

克雷伯氏肺炎杆菌 HR526 快速合成 1,3-丙二醇发酵特性研究

陈珍¹ 郑宗明² 孙燕³ 洪安安¹ 彭枫¹ 刘灿明¹ 刘德华^{3*}

(1. 湖南农业大学理学院 湖南 长沙 410128)

(2. 生物质发电成套设备国家工程实验室 华北电力大学可再生能源学院 北京 102206)

(3. 清华大学化工系 北京 100084)

摘要: 研究了实验室筛选的一株高产 1,3-丙二醇(PDO)菌株克雷伯氏肺炎杆菌 HR526(*Klebsiella pneumoniae* HR526), 在 5 L B. Braun 发酵罐进行甘油补料流加发酵 30 h, PDO 达到 91.47 g/L, 胞外代谢通量分析显示, PDO 在对数中期通量达到最大, 而乳酸在稳定期通量达到最大。结合酶学检测分析了 PDO 合成关键酶 PDO 氧化还原酶(PDOR)、甘油脱水酶(GDht)和甘油脱氢酶(GDH)酶活的变化, PDO 氧化还原酶活性在对数中期达到最高, 甘油脱水酶/甘油脱氢酶在对数期远大于稳定期、衰退期, 与代谢通量变化一致甘油脱水酶/甘油脱氢酶活性比例不均衡是 3-HPA 对数期积累的原因, PDO 合成主要集中在对数期, 是生长偶联的代谢产物。

关键词: 1,3-丙二醇, 比酶活, 代谢通量

Fermentation Characteristics of the Fast Conversion of Glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* HR526

CHEN Zhen¹ ZHENG Zong-Ming² SUN Yan³ HONG An-An¹
PENG Feng¹ LIU Can-Ming¹ LIU De-Hua^{3*}

(1. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. National Engineering Laboratory for Biomass Power Generation Equipment,
School of Renewable Energy, North China Electric University, Beijing 102206, China)

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

Abstract: The glycerol fed-batch fermentations with a novel isolated 1,3-propanediol production strains, designed *Klebsiella pneumoniae* HR526 were performed in 5 L B. Braun fermenter. The result indicated that 91.47 g/L 1,3-propanediol was produced in 30 h. The extracellular metabolic flux was calculated, indicating PDO flux reached the maximum value in the mid logarithmic growth phase, whereas lactic acid flux reached the maximum value in the stable phase. This article also analyzed the key enzyme activity of PDO synthesis, the maximum PDOR activity was reached in the mid of the logarithmic growth phase, the ratio of the GDht/PDO and GDht/GDH is rather higher in the logarithmic growth phase than in the stable, leading to

3-HPA accumulation during the exponential growth phase. The production of PDO is closely related to cell growth.

Keywords: 1,3-Propanediol, Specific enzyme activity, Extracellular metabolic flux

目前绝大部分化学品来源于石油化工过程,但是生物工程展现出直接或间接合成大宗化学品的潜力,已经成为智力及资本持续投入和工业化快速增长的领域之一。1,3-丙二醇(PDO)是一种具有双官能团的有机物,可作为溶剂用于油墨、印染、涂料、药物、润滑剂、抗冻剂等;可作为二醇用于合成杂环、药物中间体;可以替代1,4-丁二醇和新戊二醇等中间体用于生产多醇聚酯以及作为碳链延伸剂,可以作为单体来生产聚酯、聚醚、聚氨酯等聚合物,特别是合成聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT),1998年,PTT被评为美国当年的六大石化新产品之一^[1,2]。PDO可通过化学法和生物法生产,生物法生产PDO以其可利用可再生资源、对环境污染小而受到广泛的关注^[3-6]。自然界中已知的能够以甘油为底物转化PDO的菌种主要有克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter*)、乳杆菌(*Lactobacilli*)、梭菌(*Clostridia*)等,其中克雷伯氏肺炎杆菌是生产强度和产率较高的细菌之一,相关代谢机理研究的较为深入^[7,8]。在缺氧情况下,甘油代谢有赖于 dha 操纵子双歧途径,还原途径中甘油在甘油脱水酶和PDO氧化还原酶催化下形成PDO,氧化途径的产物二羟丙酮进入糖酵解途径^[9]。

代谢通量分析和酶学分析是研究细胞生理代谢机制的重要方法。代谢通量分析可以提供代谢网络中各个支路的流量分配信息。通过改变发酵条件等研究代谢网络中各个节点代谢通量的变化,将有助于了解整个细胞在生长过程中的各种生理变化和代谢应答,以便于更好地了解和解析细胞代谢机制和应答机制。酶学分析有助于进一步了解克雷伯氏肺炎杆菌的代谢机制, dha 操纵子表达的甘油脱氢酶(GDH)、甘油脱水酶(GDHt)和PDO氧化还原酶(PDOR)是与调控PDO合成密切相关的。本论文结合代谢通量、酶学特性、中间代谢产物等因素的分析,了解了菌体在流加补料发酵过程中的生长规律,研究了PDO快速合成的生理学机理,为基因工程改造和进一步优化发酵工艺奠定了初步基础。

1 菌株、材料与分析方法

1.1 实验材料

菌种:实验用克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*),由清华大学化工系应用化学研究所分离并保藏,命名为*K. pneumoniae* HR526。

试剂:辅酶、辅酶B12、3-甲基-2-苯并噻唑酮脲(MBTH);甘油、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、甘氨酸、氢氧化钠等化学试剂均为分析纯,购自北京益利精细化学品有限公司。

1.2 培养基及培养方法

种子培养基组成及培养方法参照文献^[10]。

发酵培养基(g/L):甘油 10~40, K_2HPO_4 0.69, KH_2PO_4 0.25, $(NH_4)_2SO_4$ 4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 酵母粉 1.5, 微量元素 1 mL, 铁溶液 1 mL^[11]。微量元素成分为(mg/mL): $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 100, $ZnCl_2$ 70, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 35, H_3BO_3 60, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 200, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 29.28, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 25 和 0.9 mL HCl (37%)。铁溶液的配制:每升水中加入 $FeSO_4 \cdot H_2O$ 5.0 g, 37%的浓盐酸 4 mL。

发酵培养:发酵实验在Braun B Plus型5 L全自动发酵罐(德国B. Braun公司)中进行。装液量4 L, 接种量1.5%。搅拌速度250 r/min, 发酵温度37°C, 通气量0.5 vvm, 发酵过程中体系pH用质量分数为10 mol/L的NaOH溶液控制,在初始甘油降到5 g/L以下时开始流加底物甘油,保持甘油浓度在5 g/L~30 g/L。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量细胞干重(DCW):通过722S分光光度计在波长650 nm下测定,根据干重与 OD_{650} 对应的标准曲线计算。

1.3.2 底物及代谢产物的检测:发酵底物及代谢产物使用SHMADZU高效液相色谱(日本岛津公司),色谱柱为Aminex resin-based 87H柱,柱温65°C;流动相为0.005 mol/L H_2SO_4 , 流速0.8 mL/min;检测器为CTO. 10vp折光示差检测器,进样量为20 μ L。

1.3.3 3-HPA(三羟基丙醛)的测定:通过Circle^[12]等人报道的比色法测定。

1.3.4 蛋白质及酶活的测定: 甘油脱水酶(GDHt)、甘油脱氢酶(GDH)和 PDO 氧化还原酶(PDOR)等酶活测定方法参照文献[13]。

1.3.5 比合成速率的计算方法参照文献[14]。

2 结果与分析

2.1 *K. pneumoniae* HR526 合成 PDO 补料流加发酵结果

克雷伯氏肺炎杆菌(*K. pneumoniae* HR526)在 Braun B Plus 型 5 L 中进行甘油的流加发酵补料发酵, 控制发酵温度为 37°C, 搅拌转速为 250 r/min, 以 40% 的 NaOH 调控 pH 值为 6.5, 通气量为 0.5 vvm 空气, 结果如图 1、2 所示: 发酵 30 h 的 PDO 产量为 91.47 g/L, PDO 的摩尔转化率和生产强度分别达到 0.52 mol/mol 和 3.13 g/(L·h), 好氧发酵导致 PDO 的摩尔转化率比厌氧条件低^[5]。HR526 是目前文献报道中 PDO 产量最高的菌株之一, 该产量也是利用甘油发酵 PDO 生产强度最大的菌株之一。

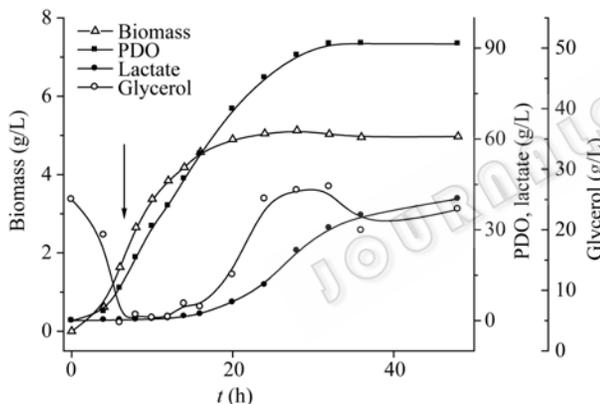


图 1 发酵过程中乳酸, 1,3-丙二醇, 甘油和生物量的变化

Fig. 1 Time profile of lactate, PDO, glycerol and biomass during fermentation

注: 箭头表示开始流加。

Note: The initiation of fed-batch fermentation is indicated by arrow.

2.2 胞外代谢通量分析

为了分析产物合成的生理学机理, 根据上节补料流加发酵的结果, 计算了 *K. pneumoniae* HR526 流加补料发酵的甘油消耗速率, PDO、BDO、乳酸、乙酸、丁二酸和乙醇的胞外代谢通量(如图 3、4)。

综合考虑生物量、产物合成、甘油消耗和胞外代谢通量等因素的变化趋势, 流加补料发酵可以分为 4 个时期, 第 1 阶段($0 < t < 2$ h)是发酵的延滞期, 底

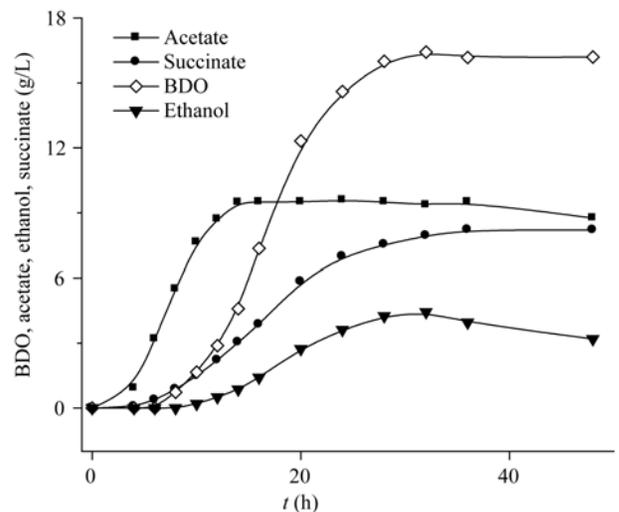


图 2 发酵过程中丁二酸、2,3-丁二醇、乙酸、乙醇的变化
Fig. 2 Time profile of succinate, BDO, acetate and ethanol during fermentation

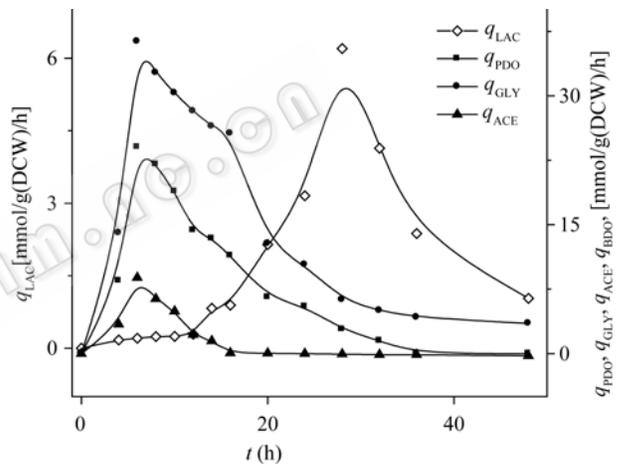


图 3 发酵过程中甘油比消耗速率、PDO、乳酸、乙酸比合成速率的变化

Fig. 3 Time profile of specific glycerol uptake, specific synthesis of PDO, lactate, and acetate

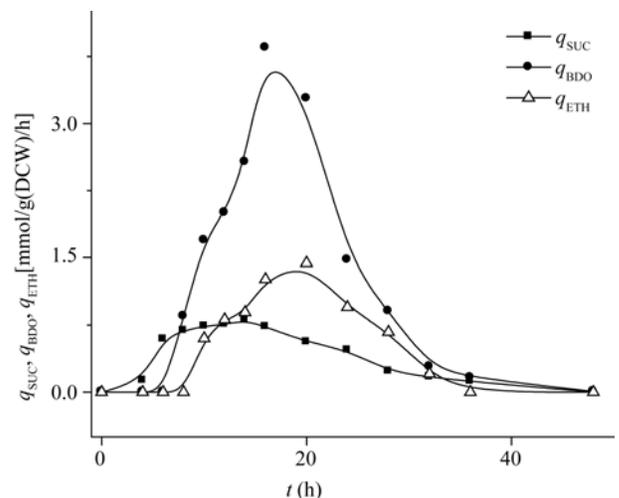


图 4 发酵过程中乙醇、BDO、丁二酸比合成速率的变化
Fig. 4 Time profile of specific synthesis of ethanol, BDO, and succinate

物消耗和产物合成速率基本为零;第2阶段($2\text{ h} < t < 20\text{ h}$)是发酵的对数生长期,在这个阶段生物量持续稳定增长, q_{glycerol} 和 q_{PDO} 、 q_{ACE} 的变化趋势相似,在对数中期达到最大值, q_{glycerol} 、 q_{PDO} 最大值分别为36.34、24.03,比Zheng等^[15]发酵*K. pneumoniae* CGMCC 1.6366计算得到的最大 q_{PDO} 22.8 mmol/g·h要高,最大 q_{glycerol} 42.7 mmol/(g·h)要低,即PDO得率高,且 q_{PDO} 在第8小时就达到最高,比其12 h到达最高提前了4 h,因此PDO在对数期能够迅速合成,在对数后期逐渐下降, q_{ACE} 、 q_{ethanol} 在对数后期达到最大;第3阶段($20\text{ h} < t < 36\text{ h}$)细胞生长进入稳定期,除 q_{lactate} 之外,其余所有产物的代谢通量均持续减少,而 q_{lactate} 先增加后降低,峰值达到6.20 mmol/(g·h);第4阶段($t > 36\text{ h}$)是衰亡期,菌体裂解,生物量逐步下降,底物消耗和产物合成速率降到非常低的水平,代谢通量值几乎为零。

2.3 1,3-丙二醇合成关键酶活分析

为了进一步研究*K. pneumoniae* HR526快速合成PDO代谢机理,本节分析了流加补料发酵过程中关键酶活变化,克雷伯氏肺炎杆菌(*K. pneumoniae* HR526)在Braun B Plus型5 L中进行甘油的流加补料发酵,控制发酵温度为37°C,搅拌转速为250 r/min,以40%的NaOH调控pH值为6.5,通气量为0.5 vvm空气,每隔4 h取样测定酶活,图4是测定GDHt、GDH和PDOR活性的变化曲线,在对数前期,由于未流加补料,GDHt、GDH和PDOR活性随着甘油浓度的降低而降低,当初始甘油浓度消耗完(8 h),GDHt、GDH和PDOR活性也降到最低,由此可见较高的甘油浓度对酶活有促进作用,8 h后开始流加补料,GDH、PDOR活性开始增加并在对数中后期保持在一个较高的水平,GDHt在对数中期活性开始下降。

图6是GDHt/PDOR、GDHt/GDH比值与3-HPA的变化曲线,由图可知,在对数期GDHt/GDH比例显著高于稳定期和衰退期,表明在对数期,碳源更多的流向还原途径,而在稳定期和衰退期,由于产物抑制,菌体生长停止,GDHt和GDH酶活降低,甘油的消耗减少并停止,NADH再生的需求减弱,即PDO合成的生理需要逐渐消失,PDOR酶活降低,PDO合成速率减缓,因此对数期是快速合成PDO的关键,这与代谢通量分析结果一致。同时GDHt/PDOR比值与3-HPA变化曲线极度相关,该结果表

明,*K. pneumoniae*流加发酵前期GDHt和PDOR活性不平衡是3-HPA积累的主要原因之一。进入对数后期(16 h以后),GDHt/PDOR比值降到最低,3-HPA致死性积累的现象逐渐消失。因此3-HPA可以作为表征菌株PDO生产能力的参数。

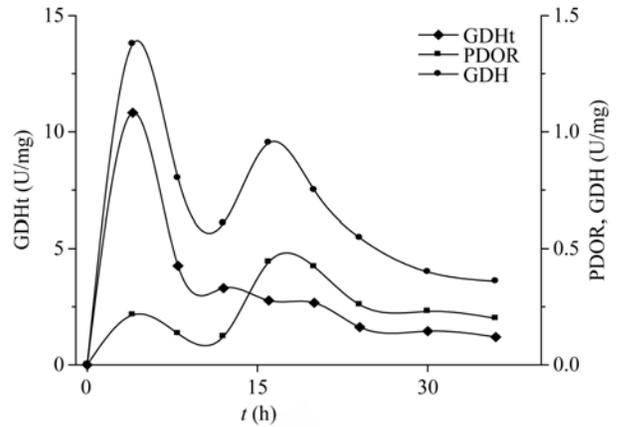


图5 流加发酵过程中GDHt、GDH、PDOR活性变化
Fig. 5 Time profile of GDHt, GDH, PDOR activity

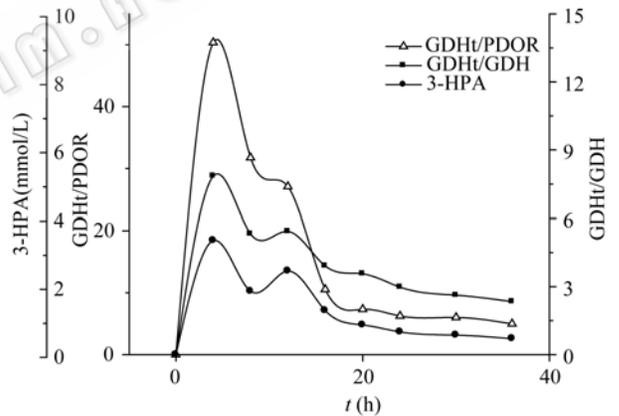


图6 流加发酵过程中GDHt/GDH、GDHt/PDOR比值变化与3-HPA变化
Fig. 6 Relationship of GDHt/GDH, GDHt/PDOR with 3-HPA

3 讨论

本实验以实验室筛选得到的一株能利用甘油高产1,3-丙二醇菌株克雷伯氏肺炎杆菌HR526(*K. pneumoniae* HR526)为对象,对*K. pneumoniae* HR526进行流加补料发酵,发酵30 h PDO产量达到91.47 g/L, PDO的摩尔转化率和生产强度分别达到0.52 mol/mol和3.13 g/(L·h),是目前文献报道中PDO产量最高的菌株之一,该产量也是利用甘油发

酵 PDO 生产强度最大的菌株之一。

根据发酵结果, 计算了胞外代谢通量, 分析了不同生长时期的代谢通量, 结果显示, 在对数期 PDO 迅速合成, 在对数中期达到最大值 24.03 mmol/(g·h), 在对数后期逐渐下降。稳定期乳酸大量合成, 其余所有产物的代谢通量均持续减少。而在衰退期, 碳源几乎不消耗, 所有产物的通量均下降。

结合酶学分析, 分析了 PDO 合成关键酶酶活变化, 结果显示 PDOR 活性在对数中期达到最高, 同时 GDHt/GDH 在对数期远大于衰退期, 由此可见对数期碳源主要流向还原途径, 所以在对数期 PDO 能迅速合成。如何进一步提高对数期和发酵后期 PDO 的合成速率, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Freund A. Über die bildung und darstellung von trimethylenealkohol aus glycerin. *Monatsheft fur Chemie*, 1881, **2**: 636–641.
- [2] González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, *et al.* Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(1): 96–101.
- [3] Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, *et al.* Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(1): 116–125.
- [4] Toraya T. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**(1): 106–127.
- [5] Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**(9): 391–396.
- [6] Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, **74**: 239–259.
- [7] Charles EN, Gregory MW. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**(5): 454–459.
- [8] 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 Bacteriol*, 2001, **183**(5): 1748–1754.
- [9] Homman T, Carmen T, Deckwer WD, *et al.* Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **33**(5): 121–126.
- [10] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, *et al.* Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(3): 289–297.
- [11] Cheng KK, Liu DH, Sun Y, *et al.* 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(11): 911–915.
- [12] Zheng ZM, Hu QL, Hao J, *et al.* Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. *Bioreactor Technol*, 2008, **99**(5): 1052–1056.
- [13] Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein determination by means of tryptophan: a colorimetric micro method. *Ind Eng Chem Anal Ed*, 1945, **17**(4): 259–262.
- [14] Zheng ZM, Xu YZ, Liu HJ, *et al.* Physiologic Mechanisms of 1,3-propanediol fed-batch fermentation by *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **100**(5): 923–932.
- [15] Kastner JR, Eiteman MA, Lee SA. Effect of redox potential on stationary-phase xylitol fermentations using *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotchnol*, 2003, **63**(1): 96–100.

栏目介绍

显 微 世 界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片, 带您走进显微镜下的微生物世界, 希望在阅读期刊相关科学新进展的同时, 给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。