

琥珀酸对产酸克雷伯氏菌好氧发酵甘油产 1,3-丙二醇的影响

管桂萍¹, 王红兵², 田杰生³

1(湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南长沙, 410128) 2(湖南省畜牧兽医研究所, 湖南长沙, 410131)

3(中国农业大学微生物与免疫学系, 北京, 100094)

摘 要 好氧条件下, 通过产酸克雷伯氏菌发酵甘油产 1,3-丙二醇的摇瓶实验中发现, 添加副产物琥珀酸对菌体生长和 1,3-丙二醇合成有促进作用, 在 5L 自动发酵罐上做批式发酵, 也得到相似的结果。为探讨其原因, 进行了类似的摇瓶实验, 分别添加副产物乳酸和乙酸, 菌体生长和 1,3-丙二醇合成均受到抑制, 添加琥珀酸、柠檬酸和苹果酸, 对菌体生长和 1,3-丙二醇合成均有促进作用。上述结果初步表明, 琥珀酸强化了三羧酸循环产生更多的能量, 促进了甘油脱水酶的复活, 引起 1,3-丙二醇产量的增加。

关键词 琥珀酸, 好氧发酵, 1,3-丙二醇, 三羧酸循环, ATP

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)为肠杆菌科中一类具有兼性好氧特性的革兰氏阴性菌, 能以甘油(GLY)作为唯一碳源和能源发生歧化反应, 氧化途径中产物与糖类发酵产物一致, 并产生供细胞生长所必需的能量 ATP, 在某些产物形成的同时释放还原力 NADH; 还原途径则消耗氧化途径中多余的还原力, 生成 1,3-丙二醇(PDO)^[1]。

1,3-丙二醇发酵一般是在厌氧条件下进行, 但王剑锋等人发现在微好氧条件下, 肺炎克雷伯氏菌也能产生 1,3-丙二醇, 且生产强度有所提高^[2]。甘油代谢过程中氧化途径生成丙酮酸最终形成琥珀酸(SUC)、乳酸(LAC)、乙酸(ACE)、乙醇(ETH)和 2,3-丁二醇(BDO)等副产物^[3], 此前已有较多研究报道过厌氧条件下这些副产物对 1,3-丙二醇发酵的影响^[4~6], 而琥珀酸因其产量较低而被很少被关注。

本文研究了在培养基中添加琥珀酸对 *K. oxytoca* 好氧发酵甘油产 1,3-丙二醇的影响, 并初步探讨其原因。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) M5al, 来源于中国农业大学微生物与免疫学系生物固氮研究室。

1.2 培养基

种子培养基(1 L): K_2HPO_4 3.4 g, KH_2PO_4 1.3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4$ 0.2 g, 酵母粉 1.0 g, 甘油 10 g, 葡萄糖 10 g, 亚铁离子溶液 2.0 mL, 微量

元素溶液 1.0 mL, pH 7.0。

发酵培养基(1 L): K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4$ 0.2 g, 酵母粉 1.0 g, 甘油 30 g, 亚铁离子溶液 1.0 mL, 微量元素溶液 1.0 mL, pH 7.0。

微量元素溶液(1 L): $ZnCl_2$ 70 mg, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 20 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 25 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 35 mg, H_3BO_3 60 mg, $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 g。

1.3 培养条件

1.3.1 摇瓶培养

在 500 mL 三角瓶中进行发酵实验, 装液量为 100 mL, 接种量 5%, 150~200 r/min, 37 ℃, 空气浴摇床培养 36 h 后, 取样分析。

1.3.2 自动发酵罐培养

发酵罐培养在 MARUBISHI MD-300 型 5 L 自动发酵罐中进行, 装液量为 3 L, 接种量为 10 %, pH 7.0, 37 ℃, 流加补料批式培养, 甘油浓度维持在 20~50 g/L, 通气量 0.4 L/min, 转速 300 r/min。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量测定

取发酵液稀释至合适倍数, 蒸馏水为对照, 用分光光度计测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.4.2 发酵液组分测定

发酵液中的主要化学组分通过 HPLC 测定: Waters 高效液相色谱仪, 510 泵, 2414 型示差折光检测器, Aminex HPX-87H 色谱柱。检测条件: 柱温 65 ℃, 流动相为 0.005 mol/L 的 H_2SO_4 溶液, 流速 0.8 mL/min^[6]。

第一作者: 博士, 讲师(田杰生副教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-10-31, 改回日期: 2008-02-29

2 结果与讨论

2.1 摇瓶培养条件下不同浓度琥珀酸对菌体生长及产物合成的影响

表 1 不同浓度琥珀酸对 *K. oxytoca* 生长及产物合成的影响

琥珀酸 /g · L ⁻¹	发酵液组分/g · L ⁻¹							菌体浓度 OD _{600 nm}
	SUC	PDO	GLY	LAC	ACE	ETH	BDO	
0	痕量	3.25	14.6	痕量	2.60	2.15	1.56	2.54
5	1.30	3.80	12.2	2.17	2.60	2.34	2.32	2.67
10	3.84	4.81	9.80	3.07	2.41	2.00	2.04	3.12
15	8.58	4.68	10.5	4.15	2.39	2.21	1.97	2.95

从表 1 可知,随着琥珀酸浓度的逐步增加,产物中 1,3-丙二醇和乳酸也逐步增加,当琥珀酸浓度为 10 g/L 时,1,3-丙二醇的终浓度为 4.81 g/L,较对照提高 50 % 以上,琥珀酸的浓度为 15 g/L 时,乳酸的产量相比于对照更是从痕量存在增加到 4.15 g/L。

2.2 自动发酵罐培养条件下琥珀酸对菌体生长及产物合成的影响

在 5 L 自动发酵罐中进行批式发酵,培养基中添加 0(对照)、8 g/L 琥珀酸进行好氧发酵,动态测定发酵液中各组分浓度,选取生物量、1,3-丙二醇、乳酸三项指标比较。

如图 1,实验组菌体浓度稍高,其生长曲线中对数生长期在 20 h 左右结束,此时 OD_{600 nm} 为 12.5,随后出现一次轻微的溶菌,菌体衰亡出现时间也相对较早,应该与好氧条件下新陈代谢加剧有关。而对照的对数生长期在 16 h 左右结束,此时 OD_{600 nm} 为 11.2,此后的稳定期则相对较长。

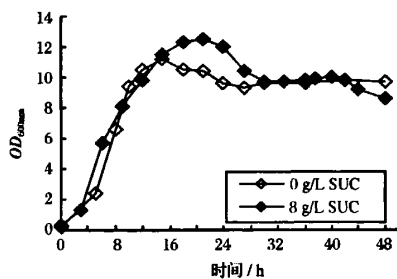


图 1 琥珀酸对 *K. oxytoca* 生长的影响

如图 2,实验组的 1,3-丙二醇最高浓度达到 35.6 g/L,较对照的 24.7 g/L 提高了近 50 %,1,3-丙二醇的合成到菌体衰亡期之前都有一个比较稳定的增长,而对照中 1,3-丙二醇的合成在 30 h 达到 23.8 g/L 后,基本停滞。

如图 3,实验组中乳酸的最高浓度达 54.8 g/L,较对照的 33.4 g/L 提高了近 65 %,但是其浓度在达

在培养基中分别添加 0(对照)、5 g/L、10 g/L、15 g/L 的琥珀酸(调节 pH 到 7.0),150 r/min 摇瓶培养 36 h 后检测发酵液组份,*K. oxytoca* 菌体生长及产物合成结果如表 1。

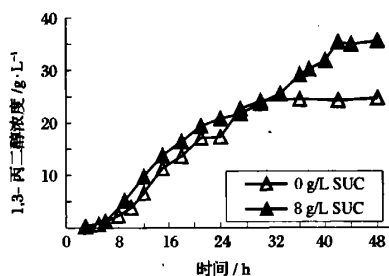


图 2 琥珀酸对 *K. oxytoca* 发酵甘油产 1,3-丙二醇的影响到最高值后基本稳定在同一水平,而对照的浓度从 30 h 后一直处于逐步下降之中,与此同时 1,3-丙二醇的浓度也开始维持不变,推测其原因应该是有氧条件下菌体以乳酸为碳源进行正常的生理代谢,故不再形成 1,3-丙二醇。

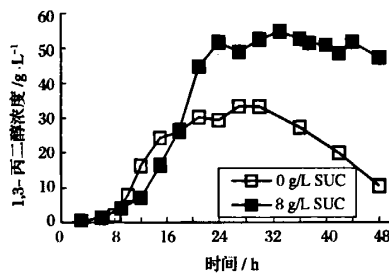


图 3 琥珀酸对 *K. oxytoca* 发酵甘油产乳酸的影响

2.3 好氧条件下不同浓度乳酸和乙酸对菌体生长和 1,3-丙二醇合成的影响

张延平等研究发现,厌氧条件下,在肠道细菌发酵甘油产 1,3-丙二醇的过程中,外加副产物乳酸和乙酸都会对菌体生长和 1,3-丙二醇合成产生抑制作用^[6]。为了考察有氧条件下,乳酸和乙酸的加入是产生何种效果,在培养基中分别加入不同浓度的乳酸和乙酸,150 r/min 培养 36 h 后检测发酵液组份,结果如表 2 所示。

结果显示,乳酸的加入对菌体生长有抑制作用,

而乙酸的加入虽然促进了菌体的生长,但对 1,3-丙二醇的合成有明显的抑制作用。这表明有氧条件下,外加有机酸并不意味着一定能促进菌体生长和 1,3-丙二醇的合成。

表 2 不同浓度乳酸和乙酸对 *K. oxytoca* 生长和 1,3-丙二醇合成的影响

外加酸浓度 /g · L ⁻¹	乳 酸		乙 酸	
	菌体浓度 (OD _{600 nm})	PDO/g · L ⁻¹	菌体浓度 (OD _{600 nm})	PDO/g · L ⁻¹
0	3.25	3.73	3.25	3.73
5	3.45	3.70	5.80	3.79
10	2.44	3.19	5.47	3.08
15	2.09	2.65	3.83	2.52

表 3 不同浓度琥珀酸、柠檬酸、苹果酸对 *K. oxytoca* 生长和 1,3-丙二醇合成的影响

外加酸 /g · L ⁻¹	琥 珀 酸		柠 檬 酸		苹 果 酸	
	菌体浓度(OD _{600 nm})	PDO/g · L ⁻¹	菌体浓度(OD _{600 nm})	PDO/g · L ⁻¹	菌体浓度(OD _{600 nm})	PDO/g · L ⁻¹
0	3.94	5.21	3.94	5.21	3.94	5.21
5	4.48	8.64	4.29	7.65	4.10	7.10
10	4.44	9.12	4.85	8.14	4.70	7.33
15	4.27	8.13	4.95	8.37	4.41	6.97

结果显示,琥珀酸、柠檬酸和苹果酸的加入都能一定程度促进 *K. oxytoca* 菌体生长和 1,3-丙二醇合成,尤以琥珀酸的效果最为显著。有氧条件下 1 个 TCA 循环能生成 3 个 NADH 和 1 个 FADH₂,它们参与电子传递链分别产生 3 个和 2 个 ATP 分子,另有 GTP 生成 TAP 分子 1 个,总计产生 12 分子 ATP^[8]。

正是因为细胞内 ATP 量的增加,促进了关键酶甘油脱水酶的复活,进而引起 1,3-丙二醇合成的增加^[7,9]。

3 结 论

产酸克雷伯氏菌有氧条件下发酵甘油产 1,3-丙二醇的过程中,在培养基中分别添加不同浓度的琥珀酸后,对菌体生长、1,3-丙二醇以及乳酸合成都有一定程度的促进作用。5 L 自动发酵罐批式培养实验结果表明,在培养基中添加 8 g/L 的琥珀酸,发酵液菌体浓度较对照稍高,其生长曲线的对数生长期较对照长,稳定期则相对较短。发酵液中 1,3-丙二醇的终浓度可达 35.6 g/L,较对照提高了近 50 %,乳酸的产量也较对照提高了近 65 %。

在摇瓶发酵培养基中分别添加副产物乳酸和乙酸,以及 TCA 循环中间物琥珀酸、柠檬酸和苹果酸,结果初步证明引起上述实验现象的原因为:琥珀酸作

2.4 好氧条件下不同浓度琥珀酸、柠檬酸和苹果酸对菌体生长和 1,3-丙二醇合成的影响

饶治等人研究发现,外源添加 ATP 对 1,3-丙二醇的合成有促进作用^[7],而三羧酸循环(TCA 循环)与 ATP 生成有着密切的关联。琥珀酸同时作为 1,3-丙二醇发酵过程中的副产物和 TCA 循环中的中间产物,所以推测外加的琥珀酸参与菌体代谢过程,强化了 TCA 循环,生成了更多的 ATP,引发了上述试验现象^[8]。为了考察这种原因的可能性,进行以下实验:在培养基中分别外加不同浓度的琥珀酸、柠檬酸和苹果酸(三者皆为 TCA 循环的中间产物),200 r/min 培养 36 h 后检测发酵液组份,结果如表 3 所示。

为 TCA 循环中的一个中间物,它的加入强化了菌体内 TCA 循环,产生了更多的 ATP,从而促进了菌体生长,同时 ATP 又促进了甘油脱水酶的复活进而引起 1,3-丙二醇产量的增加。这也为克雷伯氏菌有氧条件下发酵产 1,3-丙二醇过程中,提高目标物产量提供了一种可能的策略。

参 考 文 献

- 1 王宝光,刘 铭,杜晨宇,等. 微生物法生产 1,3-丙二醇过程的代谢工程研究进展[J]. 过程工程学报,2006,(6):144~149
- 2 王剑锋,修志龙,刘海军,等. 克雷伯氏菌微氧发酵生产 1,3-丙二醇的研究[J]. 现代化工,2001,21(5):28~31
- 3 Biehl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999,52:289~297
- 4 蒋 洁,张 栩,谭天伟. 乙酸对 1,3-丙二醇发酵的影响[J]. 北京化工大学学报,2005,32(5):36~42
- 5 王领民,甘一如,金 平,等. 有机酸对产丙二醇菌生长和生产的影响[J]. 精细化工,2006,23(5):439~442
- 6 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,2006,5(5):804~808
- 7 饶 治,张延平,沈金玉,等. 外源添加 ATP 对 *K. pneumoniae* 菌体生长和产物合成的影响[J]. 精细化工,2004,21(6):413~417
- 8 沈 同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,

1999.96~101

9 Kajiur H ,Mori K,Tobimatsu T,et. al. Characteriza-tion
and mechanism of action of a reactivating factor for adeno-

sylicabala min-dependent glycerol dehydratase [J]. The
Journal of Biological Chemistry,2001,276(39):36 514~36
519

Effect of Succinate on Aerobic Fermentation of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Klebsiella oxytoca*

Guan Guiping¹, Wang Hongbing², Tian Jiesheng³

1(College of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

2(Hunan Institute of Animal & Veterinary Science, Changsha 410131, China)

3(Department of Microbiology and Immunology, China Agricultural University, Beijing, 100094)

ABSTRACT Succinate is a by-product of 1,3-propanediol production from glycerol by *Klebsiella oxytoca*. Under aerobic conditions, enhancement of cell growth and 1,3-propanediol synthesis was found with addition of succinate in the fermentation medium. When batch fermentation was carried out in 5L autofermenter, the similar results appeared. In order to explore the reason, we added lactate, acetate(by-products), succinate, citrate, and malate (intermediates in TCA cycle) to the medium respectively in shake flask fermentation. The preliminary results showed that reactivation of glycerol dehydratase by added ATP from aggrandizement of TCA cycle increased the yield of 1,3-propanediol.

Key words succinate, aerobic fermentation, 1,3-propanediol, TCA cycle, ATP

市
场
动
态

2007~2008 中国乳品饮料业市场状况

2007年,我国食品工业呈现健康、快速、可持续发展的良好态势,取得了显著成果。企业规模明显扩大,规模效益显著提高;产品质量、卫生、安全状况得到改善,产品质量不断提高,产品品种日益增加;企业投资比重加大;国有企业改制进一步发展。

2007年,我国乳品行业仍然保持了良好的发展势头,尽管上半年市场一度低迷,但由于国际市场乳粉价格攀升、货源紧张,国内食品生产需求量增加等原因,乳品行业尤其是乳粉生产、销售出现了近几年少有的好形势,价格也有大幅度的提高,因而激活了近些年来一直处于低迷状态的乳粉生产。由此,也相应带来了“奶源争夺”的白热化。大型乳品加工企业完全占据市场竞争的主动,整合、兼并、扩张的步伐明显加快,一些区域性乳品企业,依靠独特的产品定位与产品创新,在细分市场上努力发掘发展空间。

2008年饮料行业发展趋势:软饮料制造业是食品行业中快速增长的子行业之一,行业需求不断提高,产能不断扩大,将使产业结构进一步提升和优化。在产销规模继续扩大的同时,饮品不断推陈出新,将衍生出更加广阔的细分市场空间。市场竞争也从产品的渠道与价格竞争升级到产品的创新与品牌竞争,一线企业将通过“产品线延伸”加“高端产品研发”的组合策略,继续扩张市场份额和品牌影响力。“高附加值、高毛利率、功能诉求明显”将成为企业产品结构调整的重点,如功能性饮料、果蔬汁、乳饮以及融合3种品类概念的复合型产品等都将在2008年流行。

2008年,随着国家奶业扶持政策的落实,液态奶生产经营管理的加强,加工企业生产经营行为的逐步规范,乳制品企业的效益将进一步提高,产业结构也将逐步优化。骨干企业会加快在全国重点市场的布局,地方性品牌更多地会转入区域性市场的精耕细作。随着高端市场新面孔的增多,竞争开始加剧。乳酸菌市场持续升温,乳业市场将会出现乳酸菌产品和纯奶、酸奶共分客源的现象。在骨干企业规模继续扩张的前提下,奶源竞争仍然是今年各乳品企业面临的主要问题。“禁鲜令”的终结,对巴氏奶生产企业无疑是一大利好,其在产品营销尤其是对消费者的宣传策略上必大有文章可做。