

乙酸对 1,3-丙二醇发酵的影响

蒋 洁 张 栩 谭天伟*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 考察了克雷伯氏菌发酵生产 1,3-丙二醇过程中,乙酸对发酵过程的影响。结果表明,在发酵初始培养基中加入微量的乙酸能够提高 1,3-丙二醇的产量,但乙酸的添加会影响菌体生长,造成发酵液的菌体吸光度 A 下降。通过实验确定了乙酸的最优添加质量浓度为 0.6 g/L,此时 1,3-丙二醇质量浓度为 8.46 g/L,转化率为 0.62;在此浓度乙酸初始培养基中添加 1.2 g/L 葡萄糖作为辅助底物将甘油转化率提高到 0.66。

关键词: 1,3-丙二醇; 发酵; 乙酸; 葡萄糖

中图分类号: TQ223.163

引言

1,3-丙二醇(1,3-PD)是有机合成的重要中间体,可用于多种药物、聚酯、抗冻剂、溶剂、保护剂的合成。1,3-丙二醇的生产方法主要有化学法和微生物发酵法,目前 1,3-PD 的工业化生产主要以化学合成为主^[1],由于化学合成法具有设备投资大、技术难度高、需重金属催化剂、污染环境等缺点,微生物发酵法^[2]生产 1,3-PD 以绿色化学为特征,和化学法相比具有选择性好、转化率高、产物分离简单、无环境污染问题、可利用再生资源等优点,是一种技术上可行的、经济上有竞争力的生产方法。

发酵生产 1,3-丙二醇的过程中在生成 1,3-丙二醇的同时还生成乙酸、2,3-丁二醇、乙醇、丁酸等副产物,其中乙酸和乙醇是主要的副产物^[3],其他几种副产物的生成量较少(总量小于 5%)^[1]。微生物转化甘油的过程中存在两条途径:一是生成 ATP 和还原乙酸乙醇的途径,伴随细胞生长;另一条是 1,3-PD 形成途径。有文献报道乙醇对发酵生产 1,3-PD 有强烈的抑制作用^[4],但目前还未见到关于 1,3-PD 发酵过程中乙酸对发酵的影响。本文研究了发酵过程中乙酸对生产 1,3-PD 的影响。

收稿日期: 2004-11-30

基金项目: 国家 973 项目(2003CB716002);中国石化股份公司项目(202059);北京生物加工过程重点实验室开放项目(SYS100100421)

第一作者: 女,1979 年,硕士生

*通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

菌种为克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) KP0301,本实验室保藏。

种子培养基和发酵培养基相同,均采用文献[3]配方。

1.2 培养方法

种子液于 250 mL 锥形瓶中装 100 mL 种子培养基,灭菌后接入斜面菌种,然后在摇床中好氧培养 16 h,温度 37℃、转速 180 r/min、pH 值为 7.0。发酵液分别在 300 mL 摇瓶和 5 L 发酵罐中进行发酵培养。摇瓶发酵条件为底物甘油质量浓度为 20 g/L,发酵装液量 200 mL,灭菌后接种,接种量为 10%,发酵温度 37℃、转速 180 r/min、pH 值为 7.0;发酵罐发酵条件为补料分批发酵,共流加甘油 90 g/L,发酵培养基 3 L,灭菌后接种,接种量为 10%,发酵过程中通入氮气保持厌氧环境。发酵温度、转速、酸碱度同摇瓶发酵条件。

1.3 分析方法

生物量采用比浊法,以蒸馏水为空白在 650 nm 条件下测定发酵液的吸光度。

甘油采用滴定法检测,参照文献[5]。

产物 1,3-PD 以及副产物乙酸采用气相色谱检测。用移液器取发酵液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,以 8000 r/min 的速度离心 10 min 后,取上清液 1 μ L 于气相色谱仪进行检测,色谱柱 2 m \times ϕ 5 mm,填料为 Chromosorb101,柱温 200℃,检测器和汽化室温度均为 250℃,载气为氮气,流速 50 mL/min,采用外

标法定量。

甘油转化率为生成 1,3-PD 物质的量/消耗甘油物质的量。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度乙酸对摇瓶发酵生产 1,3-PD 的影响

乙酸是发酵生产 1,3-PD 过程的副产物,实验研究了乙酸对发酵过程的影响。

首先在初始培养基中添加 0, 0.584, 1.752, 4.672 g/L 质量浓度的乙酸进行实验,发酵 32 h 取样测定,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,在培养基中加入 0.584 g/L 的乙酸时,其吸光度 A 与不含乙酸的培养基发酵结果几乎相同,但是甘油到 1,3-PD 的转化率与其相

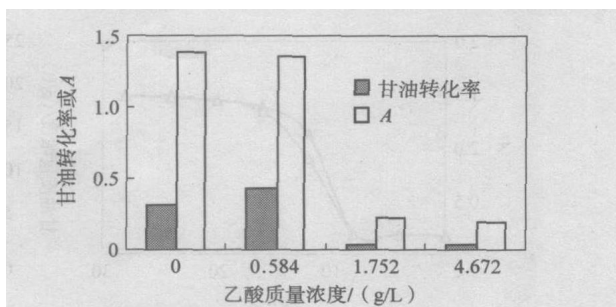


图 1 不同质量浓度乙酸对摇瓶发酵的影响

Fig. 1 Effect of acetic acid on fermentation

比有了较大的提高;当乙酸的浓度增大到一定程度时,对菌体的生长和甘油的转化都有较大的影响,吸光度和转化率都有很大程度的降低。研究了在初始培养基中添加 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L 的乙酸进行实验,发酵 32 h 结果如图 2 所示。

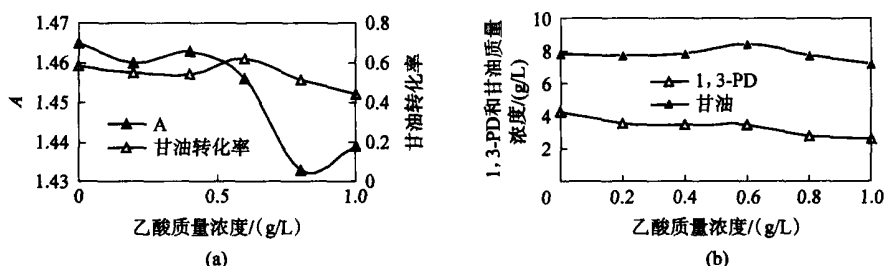


图 2 低浓度乙酸对摇瓶发酵菌体生长和 1,3-PD 的影响

Fig. 2 Effect of low concentration acetic acid on biomass and 1,3-PD of fermentation

从图 2 可以看出在初始培养基中加入低浓度乙酸对菌体的生长有一定的影响,菌体的生长随着乙酸浓度的增加而降低,但降低的幅度不大。随着乙酸浓度的增加,细胞的生物量逐渐减小,说明乙酸的添加会抑制菌体的生长。甘油的消耗则随着乙酸浓度的增加逐渐增加,1,3-PD 的浓度则随着乙酸浓度的增加先增大后减小。由此可以说明,乙酸的添加可以促进甘油的转化,但是抑制菌体的生长,合适的乙酸浓度能提高终产物的浓度。1,3-PD 的质量浓度在乙酸质量浓度为 0.6 g/L 时达到最大,为 8.46 g/L,与不含乙酸的相比较 1,3-PD 终浓度提高了 12%,此时的甘油转化率为 0.62,提高了 5.6%。

2.2 乙酸对摇瓶发酵过程的影响

普通发酵培养基(1[#])与普通发酵培养基添加 0.6 g/L 乙酸(2[#])发酵 28 h,每隔 4 h 取样测定发酵过程中发酵液的 A 、残余甘油以及 1,3-PD 的浓度,观察其动态变化,结果如图 3 所示。

从图 3(a)可以看出,发酵开始的 8 h 是菌体生

长的延迟期,这个时期菌体几乎不生长,甘油也基本没有消耗,1,3-PD 没有累积。从 8 h 到 16 h 是发酵的对数生长期,菌体迅速生长, A 从 0.19 增加到 1.38。乙酸的添加在发酵对数生长期对菌体生长有一定的抑制作用,但到发酵结束时,与以甘油为唯一底物的发酵相比较,乙酸的添加对菌体的生长几乎没有影响。从图 3(b)可以看出,发酵开始的 8 h 甘油基本无消耗,1,3-PD 也无累积。8 h 以后,甘油的消耗加快,此时期共消耗甘油 7.8 g,1,3-PD 也迅速累积,质量浓度从 1.56 g/L 增加到 7.82 g/L。发酵开始的 20 h 含乙酸培养基发酵与甘油单一底物相比较,甘油的消耗速率较慢,20 h 以后,含乙酸培养基发酵的甘油消耗量反而增加,由此可以看出,乙酸的添加在发酵后期促进甘油的消耗;发酵开始的前 18 h 两种发酵液中 1,3-PD 的累积基本相同,18 h 以后 1,3-PD 在发酵液中的浓度迅速增加,直至发酵结束。

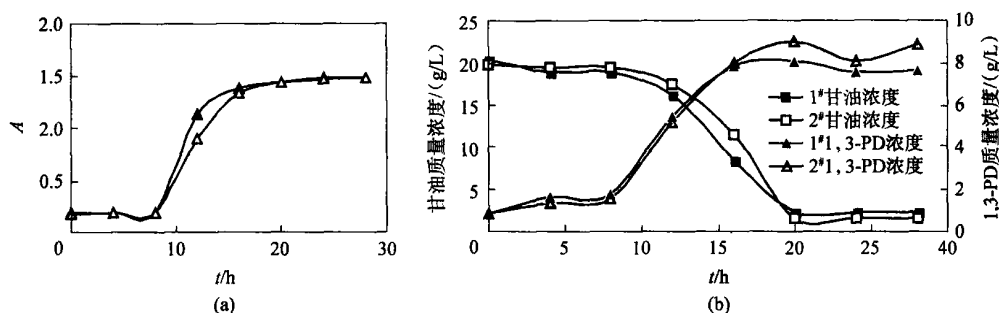


图3 乙酸对摇瓶发酵过程菌体生长和1,3-PD的影响

Fig. 3 Effect of acetic acid on biomass and 1,3-PD fermentation process

2.3 含有乙酸的培养基中葡萄糖对发酵的影响

初始培养基中乙酸的添加会在一定程度上抑制菌体的生长,葡萄糖作为辅助底物可以促进菌体的生长^[6],以下实验研究了在乙酸存在的条件下葡萄

糖对发酵过程的影响。

在含有 0.6 g/L 乙酸的培养基中分别加入 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 g/L 葡萄糖,发酵 32 h 结果如图 4 所示。

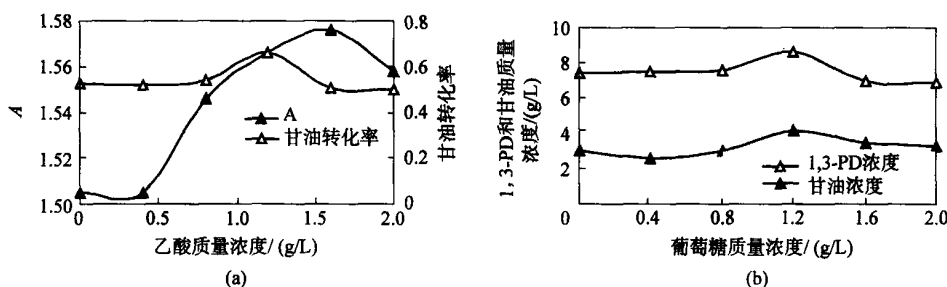


图4 不同浓度葡萄糖对摇瓶发酵菌体生长和1,3-PD产生的影响

Fig. 4 Effect of glucose concentration on biomass and 1,3-PD of fermentation

从图 4(a) 可以看出,与不加乙酸的培养基类似,葡萄糖的加入会在一定程度上促进菌体的生长,但是葡萄糖的加入会使菌体优先利用其进行生长^[5],因此它在一定程度上会抑制甘油的消耗,从图 4(b) 可以看出,当培养基中添加 1.2 g/L 的葡萄糖时,甘油的利用率低,而此时其转化率高,达到 0.66。

2.4 乙酸对 5L 发酵罐发酵的影响

在摇瓶培养的基础上,又在 5L 的发酵罐中进行实验。普通发酵培养基(1[#])与普通发酵培养基添加 0.6 g/L 乙酸(2[#])进行发酵,测定发酵液中底物与代谢产物的浓度列表如下。

从表 1 中可以看出,在初始培养基中加入 0.6 g/L 的乙酸。能促进甘油的消耗,提高终产物 1,3-PD 的产量并提高甘油的转化率,最终两批乙酸的浓度基本相同。

表1 乙酸对批式补料发酵的影响

Table 1 Effect of acetic acid on fedbatch culture

	质量浓度/(g/L)			甘油转化率
	消耗甘油	1,3-PD	发酵后乙酸	
1 [#] 发酵	74.57	39.33	6.22	0.638
2 [#] 发酵	81.71	45.29	6.20	0.671

2.5 5L 发酵罐发酵过程中乙酸的变化

图 5 是补料批式发酵过程中乙酸的浓度变化,从图中可以看出,在整个发酵过程中,初始培养基中添加乙酸的发酵过程所产生的乙酸总是高于不添加乙酸的,发酵过程产酸的多少可以来衡量发酵的快慢。发酵中甘油消耗的越多,所产生的乙酸也就越多,因此可以说明在初始培养基中加入乙酸可以增加菌体对甘油的消耗,从而增加 1,3-PD 的产量。

(下转第 42 页)

centrations of the precipitant (3, 6, 9 mol/L) and different molar ratios of Zn^{2+} to Ti^{4+} (1:1.2 ~ 2:1) were used to prepare the cubic nano-sized zinc titanate powders. The results demonstrated that when the concentration of the precipitant is 3 mol/L and the molar ratio is 1:1, the cubic nano-sized ZnTiO_3 with a mean grain size of about 40 nm, can be obtained under 600 °C by calcinations; when the concentration of the precipitant is 3 mol/L and the molar ratio is 2:1, the Zn_2TiO_4 powder with a mean grain size of about 90 nm, can be obtained under 800 °C by calcinations. And the powders have sphere shape with a narrow PSD.

Key words nanometer; zinc titanate; direct-reactive precipitation(DRP); cubic

(责任编辑 云志学)

(上接第 38 页)

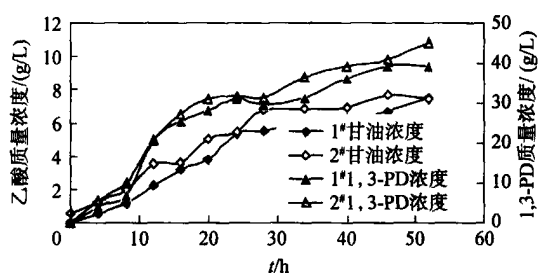


图 5 补料批式发酵过程中乙酸浓度的变化

Fig. 5 Variation of acetic acid concentration on fedbatch culture

3 结论

乙酸是 1,3-PD 发酵过程中的一种重要代谢副产物,在培养基中添加适量的乙酸能促进甘油的消耗、1,3-PD 的生成并提高甘油转化率。当乙酸质量浓度为 0.6 g/L 时,1,3-PD 为 8.46 g/L,与不含乙酸的发酵相比较,1,3-PD 浓度提高了 12%,此时的甘油转化率为 0.62,提高了 5.6%。培养基中葡萄糖的加入促进菌体的生长,当培养基中添加 1.2 g/L

的葡萄糖时,甘油的利用率低,则其转化率较高,达到 0.66。

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] 赵红英, 程可可, 向波涛. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇[J]. 精细与专用化学品, 2002, 13: 21 - 24
- [3] Zeng A P, Ross A. Multiple product inhibition and growth modeling of clostridium butyricum and klebsiella pneumoniae in glycerol fermentation[J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 902 - 911
- [4] 金平, 张建刚, 佟明友, 等. 甘油发酵制取 1,3-丙二醇菌株筛选[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(16): 13 - 15
- [5] 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
- [6] 张健, 赵红英, 刘宏娟, 等. 以葡萄糖为辅助底物发酵生产 1,3-丙二醇的研究[J]. 现代化工, 2002, 22(6): 32 - 35

Effect of acetic acid on 1,3-propanediol fermentation

JIANG Jie ZHANG Xu TAN Tan-wei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Effect of acetic acid on 1,3-propanediol fermentation was studied. The results show that the acetic acid increases 1,3-propanediol yield and reduces the absorbency of liquid. The optimal concentration of acetic acid was 0.6 g/L and the yield of 1,3-propanediol was 8.46 g/L, and the conversion reached to 0.62 mol/mol. The conversion of glycerol was up to 0.66 mol/mol when adding glucose as cosubstrate.

Key words: 3-propanediol; fermentation; acetic acid; glucose

(责任编辑 云志学)