

# 以葡萄糖为辅助底物发酵 生产 1,3-丙二醇的研究

张 健<sup>1</sup> 赵红英<sup>1</sup> 刘宏娟<sup>2</sup> 向波涛<sup>1</sup> 刘德华<sup>1</sup>

(1. 清华大学化学工程系, 北京 100084; 2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

**摘要:**采用 *Klebsiella pneumoniae* 对葡萄糖作为辅助底物发酵生产 1,3-丙二醇进行了研究。结果表明葡萄糖单独作为底物发酵时不生成 1,3-丙二醇。以葡萄糖和甘油为混合底物时,则可以显著提高菌体浓度,但是 1,3-丙二醇浓度和甘油到 1,3-丙二醇转化率没有提高。在甘油为底物的批次发酵过程中,通过流加葡萄糖作为辅助底物可以提高甘油到 1,3-丙二醇的摩尔转化率,同时可缩短发酵时间。通过选择合适的葡萄糖流加速率,较以甘油为单一底物的发酵结果,1,3-丙二醇的摩尔转化率最高可达 0.649,提高了 53.4%;生产强度为 1.005 g/(L·h),提高了 139.9%。

**关键词:** 1,3-丙二醇; 葡萄糖; 辅助底物; 甘油; *Klebsiella pneumoniae*

中图分类号: TQ923

文献标识码: A

## Fermenting production of 1,3-propanediol by using glucose as cosubstrate

ZHANG Jian<sup>1</sup>, ZHAO Hong-ying<sup>1</sup>, LIU Hong-juan<sup>2</sup>, XIANG Bo-tao<sup>1</sup>, LIU De-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Bioengineering Institute, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** 1,3-propanediol fermenting production was studied by using glucose as cosubstrate and *Klebsiella pneumoniae*. The results show that 1,3-propanediol can't be obtained when glucose used alone as substrate. In the fermenting production of 1,3-propanediol with glycerol as substrate, the yield of 1,3-propanediol was greatly increased when adding glucose as cosubstrate, but the concentration of 1,3-propanediol and the conversion ratio of glycerol to 1,3-propanediol were not increased. In the process of fermentation with glycerol as substrate, the molar yield of 1,3-propanediol was increased with glucose as cosubstrate, while fermentation time also decreased. Compared with 1,3-propanediol fermenting production with glycerol as the only substrate, the maximal molar yield of 1,3-propanediol was 0.649 g/(L·h), increased by 53.4%, and 1,3-propanediol production intensity was 1.005 g/(L·h), increased by 139.9%.

**Key words:** 1,3-propanediol; glucose; cosubstrate; glycerol; *Klebsiella pneumoniae*

1,3-丙二醇(1,3-PDO)是一种重要的化工原料,主要用于生产聚酯和聚氨酯的单体以及溶剂、抗冻剂或保护剂等。近年研究表明以 1,3-丙二醇和对苯二甲酸为单体合成的聚酯 PTT 较之以乙二醇和对苯二甲酸为单体的聚酯 PET 具有更优良的特性,如良好的弹性、可连续印染性、易着色性和可生物降解性等<sup>[1]</sup>。目前 PDO 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

为近年来的研究重点<sup>[2]</sup>,其中研究较多的是以 *Klebsiella pneumoniae* 为菌种的发酵过程,其基本的代谢过程主要有两条途径:一条途径为甘油经协助扩散进入细胞后,甘油脱水酶催化甘油形成 3-羟基丙醛和水,接着 3-羟基丙醛还原为 PDO,而 PDO 不再进一步被代谢;另一条途径是部分甘油在脱氢酶的作用下转变为二羟基丙酮,然后经磷酸化脱氢,进而进入丙酮酸代谢,生成副产物。PDO 的形成主要是为了平衡微生物代谢的氧化还原状态,消耗氧化支路

收稿日期: 2002-04-02

基金项目: “十五”国家科技攻关计划项目(2001BA708B01-04)

作者简介: 张健,男,1976年生,硕士生;刘德华,男,1962年生,博士,教授,博导,主要从事天然可再生资源利用的生物化工技术方面的研究。

和生物量合成所产生的还原当量(NADH)<sup>[3]</sup>。PDO属于 *Klebsiella pneumoniae* 的初级代谢产物,其合成与菌体的生长有着密切的关系。因为菌体生长及氧化代谢支路要消耗部分甘油,所以甘油到 PDO 的转化率不高,实际过程中也证实了这一点,甘油到 PDO 的摩尔转化率最高只能达到 0.5 左右<sup>[4,5]</sup>。此外发酵过程中菌浓较低,发酵周期较长,生产强度不高。

为解决以上问题,笔者研究了以葡萄糖作为辅助底物对于发酵过程的影响,尝试以流加辅助底物葡萄糖来促进菌体生长,同时以较廉价的葡萄糖替代部分由于菌体生长和氧化代谢所消耗的甘油,从而提高甘油到 PDO 的转化率,降低生产成本。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养基

所采用的菌种为北京农业大学赠送的 *Klebsiella pneumoniae*, 培养基的组成见表 1<sup>[5,6]</sup>。

表 1 每升培养基组成

组分	含量	组分	含量
甘油	20g	微量元素溶液	2 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	4.45 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 g	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25mg
酵母粉	1.0 g	NiCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	27.64mg
浓盐酸(37%)	0.9 ml	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	35mg
铁溶液(5g/L)	1 ml	CuCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	20mg
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	29.28mg
		ZnCl <sub>2</sub>	70mg

注:此培养基组成为发酵培养基,种子培养基其他成分与发酵培养基相同,另加入 CaCO<sub>3</sub> 2.0 g/L。

### 1.2 培养条件

种子培养采用好氧培养,使用 500 ml 瓶,装液量为 50 ml,培养温度 30℃,摇床转速 150 r/min。发酵在 B. Braun Biostat B 型 5 L 全自动发酵罐中进行。装液量 4 L,接种量 10%,搅拌速度 150 r/min,发酵温度 37℃,通入 0.2 L/min(针对每升发酵液)的氮气保持厌氧环境,发酵过程中 pH 值用 4.8 mol/L 的 KOH 溶液控制在 7.0。

### 1.3 分析方法

生物量采用比浊法(波长 650 nm)测定。发酵液中甘油、PDO 用 HPLC 测定。色谱柱为 Aminex resin-based 87H 柱,柱温 65℃,流动相为 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,流速为 0.8 ml/min,检测器为 CTO-10vp 折光光示差检测器,温度 65℃,进样量为 20 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同底物批式发酵结果

以葡萄糖为单一底物的发酵结果如图 1 所示。随着发酵时间的增加,菌体生长迅速,葡萄糖消耗较快。当发酵时间为 6.8 h 时,葡萄糖已被完全消耗,此时菌体浓度(OD)可达 3.2。但通过检测发酵产物,没有 PDO 生成。

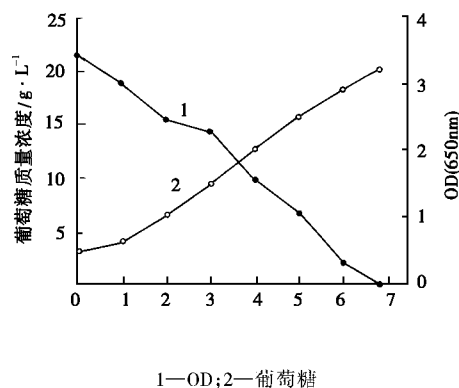


图 1 2%质量分数的葡萄糖发酵结果

图 2 的结果表明,当用甘油为发酵的单一底物时,4 h 以前菌体浓度低,PDO 增长不明显;4~12 h,菌体生长迅速,同时 PDO 生成量增加也较快;12 h 以后,菌体浓度基本不变,PDO 浓度有少量增加。最终菌体 OD 和 PDO 质量浓度可分别达 0.9 g/L 和 6.7 g/L,甘油到 PDO 摩尔转化率为 0.423,生产强度为 0.419 g/(L·h)。

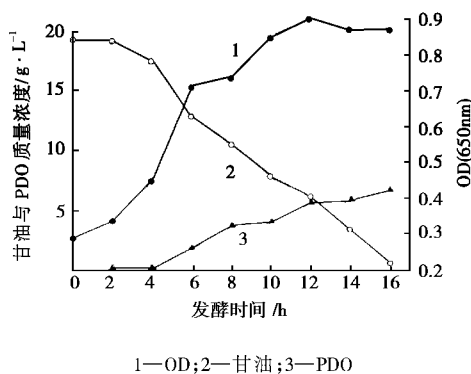
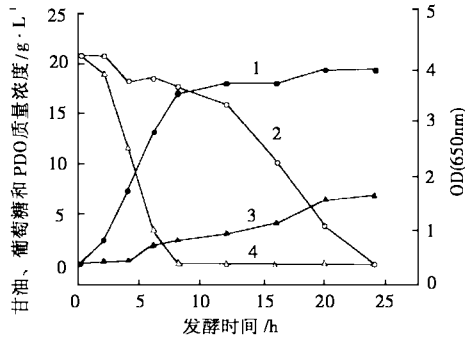


图 2 2%质量分数的甘油发酵结果

当以甘油和葡萄糖为混合底物的发酵结果见图 3。从图中可以看出,在发酵初期,葡萄糖消耗较快,而甘油消耗较慢,同时菌体增长也较快,但 PDO 生成较慢。当发酵进行到 8 h 左右时,葡萄糖被消耗完,菌体开始以较快速率消耗甘油,同时生产 PDO。

这表明当体系内葡萄糖浓度较高时,虽然菌体生长旺盛,但是与 PDO 合成相关的酶系可能受到抑制,使得甘油消耗速率较低, PDO 生成速率不高。当发酵至 24 h 时,甘油被消耗完,此时 PDO 质量浓度为 6.8 g/L,甘油到 PDO 的摩尔转化率为 0.398,生产强度为 0.284 g/(L·h)。



1—OD;2—甘油;3—PDO;4—葡萄糖

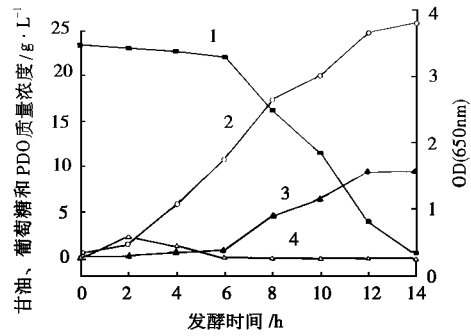
图 3 2% 质量分数的甘油和 2% 葡萄糖混合底物发酵结果

以上结果表明,葡萄糖和甘油混合物作为发酵底物时,菌体优先消耗葡萄糖,在葡萄糖消耗完之后才开始大量消耗甘油,虽然 PDO 生成与菌体生长成半耦连关系,但由于较高葡萄糖浓度可能对与生成 PDO 相关的酶系具有抑制作用,使得在菌体大量生长时没能有效地将甘油转化成为 PDO。同时从图 3 中还可以看出,在葡萄糖消耗完以后,体系中菌浓增长缓慢,虽然此时的菌浓比以甘油为单一底物发酵时的菌浓高 3 倍,但其 PDO 浓度和甘油到 PDO 的转化率反而有所下降。因此考虑采用流加葡萄糖的方式,使体系中葡萄糖浓度保持在较低水平,以避免产生明显的抑制。

2.2 匀速流加葡萄糖的批式发酵结果

以 2% 质量分数的甘油为底物,以 1.8 g/(L·h) 的流加速度,流加时间为 8 h,匀速流加葡萄糖作为辅助底物进行批式发酵试验,其结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,在前 6 h 菌体生长旺盛,但是体系中有葡萄糖积累,此时甘油消耗速率很慢,产物 PDO 生成量很少,这与图 3 中甘油和葡萄糖混合物作为发酵底物的情况相似。在流加 6 h 以后,甘油与葡萄糖才被迅速消耗,6 h 以后体系中葡萄糖浓度一直保持为零。这是由于此时的菌浓较 6 h 前已大大增加,对葡萄糖的消耗速率大大加快,而葡萄糖流加速度保持不变。当发酵至 14 h 时,甘油被消耗完,此时 PDO 质量浓度为 9.65 g/L,甘油到 PDO 摩

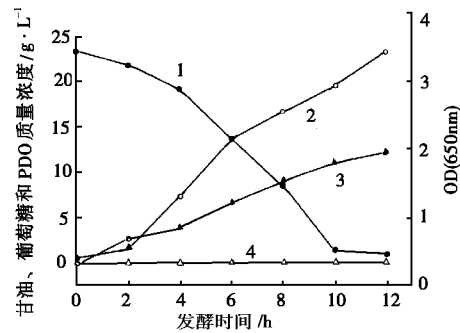
尔转化率为 0.505,较单一甘油发酵结果提高了 14.3%,生产强度为 0.689 g/(L·h),较单一甘油发酵结果提高了 64.4%。



1—甘油;2—OD;3—PDO;4—葡萄糖

图 4 流加速度为 1.8 g/(L·h) 发酵结果

在上述实验基础上,保持葡萄糖流加总量不变,延长流加时间为 12 h,相应的葡萄糖流加速度调整为 1.2 g/(L·h),实验结果见图 5。由图 5 可以看出,菌体生长迅速,且体系中没有葡萄糖积累。从发酵初期开始,甘油和葡萄糖即可被同时迅速消耗,同时产物 PDO 也很快生成。当发酵至 12 h 左右,甘油基本耗完, PDO 质量浓度为 12.06 g/L,甘油到 PDO 的摩尔转换率达 0.649,较单一甘油为底物发酵结果提高了 53.4%,生产强度为 1.005 g/(L·h),较单一甘油为底物发酵结果提高了 139.9%。

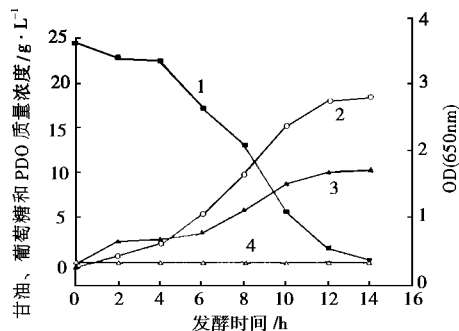


1—甘油;2—OD;3—PDO;4—葡萄糖

图 5 流加速度为 1.2 g/(L·h) 发酵结果

为进一步考察葡萄糖作为辅助底物对于发酵过程影响,将葡萄糖流加速度降低至 0.798 g/(L·h),流加时间为 12 h,此时的葡萄糖流加总量较流加速度为 1.2 g/(L·h) 时降低了 33.5%,结果如图 6 所示。实验结果表明在此条件下,体系中没有葡萄糖积累,菌体生长、甘油消耗及 PDO 生成规律与葡萄糖流加速度为 1.2 g/(L·h) 时相似。产物 PDO 质量浓度为 10.34 g/L,甘油到 PDO 的摩尔转化率为

0.513,较单一甘油为底物发酵结果提高了21.3%,生产强度为0.739 g/(L·h),较单一甘油为底物发酵结果提高了76.4%。但与葡萄糖流加速率为1.2 g/(L·h)时相比,其对发酵过程的改善程度相对较小。



1—甘油;2—OD;3—PDO;4—葡萄糖

图6 流加速率为0.798 g/(L·h)发酵结果

通过以上3组实验的对比可知,在适当的葡萄糖流加速率下,流加葡萄糖能有效的提高菌体生长速率,同时促进甘油到PDO的转化,使得过程中PDO浓度、甘油到PDO的摩尔转化率及生产强度均得以显著提高。当葡萄糖的流加速率过快,使得体系中有葡萄糖积累时,会使PDO合成酶系受到抑制,这与葡萄糖和甘油混合底物批式发酵的现象是一致的。在保证体系中无葡萄糖积累的前提下,加大葡萄糖的流加速率,可以更加显著的强化发酵过程。

### 3 结论

*Klebsiella pneumoniae* 可以葡萄糖为底物快速生长,但不产生PDO。以甘油为单一底物发酵时,菌体

生长较慢,最终PDO浓度、甘油到PDO的摩尔转化率较低。在2%甘油和2%葡萄糖的混合底物发酵过程中,与单一甘油底物的发酵过程相比,菌体浓度显著提高,但是由于较高浓度的葡萄糖的抑制作用,最终PDO浓度和甘油到PDO的摩尔转化率反而有所下降。

通过流加葡萄糖作为辅助底物,在提高菌体浓度的同时,可以避免葡萄糖对过程的抑制作用,显著提高最终发酵液中的PDO浓度、甘油到PDO的转化率以及PDO的生产强度。与单一甘油底物发酵过程相比,在本实验条件下,其最大增长幅度分别可达77.4%、53.4%和139.9%。

在流加辅助底物葡萄糖过程中,控制合适的流加速率可以取得较好的效果。在保持体系中无葡萄糖积累的前提下加大流加速率,对过程的改善效果更加明显。

### 参考文献

- [1] Kirl-othmer. Encyclopedia of chemical technology[M]. New York: Wiley, 1992. 156 ~ 160
- [2] 王熙庭,陈曼华. 1,3-丙二醇生产方法及用途[J]. 煤化工, 2000, 4: 39 ~ 42
- [3] Zeng A P, Biebl H, Schlieker H, et al. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation[J]. Enzyme Microb Technol, 1993, 15 (9): 770 ~ 779
- [4] 王剑锋,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
- [5] 朱丙田,刘德华,等. 1,3-丙二醇发酵条件的探索[J]. 化工冶金, 2000, 21(8): 420 ~ 422
- [6] Homman T, Carmen T, Deckwer W D, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol *Klebsiella* and *Citrobacter* strains[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 33: 121 ~ 126

## 2002 中国西部粉体与粉体工业技术展览会

### ——一次汇聚先进技术装备的行业盛会

时间:2002年9月5~7日

地点:中国·重庆技术展览中心

粉体技术设备是高新技术的结晶,是实现制造业现代化和促进生产力发展的重要物质保证,在工业基础雄厚,资源丰富集的重庆及西部地区县具有广泛的市场。为了更好地引进国内外先进技术装备,加强东西部交流贸易与合作,我们特举办本届盛会,热忱欢迎行业单位及业界人士与会参观交流、洽谈贸易!

#### 展示范围

1. 硅酸盐、磨料、冶金、化工、食品(含粮食)、煤炭、制药等行业的粉体制造加工、固体散装材料处理和环保设备,包括粉碎、筛分、分级、固液分离、混合、捏合、选料、包覆、干燥、成型、烧结、送料、输送、仓储、收尘、包装、环保等设备;
2. 工厂检测和自动化设备:测试、控制仪器仪表、化验

室装备、自动控制、节能系统、辅助设计系统等;

3. 工程材料、粉体产品,包括各工业用原料粉体、非矿粉料、耐磨材料、过滤材料、筛面新材料、功能性粉体以及各种粉体新产品以及信息。

#### 大会组织办公室

地址:重庆市南坪北路12号工贸大厦810室

邮编:400060

电话:023-62809699 62801864 62904484

传真:023-62809699 E-mail: hui-lian@163.net

#### 北京联络部

地址:北京市西城区六铺炕街一号南楼535室

邮编:100011

电话:010-82084358 传真:010-82081306