

# 利用酿酒酵母工程菌株生产 2,3-丁二醇的研究进展

黄守锋<sup>1</sup>, 裴芳艺<sup>1</sup>, 王长丽<sup>1</sup>, 平文祥<sup>1,2</sup>, 葛菁萍<sup>1,2\*</sup>

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 微生物省高校重点实验室, 哈尔滨 150080;  
2. 农业微生物技术教育工程研究中心, 哈尔滨 150500)

**摘要:** 2,3-丁二醇在食品、化妆品、医药和运输燃料等行业具有广泛的应用, 因而提高 2,3-丁二醇的产量一直备受研究者们关注。目前, 研究的热点主要集中于利用微生物发酵可再生资源生产 2,3-丁二醇以取代传统的化学合成法, 并取得了较大的进展。常见的 2,3-丁二醇产生菌有克雷伯氏菌属和芽孢杆菌属, 它们能有效利用可再生资源高效生产 2,3-丁二醇。然而这些细菌被认为是潜在的病原菌, 难以应用于大规模生产。因此, 研究者们又将目光转向了酿酒酵母。就安全性和工业化生产要求而言, 酿酒酵母是生产 2,3-丁二醇的理想菌种。本文对国内外的相关研究进行了总结, 介绍了酿酒酵母产 2,3-丁二醇的优势和不足, 2,3-丁二醇合成代谢途径及其基因工程菌株构建的方向, 以及通过代谢工程将酿酒酵母改造成能高效、高质、高产 2,3-丁二醇的理想菌株的研究关键。

**关键词:** 2,3-丁二醇; 基因工程; 酿酒酵母; 代谢工程

## Research progress in production of 2,3-butanediol by *Saccharomyces cerevisiae* engineering strains

HUANG Shou-Feng<sup>1</sup>, PEI Fang-Yi<sup>1</sup>, WANG Chang-Li<sup>1</sup>, PING Wen-Xiang<sup>1,2</sup>, GE Jing-Ping<sup>1,2\*</sup>

(1. Key laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. Ministry of Education and Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Harbin 150500, China)

**ABSTRACT:** 2,3-Butanediol (2,3-BD) is a compound of significant importance which has an extensive application in the fields of food, cosmetics, medicine and transport fuel. Thus it has being a hot topic about how to improve the 2,3-BD yield in the world. The utilization of renewable resources by microbial fermentation to produce 2,3-BD has been continuously focused on and great advancements have been made by researchers as an alteration of traditional chemical synthesis. Most bacteria such as *Klebsiella.sp* and *Bacillus.sp* used as 2,3-BD producers can make full use of renewable resources to produce 2,3-BD efficiently. However, most of *Klebsiella.sp* and *Bacillus.sp* are considered as potential pathogenic which is not suitable for a large-scale production of 2,3-BD. To this end, *Saccharomyces cerevisiae* is a competent alternative microorganism in terms

基金项目: 国家自然科学基金(31570492)、国家自然科学基金(31270534)、国家自然科学基金(31470537)、黑龙江省高等学校科技创新团队项目(2012td009)

**Fund:** Supported by Natural Science Foundation of China (31570492), Natural Science Foundation of China (31270534), Natural Science Foundation of China (31470537), Science and Technology Innovation Team of Colleges and Universities of Heilongjiang Province (2012td009)

\*通讯作者: 葛菁萍, 教授, 主要研究方向为微生物遗传育种。E-mail: gejingping@126.com

\*Corresponding author: GE Jing-Ping, Professor, Key laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Harbin 150080, China. E-mail: gejingping@126.com

of the security and the demand for industrial production. This paper reviews the relevant research all over the world. The advantages and disadvantages of *S. cerevisiae* as 2,3-BD producer, the metabolism and synthesis routes of 2,3-BD, the directions of enhancing the 2,3-BD yield by *S. cerevisiae* and key factors to produce 2,3-BD with high efficiency, high quantity and high yield by *S. cerevisiae* engineering strains using metabolic engineering are introduced in detail.

**KEY WORDS:** 2,3-butanediol; genetic engineering; *Saccharomyces cerevisiae*; metabolic engineering

## 1 引言

目前,整合了生物量转化过程和先进仪器设备的生物精炼系统,能大量利用每年剩余的可再生资源生产燃料、能源和化学产品,并在全球范围内迅速发展。之前通过化学过程生产的一些化学物质现在都能通过生物学方法生产,利用微生物发酵可再生物质生产 2,3-丁二醇就是其中一个很好的例子<sup>[1]</sup>。2,3-丁二醇是一类使用价值很高的物质,在化工、食品、燃料和航空航天等领域都有广泛的应用<sup>[2,3]</sup>。它可作为良好的燃料和燃料添加剂,脱水生产 1,3-丁二烯从而用于橡胶合成并可作为抗凝剂使用。研究表明,2,3-丁二醇主要是通过化学法和微生物发酵法生产。化学法是以石油裂解时产生的四碳类碳氢化合物在高温高压下水解得到 2,3-丁二醇,这种方法花费高、过程繁冗、操作不便,难以实现大规模生产<sup>[4-6]</sup>。代谢过程中可以积累 2,3-丁二醇的微生物有很多种,它们广泛分布在自然界中且大都具有广泛的底物谱,可以利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等,在不同的环境条件下,除了对渗透压敏感外,它们均能保持相对稳定<sup>[7]</sup>。但是目前常用的 2,3-丁二醇产生菌如克雷伯氏菌属等是病原菌,而工业化规模的生产必须遵从安全法规,意味着这类细菌不适合作为生产菌株。因此,对 2,3-丁二醇的渴望迫切要求人们寻找到适合的菌株,此时利用酿酒酵母生产 2,3-丁二醇成为目前的热点<sup>[8]</sup>。酿酒酵母已经成功应用于现代工业,用于发酵生产许多产品,如乙醇,有机酸,氨基酸,酶类以及蛋白质等<sup>[9]</sup>。因此,本论文以酿酒酵母为对象,借鉴成功应用的代谢工程策略,希望可以指导代谢流朝着 2,3-丁二醇方向移动,论述酿酒酵母作为 2,3-丁二醇生产菌株的可行性,为相关研究提供一个参考。

## 2 酿酒酵母细胞内 2,3-丁二醇代谢途径解析

在酵母菌体内,2,3-丁二醇的产生于有几个重要的前体物质,即发酵过程中产生的乙醛、丙酮酸和  $\alpha$ -乙酰乳酸,该过程是通过双乙酰和乙偶姻进行转换的(图 1)。在酿酒酵母糖酵解过程中产生的丙酮酸通过两个途径转换成 2,3-丁二醇<sup>[10-12]</sup>。一条途径是丙酮酸在  $\alpha$ -乙酰乳酸合酶( $\alpha$ -acetolactate synthase/ $\alpha$ -ALS)催化作用下经过脱羧反应形成  $\alpha$ -乙酰乳酸, $\alpha$ -乙酰乳酸只需要利用较少的 NADH 就可

以生成。在无氧条件下, $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶( $\alpha$ -acetolactate decarboxylase/ $\alpha$ -ALDC)催化  $\alpha$ -乙酰乳酸转化成乙偶姻。当有  $O_2$  存在时, $\alpha$ -乙酰乳酸会自发脱羧形成双乙酰,双乙酰在双乙酰还原酶(DAR,也被称为乙偶姻脱氢酶)作用下能转变成乙偶姻。另一条途径是丙酮酸在丙酮酸脱羧酶(PDCs)催化下转化成乙醛,乙醛在 PDCs 催化下通过缩合反应转化成乙偶姻。最后,丁二醇脱氢酶(butanediol dehydrogenase/BDH)催化乙偶姻生成 2,3-丁二醇。

除了 2,3-丁二醇外,还会生成一些其他副/终产物,如乙醇、乙酸、甲酸、琥珀酸和甘油等,这些产物的产生因微生物种类和发酵条件的差别而不同。首先,由于酵母中活性较高、数量较多的乙醇脱氢酶的存在,发酵时会主要合成乙醇<sup>[13]</sup>;其次,在 pH 较低时,形成的醋酸盐是  $\alpha$ -ALS,  $\alpha$ -ALDC, DAR 和 BDH 这几种重要酶的抑制诱导物,会严重抑制丙酮酸转变为 2,3-丁二醇,而且醋酸对于酵母细胞的生长和代谢都具有较强的抑制作用<sup>[14-16]</sup>。此外, $\alpha$ -ALS 在有  $O_2$  时会迅速的不可逆失活,阻碍 2,3-丁二醇的合成,丙酮酸则在丙酮酸脱氢酶多酶复合物作用下裂解形成乙酰-CoA,乙酰-CoA 随后进入三羧酸循环。而在无氧环境下,由于受辅酶 NADH 量的限制,乙酰-CoA 就不会生成<sup>[17-19]</sup>。最后,在微有氧条件下,丙酮酸-甲酸裂解酶和乙酰乳酸合酶作用于丙酮酸生成甲酸和 2,3-丁二醇。甲酸最终被进一步代谢生成  $CO_2$  和水。琥珀酸则形成于磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)分支代谢,在严格厌氧条件下,PEP 经 PEP 羧化酶作用形成草酰乙酸,最后转变为琥珀酸<sup>[20,21]</sup>。甘油是酿酒酵母代谢过程中的主要副产物。葡萄糖在甘油三磷酸脱氢酶(GPD)的催化下,在辅酶 NADH 的参与下被转变成甘油三磷酸,进而在甘油-3-磷酸酯酶(GPP)作用下转化成甘油,这是酵母合成甘油的唯一代谢支路,对于酵母的正常代谢有着重要的作用<sup>[22-24]</sup>。首先甘油可以维持细胞内外渗透压平衡,使细胞生长在均衡的渗透压环境中,其次甘油可以维持细胞内氧化还原的平衡,保证酵母细胞的正常代谢。

## 3 利用酿酒酵母生产 2,3-丁二醇的优势和不足

### 3.1 利用酿酒酵母生产 2,3-丁二醇的优势

选择酿酒酵母作为 2,3-丁二醇的生产菌株,是出于多方面的考虑。酿酒酵母培养条件普通,能有效降低生产成本。生长繁殖迅速,代谢旺盛,碳源消耗速率快,可以实现

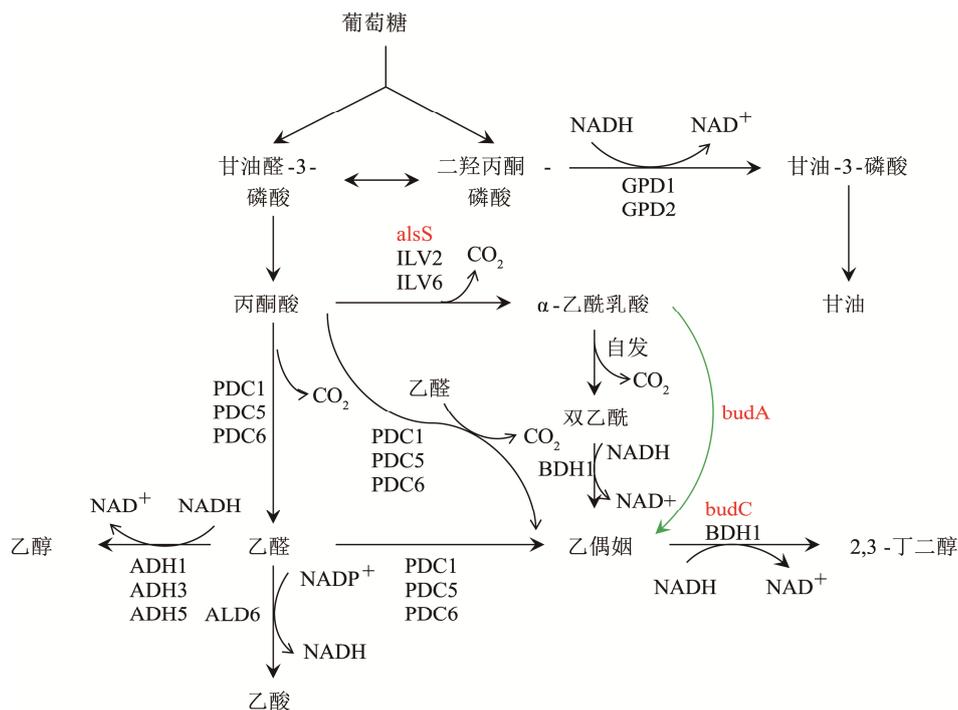


图1 酿酒酵母利用葡糖糖产2,3-丁二醇代谢途径<sup>[12]</sup>

Fig. 1 Metabolic pathways of 2,3-BD production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*

大规模生产；酿酒酵母对底物和产物耐受性强，对环境压力抗性较高，用于表达基因工程产品时，工艺简单，最重要的它不会产生毒素，安全可靠<sup>[25,26]</sup>；在现代分子生物学和细胞生物学中，酿酒酵母与动植物细胞有诸多相同的结构，被用作真核模式生物。人们已经完成了酿酒酵母全基因组测序工作，遗传背景非常清晰，遗传操作技术也十分成熟<sup>[27]</sup>；而且酿酒酵母在表达外源基因时，具有一定的翻译后修饰能力，收获的外源蛋白质具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰，特别适合于表达真核生物基因，这有利于保持生物产品的活性和稳定性<sup>[28-30]</sup>。目前对酿酒酵母的研究主要集中在代谢调控机制，高通量研究技术手段包括基因组学，转录组学，蛋白质组学和代谢组学及现代生物信息学对结果的分析 and 处理几个方面<sup>[31,32]</sup>。

刘继栋<sup>[33]</sup>等通过代谢工程对改造酿酒酵母生产单萜的关键问题进行分析，改造酿酒酵母甲羟戊酸(MVA)途径，使得单萜香叶醇的产量从0.68 mg/L提高到了44.13 mg/L，为进一步研究提供了依据。杨静<sup>[34]</sup>等对酿酒酵母进行基因组水平的分泌蛋白及信号肽结构的生物信息学分析后发现，该研究可更好的为表达分泌型的外源蛋白研究提供参考信息。这些代谢工程策略的成功运用为我们提供了参考。有鉴于此，酿酒酵母成为2,3-丁二醇生产的首选真核微生物而受到广泛关注。但是利用酿酒酵母作为2,3-丁二醇生产菌株，还存在着一些问题需要解决。

### 3.2 利用酿酒酵母生产2,3-丁二醇的不足

首先，酿酒酵母分支代谢路径限制了2,3-丁二醇产量；野生型的酿酒酵母菌株虽然能产生2,3-丁二醇，但是产量很低，难以直接应用。甘油是酵母糖代谢过程中的主要副产物，可以消耗4%~10%的总碳源，因而会降低碳源向2,3-丁二醇途径的转化率。丙酮酸是产生2,3-丁二醇的关键性前体物质，而在酿酒酵母实际代谢过程中，丙酮酸会在乙醇脱氢酶催化下被优先利用生成乙醇，此外还有乙酸，琥珀酸等副产物，这些都是限制大2,3-丁二醇量产生的因素；其次酿酒酵母本身2,3-丁二醇代谢酶系并不完整。丙酮酸是整个代谢过程的关键中间体，丙酮酸到2,3-丁二醇的形成途径有3种酶<sup>[21]</sup>，包括 $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶和3-羟基丁酮还原酶(又名2,3-丁二醇脱氢酶)。在酿酒酵母体内，由于不存在 $\alpha$ -ALDC，故只能在微有氧条件下产生微量的2,3-丁二醇。同时人们还发现，在酿酒酵母体内，丙酮酸可以在丙酮酸脱羧酶(PDCs)催化下通过乙醛转化成乙偶姻<sup>[23]</sup>，然而其合成乙偶姻的代谢能力却十分低下，难以大量产生2,3-丁二醇。

### 4 利用酿酒酵母生产2,3-丁二醇的改进方法

因此若想增加2,3-丁二醇的合成，首要的是改变碳代谢流，减少副产物的合成。首先要减少代谢过程中副产物

甘油、乙酸和乙醇的生成, 增加碳源的转化率和中间代谢产物的积累, 促进碳源朝 2,3-丁二醇合成的方向流动。通过代谢工程理论, 阻断副产物合成途径必须敲除关键酶基因。研究表明, 缺失 *GPD1* 基因的酵母单倍体突变菌株的甘油产量与亲本相比减少了近 50% 而 *GPD2* 基因缺失菌株与亲本相比, 甘油产量减少了近 40%。*GPD1* 和 *GPD2* 全缺失的酵母突变菌株基本不产生甘油, 对高渗透压环境条件高度敏感, 并且在厌氧条件下基本不能正常生长<sup>[35]</sup>。此外, 2,3-丁二醇合成途径中, 消耗 2 分子的  $\text{NAD}^+$  产生 2 分子的丙酮酸, 而 2 分子的丙酮酸只能产生 1 分子的乙偶姻, 因此, 在 BDH 催化下, 1 分子的乙偶姻被还原生成 1 分子的 2,3-丁二醇的过程中, 只有 1 分子的  $\text{NAD}^+$  被再生。这样就使得体内的  $\text{NAD}^+$  缺乏, 造成氧化还原失衡, 此时必须通过外界提供 1 分子的  $\text{NAD}^+$  才会使体内的氧化还原平衡, 2,3-丁二醇才会正常的产生。而甘油的产生正是伴随着 NADH 的氧化反应, 可以充当电子穴, 因此对于 2,3-丁二醇的产生至关重要<sup>[36]</sup>。研究表明, 过表达甘油途径的 *GPD1* 基因, 会使乙醇的产量大幅度减少而乙偶姻和 2,3-丁二醇的产量得到增加, 2,3-丁二醇的产量可达到  $4.85\text{g/L}$ <sup>[37-38]</sup>, 这大概是因为 2,3-丁二醇途径和乙醇途径有着共同的中间代谢产物, 二者存在竞争机制的缘故。因此, 抑制编码乙醇脱氢酶的 *ADH1*, *ADH3* 和 *ADH5* 三个基因的表达或者直接敲除这三个基因, 可以减少乙醇的产量并增加 2,3-丁二醇的产量。Ng<sup>[12]</sup> 等敲除这三个基因之后发现 2,3-丁二醇的产量比原始菌株提高了 20 倍, 表明这是一个可行的方案, 但 2,3-丁二醇的产量依然不高, 仅有  $2.29\text{g/L}$ 。因此, 人们将目光转而投向乙醇途径上游的酮酸脱羧酶 (PDCs) 失活策略或者是敲除控制 PDCs 的基因<sup>[39]</sup>。丙酮酸脱羧酶活性主要受 3 个结构基因调控, 即 *pdcl*、*pdcs* 和 *pdcs6*, 这三个基因的表达又依赖于转录因子 *pdcs2*, 这是一个关键步骤, 敲除 *pdcl*、*pdcs* 或者三个基因后会使菌株的丙酮酸脱羧酶缺乏乃至消失, 从而会使得中间产物丙酮酸大量积累, 乙醇的产量会降到最低, 而 2,3-丁二醇的产量能最大化。

但是, PDC 缺陷菌株 (*pdcs*<sup>-</sup> 菌株) 却有着生长缺陷问题。首先, *pdcs*<sup>-</sup> 菌株的生长强烈依赖二碳 ( $\text{C}_2$ ) 物质如乙酸和乙醇, 如果缺乏  $\text{C}_2$  物质, *pdcs*<sup>-</sup> 菌株将不能合成赖氨酸和脂肪酸, 导致细胞质中缺乏乙酰-CoA, 从而影响发酵进程。其次, *pdcs*<sup>-</sup> 菌株在葡萄糖为唯一碳源的培养基中无法生长, 这是因为葡萄糖会抑制 *pdcs*<sup>-</sup> 菌株的呼吸作用导致其体内氧化还原失衡, 而呼吸作用对于细胞质中 NADH 的再氧化过程是必不可少的<sup>[40-41]</sup>。野生酵母体内, NADH 产生于糖酵解过程, 乙醇发酵的主要功能就是再氧化 NADH 产生  $\text{NAD}^+$ , 而 *pdcs*<sup>-</sup> 菌株中乙醇发酵过程被终止, 导致了 NADH 的过剩, 使得体内氧化还原的不平衡, 从而阻碍细胞生长<sup>[42]</sup>。另外, 内部敲除 *mth1* 基因编码序列也可以使

*pdcs*<sup>-</sup> 菌株在葡萄糖为唯一碳源的培养基上生长。因为对葡萄糖敏感的菌株, 体内己糖转运基因 (*HXTs*) 的表达会受到抑制, 而 *mth1* 基因是导致葡萄糖敏感型基因的转录因子。因此, *mth1* 基因编码序列的缺失会使 *pdcs*<sup>-</sup> 菌株重新摄取葡萄糖<sup>[43-45]</sup>。这种内部序列敲除导致与蛋白质降解有关的特定位点被移除, 并在此基础上增加基因功能的稳定性, 维持细胞内葡萄糖浓度在一个较低的水平并能因此而减轻葡萄糖对菌株的抑制作用。

邓旭衡<sup>[46]</sup> 通过基因工程手段构建 *pdcl* 和 *pdcs5* 双缺失的酿酒酵母菌株, 并进行培养基优化, 丙酮酸的积累达到  $24.85\text{g/L}$ 。王志坤<sup>[47]</sup> 针对 *pdcs* 酿酒酵母菌株进行了驯化, 并优化发酵条件, 使得丙酮酸的积累达到  $66.4\text{g/L}$ , 然后通过辅酶工程进一步对菌株进行分子改造, 进行辅酶因子的调控, 使得丙酮酸的积累达到  $74.83\text{g/L}$ 。这些结果表明, 可以通过基因工程手段改造酿酒酵母碳代谢流, 使其乙醇产量降到最低并积累 2,3-丁二醇途径的关键中间产物丙酮酸。

在酿酒酵母中, 2,3-丁二醇的转化有两个途径, 但都是通过乙偶姻转化的。因此, 必须提高丙酮酸转成乙偶姻的代谢能力。此时, 可以将控制 2,3-丁二醇合成途径的关键酶过量表达, 从而提高 2,3-丁二醇的产量。能够高产 2,3-丁二醇的细菌中, 芽孢杆菌由于生长更迅速、代谢较旺盛、菌体形体较大, 而且常见的产 2,3-丁二醇的多粘类芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌被认为是 GRAS 细菌, 因而更适合用于 2,3-丁二醇的批量生产。此外, 2,3-丁二醇的三种构型中, 人们最期望得到的是 (2R,3R)-丁二醇, 自然条件下, 唯有芽孢杆菌可以生产得到。其中枯草芽孢杆菌产生的 2,3-丁二醇以该构型为主<sup>[48]</sup>。因此, 在构建过量表达的 2,3-丁二醇工程菌株时, 关键酶基因都是从枯草芽孢杆菌中扩增得到的。Maryam 等<sup>[49]</sup> 构建了一株过表达 BDH 和甘油、低产乙醇酿酒酵母工程菌株, 在补料分批发酵中, 2,3-丁二醇产量最高可达到  $33.2\text{g/L}$ 。Lian 等<sup>[50]</sup> 将枯草芽孢杆菌的 *BsalsD* 导入敲除了 *mth1* 基因的 *pdcs* 酿酒酵母, 在补料分批发酵中, 2,3-丁二醇产量最高可达到  $100\text{g/L}$ 。Kim 等<sup>[41]</sup> 将枯草芽孢杆菌 2,3-丁二醇合成途径的 *alsS* 和 *alsD* 基因导入 *pdcs*<sup>-</sup> 酿酒酵母, 在最优通气条件下, 进行流加发酵培养, 2,3-丁二醇的产量达到  $96.2\text{g/L}$ 。这些结果表明, 工程化的酿酒酵母菌株可以成为高效利用可再生资源生产 2,3-丁二醇的最适宿主菌株。

## 5 展望

自然界中可用来发酵生产 2,3-丁二醇的菌种较多, 为菌种的选择提供了较大的空间, 但由于 2,3-丁二醇属于菌体的次级代谢产物, 因而其产量受到了一定的限制。若要提高微生物发酵工艺相对于化学合成工艺的竞争力, 必须通过分子生物学、微生物代谢工程等现代生物技术, 提高

2,3-丁二醇发酵水平,同时开发高效率,低成本的2,3-丁二醇产品提取工艺。进一步探索2,3-丁二醇生物合成途径中关键酶的酶学性质,尤其是参与不同构型2,3-丁二醇合成的酶及关键限速酶,以为2,3-丁二醇的高产及其相关构型的有效控制奠定基础。在对发酵过程进行动力学分析的基础上研究2,3-丁二醇的产生优化发酵过程,改进发酵工艺,充分挖掘菌株的生产潜力,尽可能提高转化率与发酵液中产物浓度,并在此基础上开发高效、廉价、低耗的提取工艺。都是获得高产工程菌株的有效途径。酿酒酵母作为生产2,3-丁二醇的理想菌株,要加大这方面的研究力度。在现有的过量表达、基因敲除、导入新基因甚至直接在体内构建新的代谢路径的基础之上,还要开发新技术,新手段,以保证对产2,3-丁二醇酿酒酵母改造能完全成功。此外,已知的全基因序列为新技术的发展铺平了道路,比如高通量技术的大量应用。尽管现在通过基因工程来改变酿酒酵母的代谢途径还存在某些方面的限制,而且关于利用酿酒酵母工程菌株生产2,3-丁二醇的报道很少。现有的数据表明利用基因工程手段改造酿酒酵母可以使其成为2,3-丁二醇的产生菌株。随着大量的新技术在未来将会应用到酿酒酵母上,加上现在已经研究清楚的各种技术,酿酒酵母必将成为一个重要的有潜力的2,3-丁二醇生产的细胞工厂。

#### 参考文献

- [1] Celińska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, (27): 715–725.
- [2] 赵恭文, 刘建军, 李长松, 等. 微生物发酵法生产2,3-丁二醇瓶颈因素分析[J]. *山东农业科学*, 2011, 11: 94–99.  
Zhao GW, Liu JJ, Li CS, *et al.* Analysis of bottleneck factors in 2,3-butanediol production by microbial fermentation [J]. *Shandong Agric Sci*, 2011, 11: 94–99.
- [3] 蒋丽群, 郭峰, 方真, 等. 微生物发酵法生产2,3-丁二醇的研究[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28 (6): 25–28.  
Jiang LQ, Guo F, Fang Z *et al.* Research of 2,3-butanediol production by microbial fermentation [J]. *Chem Biol Eng*, 2011, 28 (6): 25–28.
- [4] 刘德龙, 张玉苍, 何连芳, 等. 生物转化法生产2,3-丁二醇的研究进展[J]. *食品工程*, 2011, 3: 143–146.  
Liu DL, Zhang YC, He LF, *et al.* Research development of 2,3-butanediol production by biotransformation method [J]. *Food Eng*, 2011, 3: 143–146.
- [5] 戴建英, 孙亚琴, 孙丽慧, 等. 生物基化学品2,3-丁二醇的研究进展[J]. *过程工程学报*, 2011, 10(1): 200–208.  
Dai JY, Sun YQ, Sun LH, *et al.* Research development of a Bio-based chemicals: 2,3-butanediol [J]. *J Process Eng*, 2011, 10(1): 200–208.
- [6] 赵世敏. 微生物发酵法产2,3-丁二醇[D]. 无锡: 江南大学, 2008.  
Zhao SM 2,3-butanediol production by microbial fermentation [D]. Wuxi: Jiang Nan University, 2008.
- [7] Biebl H, Zeng AP, Menzel K, *et al.* Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumonia* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 24–29.
- [8] 付磊, 王萌, 刘维喜. 生物法制备2,3-丁二醇的最新进展[J]. *化学进展*, 2012, 11(24): 2268–2276.
- [9] Fu J, Wang M, Liu WX. The newest development of 2,3-butanediol production by biological method [J]. *Chem Progress*, 2012, 11(24): 2268–2276.
- [9] 李代昆, 张德纯. 酿酒酵母发酵糖类生产酒精的研究现状[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2005, 17(2): 353–357.  
Li DK, Zhang DC. Current research status of alcohol production from sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chin J Microecol*, 2005, 17(2): 353–357.
- [10] Ehsani M, Fernandez MR, Biosca JA, *et al.* Reversal of coenzyme specificity of 2,3-butanediol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo functional analysis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104: 381–389.
- [11] Pronk JT, Steensma HY, VanDijken JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1996, 12: 1607–1633.
- [12] Ng CY, Jung MY, Lee J, *et al.* Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by *in silico* aided metabolic engineering [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 68.
- [13] 纪晓俊, 聂志奎, 黎志勇, 等. 生物制造2,3-丁二醇: 回顾与展望[J]. *化学进展*, 2010, 12(22): 2450–2461.  
Ji XJ, Nie ZK, Li ZY, *et al.* Biological manufacturing of 2,3-butanediol: retrospect and prospect [J]. *Chem Progress*, 2010, 12(22): 2450–2461.
- [14] Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, *et al.* Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca* [J]. *Process Biochem*, 2010, 45: 613–6.
- [15] 沈梦秋, 纪晓俊, 聂志奎, 等. 生物制造不同立体构型2,3-丁二醇: 合成机理与实现方法[J]. *催化学报*, 2013, 34(2): 351–360.  
Shen MQ, Ji XJ, Nie ZK, *et al.* Biological manufacturing different spatial configuration of 2,3-butanediol: synthesis mechanism and implementation method [J]. *Chin J Catalysis*, 2013, 34(2): 351–360.
- [16] 赵心清, 张明明, 徐桂红, 等. 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(3): 368–380.  
Zhao XQ, Zhang MM, Xu GH, *et al.* Molecular mechanisms of acetic acid tolerance in functional genomics of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chin J Biotechnol*, 2014, 30(3): 368–380.
- [17] Han SH, Lee JE, Park K, *et al.* Production of 2,3-butanediol by a low acid producing *Klebsiella oxytoca* NBRF4 [J]. *N Biotechnol*, 2013, 30: 166–172.
- [18] Nicholson WL. The *Bacillus subtilis ydjl (bdhA)* gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 6832–6838.
- [19] Maddox IS. Microbial production of 2,3-butanediol [J]. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996: 269–291.
- [20] Gottshalk G. Bacterial metabolism [M]. New York: Springer-Verlag, 1986.
- [21] Magee RJ, Kosaric N. The microbial production of 2,3-butanediol [J]. *Adv Appl Microbiol*, 1987, 32: 89–161.
- [22] 宋源泉, 贇珍, 李强, 等. 2,3-丁二醇的发酵生产[J]. *化工进展*, 2011, 30(5): 1069–1077.  
Song YQ, Yun Z, Li Q, *et al.* Fermentation production of 2,3-butanediol [J]. *Chem Progress*, 2011, 30(5): 1069–1077.
- [23] Gonzalez E, Fernandez MR, Marco D, *et al.* Role of *Saccharomyces cerevisiae* oxidoreductases *Bdh1p* and *Ara1p* in the metabolism of acetoin and 2,3-butanediol [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 670–679.

- [24] 曹罗元. 酿酒酵母 *ALD4* 基因敲除与 *GPD1* 基因沉默研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2010.  
Cao LY. Research of *ALD4* knockout and *GPD1* gene silence *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2010.
- [25] 唐香山, 张学文. 酿酒酵母表达系统[J]. 生命科学研究, 2004, 8(2): 106–109.  
Tang XS, Zhang XW. *Saccharomyces cerevisiae* expression systems [J]. Life Sci Res, 2004, 8(2): 106–109.
- [26] Yu B, Sun JB, Bommarreddy RR, 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.
- [27] 宋洋波, 马捷, 李丽, 等. 后基因组时代的酿酒酵母研究策略[J]. 中国农业科学, 2012, 45(23): 4873–4882.  
Song YB, Ma J, Li L, et al. Research strategy of *Saccharomyces cerevisiae* in post genomics era [J]. Sci Agr Sin, 2012, 45(23): 4873–4882.
- [28] 张琦, 林燕, 彭兆城, 等. 酵母菌性能优化关键技术研究进展[J]. 酿酒科技, 2013, 4: 80–87.  
Zhang Q, Lin Y, Peng ZC, et al. Reviewed key technology of Yeast performance optimization [J]. Liquor-making Sci Technol, 2013, 4: 80–87.
- [29] 郑道琼. 酿酒酵母的比较功能组学研究和遗传育种[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.  
Zheng DQ. The comparison of functional group study and genetic breeding of *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [30] 周世水. 酿酒酵母的基因改良[J]. 酿酒科技, 2005, 7: 29–35.  
Zhou SS. Genes improvement of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Liquor-making Sci Technol, 2005, 7: 29–35.
- [31] 张群. 酿酒酵母基因工程菌的构建及应用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 1: 112.  
Zhang Q. Construction and application of genetic engineering *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Food Sci Biotechnol, 2013, 1: 112.
- [32] Ofuonye E, Kutin K, Stuart DT. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* fermentative pathways for the production of isobutanol [J]. Biofuels, 2013, 4: 185–201.
- [33] 刘继栋. 代谢工程改造酿酒酵母生产单萜的关键问题分析[D]. 无锡: 江南大学, 2013.  
Liu JD. Key problem analysis of monoterpene production by Metabolic engineering *saccharomyces cerevisiae* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- [34] 杨静, 李成云, 王云月, 等. 酿酒酵母分泌蛋白组的计算机分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 516–522.  
Yang J, Li CY, Wang YY, et al. Computer analysis of protein group secreted by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Sci Agr Sin, 2005, 38(3): 516–522.
- [35] 黄广庆. 缺失 *GPD2* 基因对工业酿酒酵母乙醇发酵的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2013.  
Huang GY. Effects on ethanol fermentation by industrial *Saccharomyces cerevisiae* with the deletion of *GPD2* genes [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.
- [36] Magee RJ, Kosaric N. Microbial production of 2,3-butanediol [J]. Adv Appl Microbiol, 1987, 32(89): 89–161.
- [37] Ida Y, Furusawa C, Hirasawa T, et al. Stable disruption of ethanol production by deletion of the genes encoding alcohol dehydrogenase isozymes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 113(2): 192–195.
- [38] de Smidt O, du Preez JC, Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review [J]. FEMS Yeast Res, 2008, (8): 967–978.
- [39] Kim SJ, Seo SO, Jin YS, et al. Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biotechnol, 2014, 192: 376–382.
- [40] Cambon B, Monteil V, Remize F, et al. Effects of *GPD1* Overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking *ALD6* genes [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(7): 4688–4694.
- [41] Kim SJ, Seo SO, Jin YS, et al. Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresour Technol, 2013, 146: 274–281.
- [42] Flikweert MT, de Swaaf M, Van dijen JP, et al. Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 174: 73–79.
- [43] Van Maris AJA, Geertman JMA, Vermeulen A, et al. Directed evolution of pyruvate- decarboxylase negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C<sub>2</sub>-independent, glucose tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 159–166.
- [44] Oud B, Flores CL, Gancedo C, et al. An internal deletion in *mtl1* enables growth on glucose of pyruvate-decarboxylase negative, non-fermentative *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microb Cell Fact, 2012, 11: 131.
- [45] Tokuhiko K, Ishida N, Nagamori E, et al. Double mutation of the *PDC1* and *ADH1* genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 883–890.
- [46] 邓旭衡. 定向改造酿酒酵母积累丙酮酸的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2011.  
Deng XH. Pyruvate accumulation by directional transformation of *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Tianjin: Tianjin Science and Technology University, 2011.
- [47] 王志坤. 酿酒酵母 BY5419 生产丙酮酸的定向进化及辅酶工程改造[D]. 济南: 山东大学, 2010.  
Wang ZK. Directed evolution of pyruvate production and reconstruction of coenzyme engineering in *Saccharomyces cerevisiae* BY5419 [D]. Jinan: Shandong University, 2010.
- [48] 张帆, 李理想, 马翠卿. 芽孢杆菌发酵产 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 LX, Ma CQ. Progress and prospects of 2,3-butanediol production fermented by *Bacillus* sp. [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2014, 12(3): 79–86.
- [49] Maryam E, Maria R, Fernandez, et al. Engineering of 2,3-Butanediol Dehydrogenase To Reduce Acetoin Formation by Glycerol Overproducing, Low-Alcohol *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Environ Microbiol, 2009, 10(75): 3196–3205.
- [50] Lian JZ, Chao R, Zhao HM. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol [J]. Metabolic Eng, 2014, 23: 92–99.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



黄守锋, 硕士研究生, 主要研究方向  
为微生物资源开发与利用。  
E-mail: 358285150@163.com

葛菁萍, 教授, 博士, 主要研究方向  
为微生物遗传育种。  
E-mail: gejingping@126.com

---

## “食品加工与贮藏保鲜新技术”专题征稿函

民以食为天。食品的安全与质量, 直接关系到民族的健康和体质, 影响到国家或地区的政治安定和社会进步。而食品的加工质量与贮藏安全性与食品加工与贮藏保鲜技术的成熟与革新息息相关。近年来, 基因工程、酶工程、发酵工程、细胞工程、辐照技术、超临界流体萃取技术、微胶囊技术、膜分离技术、超高压技术、脉冲电场技术等被广泛应用于食品的加工与贮藏保鲜, 为食品工业的发展注入了新活力。

鉴于此, 本刊特别策划“食品加工与贮藏保鲜新技术”专题, 由江南大学的张懋教授担任专题主编。专题将围绕食品工业中食品微细化处理、食品混合、食品干燥、食品成分提取与分离、食品浓缩与结晶、食品膨化、食品杀菌、食品低温处理与贮藏保鲜、食品包装等各个环节中的高新技术展开, 探讨技术原理、技术特点、优势与局限性、影响因素、工艺及设备、应用实践等各个方面展开讨论, 计划在 2015 年 11 月正式出版。

本刊主编 **吴永宁 研究员** 与 **张懋 教授** 与本刊特邀请您撰稿, 展示您的研究成果与学术发现, 以期食品加工与贮藏保鲜新技术的推广应用、科研开发提供理论和实践指导。请您请在 2015 年 11 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

**投稿方式:**

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部