

研究报告

1, 3-丙二醇发酵过程中盐浓度的胁迫作用

徐佳杰, 刘朋波, 陶春平, 程骋, 付水林, 官衡

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 通过对克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)甘油发酵生产 1, 3-丙二醇(1, 3-PD)过程的研究发现, 盐浓度对 1, 3-PD 发酵有胁迫作用。盐浓度较低时, 菌体生长和产物生成均维持较高速率; 盐浓度较高时会导致菌体生长减慢, 1, 3-PD 最终浓度, 甘油到 1, 3-丙二醇的转化率降低, 同时 1, 3-丙二醇氧化还原酶受到抑制。在 5 m³ 罐中控制合适的盐浓度可以提高 1, 3-PD 的发酵水平, 使 1, 3-PD 的最终浓度达到 64 g/L, 转化率 61%, 生产强度 2.1 g/(L·h)。

关键词: 盐浓度, 中试实验, 发酵条件, 氧化还原电位

1, 3-Propanediol Production Under Salt Stress

Jiajie Xu, Pengbo Liu, Chunping Tao, Cheng Cheng, Shuilin Fu, and Heng Gong

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Through studying the process of glycerol fermentation to 1, 3-propanediol(1, 3-PD) by *Klebsiella pneumoniae*, it was found that the cell growth and product (or by-product) production were under salt stress. Cell growth and product formation kept high rate at low salt concentration. High salt concentration led to low growth of cells, final concentration of 1, 3-PD and conversion from glycerol to 1, 3-PD, and, 1, 3-propanediol oxidoreductase activity decreased. When the salt concentration in 5 m³ bioreactor was controlled under appropriate manner, the concentration of 1, 3-PD production was markedly enhanced. The final 1, 3-PD concentration, the conversion of glycerol to 1, 3-PD and productivity were 64 g/L, 61% and 2.1 g/(L·h).

Keywords: salt concentration, middle industrial scale, fermentation conditions, oxidation reduction potential

1, 3-丙二醇(1, 3-propanediol, 简称 1, 3-PD)是一种重要的化工原料, 可用作溶剂、防冻剂或保护剂、精细化工原料以及新型聚酯——聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)和聚氨酯的单体。PTT 已被证明是一种性能优异的新型聚酯材料。现有的 1, 3-PD 生产法为化学合成法和生物合成法。目前国际上 1, 3-PD 的合成主要是通过化学法进行的。但是相对于化学合成法而言, 生物法合成 1, 3-PD 条件更温和、操作简单、副产物少、更绿色环保。随着 1, 3-PD 需求量的日趋扩大, 对于 1, 3-PD 的生物合成法的研究已越来越受

到国内外研究人员的重视。美国 DuPont 公司开发的由葡萄糖合成 1, 3-PD, 进而合成对 PTT 的工艺, 被授予 2003 年美国绿色化学奖^[1,2]。从目前的情况看来, 由于克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)在生产 1, 3-PD 的过程中底物转化率高, 产物浓度高、生产强度大, 菌种稳定而越来越引起各方的重视。

本实验室从 2003 年起开始研究以甘油为底物通过克雷伯氏菌发酵生产 1, 3-PD, 目前, 5 L 发酵罐已能稳定在产物 1, 3-PD 65 g/L 以上, 转化率 60%以上, 生产强度 2g/(L·h)^[3,4]。在此基础上本实验在 5 m³

Received: March 19, 2008; Accepted: April 11, 2008

Corresponding author: Heng Gong. Tel: +86-21-64253007; E-mail: gongheng@ecust.edu.cn

发酵罐水平上进行了中试实验。

在中试扩大过程中, 由于工厂调节 pH 所用碱为 5 mol/L(实验室中为 2 mol/L), 最终导致发酵液中盐浓度高出 1.5~2 倍, 使 1, 3-PD 产量为预期值的 60%左右。之后通过各种参数的关联分析后发现了这一问题, 并采用一定的技术手段, 将发酵液盐浓度控制在一定范围之内, 成功的解决了这一问题, 最终使 1, 3-PD 的生物合成法中试获得了成功。

本文主要探讨了盐浓度对菌体代谢速率、产物生成的影响, 并结合过程中关键酶活的变化以及氧化还原电位(oxidation reduction potential, 简称 ORP)变化进行了分析。

1 材料和方法

1.1 实验菌株和培养基

所采用菌种为 *K. pneumoniae* KG1, 为本实验室筛选。

种子培养基 (g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 7.0, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, KH_2PO_4 2.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, 酵母膏 7.0, 微量元素各 0.3 mL, pH 值 7.0。

发酵培养基(g/L): KCl 0.75, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.38, $(NH_4)_2SO_4$ 5.35, Na_2SO_4 0.28, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.26, 柠檬酸 0.42, 酵母粉 2.0, 微量元素各 0.3 mL, pH 值 7.0。

1.2 实验室 5 L 罐培养方法

种子培养条件: 采用厌氧培养, 250 mL 三角瓶, 装液量 50 mL, 培养温度 37°C, 摇床转速 200 r/min, 培养 24 h。

发酵罐培养: 采用 FMG-5L 全自动发酵罐(上海国强生化工程有限公司国家生化工程技术研究中心(上海)监制), 装液量为 2L, 接种量 5%, 发酵温度为 37°C, 用 2 mol/L NaOH 溶液控制 pH 值, 中间补加甘油, 发酵 30 h。

1.3 中试 5 m³ 罐发酵方法

一级种子培养条件: 采用厌氧培养, 培养温度 37°C, 摇床转速 200 r/min, 培养 24 h。

二级种子培养条件: 采用厌氧培养, 培养温度 37°C, 转速 40 r/min, 培养 24 h。

发酵罐培养: 采用 5 m³ 发酵罐(由镇江东方生物工程设备技术有限责任公司生产), 装液量为 3 m³, 接种量 5%, 发酵温度为 37°C, 用 5 mol/L NaOH 溶

液控制 pH 值, 中间补加甘油, 发酵 30 h。

1.4 菌体浓度以及 1, 3-PD 浓度测定方法

菌体浓度用每升发酵液中所含有菌体的干重来表示。菌体浓度通过测定 620 nm 下的光密度值来获得。

发酵液中的产物 1, 3-PD 采用 GC112A 型气相色谱(上海精密科学仪器有限公司)测定。色谱柱采用毛细管柱 ATSE-54(30 m × 0.53 mm × 1.0 μm), FID 检测器, N₂ 作为载气, 流速 15 mL/min, 柱温 120°C, 检测器温度 250°C, 进样量 0.15 μL。

1.5 酶活测定方法

1, 3-丙二醇氧化还原酶(1, 3-propanediol Oxidoreductase, 简称 PDOR)测定参见文献^[5], 酶活定义为: 每分钟还原 1 μmol 3-羟基丙醛的酶量为 1 个单位。酶的比活力为每 mg 蛋白所含酶单位数 (u/mg)。

1.6 盐浓度的测定方法:

盐浓度测定方法采用 DDS-11A 数显电导率仪(上海雷磁新泾仪器有限公司)测定。分别测定 0、20、40、60、80 g/L NaCl 溶液的电导率, 并用测量值做标准曲线。测定发酵液中电导率, 将电导率转换为标准 NaCl 浓度, 即为本文中所述的发酵液盐浓度。

2 结果与讨论

2.1 5 L 发酵罐发酵结果

5 L 发酵罐发酵已能稳定在产物 1, 3-PD 65 g/L 以上, 转化率 60%以上, 生产强度 2 g/(L · h)以上。发酵过程参数参见图 1。在发酵过程中菌体浓度在 14 h 达到最高, 之后菌体浓度缓慢下降, 最终维持稳定。与此相对应的, 氧化还原电位(oxidation reduction potential, 简称 ORP)与菌体浓度变化成反向关系。在 1, 3-PD 生成速率最快的, 氧化还原电位在发酵 4~18 h 一直低于-300 mV, 此时随着 1, 3-PD 生成速率的下降, 在发酵最后 12 h, ORP 缓慢上升, 最后稳定在-160 mV。

从 5 L 发酵罐的发酵结果中可以发现, 当 ORP 低于-300 mV 时, 1, 3-PD 快速生成。

图 2 是 5 L 发酵罐发酵过程中菌体的比生长速率、产物生成的比生成速率和发酵液盐浓度的关系, 可以从图中直观的看到, 随着发酵过程的继续, 作为调节 pH 的 NaOH 不断补入, 盐浓度逐渐上升, 而

与之相对应的是菌体的比生长速率、产物的比生长速率不断地下降、当盐浓度高于 10 g/L 时, 随着盐浓度的上升, 比生长速率和比生成速率快速下降, 当盐浓度高于 17 g/L 之后, 比生长速率和比生成速率变化较缓慢, 并且维持在一个较低的水平。

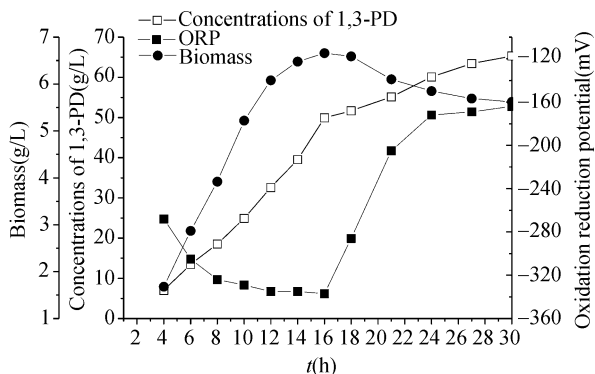


图 1 5L 发酵罐发酵过程中 1, 3-PD 浓度、ORP(氧化还原电位)和菌体浓度的变化趋势

Fig. 1 Time courses of ORP, concentration of 1, 3-PD and biomass in 5L bioreactor

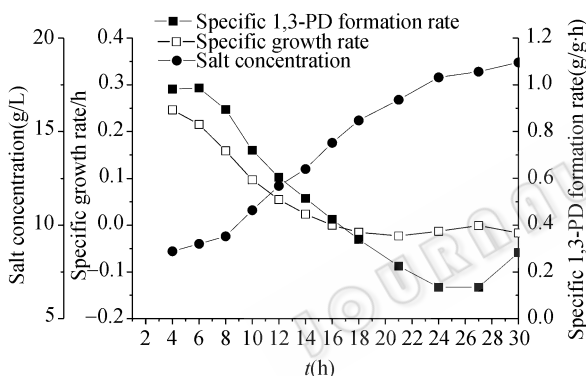


图 2 5L 发酵罐发酵过程中盐浓度和生产速率、产物比生成速率的关系

Fig. 2 Time courses of specific 1, 3-PD formation rate, specific growth rate and salt concentration in 5L bioreactor

2.2 5 m³ 中试发酵罐发酵结果

在 5 m³ 发酵罐中试过程中, 初期的批次由于使用的是工业上常用的 5 mol/L NaOH 调控 pH 值, 由于补碱量较大, 发酵中后期发酵液盐浓度就开始处于一个较高的浓度, 导致发酵单位一直不高、维持在 45~50 g/L 1, 3-PD 的水平上。

通过分析图 3、图 4 我们发现, 盐浓度在中试发酵罐中逐渐升高, 在发酵 6 h 后盐浓度达到 10 g/L, 发酵 12 h 后盐浓度达到 17 g/L 以上, 最终发酵结束时盐浓度高达 30 g/L, 是 5 L 罐的 1.5 倍。随着盐浓

度的升高, 其他数据都有不同程度的降低, 菌体浓度在 10h 即达到最大值, 比生长速率也比 5 L 罐慢。在产物生成方面相应发现, 初期比生产速率正常, 但是当发酵液中盐浓度的快速增长, 比生产速率快速下降, 并且最终维持在一个较低的值, 特别是当盐浓度高于 17 g/L 以上时, 1, 3-PD 的生产速率非常缓慢, 只有同一时期正常值的 1/3。

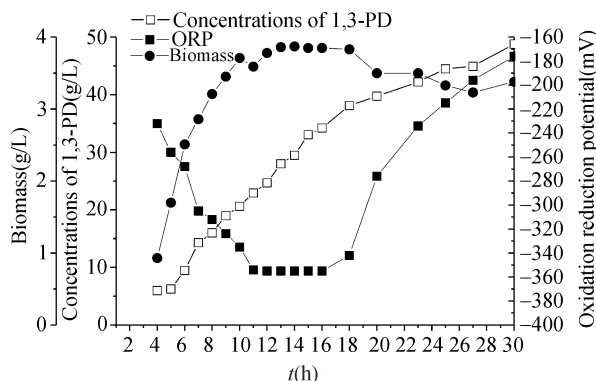


图 3 5 m³ 发酵罐高盐浓度发酵过程中 1, 3-PD 浓度、ORP(氧化还原电位)和菌体浓度的变化趋势

Fig. 3 Time courses of ORP, concentration of 1, 3-PD and biomass in 5 m³ bioreactor under high salt concentration

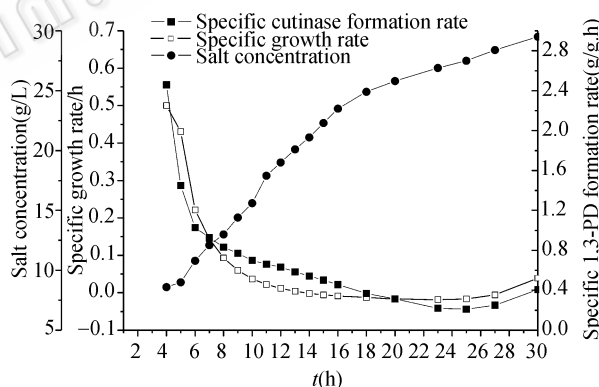


图 4 5 m³ 发酵罐发酵过程中盐浓度和生产速率、产物比生成速率的关系

Fig. 4 Time courses of specific 1, 3-PD formation rate, specific growth rate and salt concentration in 5 m³ bioreactor

同时, 在高盐浓度下, 初期 ORP 下降缓慢, 在发酵 7 h 后, ORP 才达到 -300 mV, 并且在低位的保持时间也较短, 这样的 ORP 并不利于产物 1, 3-PD 的生成。

当盐浓度较高时, 5 m³ 中试发酵罐发酵结果为产物 1, 3-PD 48 g/L, 转化率 52%, 生产强度 1.6 g/(L · h)。

在中试后些批次中, 通过技术手段的应用降低了发酵罐的盐浓度。图 5、图 6 是降低浓度后的发

醇结果与原结果的比较。

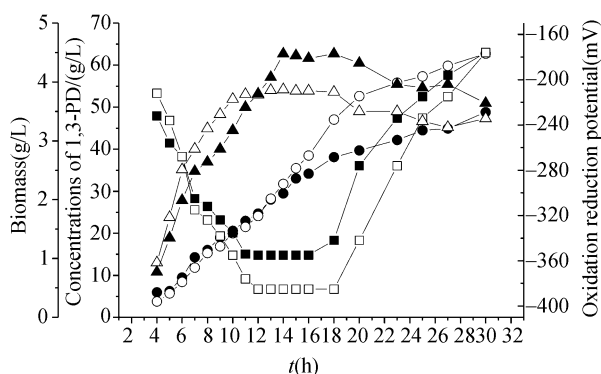


图 5 5 m^3 发酵罐高盐浓度与低盐浓度发酵过程比较
Fig. 5 Time courses of concentration of 1, 3-PD, ORP, biomass under low salt concentration and high salt concentration in 5 m^3 bioreactor

- △— biomass under low salt concentration;
- ▲— biomass under high salt concentration;
- ORP under low salt concentration;
- ORP under high salt concentration;
- concentration of 1, 3-PD under low salt concentration ;
- concentration of 1, 3-PD under high salt concentration

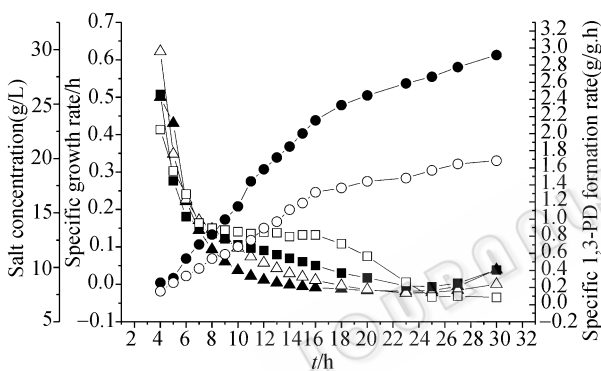


图 6 5 m^3 发酵罐高盐浓度与低盐浓度比率比较
Fig. 6 Time courses of salt concentration, specific 1, 3-PD formation rate, specific growth rate under low salt concentration and high salt concentration in 5 m^3 bioreactor

- △— specific growth rate under low salt concentration;
- ▲— specific growth rate rate under high salt concentration;
- courses of salt concentration under low salt concentration;
- courses of salt concentration under high salt concentration;
- specific 1, 3-PD formation rate under low salt concentration;
- specific 1, 3-PD formation rate under high salt concentration

比较图 5、图 6, 可以发现在发酵初期(0~4 h), 高盐浓度罐和低盐浓度罐此时的盐浓度相差不大, 所以此时, 产物比生成速率、菌体比生长速率、氧化还原电位变化均较为接近, 但是随着后续工艺的不同, 在 4 h 之后, 高盐浓度罐的盐浓度快速上升, 而低盐浓度罐盐浓度仍然保持在一个可控范围之内, 此时低盐浓度罐的氧化还原电位快速下跌, 维持在

-300 mV 以下 16 h, 与此对应的高盐浓度罐较晚达到 -300 mV, 且维持时间很短(仅为 12 h)。

在低盐浓度罐中, 菌体生长较高盐浓度罐生长更平稳, 虽然前期菌浓并不高, 但是其最高菌浓较高盐浓度罐高, 且维持时间长。由于 1, 3-PD 为初级代谢产物, 其生成速率与菌体生长密切相关, 故一般认为, 菌体浓度维持在高水平有利于 1, 3-PD 的合成。

比较两罐 1, 3-PD 的生成曲线, 可以发现在发酵 12 h 之后, 高盐浓度罐的 1, 3-PD 合成速率明显下降, 12 h 时 1, 3-PD 浓度已经达到 30 g/L, 但此时盐浓度也已经快速达到了 20 g/L。之后的 18h 发酵时间中高盐浓度罐 1, 3-PD 浓度仅增长了 10 g/L。在低盐浓度罐虽然前 12 h 中 1, 3-PD 生成速率并不占明显优势, 但是此时其盐浓度仅为 14 g/L, 在 12 h 之后 1, 3-PD 浓度仍然快速生长, 最终达到了 64 g/L, 表 1 为两罐的主要参数比较。

表 1 高盐浓度罐与低盐浓度罐主要参数

Table 1 Main parameters in bioreactor under low salt concentration and high

	Bioreactor under low salt concentration	Bioreactor under high salt concentration
Final 1, 3-PD concentration / (g/L)	64	48
The conversion of glycerol to 1, 3-PD	0.61	0.48
Productivity / (g/L · h)	2.1	1.6
Final salt concentration / (g/L)	17.8	29.6
Time of ORP under 300mV	16	12
The value of lowest ORP / (mV)	-380	-340

2.3 高盐浓度对菌浓的影响

通过对发酵初始时人为在 5 L 发酵罐中添加 NaCl, 增加盐浓度, 研究了盐浓度对菌体浓度的影响。NaCl 的外加量为 0、20、40、60 g/L。

从比较图中我们可以看出, 盐浓度对菌体的抑制能力较强的, 以最高菌浓为例, 20 g/L、40 g/L、60 g/L 分别只有对照组的 94%、86%、60%。盐浓度越高抑制能力越强。

2.4 盐浓度对氧化还原酶的影响

PDOR(1, 3-丙二醇氧化还原酶)是文献报道中, 生成 1, 3-PD 代谢途径的最后一个酶, 也是比较关键的一个酶, 它的活力的大小直接关系到 1, 3-PD 的生成速率。实验方法为通过人为在 5 L 发酵罐中添加

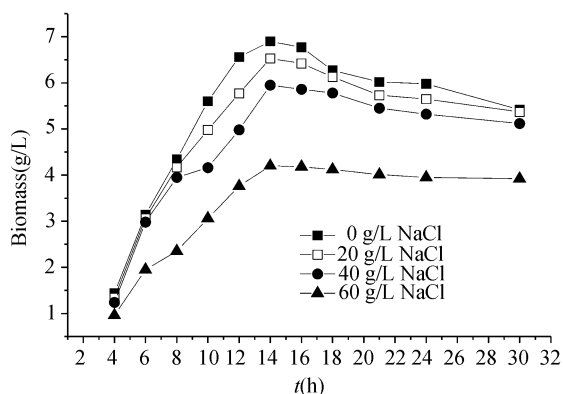


图7 5 L 发酵罐中盐浓度对菌体浓度的影响

Fig. 7 Time courses of biomass under different salt concentration in 5 L bioreactor

NaCl, 增加盐浓度, NaCl 的外加量为 0、20、40、60 g/L。分别取 5L 发酵罐发酵 10 h、16 h、24 h 的发酵液测定。

表 2 不同盐浓度下的 PDOR 表观酶活

Table 2 PDOR activity under different salt concentration

	0g/L NaCl	20g/L NaCl	40g/L NaCl	60g/L NaCl
PDOR(u/mg) of fermentation at 10 h	0.41	0.35	0.29	0.34
PDOR(u/mg) of fermentation at 16 h	1.18	0.98	0.89	0.75
PDOR(u/mg) of fermentation at 24 h	0.95	0.81	0.75	0.69

从数据上能发现盐浓度对于 PDOR 表观酶活影响非常巨大, 60 g/L NaCl 罐 16 h 时 PDOR 表观酶活相比同时间 0 g/L NaCl 罐低 36.5%。

3 结论

盐浓度对于 *Klebsiella pneumoniae* 生产 1, 3-PD

的过程影响还是很大的, 较高的盐浓度对于菌体、以及酶都有不同程度的抑制, 在中试初期由于忽略了这一重要因素导致发酵水平较低(45~60 g/L)、转化率较低(50%左右)。在通过技术手段降低盐浓度之后, 发酵水平有了大幅度的提高, 最终达到 1, 3-PD 64 g/L, 转化率 61%, 生产强度 2.1 g/(L·h)。中试取得了圆满的成功。

REFERENCES

- [1] Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, **74**: 239-259
- [2] Charles EN, Gregory MW. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curt Opin Biotechnol*, 2003,**14**:454-459.
- [3] Tao CP, Liu PB, Xia M, *et al.* Enhancement of 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella Pneumoniae* with Controlling Nitrogen Concentration. *Chemistry & Bioengineering*, 2007,**24**(5):38-41
陶春平, 刘朋波, 夏敏, 付水林, 宫衡, 控制氮源浓度提高 1, 3-丙二醇的发酵水平. *化学与生物工程* 2007, **24**(5):38-41.
- [4] Yang SB, Gong H, Fu SH. Enhancement of 1,3-Propanediol Production Using Two-Stage Glycerol Concentration Control Strategy. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2006, **32**: 9
杨树斌, 宫衡, 付水林, 两阶段控制甘油浓度提高 1, 3-丙二醇发酵水平. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2006, **32**: 9
- [5] Ahrens K, Menzel K, Zeng AP. Kinetic, Dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1, 3-propanediol formation. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**(5): 544-552.