

生物催化合成1,3-丙二醇工艺的研究

冷桂华,王瑞君,孙万里

(宜春学院化学与生物工程学院,江西省天然药物活性成分研究重点实验室,江西宜春 336000)

摘要:以甘油为底物,利用克雷伯氏菌发酵生产1,3-丙二醇的实验中,考察了初始甘油浓度、温度、pH、通气策略等发酵条件对1,3-PDO产量的影响。实验结果表明:积累1,3-PDO的适合条件为:甘油的初始浓度为40g/L、发酵温度37℃、pH7.0、0.5V/V·min的通气量,发酵30h,反应液中PDO的产量可达57.63g/L。

关键词:生物合成,1,3-丙二醇,发酵,工艺

Study on the biocatalysis synthetic technique of 1,3-propanediol

LENG Gui-hua, WANG Rui-jun, SUN Wan-li

(Chemical and Biological Engineering College, Yichun University, Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China)

Abstract: The effects of glycerol concentrations, temperature, pH and aeration strategies were investigated on the production of 1,3-propanediol with glycerol as substrate by *Klebsiella pneumoniae*. The results showed that the most suitable condition of accumulating 1,3-PDO were glycerol concentrations 40g/L, temperatures 37℃, pH 7.0 and aeration rate 0.5V/V·min, fermentation time 30h, respectively. The PDO concentration in the fermentation broth reached 57.63g/L.

Key words: biosynthesis; 1,3-propanediol; fermentation; technique

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2011)12-0136-04

1,3-丙二醇(1,3-propanediol,简称1,3-PDO)是一种重要的化工原料,可直接用作防冻剂,是增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂的合成原料^[1],广泛用于食品、化妆品和制药等行业^[2]。目前1,3-丙二醇最主要的用途是作为合成聚酯、聚氨酯的主要原料,聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)是一种新型聚酯材料,具有许多优良特性,主要用于生产纤维和纺织品,是合成纤维新品种开发的热点^[3],制约PTT发展的关键因素在于1,3-丙二醇的成本问题。1,3-丙二醇可通过化学法和生物法生产^[4],化学法生产消耗了不可再生的有限资源,造成环境污染,同时化学法生产原料及设备要求高,生产存在设备投资大、工艺复杂、条件苛刻和环境污染,且原料石油资源日益匮乏等问题;生物法具有原料可再生、操作简便、反应条件温和、副产物较少、环境污染小等优点,越来越受到人们的重视,各国都致力于研发生物技术合成1,3-丙二醇。本文以甘油为主要底物、以克雷伯氏肺炎杆菌为菌种,探讨发酵生产1,3-丙二醇的条件,以提高1,3-PDO转化率,降低其成本。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期:2011-09-01

作者简介:冷桂华(1968-),女,硕士,副教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目:江西教育厅计划项目资助(GJJ10603)。

克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)由华东理工大学国家化生中心提供;粗甘油 工业级,上海化学试剂采购供应站中心化工厂;酵母浸膏 生化级,北京奥博星生物技术有限责任公司;甘油 分析纯,天津市福晨化学试剂厂;维生素 B₁₂、甘氨酸 生化级,上海国药集团化学试剂有限公司;1,3-丙二醇、高碘酸钠 分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;K₂HPO₄·KH₂PO₄ 分析纯,成都科龙化工试剂厂;(NH₄)₂SO₄·MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·4H₂O 分析纯,天津市永大化学试剂开发中心;KOH 化学纯,上海光华化学试剂厂;种子培养基(g/L) 甘油 10,葡萄糖 4,K₂HPO₄·3H₂O 0.8,KH₂PO₄ 0.5,(NH₄)₂SO₄ 2,MgSO₄·7H₂O 0.5,酵母浸膏 3,微量元素 1mL,Fe²⁺溶液 0.5mL;发酵培养基(g/L) 甘油 40,葡萄糖 2,K₂HPO₄ 1.2,KH₂PO₄ 0.4,(NH₄)₂SO₄ 3,MgSO₄·7H₂O 0.5,酵母粉 1.5,微量元素 1mL,铁溶液 0.6mL;微量元素成分和铁溶液的配制 参考文献[5]。

DSX-280A 不锈钢灭菌器 上海申安医疗器械厂;SPX-250BS-II 生化培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;UV-2000 紫外分光光度计 尤尼柯仪器有限公司;BIOTECH-7BGZ 磁力搅拌发酵罐 上海保兴生物设备工程公司;SP-3420A 气相色谱仪 北京北分瑞利仪器有限公司;BCM-1000A 生物洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;BS224S 电子分析天平 北京赛多利斯仪器有限公司。

1.2 1,3-丙二醇的发酵培养方法

1.2.1 种子培养 250mL 三角瓶棉塞加牛皮纸封口,装液量 100mL,接入斜面菌苔 1 环,在 37℃ 的生化培养箱、转速为 150r/min 下培养 12h。

1.2.2 发酵培养

1.2.2.1 分批发酵 在 5L 发酵罐中,装入发酵培养基 4L,接种量为 5% (v/v),搅拌速度 200r/min,发酵温度 37℃,通气量 0.5V/V·min,发酵过程中体系 pH 用 5mol/L 的 NaOH 自动调控为 7.0。

1.2.2.2 补料分批发酵 在 5L 发酵罐中,装入发酵培养基 3L,接种量为 5% (v/v),搅拌速度 200r/min,发酵温度 37℃,通气量 0.5V/V·min,发酵过程中体系 pH 用 5mol/L 的 NaOH 自动调控为 7.0。在初始甘油降到 15g/L 以下时开始流加底物甘油,保持甘油浓度在 15~25g/L 范围内。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定 采用比浊法,以未接种的发酵培养基为对照,分光光度计于 650nm 处检测细胞的浓度,根据干重与 OD₆₅₀ 对应的标准曲线计算。

1.3.2 目的产物 1,3-丙二醇以及副产物乙酸和乙醇含量的测定 气相色谱法测定,检测器为 FID,色谱柱为毛细管柱,柱温 130℃,汽化室与检测器的温度均为 240℃,载气为 N₂,进样量 0.5μL,采用外标法定量。

1.3.3 甘油、葡萄糖含量测定 分别采用高碘酸氧化法^[4]、DNS 比色法^[5]。

2 结果与分析

2.1 在分批发酵中初始甘油浓度对发酵的影响

利用克雷伯氏菌的 PDO 发酵中,甘油是发酵底物中的物质基础,提供碳源和能源,其浓度对产物 1,3-丙二醇有较大的影响。分别取 20、40、60、80g/L 的初始甘油浓度进行分批发酵实验,实验结果见图 1、图 2。

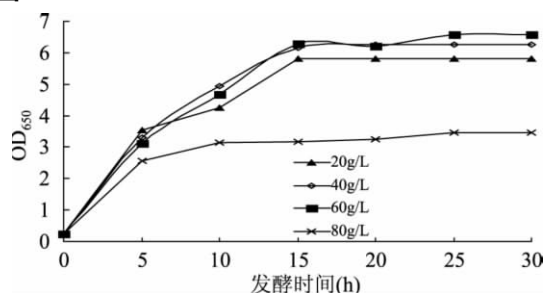


图1 分批发酵过程中不同初始甘油浓度(g/L)下生物量的变化

由图 1 可知,甘油初始浓度在 20~60g/L 范围内的菌体生长比较好,菌体生长 15h 左右基本上处于停滞状态,初始甘油浓度 60g/L 稍有生长,但增殖较小,发酵 30h 其菌密度比其它两种情况稍高些。初始甘油浓度为 80g/L 时,生长相对缓慢得多,菌体密度也偏小。由图 2 可以看出,初始甘油浓度分别为 40g/L 和 60g/L 时,二者的 PDO 生物合成情况有相似之处,前者比后者更早到达最大产量,且浓度稍高些。初始甘油浓度分别为 20g/L 和 80g/L 时,二者的 PDO 生物合成情况也有相似,相比之下,80g/L 时

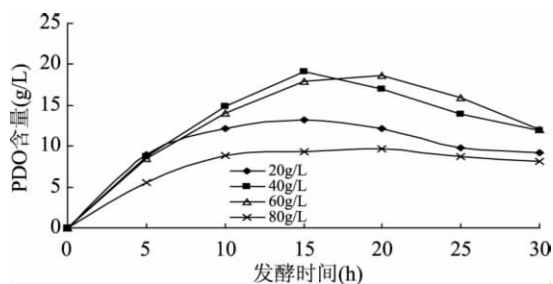


图2 分批发酵过程中不同初始甘油浓度(g/L)下1,3-丙二醇含量的变化

的 PDO 浓度低了很多。结合图 1、图 2,初始甘油浓度 20g/L,在发酵初期的菌体生长旺盛,可能由于碳源的缺乏影响了 PDO 的合成。40~60g/L 的初始甘油,细胞生长良好, PDO 浓度也高,可能由于底物的抑制作用较小。80g/L 的初始甘油浓度过高对发酵有抑制作用^[6],主要是生成高浓度的 3-羟基丙醛,在细胞中积累到一定浓度,会毒害细胞,使发酵终止。综合成本考虑,分批发酵中甘油初始浓度选为 40g/L 最佳。

2.2 流加补料发酵中温度对 1,3-丙二醇生成的影响

温度是影响微生物生长代谢的基本环境因素之一,酶活对温度的变化很敏感,合适的温度将有利于酶促反应,有利于产物的形成。克雷伯氏肺炎杆菌属于肠道细菌,生长温度应该接近人体温度,实验选用 34、37、40℃ 三个温度情况来考察温度对 PDO 转化的影响,结果如图 3 所示,由图 3 可以看出,37℃ 下的 1,3-丙二醇的产量最高,达到 57g/L 左右。在 40℃ 条件下其 1,3-丙二醇的产量很低。在 34℃ 下产物的最高浓度达 38g/L 左右,所以温度偏低(34℃)、偏高(40℃)都会影响发酵产物的产生,低温可能影响 1,3-丙二醇形成的酶系活力,高温可能对于细胞有极大的破坏,因此 37℃ 为 1,3-丙二醇生物合成中的较理想温度。

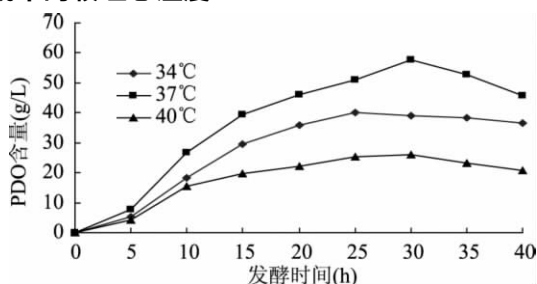


图3 流加补料发酵中温度对1,3-丙二醇生成的影响

2.3 流加补料发酵中 pH 对 1,3-丙二醇生成的影响

微生物的生长和代谢中,环境的 pH 对细胞的生长与代谢有着重要影响,同样微生物代谢的活动反过来又会影环境液的酸碱状态。克雷伯氏肺炎杆菌属于肠道细菌,其生长环境在 pH6.5~7.5 之间,实验方法采用对比实验,考察 pH 为 6.5、7.0、7.5 和不调 pH 条件下整个发酵过程中 PDO 的生成情况。

图 4 表明发酵液的 pH 在 6.5~7.5 之间,产物的积累可以延续到 25~30h,在 pH 为 7 的条件下产量

可达到 57 g/L 左右,浓度最大,这与有关报道克雷伯氏肺炎杆菌产生 1,3-丙二醇的最适酸碱环境 pH 为 7.0 左右相适^[9],而不调 pH 条件下产物的积累只能持续 10h,并且产量很低,只有 15 g/L 左右,这与克雷伯氏肺炎杆菌代谢甘油,产生有机酸如乙酸、乳酸等,使 pH 下降,使菌体的生长代谢也受到抑制有着非常密切的关系。

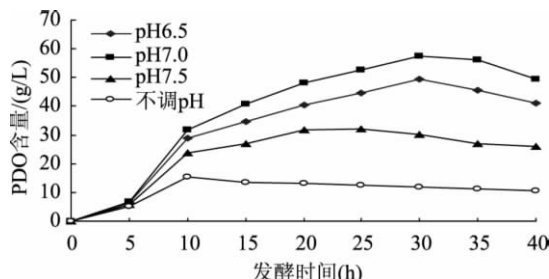


图4 流加补料发酵中 pH 对 1,3-丙二醇生成的影响

2.4 通气策略对 1,3-丙二醇生成的影响

克雷伯氏肺炎杆菌利用甘油作为底物进行分解代谢时,其代谢途径见文献[10],在好氧情况下,代谢主要经 3-磷酸甘油代谢;在厌氧情况下,甘油代谢将主要通过二羟丙酮途径。目前有许多报道关于 1,3-丙二醇在有氧参与的情况下发酵的研究,其产量、生产强度等发酵结果要高于厌氧发酵^[11]。为此实验设计了三种通气策略来优化发酵条件。I: 整个发酵过程不通空气; II: 发酵 0~20h 通 0.5 V/V · min 空气, 20~40h 不通空气; III: 全发酵过程通 0.5 V/V · min 空气。实验结果如图 5 所示。

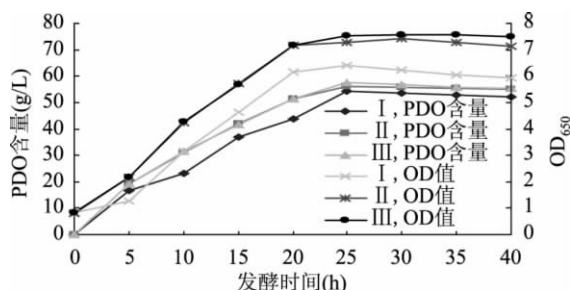


图5 流加补料发酵中通气策略对发酵的影响

由图 5 可见,在第 II 和第 III 通气策略下,其 OD₆₅₀ 始终大于第 I 情况,而且菌体增殖持续时间更长。三种情况下产物 PDO 生成量的差别不是很大,III 在 30h 积累量最大,接近 57 g/L,II 的产量达 55.65 g/L,不通气情况下最小。考虑到生产成本与操作的方便性,选用全发酵过程通 0.5 V/V · min 空气来发酵生产。

3 结论与讨论

3.1 发酵液中的初始甘油为 40 g/L,为克雷伯氏肺炎杆菌利用甘油作为底物进行生长代谢提供碳源和能量,代谢中间产物 3-羟基丙醛浓度不高,这种有毒的化合物能及时被转化,解除 3-羟基丙醛的积累,有利于 1,3-丙二醇的合成。

3.2 发酵液的温度维持在 37℃ 下,甘油转化成 1,3-丙二醇过程中的三个关键酶-甘油脱氢酶 (GDH)、甘油脱水酶 (GDHt) 和 1,3-丙二醇氧化还

原酶 (PDOR) 的酶活力达到较佳状态,PDO 的产率相对较高。

3.3 发酵过程中 pH 为 7.0 的条件下,菌体生长良好,PDO 生物合成量最高,有几方面的原因: a. GDHt 甘油脱水酶的活性恰好在 pH 为 7.0 的时候最高^[12],甘油脱水酶为甘油向 PDO 转化途径的第一个酶,为 1,3-丙二醇发酵几个关键酶中的限速酶; b. 发酵液中的 pH 影响着细胞内的氧化还原电位,影响到 NADH/NAD 的含量,而 PDO 合成途径与胞内辅酶的氧化、还原状态相关,也就间接影响到 PDO 的合成; c. pH 对克雷伯氏菌合成 1,3-丙二醇过程中的副产物如丁二酸、乳酸、乙酸、乙醇和 2,3-丁二醇等有显著影响^[13],过多的副产物都会毒害细胞,也抑制产物的形成。

3.4 通气量在 0.5 V/V · min 的微好氧条件对 1,3-丙二醇的发酵最有利。氧气的存在会对 PDO 发酵中几种关键酶的活性产生抑制作用^[14],但通入微量的空气,对发酵反而有明显的促进作用。原因可能是前期菌体生长时氧的供应对菌体生长有利;微量氧作为氢受体有利于调节氧化途径和还原途径之间的 NAD⁺/NADH 平衡,消除厌氧途径积累的大量 NADH。

参考文献

- [1] 王熙庭,陈曼华. 1,3-丙二醇生产方法及用途 [J]. 煤化工, 2000, 93(4): 38-40.
- [2] 金志红. 丙二醇硬脂酸酯的合成和应用 [J]. 中国食品添加剂, 1996(1): 24-27.
- [3] 陈国康,黄安,顾利霞. 聚对苯二甲酸丙二醇树脂的合成 [J]. 合成纤维工业, 1998, 21(5): 26-29.
- [4] 朱丙田,刘德华,任海玉,等. 1,3-丙二醇发酵条件的探索 [J]. 化工冶金, 2000, 21(4): 420-422.
- [5] 陈珍,郑宗明,孙燕,等. 克雷伯氏肺炎杆菌 HR526 快速合成 1,3-丙二醇发酵特性研究 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 799-803.
- [6] 王剑锋,修志龙,范圣第. 甘油转化生产 1,3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定 [J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 35-37.
- [7] 杜晨宇,刘铭,饶治,等. 分段通气对 *Klebsiella pneumoniae* 生产 1,3-丙二醇关键酶和辅酶的影响 [J]. 过程工程学报, 2005, 5(5): 540-544.
- [8] Vollenweider S, Lacroix C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(1): 16-27.
- [9] Zong M Z, Qiu L H, Jian H, et al. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *K. pneumoniae* AC 15 via central composite Design [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 1052-1057.
- [10] Zeng A P, Menzel K, Deckwer W D. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: II. Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions [J]. Biotechnol Bioeng, 1996, 52: 561-571.

(下转第 141 页)

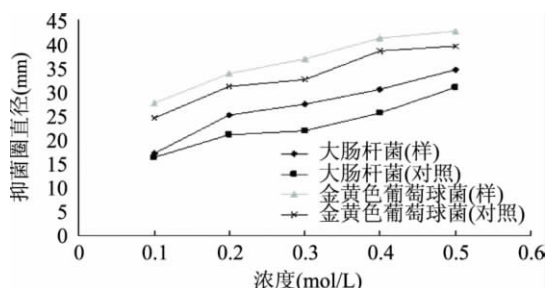


图3 氧化剂对色素抑菌作用的影响

是与 H_2O_2 本身具有杀菌能力有关。

2.3.5 还原剂对色素抑菌作用的影响 将浓度为100%色素提取液分别装入6支试管中,分别加入不同浓度的还原剂亚硫酸钠($C = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 \text{ mol/L}$),按“1.2.3”的方法测定抑菌圈直径,结果见图4。

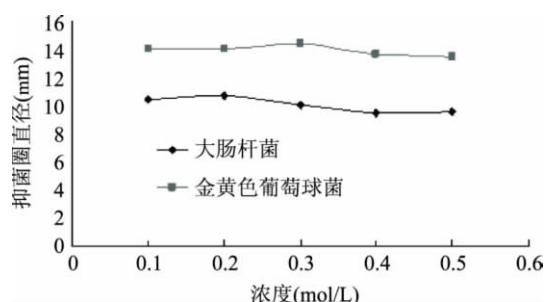


图4 还原剂对色素抑菌作用的影响

低浓度的还原剂对小黄杏色素抑菌作用的影响不明显,但还原剂的浓度达到一定程度时色素的抑菌能力会降低。

3 结论

3.1 实验结果表明,一定浓度的小黄杏色素提取物可以抑制供试菌的生长,色素对变形杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用均大于对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用,其对变形杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC为1.563%,对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的MIC为3.125%,这进一步说明小黄杏色素中可能存在天然杀菌的成分,有待进一步的研究探讨,根据小黄杏抑菌作用的这一性质不仅可将其应用于食品领域,还能将其开发制成生物药剂,治疗一些常见的疾病,其副作用小,并且提取工艺简单,便于操作。

3.2 温度对色素抑菌作用的影响很小,该色素对温度的稳定性良好,因此小黄杏色素可以作为高温处理食品的添加剂。

3.3 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等金属离子能增强色素对大肠杆菌的抑菌作用, K^+ 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 离子对其基本没有影响,说明该色素可以作为一些功能性

食品的添加剂,如补钙、补铁等功能性食品或药物,具有食品保健方面的应用潜能;然而, Mn^{2+} 离子增强色素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用效果尤为明显,这可能是由于大肠杆菌属革兰氏阴性菌,而金黄色葡萄球菌属革兰氏阳性细菌,他们之间存在一定的差异,另外,酶离子的激活剂有 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子,这使得小黄杏色素在酶促反应中的应用有了一定的可能性。

3.4 小黄杏色素的最佳抑菌pH范围在5~6之内。

3.5 氧化剂能增强色素的抑菌作用,这为该色素在含易氧化性物质或添加剂的食品上的应用提供了可能性,并且其在医疗卫生领域也已有了一定的应用。

3.6 低浓度还原剂对色素抑菌作用的影响不明显,但还原剂的浓度达到一定程度时会降低色素的抑菌效果,因此还原性添加剂和小黄杏色素混合使用时,要控制其还原剂的浓度。

参考文献

- 田建保,戴桂林,杨晓华,等.杏业生产现状及其发展前景[J].北京农业,2004(8):48-51.
- 赵铎.新疆杏资源与生产考察[J].山西果树,2003(3):25-26.
- 霍文兰.山杏黄色素的提取及稳定性研究[J].食品科学,2004,25(9):100-104.
- 唐晓珍,姜红波,孙淑静,等.玫瑰茄红色素稳定性的影响因素[J].中国食品添加剂,2003(2):60-62.
- 滕云,张国强,彭子模.黑果小檗红色素的提取及其稳定性研究[J].食品科学,2007,28(5):68-70.
- 文赤夫,赵虹桥,田春莲,等.樟树熟果红色素提取工艺及稳定性研究[J].食品科学,2006(4):143-146.
- 王林,等.中药大黄提取色素的抑菌作用研究[J].食品工业科技,2000(6):27-28.
- 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].第三版.高等教育出版社,1999.
- 叶竹秋,林跃鑫.巴西蘑菇抑菌作用的初步研究[J].食品科学,2001,22(4):82-84.
- 卢成英,唐克华,黄早成,等.红继木花红色素提取物抑菌活性研究[J].食品科学,2005,26(10):107-110.
- 张伟,詹建新,马雯,等.竹叶对食品致病菌的抑菌作用[J].食品科学,1998,19(4):37-39.
- 王新风,石红娟,陈颖,等.富硒平菇的体外抑菌作用研究[J].食品科学,2006,26(12):106-109.
- 韩永斌,朱洪梅,顾振新,等.紫甘薯花色苷色素的抑菌作用研究[J].微生物学通报,2008,35(6):913-917.
- 陈旭建,甘耀坤,罗应棉.红菇子实体提取液的抑菌作用研究[J].安徽农业科学,2008,36(10):138-139.

(上接第138页)

[1] Chen X, Zhang D J, Qi W T. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 63: 143-146.

[2] 陈宏文,王蔚,方柏山,等.克雷伯杆菌生产1,3-丙二醇关键酶发酵条件研究[J].高校化学工程学报,2004,18(5):621-627.

[3] 胡秋龙,郑宗明,刘灿明,等.pH对*Klebsiella pneumoniae*合成1,3-丙二醇中心碳代谢的影响[J].生物技术,2007,17(5):75-77.

[4] Johnson E A, Levine R L, Lin E C C. Inactivation of glycerol dehydrogenase of *Klebsiella pneumoniae* and the role of divalent cations[J]. Bacteriol, 1985, 164: 479-483.