

甘油耐受菌 *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li 合成 1,3-丙二醇的研究*

马彬彬¹, 张根林¹, 徐小琳¹, 王丽卫², 李 春^{1,2}

1(石河子大学食品学院/新疆兵团化工绿色过程重点实验室, 新疆石河子, 832003)

2(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京, 100081)

摘 要 利用自行筛选的 1,3-丙二醇(1,3-PD)合成菌株 *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li 进行发酵, 考察了甘油浓度对菌株生长及合成 1,3-PD 的影响。经多次甘油耐受后菌株 XJPD-Li 在摇瓶培养 48 h, 菌体生物量(OD_{650})和 1,3-PD 产量分别达到 1.52 和 11.16 g/L, 相比耐受前分别提高 48% 和 159%。在 5 L 发酵罐批式培养中, 甘油耐受后 XJPD-Li 菌体生物量并未显著增长, 但合成 1,3-PD 的能力却提高了 77%, 达到 53.13 g/L。

关键词 甘油, 耐受, *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li, 1,3-丙二醇

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料, 主要用于生产聚酯和聚氨酯以及溶剂、抗冻剂或保护剂等^[1]。以 1,3-PD 和对苯二甲酸为单体合成的聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)是一种新型聚酯材料, 具有许多独特的性质, 如尼龙般的弹性恢复、良好的着色性、抗紫外、抗静电及良好的生物降解性等^[2, 3]。目前 1,3-PD 生产方法有丙烯醛合成法、环氧乙烷合成法和微生物发酵法, 其中微生物发酵法因具有条件温和、原料易得和对环境污染小等优点而成为近年来的研究热点^[4]。DuPont 与英国 Tate & Lyle 公司合建的位于美国田纳西州的生物丙二醇装置已在试运行中。

虽然微生物发酵法生产 1,3-PD 具有许多优点, 但由于发酵过程中多种物质的抑制作用^[5], 使发酵液中最终 1,3-PD 的浓度较低。为取得更大的经济效益, 提高 1,3-PD 发酵液中的产品浓度及生产强度一直是该领域的研究重点。甘油作为微生物发酵法生产 1,3-PD 的底物, 其初始浓度对 1,3-PD 的合成影响很大^[6], 因此文中通过研究甘油浓度对 *K. pneumoniae* XJPD-Li(XJPD-Li)合成 1,3-PD 的影响, 利用高浓度的甘油耐受菌株, 提高发酵液中 1,3-PD 的浓度及生产强度, 取得了初步成功。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌种: *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li, 从新疆

特殊环境筛选, 石河子大学新疆兵团化工绿色过程重点实验室保藏。

培养基: 种子培养基和发酵培养基参考 Bred Gunzel^[7]等人设计的培养基, 并加以修正。

1.2 培养方法

(1) 摇瓶培养: 采用特制 300 mL 厌氧摇瓶, 装液量 100 mL, 接种量 5%, 40℃ 水浴摇床培养, 转速 150 r/min, 通入 N_2 维持厌氧环境, 通气比 0.2 vvm。

(2) 发酵罐培养: 美国 NBS Bioflo110 型 5 L 全自动发酵罐, 装液量 3 L, 接种量 10%, 发酵温度 40℃, 搅拌转速 200 r/min, 通入 N_2 维持厌氧环境, 通气比 0.2 vvm。

1.3 菌种的甘油耐受

将斜面保存菌种进行摇瓶培养, 每隔 4~6 h 添加一定量的甘油, 使培养液中最终甘油浓度达到 100 g/L, 然后在固体培养基上涂布, 挑选长势好的单菌落进行下一轮耐受实验。

1.4 分析方法

(1) 生物量的测定: 752 N 型紫外可见分光光度计测定菌悬液在 650 nm 波长下的吸光度 OD_{650} 。

(2) 代谢产物的测定: 发酵液中的甘油、1,3-PD 以及副产物等采用 SHIMADZU 10A 型高效液相色谱测定, 分析软件为 SHIMADZU CLASS-VP Version 6.12 SP1; 色谱柱 Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65℃, 流动相 0.005 mol/L 的 H_2SO_4 , 流速 0.8 mL/min, RID-10A 型折光示差检测器。

(3) 甘油脱水酶活性的测定参照 Toraya T 建立的 MBTH 法^[8]。

第一作者: 硕士研究生(李春教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金(No. 20466002), 教育部“新世纪优秀人才”项目(NCET-04-0989), 霍英东教育基金资助项目(101071)

收稿日期: 2007-09-26, 改回日期: 2007-11-23

2 结果与讨论

2.1 甘油浓度对菌株生长及合成 1,3-PD 的影响

不同浓度的甘油对 XJPD-Li 生长和 1,3-PD 合成的影响见图 1。结果显示,较高浓度甘油明显抑制菌株的生长和产物 1,3-PD 的正常合成。初始浓度为 20 g/L 的甘油最适合 XJPD-Li 的发酵,浓度为 40 g/L 时,与 20 g/L 相比生物量降低了 32%,1,3-PD 的发酵浓度降低了 28%。由相应酶活分析图(图 2)看出,在 10~30 g/L,甘油浓度对甘油脱水酶影响不大,但当底物浓度继续增加时,酶活逐渐下降。与底物为 20 g/L 甘油相比,40 g/L 甘油为底物时甘油脱水酶的活性降低了 32%,50 g/L 时降低了 41.6%,主要原因是较高浓度的甘油抑制了菌株的生长而减慢了甘油脱水酶的合成速度^[9],也可能是在催化过程中底物甘油导致脱水酶发生了不可逆抑制^[10]。

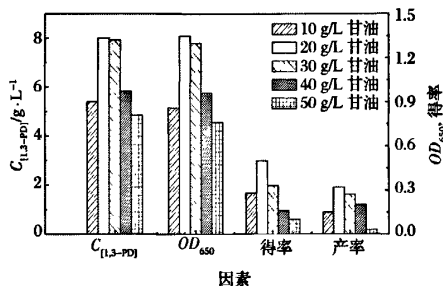


图 1 甘油对 XJPD-Li 生长和 1,3-PD 合成的影响

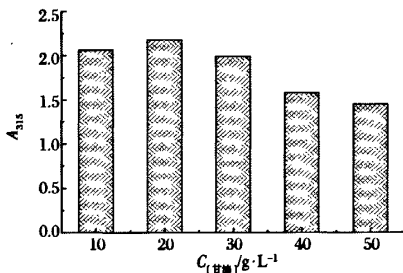


图 2 甘油浓度对甘油脱水酶合成的影响

2.2 甘油耐受后菌株的摇瓶培养特性

选取 40 g/L 的甘油浓度比较菌株耐受前后的发酵特性,结果表明,XJPD-Li 经耐受后明显优于原始菌株,发酵过程如图 3 所示。耐受前最大 OD₆₅₀ 为 1.03,1,3-PD 产量 4.31 g/L;耐受后的最大 OD₆₅₀ 为 1.52,1,3-PD 产量 11.16 g/L,比甘油耐受前分别高出 48%和 159%。经耐受后的 XJPD-Li 菌株发酵 48 h 后可以将甘油耗完,而耐受前菌株的剩余甘油高达 21.87 g/L。

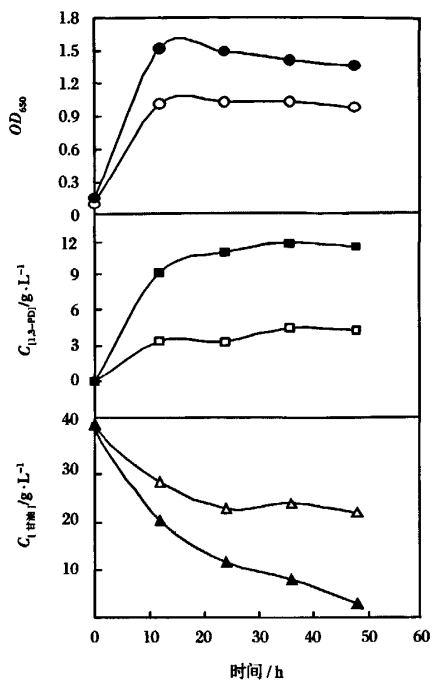


图 3 甘油耐受 XJPD-Li 摇瓶培养特性

(注:空心点为耐受前,实心点为耐受后)

2.3 甘油耐受后菌株的发酵罐批式培养

XJPD-Li 经发酵罐批式培养,其耐受前后发酵过程曲线分别见图 4 和图 5。

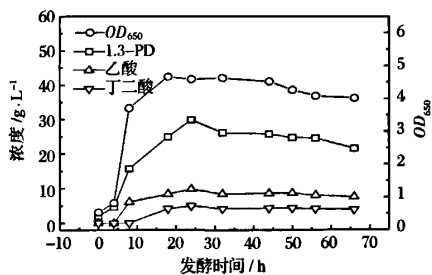


图 4 甘油耐受前 XJPD-Li 发酵过程曲线

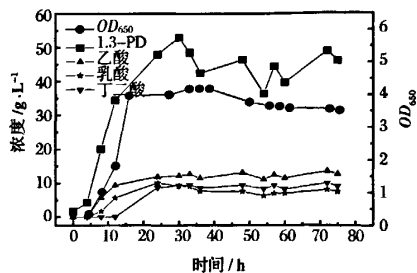


图 5 甘油耐受后 XJPD-Li 发酵过程曲线

可以看出,XJPD-Li 的生长与催化合成 1,3-PD 之间存在着很好的耦联关系,且 1,3-PD 的合成主要

集中在菌体的对数生长期和平衡期的前期,与杜晨宇等^[10]的报道相一致。但是,XJPD-Li发酵过程中副产物丁二酸的积累(耐受前后分别为4.94 g/L和9.21 g/L),在*K. pneumoniae*发酵生产1,3-PD中很少见到。

对比图4、图5可以看出,XJPD-Li耐受后生物量并未显著增长,均在4左右,而合成1,3-PD的能力却由29.89 g/L提高到53.13 g/L,提高了77%,说明合成1,3-PD能力的提高并不是靠增加菌体数量来实现的。耐受后甘油的消耗能力提高了63%,生产强度由0.45 g/(L·h)提高到0.74 g/(L·h),

增加了64%,但副产物中也出现了乳酸,导致1,3-PD的摩尔转化率并未显著提高。利用批式和批次流加发酵,克雷伯氏菌中的1,3-PD最终浓度可以达到50~60 g/L^[4]。XJPD-Li发酵25 h左右,1,3-PD生产浓度便可超过50 g/L,因而前期生产强度很大,结合合适的甘油流加策略,耐受后XJPD-Li的1,3-PD最终浓度应当可以进一步提高。

2.4 耐受后菌株的遗传稳定性

选取甘油耐受后的XJPD-Li第3代、第5代、第7代进行多批次发酵,结果见表1。菌株合成1,3-PD浓度稳定在50 g/L,未出现退化现象。

表1 甘油耐受后XJPD-Li 5 L发酵罐多批次发酵结果

传代数	OD ₆₅₀	消耗甘油 / g·L ⁻¹	产物浓度/ g·L ⁻¹				化率 / mol·mol ⁻¹	生产强度 · g(L·h) ⁻¹
			1,3-PD	乙酸	丁二酸	乳酸		
3	4.02	109.95	53.00	11.93	8.74	10.06	0.58	0.88
5	3.49	101.54	48.97	7.44	9.01	5.47	0.58	0.82
7	3.68	113.98	51.89	10.61	7.09	11.19	0.55	0.72

3 结 论

利用甘油耐受培养菌株方法简单易行,效果显著。通过摇瓶耐受培养后XJPD-Li发酵48 h,生物量由1.03提高到1.52;合成1,3-PD由4.31 g/L提高到11.16 g/L,分别提高了48%和159%。在5 L发酵罐进行的批次培养中,耐受后的菌体浓度变化不大,而合成1,3-PD的能力由29.89 g/L提高到53.13 g/L,提高了77%。结合代谢工程和基因工程手段对XJPD-Li进行改造,将进一步减少各种副产物的合成,提高1,3-PD的终浓度和转化率。

参 考 文 献

- 1 杨东,李春,杜晨宇,等. 两段双底物发酵生产1,3-丙二醇[J]. 过程工程学报,2003,3(3):269~273
- 2 李吉春,赵旭涛. 1,3-丙二醇的合成方法及技术进展[J]. 石化技术与应用,2004,22(1):4~12
- 3 周邦荣. 1,3-丙二醇生产工艺[J]. 石油化工动态,1998,6(5):55~61
- 4 王剑锋,刘海军,修志龙,等. 生物转化生产1,3-丙二醇的研究进展[J]. 化学通报,2001,10:621~625
- 5 张延平,刘铭,杜晨宇,等. 代谢副产物对*Klebsiella pneumoniae*生长及合成1,3-丙二醇的影响[J]. 过程工程学报,2006,6(5):804~808
- 6 赵红英,张健,刘宏娟,等. 1,3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究[J]. 现代化工,2002,22(7):34~38
- 7 Bred Gunzel, Sems Yonsel, Wolf-Dieter Deckwer. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³ [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1991,36:289~294
- 8 Toraya T, S Kuno S Fukui. Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae* [J]. J Bacteriol, 1980,141:1439~1442
- 9 Zhang G L, Ma B B, Xu X L, et al. W. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Biochem Eng J, 2007,37:256~260
- 10 Rolf Daniel, Thomas A Bobik, Gerhard Gottschalk. Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999,22:553~566
- 11 杜晨宇,杨东,李春,等. *Klebsiella pneumoniae* 合成1,3-丙二醇过程中的生长与催化耦联[J]. 化工学报,2004,55(3):505~508

Fermentation of Glycerol to 1,3-Propanediol by Domesticated *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li

Ma Binbin¹, Zhang Genlin¹, Xu Xiaolin¹, Wang Liwei¹, Li Chun^{1,2}

1(Food College/ Key Laboratory for Green Processing of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtan, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

2(School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT The concentration of glycerol showed effect on the fermentation feature of *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li (XJPD-Li), which was stored by Key Laboratory for Green Processing of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtan. The biomass (OD₆₅₀) and the production of 1,3-propanediol, fermented in shake flask, reached to the 1.52 and 11.16 g/L with domesticated XJPD-Li in 48h, which were 48% and 159% higher than the original microorganism. In the 5L-bioreactor, the biomass has less remarkable change after domesticated. The concentration of 1,3-propanediol, however, was increased to 53.13g/L, 77% higher than that of the original.

Key words glycerol, domestication, *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li, 1,3-propanediol