

代谢副产物对 *Klebsiella pneumoniae* 生长及合成 1,3-丙二醇的影响

张延平, 刘铭, 杜晨宇, 沈金玉, 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 研究了 *Klebsiella pneumoniae* 在厌氧摇瓶中的生长代谢特性和基质消耗情况, 发现主要副产物乙醇是抑制菌体持续生长及 1,3-丙二醇合成的主要因素, 外源添加实验表明, 8 g/L 乙醇可使 *K. pneumoniae* 比生长速率、1,3-丙二醇比合成速率、最大菌体浓度及 1,3-丙二醇终浓度分别下降 21.6%, 22.1%, 59.6% 及 33.5%; 指数生长期加入乙醇对菌体生长代谢的抑制作用更加明显. 其他代谢副产物乙酸、乳酸、2,3-丁二醇对 *K. pneumoniae* 生长代谢也有不同程度影响, 乙酸浓度仅 2 g/L 即可对菌体生长产生抑制, 乙酸浓度达到 5 g/L 以上时对菌体生长有显著的抑制作用, 而 2,3-丁二醇与乳酸浓度需达到 10 g/L 时才会对菌体生长产生显著影响.

关键词: 乙醇; 抑制作用; 克氏肺炎杆菌; 1,3-丙二醇

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)05-0804-05

1 前言

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的溶剂和化工原料, 目前主要用于聚酯、聚醚、聚氨酯等的合成^[1,2]. 随着以其为单体的聚酯 PTT(聚对苯二甲酸丙二醇酯)的开发, 1,3-PD 的市场需求大大增加^[3]. 1,3-PD 的生产方法主要有化学法和微生物发酵法, 目前已工业化生产的主要是化学法. 虽然微生物生产 1,3-PD 的方法较化学合成法具有很多优点, 但发酵生产 1,3-PD 的同时还生成乙酸(Acetic acid)、乙醇(Ethanol)、2,3-丁二醇(2,3-BD)、乳酸(Lactic acid)等副产物, 在一定程度上影响菌体的生长及代谢^[4]. 有文献^[5]报道了外源添加乙酸对发酵合成 1,3-PD 的影响, 认为初始培养基中添加 0.6 g/L 乙酸有利于提高 1,3-PD 得率. 但 1,3-PD 发酵过程中其他副产物实际积累浓度对菌体生长代谢的影响尚不清楚. 本工作通过研究 *K. pneumoniae* 厌氧生长代谢的特点, 分析了发酵液中各主要副产物对菌体厌氧发酵的影响, 研究了 *K. pneumoniae* 对发酵副产物的耐受性.

2 实验材料与方法

2.1 菌株、培养基及培养条件

实验所用菌株为 *Klebsiella pneumoniae* M5aL, 由中国农业大学赠送.

好氧种子培养基及厌氧转化培养基(发酵培养基)碳源均为甘油, 初始浓度 30 g/L, 以 2 g/L CaCO₃ 调节 pH, 其他组分同文献^[6,7], 121 °C 灭菌 15 min.

K. pneumoniae 先接种好氧种子摇瓶培养, 35 °C, 130 r/min, 以 CaCO₃ 调节 pH 为 7.0; 摇床好氧培养 10 h

左右, 使 OD₆₅₀ 达到 3~5, 然后以 5% 的接种量转接厌氧摇瓶, 通入适量氮气进行厌氧发酵培养. 为保持发酵液中甘油浓度在 10~30 g/L 的合适范围内, 厌氧发酵过程中在 12 及 24 h 分别补加 10 g/L 甘油. 实验结果取 3 个平行样的平均值.

2.2 菌体浓度测定

菌体浓度通过测定发酵液在 650 nm 处的吸光度值 OD₆₅₀ 来衡量. 所用仪器为 Agilent 8453 紫外可见分光光度计(安捷伦科技有限公司).

2.3 底物及代谢产物浓度分析

发酵液中底物甘油及产物 1,3-PD、副产物乙酸、乙醇、乳酸、2,3-丁二醇、琥珀酸(Succinic acid)等浓度均采用 SHIMADAZU 10A 型高效液相色谱仪(岛津制作所生产)测定. 色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65 °C, 流动相为 0.005 mol/L 的 H₂SO₄, 流速 0.8 mL/min, 检测器为 RID-10A 型折光示差检测器^[6,8].

发酵液中的 NH₄⁺ 浓度测定采用靛酚兰比色法^[9].

2.4 厌氧发酵时菌体比生长速率及 1,3-PD 比合成速率的计算

菌体比生长速率

$$\mu = dx/(xdt) = \Delta x/(x\Delta t) = \Delta(\ln x)/\Delta t,$$

取 Δt 为尽可能小的时间间隔.

菌体实际最大比生长速率

$$\mu_{\max} = \max(\mu),$$

菌体在 12~24 h 间的平均比生长速率

$$\mu_{12-24} = [2/(x_{12}+x_{24})][(x_{24}-x_{12})/12] = (x_{24}-x_{12})/[6(x_{12}+x_{24})].$$

收稿日期: 2005-11-07, 修回日期: 2006-02-27

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: 2003CB716000)

作者简介: 张延平(1978-), 女, 山东省潍坊市人, 博士研究生, 生物化工专业; 曹竹安, 通讯联系人, Tel: 010-62785514, E-mail: cza-dce@mail.tsinghua.edu.cn.

以上各式中 x 为菌体浓度, t 为发酵时间, 下标 12, 24 为时间(h).

同样的, 1,3-PD 比合成速率

$$\rho = dC_{1,3-PD} / (xdt) = \Delta C_{1,3-PD} / (x\Delta t),$$

1,3-PD 最大比合成速率

$$\rho_{\max} = \max(\rho),$$

12~24 h 间 1,3-PD 平均比合成速率

$$\rho_{12-24} = (C_{1,3-PD,24} - C_{1,3-PD,12}) / [6(x_{12} + x_{24})].$$

以上各式中 $C_{1,3-PD}$ 为 1,3-PD 浓度, 下标 12, 24 为时间(h).

3 结果及讨论

3.1 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 合成

实验首先通过摇瓶厌氧实验研究了 *K. pneumoniae* 厌氧生长及合成 1,3-PD 的情况. 活化后的菌种先好氧培养过夜, 然后以 5% 的接种量转接厌氧发酵培养基, 通氮气进行厌氧培养, 每隔 12 h 左右取样测定菌体浓度及 1,3-PD 浓度, 结果如图 1 所示.

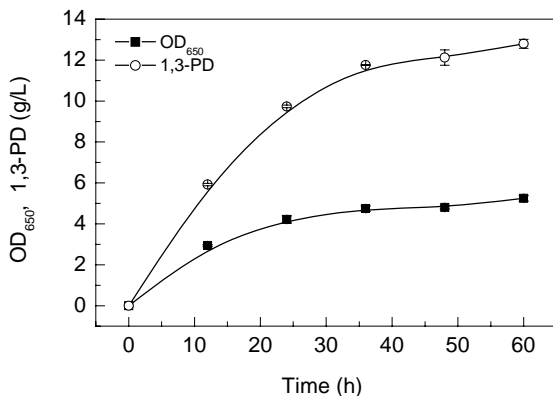


图 1 *K. pneumoniae* M5aL 厌氧发酵菌体生长及 1,3-PD 合成曲线
Fig.1 Cell growth and 1,3-PD production by *K. pneumoniae* M5aL under anaerobic conditions

K. pneumoniae 厌氧培养时菌体生长及 1,3-PD 合成大致可分为两个阶段, 前 36 h 菌体生长及 1,3-PD 合成较快, 36 h 后菌体浓度及 1,3-PD 浓度基本不再提高. 菌体生长停滞时 1,3-PD 的合成也随之减缓. 因此, 要提高 1,3-PD 合成浓度, 需避免菌体生长过早停滞.

3.2 基质消耗

菌体生长代谢过程中基质不断消耗. 本工作中 *K. pneumoniae* 厌氧发酵培养基的碳源主要是甘油, 无机氮源主要是硫酸铵. 实验中发现, 2 g/L 硫酸铵完全可以满足摇瓶实验的氮源消耗(见图 2), 不是导致菌体生长代谢停滞的原因.

由图 2 可见, *K. pneumoniae* 厌氧发酵过程中甘油

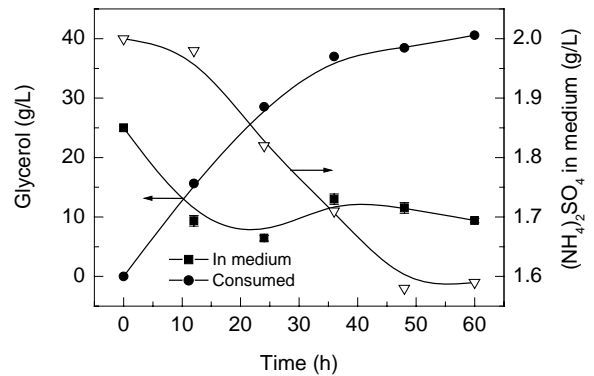


图 2 *K. pneumoniae* M5aL 厌氧发酵甘油及硫酸铵浓度控制
Fig.2 Concentration regulation of glycerol and ammonium sulphate during the anaerobic culture of *K. pneumoniae* M5aL

被不断消耗, 甘油消耗速率与菌体生长、1,3-PD 合成速率基本呈正相关. 本研究通过间歇补加甘油的方法, 可以将甘油浓度控制在 8~25 g/L 之间, 发酵后期培养基中的甘油足够 *K. pneumoniae* 生长及代谢利用, 所以培养基中的碳源也不是导致 *K. pneumoniae* 生长代谢停滞的主要因素.

3.3 代谢副产物对 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 合成的影响

3.3.1 *K. pneumoniae* 厌氧发酵过程中副产物的累积

K. pneumoniae 厌氧发酵时, 一部分底物甘油经还原途径转化为 1,3-PD, 还有一部分甘油被氧化为丙酮酸, 然后进一步转化为乙酸、乙醇、乳酸、2,3-丁二醇等. 摇瓶厌氧发酵时主要副产物依次是乙醇、乳酸和 2,3-丁二醇, 乙酸和琥珀酸合成浓度很低. 如图 3 所示, 发酵前期乙醇积累较多, 发酵 24 h 乙醇浓度超过 4 g/L, 随着发酵时间延长, 乙醇浓度略有下降, 乳酸和 2,3-丁二醇开始积累, 发酵液中乳酸和 2,3-丁二醇浓度基本在 36 h 达到较大值, 与菌体生长及 1,3-PD 合成曲线一致.

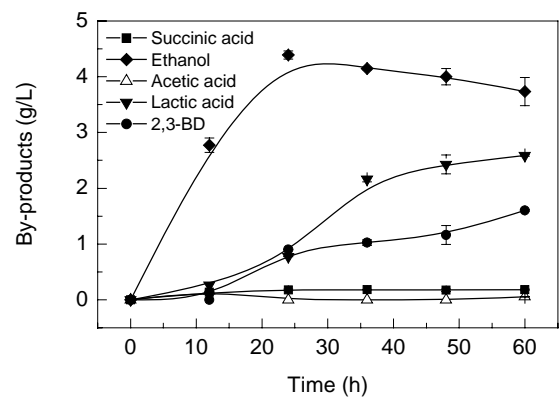


图 3 *K. pneumoniae* M5aL 厌氧发酵代谢副产物累积曲线
Fig.3 Accumulation of by-products during the anaerobic culture of *K. pneumoniae* M5aL

3.3.2 主要副产物对 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 合成的影响

由图 3 可知, *K. pneumoniae* 厌氧培养的前 36 h 副产物乙醇、乳酸、2,3-丁二醇及乙酸的最高浓度分别为 4.4, 2.16, 1.03 及 0.46 g/L. 以这些数值为基准分别研究了其对 *K. pneumoniae* 生长代谢的影响.

(1) 乙醇对菌体生长代谢的影响

向发酵培养基中添加乙醇, 研究了乙醇对 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 合成的影响. 分别在初始发酵培养基中(0 h)添加 4 或 8 g/L 乙醇, 或在培养 12 h 后补加 4 或 8 g/L 乙醇, 不同实验方案发酵液中乙醇浓度变化如图 4 所示. 培养基中添加较高浓度乙醇时, 发酵液中乙醇量基本不再增加, 甚至有所下降, 这可能与乙醇自身的挥发及被菌体转化利用有关. 总之在该实验条件下, 发酵液中乙醇最高浓度可分别达到 4 或 8 g/L 左右. 表 1 显示了不同乙醇浓度下 *K. pneumoniae* 的实际最大比生长速率(μ_{\max})、最高菌体浓度(OD_{\max})、最大 1,3-PD 产率(ρ_{\max})、最高 1,3-PD 浓度($C_{1,3-PD}$)及反映乙醇刺激响应程度的平均比生长速率(μ_{12-24})和 1,3-PD 平均比合成速率(ρ_{12-24}). 由表可知, 乙醇浓度高于 4 g/L 确实会抑制 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 的合成, 乙醇

浓度越高, 抑制作用越明显, 8 g/L 乙醇可使 *K. pneumoniae* 实际最大比生长速率、1,3-丙二醇最大比合成速率、最大菌体浓度及最高 1,3-丙二醇浓度分别下降 21.6%, 22.1%, 59.6% 及 33.5%; 指数生长期加入乙醇对菌体生长代谢的抑制作用更加显著. 实际发酵过程中由于前期乙醇积累较快, 在菌体生长的指数期发酵液中乙醇即可达到较高浓度, 因此会在很大程度上抑制 *K. pneumoniae* 的菌体生长及 1,3-PD 合成.

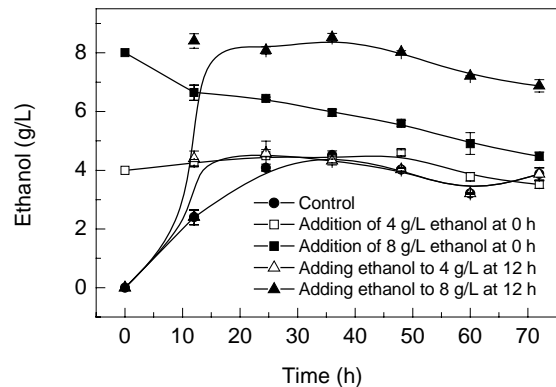


图 4 不同实验条件下乙醇时变曲线

Fig.4 Curves of ethanol concentration in various schemes during anaerobic culture of *K. pneumoniae* M5aL

表 1 乙醇对 *K. pneumoniae* M5aL 菌体生长及 1,3-PD 合成的影响

Table 1 Effect of ethanol on cell growth and biosynthesis of 1,3-PD by *K. pneumoniae* M5aL

Condition	Cell growth			Biosynthesis of 1,3-PD		
	μ_{\max} (h^{-1})	μ_{12-24} (h^{-1})	OD_{\max}	ρ_{\max} [$g/(L \cdot h \cdot OD)$]	ρ_{12-24} [$g/(L \cdot h \cdot OD)$]	$C_{1,3-PD}$ (g/L)
Control	0.282	0.038	4.88	0.548	0.155	11.03
0 h, 4 g/L ethanol	0.282	0.036	4.10	0.539	0.150	8.93
0 h, 8 g/L ethanol	0.221	0.029	1.97	0.427	0.142	7.34
12 h, 4 g/L ethanol	-	0.033	4.13	-	0.144	9.15
12 h, 8 g/L ethanol	-	0.022	3.14	-	0.127	7.92

表 2 *K. pneumoniae* M5aL 对乳酸、2,3-丁二醇及乙酸的耐受性

Table 2 Resistances of lactic acid, acetic acid and 2,3-butanediol to *K. pneumoniae* M5aL (number of colonies)

Condition	Concentration of additives (g/L)				
	0	0.5	2	5	10
LB medium+lactic acid	150~180	150~180	150~180	150~180	130~150
LB medium+2,3-butanediol	150~180	150~180	150~180	100~120	56
LB medium+acetic acid	150~180	150~180	63	17	0

另外, 副产物乙醇及目的产物 1,3-PD 的还原性都高于底物甘油^[10], 二者在合成过程中都需要消耗还原型辅酶 NADH, 因此, 乙醇的大量积累不仅抑制了菌体的生长代谢, 而且会与 1,3-PD 合成过程竞争性地消耗 NADH, 降低 1,3-PD 得率.

(2) 副产物乳酸、2,3-丁二醇及乙酸对 *K. pneumoniae* 菌体生长的影响

厌氧摇瓶发酵实验中副产物乳酸、2,3-丁二醇及乙酸积累量较少(见图 3), 实验证明该浓度对 *K. pneumoniae* 菌体生长及 1,3-PD 合成不会产生明显影响.

但 *K. pneumoniae* 对这些物质也具有一定的耐受性, 将活化后的 *K. pneumoniae* 稀释到一定浓度后分别涂布到含有不同浓度乳酸、2,3-丁二醇及乙酸的 LB 固体培养基上, 37℃培养 20 h 后培养基上单菌落数如表 2 所示.

乳酸、2,3-丁二醇及乙酸对 *K. pneumoniae* 菌体生长的抑制作用由强到弱依次是乙酸>2,3-丁二醇>乳酸, 乙酸浓度仅 2 g/L 即可对菌体生长产生抑制, 达到 5 g/L 以上时对菌体生长有显著的抑制作用, 2,3-丁二醇浓度不超过 5 g/L 时对菌体生长影响不大, 而乳酸浓度高达 10 g/L 时对菌体生长仍然无显著影响.

图5是 *K. pneumoniae* 在发酵罐中厌氧培养的结果,副产物乙醇、乙酸的浓度在 20 h 分别达到 8 和 4 g/L 左右,此时菌体生长及 1,3-PD 合成减缓(乳酸、2,3-丁二醇最高合成浓度分别为 5 及 3 g/L,对菌体生长代谢影响不大),而随着乙醇、乙酸浓度进一步提高,到 40 h 以后菌体生长及产物合成基本停滞.实际发酵现象与上述研究结果一致,进一步说明该工艺条件下 *K. pneumoniae* 厌氧发酵过程中主要副产物乙醇、乙酸的积累对菌体生长代谢有不利影响.

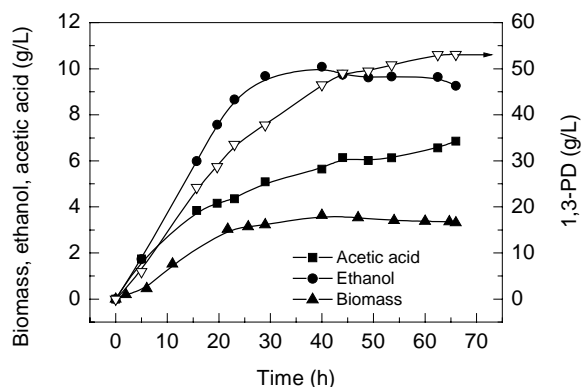


图5 *K. pneumoniae* M5aL 发酵罐厌氧培养结果
Fig.5 Fermentation results of *K. pneumoniae* in bioreactor M5aL

乙酸在很多微生物发酵过程中都是主要代谢副产物之一^[11,12],其形成机理比较复杂.减少乙酸的生成一般认为可以通过培养基优化^[13]、发酵过程控制^[14-16]、选育磷酸转乙酰酶(PTA)或乙酸激酶(ACK)缺失突变株^[17]等方法.近年来应用代谢工程方法将代谢流引向一些无毒性或毒性较小的代谢产物,如糖原^[18]、乙酰乳酸^[19]等,也不失为一种可行的策略.

摇瓶实验条件下发酵液中副产物乳酸、2,3-丁二醇及乙酸积累浓度较低,不会对 *K. pneumoniae* 的生长和代谢产生明显影响.但在发酵罐实验中,副产物乙酸合成较多,对菌体生长代谢的影响是不可忽略的,因此需要考虑这些问题,通过代谢调控等方法,降低副产物的抑制作用.

4 结论

K. pneumoniae M5aL 摇瓶厌氧培养时 36 h 左右菌体生长基本停滞,1,3-丙二醇合成速度开始下降.研究发现,培养基中碳、氮源浓度不是造成菌体生长代谢停滞的主要原因.

K. pneumoniae M5aL 厌氧摇瓶培养时的主要副产物依次是乙醇、乳酸及 2,3-丁二醇,乙酸和琥珀酸产量很低;该条件下乙醇的积累对菌体生长产生抑制,对

1,3-PD 的合成也明显不利;8 g/L 乙醇可使菌的实际最大比生长速率、1,3-丙二醇最大比合成速率、菌体浓度及 1,3-丙二醇终浓度分别下降 21.6%, 22.1%, 59.6% 及 33.5%;指数生长期较高浓度乙醇对菌体生长代谢的抑制作用更加显著.因此需要在后续的研究中对乙醇的合成进行调控.

K. pneumoniae 对各种副产物的耐受性不同,乙酸在 5 g/L 时明显抑制菌体生长,而 2,3-丁二醇与乳酸浓度需达到 10 g/L 或以上才会对菌体生长产生显著影响.厌氧摇瓶培养时发酵液中副产物乙酸、乳酸、2,3-丁二醇的积累浓度较低,对 *K. pneumoniae* 的生长代谢不会造成明显影响;但在发酵罐实验时,乙酸的快速积累对菌体生长和产物合成都会产生明显抑制作用.

参考文献:

- [1] Zeng A P, Biebl H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends [J]. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 2002, 74: 239-259.
- [2] Barbirato F, Himmi H E, Conte T, et al. 1,3-Propanediol Production by Fermentation: An Interesting Way to Valorize Glycerin from the Ester and Ethanol Industries [J]. Industrial Crops and Products, 1998, 7: 281-289.
- [3] 张忠安. PTT 纤维生产技术和应用 [J]. 合成纤维工业, 2003, 26(1): 42-44.
- [4] Zeng A P, Ross A, Biebl H, et al. Multiple Product Inhibition and Growth Modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in Glycerol Fermentation [J]. Biotechnol. Bioeng., 1994, 44: 902-911.
- [5] 蒋洁, 张栩, 谭天伟. 乙酸对 1,3-丙二醇发酵的影响 [J]. 北京化工大学学报, 2005, 32(5): 36-42.
- [6] 张延平, 杜晨宇, 饶治, 等. 维生素 C 和 E 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的调控 [J]. 过程工程学报, 2005, 5(2): 197-200.
- [7] Ahrens K, Menzel K, Zeng A P, et al. 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 [J]. Biotechnol. Bioeng., 1998, 59: 544-552.
- [8] Cocaigh-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, et al. Rational Development of a Simple Synthetic Medium for the Sustained Growth of *Lactococcus lactis* [J]. J. Appl. Bacteriol., 1995, 79: 108-116.
- [9] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986. 296-297.
- [10] Stephanopoulos G N, Arititou A A, Nielsen J. 代谢工程—原理与方法 [M]. 赵学明, 白冬梅, 李文钊, 等, 译. 北京: 化学工业出版社, 2003. 72.
- [11] 冯尔玲, 于公义. 工程菌发酵过程中乙酸的生成及其控制方法 [J]. 生物技术通讯, 1995, 6(4): 184-186.
- [12] 朱才庆, 叶勤. 大肠杆菌 DH5 α 及其耐乙酸突变株生长和产乙酸规律 [J]. 华东理工大学学报, 2004, 30(1): 51-56.
- [13] Han K. Acetate Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation [J]. Biotechnol. Bioeng., 1991, 39: 663-671.
- [14] 丛春水, 苏志国. 重组大肠杆菌的分批补料培养方法 [J]. 微生物学杂志, 1998, (18): 44-47.

- [15] 杜鹏, 叶勤, 俞俊棠. 大肠杆菌偶合乙酸分离的过滤培养 [J]. 生物工程学报, 2000, (16): 528–530.
- [16] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K, et al. Simple Fed-batch Technique for High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* [J]. J. Biotechnol., 1995, 39: 59–65.
- [17] Brown T D K, Jones-Mortimer M M, Kornberg H L. The Enzymic Interconversion of Acetate and Acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli* [J]. J. Gen. Microbiol., 1977, 102: 327–336.
- [18] Dedhia N N, Hottiger T, Bailey J E. Overproduction of Glycogen in *Escherichia coli* Blocked in the Acetate Pathway Improves Cell Growth [J]. Biotechnol. Bioeng., 1994, 44: 132–139.
- [19] Aristidou A A, San K Y, Bennett G N. Modification of Central Metabolic Pathway in *Escherichia coli* to Reduce Acetate Accumulation by Heterologous Expression of the *Bacillus subtilis* Acetolactate Synthase Gene [J]. Biotechnol. Bioeng., 1994, 44: 944–951.

Effect of By-products on Cell Growth and Biosynthesis of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*

ZHANG Yan-ping, LIU Ming, DU Chen-yu, SHEN Jin-yu, CAO Zhu-an

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Biosynthesis of 1,3-propanediol attracted much attention recently. The cell growth and biosynthesis of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* tended to be ceased in the latter phase of anaerobic culture. The effect of environmental factors was studied in this work. It was indicated that the main by-product ethanol was the key inhibitor. Addition of 4 g/L ethanol in the culture medium would restrain the cell growth and 1,3-propanediol formation. By addition of 8 g/L ethanol, the maximum specific rates of cell growth and 1,3-propanediol biosynthesis, the maximum concentrations of biomass and 1,3-propanediol were decreased by 21.6%, 22.1%, 59.6% and 33.5% respectively. The inhibition potentials of other by-products on the anaerobic growth of *K. pneumoniae* were also detected. It was shown that the cell growth was inhibited obviously with 2 g/L acetic acid, yet it would not be affected even with 5 g/L 2,3-butanediol or 10 g/L lactic acid.

Key words: ethanol; inhibitory effect; *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-propanediol