

# 3-羟基丁酮的合成及应用进展

纪晓俊<sup>1</sup>, 黄和<sup>1,2</sup>, 杜军<sup>1</sup>, 任潇<sup>1</sup>, 李霜<sup>1,2</sup>

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京 210009;

2. 江苏省工业生物技术创新中心, 江苏南京 211816)

**摘要:**介绍了3-羟基丁酮合成的国内外研究现状,其中着重介绍了发酵法生产3-羟基丁酮的发酵菌株、代谢机理及高产策略;并在分析3-羟基丁酮作为食用香料市场前景的基础上,对发酵法生产3-羟基丁酮进行了成本核算,认为进一步扩大其生产规模,不仅可以满足人们对天然安全香料的需求,而且具有丰厚的利润空间。

**关键词:**3-羟基丁酮;合成;应用;发酵;市场前景

**中图分类号:** O623.56

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2008)04-0018-05

## Advances in production of 3-hydroxybutanone and its application

Ji Xiao-jun<sup>1</sup>, HUANG He<sup>1,2</sup>, DU Jun<sup>1</sup>, REN Xiao<sup>1</sup>, LI Shuang<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. Jiangsu Provincial Innovation Center for Industrial Biotechnology, Nanjing 211816, China)

**Abstract:** The production of 3-hydroxybutanone both at home and abroad is introduced, with the emphasis on the fermentative methods including the microbe strains, its metabolic mechanism and some strategies for enhancing its production. On the basis of analyzing the market prospect of using it as a kind of flavor and counting in the fermentative cost, it is pointed out that further expanding the scale of the fermentative production can not only meet people's increasing demand for natural flavor, but also possess huge profits space.

**Key words:** 3-hydroxybutanone; synthesis; application; fermentation; market prospect

3-羟基丁酮,又名乙偶姻、甲基乙酰甲醇,存在于乳品和某些水果中,是一种应用广泛的食用香料,我国 GB 2760—86 规定其允许食用<sup>[1]</sup>。3-羟基丁酮作为香料应用范围极其广泛,用量也较大,其最主要的作用是用于奶油、乳品、酸奶和草莓型等香料的生产<sup>[2-3]</sup>。此外,3-羟基丁酮还可以作为一种平台化合物,广泛应用于其他众多行业,2004年美国能源部将其列为30种优先开发利用的平台化合物之一<sup>[4]</sup>。近年来随着人们对3-羟基丁酮需求的不断增长,有关3-羟基丁酮的生产方法及应用研究已引起人们的广泛关注。

## 1 3-羟基丁酮的合成方法

### 1.1 化学法

目前,国内外3-羟基丁酮工业化生产方法主要有3种:①丁二酮部分加氢还原工艺<sup>[5]</sup>;②2,3-丁二醇选择性氧化工艺<sup>[5]</sup>;③丁酮氯化水解工艺<sup>[3]</sup>。这3种方法存在产品收率和得率较低,且环境污染较严重等缺点,而且产品质量很难达到目前3-羟基丁

酮的最大消费领域——食用香料的要求;更为严重的是这3种工艺的原料来源限制了其大规模的发展。工艺①和③中所使用的原料丁二酮和丁酮目前均来自于不可再生的化石资源——石油,随着石油资源的日益短缺以及石油价格的日益攀升,这2条工艺路线的成本将越来越高,势必会进一步增加3-羟基丁酮的生产成本;工艺②中的原料2,3-丁二醇可以通过化学法生产,也可以通过微生物发酵法生产<sup>[6]</sup>,通过化学法生产2,3-丁二醇同样也存在石油资源短缺与环境污染等带来的压力;而通过微生物发酵法生产的2,3-丁二醇本身也是香料,而非大宗化工产品,因此该工艺路线的原料成本很高,加上2,3-丁二醇选择性氧化的转化率较低,因此使用该工艺路线生产3-羟基丁酮同样不符合可持续发展的潮流。

### 1.2 生物法

基于对上述3种化学法合成3-羟基丁酮工艺路线以及产品质量的担忧,人们开始寻求利用生物合成法来替代化学合成法,以期待减轻资源与环境

收稿日期:2008-01-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20606018);国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2007CB707805)

作者简介:纪晓俊(1982-),男,博士生;黄和(1974-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物质可再生资源的利用及微生物代谢工程研究,通讯联系人,025-86990023,biotech@njut.edu.cn。

压力,提高产品质量。

## 2 生物法合成3-羟基丁酮的研究概况

### 2.1 酶转化法生产3-羟基丁酮

1992年,Hummel等<sup>[7]</sup>用微生物菌体中的酶作为催化剂进行还原反应,该方法是通过培养乳酸杆菌或酵母菌分离纯化其中的丁二酮还原酶,在pH 5.0、温度70℃下,应用该还原酶及辅酶NAPH催化转化丁二酮,生成3-羟基丁酮,使用该方法产率最高达100%,没有其他副产物,并可以获得旋光度一定的产品。2003年,De Faveri等<sup>[8]</sup>开发了一种附有醇脱氢酶活力的膜反应器,采用汉氏醋杆菌(*Acetobacter Hansenii*) MIM 2000/5全细胞催化2,3-丁二醇合成3-羟基丁酮,在建立该过程中物质和能量平衡数学模型的基础上,考察了溶氧水平、P/O比例对该催化反应的影响,在最适反应条件下2,3-丁二醇转化为3-羟基丁酮的最大摩尔转化率达71.6%,3-羟基丁酮的最高质量浓度达8.93 g/L。以上这些方法和化学合成法相似,都是以丁二酮或2,3-丁二醇为原料,经酶法部分还原或氧化生成3-羟基丁酮,区别在于酶法产物得率高,没有其他副产物,并且产物具有旋光度,但要获得大量特异性的酶比较困难,而且其底物来源受到了限制。酶转化法未能从根本上改变3-羟基丁酮生产过程中所面临的资源与环境压力,因此该路线尚不具备大规模工业化生产的潜力。

### 2.2 发酵法生产3-羟基丁酮

无论化学合成法生产还是酶转化法都是以丁二酮或2,3-丁二醇等为原料,丁二酮和2,3-丁二醇也是合成香料而非大宗化工产品,原料来源及价格都受到限制,这可能也是目前3-羟基丁酮没有得到较好研究开发的原因之一,因此积极开发以糖质为原料利用微生物发酵生产3-羟基丁酮有望改变这一局面。

#### 2.2.1 发酵菌株

自然界中的某些细菌具有产3-羟基丁酮的能力,主要包括克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)以及乳球菌属(*Lactococcus*)等。但是在大多数菌株代谢过程中,3-羟基丁酮是作为2,3-丁二醇和丁二酮代谢的副产物而存在的<sup>[9-10]</sup>,在发酵过程中,积累浓度较低,这直接导致了难以利用这些微生物菌种工业化发酵生产3-羟基丁酮。针对该问题,赵祥瑞和刘建军等<sup>[11-12]</sup>选育获得了一株高产3-羟基丁酮的枯草芽孢杆菌SFA-H31(CGMCC 1869),可有效地转化葡萄糖生成3-羟基丁酮,该菌株在50 L发酵罐中发酵培养52 h,葡萄糖转化生成3-羟基丁酮的转化率高达48.26%,已接近理论转化率(48.9%)<sup>[13]</sup>,其生物合成3-羟基丁酮的最高产量达55.67 g/L,并且该菌株不产生伴随副产物丁二酮和2,3-丁二醇,是一株极具研究开发价值的3-羟基丁酮生产菌株。此外Xu等<sup>[14]</sup>从葡萄园和苹果园的土样中筛选得到一株短小芽孢杆菌XH195

(上接第17页)

[8] 颜廷珍. 提取过喜树碱的喜树种子、树叶堆制肥料的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2001.

[9] 田春,张通,兰辉,等. 用中药渣制备天然碱泥用生物絮凝剂的研究[J]. 内蒙古工业大学学报,2004,23(4):255-260.

[10] 吉媛媛. 利用甘草渣制备硝化纤维素[J]. 太原工业大学学报,1996,27(3):106-111.

[11] 侯蝶娟,孟宪纤,徐育新. 以酶解法从中药及药渣制备β-葡萄糖的研究[J]. 沈阳药学院学报,1994,11(61):289-294.

[12] 梁海. 日正在进行研究利用中药渣造纸[J]. 包装世界,1995(1):41.

[13] Demirbas A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals[J]. Energy Conversion and Management, 2001,42(7):1357-1378.

[14] Bridgwater A, Meier V D, Radlein D. An overview of fast pyrolysis of biomass[J]. Organic Geochemistry, 1999,30:1479-1493.

[15] Sharma A, Rajeswara Rao T. Kinetics of pyrolysis of rice husk[J]. Bioresource Technology, 1999,67:53-59.

[16] Alman S, Stubington J F. The pyrolysis kinetics of bagasse at low heating rates[J]. Biomass and Bioenergy, 1992,5(2):115-120.

[17] 刘荣厚,牛卫生,张大雷. 生物质热化学转换技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:1-10,77-93.

[18] 东北林业大学,祖元刚. 一种利用中药或植物提取固体废弃物制造机炭的方法:中国,1803981A[P]. 2006-07-19.

[19] 李建政,汪群慧. 废物资源化与生物能源[M]. 北京:化学工业出版社,2004:4-12.

[20] 吴剑之,马隆龙. 生物质能现代化利用技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003:3-4.

[21] Kuroda K I, Sakai K. Analysis of lignin by pyrolysis-gas chromatography: II. Effect of borosilicate glass fibers on pyrolysis product composition[J]. Makuzai Gakkaishi, 1993,39(5):584-589.

[22] Gercel H F. The production and evaluation of bio-oils from the pyrolysis of sunflower-oil cake[J]. Biomass and Bioenergy, 2002,23:307-314.

[23] Ates F, Putun A E. Fixed bed pyrolysis of *Euphorbia rigida* with different catalysts[J]. Energy Conversion and Management, 2005,46:421-432.

[24] Hosoya T, Kawamoto H, Saka S. Cellulose-hemicellulose and cellulose-lignin interactions in wood pyrolysis at gasification temperature[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2007,205(1):1-8. ■

(DSM 16187), 该菌株能够在含氯化钠质量浓度为 100 g/L 的培养基上生长, 以葡萄糖或蔗糖为碳源, 37℃ 下发酵 60 h 后, 3-羟基丁酮的产量分别达

63.0 g/L 或 58.1 g/L。

3-羟基丁酮广泛的应用领域、相关发酵菌株及研究情况分别见表 1 及表 2。

表 1 3-羟基丁酮广泛的应用领域

应用领域	衍生物及使用特性	功能
日化食品行业	合成环己烯衍生物等香味化合物	广泛应用
	酒中重要的呈香呈味物质	与双乙酰等配合使用可使酒体丰满, 后味圆润
制药工业	与双乙酰混合使用	治疗乳腺炎
	制备吡咯烷酮或四氢吡咯的烟碱衍生物	重要的医药中间体
	与活性位点的半胱氨酸的残基进行键合	尿素酶的抑制剂
	昆虫性激素	生物农药
化学工业	与脂肪二元羧酸形成的酯	防冻剂和增塑剂
	3-羟基丁酮的羧酸酯	聚氯乙烯增塑剂
	3-羟基丁酮	含氯聚合物的稳定剂
	3-羟基丁酮	起泡剂
涂料工业	合成新型亲水涂料, 用于醇酸树脂的表面涂层	抗氧化性能, 延长树脂的使用寿命
IT 行业	光学活性的 3-羟基丁酮衍生物	液晶材料的重要成分

表 2 相关发酵菌株及研究情况

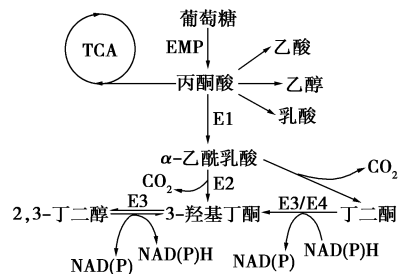
菌种	学名及编号	底物	3-羟基丁酮产量/ (g·L <sup>-1</sup> )	参考文献
阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 27613	蔗糖	< 14	[15]
黏质沙雷氏杆菌	<i>Serratia marcescens</i> IAM 1022	葡萄糖	6.62	[16]
肺炎克雷伯氏杆菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NRRL B-199	葡萄糖	17 ~ 19	[17]
乳酸乳球菌乳酸亚种	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 3022	葡萄糖	9.28	[18]
产酸克雷伯氏杆菌	<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 3539	糖蜜	4.3	[19]
产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i> DSM 30053	葡萄糖	10 ~ 12	[20]
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> AJ 1992	糖蜜	< 20	[21]
乳酸乳球菌乳酸亚种丁二酮变种	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CNRZ 483	葡萄糖	1.74	[22]
类多黏芽孢杆菌	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 12321	葡萄糖	9.24	[23]
肺炎克雷伯氏杆菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CICC 10011	葡萄糖	13.1	[24]
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> CICC 10025	糖蜜	37.9	[25]
短小芽孢杆菌	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 16187	葡萄糖	63.0	[14]
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC 1869	葡萄糖	55.5	[11 - 12]

### 2.2.2 代谢机理及高产策略

以葡萄糖或其他能够转化生成丙酮酸的化合物为底物发酵生产 3-羟基丁酮的代谢途径已经研究得比较清楚<sup>[9-10]</sup>(图 1), 这为微生物发酵法生产 3-羟基丁酮提供了理论指导。在微生物体内, 主要有 2 条 3-羟基丁酮合成途径: 两分子丙酮酸在

$\alpha$ -乙酰乳酸合成酶(E1)的作用下合成一分子  $\alpha$ -乙酰乳酸,  $\alpha$ -乙酰乳酸在酸性条件下非酶自然氧化脱羧生成丁二酮, 丁二酮又可在丁二酮还原酶(E4)或 2,3-丁二醇脱氢酶(E3)的作用下还原为 3-羟基丁酮, 该氧化途径已得到大量生化、分子生物学的的支持<sup>[10,26]</sup>; 另一条途径  $\alpha$ -乙酰乳酸在合成后, 经

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶(E2)作用生成3-羟基丁酮。通过这2条途径生成的3-羟基丁酮还可进一步由催化可逆反应的2,3-丁二醇脱氢酶(E3)的作用生成2,3-丁二醇。3-羟基丁酮是多种微生物糖代谢的中间代谢产物,以糖质为原料利用微生物发酵可以产生3-羟基丁酮,但是据目前有关微生物产生3-羟基丁酮的文献,多数报道是有关微生物代谢途径理论方面的研究,少数涉及3-羟基丁酮生产的报道也主要是作为丁二酮和2,3-丁二醇发酵的副产物提及<sup>[15-24]</sup>。因此笔者认为,从自然界中筛选分离能够高产3-羟基丁酮的微生物菌种是发酵法生产3-羟基丁酮工作中的一个重要环节,并且可以在对其代谢途径充分分析的基础上,选育酶E3和酶E4缺陷型的突变菌株,以使现有产丁二酮或2,3-丁二醇的菌株大量积累3-羟基丁酮;另外还可以通过基因工程技术敲除这2个酶的编码基因以达到失活这2个酶,从而使其高产目标产物3-羟基丁酮的目的;或者通过在原始菌株中超量表达NAD(P)H氧化酶,以有效调节菌株体内NAD(P)H与NAD(P)的比例,抑制酶E3和酶E4的活性的同时抑制丙酮酸的其他代谢支路,从而提高菌株生物合成3-羟基丁酮的能力。



EMP—糖酵解途径;TCA—三羧酸循环;

NAD(P)—氧化型辅酶 I (II);NAD(P)H—还原型辅酶 I (II);

E1— $\alpha$ -乙酰乳酸合成酶;E2— $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶;

E3—2,3-丁二醇脱氢酶;E4—丁二酮还原酶

图1 细菌生物合成3-羟基丁酮的代谢途径

### 3 市场前景预测

随着人们生活水平的提高,饮食习惯也正在改变,对食品的感官要求越来越高,3-羟基丁酮作为香料的需求日益增加,市场前景广阔。目前国外工业化生产3-羟基丁酮的企业主要有美国JM公司、德国BASF公司以及日本信达公司,这3家公司均采用化学合成法获得;国内也有部分企业从事3-羟基丁酮的工业化生产,包括江苏潘南香料厂、河南濮盟集团、上海泰禾化工有限公司、上海爱普香料有限公

司以及上海凯信生物科技有限公司等。其中除上海爱普香料有限公司和上海凯信生物科技有限公司外,其余生产厂家均采用化学法生产,产量质量无法满足国内外市场对天然香料的需求。最新报道显示,上海爱普香料有限公司正在联合国内相关高校进行发酵法生产天然3-羟基丁酮及其衍生物的产业化研究,并已经取得了初步进展,申报了相关专利<sup>[14]</sup>;上海凯信生物科技有限公司正在进行以微生物发酵技术生产天然、旋光性3-羟基丁酮的产业化研究,据称已获得Kosher认证证书,并通过天然度检测权威机构——美国乔治亚大学(University of Georgia)天然度检测,但其尚处于试生产阶段,生产规模很小,无法满足市场的巨大需求。开展3-羟基丁酮的生产及应用研究,尤其是开展环境友好、原料来源丰富、条件温和、产品可视为纯天然的微生物发酵法生产3-羟基丁酮的技术研究,具有重要的意义。

据安徽省产权交易网统计,2006年全球3-羟基丁酮的产量为数千吨,我国3-羟基丁酮的生产规模约100t,目前国内报价为25万元/t左右。以葡萄糖为底物采用微生物发酵法生产3-羟基丁酮不仅能够满足人们对天然香料的需求,而且利润空间巨大,目前国内葡萄糖报价基本上在3300元/t左右,以葡萄糖为底物发酵生产乙偶姻理论转化率为48.9%<sup>[13]</sup>,葡萄糖和3-羟基丁酮分别按3300元/t和25万元/t计,除去分离、精制等其他成本2万元/t,生产1t3-羟基丁酮的利润在22万元/t左右,当然这是以完全转化为前提,随着对微生物发酵法生产3-羟基丁酮的研究的进一步深入,葡萄糖到3-羟基丁酮的转化率势必会进一步增加,因此积极开发微生物发酵法生产3-羟基丁酮具有巨大的市场潜力和丰厚的利润空间。

### 4 展望

随着石油等非可再生资源日益减少、世界人口和环境压力的增加,以及人们对天然食品香料的需求增长,利用生物法制备传统的利用化学法生产的食用香料日益备受关注。微生物发酵法生产3-羟基丁酮正顺应了这一潮流,其发展前景和机遇均十分有利。笔者认为,为了克服化学法生产3-羟基丁酮对环境和人们的健康安全带来的威胁,应进一步建立微生物发酵法生产3-羟基丁酮的优势,全面提高微生物发酵工艺相对于化学合成工艺的竞争力,综合应用分子生物学、微生物代谢工程等现代生物技术手段,提高3-羟基丁酮的发酵水平,在今后的

研究过程中应该从以下几个方面展开:

(1) 重视菌株的选育, 在前人研究的基础上, 着重选育副产物少以及能够耐受高浓度产物并适合高密度培养的菌株;

(2) 在公认安全 (GRAS) 菌株 (如大肠杆菌、芽孢杆菌等) 以及原始高产菌株中强化表达与 3-羟基丁酮生物合成相关的关键酶, 或通过基因工程技术有效调节原始菌株内的氧化还原水平, 显著降低 3-羟基丁酮生产过程中的伴随产物丁二酮和 2,3-丁二醇, 利用所构建的基因工程重组菌超量合成目标产物;

(3) 在对发酵过程进行动力学分析的基础上利用数学工具模拟优化发酵过程, 以更好地优化发酵工艺, 并在此基础上开发高效率、低成本的分离提取工艺, 以获得高纯度的 3-羟基丁酮, 满足人们对安全香料的需求。

### 参考文献

- [1] 凌关庭. 食品添加剂手册 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1997.
- [2] 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.
- [3] 胡明一, 王中. 食用香料乙偶姻 [J]. 精细与专用化学品, 2002, 10(1): 20 - 21.
- [4] Wery T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: Volume I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas [EB/OL]. <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>, 2004 - 08 - 06.
- [5] 张小舟, 曾崇余, 任晓乾. 乙偶姻合成研究现状及展望 [J]. 江苏化工, 2001, 29(2): 29 - 31.
- [6] 纪晓俊, 朱建国, 高振, 等. 微生物发酵法生产 2,3-丁二醇的研究进展 [J]. 现代化工, 2006, 26(8): 23 - 27.
- [7] Hummel W, Kula M R, Boermann F. Microbiologically prepared diacetyl reductase: US, 5164314 [P]. 1992 - 11 - 17.
- [8] De Faveri D, Torre P, Molinari F, et al. Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter Hansenii* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(5): 708 - 719.
- [9] Juni E. Mechanisms of formation of acetoin by bacteria [J]. Journal of Biological Chemistry, 1952, 195(2): 715 - 726.
- [10] Xiao Z J, Xu P. Acetoin metabolism in bacteria [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2007, 33(2): 127 - 140.
- [11] 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: 中国, 101016530A [P]. 2007 - 01 - 29.
- [12] 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: 中国, 101008019A [P]. 2007 - 08 - 01.
- [13] Syu M J. Biological production of 2,3-butanediol [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(1): 10 - 18.
- [14] Xu P, Xiao Z J, Du Y, et al. An acetoin high yield *Bacillus pumilus* strain: WO, 2006053480 [P]. 2006 - 05 - 26.
- [15] Gupta K G, Yadav N K, Dhawan S. Laboratory-scale production of acetoin plus diacetyl by *Enterobacter cloacae* ATCC 27613 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1978, 20(12): 1895 - 1901.
- [16] Ui S, Masuda H, Muraki H. Laboratory-scale production of 2,3-butanediol isomers (*D*(-), *L*(+), and *Meso*) by bacterial fermentations [J]. Journal of Fermentation Technology, 1983, 61(3): 253 - 259.
- [17] Yu E K C, Saddler J N. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(3): 630 - 635.
- [18] Kaneko T, Takahashi M, Suzuki H. Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or  $\text{Cu}^{2+}$  [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(9): 2644 - 2649.
- [19] Afschar A S, Bellgardt K H, Vaz Rossell C E, et al. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 34(5): 582 - 585.
- [20] Zeng A P, Biebl H, Deckwer W D. Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 34(4): 463 - 468.
- [21] Dettwiler B, Dunn I J, Heinze E, et al. A simulation model for the continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 41(8): 791 - 800.
- [22] Boumerdassi H, Monnet C, Desmazeaud M, et al. Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetyllactis CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6): 2293 - 2299.
- [23] Nakashimada Y, Kanai K, Nishio N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture [J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(12): 1133 - 1138.
- [24] Qin J Y, Xiao Z J, Ma C Q, et al. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2006, 14(1): 132 - 136.
- [25] Xiao Z J, Liu P H, Qin J Y, 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.
- [26] Snoep J L, Teixeira de Mattos M J, Starrenburg M J C, et al. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and  $\alpha$ -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetyllactis [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(14): 4838 - 4841. ■