

1,3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究

赵红英¹ 张健¹ 刘宏娟² 向波涛¹ 刘德华¹

(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:研究了底物甘油浓度对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵生产 1,3-丙二醇的影响,并通过实验确定了最佳的初始甘油浓度和甘油开始对产物生成产生抑制作用的浓度。针对底物抑制现象,提出了菌种驯化和流加甘油发酵两种解决途径。结果表明:采用原始菌株发酵,适宜的甘油初始浓度为 642.4 mmol/L,此时 1,3-丙二醇浓度和转化率分别可达 260 mmol/L 和 0.492 mol/mol;在较高甘油初始浓度(789 mmol/L)的情况下,经驯化培养获得的耐底物抑制菌株,可将最终 1,3-丙二醇浓度和转化率分别提高到 300.9 mmol/L 和 0.530 mol/mol;采用流加甘油发酵工艺,1,3-丙二醇浓度和转化率分别可提高到 397.7 mmol/L 和 0.625 mol/mol。

关键词:1,3-丙二醇;甘油;底物抑制;*Klebsiella pneumoniae*

中图分类号:TQ923

文献标识码:A

Substrate inhibition in fermentation of 1,3-propanediol and countermeasures to it

ZHAO Hong-ying¹, ZHANG Jian¹, LIU Hong-juan², XIANG Bo-tao¹, LIU De-hua¹

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

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

Abstract: Inhibiting effects of initial glycerol concentration on fermentation production of 1,3-propanediol by using *Klebsiella pneumoniae* was studied. Inhibiting effects of glycerol on cell growth and product formation was discussed and optimal initial glycerol concentration was determined. Both approaches of bacteria improvement and fed-batch fermentation to avoid substrate inhibition were proposed. With original Kp, appropriate initial glycerol concentration, 642.4 mmol/L was obtained, correspondingly, the maximal 1,3-PDO concentration and yield, 260 mmol/L and 0.492 mol/mol, were reached respectively. With substrate-tolerant mutants, 1,3-PDO concentration and yield could be increased more, which were 300.9 mmol/L and 0.530 mol/mol respectively. Fed-batch fermentation can also increase 1,3-PDO concentration and yield, accompanying the maximal 1,3-PDO concentration and yield, 397.7 mmol/L and 0.625 mol/mol is got respectively.

Key words: 1,3-propanediol; glycerol; substrate inhibition; *Klebsiella pneumoniae*

聚对苯二甲酸丙二醇酯 (PTT) 是新近开发成功的一种性能优异的聚酯材料,在纺织工业、地毯工业以及工程热塑性材料等领域具有非常广阔的应用前景,PTT 生产的关键在于原料单体——1,3-丙二醇 (1,3-propanediol, 简称 1,3-PDO) 的来源问题^[1,2]。现行的 1,3-PDO 生产路线主要是丙烯醛法和环氧乙烷法,但这两种方法存在副反应多、反应条件苛刻、产量较低以及环境污染等问题,极大地制约了 PTT 的

生产和应用。因此利用具有条件温和、副产物少、原料来源广泛、环境污染小等优点的微生物发酵法生产 1,3-PDO 越来越受到人们的重视。

虽然微生物发酵法生产 1,3-PDO (以下简称 PDO) 较化学合成法有很多优点,但是发酵过程中存在多种物质的抑制作用^[3,4],使发酵液中最终 PDO 的浓度较低,这不仅影响了 PDO 的生产能力,而且也给产物分离带来困难。甘油 (Gly) 作为微生物发

收稿日期:2002-04-12

基金项目:“十五”国家科技攻关计划项目(2001BA708B01-04)

作者简介:赵红英,女,1977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的研究,侧重于微生物发酵工艺优化和设备开发。

醇法生产 PDO 的底物,是微生物生长、产物 PDO、副产物乙醇、乙酸、乳酸等的反应物,其初始浓度的大小对 PDO 的生成有很大影响。因此笔者研究了初始甘油浓度对 PDO 生成的影响,并针对由实验得出的底物抑制作用,提出了耐底物抑制菌株驯化和采用流加工艺以提高 PDO 最终浓度两种可行策略。

1 实验部分

1.1 材料

菌种为中国农业大学提供的 *Klebsiella pneumoniae*(简称为 Kp)。

斜面培养基成分为:酵母提取物 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 10.0 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1.0 L。种子和发酵培养基相同,见文献[5]中种子培养基的配方。上述培养基均在 115℃ 下灭菌 20 min。

1.2 菌种驯化及筛选

将原种子培养基中 0.22 mol/L 甘油浓度分别提高到 1.3、1.5 mol/L,进行种子传代培养,驯化培养三代,再将每代种子液中菌种进行平板包埋培养(即将涂有菌株的平板上面再覆盖一层固体培养基,以提高菌株在厌氧条件下的生长能力),最后挑选出长势好的单菌落进行驯化菌种的发酵培养。

1.3 1,3-PDO 的发酵培养

种子培养:于 500 ml 三角瓶中装入 50 ml 种子培养基,灭菌后,接入斜面菌种,然后在空气浴摇床中进行好氧种子培养,温度 30℃,转速 150 r/min,pH 值为 7.0。

发酵培养:分别在 500 ml 摇瓶和 5 L 气升式发酵罐中进行。摇瓶发酵条件为发酵培养基 200 ml,灭菌后接种,接种量 10%,用带有通气管和注射器针头的橡胶塞塞住瓶口,通入微量 N₂ 进行厌氧发酵培养。

发酵罐发酵条件:发酵培养基 4 L,灭菌后接种,接种量 10%,通 0.5 L/min(针对每升发酵液)的 N₂ 进行厌氧发酵培养。两种方式发酵温度均恒定在 37℃,pH 值控制在 7.0。

驯化菌种发酵培养:将发酵培养基中甘油初始浓度提高到 800 mmol/L 左右,其他条件与发酵培养相同。

流加培养:待菌株进入对数生长期后进行甘油补料,甘油代谢有乙酸、乳酸等副产物的生成,发酵过程需要加碱来调节 pH 值,实验中根据碱的消耗量来调整补加甘油的速率,控制甘油浓度在 0.1 ~ 0.3 mol/L。

若无特殊说明,所有摇瓶实验结果均为两个平行样的平均值。

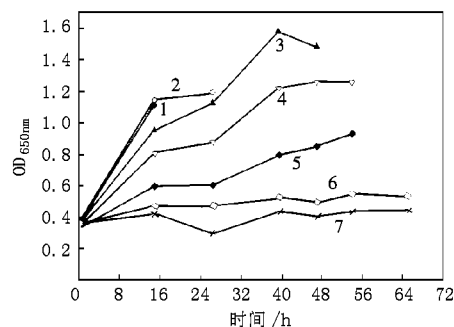
1.4 分析方法

生物量采用比浊法,在 721 分光光度计上于 650 nm 处进行测定。

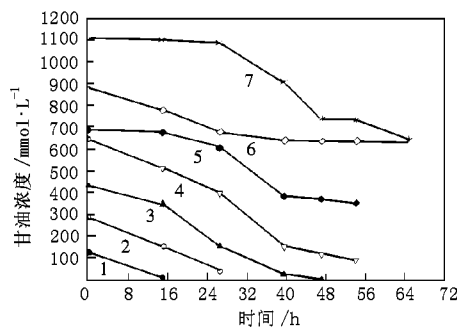
发酵液中甘油、PDO 以及副产物乳酸、乙酸、乙醇用 HPLC 测定。色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱,柱温 65℃,流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄,流速为 0.800 ml/min;检测器为 CTO-10vp 型折光光示差检测器。

2 结果与讨论

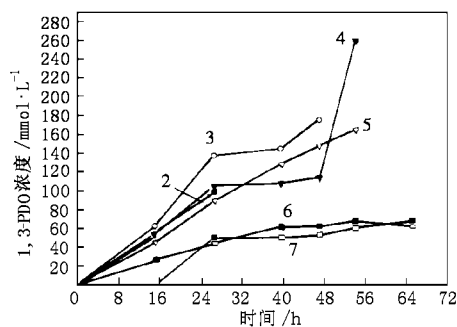
2.1 初始甘油浓度对 1,3-PDO 发酵的影响



(a)



(b)



(c)

1—127.2 mmol/L; 2—289.1 mmol/L; 3—434.8 mmol/L;
4—642.4 mmol/L; 5—688.9 mmol/L; 6—881.4 mmol/L;
7—1110.0 mmol/L

图 1 不同初始甘油浓度对菌株生长、甘油消耗和 1,3-PDO 生成的影响

从图 1(a)可看出初始甘油浓度分别为 127.2、

289.1 mmol/L 时细胞在对数生长期时的比生长速率最高,之后随着初始甘油浓度的增大,细胞的比生长速率逐渐降低,当初始甘油浓度高于 881.4 mmol/L 时,细胞比生长速率最低,最终细胞的菌体浓度(OD 值)只有 0.36,而初始甘油浓度为 434.8 mmol/L 的最终细胞的 OD 值可达到 1.5。可见较高的初始甘油浓度对菌株生长产生了一定程度的抑制作用。

从图 1(b)可以直接验证,随着时间增加甘油不断消耗,当初始甘油浓度为 127.2 mmol/L 时,甘油消耗最快,而甘油浓度为 1 110.0 mmol/L 时,甘油消耗最慢。同时在较高的初始甘油浓度下,所需的发酵时间较长。

从图 1(c)看出,PDO 的生成也受到不同初始甘油浓度的影响。随着发酵时间的增加,生成 PDO 浓度增加,当初始甘油浓度为 434.8 mmol/L 时,PDO 的比生成速率最高,当初始甘油浓度为 881.4 mmol/L 时,PDO 的比生成速率较低,而当初始甘油浓度达到 1 110.0 mmol/L 时,PDO 的生成存在一个长达 15 h 的延迟期。从图中还可看出,随着初始甘油浓度增大,最终 PDO 的浓度先随之升高,而后降低。当初始甘油浓度为 642.4 mmol/L 时,最终 PDO 浓度达到最高,为 260 mmol/L,当甘油浓度高于 881.4 mmol/L 时,最终 PDO 浓度只有 64 mmol/L。

表 1 是不同初始甘油浓度对 1,3-PDO 的转化率、生产强度以及副产物转化率的影响($C_{1,3-PDO}$ 为 1,3-PDO 浓度, $P_{1,3-PDO}$ 为 1,3-PDO 的生产强度, Y_{EtOH} 为乙醇相对转化了的甘油的转化率, Y_{HAc} 为乙酸相对转化了的甘油的转化率, Y_{Lac} 为乳酸相对转化了的甘油的转化率, $Y_{1,3-PDO}$ 为 1,3-PDO 相对转化了的甘油的转化率,下同)。从表 1 可看出,随着初始甘油浓度的增加,PDO 相对于消耗掉的甘油的转化率和其生成能力随之提高,当初始甘油浓度为 642.4 mmol/L 时达到最高,之后随着初始甘油浓度的继续增加,上述各值转而降低。这主要是由于过高的初始甘油浓度会抑制菌株的生长。从代谢途径而言,因为菌株生长既是生成能量(ATP,三磷酸腺苷)也是生成还原当量(NADH,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)的过程,所以甘油浓度过高导致的菌浓明显降低,不利于消耗 NADH 过程的 PDO 的生成。同时随初始甘油浓度的不同,发酵过程中副产物的组成和浓度也有明显的区别。在本实验范围内,当初始甘油浓度较低时,发酵过程中形成的副产物是乙醇和乳酸,没有醋酸生成。初始甘油浓度在 642.4 ~ 688.9 mmol/L 时,上述 3 种副产物均会产生,其中以乙醇和乳酸较多。当初始甘油浓度升高到 881.4

mmol/L 之后,副产物是醋酸和乳酸,没有乙醇生成。这说明菌浓降低同时也降低了各代谢副产物的生成。

表 1 不同初始甘油浓度对 1,3-PDO 的转化率、生产强度及副产物转化率的影响

编号	甘油初始浓度/ mmol·L ⁻¹	$Y_{1,3-PDO}/$ mol·mol ⁻¹	$P_{1,3-PDO}/$ mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹	副产物浓度/mmol·L ⁻¹		
				EtOH	HAc	Lac
1	127.2	0.438	3.55	75.3	0.0	0.0
2	289.1	0.396	3.70	87.3	0.0	4.6
3	434.8	0.405	3.73	102.8	0.0	10.5
4	642.4	0.492	4.81	146.2	19.3	36.3
5	688.9	0.238	3.03	35.9	19.6	26.7
6	881.4	0.221	0.98	0.0	17.4	12.1
7	1110.0	0.150	1.04	0.0	17.4	18.2

2.2 驯化菌株对 1,3-PDO 发酵的影响

从上述 2.1 部分可知,较高的初始甘油浓度不仅会抑制菌株的生长,而且可降低 PDO 的最终发酵指标。为了提高发酵最终 PDO 的产量,笔者对原菌株进行了耐高浓甘油的驯化培养,并将挑选出的菌落在较高的初始甘油浓度下进行摇瓶发酵对比实验,结果如表 2 所示。从表 2 可以看出,在初始甘油浓度相同的条件下,除了一支驯化菌株(B-1)发酵 PDO 的浓度比原菌株(A)发酵 PDO 的浓度低外,其余驯化菌株发酵结果都有不同程度的提高,其中以驯化菌株 C-1 的发酵最终产物 PDO 的浓度和转化率最高,与原菌株的发酵结果相比分别提高了 60% 和 58%。因此通过适当的驯化可改善菌株的性能,提高发酵水平。

表 2 耐底物驯化菌株与原菌株摇瓶发酵 1,3-PDO 的比较

编号	A	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3
$C_{1,3-PDO}/$ mmol·L ⁻¹	202.6	325.0	314.5	278.9	176.3	276.3	315.8
增幅	—	0.60	0.55	0.38	-0.13	0.36	0.56
$Y_{1,3-PDO}/$ mol·mol ⁻¹	0.220	0.347	0.395	0.373	0.213	0.286	0.344
增幅	—	0.58	0.79	0.69	-0.03	0.30	0.56

注:A 为未经驯化的原始菌株;B、C 为将原始菌株在甘油浓度分别是 1.3 mol/L 和 1.5 mol/L 的培养基中驯化后所得的菌株,1、2、3 为驯化代数;甘油初始浓度为 789 mmol/L。

为了进一步验证摇瓶实验结果,在 5 L 气升式发酵罐中进行了发酵实验,结果见表 3。在初始甘

油浓度基本相同的条件下,采用摇瓶发酵结果较好的驯化菌株即表2中的(B-1)进行发酵,PDO浓度可达到300.9 mmol/L,摩尔转化率为0.530 mol/mol,较未经驯化的原始菌株在相同条件下发酵的最终结果分别提高了356%和142%,较表1中的最优结果(D)分别提高了15.7%和7.7%。

与未经驯化的原始菌株相比,驯化菌株在发酵过程中的OD值和PDO浓度均较高,甘油消耗较快。根据代谢机理,PDO浓度的提高主要是因为驯化菌种提高了对培养基的适应性,在甘油浓度较高的发酵培养基中也可以获得较高的菌浓,从而可以为

表3 耐底物驯化菌株与原始菌株在5L气升式发酵罐中的间歇发酵结果比较

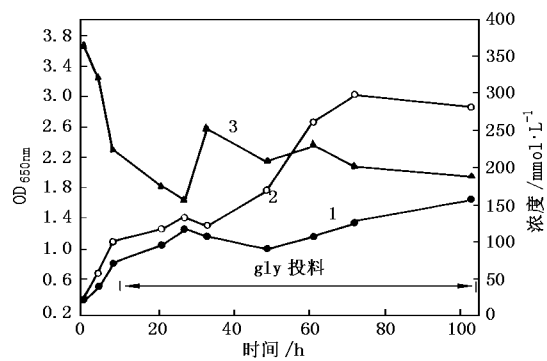
菌株	甘油初始浓度/ mmol·L ⁻¹	甘油消耗量/ mmol·L ⁻¹	副产物生成量/mmol·L ⁻¹			Y _{1,3-PDO}	Y _{EiOH}	Y _{HAc}	Y _{Lac}	P _{1,3-PDO} / mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹
			EiOH	HAc	Lac					
原始菌株 A	789.1	301.9	60.5	14.7	0.0	0.219	0.200	0.049	0.000	1.25
驯化菌株 B	783.0	567.6	92.7	50.0	18.6	0.530	0.163	0.088	0.033	6.27

2.3 流加工工艺对1,3-PDO发酵的影响

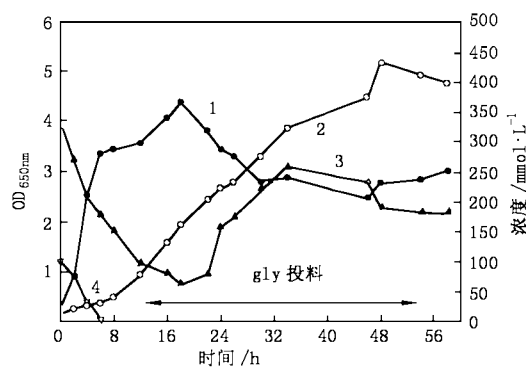
为了克服底物抑制作用,提高PDO的产量,进行了流加实验。初始甘油浓度为300 mmol/L,发酵过程中通过计算甘油的消耗速率来调整流加甘油的速率,将其浓度控制在0.1~0.3 mol/L。图2是甘油发酵过程的流加过程曲线,其中图2(a)是不添加葡萄糖辅助底物流加甘油的B菌株的发酵过程曲线,可知B菌株在发酵前30h处于生长期,而后进入稳定期;甘油浓度在流加甘油前期迅速降低,流加甘油后其浓度基本维持在150 mmol/L到250 mmol/L;PDO浓度随发酵进行而不断增长,发酵72h达到最高,为296.3 mmol/L,之后PDO生成减慢,其浓度随发酵液体积增大而略有降低,最终为281.2 mmol/L。图2(b)是添加葡萄糖辅助底物流加甘油的B菌株的发酵过程曲线,可知在厌氧培养条件下,葡萄糖迅速消耗,发酵进行6h后就消耗完全;菌株在发酵初始迅速生长,在葡萄糖消耗结束时菌浓的OD值达到3.34,之后菌株生长向以甘油为唯一碳源转变,生长速率有所降低,发酵12h后菌株再次按对数生长期规律生长到18h,然后逐渐进入衰亡期;发酵培养基中的甘油浓度在流加前按对数降低,流加甘油后其浓度基本维持在100~250 mmol/L;PDO浓度在发酵初始增长缓慢,发酵8h后进入对数生成期,48h其浓度达到最高,为432.2 mmol/L,之后PDO生成减慢,其浓度随发酵液体积增大而略有降低,最终PDO浓度为397.7 mmol/L。由图2和表4比较B、C菌株可知,培养基中加入辅助底物葡萄糖,不仅可将发酵过程中的菌浓提高2

PDO的合成提供更多的ATP和NADH。另外与未经驯化的原始菌株相比,用驯化菌株发酵,由于菌浓的提高,最终发酵液中代谢副产物乙醇、乙酸的浓度也都较原菌株有所提高,而且增加了副产物乳酸。表3中Y_{EiOH}与Y_{Lac}的二者之和与驯化前Y_{EiOH}的值相当,只有Y_{HAc}较原始菌株提高了,根据代谢机理乙酸的生成不需消耗NADH,而可以合成ATP,因此其转化率的增加可促进氧化路径的进行。实验结果表明,采用驯化菌株,可提高PDO的浓度,而且菌株在以后实验中表现了较好的稳定性和重复性,未出现菌种退化现象。

倍以上,而且可将PDO的最终浓度提高41.4%,转化率提高87.7%,生产能力提高1倍。即添加辅助底物葡萄糖可有效的提高菌浓和转化率,与文献[6]相符。



(a)



(b)

1—OD;2—PDO浓度;3—甘油浓度;4—葡萄糖浓度

图2 流加发酵中的甘油转化成1,3-PDO的代谢过程

表 4 是甘油发酵过程的两个流加实验结果,结合图 2,与表 1 中 4 号实验的最优批式发酵结果相比:A、B 菌株流加发酵最终的 PDO 浓度分别提高了 8.2% 和 53%;A 的 PDO 生产能力和转化率有所降低,而 B 菌株的这两个指标分别提高了 42.6% 和 27%;因此对 PDO 发酵而言,流加工艺是可行的。

另外从表 4 还可看出,未添加葡萄糖的流加甘油发酵,乙醇和乳酸的积累较多,而添加葡萄糖的流加甘油发酵,乙酸的积累较多,乳酸的积累较少,而乙醇的积累相差不多。因此流加过程后期存在的副产物乙醇、乙酸和乳酸的积累,会影响 PDO 的合成,所以应在对流加工艺进行进一步的优化,建立更加有效的流加策略来提高 PDO 产量。

表 4 流加发酵 1,3-PDO 的转化率、生产强度及副产物转化率的比较

菌株	甘油消耗量/ mmol	副产物浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$			$Y_{1,3\text{-PDO}}/$ $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	$P_{1,3\text{-PDO}}/$ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
		EtOH	HAc	Lac		
B	4780	181	37	72	0.333	3.39
C	2960	169	151	27	0.625	6.86

3 结论

(1)较高的甘油浓度会对 1,3-PDO 发酵产生抑制作用,对原始菌株而言,适宜的初始甘油浓度为 642.4 mmol/L,此时 1,3-PDO 的浓度、转化率和生产能力分别为 260 mmol/L、0.492 mol/mol 和 4.81 mmol/(L·h)。

(2)通过对菌种进行耐高浓底物的驯化培养,可以提高菌株在较高甘油浓度培养基中的生产能力,在初始甘油浓度提高到 780 mmol/L 时,发酵最终 1,3-PDO 的浓度和其对甘油的转化率比未经驯化的原始菌种分别提高了 356% 和 142%,较未经驯化时的最优结果分别提高了 15.7% 和 7.7%。

(3)采用流加甘油消除底物抑制可提高 1,3-PDO 的产量,而添加少量葡萄糖可进一步提高 1,3-PDO 产量,发酵最终 1,3-PDO 浓度、转化率和生产能力可分别达到 397.7 mmol/L、0.625 mol/mol 和 6.86 mmol/(L·h)。

参考文献

- [1] Witt U, Muller R J, Augusta J, et al. Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol[J]. Makromol Chem Phys, 1994, 195: 793 ~ 802
- [2] 张从容. 新型 PTT 聚酯工业现状及进展[J]. 精细石油化工, 2000, 5: 49 ~ 52
- [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] Zeng A P, Ross A. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation[J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 902 ~ 911
- [5] 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
- [6] Tong I T, Cameron D C. Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* dha regulon genes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1992, 34/35: 150 ~ 151

《中国化工产品目录》2001 ~ 2002 年第 10 版

该书是由中国化工信息中心、中化信富邦信息技术有限公司主编的大型化工工具书,第 10 次出版,经过每年的更新充实,积累了丰富翔实的信息,可满足不同读者的要求。

上册(产品):十九大类 24 000 余种(类)产品。

下册(企业):全国 18 000 余家企业。

附录:石油化工上市企业简介、化工进出口贸易公司名录、化工社团机构名录、化工企业网址名录、石油科研院所及设计院名录、化工产品中英文

名称索引及 CA 登记号索引。

订价:350 元/套(含邮资)

中化信富邦信息技术有限公司

网上书店:www.cheminfo.gov.cn

地址:北京安外小关街 53 号 (100029)

联系人:马立红

电话:010-64444193

传真:010-64437137

开户行:北京农行亚运村支行

帐号:230101040004176