

克雷伯杆菌有氧发酵利用甘油生产 3-羟基丙醛的研究

陈宏文^{1,2} 洪其文² 徐 晶² 方柏山² 胡宗定¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 华侨大学生物工程与技术系, 福建 泉州 362011)

摘要: 克雷伯杆菌在含有盐酸氨基脒和甘油的磷酸盐缓冲液培养基中有氧发酵, 可实现 3-羟基丙醛(3-HPA)的转化。考察了影响 3-HPA 积累和稳定性的一些主要因素, 如菌种培养时间、接种量、甘油浓度、盐酸氨基脒、培养温度和 pH 值。优化后的培养条件为: 菌种培养时间 24 h、接种量 2.16 g/L、甘油 30 g/L、盐酸氨基脒 26.8 g/L、28℃ 和 pH 值 7.2。在优化条件下培养 27 h, 发酵液中 3-HPA 质量浓度达到 15.48 g/L, 总得率和转化率分别为 0.60 g/g 和 75%。3-HPA 低温条件下比较稳定, pH 值对其稳定性影响不大。

关键词: 3-羟基丙醛; 甘油; 发酵

中图分类号: TQ224.26; TQ923

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)11-0036-04

Aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde by *Klebsiella Pneumoniae*

CHEN Hong-wen^{1,2}, HONG Qi-wen², XU Jing², FANG Bai-shan², HU Zong-ding¹

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Department of Bioengineering & Biotechnology, Hua Qiao University, Quanzhou 362011, China)

Abstract: When *Klebsiella Pneumoniae* DSM 2026 were grown aerobically on a rich glycerol medium and then suspended in buffer supplemented semicarbazide and glycerol, aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) could be carried out. Several factors that may influence 3-HPA accumulation and the stability of 3-HPA were studied. The 3-HPA accumulation is greatly affected by cell age, biomass, glycerol concentration, semicarbazide hydrochloride concentration, temperature as well as pH value. The optimal conditions are obtained as follows: 12 h of cell age, 2.16 g/L of inoculum, 30 g/L of glycerol, 26.8 g/L of semicarbazide hydrochloride, at 28℃ and 7.2 of pH value. When the strain grew in the medium under the optimal conditions for 27 h, 15.48 g/L of 3-HPA could be produced at an overall yield of 0.60 g/g, representing a 75% conversion rate. In general, 3-HPA is stable under cool temperature with a large range of 6-11 of pH value.

Key words: 3-hydroxypropionaldehyde; glycerol; fermentation

3-羟基丙醛(3-HPA)是一种有效的抗菌剂,也是丙烯酸、丙烯醛、1,3-丙二醇等许多有机化合物的前体^[1-3]。目前工业上主要通过环氧乙烷羰基合成^[4]或丙烯醛水合法^[5]生产 3-HPA,但是 3-HPA 稳定性差,合成后作为中间体随即参与下一步反应,因此迄今为止还没有纯 3-HPA 的商品。由于化学合成法生产 3-HPA 所用的催化剂体系复杂,制作工艺苛刻且不稳定,有些配位体有剧毒,合成工艺需高压,回收率不高,加之最初原料都来自石油,所以研究以可再生资源为原料、污染程度低的生物技术法生产 3-HPA 引起高度重视^[6-8],目前发现的能将甘油转化为 3-HPA 的微生物主要包括克雷伯杆菌、柠

檬菌、肠细菌及梭状芽孢杆菌属等,而 3-HPA 是细菌甘油代谢的中间产物,必须通过代谢调控手段使其胞外积累。目前国内尚未见生物转化法生产 3-HPA 的报道,笔者主要以克雷伯杆菌为研究对象,利用盐酸氨基脒,对有氧条件下转化 3-HPA 的发酵条件进行优化并对其动力学以及稳定性进行初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026),来自德国生物技术中心。

收稿日期: 2004-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(20276026)和福建省自然科学基金重点项目(D0120002)基金资助

作者简介: 陈宏文(1969-),女,博士生,讲师,主要从事生物工程、酶工作研究;方柏山(1957-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物化学工程、基因工程研究,通讯联系人,0595-2691560, fangbs@hqu.edu.cn。

1.2 试剂和仪器

盐酸氨基脲,上海新中化学科技有限公司;丙烯醛,天津化学试剂研究所;其他试剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司。高速冷冻离心机 3K30,德国 Sigma;HYG-II 旋转式恒温摇床柜,上海新蕊自动化设备有限公司;VIS-7220 型分光光度计,北京瑞利分析仪器公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸膏 5.0, NaCl 10.0, pH 值 7.0。

种子培养基(g/L):甘油 20.0, K_2HPO_4 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 酵母浸膏 1.0, $CaCO_3$ 2.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0×10^{-3} , $CaCl_2$ 2.0×10^{-3} , 微量元素 2.0 mL/L。

微量元素溶液组分(g/L): $ZnCl_2$ 0.07, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1, H_3BO_3 0.06, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.035。

发酵培养基:在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液中加入一定量的盐酸氨基脲和甘油,用新制的 10 mol/L KOH 调节不同的 pH 值。

1.4 培养方法

50 mL 种子培养基置于 250 mL 三角瓶,接入 1 mL 经过活化、保存于 LB 培养基的菌液,37℃、120 r/min 旋转式摇床培养 24 h,得到种子液。将 5 mL 种子液再接入装有 250 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,有氧条件下 120 r/min、37℃ 摇床培养一定时间(即种子扩培)。种子扩培液于 8 000 r/min、1℃ 下离心 30 min,去上清液取菌体待用。将一定量菌体悬浮于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,根据实验方案改变培养基及培养条件进行发酵条件实验。

1.5 分析方法

3-HPA 含量采用比色法测定。酸性条件下,3-HPA 脱水生成丙烯醛,丙烯醛与色氨酸试剂反应形成紫色复合物,该复合物 560 nm 有最大吸收峰。由于 3-HPA 没有纯品,丙烯醛替代作为标准品,因为 1 mol 3-HPA 脱水形成 1 mol 丙烯醛。 D, L -色氨酸 2.05 g、浓盐酸 4.17 mL 和甲苯 2.5 mL 定容至 1 L 蒸馏水中,即为色氨酸试剂。在大试管中,3 mL 适当稀释的样品与 6 mL 浓盐酸、1.5 mL 色氨酸试剂混匀,40℃ 水浴恒温 20 min,560 nm 测定 OD 值。

甘油含量的测定采用改进的高碘酸钠氧化法^[9]。

生物量采用细胞干重法测定,将菌悬液进行系

列稀释($OD_{620\text{ nm}}$ 值为 0.05 ~ 0.50),在烘箱中 105℃ 烘至恒重,称重。以菌体干重对光吸收作标准曲线。适当稀释的菌悬液样品 620 nm 测吸光值,利用标准曲线转化为细胞干重浓度。

3-HPA 总得率指每消耗 1 g 甘油所产生的 3-HPA 的质量,理论值为 0.8 g/g,故总产率(百分数)为总得率/0.8。

2 结果和讨论

2.1 种子扩培时间对 3-HPA 发酵的影响

将 5 mL 种子液接入装有 250 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,有氧条件下 120 r/min、37℃ 摇床分别培养 12、24、48 h,每一批细胞接种量为 6.45 g/L(指细胞的干质量,下同),发酵培养基含有甘油 30 g/L、盐酸氨基脲 26.8 g/L, pH 值 7.2, 28℃, 150 r/min 的摇床中培养 24 h,实验结果见表 1,可知,种子扩培时间对 3-HPA 发酵影响较大,扩培时间为 12 h 时,获得的 3-HPA 最多。

表 1 种子扩培时间对克雷伯杆菌 3-HPA 代谢的影响

种子扩培时间/h	3-HPA 质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$
12	7.36
24	4.53
48	4.52

2.2 接种量对 3-HPA 发酵的影响

将扩培 12 h 的种子分别按 2.16、4.23 和 6.45 g/L 的接种量接入发酵培养基中,其他条件同 2.1,实验结果见表 2。由表 2 可知,接种量为 2.16 g/L 时,3-HPA 的含量和总得率较高,分别为 12.81 g/L、0.5 g/g。随着接种量的增加,3-HPA 的含量和总得率下降,而残留的甘油量差别不大,说明接种量过高,底物用于细胞维持和生长的比例可能增加,导致 3-HPA 的产量和得率偏低。因此选择 2.16 g/L 的接种量较为合适。

表 2 接种量对克雷伯杆菌 3-HPA 发酵的影响

接种量/ $g \cdot L^{-1}$	3-HPA 质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	剩余甘油质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	3-HPA 得率/ $g \cdot g^{-1}$
2.16	12.81	4.37	0.50
4.23	7.42	4.14	0.27
6.45	7.36	4.93	0.29

2.3 初始甘油浓度对 3-HPA 发酵的影响

种子扩培 12 h,接种量 2.16 g/L,分别接入含有 15、30、50 g/L 甘油的发酵培养基中,其余条件同上,

按时取样,测定发酵液中甘油、3-HPA 的浓度,发酵终点以 3-HPA 达到峰值为准,实验结果见表 3。权衡之后,初始甘油浓度为 30 g/L 较为合适,3-HPA 浓度和发酵周期都较适中。

表 3 初始甘油浓度对克雷伯杆菌 3-HPA 发酵的影响

甘油初始 质量浓度/ g·L ⁻¹	发酵 时间/h	3-HPA 质量 浓度峰值/ g·L ⁻¹	总得率/ g·g ⁻¹	甘油消 耗率/%	转化率/ %
15	24	9.82	0.65	100	81
30	27	15.48	0.60	87	75
50	36	11.93	0.46	48	58

2.4 盐酸氨基脲的含量对 3-HPA 发酵的影响

种子扩培 12 h,接种量 2.16 g/L,分别接入含有 0~40.20 g/L 盐酸氨基脲的发酵培养基中,其他条件同上,结果见表 4。从表 4 中可看出,培养基中没有盐酸氨基脲时,克雷伯杆菌无法积累中间代谢物 3-HPA,其主要用于 1,3-丙二醇的转化^[7],说明盐酸氨基脲是诱导 3-HPA 胞外积累的关键因素。而当盐酸氨基脲的质量浓度达到 40.20 g/L 时,3-HPA 的浓度和转化率出现下降,过高的盐酸氨基脲浓度有损于细胞的活力,不利于 3-HPA 的积累。因此确定盐酸氨基脲的质量浓度为 26.8 g/L。

表 4 盐酸氨基脲含量对克雷伯杆菌 3-HPA 发酵的影响

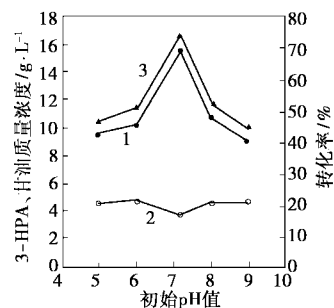
盐酸氨基脲质量 浓度/g·L ⁻¹	3-HPA 质量浓度 峰值/g·L ⁻¹	总得率/ g·g ⁻¹	甘油消 耗率/%	转化率/ %
0	0	0	95	0
3.35	1.68	0.06	89	8
13.40	7.26	0.27	89	34
26.80	15.48	0.60	87	75
40.20	10.10	0.47	72	59

盐酸氨基脲诱导 3-HPA 积累的原因目前还不清楚,从代谢途径分析,盐酸氨基脲可能提高了甘油脱水酶的活力,降低了 1,3-丙二醇氧化还原酶的活力,导致 NAD⁺(辅酶 I)的再生出现障碍,使得依赖 NAD⁺的甘油脱氢酶活力也下降,因此盐酸氨基脲可能通过阻止二羟基丙酮和 1,3-丙二醇的生产,促使 3-HPA 过量积累。

2.5 初始 pH 值和温度对 3-HPA 发酵的影响

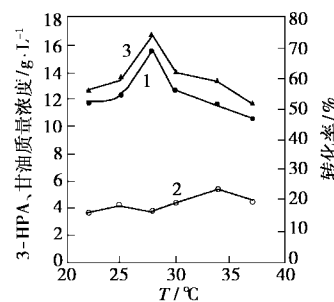
种子扩培 12 h,接种量 2.16 g/L,发酵液中盐酸氨基脲、甘油质量浓度分别为 26.8、30.0 g/L,在不同 pH 值和温度条件下培养。从图 1 可看出,pH 值 7.2 下,3-HPA 的浓度和转化率达到最高,酸性和碱

性环境下,3-HPA 的浓度和转化率偏低。从图 2 可知,3-HPA 的生产对温度也比较敏感,28℃为最适宜的温度。



1—3-HPA;2—甘油;3—转化率

图 1 初始 pH 值对生产 3-HPA 的影响

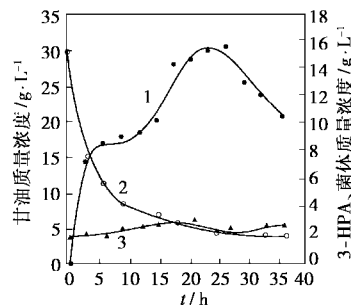


1—3-HPA;2—甘油;3—转化率

图 2 温度对生产 3-HPA 的影响

2.6 3-HPA 发酵过程的代谢曲线

通过上述实验得到 3-HPA 发酵的优化条件为:种子扩培 12 h,接种量 2.16 g/L,发酵液中盐酸氨基脲、甘油质量浓度分别为 26.8、30.0 g/L,pH 值 7.2,温度 28℃。在该优化条件下,3-HPA 的发酵过程如图 3 所示。



1—3-HPA;2—甘油;3—转化率

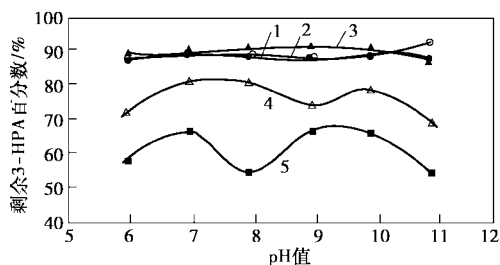
图 3 发酵过程 3-HPA、甘油和菌体浓度的变化

在整个培养过程中,细胞浓度变化不大,这主要是由于接种量较大(2.16 g/L),将经过充分生长处于对数生长期末期的细胞以较大的接种量接入组成简单的发酵培养基中,目的是在细胞催化甘油的过

程中,使甘油尽可能用于3-HPA的转化,而不是用于细胞的生长繁殖。此外成分简单的发酵培养基也有利于3-HPA的分离提取。最终得到3-HPA的转化率为75%,生产能力为0.57g/(L·h)。

2.7 3-HPA 稳定性考察

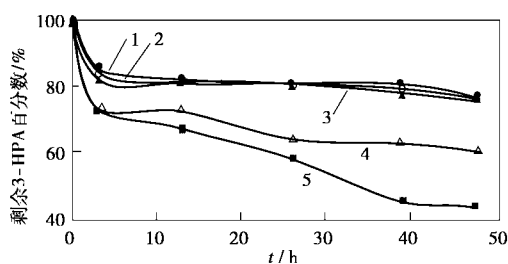
3-HPA性质活泼,易与巯基、羧基、氨基等发生反应,笔者对所获得的3-HPA的稳定性做了初步考察。发酵液8000 r/min、1℃下离心30 min,得到无细胞3-HPA上清液,在不同pH值、不同温度条件下保存48 h,以初始3-HPA浓度为基准,实验结果如图4所示。



温度/℃: 1—20; 2—4; 3—25; 4—45; 5—60

图4 3-HPA的pH值稳定性

从图4中可看出,在-20、4、25℃条件下,不同pH值(6~11)对3-HPA的稳定性影响不大,温度达到45、60℃时,3-HPA的pH值稳定性发生波动,与较低温度条件相比,3-HPA残存率下降较大。



温度/℃: 1—20; 2—4; 3—25; 4—45; 5—60

图5 3-HPA的热稳定性

图5是对3-HPA热稳定性的考察结果,实验结果说明在较低温度下(-20、4、25℃)保存48 h,3-HPA的残存率在80%以上,稳定性较高,而高温条

件下(45、60℃),残存率明显下降,不利于3-HPA的保存。在-20℃条件下,3-HPA可保存3个月以上。Sabine等^[10]研究发现溶液中3-HPA以水合HPA、二聚体HPA和单体HPA 3种形式存在(即HPA系统),且3种形式的分布与3-HPA浓度有关,他们通过传统的色谱纯化方法得到的3-HPA在4℃下也可保存到6个月以上。

3 结语

克雷伯杆菌在含有盐酸氨基脲和甘油的磷酸盐缓冲液培养基中有氧发酵,可实现中间代谢物3-HPA的胞外积累。实验结果表明,种子扩培时间、接种量、盐酸氨基脲和甘油浓度以及培养温度、初始pH值对3-HPA的积累影响很大。通过对发酵条件优化,发酵液中3-HPA质量浓度最高达到15.48 g/L,总得率和转化率分别为0.60 g/g和75%。盐酸氨基脲改变甘油代谢途径促使3-HPA过量积累的作用机制以及3-HPA的分离纯化、组成鉴定尚需进一步研究。

参考文献

- [1] El-Ziney M G, Van-den-Tempel T, Debevere J, *et al.* [J]. *J Food Prot*, 1999, 62: 257 - 261.
- [2] Chen C C, Chen J Y, Lee S R. [J]. *J Chin Agric Chem Soc*, 1999, 37: 117 - 125.
- [3] Witt U, Muller R J, Augusta J, *et al.* [J]. *Macromol Chem Phys*, 1994, 195: 793 - 802.
- [4] Hoechst Celanese Corporation. Process for making 1,3-diols from epoxides [P]. US 4935554, 1990 - 06 - 19.
- [5] 徐泽辉,郭世卓,王佩琳. [J]. *石油炼制与化工*, 2001, 32(12): 21 - 24.
- [6] Sobolov M, Smiley K L. [J]. *J Bacteriol*, 1960, 191: 365 - 376.
- [7] Ahrens K, Menzel K, Zeng A P, *et al.* [J]. *Biotech Bioeng*, 1998, 59(5): 544 - 552.
- [8] Slininger P J, Bothast R J, Smiley K L. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46: 62 - 67.
- [9] 王剑锋,修志龙,范圣第. [J]. *工业微生物*, 2001, 31(2): 33 - 35.
- [10] Vollenweider S, Grassi G, Konig I, *et al.* [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 3287 - 3293. ■

热烈庆祝 2004(第七届)中国国际化工
展览会隆重召开!