

葡萄糖作辅助碳源对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的影响

程可可¹, 凌宏志², 张丽莉², 孙燕¹, 刘德华¹

(1. 清华大学化学工程系, 北京 100084; 2. 黑龙江辰能生物工程有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 在 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的种子培养及发酵实验中, 考察了葡萄糖作辅助碳源对菌体生长及 1,3-丙二醇生成的影响. 结果表明, 在种子培养期, 以葡萄糖和甘油为混合碳源可缩短种子培养周期; 在批次发酵和流加发酵中, 葡萄糖作辅助碳源可使 1,3-丙二醇产率及得率明显提高, 但不同的葡萄糖加入方式对产率及得率促进的效果不同. 在初始发酵培养基中添加 5 g/L 葡萄糖, 并在 4~40 h 进行葡萄糖与甘油混合液连续流加的条件下, 1,3-丙二醇浓度、产率及得率较单一甘油为底物的流加发酵结果分别提高 41.2%、38.6%和 8.3%.

关键词: 1,3-丙二醇; *Klebsiella pneumoniae*; 葡萄糖

中图分类号: TQ923 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)06-0561-06

1 前言

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 简称 PDO)是一种重要的化工原料,可用于油墨、涂料、抗冻剂、保护剂以及医药等行业^[1]. 最近的研究表明,以 1,3-丙二醇与对苯二甲酸为单体合成的聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)比以乙二醇和对苯二甲酸为单体形成的聚对苯二甲酸乙二酯(PET)更具良好特性,因而 PDO 在纺织、地毯以及工程塑料领域也具有非常广阔的应用前景. 现行的 PDO 生产路线主要是丙烯醛法和环氧乙烷法,两者都存在工艺复杂、条件苛刻和环境污染等问题,极大地制约了 PDO 的生产和应用. 因此利用具有条件温和、原材料来源广泛、环境污染小等优点的微生物发酵法生产 1,3-丙二醇,已成为近年来研究的热点^[2]. 然而与化学法合成 1,3-丙二醇的价格相比,微生物发酵法目前并没有明显的成本优势. 由于发酵液中 PDO 产品浓度低、从底物甘油到 PDO 转化率不高等原因^[3-5],使生产成本相对较高,因此,目前国内外都在广泛开展旨在提高发酵液中 PDO 产品浓度及利用更廉价原料来生产 PDO 的工艺研究^[6-9].

用廉价的辅助底物来提高发酵过程中较贵原料的转化率是常用的降低生产成本的措施之一^[8]. 张健等^[5]的研究结果表明,在批次发酵过程中保持葡萄糖流加可使 PDO 对甘油的质量得率从 0.35 提高至 0.54. 但由于其初始甘油浓度不高,最终 PDO 浓度仅为 12 g/L. 本工作在此基础上进一步考察了葡萄糖作辅助碳源对种子培养、批次发酵以及流加发酵的影响,并重点考察了葡萄糖的加入方式对生物量以及 PDO 产量和产率的影响.

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

实验所用菌种为中国农业大学赠送的克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* M5al),培养基组成成分见文献[6].

收稿日期: 2003-12-29, 修回日期: 2004-04-20

基金项目: “十五” 国家科技攻关计划资助项目(编号: 2001 BA708B01-04)

作者简介: 程可可(1975-), 男, 湖南省南县人, 博士研究生, 应用化学专业; 刘德华, 通讯联系人.

2.2 实验方法

2.2.1 培养条件

甘油管保藏的菌种转接至 LB 斜面, 30°C 温度下活化 12 h.

种子培养采用有氧培养, 500 mL 三角瓶中装液量 100 mL. 培养温度 30°C 摇床转速 140 r/min.

发酵实验在瑞士产 Sixfors 全自动 6 连罐中进行, 装液量 400 mL, 接种量 10%. 批次发酵初始甘油浓度 50 g/L; 流加发酵实验初始甘油浓度 50 g/L, 流加甘油浓度 1000 g/L, 流加甘油量 40 g. 发酵 8 h 后开始流加甘油, 40 h 后终止流加. 发酵过程中调整甘油的流加速度, 保持体系中甘油浓度在 40 h 前不低于 25 g/L. 发酵温度 37°C, 通入 0.2 L/min 的氮气保持厌氧环境. pH 值用 10 mol/L NaOH 溶液调控在 7.0.

2.2.2 分析方法

采用比浊法测定波长 650 nm 下细胞光密度(OD)以表征生物量. 发酵液中的其它有效成分如甘油、PDO、葡萄糖用日产岛津高效液相色谱测定. 色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65°C; 流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄, 流速 0.8 mL/min. 检测器为 CTO-10vp 折光示差检测器, 进样量 20 μL.

3 结果与讨论

3.1 种子培养基中葡萄糖对菌体生长及种子培养条件对发酵的影响

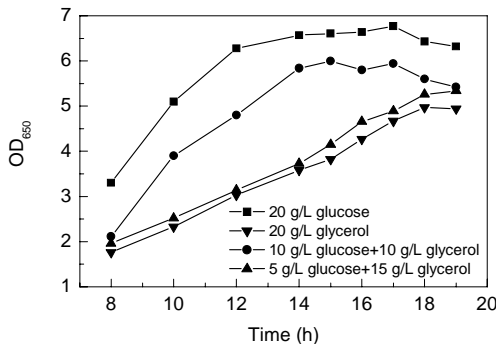


图1 不同碳源下菌体生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Klebsiella pneumoniae* at different carbon resources

为比较在不同碳源下 *Klebsiella pneumoniae* 的生长情况, 以不同比例糖和甘油作为种子培养基中碳源进行对比实验, 结果如图 1 所示. 结果表明, 种子培养基中碳源结构不同, 菌体生长速率不同. 菌体在仅以甘油为碳源的培养基中生长最慢, 随着培养基中葡萄糖浓度增加, 菌体生长加快, 相应进入对数生长期的时间提前. 以不同碳源培养条件下菌体生长进入稳定期前 1 h 的培养液为发酵种子液, 分别进行初始甘油浓度为 50 g/L 的批次发酵实验, 结果见表 1. 由表可知, 以 20 g/L 葡萄糖为碳源培养的种子虽然接种时 OD 值最高, 但发酵周期反而最长, 实验中可观察到明显的延滞期; 以 10 g/L

葡萄糖和 10 g/L 甘油为混合碳源培养的种子, 发酵周期最短, 与以 20 g/L 甘油为种子培养碳源相比, 不仅种子培养时间可缩短 3 h, 而且发酵周期也缩短 3 h, 因此, 在以下实验中均采用 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 甘油混合碳源培养种子.

表 1 不同种子培养条件批次发酵结果

Table 1 Results of batch fermentation with different precultured seeds

Substrate	20 g/L glucose	10 g/L glucose+10 g/L glycerol	5 g/L glucose+15 g/L glycerol	20 g/L glycerol
Preculture time (h)	12	14	16	17
Seed OD ₆₅₀	6.28	5.84	4.66	4.67
Glycerol given (g/L)	54.3	54	54	54.5
Glycerol consumed (g/L)	54.3	54	54	54.5
Fermentation time (h)	40	34	36	37
PDO concentration (g/L)	18.3	18.8	18.6	19.3
PDO productivity [g/(L·h)]	0.46	0.55	0.52	0.52
PDO yield	0.34	0.35	0.34	0.35

3.2 葡萄糖加入方式对甘油批次发酵的影响

3.2.1 发酵培养基中葡萄糖对菌体生长及发酵的影响

固定发酵培养基中其它成分不变,加入不同浓度葡萄糖,考察初始培养基中葡萄糖对发酵的影响.结果如图 2 及表 2.

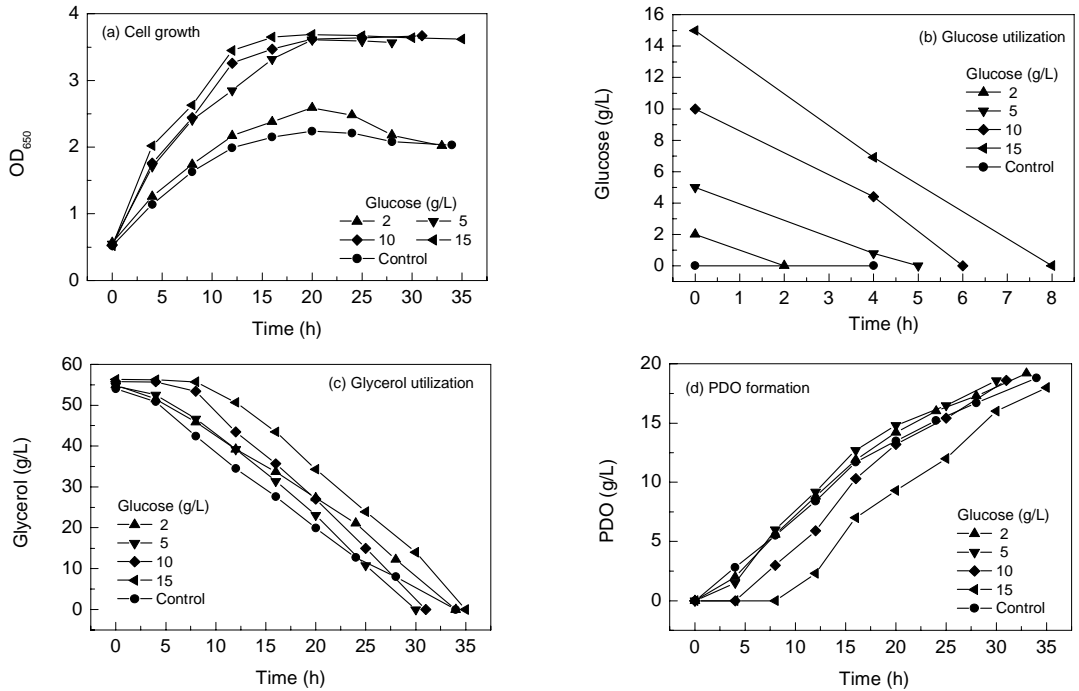


图 2 发酵初始培养基中不同葡萄糖浓度对批次发酵的影响

Fig.2 Time course of batch fermentation at different initial concentrations of glucose

表 2 不同浓度葡萄糖混合碳源批次发酵结果

Table 2 Results of batch fermentation with different concentrations of glucose

Initial glucose (g/L)	Initial glycerol (g/L)	Fermentation time (h)	PDO conc. (g/L)	PDO productivity [g/(L·h)]	PDO yield
0	54.0	34	18.8	0.55	0.35
2	54.9	33	19.2	0.58	0.35
5	54.7	28	18.6	0.66	0.34
10	55.2	31	18.4	0.59	0.33
15	54.1	35	18.0	0.55	0.33

由图 2 可见,在以甘油和葡萄糖为混合碳源时,菌体优先消耗葡萄糖,只有当体系中葡萄糖消耗近完全时,菌体才开始消耗甘油.随着初始葡萄糖浓度的提高,菌体的比生长速率增大,并且整个发酵体系中菌体密度也有所增加,但菌体密度有一饱和值,当体系中初始葡萄糖浓度大于 5 g/L 时,菌体的生长都能达到此饱和值.由表 2 可知,初始培养基中葡萄糖浓度的升高会导致得率下降,但产率随着体系中葡萄糖浓度的增加而增加,当葡萄糖浓度为 5 g/L 时达到最大,较体系中无葡萄糖的产率提高 20%.此后再增加葡萄糖浓度至 10 和 15 g/L,产率反而有所下降,因此加入葡萄糖的浓度控制在 5 g/L 为宜.

3.2.2 葡萄糖匀速流加对甘油批次发酵的影响

以上的研究结果表明,在发酵初始培养基中加入葡萄糖能提高产率,但 PDO 相对甘油的得率

有所降低. 张健等^[5]的研究结果表明,在发酵过程中流加葡萄糖可提高 PDO 得率. 固定发酵初始培养基中含 50 g/L 初始甘油浓度不变,在发酵开始后设置不同葡萄糖流加速率,考察葡萄糖流加速率对 PDO 得率及产率的影响. 由图 3 可知,葡萄糖流加速率对产率影响不大,但 PDO 得率随着葡萄糖流加速率的增大而增加,当葡萄糖流加速率为 0.5 g/(L·h) 时,其得率达到最大值,为 0.4,较体系中不流加葡萄糖的得率提高 28.6%. 当葡萄糖流加速率大于 1 g/(L·h)后,在发酵体系中葡萄糖有所积累,反而导致得率下降.

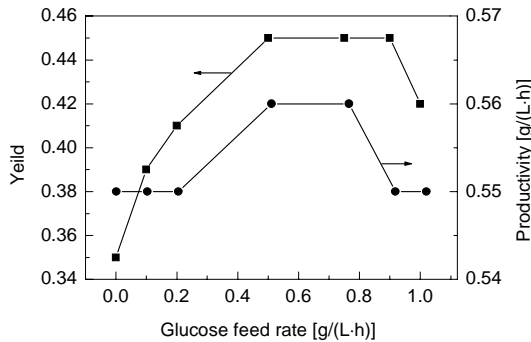


图 3 葡萄糖流加速率对 PDO 得率及产率的影响
Fig.3 Effect of glucose feed rate on PDO yield and productivity

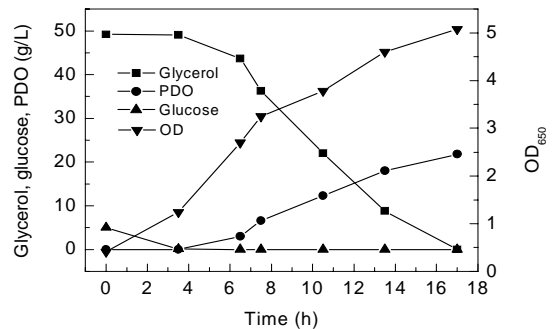


图 4 不同阶段及不同葡萄糖加入方式对发酵的影响
Fig.4 Effect of different glucose feed strategy at different stages on glycerol batch fermentation

3.2.3 初始添加及流加葡萄糖对甘油批次发酵的影响

由以上实验结果可知,在初始培养基中一次性加入葡萄糖可提高产率,而在发酵过程中流加葡萄糖可提高 PDO 得率,因此,进一步考察葡萄糖在发酵过程中的不同阶段以不同方式加入对甘油批次发酵的影响. 图 4 为发酵初始培养基中含 5%甘油和 0.5%葡萄糖、发酵 4~17 h、葡萄糖流加速率为 0.5 g/(L·h)的流加发酵结果. 在初始添加及流加葡萄糖后,明显促进菌体生长,最终菌体 OD 可达 5.08. 发酵 17 h 甘油即消耗完全,得率和产率分别为 0.44 和 1.28 g/(L·h),较甘油为单一碳源的发酵得率提高了 25.7%,产率提高了 132.7%. 表明在初始培养基中加入适宜的葡萄糖并在菌体生长进入对数期后连续流加适量葡萄糖可同时达到提高产率及得率的目的.

3.3 葡萄糖加入方式对流加甘油发酵的影响

图 5(a)为以甘油为唯一碳源的流加发酵结果;图 5(b)为初始培养基中添加 5 g/L 葡萄糖、发酵

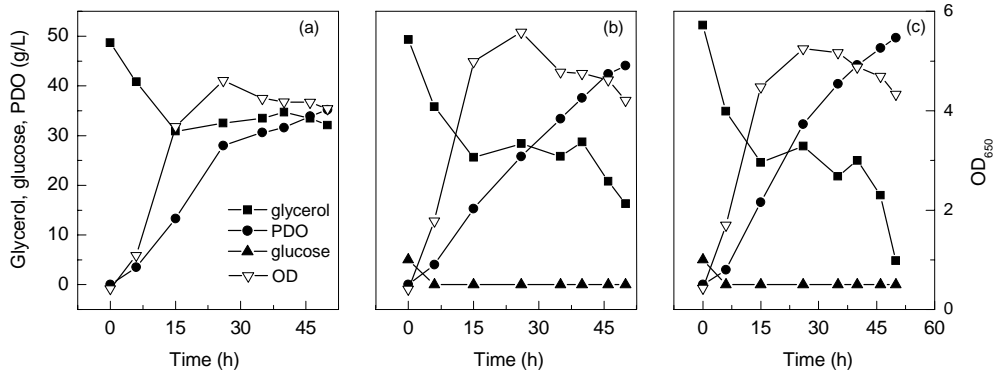


图 5 葡萄糖加入方式对甘油流加发酵的影响
Fig.5 Effect of glucose feed strategy on glycerol fed-batch fermentation

4~40 h 期间葡萄糖流加速率为 0.5 g/(L·h)并同时流加甘油的发酵结果. 在以上两种情况中,通过取样监测体系中甘油浓度并适时调节甘油流加速率,使体系中甘油浓度维持在 25 g/L 以上. 图 5(c)为初始培养基中加 5 g/L 葡萄糖、流加物为葡萄糖与甘油混合溶液,流加葡萄糖量与(b)相同,发酵过程中通过取样监测体系中甘油浓度并适时调节葡萄糖与甘油混合溶液的流加速率,使体系中甘油浓度也维持在 25 g/L 以上.

表 3 为葡萄糖加入方式对 PDO 产率和得率的影响结果. 由图 5 及表 3 可知,在甘油流加发酵中用葡萄糖作辅助碳源同样使产率及得率都有提高. 与甘油为单一碳源的流加发酵结果相比,初始培养基中含 5 g/L 葡萄糖、4~40 h 间流加甘油同时匀速流加葡萄糖的产率和得率分别提高 25.7%和 8.3%;初始培养基中含 5 g/L 葡萄糖、葡萄糖与甘油混合液连续变速流加的产率和得率分别提高 41.4%和 8.3%,而且操作更为简单,对产率的促进比葡萄糖匀速流加更为明显.

表 3 葡萄糖加入方式对 PDO 产率和得率的影响

Table 3 Effect of glucose feed strategy on the productivity and yield of 1,3-propanediol

Feed strategy	Glycerol consumed (g/L)	Glucose consumed (g/L)	PDO conc. (g/L)	PDO productivity [g/(L·h)]	PDO yield
1	97.7	—	35.2	0.70	0.36
2	113.1	23	44.1	0.88	0.39
3	127.4	23	49.7	0.99	0.39

Note: 1. Only continuous glycerol feeding; 2. Continuous glycerol feeding with glucose feeding at a constant rate; 3. Continuous glycerol and glucose mixture feeding.

4 经济性评价

目前国内市场甘油价格约为 9400 元/t^[10],葡萄糖价格约为 3300 元/t^[11],根据以上数据对葡萄糖作辅助碳源的发酵工艺进行初步的经济评价.

用葡萄糖作辅助底物发酵,生产 1 t PDO 将增加葡萄糖消耗量 0.46 t,但消耗的甘油较甘油为单一底物发酵工艺减少 0.21 t,可使原材料成本下降 456 元. 此外,可以大幅度提高产率和发酵液中产品浓度,减少一定制造成本和后提取费用. 可以看出,本工艺对于 PDO 发酵过程的经济效益可观.

5 结论

与甘油作单一碳源相比,以葡萄糖作单一碳源培养种子菌体生长快,但用于后续甘油发酵时存在明显的延滞期,导致发酵周期延长;以 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 甘油混合作碳源时,不但种子培养时间可缩短,而且后续的甘油发酵周期也缩短.

在批次发酵的初始培养基中添加葡萄糖可使 PDO 产率较甘油为单一碳源时提高,但 PDO 得率有所下降. 在发酵过程中流加葡萄糖可使 PDO 得率较甘油为单一碳源时提高,但 PDO 产率变化不大. 在初始培养基中添加适量葡萄糖,并在发酵过程中流加适量葡萄糖可同时提高产率及得率,比甘油为单一碳源的流加发酵产率和得率分别提高了 25.7%和 8.3%. 在初始发酵培养基中添加葡萄糖,并在发酵过程中流加葡萄糖与甘油混合液,1,3-丙二醇浓度、产率和得率较甘油为单一底物时分别提高了 41.2%,38.6%和 8.3%. 而且采用葡萄糖作辅助底物发酵工艺,对降低生产成本非常有效.

参考文献:

- [1] 修志龙. 1,3-丙二醇的微生物生产法分析 [J]. 现代化工, 1999, 3(19): 33-35.
- [2] 王熙庭, 陈曼华. 1,3-丙二醇生产方法及用途 [J]. 煤化工, 2000, 4: 39-42.

- [3] 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.
- [4] 修志龙. 甘油连续生物歧化过程培养基和 pH 调控策略研究 [J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(4): 397-402.
- [5] 张健, 赵红英, 刘宏娟, 等. 以葡萄糖为辅助底物发酵生产 1,3-丙二醇的研究 [J]. 现代化工, 2002, 22(6): 32-35.
- [6] 赵红英, 张健, 刘宏娟, 等. 1,3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究 [J]. 现代化工, 2002, 22(7): 34-38.
- [7] 刘海军, 王剑锋, 张代佳, 等. 用克雷伯氏菌批式流加法生产 1,3-丙二醇 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 27(7): 4-7.
- [8] Biebl H, Marten S. Fermentation of Glycerol to 1,3-Propanediol: Use of Cosubstrates [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, 44: 15-19.
- [9] Huang H, Gong C S, Tsao G T. Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, 98: 687-698.
- [10] 沈耘. 东方化工信息 [N]. 中国化工报, 2004-01-15(3).
- [11] 陈国兴. 华东市场化工产品价格 [N]. 中国化工报, 2004-03-03(3).

Effect of Glucose as Cosubstrate on 1,3-Propanediol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*

CHENG Ke-ke¹, LING Hong-zhi², ZHANG Li-li², SUN Yan¹, LIU De-hua¹

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2. Heilongjiang Chenneng Bioengineering Co., Ltd., Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: The effect of glucose as cosubstrate for the seed culture and fermentation of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* with glycerol as substrate was investigated. The results showed that the mixed substrate of glycerol and glucose for the seed culture could shorten the seed culture period. When adding glucose as cosubstrate, the productivity and yield of 1,3-propanediol were increased greatly in batch and fed-batch fermentation, but different glucose feed strategies could lead to different results. Compared with the 1,3-propanediol fed-batch fermentation production with glycerol as the only substrate, the 1,3-propanediol concentration, productivity and yield increased by 41.2%, 38.6% and 8.3% respectively when 5 g/L glucose was added to the initial fermentation media and a mixture of glycerol and glucose was fed during 4~40 h.

Key words: 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; glucose