

# 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵 生产乙偶姻的 pH 调控策略

郝飞 吴群 徐岩\*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学 酿酒微生物与酶技术研究室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】为了提高 *Bacillus subtilis* CCTCC M 208157 发酵生产乙偶姻的效率。【方法】在 7 L 发酵罐水平上考察不同 pH 条件对菌株生长及乙偶姻合成的影响。【结果】pH 对菌株合成乙偶姻有显著影响, pH 4.5 有利于细胞合成乙偶姻, 但是延迟期较长; pH 5.5 时菌株生长较快, 但乙偶姻的产量偏低。因此提出了两阶段 pH 控制策略: 发酵前期 (0–16 h), 控制 pH 5.5; 发酵中后期 (16–72 h), 控制 pH 4.5。【结论】通过此策略, 菌株合成乙偶姻的能力得到进一步提高, 乙偶姻的产量、产率和生产强度分别为 32.7 g/L、0.41 g/g 和 0.91 g/(L·h), 分别比初始发酵条件下提高了 41%、42%和 69%。

**关键词:** 乙偶姻, pH 调控策略, 枯草芽孢杆菌

## Two-stage pH control strategy of acetoin production by *Bacillus subtilis* CCTCC M 208157

HAO Fei WU Qun XU Yan\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] In order to improve the acetoin production efficiency by *Bacillus subtilis* CCTCC M 208157. [Methods] The processes of acetoin fermentation were investigated

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301); 国家自然科学基金项目(No. 31000806); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(No. BY2010116); 中国白酒 169 计划项目

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; ✉: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-07-31; 接受日期: 2012-10-26

under various pH conditions in a 7 L fermentor. **[Results]** The effects of pH on cell growth and acetoin production showed that the optimum pH for acetoin production and cell growth were 4.5 and 5.5, respectively. Based on the above results, a two-stage pH control strategy was developed: the pH was controlled at 5.5 for the first 16 h, and then decreased to 4.5 for the remaining time. **[Conclusion]** With this optimized pH control strategy, the production of acetoin had a significant improvement. Moreover, the production, conversion rate from glucose and productivity of acetoin were achieved at 32.7 g/L, 0.41 g/g and 0.91 g/(L·h), respectively, which were 41%, 42% and 69% higher than that from the strategy without pH control.

**Keywords:** Acetoin, pH control strategy, *Bacillus subtilis*

乙偶姻 (Acetoin, 3-hydroxy-2-butanone), 又称 3-羟基-2-丁酮, 天然存在于干酪、葡萄、玉米、黄油、可可、苹果等各类食品中, 具有明显的奶油香、脂香特征, 因此成为一种被大众广泛使用的食用香料, 国家标准 GB2760-2011 规定其为允许使用的合成香料, FEMA 安全编号为 2008<sup>[1]</sup>。乙偶姻在食品、医药、化工等行业均有广泛的应用<sup>[2-3]</sup>, 2004 年美国能源部将其定义为 30 种优先利用的平台化合物之一<sup>[4]</sup>, 更表明其广泛的应用前景。

目前, 国内外乙偶姻生产方法主要有化学合成法和生物合成法。与化学法相比, 微生物发酵法生产乙偶姻, 因其原料廉价易得, 产品绿色天然, 受到人们的青睐<sup>[5]</sup>。目前关于微生物发酵生产乙偶姻的研究, 多集中于高产菌株的筛选与培养基的优化<sup>[6-12]</sup>。用于乙偶姻发酵的微生物主要有 *Lactococcus lactis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus pumilus*、*Hanseniaspora guilliermondii* 等, 野生菌发酵产量一般在 20-40 g/L, 产率在 0.2-0.4 g/g。通过菌种的选育虽得到了一些高产量的菌株, 但是仍缺少对发酵机理的深入认识, 关于发酵过程调控的研究较少。

本研究室自高温茅台大曲中筛选得到一株高产乙偶姻的 *B. subtilis*<sup>[13]</sup>, 本文着重考察了不同 pH 条件对菌株生长及乙偶姻合成的影响, 通过对发酵过程的动力学参数分析, 提出了相应的

pH 调控策略, 以期通过代谢工程手段进一步提高菌株合成乙偶姻的能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

*Bacillus subtilis* CCTCC M 208157 由江南大学生物工程学院酿造微生物与应用酶学研究室筛选并保藏。

### 1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, 氯化钠 5, pH 7.0。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 80, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 磷酸氢二钾 5, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 80, 酵母膏 20, 磷酸氢二钾 10, 硫酸铵 5, 硫酸镁 1, 硫酸锰 0.08, pH 7.0。

### 1.3 培养条件

**1.3.1 菌种活化:** 将保存于 4 °C 的菌株斜面培养物, 接种于装有 30 mL 种子培养基的 150 mL 摇瓶中, 在 37 °C、200 r/min 培养 24 h。

**1.3.2 种子扩培:** 按 5% 的接种量将菌株活化培养物接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 37 °C、200 r/min 培养 24 h。

**1.3.3 发酵罐培养:** 按 5% 的接种量将种子液接种于 7 L 发酵罐(New Brunswick ScientiWc Edi-

son, 美国)发酵培养, 装液量 4 L, 控制通气量 1 VVM, 搅拌转速 500 r/min, 温度 37 °C, 以 4 mol/L 的 NaOH 和 HCl 控制发酵体系 pH 至设定值。

#### 1.4 分析方法

细胞量测定: 取一定量的发酵液经 8 000 r/min 离心 10 min, 得到菌体置于 90 °C 烘箱烘干至恒重, 测定其干重。

葡萄糖测定: 邻-甲苯胺法<sup>[14]</sup>。

乙偶姻测定: 发酵液经离心, 取上清液稀释适当倍数, 以 2-庚酮为内标物, 二氯甲烷为萃取剂, 进行萃取后通过 GC 分析定量。气相色谱仪为安捷伦公司 6890N GC, 色谱柱为 DB-Wax (15 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样口与检测器温度均为 250 °C, 载气为氮气, 流速为 2 mL/min, 升温程序: 80 °C 恒温 2 min, 再以 10 °C 的速度升温至 200 °C。

比速率的测定: 菌株的比生长速率、乙偶姻的比合成速率分别用公式  $q = \frac{1}{p} \frac{dp}{dt}$ 、 $\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$  表示, 其中  $x$  为菌体干重(g/L),  $p$  为乙偶姻产量(g/L),  $t$  为时间(h)。对菌株生长与乙偶姻合成的数据进行非线性拟合, 然后对拟合数据进行微分计算, 按照上述公式求解得到不同时刻的菌株比生长速率  $\mu$  与乙偶姻比合成速率  $q$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 未控制 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 发酵生产乙偶姻的特征

在前期的研究中, 自高温茅台大曲中筛选得到一株高产乙偶姻的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* CCTCC M 208157), 考察了自然 pH 条件下菌株的发酵过程特征, 结果如图 1 所示。

经过一个短暂的延迟期后菌体开始快速生长, 发酵进行到 24 h 后菌体生长进入稳定期; 底物葡萄糖随着菌体生长被快速消耗, 发酵至 48 h

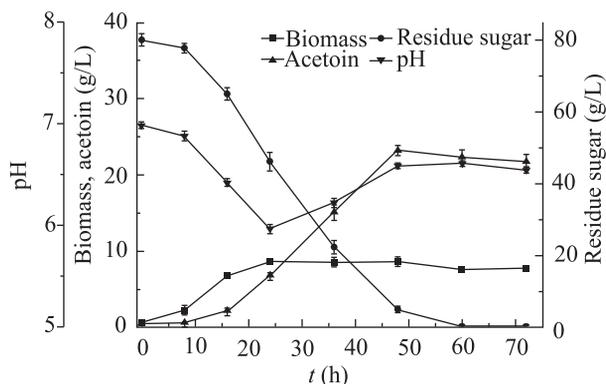


图 1 自然 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵过程曲线

Fig. 1 Time course of batch fermentation of *B. subtilis* CCTCC M 208157 in 7 L fermentor without pH control process

残糖消耗至 1.2 g/L。乙偶姻的产量随着发酵过程的进行不断增加, 在发酵 48 h 达到最大值 23.1 g/L, 随后开始缓慢下降, 这可能是由于乙偶姻作为一种能源储存物质, 当环境中的葡萄糖被消耗殆尽, 乙偶姻可以被菌体利用<sup>[15]</sup>。pH 在整个发酵过程中呈现出先降低、后升高的现象。这可能是因为在发酵前期, 菌体快速生长的过程中消耗底物葡萄糖, 同时合成大量的有机酸, 导致 pH 降低; 而过酸的环境不利于菌体生长, 细胞合成乙偶姻使得 pH 上升以抵御酸性环境对细胞的伤害<sup>[16]</sup>, 最终发酵体系中 pH 稳定在 6.5 左右。

### 2.2 不同 pH 条件对 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵的影响

考察了不同 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 的乙偶姻发酵过程, 结果如图 2 所示。随着 pH 的降低, 菌株生长及产物合成均表现出明显的延迟现象。在 pH 5.5 的条件下, 在发酵 24 h 时细胞量达到最大值, 之后细胞生长进入稳定期; 乙偶姻的产量随着菌体生长而增加, 并在发酵至 36 h 时达到峰值(25.5 g/L)。当 pH 低于 5.5 时, 菌体生长缓慢, 细胞量下降, 乙偶姻合成达到峰值的时间相应向后推迟。在 pH 4.5 的条件下, 菌体合成乙偶姻的产量最高, 可达 32.6 g/L, 但

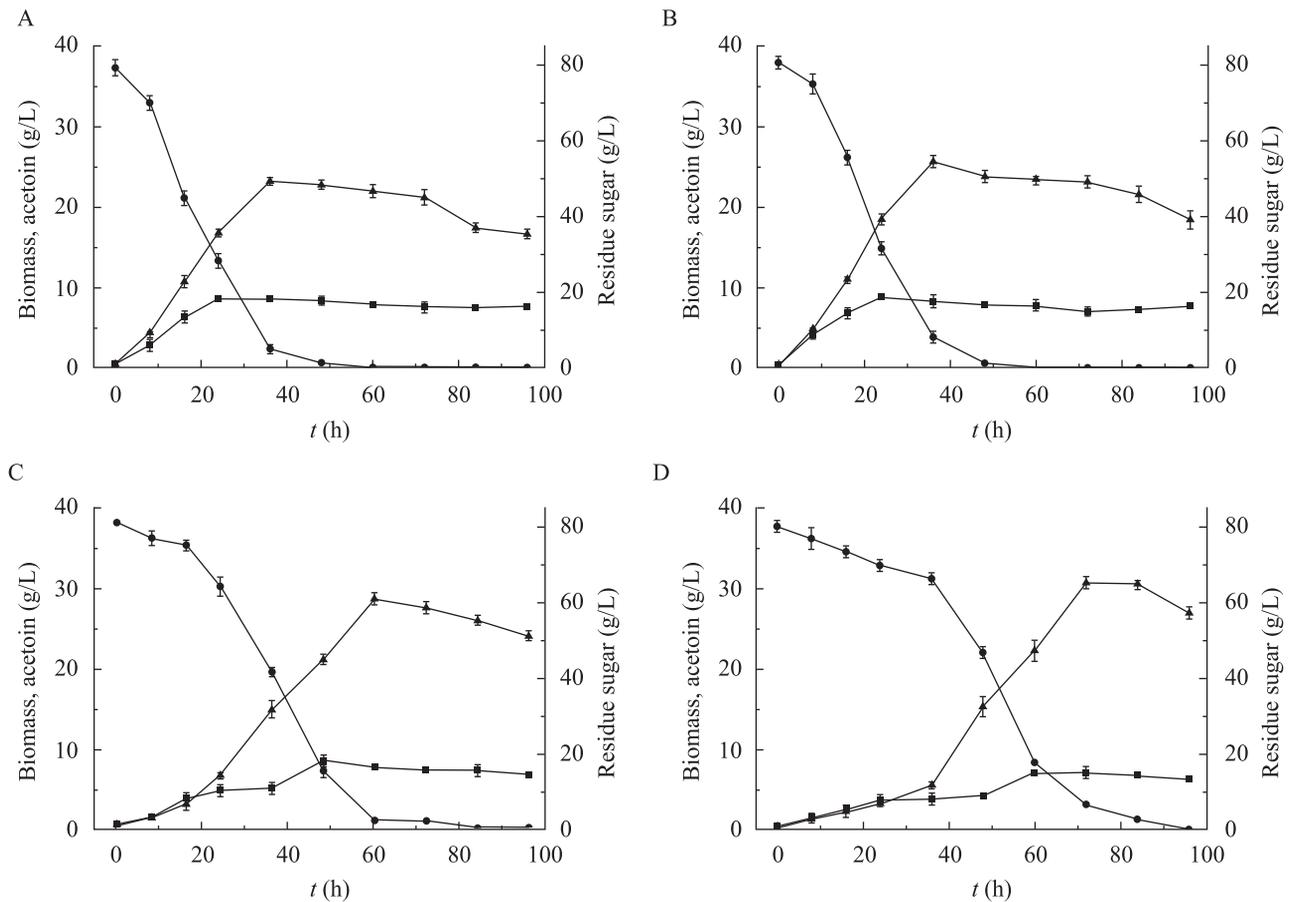


图 2 不同 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵过程曲线

Fig. 2 Time course of batch fermentation in 7 L fermentor under various pH controlled processes by *B. subtilis* CCTCC M 208157

注: A: pH 6.0; B: pH 5.5; C: pH 5.0; D: pH 4.5. ■: 生物量; ●: 残糖量; ▲: 乙偶姻。

Note: A: pH 6.0; B: pH 5.5; C: pH 5.0; D: pH 4.5. ■: Biomass; ●: Residue sugar; ▲: Acetoin.

是菌体生长缓慢, 发酵 72 h 乙偶姻的产量才达到峰值, 相比 pH 5.5 条件下推迟了 36 h。

酸性 pH 条件有利于菌株代谢合成乙偶姻, 但是过酸的环境条件下, 菌株生长缓慢, 延迟期较长, 细胞量下降。为了进一步区分不同 pH 条件对于菌株乙偶姻发酵的影响, 考察了不同 pH 条件下菌株比生长速率和乙偶姻比合成速率的动力学过程曲线。如图 3、4 所示, pH 5.5 时菌株的比生长速率为  $0.38 \text{ h}^{-1}$ , 菌株生长达到对数生长末期<sup>[17]</sup> (比生长速率小于 0.02) 仅用了 16 h, 与 pH 5.0 和 pH 4.5 条件下相比缩短了 16–20 h, 以

上结果表明 pH 5.5 最适合菌株生长。随着 pH 的降低, 菌体合成乙偶姻的比速率逐渐增大, 在 pH 4.5 时最大乙偶姻比合成速率达到  $0.19 \text{ h}^{-1}$ , 但是乙偶姻比合成速率达到峰值的时间却向后推移。在发酵前期, 菌体生长缓慢, 并且合成乙偶姻的比速率在发酵 45 h 时达到最大。

### 2.3 两段 pH 条件控制策略应用于 *B. subtilis* CCTCC M 208157 发酵生产乙偶姻

pH 对菌体生长和产物合成均有显著的影响, 但是菌体生长和产物合成的最适 pH 不一致, pH 5.5 适合菌体生长, pH 4.5 适合乙偶姻的合成,

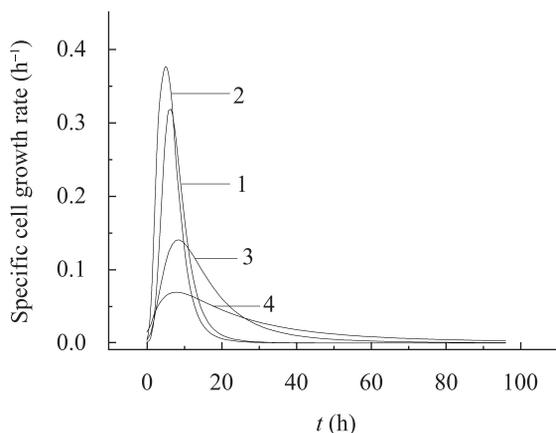


图3 不同 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵细胞比生长速率曲线

Fig. 3 Time course of specific cell growth rate under various pH controlled processes by *B. subtilis* CCTCC M 208157

Note: 1: pH 6.0; 2: pH 5.5; 3: pH 5.0; 4: pH 4.5.

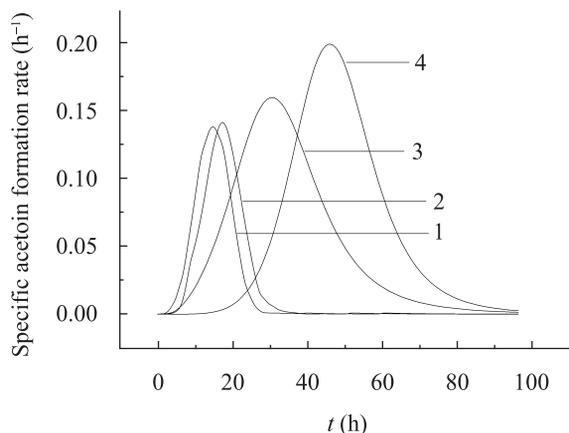


图4 不同 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 发酵乙偶姻比合成速率曲线

Fig. 4 Time course of specific acetoin formation rate under various pH controlled processes by *B. subtilis* CCTCC M 208157

Note: 1: pH 6.0; 2: pH 5.5; 3: pH 5.0; 4: pH 4.5.

并且 pH 4.5 环境下菌体生长和产物合成均表现出延迟, 乙偶姻产量达到最高值的时间过长。为了缩短菌株合成乙偶姻的周期, 提高乙偶姻的生产效率, 提出了两段 pH 控制策略: 发酵 0–16 h, pH 5.5, 使菌体快速生长; 16–72 h, pH 4.5, 得到大量菌体后, 调节 pH 使之适应细胞代谢合成乙

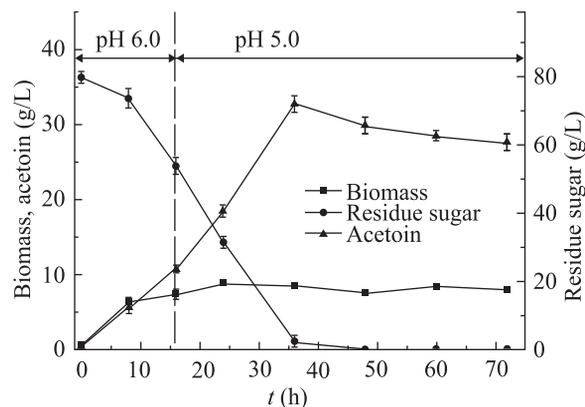


图5 两段 pH 控制策略 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵过程曲线

Fig. 5 Batch fermentation with pH shifted from 5.5 to 4.5 after 16 h in 7 L fermentor by *B. subtilis* CCTCC M 208157

偶姻。两段 pH 调控发酵过程如图 5 所示, 通过该策略, 显著提高了菌株合成乙偶姻的能力, 使其相比初始发酵条件下的产量、产率和生产强度分别提高了 41%、42%和 69% (表 1)。

### 3 结论

本文研究了不同 pH 条件下 7 L 发酵罐水平上 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵过程, 实验表明 pH 对菌株生长和乙偶姻合成有着显著的影响, 两者的最适 pH 分别为 5.5 和 4.5, 针对这一特性提出了两段 pH 控制策略: 发酵前期 (0–16 h), 控制 pH 5.5; 发酵中后期 (16–72 h), 控制 pH 4.5。通过该策略, *B. subtilis* CCTCC M 208157 发酵合成乙偶姻的产量、产率和生产强度分别比自然 pH 条件下提高了 41%、42%和 69%。

乙偶姻是微生物重要的生理代谢产物, 微生物代谢乙偶姻的生理意义有: (1) 作为细胞的储存型能源物质; (2) 抵抗酸性环境对细胞的毒害; (3) 调节细胞内的 NAD/NADH 平衡。基于微生物代谢乙偶姻的生理意义可知, pH 的改变影响着细胞代谢乙偶姻的能力, 已有文献报道酸性 pH 条件有利于微生物合成乙偶姻<sup>[18–19]</sup>。

表1 两段 pH 控制策略与自然 pH 条件下 *B. subtilis* CCTCC M 208157 乙偶姻发酵参数比较  
Table 1 Fermentation properties of acetoin fermentation in pH control strategy and natural pH

参数 Parameter	自然 pH Natural pH	两段控制 pH <sup>a</sup> pH control
生物量 Biomass (g/L)	8.60	8.80
乙偶姻产量 Acetoin production (g/L)	23.10	32.70
乙偶姻产率 Acetoin yields on glucose (g/g) <sup>b</sup>	0.32	0.41
乙偶姻生产强度 Acetoin productivity [g/(L·h)] <sup>c</sup>	0.53	0.91

注: <sup>a</sup>: 0–16 h, pH 5.5; 16–72 h, pH 4.5; <sup>b</sup>: 乙偶姻的产率=乙偶姻产量(g/L)/消耗葡萄糖量(g/L); <sup>c</sup>: 生产强度=乙偶姻产量(g/L)/发酵时间(h).

Note: <sup>a</sup>: 0–16 h, pH 5.5; 16–72 h, pH 4.5; <sup>b</sup>: Acetoin yields on glucose=Acetoin production (g/L)/Glucose consumption (g/L); <sup>c</sup>: Acetoin productivity=Acetoin yields (g/L)/Time (h).

微生物利用葡萄糖代谢合成乙偶姻的理论产率为 0.48 g/g, 而 *B. subtilis* CCTCC M 208157 在自然 pH 条件下乙偶姻的产率较低(表 1)。作者根据 *B. subtilis* CCTCC M 208157 在不同 pH 条件下自身的生长代谢规律, 提出了 pH 两段控制策略, 通过代谢工程手段有效地提高了菌株发酵合成乙偶姻的能力, 乙偶姻的产率为理论产率的 85.4%, 为后续乙偶姻产量的进一步提高和产物的分离提取奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 韩丽, 赵祥颖, 刘建军. 3-羟基丁酮的研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 116–118.
- [2] Saito S, Inoue H, Ohno K. Alpha-hydroxyketone derivatives, liquid crystal compositions containing said derivatives, and liquid crystal devices using said compositions: European, 0409234B1[P]. 1994. <http://www.freepatentsonline.com/EP0409234.html>
- [3] 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.
- [4] Werpy T, Petersen G, Aden A, et al. Top value added chemicals from biomass volume 1-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas[EB/OL]. 2004. <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA436528>.
- [5] 徐慧, 贾士儒, 刘建军. 生物法生产3-羟基丁酮的研究概况[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(11): 137–144.
- [6] Liu YF, Zhang SL, Yong YC, et al. Efficient production of acetoin by the newly isolated *Bacillus licheniformis* strain MEL09[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 390–394.
- [7] Liu Z, Qin JY, Gao C, et al. Production of (2S, 3S)-2,3-butanediol and (3S)-acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10741–10744.
- [8] Xu H, Jia SR, Liu JJ. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(5): 779–788.
- [9] Xiao ZJ, Qiao SL, Ma CQ, et al. Acetoin production associated with the increase of cell biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(19): 1997–2003.
- [10] Xiao ZJ, Liu PH, Qin JY, et al. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 61–68.

- [11] Xu P, Xiao ZJ, Du Y, et al. An acetoin high yield *Bacillus pumilus* strain: European, 1820848B1[P]. 2009. <http://www.freepatentsonline.com/EP1820848.html>
- [12] Zhang X, Yang TW, Lin Q, et al. Isolation and identification of an acetoin high production bacterium that can reverse transform 2,3-butanediol to acetoin at the decline phase of fermentation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(12): 2785–2790.
- [13] Zhu BF, Xu Y. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(8): 815–821.
- [14] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 142–145.
- [15] Xiao ZJ, Ma CQ, Xu P, et al. Acetoin catabolism and acetylbutanediol formation by *Bacillus pumilus* in a chemically defined medium[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5627.
- [16] Xiao ZJ, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2007, 33(2): 127–140.
- [17] 张静, 周景文, 刘立明, 等. 分阶段 pH 调控提高 2-酮基-L-古龙酸生产[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(9): 1263–1268.
- [18] Moons P, van Houdt R, Vivijs B, et al. Integrated regulation of acetoin fermentation by quorum sensing and pH in *Serratia plymuthica* RVH1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3422–3427.
- [19] McFall SM, Montville TJ. pH-mediated regulation of pyruvate catabolism in *Lactobacillus plantarum* chemostat cultures[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1989, 4(5): 335–340.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白质组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2013 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: [bjb@im.ac.cn](mailto:bjb@im.ac.cn), [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn)

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413