

# 利用氧化还原电位调控基因工程菌株 *Klebsiella pneumoniae* F-1 合成 1,3-丙二醇

黄志华<sup>1,2</sup>, 张延平<sup>2,3</sup>, 杜晨宇<sup>2</sup>, 黄星<sup>2</sup>, 曹竹安<sup>2</sup>

(1. 三明学院化学与生物工程系, 福建 三明 365004; 2. 清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084; 3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

**摘要:** 基因工程菌株 *Klebsiella pneumoniae* 厌氧发酵过程中, 氧化还原电位(ORP)是一个监控发酵过程的重要指标. 考察了 *K. pneumoniae* F-1 在不同 ORP(-190, -210, -240 和 -290 mV) 下菌体生长和代谢产物合成的情况. 在 ORP 为 -240 mV 时, 1,3-丙二醇的发酵终浓度和得率分别为 81.5 g/L 和 0.423 mol/mol, 分别为 4 种 ORP 条件下的最高值. 这说明 ORP=-240 mV 是菌株 *K. pneumoniae* F-1 的最适 ORP. 此 ORP 既不同于野生菌株 *K. pneumoniae* M5aL 的最适 ORP(-190 mV), 也不同于经过诱变的菌株 *K. pneumoniae* YMU2 的最适 ORP(-280 mV). 另外, 通过研究发酵体系 ORP 对甘油代谢流的影响, 发现还原性氛围较有利于甘油向 1,3-PD、乙醇、2,3-丁二醇等还原性较高的代谢物转化. 首次报道了 ORP 调控发酵过程在基因工程改造菌株中的应用, 这对于进一步研究 ORP 调控厌氧发酵过程具有一定的意义.

**关键词:** 1,3-丙二醇; NADH 再生; 氧化还原电位; *Klebsiella pneumoniae*

**中图分类号:** Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)05-1014-04

## 1 前言

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 1,3-PD)是一种重要的化工原料, 主要用于合成聚对苯二甲酸丙二醇酯(Polytrimethylene Terephthalate, PTT). PTT 由于具有优良的性能而引起广泛的关注<sup>[1]</sup>. 近年来, 生物法生产 1,3-丙二醇受到重视, 并有望在工业规模上取代传统的化学法生产工艺<sup>[2]</sup>. 自然界中以甘油为底物合成 1,3-PD 的微生物主要是厌氧菌或兼性厌氧菌, 其中 *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* 和 *Clostridium butyricum* 是得率较高的 3 种菌, 也是研究最深入的<sup>[3,4]</sup>, 它们厌氧转化甘油的共同特点是甘油发生歧化反应, 沿氧化和还原两条路径代谢, 氧化途径与糖类混合酸发酵途径一致, 还原途径则由甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶催化的两步反应组成, 第二步需要消耗氧化途径中多余的还原力 NADH 以维持细胞的氧化还原平衡<sup>[5]</sup>. 由于 1,3-PD 合成途径与胞内辅酶的氧化、还原状态(NAD, NADH)相关, 因此可以合理推测胞外的氧化还原状态在一定程度上影响 1,3-PD 合成.

生物法生产 1,3-丙二醇的研究重点集中在筛选或构建高产 1,3-丙二醇的菌株及其发酵工艺的优化, 以提高 1,3-丙二醇的产量和得率. 本实验室在一株筛选得到的正突变菌株上构建了高产 1,3-丙二醇菌株, 使 1,3-丙二醇产量达到了 78.6 g/L, 得率达到 0.403 mol/mol<sup>[6]</sup>. 但由于 1,3-丙二醇发酵是在厌氧-微厌氧条件下进行, 因此其发酵工艺的进一步优化由于缺少合适的可监控

参数而难以进行.

近年来的研究表明, 菌体所处的微观环境对于菌体生长和菌体的代谢流流量具有显著的影响, 每一个菌株都有一个合适的氧化还原电位, Sridhar 等<sup>[7,8]</sup>研究 *Cl. thermosuccinatenes* 的代谢过程时也得到了相似的结论. Riondet 等<sup>[9,10]</sup>用氧化还原电位表征菌体生长的微观环境, 并通过通入氮气、氢气及添加 NaHB<sub>4</sub> 来研究氧化还原电位对菌体的影响. 本实验室通过调控氧化还原电位, 对野生菌株 *Klebsiella pneumoniae* M5aL 的发酵过程进行优化, 得到了该菌株合成 1,3-丙二醇的最适 ORP 在 -190 mV 左右<sup>[11]</sup>; 通过化学诱变得得到一株 1,3-丙二醇产量提高的正突变菌株 *K. pneumoniae* M5aL YMU2, 其最适 ORP 在 -280 mV 左右<sup>[12]</sup>. 本工作研究的基因工程菌株 *K. pneumoniae* F-1 是在该突变菌株的基础上引入了 NADH 再生途径, 代谢途径的变化很有可能引起其最适 ORP 的变化, 从而影响 1,3-丙二醇的产量. 因此, 本工作研究了 *K. pneumoniae* F-1 合成 1,3-丙二醇的最适 ORP 范围及其对基因改造后的菌体代谢流的影响.

## 2 菌株、材料与分析方法

### 2.1 菌株及培养条件

*K. pneumoniae* M5aL 是野生型菌株, 由中国农业大学生物学院李季伦教授提供.

*K. pneumoniae* F-1 是本课题组在 1,3-丙二醇正突变菌株 *K. pneumoniae* YMU2 中导入了甲酸/甲酸脱氢酶

收稿日期: 2007-05-08, 修回日期: 2007-07-17

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716007); 福建省自然科学基金资助项目(编号: 2007J0287)

作者简介: 黄志华(1964-), 女, 福建省平和县人, 学士, 副教授, 生物化工专业, E-mail: hzh917@163.com.

NADH 再生系统的基因工程菌, 与 YMU2 相比, 具有更高的 1,3-PD 合成能力<sup>[6]</sup>.

*K. pneumoniae* F-1 的培养基与 YMU2<sup>[13]</sup>相同. 种子培养在 150 mL 摇瓶(持液量 50 mL)中进行, 通入氮气维持厌氧环境, 并以  $\text{CaCO}_3$  调节 pH 在 7.0 左右, 35 °C, 120 r/min 下培养. 补料批次发酵在 5 L 发酵罐(Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany)中进行, 持液量为 3 L. 发酵过程通入氮气, 并补加甘油使其浓度维持在 20~30 g/L.

## 2.2 氧化还原电位调控及测定

发酵过程中氧化还原电位(ORP)的调控主要通过调节通入发酵罐的氮气/空气的比例或流量实现, 加入适量的还原剂如  $\text{NaHB}_4$  则可以快速降低发酵液 ORP 值. ORP 的测定则利用氧化还原电极进行<sup>[11]</sup>.

## 2.3 菌体生长及代谢产物测定

菌体浓度通过测定发酵液在 650 nm 处的吸光度值  $A_{650}$  来衡量. 将培养液用去离子水稀释适当倍数, 使  $A_{650}$  值在 0.2~1.0 之间, 采用 Agilent 8453 紫外可见分光光度计(安捷伦科技有限公司)测定. 菌液浊度  $\text{OD}_{650} = A_{650} \times$  稀释倍数.

发酵液中底物甘油及产物 1,3-PD、副产物乙酸(Acetic acid)、乙醇(Ethanol)、乳酸(Lactic acid)、2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD)、琥珀酸(Succinic acid)等浓度均采用 SHIMADZU 10A 型高效液相色谱仪(岛津制作所)测定, 色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65 °C, 流动相为 0.005 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速为 0.8 mL/min, 检测器为 RID-10A 型折光示差检测器<sup>[11]</sup>.

# 3 实验结果及分析

## 3.1 发酵液氧化还原电位对菌体生长及 1,3-PD 合成的影响

为优化重组菌 *K. pneumoniae* F-1 生产 1,3-PD 的工艺, 研究了 ORP 的影响. 通过调节通入发酵罐的氮气/空气的比例及流量, 发酵中后期发酵液 ORP 可以分别稳定在 -190, -210, -240 及 -290 mV 左右(见图 1).

如图 2 所示, 在 4 种 ORP 条件下, 菌体生长趋势是基本一致的, 厌氧发酵前 24 h 左右菌体生长速度较快, 之后菌体生长基本停止, 在发酵后期(50 h 以后)由于菌体破裂等原因发酵液浊度略有下降. 另外, *K. pneumoniae* F-1 厌氧发酵过程中菌体生长情况受发酵体系 ORP 影响非常显著, 当发酵液 ORP 基本稳定(约 12 h)后, 由于 ORP 值的不同, 菌体生长曲线出现明显分化. 在较高 ORP 下(-190~-210 mV), 菌体生长较慢, 这说明生长环境氧化性较高对菌体生长不利; 但还原性太强

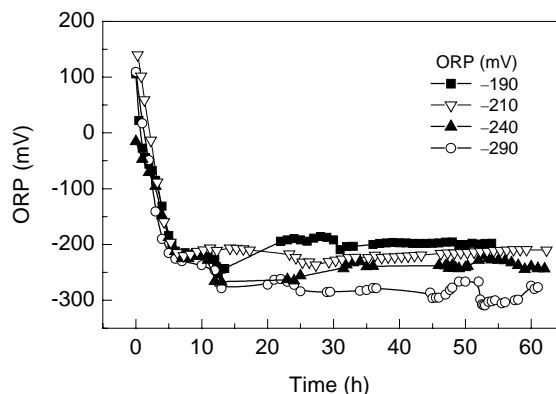


图 1 发酵过程 ORP 随时间的变化曲线  
Fig.1 ORP time courses in fermentations

的环境(如 ORP 为 -290 mV)对菌体的生长也有不利影响, 发酵液 ORP 控制在 -240 mV 左右时对菌体 *K. pneumoniae* F-1 生长最为有利.

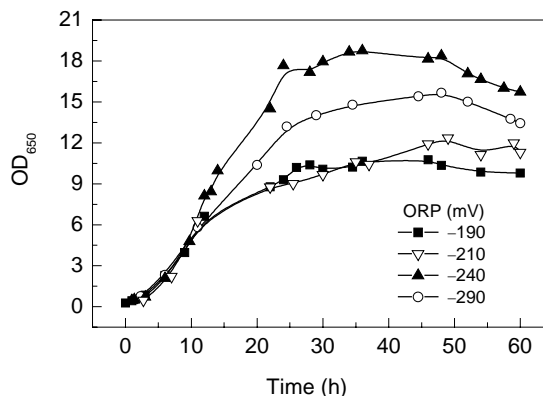


图 2 发酵液氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 菌体厌氧生长的影响  
Fig.2 Effect of ORP on cell growth of *K. pneumoniae* F-1

发酵液氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 合成 1,3-PD 的影响如图 3 所示. 还原性较强的发酵体系有利于 1,3-PD 的合成. 在 ORP 调控到 -240 及 -290 mV 的发酵体系中, 1,3-PD 合成浓度比 ORP 调控在 -190~-210 mV 的发酵体系高 15% 左右, 分别达到 81.5 及 78.5 g/L, 尤其是在 ORP 为 -240 mV 时, 最大 1,3-PD 合成速度(12~24 h)为 2.8 g/(L·h), 比 ORP 为 -190, -210 和 -290 mV 的最大 1,3-PD 合成速度分别提高了 71%, 69% 和 15%. 这说明 *K. pneumoniae* F-1 的最适 ORP 为 -240 mV 左右.

## 3.2 发酵液氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 中甘油代谢流的影响

*K. pneumoniae* 厌氧发酵的主要副产物是乙醇、2,3-丁二醇、乳酸、乙酸及少量甲酸等<sup>[14]</sup>. 本研究发现, 重组菌 *K. pneumoniae* F-1 厌氧发酵甘油时副产物主要有

乙酸、乙醇和乳酸, 2,3-丁二醇和琥珀酸的产量相对较低. 图4分别是不同的发酵液 ORP 下 *K. pneumoniae* F-1

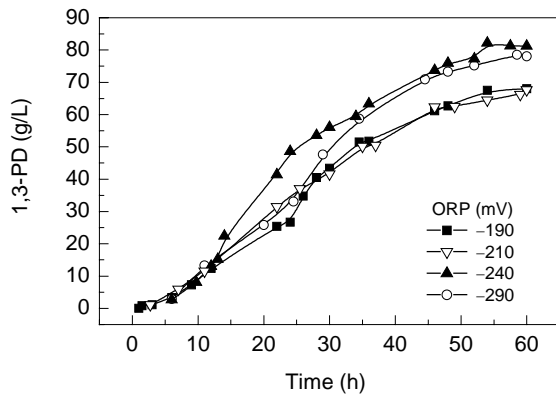


图3 发酵液氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 合成 1,3-PD 的影响

Fig.3 Effect of ORP on 1,3-PD synthesis by *K. pneumoniae* F-1

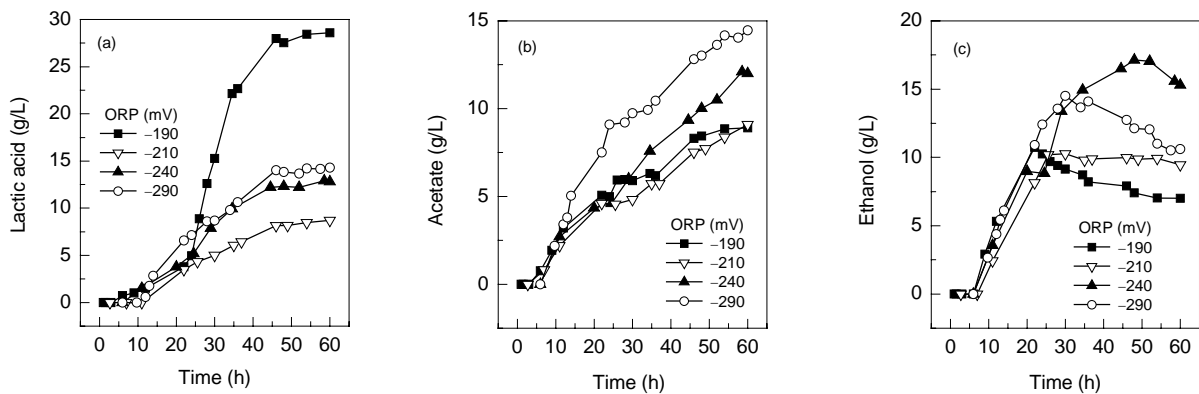


图4 氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 厌氧代谢副产物合成的影响

Fig.4 Effects of ORP on the formation of byproducts by the anaerobic fermentation of *Klebsiella pneumoniae* F-1

表1 氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 中甘油代谢流的影响

Table 1 Effects of ORP on yields of metabolites in the fermentation by *K. pneumoniae* F-1

ORP (mV)	Molar yields of metabolites from glycerol (mol/mol)					
	1,3-PD	Acetic acid	Ethanol	Lactic acid	2,3-Butanediol	Succinic acid
-190	0.396±0.006	0.065±0.003	0.066±0.003	0.139±0.006	0.005±0.001	0.006±0.001
-210	0.398±0.005	0.067±0.003	0.091±0.005	0.043±0.003	0.011±0.001	0.010±0.001
-240	0.423±0.006	0.095±0.005	0.090±0.004	0.062±0.004	0.009±0.001	0.011±0.001
-290	0.405±0.003	0.080±0.003	0.132±0.008	0.057±0.003	0.017±0.002	0.008±0.001

考察了 *K. pneumoniae* F-1 在不同氧化还原电位下 1,3-PD 得率的变化, 连同各种副代谢产物的得率列于表 1. 发酵液 ORP 为 -240 mV 时 1,3-PD 得率达到 0.423 mol/mol, 高于其他 3 种 ORP, 同时该条件下甘油厌氧发酵副产物乙酸及琥珀酸的得率也较高. 另外, 即使在最优 ORP 条件下, 1,3-PD 的得率仍远低于理论最大值 (0.72 mol/mol). 这说明虽然通过优化发酵液氧化还原电位可对 1,3-PD 浓度和得率进行一定程度的调控, 但胞外氧化还原电位对 *K. pneumoniae* F-1 甘油代谢网络的调控作用不是很显著. 进一步提高 1,3-PD 得率宜从

发酵甘油时 3 种主要代谢副产物的合成曲线(2~3 次实验的平均值). 由图可见, 3 种主要副产物受发酵液 ORP 的影响相差甚远. 4 种 ORP 下, 乙酸、乙醇及乳酸的合成都有 5~10 h 的延滞期, 乙酸在整个发酵过程中持续缓慢的合成和累积, 乳酸和乙醇在发酵前期能快速合成, 发酵中后期浓度基本维持恒定, 甚至略有下降. ORP 为 -190 mV 左右时, 乙酸和乙醇合成浓度均最低, 而乳酸合成浓度最高. 结合图 3 的结果可以看出, 较有利于 1,3-PD 合成的发酵体系(还原性较强, ORP 调控在 -240~-290 mV)中, 乙酸及乙醇的合成浓度均比 ORP 较高(-190~-210 mV)的体系提高 40% 以上[见图 4(b), 4(c)]; 而此时乳酸的合成浓度则居中(12~15 g/L 左右), 低于 ORP 为 -190 mV 的体系(乳酸浓度 28 g/L), 而高于 ORP 为 -210 mV 的体系(乳酸浓度 6 g/L 左右)[图 4(a)].

代谢节点(丙酮酸)通量调节方面考虑.

从表 1 也可以看出, 发酵体系还原性较强(ORP 为 -290 mV)时甘油到乙醇、2,3-丁二醇的得率较高, 还原性较低(ORP 为 -190 mV)时甘油到乳酸的得率则较高. 说明维持还原性氛围有利于甘油向 1,3-PD、乙醇、2,3-丁二醇等还原性较高的代谢物转化, 这可能与这些代谢过程中消耗较大量的还原型辅酶 NADH 有关<sup>[5]</sup>.

## 4 结论

(1) 基因工程菌株 *K. pneumoniae* F-1 最适的氧化还

原电位(ORP)为 $-240\text{ mV}$ ,与原始野生菌株 *K. pneumoniae* M5aL 和诱变菌株 *K. pneumoniae* YMU2 的最适 ORP(分别为 $-190$ 和 $-280\text{ mV}$ )都不同.这说明与出发菌株相比,由于基因工程改造使菌体辅酶代谢途径发生改变,菌株的最适 ORP 也随之改变.

(2) 可以利用 ORP 调控基因工程菌株的发酵. 在最适 ORP( $-240\text{ mV}$ )下, 1,3-PD 浓度及得率分别达到  $81.5\text{ g/L}$  及  $0.423\text{ mol/mol}$ . 同时, 调控发酵体系 ORP 还对菌体内的甘油代谢流分布产生了显著影响, 还原性氛围较有利于甘油向 1,3-PD、乙醇、2,3-丁二醇等还原性较高的代谢物转化.

#### 参考文献:

- [1] 修志龙. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 300–302.
- [2] 修志龙. 1,3-丙二醇的微生物法生产分析 [J]. 现代化工, 1999, 19(3): 33–35.
- [3] Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J, et al. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose–Glycerol Mixtures [J]. J. Bacteriol., 2001, 183(5): 1748–1754.
- [4] Homman T, Carmen T, Deckwer W D, et al. Fermentation of Glycerol to 1,3-Glycerol by *Klebsiella* and *Citrobacter* Strains [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1990, 33: 121–126.
- [5] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52(3): 289–297.
- [6] 黄志华, 张延平, 刘铭, 等. 甲酸脱氢酶在 *Klebsiella pneumoniae* 中的表达和功能分析 [J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 64–68.
- [7] Sridhar J, Eiteman M A. Influence of Redox Potential on Product Distribution in *Clostridium thermosuccinogenes* [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 1999, 82(2): 91–101.
- [8] Sridhar J, Eiteman M A. Metabolic Flux Analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*—Effects of pH and Culture Redox Potential [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 94(1): 51–69.
- [9] Riondet C, Cachon R, Wache Y, et al. Changes in the Proton-motive Force in *Escherichia coli* in Response to External Oxidoreduction Potential [J]. Eur. J. Biochem., 1999, 262: 595–599.
- [10] Riondet C, Cachon R, Wache Y, et al. Extracellular Oxidoreduction Potential Modifies Carbon and Electron Flow in *Escherichia coli* [J]. J. Bacteriol., 2000, 182: 620–626.
- [11] Du C Y, Yan H, Zhang Y P, et al. Use Oxidoreduction Potential as an Indicator to Regulate 1,3-Propanediol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 69: 554–563.
- [12] Du C Y, Zhang Y P, Li Y, et al. Novel Redox Potential-based Screening Strategy for Rapid Isolation of *Klebsiella pneumoniae* Mutants with Enhanced 1,3-Propanediol-producing Capability [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73: 4515–4521.
- [13] Zhang Y P, Li Y, Du C Y, et al. Inactivation of Aldehyde Dehydrogenase: A Key Factor for Engineering 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Metab. Eng., 2006, 8: 578–586.
- [14] Zeng A P, Biebl H, Schlieker H, et al. Pathway Analysis of Glycerol Fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of Reducing Equivalent Balance and Production Formation [J]. Enzyme Microbiol. Technol., 1993, 15: 770–779.

## Improvement of 1,3-Propanediol Production with a Recombinant Strain *Klebsiella pneumoniae* F-1 by Regulating Redox Potential

HUANG Zhi-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan-ping<sup>2,3</sup>, DU Chen-yu<sup>2</sup>, HUANG Xing<sup>2</sup>, CAO Zhu-an<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry and Biology Engineering, Sanming College, Sanming, Fujian 365004, China;

2. Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Redox potential (also called oxidoreduction potential, ORP) is one of important indicators to monitor the anaerobic fermentation of *Klebsiella pneumoniae*. In this report, the preferred ORP of a recombinant strain *K. pneumoniae* F-1 was investigated by controlling the ORP of broth into four levels of  $-190$ ,  $-210$ ,  $-240$  and  $-290\text{ mV}$ . The results showed that in the fermentation of ORP at  $-240\text{ mV}$ , the highest final 1,3-propanediol concentration and molar yield of were achieved, being  $81.5\text{ g/L}$  and  $0.423\text{ mol/mol}$ , respectively. This preferred ORP to the genetic modified strain was different from those of both the wild strain *K. pneumoniae* M5aL ( $-190\text{ mV}$ ) and the mutant *K. pneumoniae* M5aL YMU2 ( $-280\text{ mV}$ ). It is demonstrated that the modification of the metabolic pathway in the *K. pneumoniae* F-1 exerted effects on the preferred ORP of the strain. The effect of ORP on re-distribution of the metabolites was also investigated. The results demonstrated that the reduction environment facilitated the pathways from glycerol to reduction end-metabolites, such as 1,3-propanediol, ethanol and 2,3-butanediol. This work is the first investigation on the ORP regulation method in a recombinant strain, which will provide insight into the mechanism of ORP regulation in anaerobic fermentations.

**Key words:** 1,3-propanediol; cofactor (NADH) regeneration; redox potential; *Klebsiella pneumoniae*