

维生素 C 和 E 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的调控

张延平, 杜晨宇, 饶治, 曹竹安

(清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 通过外源添加还原剂的方式调控细胞内 NADH/NAD 再生系统的状态, 研究了 40~150 mg/L VC 及 20~100 mg/L VE 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的影响, 发现外源添加 150 mg/L VC 或 30 mg/L VE 均可使 1,3-PD 合成浓度提高 20%~30%; 但同时也提高了某些副产物的合成浓度, 对代谢流分布的调控作用不明显; 1,3-丙二醇得率稍有提高但不显著. 提高 1,3-PD 得率宜从代谢节点(丙酮酸)通量调节方面考虑.

关键词: 还原剂; 维生素 C; 维生素 E; *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-丙二醇; 还原型二磷酸嘧啶核苷酸

中图分类号: TQ923

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2005)02-0197-04

1 前言

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 简称 1,3-PD)是一种重要的溶剂和化工原料, 目前最主要的用途是用于聚酯、聚醚、聚氨酯等的合成^[1,2]. 以 1,3-PD 与对苯二甲酸合成的聚酯 PTT(聚对苯二甲酸丙二醇酯)显示了优良的性能. 1998 年, PTT 被评为美国当年的六大石化新产品之一^[2]. 根据美国 CONDUX 公司的预测, 到 2010 年, PTT 的年需求量将达到 1000000 t^[1]. 目前生产 1,3-PD 有化学合成法和生物转化法, 随着化石燃料资源的日益枯竭, 以石油资源为原料的化学合成法受到限制, 生物转化法生产 1,3-PD 已成为当前研究的热点.

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* 是转化率较高的 3 种菌, 也是研究最深入的^[3,4]. 它们厌氧转化甘油的共同特点是甘油在 dha 调节子的歧化作用下, 沿氧化和还原两条路径代谢^[3], 以维持细胞的氧化还原平衡. 甘油还原为 1,3-PD 的过程要消耗 NADH(还原型二磷酸嘧啶核苷酸, 还原型辅酶 D), 这些还原型辅酶是甘油氧化代谢途径产生或再生的. 因此, 培养基的氧化还原状态会影响 NADH 的再生效率, 从而影响 1,3-PD 的合成.

徐勇等^[5]曾用 L-半胱氨酸调节培养基氧化还原电位繁殖青春双歧杆菌, 取得了一定效果. Zeng 等^[6]用代谢分析的方法研究了甘油浓度对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵过程中 NADH 量及 1,3-PD 合成的影响, 也有一些研究者希望通过复合底物的方式促进 1,3-PD 的合成^[7,8], 但利用还原剂调控 *Klebsiella pneumoniae* 的生长代谢尚未见报道. 考虑到成本等因素, 本研究选用相对低廉而

生物相容性仍较强的还原剂维生素 C(VC)和维生素 E(VE), 通过外源添加的方式研究了这些还原剂对 *Klebsiella pneumoniae* 生长和代谢的影响, 尤其是对 1,3-PD 合成的影响, 并通过研究甘油代谢过程中 NADH 的再生及消耗情况, 分析了提高 1,3-PD 得率的可行性.

2 材料和方法

2.1 菌株和培养条件

实验所用菌株为克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae* L1), 由中国农业大学赠送.

好氧种子培养基碳源为葡萄糖, 初始浓度均为 20 g/L; 厌氧转化培养基(发酵培养基)碳源为甘油, 初始浓度 20 g/L; 以 CaCO₃ 调节 pH, 其他组分同文献[9]. *K. pneumoniae* L1 先好氧培养 6~8 h, 使 OD₆₅₀ 达到 3~5, 然后以 5%的接种量转入厌氧培养. 灭菌后的发酵培养基中添加一定量 VC(分析纯, 含量≥99.7%, 天津市化学试剂三厂生产)或 VE[外消旋体, 40%(w), Sigma 生产].

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生产).

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(Acetate)、乙醇(Ethanol)、乳酸(Lactate)、2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD)等浓度均采用 SHIMADZU 10A 型高效液相色谱(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, 流速为 0.8 mL/min; 检测器为 RID-10A 型折光示差检测器^[10].

收稿日期: 2004-04-15, 修回日期: 2004-06-07

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(编号: 2001BA708B01-04); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)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.

2.4 *Klebsiella pneumoniae* 厌氧代谢甘油时氧化途径再生 NADH 及还原途径消耗 NADH 的计算

根据图 1^[11]中 *Klebsiella pneumoniae* 厌氧代谢甘油的途径, 甘油还原代谢途径所消耗的 NADH(NADH_{red})可按下式计算(式中浓度单位均取摩尔浓度, 下同):

$$NADH_{red}=1,3-PD.$$

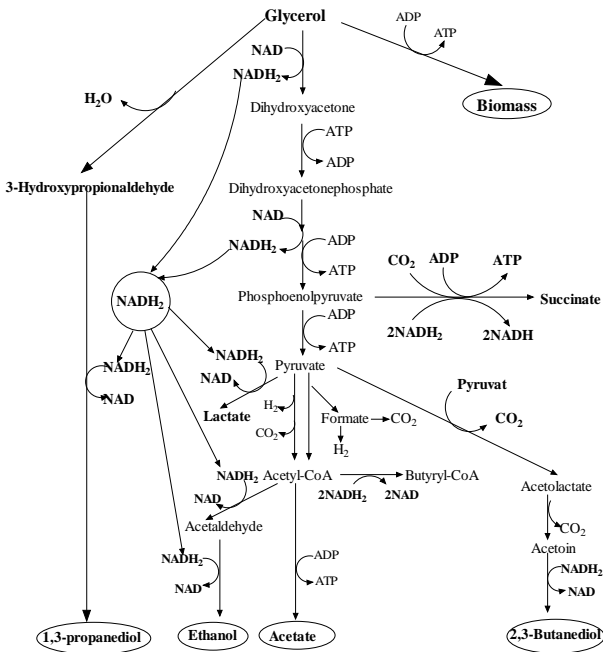


图 1 甘油在 *Klebsiella pneumoniae* 内的厌氧转化途径^[11]
Fig.1 Metabolic pathways of glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*

甘油氧化代谢再生的 NADH 按下式计算:

$$NADH_{oxi}=3(2,3-BD)+2Acetate+Lactate.$$

如果改变代谢流方向使氧化途径消耗的甘油全部转化为乙酸, 则氧化途径可再生最大量的 NADH, 其值可用下式计算:

$$NADH_{oxi-max}=2Glycerol_{oxi}=2[Acetate+Ethanol+Lactate+2(2,3-BD)].$$

3 结果与分析

3.1 添加 VC 对 *K. pneumoniae* 合成 1,3-PD 的影响

由于 *Klebsiella pneumoniae* 转化甘油为 1,3-PD 的过程中所涉及的甘油脱水酶和 1,3-丙二醇脱氢酶都需要还原性氛围, 而且该过程需消耗 NADH, 所以可以通过调节培养基的氧化还原状态影响酶的催化活性以及 NADH 的再生效率, 进而影响 1,3-PD 的合成. 首先外源添加还原剂 VC 考察其对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-PD 的影响. 图 2(a)是在发酵培养基内添加不同浓度 VC 时 *Klebsiella pneumoniae* 菌生产 1,3-PD 的情况(2 次实验的平均值). 可以看出, 添加 VC 确实对 1,3-PD 的合成有一定促进作用, 而且越到发酵后期, 促进作用越明显. 外源添加 150 mg/L VC, 经 48 h 厌氧培养, 可使 1,3-PD 最终浓度比对照组提高 25%左右. 而实验范围内(40~150 mg/L)外源添加 VC 对菌体的生长则无明显促进作用[图 2(b)], 甚至在一定浓度下 VC 会稍微抑制菌体生长. 这说明添加 VC 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-PD 的促进作用并非因 VC 促进菌体生长所致.

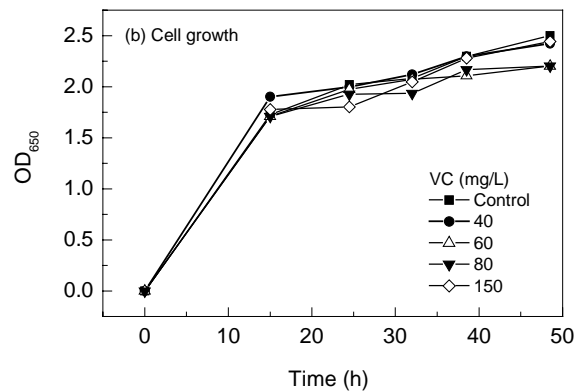
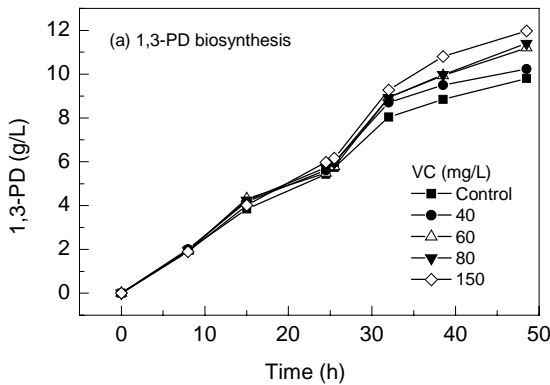


图 2 外源添加 VC 对 *Klebsiella pneumoniae* 菌体生长及其合成 1,3-PD 的影响

Fig.2 Effects of VC on the cell growth and biosynthesis of 1,3-PD by *Klebsiella pneumoniae* under anaerobic conditions

3.2 VE 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-PD 的影响

为进一步研究还原剂对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-PD 的影响, 选用另一种还原剂 VE 作为研究对象. 由于 VE 是脂溶性液体, 难溶于水, 将 VE 先溶解在二甲基亚砜(DMSO)中, 形成 1%(φ)的溶液, 然后取适量

加入到灭菌的厌氧培养三角瓶中, 使 VE 的终浓度分别为 20, 30, 60 和 100 mg/L(相应的 DMSO 终浓度依次为 2, 3, 6 及 10 mL/L). *Klebsiella pneumoniae* 生产 1,3-PD 的情况如图 3 所示(2 次实验的平均值). 可见, 外源添加适量的还原剂 VE 对 1,3-PD 的合成具有很好的促进作

用, 但 VE 添加量过高或过低, 反而会造成负面效应. 添加 30 mg/L VE 可使 1,3-PD 最终合成浓度提高 30% 以上.

为了解 VE 溶解体系对 1,3-PD 合成的影响, 研究了溶剂 DMSO 对 *Klebsiella pneumoniae* 生长和代谢的影响. 采用对 1,3-PD 合成促进最为明显的 30 mg/L VE 添加方案, 此时 DMSO 浓度为 3 mL/L, 结果添加 DMSO

与对照组的 OD₆₅₀ 分别为 1.72 和 1.94, 1,3-PD 浓度分别为 7.38 和 7.80 g/L. 单独添加此浓度的 DMSO 不论对菌体生长还是 1,3-PD 合成都是明显不利的, 由此可以排除 VE 溶解体系中溶剂对菌体生长和 1,3-PD 生产的促进作用. 通过优化溶解体系, 可进一步强化 VE 对 1,3-PD 合成的促进作用.

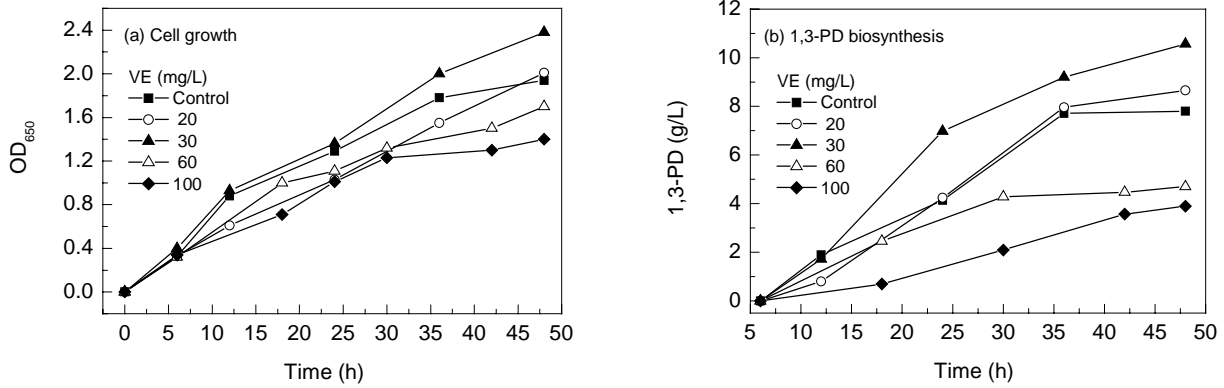


图3 VE 对 *Klebsiella pneumoniae* 生长及其合成 1,3-PD 能力的影响

Fig.3 Effects of VE on the cell growth and biosynthesis of 1,3-PD by *Klebsiella pneumoniae* under anaerobic conditions

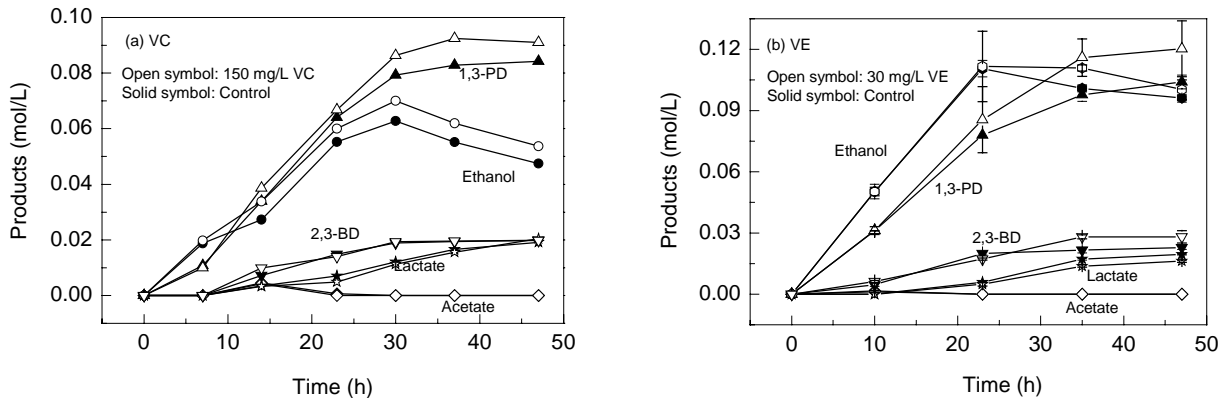


图4 还原剂(VC, VE)对 *Klebsiella pneumoniae* 合成副产物情况的影响

Fig.4 Effects of VC and VE on formation of byproducts by fermentation of *Klebsiella pneumoniae*

3.3 添加物对 *Klebsiella pneumoniae* 代谢的影响

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^[6]. 本研究发现, 在摇瓶实验条件下, 主要的副产物是乙醇、2,3-丁二醇及乳酸; 乙酸的产量相对较低, 只有在发酵前期能够测到. 图 4 分别是在发酵培养基中添加 150 mg/L VC 及 30 mg/L VE 时的 *K. pneumoniae* 代谢产物及副产物积累情况(3 次实验的平均值). 由图可见, 添加 VC 及 VE 时, 主产物 1,3-PD 及副产物乙醇、2,3-丁二醇的终浓度均得到提高, 乳酸浓度在添加 VC 时提高而添加 VE 时降低, 其机理尚待进一步研究. 在这种情况下, 1,3-PD 得率变化也不很明显. 添加 150 mg/L VC 时 1,3-PD 摩尔得率仅从 0.33 提高到 0.36, 添加 VE 时 1,3-PD 得率也

仅是略有提高.

根据产物、副产物的时变曲线, 计算了该实验中 *Klebsiella pneumoniae* 厌氧转化甘油时还原途径消耗 NADH 与氧化途径再生 NADH 的量, 结果如图 5 所示. 根据本工作的分析, 在不考虑菌体生长对 NADH 合成及再生的影响的情况下, 生产 1,3-PD 所需的 NADH 的量略高于甘油氧化代谢合成各副产物时再生的 NADH 量, 即使外加一定量还原剂仍存在这种情况, 这可能与外加还原剂的还原力有关; 另外, 也说明在原始菌株代谢流分布不作较大调整的情况下, 通过减少副产物的形成来提高 1,3-PD 得率的空间是很有限的. 但是, 如果改变代谢流方向(即假定氧化途径消耗的甘油可以全部转化为乙酸), 使甘油氧化代谢部分尽可能多地再生

NADH, 则氧化途径所能再生的 NADH 的量如图 5 中虚线(NADH_{oxi-max})所示, 该情况下 1,3-PD 得率提高的潜力

很大. 因此, 提高 1,3-PD 得率宜从代谢节点(丙酮酸)代谢流调节方面考虑.

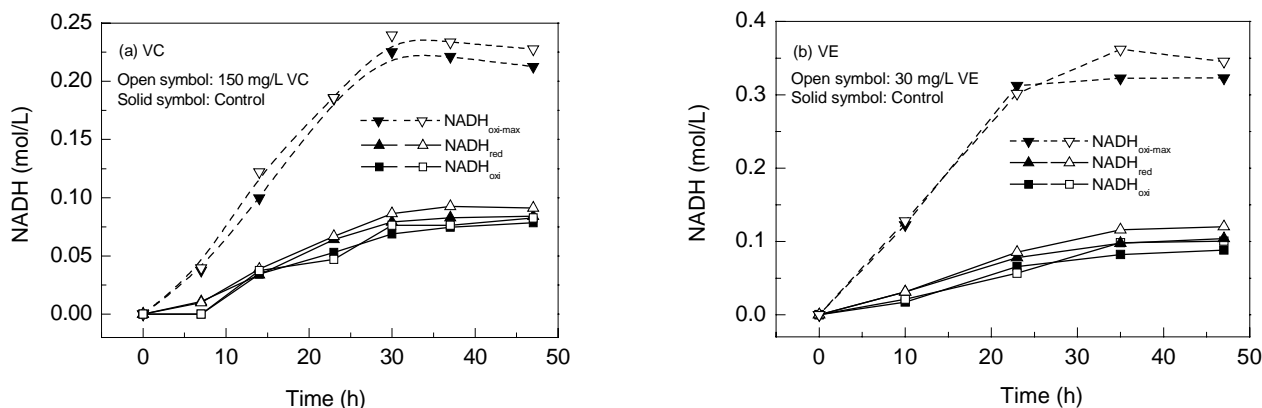


图 5 甘油厌氧代谢还原力分析

Fig.5 Regeneration and consumption of NADH during glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*

4 结论

外源添加还原剂可在一定程度上促进 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-PD, 150 mg/L VC 或 30 mg/L VE 均可使 1,3-PD 合成浓度提高 20%~30%; 但添加还原剂在提高 1,3-PD 合成浓度的同时也提高了乙醇、2,3-丁二醇等副产物的合成浓度, 对代谢流分布的调控作用不明显, 因此 1,3-PD 得率稍有提高但不显著. 提高 1,3-PD 得率宜从代谢节点(丙酮酸)通量调节方面考虑.

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]. Ind. Crops Prod., 1998, 7: 281-289.
- [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] 徐勇, 余世袁, 江华, 等. 培养条件对低聚木糖增殖青春双歧杆菌的影响 [J]. 林产化学与工业, 2001, 21(3): 34-38.
- [6] 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.
- [7] Biebl H, Marten S. Fermentation of Glycerol to 1,3-Propanediol: Use of Cosubstrates [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, 44: 15-19.
- [8] Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, et al. Effect of Glucose on Glycerol Metabolism by *Clostridium Butyricum* DSM 5431 [J]. J. Appl. Microbiol., 1998, 84: 515-522.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 289-297.

Regulation of Vitamin C and Vitamin E on the Biosynthesis of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*

ZHANG Yan-ping, DU Chen-yu, RAO Zhi, CAO Zhu-an

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

Abstract: Glycerol could be transformed to 1,3-propanediol (1,3-PD) by *Klebsiella pneumoniae*. Since NADH was required in the process, reductants were considered to affect the formation of 1,3-propanediol. In this work, 40~150 mg/L VC or 20~100 mg/L VE was added into the culture medium to regulate the intracellular redox state (NADH/NAD) of *Klebsiella pneumoniae*, and the effects of these two reductants on the metabolism of *Klebsiella pneumoniae* were investigated. It was shown that the concentration of 1,3-propanediol increased by 20%~30% by addition of 150 mg/L VC or 30 mg/L VE into the culture medium. With the increasing 1,3-PD, some byproducts such as ethanol and 2,3-butanediol increased correspondingly, which resulted in an unobvious improvement of the yield of 1,3-PD. Rather than addition of these reductants, regulation of metabolic flux was considered to be a feasible attempt to improve the yield of 1,3-PD.

Key words: reductant; vitamin C; vitamin E; *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-propanediol; NADH