

固定化双菌串联发酵生产1,3-丙二醇

陈国^{1,2} 赵亚囡¹ 姚善泾² 方柏山¹

(1. 华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021;

2. 浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 以葡萄糖为底物, 利用分别固定化的酵母 *Candida krusei* ICM-Y05 和肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae* ZJU 5205 串联发酵生产 1,3-丙二醇。实验结果表明, 由 *C. krusei* 发酵而得粗甘油只需经简单离心后即可被 *K. pneumoniae* 所利用。将 *C. krusei* 包埋于 NaCS/PDMAAC 生物微胶囊中, 并于气升式反应器中发酵, 所得发酵液直接流入固定床反应器, 同时向固定床反应器补充微量元素, 发酵培养经 NaCS/PDMAAC 生物微胶囊包埋的 *K. pneumoniae*, 产物即为 1,3-丙二醇。三批次发酵实验结果表明, 1,3-丙二醇/葡萄糖的最终摩尔转化率为 0.295。

关键词: 细胞固定化; 生物微胶囊; 混菌发酵; 1,3-丙二醇

中图分类号: Q814.2

引言

1,3-丙二醇是一种重要的化工原料, 微生物转化法生产 1,3-丙二醇主要利用甘油作为底物。考虑到市场上原料甘油供求情况, 以及葡萄糖的充足, 许多研究者非常关注由葡萄糖直接转化 1,3-丙二醇的工艺。自然界中尚未发现能直接将葡萄糖转化为 1,3-丙二醇的微生物, 因此生物法转化葡萄糖生产 1,3-丙二醇的代表性工艺路线有两条: 一是通过基因工程的手段^[1-3], 将产甘油的关键酶基因克隆到产 1,3-丙二醇的细菌中, 或将产 1,3-丙二醇的关键酶基因克隆到产甘油的细菌中; 二是通过双菌发酵, 先将葡萄糖转化为甘油, 再将甘油转化为 1,3-丙二醇。双菌发酵包括二步法^[4]和混菌发酵法^[5]。二步法中, 第一步产生的甘油要经过较复杂的分离过程, 才能作为第二步的原料, 生产过程较复杂, 运行成本也相对较高, 不利于连续操作。在混菌发酵时, 由于不同微生物间的相互作用和影响, 往往稳定性不好、调控困难, 难于同时达到不同微生物的最适发酵条件^[6]。因此第一种方法的可行性较大, 而第

二种方法混菌培养研究较少。

本文结合二步法生产 1,3-丙二醇的工艺, 利用微胶囊固定化细胞的特性, 提出了通过分别固定化双菌进行串联发酵的设想, 即固定化耐高渗的产甘油假丝酵母 *Candida krusei* ICM-Y05 从葡萄糖发酵生产甘油, 固定化克雷伯氏肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae* ZJU 5205 从甘油发酵生产 1,3-丙二醇, 然后将二个过程串联起来, 形成直接由葡萄糖进料, 生产目标产物 1,3-丙二醇的新工艺。本文对这一工艺作了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

耐高渗产甘油假丝酵母 *Candida krusei* ICM-Y05 由中科院过程工程研究所提供, 浙江大学生物工程研究所保存。克雷伯肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae* ZJU 5205 由浙江大学生物工程研究所筛选保藏。纤维素硫酸钠 (NaCS) 由浙江大学生物工程研究所合成, 取代度为 0.36; 聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDMAAC), $M_w = 200,000 \sim 350,000$, 20% 水溶液购自 Aldrich 公司; 其他试剂均为分析纯, 市售。

1.2 培养基

C. krusei 培养基组成: 葡萄糖 200 g/L、玉米浆 3.0 g/L、尿素 2.5 g/L、磷酸二氢钾 3.5 g/L。

K. pneumoniae 菌培养基组成: 1.36 g/L KH_2PO_4 、6.61 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、0.26 g/L $MgCl_2 \cdot$

收稿日期: 2007-07-01

基金项目: 国家自然科学基金 (20576118); 福建省青年人才项目 (2006F3080); 华侨大学高层次人才科研启动基金 (06BS214)

第一作者: 1978 年生, 讲师, 博士

E-mail: chenguo@hqu.edu.cn

6H₂O、0.29 g/L CaCl₂·2H₂O、1.0 g/L 酵母粉、0.42 g/L 水合柠檬酸、5 mL/L 微量元素溶液 SL2。每升微量元素溶液 SL2 包含 0.68 g ZnCl₂·2.0 g MnCl₂·4H₂O、60 mg H₃BO₃、0.47 g CoCl₂·6H₂O、5 mg NaMoO₄·2H₂O、0.17 g CuCl₂·2H₂O、5.4 g FeCl₃·6H₂O、10 mL HCl (37%)。pH 调节到 7.0。甘油浓度 40 g/L, 原料甘油由 *C. krusei* 发酵液离心灭菌后得到。

1.3 细胞包埋方法

微囊化 *C. krusei* 方法: 在 200 mL 无菌水中加入 50 mL 的 *C. krusei* 种子培养液, 将种子培养液稀释到原浓度的 1/5。取 100 mL 稀释后种子液与 4 g NaCS 混合, 搅匀以备滴制胶囊。此溶液脱气后, 通过气流微囊发生器滴入质量浓度为 6% 的 PDM-DAAC 溶液中。室温下温和搅拌, 反应 30 min 后, 洗去表面残余的 PDMDAAC, 即得待培养的含细胞的微胶囊。微囊化 *K. pneumoniae* 方法与上述类似。

1.4 培养方法

C. krusei 培养方法: 将 5 mL 种子培养液接种到 50 mL 发酵培养基中, 35℃ 下, 转速 150 r/min 摇床培养 120 h。

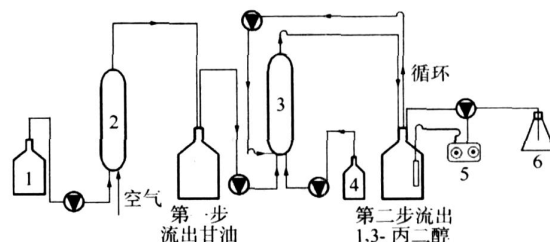
K. pneumoniae 培养方法: 5 mL 种子液加入含 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 微氧条件(棉塞封口)下在 37℃ 转速为 100 r/min 的摇床上培养 24 h。培养基中加入 CaCO₃ (2g/L) 以维持培养基近中性。

1.5 固定化双菌工艺流程

固定化双菌串联发酵生产 1,3-丙二醇的工艺流程如图 1 所示。第一步使用气升式反应器, 气升式反应器体积 600 mL, 将 150 mL 胶囊加入到含 350 mL 发酵培养基的气升式反应器中。操作过程中气体流速为 0.3 vvm, 用超级恒温槽循环水控制反应器温度为 35℃。第二步使用固定床反应器, 反应器体积 600 mL, 加入 400 mL 胶囊, 不需要通气, 反应器通过保温夹套控温在 37℃。

第一步结束时的发酵液直接与微量元素溶液以 1:1.5 的比例混合进料作为第二步发酵培养基, 发酵液进料流速为 4.0 h⁻¹, 微量元素溶液进料流速为 6.0 h⁻¹, 第一步发酵液用完时, 同时关闭微量元素溶液的进料。将发酵液循环, 循环流速为 4.0 h⁻¹, 循环前通过流加 2.5 mol/L 无菌 KOH 溶液控制 pH

为 7.0, 直到甘油接近耗完为止。微量元素溶液的组成与不含甘油的克雷伯肺炎杆菌的培养基相同。



1—*C. krusei* 培养基; 2—气升反应器; 3—固定床反应器; 4—微量元素溶液; 5—pH 控制器; 6—KOH 溶液

图 1 串联二步固定化法流程示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the process with two immobilized reactors in series

1.6 分析方法

生物量的测定采用比浊法, 利用预先建立好的浊度与干重之间的关系计算细胞干重。葡萄糖浓度采用 DNS 法分析^[7]。甘油含量测定采用改进的高碘酸氧化滴定法^[8]。1,3-丙二醇、乙醇、乙酸含量的测定采用气相色谱 (Agilent 6820) 法, 不锈钢填充柱 2 m × 5 mm, 填料为 Chromsorb101, 检测器为 FID, 柱温 180℃, 汽化室与检测器的温度均为 250℃, 载气为 N₂, 进样量 1 μL, 采用外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 甘油发酵液产 1,3-丙二醇

在进行固定化双菌串联法转化葡萄糖生产 1,3-丙二醇之前, 首先要考察第一步发酵产生的粗甘油(甘油发酵液)能否直接被 *K. pneumoniae* 利用。Seraphim 等^[9]曾考察了制备生物柴油过程中产生的副产物粗甘油直接作为 *Clostridium butyricum* 的原料甘油生产 1,3-丙二醇的情况。本文将游离酵母 *C. krusei* 发酵获得的甘油, 只经离心处理, 然后上清液作为游离 *K. pneumoniae* 发酵的底物甘油, 加入微量元素, 配置成 *K. pneumoniae* 的培养基。此实验的目的主要是考察发酵得到的未经分离的发酵液中除甘油外的其他物质对克雷伯肺炎杆菌的生长和 1,3-丙二醇生成的影响, 结果如图 2。由图 2 可得, 发酵得到的甘油经重新配置后约含有 1.5 g/L 左右的葡萄糖、40 g/L 的甘油, 而葡萄糖是 *K. pneumoniae* 可以利用的底物, 且在较高浓度时优先消耗, 所以可看到只需经过 12 h 左右, 菌浓就可达最高值 3.8 g/L 左右。而同样浓度的初始纯甘油发酵, 需 27 h, 菌浓才达到 2.62 g/L^[10]。

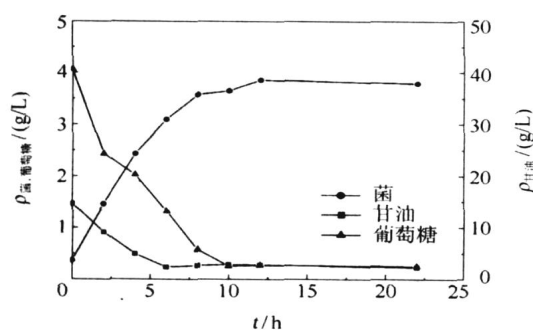


图2 以发酵甘油为底物摇瓶培养游离 *K. pneumoniae*
Fig.2 Culture of free *K. pneumoniae* with fermented glycerol substrate in a shaker flask

图3表示直接用发酵甘油生产1,3-丙二醇过程中产物浓度随时间的变化情况。从图3中可看出,未精制的粗甘油可被 *K. pneumoniae* 转化为1,3-丙二醇,但发酵甘油中的副产物乙醇和乙酸在培养基中的初始浓度为0.45 g/L左右,对细菌的生长和1,3-丙二醇的生成有抑制作用,致使最终1,3-丙二醇浓度较低。且发酵结束时,乙醇和乙酸的浓度均较高,摇瓶发酵过程中的pH调节不够恒定,所以最终1,3-丙二醇浓度只有11.3 g/L,1,3-丙二醇/甘油转化率也只有0.36,低于同样条件下纯甘油发酵时的1,3-丙二醇浓度和转化率。尽管转化率不是很理想,但可以肯定,用假丝酵母从葡萄糖发酵得到的甘油可直接被克雷伯肺炎杆菌利用发酵生产1,3-丙二醇。

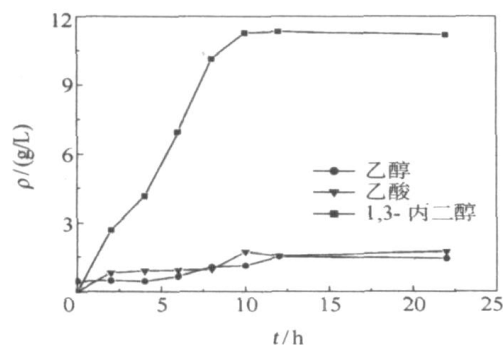


图3 以发酵甘油为底物游离培养 *K. pneumoniae* 过程中乙醇、乙酸和1,3-丙二醇浓度

Fig.3 Variation in concentration of 1,3-propanediol, ethanol and acetic acid during culture of free *K. pneumoniae* with fermented glycerol substrate

2.2 固定化双菌串联发酵生产1,3-丙二醇

从以上结果可知,发酵得来的甘油,无须精制即可作为发酵生产1,3-丙二醇的原料。在双菌分别

固定化后串联发酵的实验中,由于细胞已被微胶囊包埋,第一个反应器出料是澄清的发酵液,在进入第二个反应器之前同时补充第二步发酵所需的微量元素溶液,就可直接进入第二个反应器发酵,生成1,3-丙二醇。具体工艺过程如图1所示。共进行了三个批次的发酵,底物接近消耗完全时作为每一批次发酵的结束点。

图4示出了在第一步气升式反应器中,微囊化的 *C. krusei* 转化第一批葡萄糖生成甘油的情况。由图4可看出,初始浓度为200 g/L的葡萄糖,在加入胶囊后浓度立即变为177.8 g/L,说明葡萄糖迅速扩散进入胶囊。最后残余的葡萄糖浓度较低,约为2.6 g/L左右,甘油浓度约为40 g/L左右。

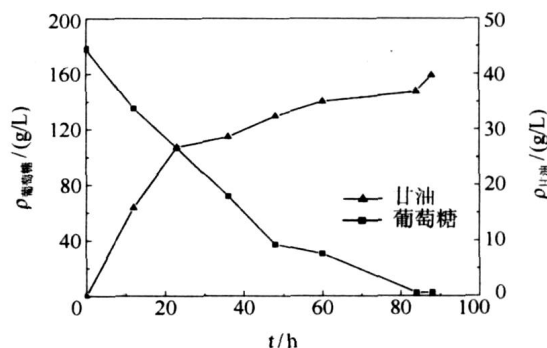


图4 第一步气升反应器中葡萄糖和甘油浓度变化情况

Fig.4 Variation in glycerol concentration and glucose consumption in the initial air-lift reactor

由第一批出来的发酵液,以较快的流速泵入第二步反应器,出口处甘油和葡萄糖浓度变化情况如图5所示。结果表明,混合后,原料甘油的浓度较低,约为16 g/L左右,葡萄糖约为1.1 g/L左右,甘

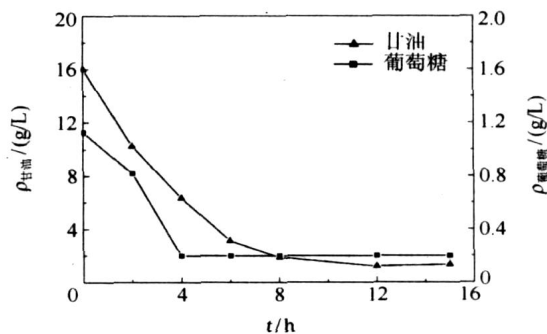


图5 第二步固定床反应器中产物浓度变化

Fig.5 Variation in concentration of glycerol and glucose in the fixed-bed (the second step)

油和葡萄糖同时迅速被消耗。被消耗的甘油和葡萄糖转化为产物的情况如图6所示。1,3-丙二醇的最

终浓度只有 4.7 g/L 左右,乙醇和乙酸初始浓度即较高,在发酵过程中又有一定积累。造成 1,3-丙二醇的浓度较低的原因:一方面由于进料的甘油浓度较低;另一方面第一批发酵时固定化的胶囊对生成的 1,3-丙二醇起到了一定的稀释作用。且第一步发酵产生的乙醇和乙酸也对发酵过程产生了影响,抑制了 *K. pneumoniae* 的生长和转化甘油生成 1,3-丙二醇的活性,致使 1,3-丙二醇/甘油摩尔转化率比直接用精制甘油在单步固定床中的转化率低。

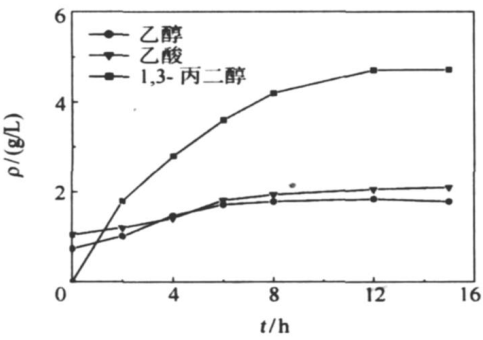


图 6 第二步固定床反应器中产物浓度变化
Fig. 6 Variation in concentration of 1,3-propanediol, ethanol and acetic acid in the fixed bed (the second step)

表 1 显示了葡萄糖在第一步反应器中三批次发酵的结果,从表 1 可看出,随着发酵的进行,发酵的时间越来越短,最终甘油浓度和甘油/葡萄糖转化率趋于稳定。因为第一批次囊内菌浓较低,菌体生长

旺盛,故甘油/葡萄糖的转化率也相对较低。后面二批次,反应器运行基本达到平稳,囊内菌体浓度也变化不大,所以甘油的最终浓度和转化率也比较稳定。

表 1 第一步气升反应器中甘油批式发酵结果
Table 1 Data for glycerol fermentation in the airlift reactor (the first step)

批次	时间/h	/(g/L)			转化率/(mol/mol)
		初始葡萄糖	最终葡萄糖	最终甘油	
1	88	177.8	2.6	39.8	0.445
2	54	177.8	5.0	52.2	0.592
3	37	177.8	4.1	52.4	0.591

表 2 显示了第二步固定床反应器中批式发酵的情况。由于来自第一步的甘油浓度不同,所以结果也有差异,第一批次发酵得到的甘油浓度较低,而且初始囊内 *K. pneumoniae* 的菌浓也较低,部分甘油被用来提供菌体生长,导致第一步 1,3-丙二醇的浓度和 1,3-丙二醇/甘油转化率较低。第二、三批次 1,3-丙二醇的转化率明显增高,约为 0.50 左右,但是同时副产物乙醇的浓度也较高,达到 3.7 g/L,持续发酵时,高的副产物浓度严重影响了菌体的生长,并且整个体系的 pH 不够均匀,所以菌体利用甘油的速率很慢,发酵所需要的时间延长很多。通过对每批次第一步和第二步转化率的计算可知,达到稳定状态后,每摩尔葡萄糖最终可生成 0.295 摩尔 1,

表 2 第二步固定床反应器中 1,3-丙二醇批式发酵结果

Table 2 Data for 1,3-propanediol fermentation in the fixed bed (the second step)

批次	时间/h	/(g/L)						转化率/(mol/mol)
		入口葡萄糖	入口甘油	出口甘油	1,3-丙二醇	乙醇	乙酸	
1	12	1.1	16.0	1.2	4.7	1.8	2.0	0.385
2	18	2.1	20.9	2.8	7.5	3.7	2.7	0.502
3	36	1.6	21.3	2.3	7.4	3.8	1.1	0.472

3-丙二醇。

以上仅是对于分别固定化后串联工艺过程的初步研究,如何协调二步发酵的条件对过程的顺利进行非常重要;第一步得到的发酵液中副产物对第二步发酵的影响的深入考察及消除方法;固定化后细胞生理特性的变化对副产物代谢的影响及细胞生长的影响,有待更深入的研究。

3 结束语

游离培养表明克雷伯肺炎杆菌可直接利用发酵

得到的甘油生成 1,3-丙二醇,发酵甘油中残存的葡萄糖有助于菌体生长,并优先利用,导致短时间内可获得较高的菌体浓度。发酵甘油中的乙醇对菌的生长和 1,3-丙二醇的生产有抑制作用,是需要消除的影响因素。通过分别固定化双菌,并将二步转化串联,实现了由葡萄糖向 1,3-丙二醇的转化。第二步 1,3-丙二醇/甘油的摩尔转化率与单独固定化时相比偏低,1,3-丙二醇/葡萄糖最终摩尔转化率约为 0.295。串联后带来了许多新的条件的变化,因此固定化后细胞的生理特性及相互适应性、反应器的稳

定性、反应器的协调、发酵甘油的简单处理等需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] ZHENG Yuanyuan, CAO Yang, FANG Baishan. Cloning and sequence analysis of the *dhaT* gene of the 1,3-propanediol regulon from *Klebsiella pneumoniae* [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 251 - 255.
- [2] ZHENG Ping, WEREATH K, SUN Jibin, et al. Over-expression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2160 - 2169.
- [3] TONG I T, LIAO H H, CAMERON D C. 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57 (12): 3541 - 3546.
- [4] HARTLEP M, HUSSMANN W, PRA YITNO N, et al. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 60 - 66.
- [5] HAYNIE S L, WAGNER L W. Process for making 1,3-propanediol from carbohydrates using mixed microbial cultures: US, 5599689[P]. 1997-02-04.
- [6] TANIGUCHI M, TANAKA T. Clarification of interactions among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances [J]. Adv Biochem Engin/ Biotechnol, 2004, 90: 35 - 62.
- [7] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426 - 428.
- [8] 王剑锋, 修志龙, 范圣第. 甘油转化生产 1,3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定 [J]. 工业微生物, 2001, 31 (2): 33 - 35.
- [9] PAPANIKOLAOU S, FICK M, AGGELIS G. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2004, 79: 1189 - 1196.
- [10] 赵亚因, 陈国, 姚善泾. 若干因素对发酵法生产 1,3-丙二醇的调控作用 [J]. 化学反应工程与工艺, 2006, 22(3): 193 - 198.

Production of 1,3-propanediol by co-culture of two immobilized microbes in series

CHEN Guo¹ ZHAO YaNan¹ YAO ShanJing² FANG BaiShan¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology(Fujian Provincial University), Huaqiao University, Quanzhou Fujian 362021;

2. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China)

Abstract: Glucose has been converted to 1,3-propanediol using two bioreactors connected in series, the first being packed with immobilized *Candida krusei* ICM-Y05 and the second with immobilized *Klebsiella pneumoniae* ZU 5205. It was shown that crude glycerol formed by *C. krusei* could be consumed directly by *K. pneumoniae*. In subsequent experiments, *C. krusei* was encapsulated in sodium cellulose sulfate/poly[dimethyl (diallyl) ammonium chloride] (NaCS/ PDMDAAC) capsules and fermentation carried out in an air-lift reactor. The glycerol produced was carried directly into the second reactor packed with encapsulated *K. pneumoniae*, with simultaneous continuous addition of a microelement solution, resulting in the formation of 1,3-propanediol. Three fermentation batches were carried out, with reproducible results. The observed yield of 1,3-propanediol was 0.295 mol per mol of glucose consumed.

Key words: cell immobilization; biomicrocapsule; mixed culture; 1,3-propanediol