36 h, 2,3-丁二醇产量就达到了38.1 g/L, 生产强度(1.1 g/(L·h))比恒定转速300、350和400 r/min时分别提高了130%、63.1%和89.3%, 副产物乙偶姻积累量分别降低了48.4%、45.5%和73.0%。因此, 该转速控制模式有利于提高 *B. amyloliquefaciens* 发酵粗甘油生产2,3-丁二醇的产量和效率。

2.4 批式流加发酵生产2,3-丁二醇

补料流加发酵结果如图5所示, 发酵72 h, 2,3-丁二醇产量达到71.2 g/L, 生产强度达到0.99 g/(L·h)。Petrov和Petrova^[11]利用 *K. pneumoniae* 通过补料流加发酵, 2,3-丁二醇产量达到70 g/L, 这是此前报道的利用甘油发酵生产2,3-丁二醇的

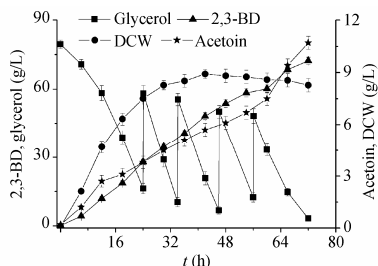


图5 粗甘油批式流加发酵生产2,3-丁二醇过程曲线
Fig. 5 Fed-batch fermentation profiles using a pulse feeding batch strategy.

最高产量, 但其发酵周期长达160 h, 生产强度仅为0.44 g/(L·h)。因此, 我们的研究结果可以和目前报道的最高产量相媲美。

3 结论

粗甘油可以作为 *B. amyloliquefaciens* 合成2,3-丁二醇的直接底物; 发酵过程中菌体通过自身对环境pH的反馈调节更能促进2,3-丁二醇的合成; 通过三阶段转速调控策略, 促进目标产物2,3-丁二醇的合成, 减少副产物乙偶姻的积累。通过补料流加实验, 2,3-丁二醇产量达到71.2 g/L, 生产强度为0.99 g/(L·h)。本文利用未经预处理的生物柴油副产物粗甘油为底物, 为粗甘油的深加工技术开发提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] Liu DH. Preface for special issue on bioenergy. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 261–264 (in Chinese). 刘德华. 生物能源专刊序言. 生物工程学报, 2013, 29(3): 261–264.
- [2] Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol—current state and prospects. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 715–725.
- [3] Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. Biotechnol Adv, 2011, 29(3): 351–364.
- [4] Da Silva GP, Mack M, Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol Adv, 2009, 27(1): 30–39.
- [5] Petrov K, Petrova P. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(4): 659–665.
- [6] De Boer AS, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36(1): 1–4.
- [7] Yang TW, Rao ZM, Zhang X, et al. Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. J Basic Microbiol, 2011, 51(6): 650–658.
- [8] Booth I. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol Rev, 1985, 49(4): 359–378.
- [9] Biebl H, Zeng AP, Menzel K, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50(1): 24–29.
- [10] Ji XJ, Huang H, Du J, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. Bioresour Technol, 2009, 100(13): 3410–3414.
- [11] Petrov K, Petrova P. Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(3): 943–949.

(本文责编 郝丽芳)