

微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展*

修 志 龙

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

关键词: 1,3-丙二醇, 甘油歧化, 代谢分析, 动力学

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)04-0300-03

1,3-丙二醇和其他二醇(如乙二醇、1,2-丙二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇)都是重要的化工原料,主要用作聚酯和聚氨酯的单体以及溶剂、抗冻剂或保护剂等。1,3-丙二醇(1,3-PD)与对苯二甲酸合成的聚三甲基对苯二甲酸酯较之乙二醇与对苯二甲酸形成的聚酯具有许多更优良的特性,数家世界上著名的跨国化工公司,如美国的杜邦(DuPont)公司、荷兰的壳牌(Shell)公司和德国的 Degussa 公司等,都对 1,3-PD 的生产和应用予以高度重视。

目前 1,3-PD 的生产方法主要是化学合成法,如壳牌公司以乙烯为原料,在高温(280℃)下用银作催化剂氧化成环氧乙烷,然后加氢和一氧化碳转化为 3-羟基丙醛,最后氢化成产品 1,3-PD; Degussa 公司则以丙烯为原料,在 350℃、0.2MPa 下以钼作催化剂氧化为丙烯醛,再水化为 3-羟基丙醛,然后氢化成 1,3-PD。这两种方法都需要在高温和贵重催化剂作用下进行,产品除 1,3-PD 外还有 1,2-丙二醇及其二聚体、三聚体等性质相近的副产物,致使产品分离纯化较困难,生产成本相应较高。为了寻求新的生产方式,美国的杜邦公司和世界第二大工业酶生产商 Genencor 国际有限公司合作研究开发以葡萄糖作底物用基因工程菌生产 1,3-PD 的技术,而欧共体国家(如德国、法国、丹麦等)则积极开展用肠道细菌和梭状芽孢杆菌将甘油转化为 1,3-PD 和 2,3-丁二醇的研究工作,并已取得了许多可喜的成果。本文将着重介绍甘油生物转化为 1,3-PD 的研究情况。

1 甘油歧化的菌种及其代谢途径

能将甘油转化为 1,3-PD 的微生物主要是几种细菌^[1],包括克雷白杆菌属(*Klebsiella*)、柠檬菌(*Citrobacter*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)等,其中肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)和丁酸梭状芽孢杆菌

(*Clostridium butyricum*)具有较高的转化率和 1,3-PD 生产能力,因而受到更多的关注。

在微生物转化甘油的过程中,甘油既作为微生物生长的底物,又是主要产物 1,3-PD 的反应物,同时生成乙酸、2,3-丁二醇、乙醇或丁酸等副产品,其中乙酸和乙醇是主要的副产物,而 2,3-丁二醇、乳酸和琥珀酸通常情况下生成量较少(总量小于 5%)。甘油歧化过程实质上存在两条途径^[2]:一是生成生物能 ATP 和还原当量 NAD / NADH₂ 的乙酸 / 乙醇途径,伴随着微生物细胞的生长;二是产物 1,3-PD 的形成途径,消耗另一条途径上生成的过量的还原型辅酶 I(NADH₂)。

甘油转化为 1,3-PD 的产率与丙酮酸代谢和还原当量平衡的调节有密切的关系。对肺炎杆菌厌氧发酵的代谢途径分析表明^[2],如果按照传统的观点假定在厌氧条件下丙酮酸由丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)催化转化为乙酰 CoA 的话,那么甘油转化为 1,3-PD 的最大理论产率($Y_{PD/S}$)为 65%(mol / mol)。但是实验结果显示在许多情况,尤其是在甘油过量的情况下, $Y_{PD/S}$ 值大于 65%。这说明上述有关丙酮酸代谢的假设是错误的,在厌氧条件下丙酮酸脱氢酶系(PDH)很有可能依然存在。Menzel^[3]通过实验检测到这个酶系的存在,并且发现在甘油过量情况下 PDH 发挥着重要作用,这样 $Y_{PD/S}$ 的最大理论值为 72%。

2 动力学和动态行为的研究

肺炎杆菌(*K. pneumoniae*)和丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)在以甘油为底物的间歇和连续发酵过

* 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 29806002)
Project of Chinese National Natural Science Fund for
young Researchers (No. 29806002)

收稿日期: 1999-02-22, 修回日期: 1999-06-10

程中,细胞的生长受到底物和多种产物的抑制作用^[4]。在 37℃、pH7.0 的培养条件下,最大比生长速率为 0.67h^{-1} , Monod 饱和常数为 0.28mmol/L 。甘油、1,3-PD、乙酸和乙醇的临界浓度分别为 2039mmol/L 、 939.5mmol/L 、 1026mmol/L 和 360.9mmol/L ^[5]。比较这些值可以看出,乙醇对细胞生长的抑制作用较强,毒性较大。

甘油既是细胞生长的底物,又是潜在的抑制剂。在甘油过剩的情况下,其比消耗速率随生物反应器中甘油的残余浓度呈 S 型饱和曲线状变化,类似的情况还有产物 1,3-PD、乙酸和生物能 ATP 的比生成速率。针对这些现象,Zeng 等人^[6,7]提出了过量动力学模型,并通过理论分析发现过量项的存在容易导致系统出现多态和滞后现象,使系统趋于不稳定状态^[8]。

肺炎杆菌转化甘油的动态研究表明^[9],当底物浓度、pH 或稀释速率发生大的扰动时,系统将出现滞后式振荡现象,导致生物量、比生长速率、乙醇、甲酸以及尾气中的 CO_2 和 H_2 含量等参数随时间有规律地涨落。振荡的幅度和周期与底物的残余浓度、稀释率和 pH 等操作条件有关。代谢速率和代谢途径的分析显示^[10],振荡现象的形成与丙酮酸代谢有密切的关系,这可能是参与丙酮酸代谢的两种酶—PFL 和 PDH—未能同步协调以及还原当量($\text{NAD} / \text{NADH}_2$)平衡失调的结果。

3 发酵过程开发与优化

3.1 菌种的筛选与改进 甘油生物转化的菌种主要是肠道细菌和梭状芽孢杆菌属。从工业应用的安全性角度考虑,梭状芽孢杆菌比肠道细菌更合适,但从甘油和 1,3-PD 的忍受程度及生产强度两方面看,丁酸梭状芽孢杆菌较肺炎杆菌略逊一筹,针对上述缺陷近几年做了大量改进工作。另一方面通过代谢流量、胞内酶和中间产物浓度的分析发现,在丁酸梭状芽孢杆菌中甘油脱水酶(GDHt)是限制步骤^[11],在肺炎杆菌中 GDHt 和丙酮酸激酶(PK)则是两个关键的酶^[12],在肠道菌 *Enterobacter agglomerans* 中积累的 3-羟基丙醛对甘油脱氢酶(GDH)具有强烈的抑制作用。借助基因工程的手段提高甘油代谢途径上的限制酶的表达水平是菌种改良的研究方向。

在甘油代谢途径中 GDHt、PDOR 和 GDH 三种酶是在一个被称为 dha 调节子的基因上,通过还原当量平衡调节的。基因工程菌就是将 dha 调节子克隆表达到大

肠杆菌 *E. coli* 中而构建的,从而实现了由葡萄糖生产 1,3-PD 的目的。进一步提高 1,3-PD 的产率仍然是改进基因工程菌的首要任务。

3.2 培养基与培养条件的优化 在甘油发酵的培养基中 Fe^{2+} 和生物素 B_{12} 被认为是重要的组分,二者对细胞内一些酶的活性起着重要的作用^[13]。另外培养基中还含有多种无机盐,而不同的阳离子对脱氢酶的活性有截然相反的作用,因此培养基中盐的种类的选择应该考虑到对代谢途径上关键酶的影响效果,这应该成为培养基选择和优化的一个指导原则。多数情况下甘油发酵在 pH7.0、温度 37℃ 的条件下厌氧进行。葡萄糖作为辅助底物经常用来提高甘油的转化率,在这种情况下甘油醛-3-磷酸脱氢酶成为限制步骤。

3.3 发酵方式 间歇发酵可以得到较高的产物浓度,但生产强度较低;连续发酵有利于提高生产强度,但产物浓度相对较低;兼顾 1,3-PD 的含量和发酵强度选择流加批式发酵是比较适宜的。通常情况下采用流加甘油的方式进行流加间歇发酵,有时也同时流加氮源(如铵盐),发酵液 pH 降低或者尾气中 CO_2 含量变化可以作为流加的指示信号。

甘油发酵的一个显著特点是在底物过剩的条件下代谢向 1,3-PD 途径倾斜,因此流加间歇发酵往往保持甘油微量过剩,并且在发酵末期停止甘油供应,将过量的甘油消耗完全。这样一方面可以使甘油得到充分利用,另一方面也减轻了下游 1,3-PD 分离的负担。甘油发酵的另一个特点表现为甘油是细胞生长优先选择的碳源,尽管可以选用葡萄糖作为辅助底物,但是葡萄糖的消耗比甘油慢得多^[14]。也有人用固定化或回流细胞的方式进行过研究,结果大大提高了生产强度,但 1,3-PD 的浓度仍然较低^[15]。

3.4 下游分离过程 相对于化学合成法来讲,微生物发酵法的下游分离纯化要简单得多。发酵液中只包含产物 1,3-PD 和挥发性的副产物,如乙醇、乙酸等,没有难以分离的 PD 异构体。添加絮凝剂和石灰可以有效地清除细胞并沉淀酸,蒸馏可以除去乙醇,真空精馏是获取最终产品 1,3-PD 的简单又高效的方法。另外实验研究表明微孔错流过滤、萃取和吸附等技术在固液分离及 1,3-PD 的回收方面都是可行的^[1]。

4 结论和展望

微生物法生产 1,3-丙二醇跟化学合成法相比具有

选择性好、转化率高、产物分离简单、无环境污染问题、可利用再生资源等优点,是一种技术上可行、经济上有竞争力的生产方法。近年来的理论和实验研究不断加深了对甘油生物转化过程的代谢途径、动力学特征和动态行为的认识,甘油为唯一碳源的最大的理论转化率为 72%,辅助底物可以将甘油的转化率提高到 100%,发酵液中 1,3-丙二醇的最终浓度可以达到 65~70 g/L。但是甘油生物转化过程仍然有些问题需要进一步研究,例如在保持较高转化率的前提下如何提高产物的浓度和生产强度,如何优化甘油或辅助底物代谢释放出的还原当量分布,并降低毒性副产物的形成,同时提高 1,3-丙二醇的产率和浓度,这些问题可以通过控制培养条件改变代谢途径等方式加以解决。另外基因工程菌的构建为从廉价碳源生产 1,3-丙二醇开辟了一条新路。微生物法生产 1,3-丙二醇有望成为生物技术在重要化工原料生产领域应用的新范例。

参 考 文 献

- [1] Deckwer W D. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16:143~149.
- [2] Zeng A P, Biebl H, Schlieker H, Deckwer W D. Enzyme Microb Technol, 1993, 15:770~779.
- [3] Menzel K, Zeng A P, Deckwer W D. J Biotechnol,

1997, 56:135~142.

- [4] Zeng A P, Rose A, Biebl H *et al.* Biotechnol Bioeng, 1994, 44:902~911.
- [5] Menzel K, Zeng A P, Deckwer W D. Enzyme Microbiol Technol, 1997, 20:82~86.
- [6] Zeng A P, Deckwer W D. Biotechnol Prog, 1995, 11:71~79.
- [7] Zeng A P. Biotechnol Bioeng, 1995, 46:314~324.
- [8] Xiu Z L, Zeng A P, Deckwer W D. Biotechnol Bioeng, 1998, 57:251~261.
- [9] Menzel K, Zeng A P, Biebl H *et al.* Biotechnol Bioeng, 1996, 52:549~560.
- [10] Zeng A P, Menzel K, Deckwer W D. Biotechnol Bioeng, 1996, 52:561~571.
- [11] Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E *et al.* Letters in Applied Microbiology, 1996, 22:311~314.
- [12] Ahrens K, Menzel K, Zeng A P *et al.* Biotechnol Bioeng, 1998, 59(5):544~552.
- [13] Reimann A. Dissertation, TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1997.
- [14] Biebl H, Martens S. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44:15~19.
- [15] Zeng A P, Biebl H, Deckwer W D. Fuels and Chemicals from Biomass (Edited by Saha B C and Woodward J), American Chemical Society, 1997, 265~279.