

3-羟丙醛对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵产 1,3-丙二醇的影响及其调控

林日辉, 刘宏娟, 张 君, 郝 健, 程可可, 刘德华
(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 中间产物 3-羟丙醛在发酵液中的积累对 *Klebsiella pneumoniae* 细胞生长及 1,3-丙二醇的合成有显著的抑制作用, 而调节发酵的起始甘油浓度及控制发酵 pH 值可调控发酵液中 3-羟丙醛的积累。当起始甘油质量浓度分别为 20、30、50、70 g/L 的批次发酵中, 发酵液中 3-羟丙醛的积累的高峰分别为 4.31、6.87、11.48 及 13.49 mmol/L, 当起始甘油质量浓度大于 50 g/L 时, 3-羟丙醛在到达积累高峰后不能被菌体有效转化, 在发酵后期维持较高浓度, 抑制了细胞生长及 1,3-丙二醇的合成, 发酵不能继续进行。控制发酵 pH 值为 7.75~8.0 可促进发酵液堆积的 3-羟丙醛被迅速转化。在流加发酵中起始甘油质量浓度采用 30 g/L, 发酵 pH 值控制为 7.75 条件下, 发酵 32 h, 1,3-丙二醇质量浓度可达 37.16 g/L, 1,3-丙二醇的生产强度和产量得率分别达到 1.16 g/(L·h) 和 52.66%。

关键词: *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-丙二醇; 3-羟丙醛; 调控
中图分类号: TQ923 **文献标识码:** A

文章编号: 0253-4320(2005)09-0047-03

Effect of 3-hydroxypropionaldehyde on 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae* and regulation for it

LIN Ri-hui, LIU Hong-juan, ZHANG Jun, HAO Jian, CHENG Ke-ke, LIU De-hua
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: 3-Hydroxypropionaldehyde, an intermediate product during the 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*, can inhibit cell growth and 1,3-propanediol production, but it can be controlled by regulating the initial glycerol concentration and pH value. In the batch culture with the initial glycerol concentration of 20, 30, 50 and 70 g/L, 3-hydroxypropionaldehyde concentration can reach the peak of 4.31, 6.87, 11.48 and 13.49 mmol/L respectively. The 3-hydroxypropionaldehyde accumulated can't be converted effectively when the initial glycerol concentration is higher than 50 g/L, which led to the fermentation ceasing. A proper pH controlling strategy (pH = 7.75 - 8.0) can enhance the conversion of 3-hydroxypropionaldehyde in the broth and decrease the toxicity of 3-hydroxypropionaldehyde to the cell. During a fed-batch culture with the initial glycerol concentration of 30 g/L at a pH value of 7.75, 1,3-propanediol concentration reached 37.16 g/L in 32 h of fermentation. Furthermore, the productivity and yield can be 1.16 g/(L·h) and 52.66% (g/g) respectively.

Key words: 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; 3-hydroxypropionaldehyde; regulation

1,3-丙二醇(PDO)是一种重要的化工原料,它最主要的用途是作为新型聚酯(如 PTT)、聚醚和聚亚氨酯的单体,另外也可用于生产溶剂、抗冻剂或保护剂等,有广泛的应用前景^[1]。1,3-丙二醇合成方法有化学合成法与微生物发酵法两类,微生物代谢甘油产 1,3-丙二醇是在厌氧条件下歧化甘油的过程。甘油脱氢酶、二羟丙酮激酶、甘油脱水酶及 1,3-丙二醇氧化还原酶是甘油厌氧代谢产 1,3-丙二醇的关键酶,由 dha 操纵子编码,其表达受到二羟丙酮及甘油诱导^[2]。

在利用 *Klebsiella pneumoniae* 以 50 g/L 甘油为碳源合成 PDO 批次发酵中,发现当发酵系统 pH 值控

制在 7.0 时,发酵进入对数生长期后出现菌体不再生长、甘油不再消耗、PDO 不再合成的现象^[3-4]。其原因为 3-羟基丙醛(3-HPA)的积累,3-HPA 是一种具有很强细胞毒性的中间产物^[5]。笔者研究了 3-HPA 的积累对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵产 PDO 的影响,并探讨了降低发酵液 3-HPA 积累的有效调控策略。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养方法

菌种:菌种为自行分离保存的克雷伯氏肺炎杆菌臭鼻亚种(*Klebsiella pneumoniae* sub. ozaenae)。

收稿日期:2005-06-10

基金项目:“十五”国家科技攻关计划资助项目(2001 BA708B01-04)

作者简介:林日辉(1972-),男,博士生;刘德华(1962-),男,博士,教授,主要从事天然可再生资源生物化工技术方面的研究,通讯联系人,010-62794742, dhliu@tsinghua.edu.cn。

培养基组成及种子培养方法见文献[6]。

发酵培养:发酵实验在 Braun Biostat B 型 5 L 全自控发酵罐中进行。装液量 4 L, 接种量 10%。搅拌速度 150 r/min, 发酵温度 37℃, 通入 1 L/min 氮气保持厌氧, 发酵过程中体系 pH 值用质量分数为 50% 的 KOH 溶液控制。

1.2 分析方法

生物量(细胞干质量, DCW)根据干质量与 OD₆₅₀ 对应的标准曲线计算。

发酵底物、产物及副产物使用高效液相色谱(HPLC)测定^[6]。色谱柱为 Aminex resin-based 87H 柱, 柱温 65℃; 流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄, 流速为 0.8 mL/min; 检测器为 CTO-10vp 折光示差检测器, 温度 65℃; 进样量为 20 μL。

3-羟基丙醛的检测参考 Slininger 方法^[7]。3-HPA 在浓酸条件下脱水生成丙烯醛, 后者与色氨酸试剂反应生成紫色物质, 在 560 nm 有最大光吸收。检测系统中含 1 mL 样品, 0.75 mL 色氨酸试剂及 3 mL 含 HCl 37% (质量分数) 的浓盐酸, 在 37℃ 水浴 20 min 显色。560 nm 检测吸光值, 根据丙烯醛的标准曲线计算出发酵液中 3-羟基丙醛的浓度。

2 结果与讨论

2.1 不同起始甘油浓度的发酵过程及 3-HPA 的积累

2.1.1 细胞生长

在不同起始甘油浓度, pH 值控制为 7.0 的条件下进行 PDO 发酵, 菌体生长状态如图 1(a) 所示。可见起始甘油浓度越高, 菌体维持对数生长时间就越短。较高起始甘油浓度使发酵菌体生长受到了明显的抑制, 在整个发酵过程中, 50、70 g/L 起始甘油的最高菌体密度分别为 0.94、0.67 g/L; 20、30 g/L 起始甘油的菌体密度分别达到 1.07、1.46 g/L。

2.1.2 甘油消耗及 PDO 合成

在不同起始甘油浓度条件下, *K. pneumoniae* 在发酵过程甘油的消耗及 PDO 合成如图 1(c)、(d) 所示。20、30 g/L 起始甘油条件下, 甘油在发酵 10 h 后基本消耗完全, PDO 质量浓度分别达到 10.27、15.42 g/L。50、70 g/L 起始甘油条件下, 甘油消耗及 PDO 合成都受到了抑制, 发酵 8 h, 两者的甘油消耗基本停滞, 至发酵结束残余甘油质量浓度分别为 28.68、50.46 g/L, PDO 终浓度分别为 11.12、9.13 g/L。Fabien^[3]等在利用 *Enterobacter agglomerans* 进行 PDO 甘油发酵时, 也发现在起始甘油浓度高于 480 mmol/L 时出现甘油不完全消耗的现象。

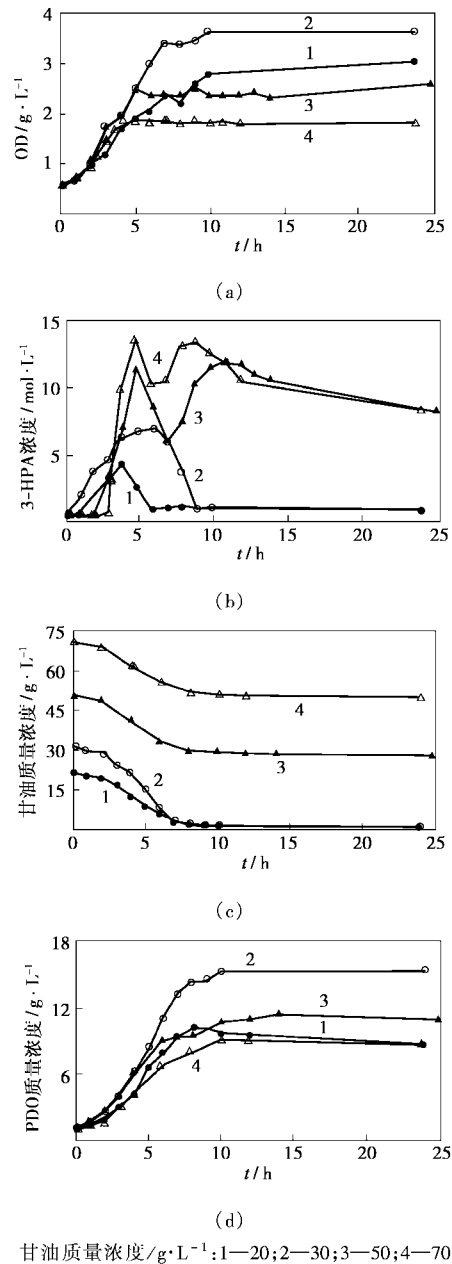


图 1 不同起始甘油浓度与 PDO 发酵过程菌体密度、甘油、1,3-丙二醇及 3-羟丙醛浓度关系曲线

2.1.3 3-HPA 积累

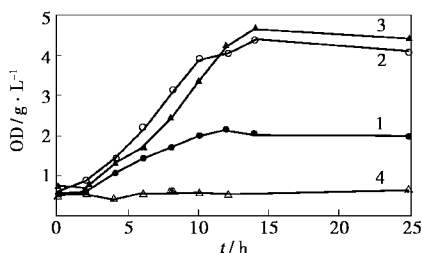
在不同起始甘油浓度条件下, *K. pneumoniae* 代谢甘油合成 PDO 过程发酵液中 3-HPA 含量变化如图 1(b) 所示。由图可见, 随着起始甘油浓度的增大, 发酵液中 3-HPA 积累量也越高, 当甘油浓度为 20、30、50、70 g/L 时, 3-HPA 积累的峰值分别为 4.31、6.87、11.48、13.49 mmol/L。在发酵前期 3-HPA 在积累到最高值后, 又能被菌体转化, 在 20 和 30 g/L 起始甘油条件下, 发酵液中 3-HPA 分别于 6、9 h 降至 0.72 mmol/L 和 0.81 mmol/L; 而 50、70 g/L 起始甘油条件下, 至发酵结束还维持在约 8 mmol/L

的较高浓度。

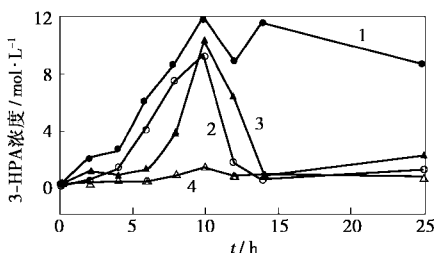
发酵液 3-HPA 来源于 *K. pneumoniae* 菌体内 GDHt 对甘油的脱水反应,是合成 PDO 的直接前体物质,同时具有很强细胞毒性。在厌氧条件下,菌体旺盛代谢甘油的过程中,若 3-HPA 未能及时被还原,则产生 3-HPA 的积累。在低起始甘油浓度条件下(低于 30 g/L),发酵液中积累的 3-HPA 量较低,并最终被菌体转化,因而发酵进行完全。而在起始甘油浓度较高条件下(高于 50 g/L),发酵液中积累的 3-HPA 的量较大,并且不能迅速被菌体转化,形成高浓度 3-HPA 在发酵液中长期的积累,对菌体代谢及生长产生伤害,导致发酵停滞。

2.2 不同 pH 值控制策略对 PDO 批式发酵过程的影响

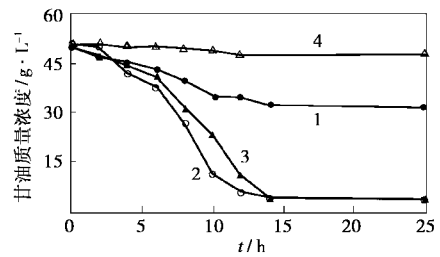
为了寻找降低 3-HPA 对发酵影响的策略,进行了起始甘油质量浓度为 50 g/L,不同 pH 值控制下 PDO 发酵实验,结果见图 2。由图 2 可知,pH 值 7.75~8.0 是 *K. pneumoniae* 较优的生长 pH 值,菌体持续生长 14 h,最高菌体质量浓度达 1.84~1.95 g/L,为 pH 值 6.0 条件下最高菌体浓度的 2.24~2.38 倍。而在 pH 值为 8.5 的条件下,菌浓密度在发酵过程几乎不变,说明 *K. pneumoniae* 在此 pH 值条件下不能正常生长。在 pH 值 6.0 条件下,甘油消耗及 PDO 合成的趋势与 pH 值 7.0 相似,甘油消耗 17.2 g/L 后基本停止,产 PDO 仅 7.57 g/L;在 pH 值 7.75、8.0 条件下,50 g/L 的甘油在 14 h 基本消耗完全,分别产 PDO 23.67 g/L 和 21.90 g/L;在 pH 值为 8.5 的条件下,至发酵结束,甘油仅消耗了 3.5 g/L,产出 PDO 2.9 g/L。



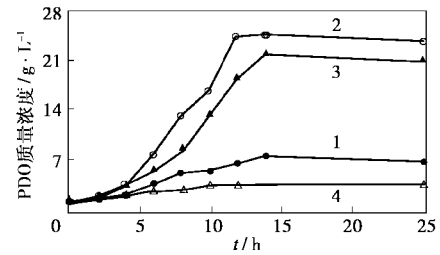
(a)



(b)



(c)



(d)

pH 值:1—6.0;2—7.75;3—8.0;4—8.5

图 2 不同 pH 值下 PDO 发酵过程菌浓密度、甘油、1,3-丙二醇及 3-羟丙醛浓度曲线

在 pH 值 6.0 条件下,发酵液中 3-HPA 积累在 10 h 达到 12.08 mmol/L 的高峰,经 12 h 小幅下降后在 14 h 重新上升至 11.55 mmol/L 的高浓度。在 pH 值为 7.75、8.0 条件下,发酵液中 3-HPA 在 10 h 达到积累高峰(9.33~10.23 mmol/L)后被迅速转化,并于 14 h 降至较低水平(0.42~0.74 mmol/L)。在 pH 值 8.5 条件下,由于菌体基本没有生长,甘油利用很少,发酵液中 3-HPA 积累很低。因此控制 pH 值在 7.75~8.0 有利于菌体迅速转化发酵液积累的 3-HPA,从而降低 3-HPA 引起的毒害作用,使菌体能够继续生长,甘油可以继续被消耗利用。

2.3 流加发酵过程对 3-HPA 积累的控制

上述实验说明,较低的起始甘油浓度或控制适当的 pH 值有利于降低发酵液中 3-HPA 积累,从而降低对细胞生长及 PDO 发酵的影响,笔者于是采用起始甘油质量浓度 30 g/L 的流加补料发酵并在发酵过程中控制 pH 值在 7.75,结果如图 3 所示。当发酵进行至 8 h,甘油质量浓度降至 5.96 g/L,开始流加甘油并使之质量浓度在 24 h 上升到 42.23 g/L。在发酵前期(8 h 以前),发酵液中 3-HPA 的积累量为 4.18 mmol/L,但在 12 h 迅速降至 0.63 mmol/L,尽管在发酵中后期将甘油质量浓度升至 40 g/L,发酵液中 3-HPA 不再明显积累。发酵 32 h PDO 产量 37.16 g/L,生产强度 1.16 g/(L·h),PDO 对甘油的得率为 52.66% (g/g)。

(下转第 51 页)

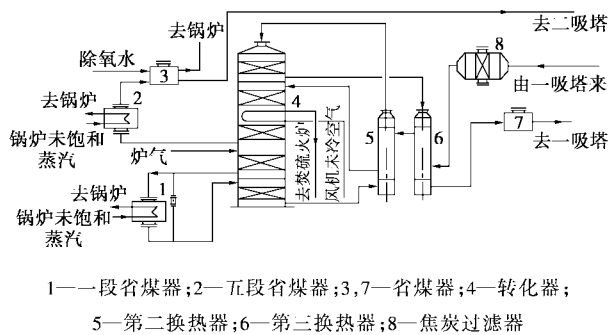


图1 转化工序流程图

KS102、KS108 型钒催化剂,装填系数为 331 L/(t·d)。转化各段催化剂装填情况见表 1。

表 1 转化各段催化剂装填情况

转化段	型号	装填高度/mm	装填量/m ³	装填比例/%
一	KS108	686	10.29	19.0
	KS102		12.36	
二	KS102	730	24.08	20.2
三	KS102	770	25.39	21.3
四	KS102	730	24.08	20.2
五	KS108	697	23.00	19.3

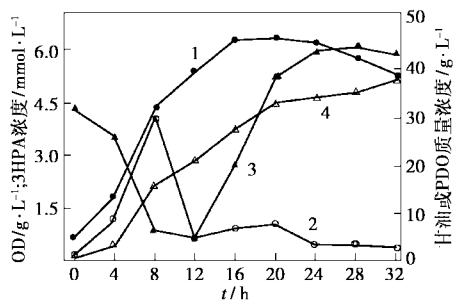
转化一段出口直径为 1 300 mm,材质为不锈钢,一段出口气体经对流管束省煤器将热量传给锅炉,转化率为 58.00% ~ 62.00%;二段出口气体进入第二换热器管程,将热量传给二次转化的 SO₂ 侧炉气,转化率可达 85.00%;三段出口气体经第三换热器管程,再经热管省煤器将气体温度降到 180℃ 后送往一吸塔,转化率可达 93.00%;四段和五段之间设转化器,内置换热器(不锈钢材质),预热干燥空气用于焚硫,转化率可达 99.30%;五段出口气体经对流管束省煤器和热管省煤器后,温度降至 160℃,送往二吸塔,最终转化率可达 99.87%。

该工艺有以下主要特点:

(1) 采用高气体浓度 [转化入口 $w(\text{SO}_2) = 10.5\% \sim 11.5\%$]、高气流速度操作。

(2) 热能得到充分回收。该装置解决了国内硫磺制酸装置热能回收率低的问题,提高了热回收效率,每吨酸 [$w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 100\%$] 的产汽量在 1.30 ~ 1.42 t,已经接近或达到国外同类装置的利用高、中温热能产汽量。系统热能利用方案如下:焚硫炉出口设中压锅炉回收高温位废热,一段出口设置对流管束省煤器;二段和三段间设置换热器;三段出口设

(上接第 49 页)



1—OD;2—3-羟丙醛;3—甘油;4—1,3-丙二醇

图3 流加发酵过程菌体浓度、甘油、1,3-丙二醇及 3-羟基丙醛浓度曲线

3 结语

利用 *K. pneumoniae* 发酵产 PDO 过程中会产生不同程度的 3-HPA 积累,作为 PDO 合成的直接前体,积累于发酵液的 3-HPA 又可以被菌体转化,若积累的 3-HPA 不能被及时转化,则会对菌体造成不可逆的伤害,使菌体生长停滞、底物消耗终止、发酵不能继续进行。pH 值控制在 7.0,较低起始甘油浓度(20、30 g/L)条件下,3-HPA 积累不高于 7 mmol/L,并迅速被重新利用,对菌体产生的伤害不大,发酵可

以顺利完成;但在起始甘油浓度较高的条件下,3-HPA 积累高于 11 mmol/L,并在发酵过程中维持较高水平,对菌体产生毒害,导致发酵终止。控制发酵 pH 值为 7.75 ~ 8.0 可促进发酵液中积累的 3-羟丙醛的转化,使之被迅速降至较低水平,避免了 3-羟丙醛对菌体产生毒害,使发酵能进行完全。在流加发酵采用较低起始甘油浓度,控制发酵 pH 值为 7.75 的策略有利于降低 3-羟丙醛积累,促进 PDO 的合成。

参考文献

- [1] Biehl H, Menzel K, Zeng A P, et al. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 289 - 297.
- [2] Forage R G, Lin E C C. [J]. Journal of Bacteriology, 1982, 151: 591 - 599.
- [3] Barbirato F, Grivet J P, Soucaille P, et al. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 1448 - 1451.
- [4] Wang W, Sun J, Hartlep M, et al. [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 83: 525 - 536.
- [5] Vollenweider S, Lacroix C. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 16 - 27.
- [6] Cheng K K, Liu D H, Sun Y, et al. [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 911 - 915.
- [7] Slininger P J, Bothast R J. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50: 1444 - 1450. ■