

文章编号:1673-1689(2010)01-0155-06

利用地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮初步研究

齐茂强^{1,2}, 姜兴涛², 刘刚^{*1}, 陈锦河¹, 李庆廷²

(1. 深圳大学 生命科学学院, 广东深圳 518060; 2. 深圳波顿香料有限公司 广东深圳 518051)

摘 要: 初步研究了摇瓶条件下地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮的工艺条件。分析了摇瓶发酵中菌体生长、产物合成和 pH 的变化情况;考察了发酵温度、装液量、种龄、接种量等条件对发酵的影响;研究了地衣芽孢杆菌利用不同碳源发酵生产 3-羟基-2-丁酮的情况,选取了最适碳源,在此基础上进行了补糖试验;最后采用正交试验方法对培养基进行了优化。在优化的发酵条件下,采用分批补糖的工艺,摇瓶发酵产量可稳定在 20 g/L 以上,为 3-羟基-2-丁酮的工业化生产提供了一定的基础。

关键词: 地衣芽孢杆菌;发酵;3-羟基-2-丁酮

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Optimization of Nutrient and Environmental Conditions for Acetoin Production from *Bacillus licheniformis*

QI Mao-qiang^{1,2}, JIANG Xing-tao², LIU Gang^{*1}, CHEN Jin-he¹, LI Qing-ting²

(1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China, 2. Shenzhen Boton Flavors & Fragrances Co., Ltd, Shenzhen 518051, China)

Abstract: The nutritional and environmental conditions for acetoin production from *Bacillus licheniformis* in flasks were studied in this manuscript. Firstly, the environmental conditions, such as pH value, culture temperature, seed age, volume and inoculation ratio, and nutritional conditions, like carbon and nitrogen sources were carefully investigated. Based on the results of the single factor experiment, the orthogonal experiment was carried to get the optimum medium composition. Then fed-batch fermentation was performed with glucose feeding. The yield of acetoin achieved at 20 g/L in fed-batch fermentation with glucose feeding.

Key words: *Bacillus licheniformis*, fermentation, acetoin

3-羟基-2-丁酮 (3-Hydroxy-2-butanone; Acetoin) 又名 3-羟基丁酮、2, 3-丁醇酮、乙酰基甲基原醇,存在于覆盆子、咖啡、奶油、可可、草莓、乳酪、醋、葡萄酒等物质中^[1],可广泛用于食品、日化、医药等行业,如在医药行业可用于修饰青霉素、氨苄

青霉素等抗生素类药物,以提高药效,减轻药物副作用等^[2]。

3-羟基-2-丁酮为淡黄色液体, FEMA 号 2008^[3]。它具有甜香、奶制品香,并带有脂肪的风味,可用于调配奶油、乳酪、可可、烘烤食品、焦糖及

收稿日期:2009-03-20

作者简介:齐茂强(1982-),男,湖南怀化人,理学硕士,主要从事应用微生物学研究。

Email:leo7256@hotmail.com

*通讯作者:刘刚(1969-),男,湖北京山人,教授,主要从事应用微生物学研究。Email:zjuliug@szu.edu.cn。

水果香型的食用香精。目前 3-羟基-2-丁酮的生产以化学合成为主。近年来,国内外已进行由发酵法生产 3-羟基-2-丁酮的研究。与合成产品相比,发酵 3-羟基-2-丁酮的产品安全性更易为人们所接受,同时由于香气天然感强,更为调香师所青睐。但用发酵法生产的成本高,尚不能用于大规模生产。因此筛选更高效的 3-羟基-2-丁酮的发酵菌株,优化其发酵工艺,对其发酵生产非常重要。

作者利用自行筛选的地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮。研究了摇瓶培养下的发酵规律,优化发酵培养基,并确定了较佳的发酵工艺,为进一步的研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)BD-JQ070307,由波顿香料有限公司自行筛选分离。

1.1.2 主要试剂 蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、琼脂购自上海生物工程技术服务有限公司,葡萄糖氧化酶试剂盒购自上海执诚生物技术有限公司,其它试剂如葡萄糖、肌酸、 α -萘酚、氢氧化钠、3-羟基-2-丁酮、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、氯化锌、氯化铁等均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基成份 固体培养基(质量分数):蛋白胨 1.0%、牛肉膏 1.0%、NaCl 0.5%、琼脂 2.2%,调 pH 值为 7.0~7.4,1 kg/cm² 灭菌 20 min。

种子培养基(质量分数):葡萄糖 4.0%、蛋白胨 0.5%、酵母膏 1.2%、NaCl 0.05%、MgSO₄ 0.15%、MnSO₄ 0.02%、K₂HPO₄ 0.1%、NaH₂PO₄ 0.1%、ZnCl₂ 0.02%、FeCl₃ 0.01%,调 pH 7.0,0.07 kg/cm² 灭菌 20 min。

初始实验发酵培养基(质量分数):葡萄糖 10.0%、蛋白胨 0.5%、酵母膏 1.2%、NaCl 0.05%、MgSO₄ 0.15%、MnSO₄ 0.02%、K₂HPO₄ 0.1%、NaH₂PO₄ 0.1%、ZnCl₂ 0.02%、FeCl₃ 0.01%,调 pH 7.0,0.07 kg/cm² 灭菌 20 min。

1.1.4 主要设备 SW-CJ-2FD 无菌操作台:苏州净化设备有限公司产品;QHZ-98A 旋转式摇床:太仓华美生化仪器厂产品;SHP-150 培养箱:上海精宏设备有限公司产品;LDZX-40I 灭菌锅:上海申安医疗器械厂产品;UV-1601 紫外分光光度计:日本岛津公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 检测方法

1) 产物的测定方法 3-羟基-2-丁酮在碱性条件下可被氧化为丁二酮^[4]。氧化产物丁二酮在甲萘酚存在时可与肌酸发生显色反应。反应所生成的红色化合物在 520 nm 下有最大吸收,且能稳定存在一定时间,可以用于 3-羟基-2-丁酮的测定。

取不同量的标准 3-羟基-2-丁酮溶液于试管中,加入 1.0 mL 肌酸溶液(5 mg/mL)、1.0 mL α -萘酚溶液(50 mg/mL,质量分数 10%的 NaOH 配制),定容至 10 mL。空白以蒸馏水代替 3-羟基-2-丁酮溶液。37 °C 下显色 60 min 后,于 520 nm 波长下用 1 cm 比色皿测定吸光度,制作标准曲线。得到发酵液中 3-羟基-2-丁酮质量浓度与 OD 值的关系:

质量浓度(g/L) = 4.57×10^{-2} OD $\times n$,其中 n 为稀释倍数

2) 葡萄糖测定 使用葡萄糖氧化酶试剂盒进行测定(按照其说明书进行)。

3) 菌体浓度测定 取不同时间发酵液适当稀释后测定 A₆₆₀。

1.2.2 培养方法 从斜面挑取两环菌种接至装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,培养 6 h 后按体积分数 3%的接种量接种于发酵培养基中(装液量同前)进行摇瓶发酵。培养温度为 37 °C,转速为 270 r/min。进行补糖发酵时补入葡萄糖干粉,每次补糖量为体积分数 2%。

1.2.3 培养基优化设计 根据文献设计 L₁₆(4⁵) 正交试验对培养基进行优化设计^[5]。选取葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、pH、氯化铵几个因素进行考察,每个考察因素设立 4 个水平进行试验。

2 结果与分析

2.1 典型的 3-羟基-2-丁酮发酵过程

典型的 3-羟基-2-丁酮的发酵曲线如图 1 所示。在延滞期发酵液的 pH 值略有下降,进入对数生长期后(8 h 后)pH 由 6.5 左右迅速下降至 5.5 以下。发酵液 pH 在 5.5 左右维持较短时间后逐渐上升,并回复到初始 pH 值附近。3-羟基-2-丁酮的合成与 pH 值的回升基本同步,但在菌体生长的稳定期仍有大量合成。随着发酵进行,pH 值继续上升,达到 7 附近时产物的合成基本停止。

分析上述情况,在接种之初菌体数量少,分裂、代谢不旺盛,对发酵液中碳源的利用缓慢,所以此阶段表现为发酵液 pH 和菌体浓度变化都不显著,发酵液外观仅稍见浑浊。随着发酵进行,菌体生长

逐渐旺盛,对碳源的利用速度加快,并产生大量的有机酸,从而使得发酵液 pH 值快速下降。当发酵进入到中期以后,发酵液中葡萄糖含量降低,菌体开始重新利用前面产生的有机酸,发酵液的 pH 值

上升。观察发酵产物积累,发现 3-羟基-2-丁酮在菌体对数生长期得到大量积累。随着发酵时间的延长产物浓度有所下降,分析可能是菌体重新代谢产物所致。

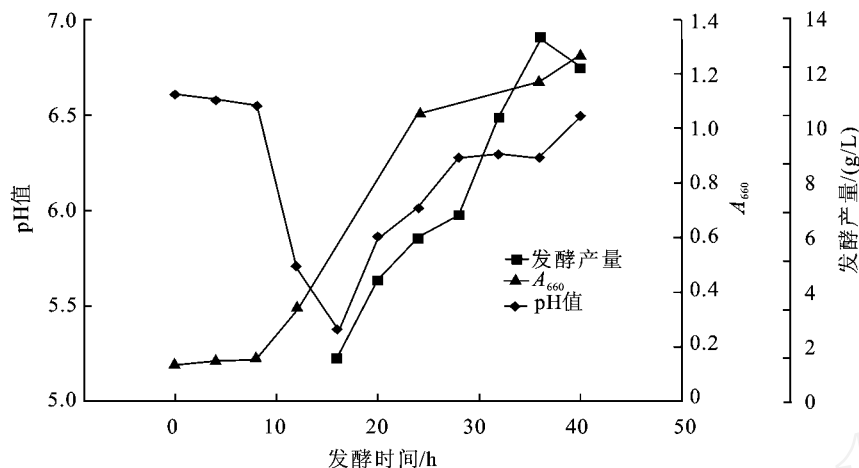


图 1 发酵时间对 pH 值、发酵产量和 A_{660} 的影响

Fig. 1 Time course of pH, yield and cell growth in flask fermentation

2.2 3-羟基-2-丁酮发酵过程发酵条件的优化

2.2.1 发酵温度试验 取 100 mL/500 mL 装液量,在不同的温度下摇瓶发酵 48 h 后的结果如图 2 所示。在 37℃ 下发酵时 3-羟基-2-丁酮的产量最高,达到 14.1 g/L。从 30℃ 开始产量随发酵温度升高而逐步增加,当温度超过 37℃ 后,继续提高发酵温度,产量略有下降。可能是随着温度的提高,菌体代谢产生 3-羟基-2-丁酮的关键酶活性亦随之提高,但当温度达到 37℃ 以上时菌体及代谢酶受高温抑制,使产量略有降低。

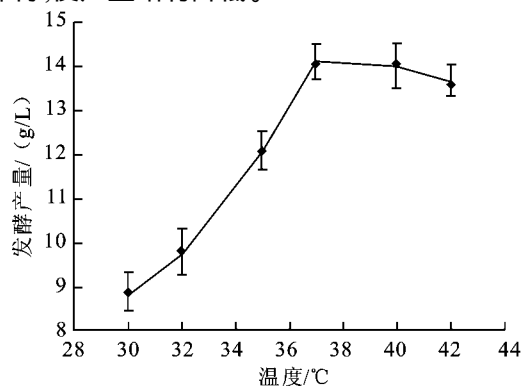


图 2 不同温度下摇瓶发酵生产 3-羟基-2-丁酮的产量

Fig. 2 Effect of fermentation temperature on acetoin yield in flask fermentation

2.2.2 装液量试验 取 500 mL 三角瓶,装液量分别为 40、60、80、100、120、150 mL,接种量 5%,在 37℃、200 r/min 条件下发酵 48 h 后测定 3-羟基-2-丁酮含量,结果如图 3 所示。以装液量为 80 mL 的

摇瓶 3-羟基-2-丁酮的产量最高(13.6 g/L)。一般认为 3-羟基-2-丁酮发酵属于好氧发酵,当装液量 40 mL 时 3-羟基-2-丁酮的产量较装液量为 80 mL 时低,装液量高于 80 mL 时产物浓度会下降,说明在利用地衣芽孢杆菌发酵 3-羟基-2-丁酮的过程中氧的传质效率并非越高越好。在利用地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮的时候应使氧的供给处于一个适当的水平,从而控制菌体代谢方向,使之有利于产物的合成。

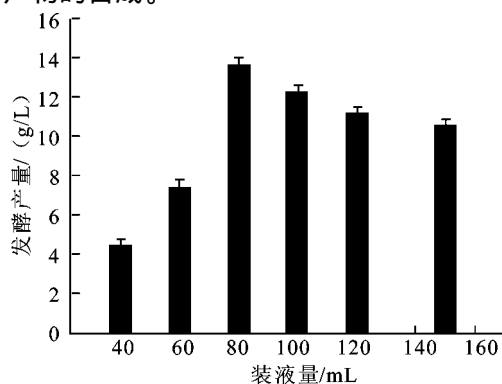


图 3 装液量试验

Fig. 3 Effect of volume charge on acetoin yield in flask fermentation

2.2.3 接种量及接种龄实验 种子质量关系到发酵结果。生长旺盛的种子和适当的接种量可有效的缩短发酵的延滞期,缩短发酵时间提高发酵效率。取不同接种量进行 3-羟基-2-丁酮发酵的结果如图 4 所示,结果表明体积分数 3% 为最佳的接种量。

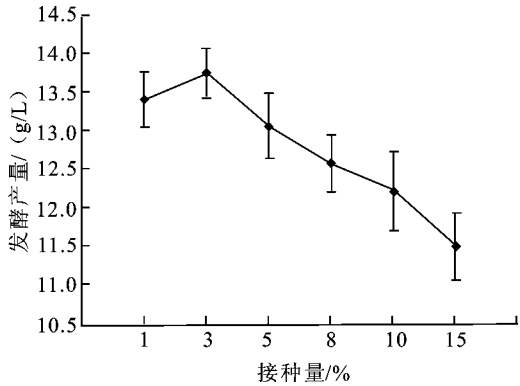


图 4 接种量试验

Fig. 4 Effect of inoculation rate on acetoin yield in flask fermentation

不同种龄的实验结果如图 5 所示,6 h 为最佳接种龄。随着种龄的增加,3-羟基-2-丁酮的发酵产量下降。其原因是当种龄过大时,在发酵中后期菌体生长旺盛,大量消耗发酵液中的营养物质,使得目的产物的有效转化率降低。综上所述,选取培养 6 h 的液体种子,3 %接种量作为最适种龄及接种量。

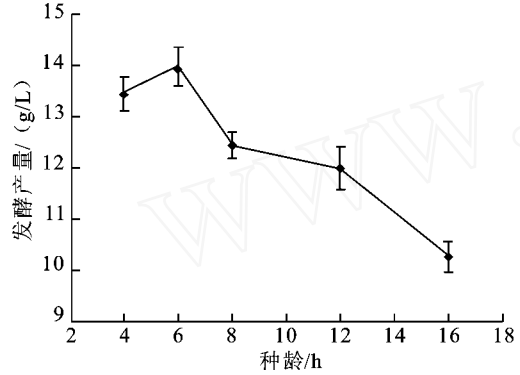


图 5 种龄试验

Fig. 5 Effect of cell age in acetoin yield in flask fermentation

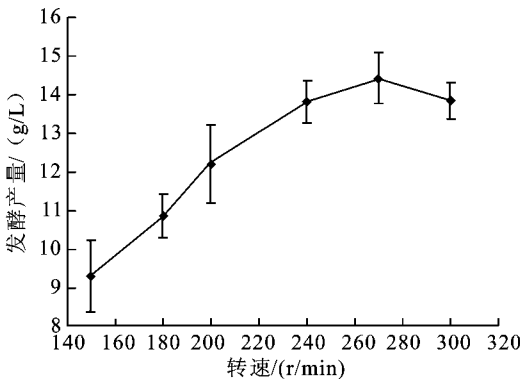


图 6 转速对发酵产量影响

Fig. 6 Effect of shaking speed in acetoin yield in flask fermentation

2.2.4 转速试验 摇床转速对 3-羟基-2-丁酮的影响如图 6 所示。随着转速提高,3-羟基-2-丁酮的

产量也随着提高,在转速为 270 r/min 时产量最高,继续增加转速,产量又会下降,类似于装液量实验的结果。不同摇床转速下的发酵结果也表明:利用地衣芽孢杆菌发酵生成 3-羟基-2-丁酮为好氧发酵,但供氧过高也对发酵不利。

2.2.5 不同碳源对发酵产量的影响 选取葡萄糖、麦芽糖、淀粉、玉米糖、蔗糖作为碳源,添加量均为 10 g/L,100 mL/500 mL 装液量,270 r/min,发酵 48 h 后测定 3-羟基-2-丁酮含量。结果表明,葡萄糖为最佳碳源,蔗糖、麦芽糖、玉米糖次之(表 1)。作者所用的地衣芽孢杆菌缺乏淀粉酶,以淀粉做为碳源的发酵液中几乎没有检测到 3-羟基-2-丁酮。

表 1 不同碳源发酵产量试验

Tab. 1 Effect of different carbon sources on acetoin yield		
碳源名称	发酵时间/h	产量/(g/L)
葡萄糖	48	12.6
麦芽糖	48	10.3
淀粉	48	0.0
玉米糖	48	8.5
蔗糖	48	11.2

2.3 碳源浓度的影响及补料发酵

2.3.1 初始糖浓度试验 取不同的初始葡萄糖浓度进行 3-羟基-2-丁酮的发酵,结果表明发酵液初始糖质量浓度对发酵产量有较明显的影响,如图 7 所示。初始葡萄糖质量浓度高时 3-羟基-2-丁酮的产量反而会下降,14 g/dL 的初始糖质量浓度同 6 g/dL 初始糖质量浓度相比产量约降低 4.1 g/L。其原因可能是较高的初始糖质量浓度会对产生分解代谢物阻遏效应。而初始糖质量浓度处于比较低的水平时,可降低分解代谢物阻遏作用,提高葡萄糖利用效率,从而增加产量。考虑到更低质量浓度的葡萄糖虽然转化率较高但整体产量较低,选取 6 g/dL 作为初始糖质量浓度。

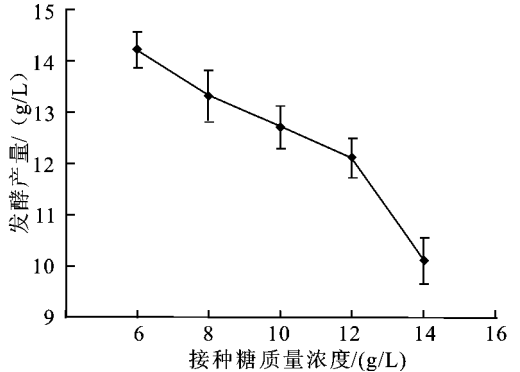


图 7 初始糖质量浓度对发酵产量影响

Fig. 7 Effect of initial sugar concentration on acetoin fermentation yield

2.3.2 补糖对发酵产量影响 初始糖质量浓度低有利于菌体合成 3-羟基-2-丁酮,但是较低的初糖质量浓度会导致发酵中途碳源不足而影响发酵产量,解决这一问题的方法是进行补糖发酵(补料分批发酵)。在发酵进行至不同的时间后,一次性地向发酵液中补加总质量为 2 %的葡萄糖干粉,结果如图 8 所示。结果表明,补糖对发酵有比较显著的促进作用,在不同的发酵时间进行补糖,3-羟基-2-丁酮产量与分批发酵相比均有显著的提高。分批发酵的产量仅为 13.4 g/L (虚线表示),24 h 摇瓶补糖发酵产量达到 25.9 g/L。

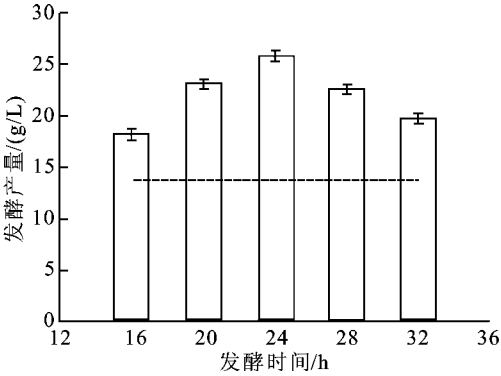


图 8 不同时间 1 次补糖摇瓶发酵产量

Fig. 8 Comparison between yield of batch fermentation and fed - batch fermentation. The dashed line represent the acetoin productivity in batch fermentation

在一次补糖发酵的基础上进行了多次补糖对发酵产量影响的实验。结果表明所有补糖摇瓶 3-羟基-2-丁酮的产量都要高于不补糖的发酵产量,发酵产量稳定在 20 g/L 以上,但效果不如一次补糖(表 2)。不同初始葡萄糖浓度发酵的结果表明,地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮受葡萄糖分解代谢物阻遏作用的调节,多次补糖可能也会产生类似于高初始葡萄糖浓度的效果,因此对发酵结果有一定的影响。

表 2 摇瓶发酵补糖表

Tab.2 The frequency and the carbon feeding times of fermentation by shaking flasks

编号	补糖时间/ h	发酵时间/ h	产量/(g/L)
1	不补糖	48	13. 34
2	16 ,24	48	20. 02
3	24 ,28	48	22. 75
4	16 ,24 ,32	48	20. 30
5	24 ,28 ,32	48	21. 41

综合补糖实验的结果,确定最佳的补糖策略为:在发酵进行至 24 h 时一次补加总质量 2 %的葡萄糖干粉。

2.4 正交试验

发酵培养 48 h 后结果检测极差分析(见表 3)可知,选择的几个主要因素对发酵产量的影响排序由高到底依次为葡萄糖 > 蛋白胨 > 氯化铵 > pH > 酵母膏,最适合添加质量浓度分别为葡萄糖 6.0 g/dL、酵母膏 1.2 g/dL、蛋白胨 0.8 g/dL、氯化铵 0.1 g/dL、pH 6.5。添加氯化铵可以起到代替部分有机氮源的作用,对提高发酵产量有一定的促进。

表 3 培养基正交试验 L(4⁵) 测定结果表

Tab.3 The result of culture medium factors of orthogonal experiment L₁₆(4⁵)

实验号	A 因素	B 因素	C 因素	D 因素	E 因素	发酵产量/(g/L)
1	1	1	1	1	1	9.46
2	1	2	2	2	2	12.42
3	1	3	3	3	3	13.80
4	1	4	4	4	4	10.10
5	2	1	2	3	4	13.70
6	2	2	1	4	3	11.47
7	2	3	4	1	2	19.74
8	2	4	3	2	1	19.87
9	3	1	3	4	2	14.67
10	3	2	4	3	1	15.67
11	3	3	1	2	4	10.78
12	3	4	2	1	3	10.59
13	4	1	4	2	3	10.18
16	4	2	3	1	4	10.10
15	4	3	2	4	1	7.66
16	4	4	1	3	2	8.80
K ₁	11.445	12.002	10.128	12.473	13.165	
K ₂	16.195	12.415	11.092	13.313	13.907	
k ₁	12.927	12.995	14.610	12.992	11.510	
k ₂	9.185	12.340	13.922	10.975	11.170	
R	7.010	0.933	4.482	2.338	2.737	

3 结 语

3-羟基-2-丁酮在食品添加行业的用途非常广泛,用它可以调配多种奶香香精,改善产品口感,提高认可度。国内关于 3-羟基-2-丁酮的报道主要停留在综述方面,报道了 3-羟基-2-丁酮的化学合成工艺以及生物利用前景。少量文献报道在国内筛选出了 3-羟基-2-丁酮高产菌株^[6,7,8],但尚未见优化其

发酵工艺的研究报道。作者利用地衣芽孢杆菌发酵生产 3-羟基-2-丁酮,研究了菌种在摇瓶条件下的生长曲线以及主要影响产量的因素。对发酵温度、接种量、种龄、摇床转速、装液量进行了试验,并利用正交试验方法对培养基进行了优化,得到了较佳

的培养基配方及发酵条件。在次基础上对葡萄糖进行了分批补料发酵,确定了较佳的补料策略:在发酵进行至 24 h 时一次补加发酵液总质量 2 % 的葡萄糖干粉,通过补料分批发酵可以 3-羟基-2-丁酮的发酵产量达到 20 g/L 以上。

参考文献(References):

- [1] 韩丽,赵祥颖,刘建军. 乙偶姻的性质、生产及应用[J]. 山东轻工业学院学报,2007,21(4):80 - 83.
HAN Li, ZHAO Xiang-ying, LIU Jiang-jun. The property, production and application of acetoin[J]. **Journal of Shandong Institute of Light Industry**, 2007, 21(4): 80 - 83.
- [2] 肖旭辉. 抗菌药伦氨苄西林盐酸盐合成[J]. 精细化工中间体,2004, 34(6): 35 - 36.
XIAO Xu-hui. Synthesis of Antibiotics Lenampicillium Hydrochloride[J]. **Fine Chemical Intermediates**, 2004, 34(6): 35 - 36.
- [3] 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997.
- [4] 阚振荣,张元亮. α -乙酰乳酸脱羧酶产生菌的分离与筛选 [J]. 河北大学学报,1997, 3: 47 - 50.
KAN Zhen-rong, ZHANG Yuan-liang. Isolation and Selection of Bacterium Producing α -Acetolactatedecarboxylase[J]. **Journal of Hebei University**, 1997, 3: 47 - 50.
- [5] 陈文强,邓百万,陈永刚,等. 用 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选列褶菌液体培养基[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):38 - 41.
CHEN Wen-qiang, DENG Bai-wan, CHEN Yong-gang, et al. Selection of Liquid Medium for *Schinophyllum commune* by $L_9(3^4)$ Orthogonal Design [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(4):38 - 41.
- [6] XU Ping, XIAO Zhi-jun, DU Y, et al. An acetoin high yield *Bacillus pumilus* strain: WO, 2006053480 [P]. 2006-5-26.
- [7] 赵祥颖,刘建军,张家祥,等. 一株产高纯度 3-羟基丁酮的枯草芽孢杆菌[P]. 中国专利, 101016530A [P]. 2007-1-29.
- [8] 刘建军,赵祥颖,田延军,等. 一株枯草芽孢杆菌在制备 3-羟基丁酮中的应用[P]. 中国专利, 101008019A [P]. 2007-8-1.

(责任编辑:朱明)