

氧对 *Klebsiella pneumoniae* 产 1,3-丙二醇代谢的影响

林日辉, 刘宏娟, 孙燕, 郝健, 程可可, 刘德华

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 考察了氧对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵产 1,3-丙二醇(PDO)代谢的影响. 研究表明, 在厌氧或供氧条件下, *K. pneumoniae* 都能利用甘油产 PDO. 起始甘油浓度 20 g/L, 发酵时间 4 h, 在充分供氧条件下, PDO 产量仅为 1.1 mmol/L; 但在微量供氧条件下, PDO 产量为 16 mmol/L, 是厌氧发酵时的 1.28 倍. 在微量供氧条件下, 调控 PDO 合成的关键酶甘油脱氢酶、甘油脱水酶及 1,3-丙二醇氧化还原酶的活性分别为 7.28, 1.14, 0.52 U/mg, 高于厌氧或充分供氧条件下的相应酶活性. 氧对细胞内 NADH 的合成也有影响, 厌氧及微量供氧条件下菌体内 NADH 含量分别为 3.78 及 3.72 $\mu\text{mol/g}$ (DCW), 高于充分供氧发酵时的 0.85 $\mu\text{mol/g}$ (DCW).

关键词: *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-丙二醇; 氧; 代谢

中图分类号: TQ923

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)01-0096-04

1 前言

1,3-丙二醇(PDO)是一种重要的化工原料, 它最主要的用途是作为新型聚酯(如 PTT)、聚醚和聚亚氨基酯的单体, 另外可用于生产溶剂、抗冻剂或保护剂等, 有着广泛的应用前景^[1]. 1,3-丙二醇可通过化学法和生物法生产, 在生物发酵法中, 克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)是目前研究较多的生产菌株之一.

K. pneumoniae 是一种兼性厌氧菌, 在好氧和厌氧条件下分别使用两套不同的途径代谢甘油(图 1). 在好氧条件下甘油代谢由 3-磷酸甘油操纵子(*glp*)调控: 甘油在依赖 ATP 的甘油激酶(GK)催化下磷酸化, 生成 3-磷酸甘油(G3P), 3-磷酸甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶作用下转化为磷酸二羟丙酮(DHAP)进入酵解途径. 3-磷酸甘油操纵子酶系的表达为 G3P 诱导. 在厌氧条件下甘油的代谢主要由二羟丙酮操纵子(*dha*)调控, 分为氧化和还原两条支路: 在氧化支路中, 甘油在依赖 NAD^+ 的甘油脱氢酶(GDH)的催化作用下脱氢转变为二羟丙酮(DHA), 二羟丙酮在二羟丙酮激酶的作用下磷酸化为磷酸二羟丙酮, 进而进入酵解途径产生 ATP 及 NADH、乙醇、乙酸、乳酸等代谢副产物; 在还原支路中, 甘油在甘油脱水酶(GDHt)的作用下转变为 3-羟基丙醛, 然后利用氧化途径产生的 NADH, 在依赖于 NADH 的 1,3-丙二醇氧化还原酶的作用下生成 1,3-丙二醇. 通过利用 NADH 还原 3-羟基丙醛, 菌体在生理上实现了 NAD^+ 的再生. 甘油脱氢酶、二羟丙酮激酶、甘油脱水酶及 1,3-丙二醇氧化还原酶的表达受到二羟丙酮的强烈诱导^[2].

目前国内外利用微生物发酵生产 PDO 普遍在厌氧

条件下进行^[3,4], 这需要制氮设备维持发酵的厌氧环境, 工业化生产时必将大大增加固定设备的投资及能耗. Chen 等^[5]研究了在微量供氧条件下 *K. pneumoniae* 发酵生产 PDO, 结果获得了比厌氧发酵更高的生产强度; Cheng 等^[6]在补料批次发酵中采用前期厌氧、后期供氧的发酵工艺, 获得了 70 g/L 的 PDO 浓度. 目前对 PDO 的研究主要集中在工艺优化上, 而代谢机理的研究还很缺乏. 本研究通过比较厌氧、微量供氧、充分供氧 3 种发酵条件下 PDO 代谢特性及其代谢关键酶的变化以及代谢过程中还原力(NADH)的变化, 就氧对 *K. pneumoniae* 的 PDO 代谢调控机理进行了初步的探讨. 为了避免长时间发酵的一些不确定因素影响, 在菌体进入对数生长期后(4 h)即进行取样分析.

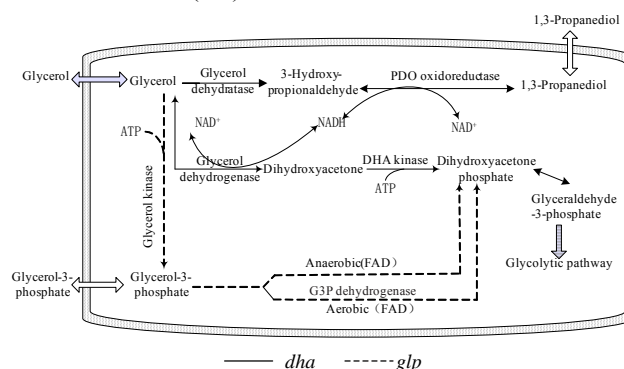


图 1 克雷伯氏肺炎杆菌代谢甘油途径

Fig.1 Pathways for glycerol dissimilation in *K. pneumoniae*

2 材料与方法

2.1 菌种及培养方法

菌种: 中国农业大学赠送的克雷伯氏肺炎杆菌

收稿日期: 2005-03-21, 修回日期: 2005-04-19

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

作者简介: 林日辉(1972-), 男, 广西省梧州市人, 博士研究生, 应用化学专业; 刘德华, 通讯联系人.

(*Klebsiella pneumoniae* M5al).

培养基组成及种子培养方法见文献[6].

摇瓶发酵: 起始甘油浓度 20 g/L, 500 mL 摇瓶装液量为 100 mL, 培养温度 37 °C, 摇床转速 120 r/min. 接种后向摇瓶充入无菌 N₂, 并以胶塞封瓶口, 维持厌氧发酵状态; 微量供氧发酵则直接以 6 层纱布加 2 层报纸封口; 充分供氧发酵使用带挡板三角瓶并以 6 层纱布封口.

2.2 分析方法

2.2.1 生物量

细胞干重(DCW)根据干重与 OD₆₅₀ 对应的标准曲线计算.

2.2.2 代谢物的检测

发酵底物、产物及副产物使用高效液相色谱(HPLC)测定^[6], 色谱柱为 Aminex[®] resin-based 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, 温度 65 °C, 进样量为 20 μL.

2.2.3 细胞抽提液的制备

取含细胞干重约 15 mg 的发酵液, 4 °C 及 10000 r/min 冷冻离心 5 min, 收集菌体; 以 pH 7.4 的 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液洗涤菌体, 含 2 mmol/L 二硫苏糖醇的同一缓冲液将菌体制成菌悬液, 在冰浴下进行超声波细胞破碎(200 W, 3 s 作用、6 s 间隔, 99 个循环); 细胞匀浆 4 °C 下、12000 r/m 冷冻离心 5 min, 取上清液即为粗提液.

2.2.4 酶活性的检测

甘油脱氢酶(EC 1.1.1.6)、1,3-丙二醇氧化还原酶(EC 1.1.1.202)、甘油脱水酶(EC 4.2.1.30)、乳酸脱氢酶(EC 1.1.2.3)、乙醇脱氢酶(EC 1.1.1.1)、磷酸乙酰转移酶(EC 2.3.1.8)检测方法见文献[7]. 酶活单位定义为 1 min 催化 1 μmol 底物的酶量.

2.2.5 NADH 及 NAD⁺的提取检测

提取: 取发酵液 1 mL 分别用 3 mol/L 的 HCl 提取 NAD⁺, 5 mol/L 的 KOH 提取 NADH.

检测: NADH 及 NAD 利用酶循环方法检测^[8]. 循

环反应系统中含 0.15 mol/L (pH 7.4)甘氨酸/烟酸缓冲液, 0.8 mg 5-乙基吩嗪硫酸盐(PES), 1 mg 噻唑蓝(MTT), 35 μL 乙醇, 25 μL 样品, 30 U 乙醇脱氢酶. 以 ΔA₅₇₀ 对反应时间作图, 得到吸光度对时间变化的斜率, 根据标准曲线算出样品中 NADH 或 NAD⁺的浓度.

2.2.6 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白^[9].

3 结果与讨论

3.1 菌体生长

在摇瓶中分别进行厌氧、微量供氧、充分供氧发酵. 发酵 4 h 时菌体生长情况如表 1 所示. 可见提高发酵体系溶氧有利于 *K. pneumoniae* 的生长, 在充分供氧发酵条件下, 菌体的生物量最高, 微量供氧发酵次之, 厌氧发酵最低. Chen 等^[5]在微量供氧条件下发酵也得到比厌氧发酵更快的菌体生长速率. 这是因为菌体的合成代谢需要各种前体物质及能量, 在完全厌氧的条件下, 菌体产生 ATP 方式只有底物磷酸化, 产能效率低, 菌体生长缓慢; 在有氧条件下, 菌体通过 TCA 循环及氧化磷酸化可以为菌体提供大量的小分子前体物质和 ATP, 使菌体的生长较快.

3.2 底物消耗及产物合成

发酵 4 h 时底物消耗及产物合成结果如表 1 所示. 在不同的发酵条件下, *K. pneumoniae* 对甘油的利用有明显区别, 在厌氧及微量供氧下消耗甘油较快, 而充分供氧下虽然具有高的菌浓密度, 但甘油消耗却是最慢的. 充分供氧条件下发酵主要产物是乙酸, 还有少量的 2,3-丁二醇及 PDO; 厌氧发酵及微量供氧发酵产物组分基本一致, 主要产物都是 PDO, 副产物包括是乙醇、乳酸、2,3-丁二醇及少量的丁二酸. 充分供氧发酵的 PDO 得率很低, 厌氧及微量供氧发酵的 PDO 得率基本一致. 这说明在厌氧和微量供氧条件下, *dha* 途径是甘油的主要代谢途径, 而在充分供氧条件下甘油主要通过 *glp* 途径代谢, 但菌体仍然可以通过 *dha* 途径代谢甘油.

表 1 不同发酵条件下底物消耗及产物合成

Table 1 Substrate consumption and product formation under different fermentation conditions

Condition	Glycerol consumption (mmol/L)	Product (mmol/L)						Dry weight (g/L)	Y _{PDO} (mmol/mol)
		Succinate	Lactate	Acetate	PDO	2,3-Butanediol	Ethanol		
Anaerobic	57.1	0.3	3.3	Not detected	12.5	3.5	6.4	0.85	218
Micro-aerobic	71.1	0.1	3.0	Not detected	16.0	3.7	10.3	1.00	2221
Aerobic	28.3	Not detected	Not detected	1.5	1.1	0.6	Not detected	1.38	38

3.3 氧对 PDO 代谢关键酶的影响

由操纵子 *dha* 控制表达产生的 GDH, GDHt 及 PDOR 是厌氧代谢甘油产生 PDO 的关键酶, 其活性高

低将直接影响 PDO 的合成^[10]. 在厌氧、微量供氧及充分供氧条件下发酵 4 h 时 GDH, GDHt 及 PDOR 活性如图 2 所示. 可以看出, 在 3 种发酵条件下 GDH, GDHt

及 PDOR 都有活性,这进一步证明尽管 *dha* 基因系统是在厌氧条件下代谢甘油的主要途径,但在微量供氧甚至充分供氧下也可以表达. Forage 等^[2]对 *K. pneumoniae* NCIB 418 及其突变株的酶学分析也表明,在有氧环境中,甘油浓度高于 3~10 mmol/L 时, *dha* 操纵子可以表达.

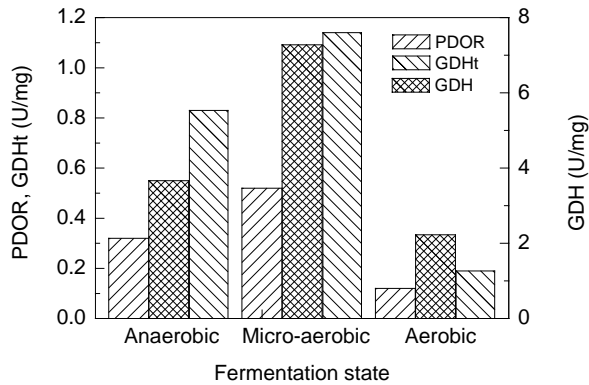


图2 氧对 PDO 代谢关键酶活性的影响
Fig.2 Effect of oxygen on the key enzymes of PDO biosynthesis

对比 3 种发酵状态,在微量供氧发酵时 GDH 活性比厌氧发酵提高了 98%,而在充分供氧发酵时比厌氧发酵下降了 39%; GDHt 活性在微量供氧发酵时最高,比厌氧发酵时提高了 37%,但在充分供氧时其活性大幅度下降,比厌氧发酵降低了 78%; PDOR 的酶活在微量供氧发酵时活性比厌氧发酵提高了 66%,而在充分供氧时则降低了 62%,可见在微量供氧条件下 3 种关键酶的比活最高.推测其原因是:在充分供氧时,一方面由于氧分子对 *dha* 操纵子的表达有强烈的阻遏作用,另外氧分子还会抑制 GDH 及 GDHt 的活性,甚至使之失活^[11,12],因此酶活性很低;微量供氧条件下,氧对 *dha* 操纵子的抑制不显著,同时微量供氧发酵比厌氧发酵能获得更多的 ATP 及代谢中间产物,更利于生物酶的合成,因此在微量供氧条件下 3 种关键酶的比活最高.张延平等^[13]在培养 *K. pneumoniae* 时外源添加 ATP,也提高了 GDHt 的酶活.

3.4 氧对 PDO 代谢副产物合成酶的影响

乳酸、乙酸、乙醇是 *K. pneumoniae* PDO 代谢过程中的主要副产物,其代谢关键酶乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸乙酰转移酶(PTA)及乙醇脱氢酶(ADH)在厌氧、微量供氧、充分供氧 3 种发酵条件下酶活的变化如图 3 所示. LDH 及 ADH 活性在微量供氧发酵时最高,在充分供氧发酵时最低,与副产物乳酸、乙醇产率变化完全一致.因此,在微量供氧发酵时,虽然 PDO 合成关键酶活性有所提高,从而提高了 PDO 的生产强度,但同时由于一些副产物合成相关酶的活性也相应提高,使副产物合成

加快,因此 PDO 对甘油的得率并未显著提高.随着发酵体系溶氧的提高,PTA 活性呈持续下降趋势,其中微量供氧发酵时其活性比厌氧发酵下降了 29%,在充分供氧发酵时其活性比厌氧发酵下降了 52%.然而,本实验仅在充分供氧发酵时检测出了乙酸(表 1),说明乙酸的生成除了受菌体内 PTA 酶量影响外,更主要是受到胞内环境对 PTA 活性调节的影响.

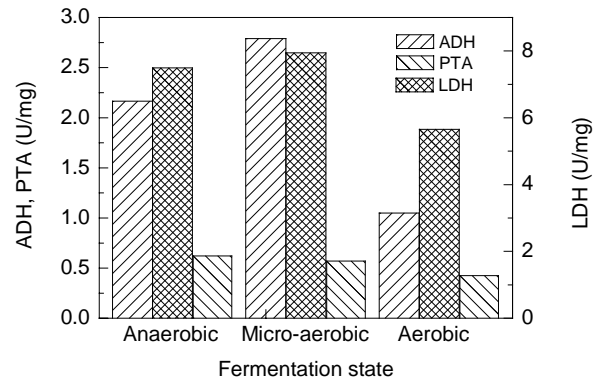


图3 氧对 PDO 代谢副产物合成酶的影响
Fig.3 Effect of oxygen on enzymes of by-products production

3.5 氧对菌体内 NAD 及 NADH 含量的影响

不同发酵状态下菌体内 NAD 及 NADH 含量见图 4,厌氧及微量供氧时菌体内 NADH 基本一致,但充分供氧时则急剧下降,仅相当于厌氧状态下 NADH 含量的 22%; NAD 在微量供氧时最高,充分供氧时最低.

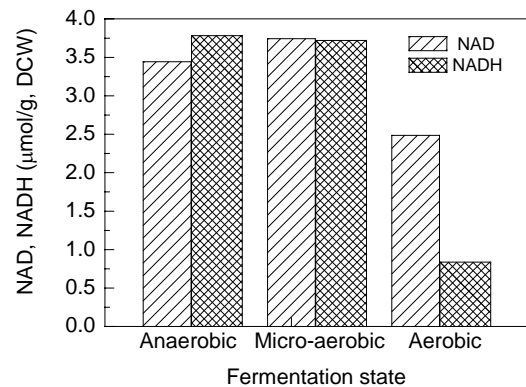


图4 氧对 NAD 及 NADH 含量的影响
Fig.4 Effect of oxygen on intracellular NAD and NADH pool

NADH 的来源包括甘油脱氢以及随后的酵解途径中的脱氢过程. *K. pneumoniae* 厌氧代谢甘油产 PDO 的生理意义之一是通过还原 3-羟基丙醛成为 PDO 的过程中消耗掉合成代谢或氧化过程产生的 NADH,从而平衡菌体内的还原价.在充分供氧发酵的状态下,由于存在丰富的外源电子受体 O_2 ,氧化代谢中产生的 NADH 很

容易通过氧化磷酸化消耗掉,而起始氧化甘油途径的甘油脱氢酶活性下降,因此菌体内 NADH 含量减少. 在微量供氧发酵中,虽然 O₂ 消耗了部分 NADH,但甘油脱氢酶活性比厌氧状态时提高了,也就提高了 NADH 的产率,因而 NADH 的绝对含量并没有明显下降. NADH 是 PDO 合成的供氢体,在充分供氧发酵时,菌体内 NADH 含量很低,因此几乎没有 PDO 的合成;而微量供氧发酵时菌体内 NADH 浓度与厌氧发酵的 NADH 浓度基本相等,在 GDHt 及 PDOR 活性提高的基础上提高了 PDO 的生产强度.

4 结论

K. pneumoniae 为兼性厌氧菌,在厌氧或供氧条件下都能利用甘油为唯一碳源生长. 溶氧提高加快了菌体生长,但 PDO 只有在厌氧和微量供氧条件下为发酵的主产物,而且在微量供氧发酵时 PDO 生产强度最高. 研究发现无论是厌氧或有氧条件,菌体内利用甘油代谢产 PDO 的 3 种关键酶(GDH, GDHt, PDOR)都能表达,其中在微量供氧发酵时酶活最高,分别为 7.28, 1.14, 0.52 U/mg;而在充分供氧发酵时 GDH, GDHt, PDOR 的酶活最低,分别是 2.23, 0.19 和 0.12 U/mg. 氧存在时,菌体内 NADH 含量下降,微量供氧发酵和充分供氧发酵时 NADH 含量分别比厌氧发酵下降 1.7%和 77.88%. 本研究初步探索了氧对 *K. pneumoniae* 发酵产 PDO 的一些生理影响,理论上证明了微量供氧条件下进行 PDO 发酵的可行性,为进一步优化 PDO 的发酵工艺提供了依据.

参考文献:

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 289–297.
- [2] Forage R G, Lin E C C. *dha* System Mediating Aerobic and Anaerobic Dissimilation of Glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418 [J]. J. Bacteriol., 1982, 151: 591–599.
- [3] Seraphim P, Patricia R S, Bernard P, et al. High Production of 1,3-Propanediol from Industrial Glycerol by a Newly Isolated *Clostridium butyricum* Strain [J]. J. Biotechnol., 2000, 77: 191–208.
- [4] Menzel K, Zeng A P, Deckwer W D. High Concentration and Productivity of 1,3-Propanediol from Continuous Fermentation of Glycerol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Enzyme Microb. Technol., 1997, 20: 82–86.
- [5] Chen X, Zhang D J, Qi W T, et al. Microbial Fed-batch Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under Micro-aerobic Conditions [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 63: 143–146.
- [6] Cheng K K, Liu D H, Sun Y, et al. 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* under Different Aeration Strategies [J]. Biotechnol. Lett., 2004, 26: 911–915.
- [7] Fabien B, Suzette A, Philippe S, et al. Anaerobic Pathways of Glycerol Dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM1210: Limitations and Regulations [J]. Microbiol., 1997, 143: 2423–2432.
- [8] Menzel K, Ahrens K, Zeng A P, et al. Kinetic, Dynamic and Pathway Studies of Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in Anaerobic Continuous Culture: IV. Enzymes and Fluxes of Glycerol Dissimilation and 1,3-Propanediol Formation [J]. Biotechnol. Bioeng., 1998, 60: 617–626.
- [9] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248–254.
- [10] 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.
- [11] Chevlier M, Lin E C C, Rodney L. Hydrogen Peroxide Mediates the Oxidative Inactivation of Enzymes Following the Switch from Anaerobic to Aerobic Metabolism in *Klebsiella pneumoniae* [J]. J. Biol. Chem., 1990, 265: 40–46.
- [12] Susumu H, Tetsuo T, Saruro F. In Situ Reactivation of Glycerol-inactivated Coenzyme B Dependent Enzymes, Glycerol Dehydratase and Diol Dehydratase [J]. J. Bacteriol., 1980, 143: 1458–1465.
- [13] 张延平, 饶治, 杜晨宇, 等. 能量驱动对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油合成 1,3-丙二醇的影响 [J]. 过程工程学报, 2004, 4(6): 567–571.

Effect of Oxygen on the Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-Propanediol Fermentation

LIN Ri-hui, LIU Hong-juan, SUN Yan, HAO Jian, CHENG Ke-ke, LIU De-hua

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

Abstract: Effect of oxygen on the metabolism of *Klebsiella pneumoniae* was studied. The results indicated that 1,3-propanediol (PDO) could be produced under both aerobic and anaerobic conditions. As 4 h fermentation was carried out with initial glycerol concentration of 20 g/L, only 1.1 mmol/L PDO was produced in aerobic fermentation. However, PDO concentration reached 16 mmol/L under micro-aerobic condition, which was 1.28 fold to that of anaerobic condition. The activities of glycerol dehydrogenase, glycerol dehydratase and 1,3-propanediol oxidoreductase were 7.28, 1.14 and 0.52 U/mg protein respectively under micro-aerobic condition, which were higher than those under aerobic or anaerobic condition. The concentration of NADH (reduced B — Nicotinamide Adenine Dinucleotide) was also affected by oxygen. It was 3.78 and 3.72 $\mu\text{mol/g}$ (DCW) in anaerobic and micro-aerobic fermentations. However, it was only 0.85 $\mu\text{mol/g}$ (DCW) when aerobic fermentation was applied.

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