

E. aero 高产 1,3-丙二醇菌株发酵条件的研究 (II)

迟乃玉^{1,3} 张庆芳¹ 邢福有¹ 刘毅^{1,3} 刘长江²

(大连大学生物工程学院 大连 116622)¹ (沈阳农业大学食品学院 沈阳 110161)²

(大连大学生命科学工作室 大连 116622)³

摘要: 建立了 1,3-丙二醇高产菌株 (*Enterobacter aerogenes* 简称为 *E. aero*-N-56) 1,3-PD 厌氧发酵最适 pH 值、温度、时间、接种量分别为 7.0、30℃、48 h、9%；在最适发酵条件下，30L 发酵罐中 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量为 47.36 g/L，生产率为 23.68 g/L·d。

关键词: *Enterobacter aerogenes*, 1,3-丙二醇, 发酵条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0044-03

STUDY ON FERMENTATION CONDITIONS OF A 1,3-PD HIGH-PRODUCTION STRAIN FROM *E. AEROGENES*

CHI Nai-Yu^{1,3} ZHANG Qing-Fang¹ XING Fu-You¹ LIU Yi^{1,3} LIU Chang-Jiang²

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622)¹

(College of Food, ShenYang Agricultural University, Shenyang 110161)²

(Work Room of Life Science, Dalian University, Dalian 116622)³

Abstract: The fermentation conditions of high 1,3-propanediol-producing strain *E. aero*-N-56 were determined in this Paper. The optimum conditions of producing 1,3-PD were: initial pH 7.0, temperature 30℃, culture time 48 h, inoculum size 9%. Under the optimum conditions: the 1,3-PD productivity reached up to 23.68 g/L·d; the 1,3-PD yield of *E. aero*-N-56 up to 47.36 g/L in 30 L fermentor.

Key words: *Enterobacter aerogenes*, 1,3-PD, Fermentation conditions

1,3-丙二醇 (1,3-PD) 是生产多聚纤维及制造多氨基甲酸乙酯及环状化合物的单体^[1]。利用 1,3-PD 生产的新型聚酯材料, 具有优良的回弹性、染色性、抗污性等, 在服装、工程塑料、地毯、药剂、有机溶剂等领域应用潜力巨大, 世界各国争相研究开发 1,3-PD 的生产途径^[2]。目前, 1,3-PD 的化学合成法已有 3 条途径可以完成, 我国尚处空白。但由于化学合成法昂贵的费用及工艺难度大, 造成严重环境污染等问题, 限制了 1,3-PD 应用的开发^[3]。为降低生产成本, 避免环境污染等问题, 微生物发酵法生产 1,3-PD 成为研究热点^[4]。国外微生物发酵法生产 1,3-PD 研究起始于 90 年代初, 目前处于菌种选育及最适发酵条件等方面研究^[5], *Klebsiella pneumoniae* 和 *Clostridium butyricum* 是研究最多的菌株, 但由于前者是病原菌而逐渐被淘汰, 鉴于 *C. but* 菌株的安全性, 在国外它是最具有工业使用潜力的菌株。而用其他的菌种进行 1,3-PD 发酵法生产还未见报道。在 1,3-PD 高产菌株 *E. aero*-N-56 最适发酵培养基等研究的基础上, 本文报道了 1,3-丙二醇高产菌株 (*E. aero*-N-56) 1,3-PD 厌氧发酵最适 pH 值、温度、时间等条件及在优化条件下进行了 30 L 发酵罐放大实验的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

E. aero-N-56 菌株, 沈阳农业大学食品学院分离选育。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2.2 种子培养基和发酵培养基: 均为厌氧培养基, 制备方法参考文献 [8]。

1.2.3 培养方法: 在 100 mL 厌氧瓶中, 装入 50 mL 种子培养基, 接入厌氧斜面菌种, 28℃ 下培养 48 h, 作为厌氧液体种子。在 250 mL 厌氧三角瓶中, 装入 200 mL 发酵产 1,3-PD 的培养基, 28℃ 厌氧培养 2 d, 取培养液 4,000 r/min 离心, 上清液即为 1,3-PD 混合液, 测定 1,3-PD 含量。

1.3 分析方法

1.3.1 1,3-PD 测定方法: 气相色谱法。

1.3.2 生物量测定: 100 mL 发酵液, 4,000 r/min 离心 20 min, 蒸馏水清洗 2 次, 60℃ 烘干, 称重。

2 结果与分析

2.1 培养液起始 pH 值对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

调整发酵培养基的起始 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, *E. aero*-N-56 菌株厌氧 1,3-PD 发酵, 结果见图 1。

实验结果表明 (图 1), pH 值达到 7.0 时, 1,3-PD 产量达到最大值 37.3 g/L; 当 pH 值再增加, 1,3-PD 产量开始下降。

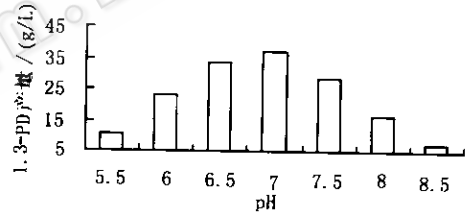


图 1 pH 值对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

2.2 培养时间对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

在优化条件下, 研究了培养时间对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响, 实验结果见图 2。

实验结果 (图 2) 表明, 随培养时间增加, *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量增加; 当培养时间达到 48 h 时, *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量达到最大值 38.5 g/L; 当培养时间再增加时, 1,3-PD 产量略有下降。

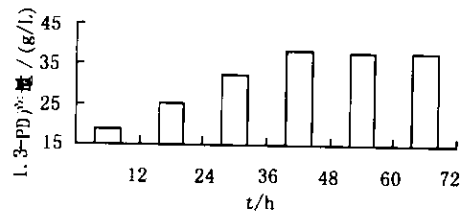


图 2 培养时间对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

2.3 培养温度对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

对 *E. aero*-N-56 菌株厌氧 1,3-PD 发酵温度进行研究, 实验结果见图 3。

实验结果 (图 3) 表明, 培养温度为 30℃ 时, *E. aero*-N-56 菌株厌氧液体 1,3-PD 发酵产量达到最大值 42.6 g/L。因此, 确定 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 厌氧液体发酵最适温度为 30℃。

2.4 接种量对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

接种量对发酵产量影响较大。接种量对 *E. aero*-N-56 菌株厌氧 1,3-PD 液体发酵影

响,实验结果见图4。

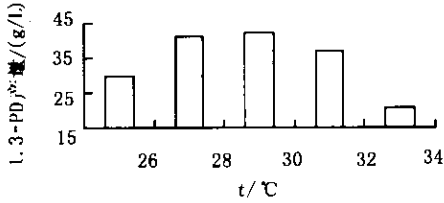


图3 培养温度对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

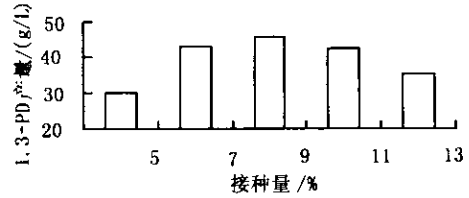


图4 接种量对 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量的影响

由图4可以看出,当接种量达到9%时, *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量达到最大值 45.8g/L。

2.5 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 发酵放大实验

在培养基和发酵条件优化的条件下,在30 L发酵罐内装20 L发酵培养基,4 MKOH 自动流加控制 pH 值 7.0, N_2 控制厌氧环境 (0.05 vvm),实验结果见表1。

表1 30 L 发酵罐 *E. aero*-N-56 菌株厌氧 1,3-PD 发酵结果

	甘油起始量 (g/L)	甘油残留量 (g/L)	发酵产物浓度 (g/L)				产量系数 (mol/mol)	Q_{PD} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
			1,3-PD	乙酸	丁酸	乙醇		
X_1	90	1.12	47.90	9.23	3.54	0.47	0.66	1.0
X_2	90	1.3	46.82	8.81	4.02	0.51	0.64	0.98
平均值 (X)	90	1.21	47.36	9.02	3.78	0.49	0.65	0.99

3 讨论

近年来,微生物发酵法生产 1,3-PD 主要侧重于研究甘油转化为 1,3-PD。微生物菌株主要有: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Ilyobacter* 和 *Pellobacter*, 其中研究最多的菌株为 *Klebsiella pneumoniae* (简称为 *K.pneu*), 其次为 *Clostridium butyricum* (简称为 *C.but*)。在分批培养中得到 1,3-PD 的最大浓度是 50 ~ 60 g/L, 在常规连续培养中, *C.but* 只能获得 *K.pneu* 菌株 1,3-PD 最大产量 (约为 48.75 g/L) 的一半,但由于前者 (*K.pneu*) 是病原菌而逐渐被淘汰,鉴于 *C.but* 菌株的安全性,在国外它是最具有工业使用潜力的菌株^[7,8]。而我们筛选的 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 产量已经超过 *C.but* 菌株的生产能力,并且该菌株以酵母甘油发酵(底物为 200 g/L 玉米淀粉的糖化液)产物为底物时,1,3-PD 厌氧发酵产量也很高(55.67 g/L)。因此, *E. aero*-N-56 菌株是一株很有开发价值和应用潜力的菌株。

致谢 本项研究工作是在沈阳农业大学刘长江教授的资助与指导下完成,特此致谢!

参考文献

- [1] Barbirato F. Ind Crops Prod, 1998, 7 (2, 3): 281 ~ 289.
- [2] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38: 453 ~ 457.
- [3] 姜兴茂. 上海化工, 2000, 23 (6): 35 ~ 39.
- [4] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38: 453 ~ 457.
- [5] Biehl-H, Marten S, Hippe H, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 44 (1-2): 15 ~ 19.
- [6] Witt U, Mueller R J, Augusta J, et al. Makromol Chem Phys, 1994, 195: 793 ~ 802.
- [7] Saint A S. Biotechnology Letters, 1995, 17 (2): 211 ~ 216.
- [8] Zeng A N, Ross A, Biehl H, et al. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 902 ~ 911.