

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得沈阳农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

管艺飞

时间： 2006年6月11日

刘长江

关于论文使用授权的说明

本人完全了解沈阳农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意沈阳农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

管艺飞

时间： 2006年6月11日

导师签名：

刘长江

时间： 2006年6月11日

摘 要

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一个具有多种用途的中间化合物,是生产新型 PTT 纤维的主要单体,具有许多优良特性和很好的应用前景。微生物发酵法生产 1,3-丙二醇与化学合成法相比具有显著的优点,因而越来越受到重视,成为当前的研究热点。

本文从已有的三株菌中筛选出一株能生产 1,3-丙二醇且性能良好的菌株—克雷伯氏肺炎杆菌 As1.1736 作为出发菌株,并对其种子培养条件进行优化。为了进一步获得 1,3-丙二醇的高产突变株,以克氏肺炎杆菌 As1.1736 为出发菌株进行诱变处理,并对发酵培养条件进行初步优化。

甘油由克氏肺炎杆菌转化生成 1,3-丙二醇的研究是在厌氧条件下进行的,采用空气置换和降低氧化还原电位相结合的方法制备预还原培养基。取对数期单细胞菌悬液适量,在紫外线最适照射剂量下诱变筛选高产突变株;再经 DES 溶液诱变筛选出高产突变株,然后将经 DES 诱变得到的高产菌株在两次浓缩的基础上进行 UV+LiCl 复合诱变,经过建立在影印技术上的初筛和复筛后采用高效液相色谱法测 1,3-丙二醇的产量以确定高产突变株;分别对温度、pH 等培养条件和碳源、氮源、酵母膏、金属离子等组分进行单因素实验,确定甘油转化生成 1,3-丙二醇的主要影响因素,然后通过正交实验进行培养条件优化。

实验研究结果表明:克氏肺炎杆菌是兼性厌氧菌,以克氏肺炎杆菌为出发菌株,经过紫外线诱变、硫酸二乙酯(DES)诱变及紫外线(UV)和氯化锂(LiCl)复合诱变得到突变株 *K.pneu4046*,其 1,3-丙二醇产量由出发菌株的 4.7g/L 提高到 16.1g/L,提高了 3.43 倍;高浓度甘油对 *K.pneu4046* 的生长具有较大的抑制作用,当甘油浓度为 9%时抑制作用十分明显;酵母膏是 1,3-丙二醇发酵所必需的营养组分,添加适量的酵母膏将有利于 1,3-丙二醇的产生;通过对菌株 *K.pneu4046* 培养条件的优化,确定最适发酵培养基(L⁻¹)是:甘油 60g, K₂HPO₄1.3g, KH₂PO₄0.5g, CaCl₂ 0.1g, MgSO₄•7H₂O 0.2g, NH₄Cl 2.0g, Fe 液 1mL, 酵母膏 2.0g, 微量元素液 1 mL。在该优化条件下 *K.pneu4046* 突变株的 1,3-丙二醇产量为 21.3g/L;通过正交实验可知温度、pH 和接种量对发酵有着重要的影响,当温度为 37℃、接种量为 5%、pH 为 7.0 时有利于甘油向 1,3-丙二醇的转化;在最适发酵培养基和最适发酵条件下,1,3-丙二醇最高产量可达 24.38g/L。

关键词:克氏肺炎杆菌;甘油发酵;1,3-丙二醇;诱变;选育;发酵培养条件优化

Abstract

1,3-propanediol (1,3-PD) is a multi-purpose intermediate and has a wide range of potential use, particularly as a monomer for the production of biodegradable polymers—PTT fiber. Compared with chemical synthesis, microbial fermentation processes to 1,3-PD have many obvious advantages, the environmental friendship and price advantage make it more promising, and become the focuses of reach.

A high-1,3-PD productivity strain—*Klebsiella pneumoniae* AS1.1736 was selected from three strains of bacteria gained in our lab. The present studies were designed to optimize the conditions of batch cultivations. In order to obtain a higher 1,3-propanediol-productivity strain, *Klebsiella pneumoniae*, as original strain, was treated by multiple mutagens. Then, the optimal medium in glycerol fermentation to 1,3-propanediol was studied tentatively in this paper.

The conversion from glycerol to 1,3-PD by *Klebsiella pneumoniae* was studied in anaerobic culture. 1,3-PD is determined by hyper-liquid chromatography. The prereduced medium is obtained through the method combined with lower oxidation-reduction potential and air-N₂ substitution. The single cells of *Klebsiella pneumoniae* in exponential phase with proper proportion were treated by UV under optimal time of UV irradiation firstly and two higher-yield mutants were obtained; Secondly, they were mutagenized multiply by diethyl sulfate under appropriate dosage of DES mutagenic effect, and then the higher-yield mutants were mutagenized multiply by UV and LiCl under optimal time of UV irradiation and appropriate dosage of LiCl mutagenic effect after twice concentration. With technology of replica screening, a higher-yield strain was bred through the primary screening and examination test of 1,3-PD production as the secondary screening; Thirdly, single factor analysis was carried out, which included cultural conditions such as temperature and pH and culture medium components such as carbon and nitrogen source, yeast extract and mineral element, in order to determine major influencing factors in glycerol conversion to 1,3-propanediol. Finally, the medium was optimized through orthogonal experiments.

The experiment studies show that *Klebsiella pneumoniae* is a facultative anaerobic bacterium; *Klebsiella pneumoniae*, as original strain, was treated by UV and diethyl sulfate (DES) and multiple mutagenesis (UV and LiCl), a higher-yield strain *K.pneu4046* was bred. It was showed that the genetic property of this new mutant was stable by pass-generation tests and the yield of 1,3-PD was higher than 16.1g/L, which had been increased about 3.43 times than that of the initial strain; Glycerol with higher concentration has a inhabitation to the cell growth of *K.pneu4046*, particularly 9% of glycerol is very marked; Yeast extract is an essential nutrient component of cell growth during glycerol fermentation to 1,3-propanediol and optimal concentration will be favorable of the product; Through single factor and orthogonal experiments, the optimal medium for glycerol conversion to 1,3-PD by *K.pneu4046* is (per litre): glycerol 60g, K_2HPO_4 1.3g , KH_2PO_4 0.5g , $CaCl_2$ 0.1mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NH_4Cl 2.0g, Fe solution 1ml, yeast extract 2g, trace mineral element solution 1mL. Under this condition, the yield of 1,3-PD about mutant *K.pneu4046* was 21.3g/L. Temperature, pH and inoculums also have an important influence on the fermentation. The cultivation with 37°C temperature, an inoculums of 5%(v/v) and pH 7.0 will be suitable to the conversation.. the yield of 1,3-PD about mutant *K.pneu4046* was higher than 24.38g/L.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Glycerol fermentation, 1,3-Propanediol, Mutation, Breeding, Optimal medium

第一章 前言

聚对苯二甲酸丙二醇酯 (PTT) 是新近开发成功的一种性能优异的聚酯材料, 是继聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET)、聚对苯二甲酸丁二酯 (PBT) 之后极有发展前途的新型聚酯高分子材料, 1998 年被美国评为六大石化新产品之一。1,3-丙二醇是重要的化工和医药中间体原料, 同时也是新型聚酯纤维聚对苯二甲酸丙二酯 (PTT) 合成的单体。与聚对苯二甲酸乙二酯 (PET)、聚对苯二甲酸丁二酯 (PBT) 和尼龙等相比, PTT 具有高弹性、良好的连续印染性、抗紫外性、抗内应力、耐磨性强、低吸水性、低静电以及良好的生物降解性、可循环利用等多种优良特性, 因此在地毯、纺织、工程塑料等众多领域中广泛应用 (黄象安, 2000; 罗抚英等, 2002; 张从容, 2000; 赵红英等, 2002a)。

化学法合成 1,3-丙二醇不仅投资巨大, 而且利用的原料是不可再生的石油资源, 生产过程中还会产生有毒有害的中间体。相对于化学合成法, 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇技术的产业化将具有划时代的意义, 它将打破过去纤维产品原料全部来源于石油化工的历史, 以玉米为起始原料, 首先将淀粉、淀粉水合物、糖蜜等发酵生成甘油; 甘油再在微生物的作用下发酵生成 1,3-丙二醇。微生物发酵法生产 1,3-丙二醇具有可利用再生资源、对环境污染小、副产物可降解等特点, 生产过程清洁, 对环境无污染, 符合二十一世纪可持续发展要求, 因而它的转化生产已成为国内外研究的重点 (王剑锋等, 2001a)。

1.1 1,3-丙二醇生产现状

1.1.1 1,3-丙二醇的性质

1,3-丙二醇 (1,3-Propanediol, 简称为 1,3-PD), 在室温下为无色或灰黄色微有甜味的粘稠状液体, 略有刺激性气味, 沸点为 214°C , 比重为 1.053, 能与水、醇、醚等互溶, 难溶于苯、氯仿、石油醚, 无腐蚀性, 微毒; 1,3-丙二醇易于生物降解, 对环境危害小, 是一种重要的化工原料。1,3-PD 的化学性质体现了醇和二元醇的典型性质 (姜兴茂, 1999), 即在高温下与羧酸缩合成酯; 与异腈酸盐及酸性氯化物反应生成聚氨酯; 在酸性催化剂条件下与醛酮反应生成 1,3-丙二醇对苯二酸酯。

1.1.2 1,3-丙二醇的用途

1,3-PD 应用领域与其它二元醇类似, 是一种重要的化工原料, 其本身就是良好的溶剂、抗冻剂、保护剂及润滑剂, 而且可以参与多种化学合成反应, 作为有机合成原料和医药中间体而受到广泛的应用。

医药中间体而受到广泛的应用。

1.1.2.1 1,3-PD 在有机合成领域的应用

1,3-PD广泛应用于有机合成领域,其可以作为聚酯、聚醚和聚氨酯的重要单体原料。这类聚合物具有生物可降解性等许多其它二元醇合成塑料所不具有的优良性质,因而1,3-PD在有机合成领域的应用正日益增加。

PTT聚酯纤维是通过1,3-PD和对苯二甲酸或苯二甲酸二甲酯反应生成对苯二甲酸丙二酯,再经缩聚反应生成聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)。以1,3-PD为单体合成的PTT,较之以乙二醇作单体的聚酯(PET)具有更优良的特性,如尼龙样的弹性恢复(拉伸20%后仍可恢复原状),在全色范围内无需添加特殊化学品即能呈现良好的连续印染特性,抗紫外、臭氧和氮氧化合物的着色性、抗内应力、低水吸附、低静电以及良好的生物降解,可循环利用等。这些特性显示出PTT的美好前景,将会在服装和地毯丝领域代替尼龙。我国是纺织大国,对一生产纺织品的原料有巨大的需求,2000年聚酯纤维产量近40000kt,我国聚酯原料有约1/2依靠进口,如果PTT使纺织材料市场扩大5%,每年1,3-PD的市场需求大约为4.5万吨/a。

另外,经玻璃纤维填充的PTT抗冲击程度和尺寸稳定性都比较好,它比PET具有更好地使用性能、比PBT具有更好地成型加工性能,使得PTT可用于电子、汽车零件、家电、器具及家具行业。1997年6月shell公司在日本塑料展览会上推出用于工程塑料的经玻璃纤维填充的PTT“Corterra”引起了工程塑料界的巨大关注。

1.1.2.2 1,3-PD 在医药合成领域的应用

2-氨基-1,3-丙二醇的衍生物可以预防,控制或治愈同种、异种移植接受者的急性或慢性排斥反应,可以预防或治愈同种或异种移植接受者的移植血管疾病,如移植血管病、动脉硬化或动脉粥样硬化。

非氨酯中间体2-苯基-1,3-丙二醇作为新一代抗癫痫药,正得到越来越多的应用。

1.1.2.3 1,3-PD 在化妆品领域的应用

作为润肤剂与保湿剂的二元醇,在个人护理用品种起着重要的增强作用。美国ARCO公司最近推出了一种新产品 MPDiol glycerol (2-甲基-1,3-丙二醇)。它能使香水的存留更为持久,具有极好的溶解特性和吸水性,而且对皮肤与口腔的毒性很低,对皮肤与眼睛的刺激潜能也低。因而它作为一种载体溶剂将广泛应用于洁肤剂、洁肤乳、香水、祛臭剂与化妆品等这类个人护理用品中。

1.1.2.4 1,3-PD 在食品领域的应用

以1,3-丙二醇为原料合成的丙二醇酯是一类食品添加剂。作为是世界六大食品乳化

剂之一，目前已被美国，日本，加拿大，丹麦，中国等国家及欧洲，联合国粮农组织和世界卫生组织批准使用。

1.1.3 1,3-PD 生产状况

90 年代初，全世界 1,3-PD 的需求量很少，产量很低，1991 年的产量仅为 100 吨。目前，1,3-PD 的生产主要采用传统的石油化工生产工艺，由于化学合成法选择性差，产率也较其它二醇的生产方法低，导致市场上其销售价格也比较高，市场占有率远远不及乙二醇、1,2-丙二醇、1,4-丁二醇等其它二醇（修志龙等，2000）。

近些年，随着 PTT 纤维优良性质的不断挖掘，1,3-PD 的市场需求量也发生了明显的变化。1995 年，世界上几家著名的大化学工业公司相继投入 1,3-PD 规模化生产并加紧了应用研究和开发。美国 Shell Chemical 公司首先实现了 PTT 的商品化，并且开发了化学法生产 1,3-PD 的新工艺。该公司于 1996 年 9 月在路易斯安那州 Geismar 工厂建立了生产 Corterra 聚合物的关键原料 1,3-PD 生产装置，年产量 4000 吨，还于 1999 年再建了一套年产 7.26 万吨 1,3-PD 和 9.1 万吨 Corterra 聚合物的工厂，并已于 1999 年底投入运营。德国 Degussa 公司已经在 Antwerpen 建成年产 2 吨 1,3-PD 的中试基地，年产 50 吨的大规模工业装置也已投产，并于 1999 年设计完成了年产 1 万吨的装置。美国杜邦（Dupont）公司于 1998 年从德国 Degussa 公司获得了化学法生产工艺，但是它主要倾向于经济可行的微生物发酵法。Dupont 公司与世界上第二大工业酶生产商 Genencor 国际公司共同申请了以可发酵碳源为底物，用基因工程菌直接生产 1,3-PD 的专利并取得了一些进展。该公司已于 2004 年 5 月末设立合资公司准备上规模化生物法 1,3-PD 生产线，预计在 2006 年投产。

根据美国一家公司的调查表明，未来全世界仅仅合成 PTT 就需要 1,3-PD 大约 400 万吨，合计 500 亿元，这还不包含其他领域对 1,3-丙二醇的需求，这也为 1,3-PD 的大规模生产展示了美好的前景（黄象安，2000）。据了解，目前世界上只有美国壳牌公司和杜邦公司等少数公司采用化学法批量生产 1,3-PD。为了垄断市场，这两家跨国公司不对外销售 1,3-PD，而只向客户销售 PTT 切片及其下游产品。

目前，我国的 1,3-PD 的产量非常少，仅有少数几家化学试剂厂，如上海试剂一厂、北京化工厂等用缩水甘油酸乙醇经氢化铝锂还原制得。国内还没有 1,3-丙二醇批量生产的企业。随着 PTT 纤维等相关产品的高速发展，1,3-丙二醇的需求量将很快增长（赵红英等，2002；瞿国华，2000）。2005 年清华大学国际技术转移中心组织国内外专家，从德国引进了生物发酵法生产 1,3-PD 的小试技术，并将合资致力于 1,3-PD 技术的逐级放大，使之成为工

业化技术。

1.1.4 1,3-PD 生产途径

目前, 1,3-PD 的生产方法主要有化学合成法和微生物发酵法(邵敬伟等, 2001; 瞿国华等, 2000; Hassiba M et al, 2001)。在化学合成生产中已具备商业化的方法有环氧乙烷法和丙烯醛法(刘银乾等, 2002)。

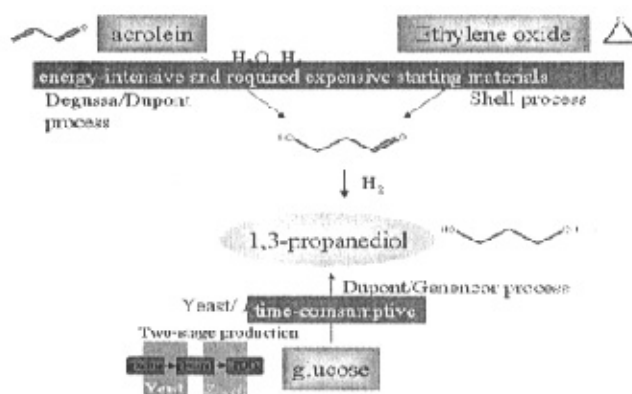


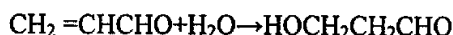
图 1.1 1,3-丙二醇的生产方法

Figure 1.1 producing method of 1,3-PD

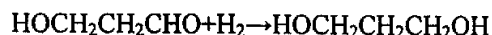
1. 丙烯醛路线(Acrolein)

德国 Degussa 公司开发出丙烯醛为原料生产 1,3-PD 的工业路线, 其生产的主要步骤有以下两步:

- a. 丙烯醛水合得到 3-羟基丙醛 (3-HPA)



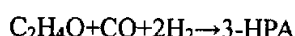
- b. 3-HPA 催化加氢制得 1,3-PD



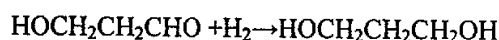
2. 环氧乙烷法 (Ethylene)

美国 Shell 公司采用环氧乙烷路线, 成功地开发出了经济规模的 1,3-PD 生产新工艺, 使成本大大降低。其反应步骤如下:

- a. 环氧乙烷在催化剂作用下与 CO 和 H₂ 反应生成 3-HPA



- b. 分离出的 3-HPA 经催化加氢生成 1,3-PD



国外共有三家公司研究开发出了环氧乙烷路线生产 1,3-PD 的工艺, 该方法的关键

还是在于催化剂的制备和选择上,原料比较容易得到,也易于储存和运输,产品成本价格低,但是设备投资大,技术难度高,尤其是催化剂的制备和选用上很复杂(Emptage M. et al, 2001)。

用化学方法合成1,3-PD需要在高温、高压及贵重催化剂才能实现,成本较高,设备投资大,技术难度高,产品分离纯化困难,特别是催化剂的制备较难,且产生CO等污染环境的废气。随着现代生物技术的发展,人们开始尝试用微生物发酵法生产1,3-丙二醇的研究。微生物发酵法具有条件温和、操作简单、副产物少、绿色环保等优点,所以这方面的研究成为当前国内外研究的热点。

20世纪70年代诞生的基因工程技术,在短短的数十年间,已经对工业生产产生了无以伦比的影响。简单来说,基因工程就是在体外进行基因的切割和重新拼接,再重新转到生物体内,从而达到人们所期望的目标。越来越多以前难以获得的蛋白质都通过构建基因工程菌进行工业化大生产而可以大量低成本地获得。

1.2 微生物 发酵法生产 1,3-丙二醇研究进展

在 100 多年前,人们就知道 1,3-PD 能从甘油中发酵得来。微生物发酵甘油生产 1,3-PD 的研究始于 20 世纪 70 年代中期,那时 Ruch F E 等(1974)就对甘油在肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)中的代谢规律进行了研究,并于 1975 年报道了在该菌种中存在两条独立的甘油代谢途径。在此后的大约 20 年中,人们主要集中在甘油代谢关键酶的研究上,而对甘油厌氧发酵的研究却仅仅始于 20 世纪 80 年代末 90 年代初期。那时,由于生物油脂的价格降低,导致人们大量地使用脂肪分解的方法来生产工业上使用的脂肪酸,从而也导致脂肪分解的副产物—甘油的大量积累过剩,甘油在国际市场上的价格也随之走低。在这种情况下,欧共体国家为了缓解甘油过剩的压力,不得不积极地进行甘油转化的研究,当时,甘油转化 1,3-PD 的研究被赋予极大的热情。1982 年和 1987 年 Forage 与 Forsberg 分别对 *Klebsiella pneumoniae* 和 *Clostridia acetobutyricum* 发酵 1,3-PD 的厌氧特性和影响因素进行了研究(Deckwer W D, 1995)。Heyndrickx(1991)和 Dabrock(1992)等分别对巴氏梭菌(*Clostridia pasteurianu*)的厌氧发酵进行了报道。Biebl H(1991)和 Günzel B(1991)率先发表了丁酸梭菌(*Clostridia butyricum*)厌氧发酵甘油生产 1,3-PD 的学术论文。迄今为止的十多年里,微生物学专家们主要围绕着发酵菌种的分离、选育、及发酵条件等方面进行研究,并对 1,3-PD 厌氧发酵的机理、抑制因素、营养需求等多方面进行了报道。

1.2.1 微生物发酵法生产 1,3-PD 菌种

微生物发酵法生产 1,3-PD 是由细菌来完成的。现已发现几种能以甘油为底物发酵生产 1,3-PD 的细菌,但还没有发现可以利用其它有机物为底物生产 1,3-PD 的自然菌(Deckwer H, 1995)。到目前为止,能够进行转化的细菌主要有:肠道细菌中的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, 简称肺炎杆菌),产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*),弗氏柠檬菌(*Citrobacter freundii*),絮凝肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*);乳杆菌属的短乳杆菌(*Lactobacilli brevis*)和布氏乳杆菌(*Lactobacilli buchneri*);梭菌属的丁酸梭状芽孢杆菌(简称丁酸梭菌)和巴氏梭菌。其中,肺炎杆菌,丁酸梭菌、弗氏柠檬菌具有较高的 1,3-PD 转化率及生产强度,是研究比较多的三种菌。肺炎杆菌与弗氏柠檬菌属于兼性菌,而丁酸梭菌则要求严格的厌氧条件(Gunzel B et al, 1991; Colin et al, 2001; Solomon et al, 1995)。肺炎杆菌和丁酸梭菌比弗氏柠檬菌具有较高的耐受力,发酵速度较快。虽然肺炎杆菌与弗氏柠檬菌是 1,3-PD 转化较好的菌种,但由于它们作为肠道菌可能的致病性,所以在实际应用上受到一定限制。在国外的 1,3-PD 微生物发酵生产研究中丁酸梭菌因具有较高初始底物浓度耐受性、安全性和 1,3-PD 转化率,已成为研究较多的优势菌种,受到越来越多的重视。

1.2.2 甘油转化生产 1,3-PD 代谢途径

1,3-PD 是以甘油为底物发酵生产的典型产物,至目前为止还没有发现可以利用其它有机物为底物生产 1,3-PD 的自然菌。甘油作为唯一的碳源和能源物质,除了一部分形成生物量外,其余沿着氧化和还原两个平行路径代谢,发生歧化反应。甘油歧化过程见图 1.2。

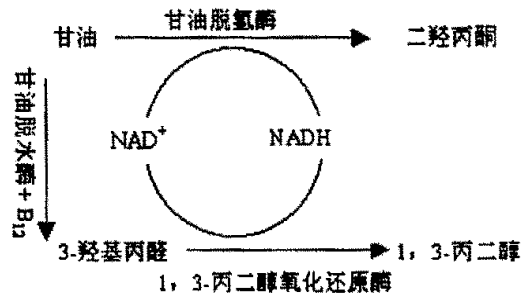


图 1.2 甘油歧化过程

Figure 1.2 The dismutation process of glycerol

一方面,甘油既可以由甘油脱氢酶(dhaD)氧化生成二羟丙酮(DHA),再由二羟丙酮激酶(dhaK)磷酸化生成磷酸二羟丙酮(DHAP),从而到达了中心代谢途径生成丙酮

酸, 丙酮酸进一步代谢生成各种副产物。该途径为氧化途径, 伴随有还原当量 NADH 和 ATP 的生成。另一方面, 甘油也可以在以维生素 B₁₂ 为辅酶的甘油脱水酶(dhaB)作用下生成 3-羟基丙醛(3-HPA); 3-HPA 在 NADH 参与下被 1,3-丙二醇氧化还原酶还原生成 1,3-PD。该途径为还原途径, 所需的 NADH 由氧化途径提供。

在厌氧条件下, 氧化途径中生成丙酮酸的反应在不同的菌种中是一致的, 但是不同的微生物菌种厌氧代谢的副产物是不尽相同的, 即丙酮酸有多个代谢途径。在肠道细菌中, 丙酮酸被丙酮酸甲酸裂解酶催化分解为乙酰辅酶 A 和甲酸, 甲酸往往又会分解为二氧化碳和氢气。乙酰辅酶 A 在经过乙酰磷酸化形成乙酸的过程中生成过量的 ATP。在不控制 pH 的条件下, 丙酮酸也可能经 α -乙酸乳酸产生 3-羟基丁醇并最终转化为 2,3-丁二醇。此外, 肠道细菌发酵的副产物中还有乳酸和琥珀酸。在巴氏梭菌中丁醇成为氧化途径的主要产物, 同时也有少量的乙醇产生(修志龙, 2001; Maria V, 1992; Barbirato F, 1997; Biebl H, 1999)。在丁酸梭菌中, 细胞在铁蛋白氧化还原酶的作用下生成乙酰 CoA, 并释放出二氧化碳和氢气, 乙酰 CoA 进一步代谢最终主要生成乙酸和丁酸, 有时也可以伴随有甲酸和正丁醇的生成。

1.2.3 1,3-PD 发酵生产影响因素

1,3-PD 最终浓度的大小主要取决于菌株对底物、主要产物和副产物的耐受程度, 还与酶的代谢活性有关。

1. 不同发酵形式对生产能力的影响

1,3-PD 发酵属于液态厌氧发酵。在发酵工艺方面, 间歇发酵和连续发酵研究的相对较多。间歇发酵可以得到较高的产物浓度, 但生产强度较低; 连续发酵有利于产率的提高, 但产物浓度较低。考虑到 1,3-PD 自身特有的性质, 及常规分离费用高、高浓度有利于后期提取等特点, 选择流加发酵较为合适, 且采用流加发酵可以降低底物抑制作用, 提高细胞对甘油的利用。另外, 细胞固定化可以缩短菌体生长时间, 提高细胞重复使用率, 减少菌体培养费用, 获得较高产率, 并有利于发酵过程稳定进行, 目前已有人在 1,3-PD 发酵方面研究开发固定化细胞的连续生产反应器。

同一种菌种采取不同的培养方式得到效果不同。分批发酵最终浓度较高。而连续发酵在生产强度上较有优势。在同样条件下, 分批发酵每摩尔甘油得到 0.55-0.65mol 1,3-PD, 其生产强度为 1-2.5g/L.h, 最终浓度达到 50-60g/L。而连续发酵可以提高生产强度到 5-6g/L·h⁻¹, 但发酵液中产物浓度却不及批式发酵的一半。值得一提的是, Menzel

等(1997)采用 *K. pneumoniae* 进行甘油连续发酵高产 1,3-PD 的研究。结果发现当稀释率在 10%-25% 时, 最终 1,3-PD 含量为 35.2~48.5g/L。由于在分批发酵中高浓度甘油对产物 1,3-PD 具有强烈的抑制作用。为了减少高浓度甘油的抑制作用, 补料分批培养是很好的甘油底物提供方式。Zeng 等(1997)的研究发现, *K.pneumonia* 采用该形式培养发酵生产 1,3-PD 时, 甘油的含量为 20-70g/L, 转化率均可达 100%, 1,3-PD 的产量为 12-32g/L。当甘油起始浓度为 5%, 可以获得最大产率。一般在 12-16h 后再补加甘油 20g/L, 随着稀释度的增加, 酶的活性也随之提高, 从而转化速率没有改变。

2. 底物和产物的抑制作用及其与代谢的关系

底物和产物对细胞生长的抑制作用是普遍存在的, 对于任何甘油发酵生产 1,3-PD 的菌株来说, 都会受到底物和产物的抑制作用。

高浓度甘油对发酵 1,3-PD 生产具有强烈的抑制作用。赵红英等人(2002)研究了底物甘油浓度对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵生产 1,3-PD 的影响, 针对底物抑制现象, 提出了菌种驯化和流加甘油发酵两种解决途径。在较高甘油初始浓度(789 mmol/L)的情况下, 使用驯化培养获得的耐底物抑制菌株, 采用流加甘油发酵工艺, 可使 1,3-PD 摩尔浓度和摩尔转化率分别达到 397.7 mmol/L 和 0.625mol/mol。

在以甘油为唯一碳源并缺少其它外源还原当量的情况下, 1,3-PD 形成的生理作用就是把在生物合成和副产物形成过程中释放的还原当量再氧化。乙酸、乙醇、丁酸等副产物对细胞的生长和生存是必要的。Zeng H (1994) 等认为抑制丁酸梭菌细胞生长的关键浓度为: 乙酸(未游离) 0.4g/L、丁酸 0.3 g/L、甘油 97 g/L、1, 3-PD 64 g/L, 并且建立了数学模式来描述几个主要副产物、产物、和底物对丁酸梭菌的抑制作用。他认为在不添加其它抑制因子的条件下, 连续培养只可以获得很少量的丁酸; 代谢产生的丁酸具有比外加入的丁酸高 2~3 倍的抑制力, 丁酸的抑制作用表现为总量。乙酸的作用方式同丁酸相似, 但是乙酸比丁酸的毒性小, 乙酸对细胞生长的抑制作用主要来自于未解离形式的乙酸。乙酸和丁酸只有在培养液中含有较低浓度的 1,3-PD 时, 对细胞的抑制作用明显; 而在含有较高浓度的 1,3-PD 时, 1,3-PD 的抑制作用则更为突出。

另外, Günzel (1991) 等认为空气流速和搅拌速度对发酵产物的形成无明显影响。

1.2.4 1,3-PD 发酵底物选用

发酵生产 1,3-PD 的细菌中, 还没有发现能利用除甘油外的其它有机物为底物生产 1,3-PD 的自然菌。在以甘油为唯一底物发酵生产 1,3-PD 的过程中, 经过微生物代谢后除产生目的产物 1,3-PD 以外, 还可能产生乙酸、乙醇、丁酸、2,3-丁二醇、乳酸、琥珀

酸、丙酸等副产品 (Boenigk R et al, 1993; Menzel K et al, 1997), 这样一部分甘油在氧化途径中作为还原当量个体而被消耗形成了副产物。因为葡萄糖可以部分取代甘油作为还原当量的供体 (张健, 2002), 通过流加葡萄糖作为甘油发酵辅助底物, 既可提高菌体的浓度, 还可以避免葡萄糖对过程的抑制作用, 从而显著提高最终发酵液中的 1,3-PD 浓度、甘油的转化率以及 1,3-PD 的生产强度。

在实际应用中, 虽然甘油的转化率可以得到提高, 但是由于同时消耗了葡萄糖, 而且提供相同的还原当量所用葡萄糖的质量是甘油质量的 2 倍, 因此, 要综合考虑转化率和葡萄糖及甘油的价格, 以便决定所采用的工艺路线 (修志龙, 2000)。

选择其它可发酵物质作为辅助底物的效果不是很理想, 如: 乙二醇, 它不仅不能提供还原当量, 而且还要从甘油的氧化中获取还原当量, 最终产生乙醇, 而甘油转化为乙酸, 这种转化则是无用功。只有在经济条件相同的情况下, 甘油的转化率越高, 生产工艺的可行性也随之提高。

我国清华大学应用化学研究所刘德华教授也对肺炎克雷伯氏杆菌以葡萄糖作为辅助底物发酵生产 1,3-丙二醇进行了研究。研究表明, 以葡萄糖单独作为底物发酵时不生成 1,3-丙二醇; 以葡萄糖和甘油为混合底物时, 菌体浓度显著提高。因此在甘油为底物的发酵中, 通过掺加葡萄糖作为辅助底物可以提高 1,3-丙二醇转化率, 同时缩短发酵时间, 通过选择合适的葡萄糖加入速率, 其转化率最高可达 64.9%。刘德华等人 (2005) 又发明了一种外源添加反丁烯二酸促进微生物合成 1,3-丙二醇的方法, 适用于 1,3-丙二醇的厌氧及有氧发酵过程, 其优点在于: 可加速菌体对甘油的利用, 显著提高 1,3-丙二醇浓度和生产强度, 降低生产成本。

克氏肺炎杆菌是兼性菌, 在有氧或厌氧条件下都可以生长, 它存在两个调节子 *glp* 和 *dha*, 分别在有氧、厌氧环境下起作用, 使细胞生长代谢进入不同代谢途径。已有研究表明: 在有氧条件下克氏肺炎杆菌生长旺盛, 因此文献报道的用于 1,3-丙二醇发酵的克氏肺炎杆菌种子培养过程大都在有氧条件下进行, 但氧的存在对还原当量的传递不利, 故而克氏肺炎杆菌发酵生产 1,3-丙二醇过程大都在厌氧条件下进行。考虑氮气制备的高成本, 近年来有氧代谢条件下生产 1,3-丙二醇的研究逐渐增多。王剑锋等和 Huang 等的研究表明, 有氧条件下, 1,3-丙二醇合成途径并未完全阻截 (王剑峰等, 2001b; Huang et al, 2002)。通过比较克氏肺炎杆菌厌氧流加发酵和有氧流加发酵结果, 清华大学提出了前期厌氧后期有氧发酵工艺, 通过 5L 及 50L 发酵罐上的实验表明, 该工艺可明显提高

1,3-丙二醇浓度及生产强度。在 5L 发酵罐上 1,3-丙二醇可达 69.6g/L, 应用工业原料的 50L 发酵罐上 1,3-丙二醇浓度可达 58.8g/L。

1.2.5 我国微生物发酵法生产 1,3-PD 研究现状

我国微生物法生产 1,3-PD 的研究虽然起步较晚, 但已经取得一定的进展。清华大学、大连理工大学、沈阳农业大学等单位对微生物发酵生产 1,3-PD 进行了研究。清华大学课题组生物发酵法分为两步, 首先将葡萄糖或淀粉、淀粉水合物、糖蜜等发酵生成甘油。甘油在微生物的作用下发酵生成 1,3-PD。采用的复合菌株是 *E.coli*, *C.acetobutyricum*, *K.pneumoniae*, 并在 *C.acetobutyricum* 中排除了导致生成副产品 Butyrate 的基因; 在工艺上, 使用连续式或间歇式发酵方式(张健, 2002; 赵红英, 2002); 糖到甘油的转化率为 0.48 (mol/mol), 甘油到 1,3-PD 的转化率为 0.64 (mol/mol), 最终 1,3-PD 的浓度为 85g/L。黑龙江辰能生物工程有限公司在清华大学自主开发的工艺技术基础上, 以玉米淀粉为原料, 采用二步耦连发酵技术、连续喷射双法制糖工艺、糖流加工工艺、絮凝和离交工艺以及新型气升式发酵罐, 成功实现 1,3-PD 的中试生产, 制得的 1,3-PD 产品纯度达到 99.92%, 超过了国外进口产品, 填补了我国生物法生产 1,3-PD 的空白。中试产品送交仪征化纤、辽阳化纤等公司进行聚合生产 PTT 的试验表明: 该产品可以满足聚酯合成及纺丝等用途的需要, 该项目工艺技术达到了国际先进水平。

大连理工大学王剑锋、修志龙(2001)等人对 *K.pneumoniae* 微氧分批和连续发酵 1,3-PD 进行了研究报道, 提出了葡萄糖好氧发酵生产甘油与甘油 *K.pneumoniae* 厌氧发酵生产 1,3-丙二醇相结合的两步发酵工艺, 并提出微氧发酵的新工艺(王剑锋等, 2001a)。

沈阳农业大学食品学院课题组在刘长江教授主持下, 重点放在微生物发酵过程中高产菌株的选育、关键酶基因的重组及基因工程菌的构建方面。2001 年完成玉米两步发酵法生产 1,3-PD 的初步研究(已经申报专利), 获得了玉米转化甘油的较高产菌株 CJ₂₀ 和甘油转化为 1,3-PD 的高产菌株 CpN-86; 已经对编码 CpN-86 菌株 1,3-丙二醇氧化还原酶(dhaT)基因及克雷伯氏杆菌(*K.pneumoniae*)甘油脱水酶基因在大肠杆菌中进行了成功的克隆、测序、表达; 并且进行了重组甘油脱水酶(dhaB)基因及其亚基酶活性鉴定。在将来, 在一个强启动子调控下通过 dhaT 和 dhaB 基因重组就可以实现玉米糖一步发酵为 1,3-PD 的设想。

我国至今尚没有大规模生产 1,3-丙二醇的企业。

1.3 本论文主要研究内容

甘油可被许多菌种转化为 1,3-PD，其中克氏肺炎杆菌、丁酸梭状芽孢杆菌、弗氏柠檬酸菌具有较高的 1,3-PD 转化率，是研究得比较多的三种菌。本论文主要通过通过对这三种原始菌种活化培养，从中选出一株性状较好的菌株作为出发菌株，着重对微生物转化生产 1,3-PD 的菌株进行物理和化学相结合的诱变处理，以期筛选出 1,3-PD 的发酵产量较高的突变株，并对发酵培养基的成分和培养条件进行初步了优化。

第二章 发酵生产 1,3-丙二醇出发菌株选育及培养条件研究

2.1 材料与方法

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 菌种

肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*) 编号 As1.1736; 弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) 编号 As1.1732; 丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*) 编号 As1.335; 购于中国普通微生物菌种保藏中心。

2.1.1.2 试剂

1,3-丙二醇(1,3-*Propanediol*) 购自瑞士 Fluka 公司, 上海化学试剂二厂分装; 刃天青(*Resazurin*) 指示剂为进口; 其它均为国产生化试剂或分析纯化学试剂。

2.1.1.3 实验仪器

- | | |
|--|------------------|
| ➤ YQX-II 厌氧培养箱 | 上海跃进医疗器械厂 |
| ➤ 85-2 恒温磁力搅拌器 | 常州国华电器有限公司 |
| ➤ HH-6 型数显恒温水浴锅 | 常州国华电器有限公司 |
| ➤ FA-2004 型电子天平 | 上海天平仪器厂 |
| ➤ PHS-25 型数字式精密 pH 计 | 上海理达仪器厂 |
| ➤ DHG-9203A 型电热恒温鼓风干燥箱 | 上海精宏实验设备有限公司 |
| ➤ ZDX-35BI 自动电热压力蒸汽灭菌锅 | 上海申安医疗器械厂 |
| ➤ Dw400/50L 型立式电热蒸汽两用杀菌锅 | 上海光华机械厂 |
| ➤ SW-CJ-1F 超净工作台 | 苏州安泰空气技术有限公司 |
| ➤ BCD-215K/HC 容声电冰箱 | |
| ➤ UV-1100 紫外可见分光光度计 | 北京瑞利分析仪器公司 |
| ➤ HZQ-F160 全温震荡培养箱 | 哈尔滨市东连电子技术开发有限公司 |
| ➤ HZS-H 水浴震荡器 | 哈尔滨市东连电子技术开发有限公司 |
| ➤ WATERS 高效液相色谱仪 | 美国 |
| ➤ HITACHI Himac CR21G 高速冷冻离心机 | 日本 |
| ➤ 其它器皿: 高纯氮气瓶 干燥器 微生物厌氧培养瓶(厌氧培养管) 圆底烧瓶 三角瓶 培养皿 移液管 温度计 玻璃棒 酒精灯 试管 涂布棒 接种 | |

针 分析天平(精度度 0.0001g) 一次性注射器 电炉

2.1.1.4 培养基(g/L):

(1) 活化培养基 I:

酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0, pH7.0

活化培养基 II:

蛋白胨 10.0, 牛肉提取物 3.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH7.0

活化培养基 III:

玉米粉 5.0, 蛋白胨 0.1, 葡萄糖 1.0, 琼脂 20.0, pH6.8~7.0。

(2) RCM 培养基:

胰蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 3.0, 葡萄糖 5.0, 可溶性淀粉 1.0, 半胱氨酸 0.5, 琼脂 20, 氯化钠 5.0, 乙酸钠 3.0, pH6.6~7.0。

(3) 种子培养基 I:

甘油 20, 酵母膏 1.0, K_2HPO_4 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2$ 0.02, 微量元素 I 1.0mL, Fe 液 2.0mL, pH7.0 左右。

(4) 种子培养基 II:

K_2HPO_4 14.0, KH_2PO_4 6.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 甘油 20, 酵母膏 0.2, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0119, 微量元素 II 1.0mL, pH7.5。

(5) 发酵培养基 :

K_2HPO_4 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 甘油 30, 酵母膏 1.0, 半胱氨酸盐酸盐 0.5, $CaCl_2$ 0.02, 微量元素 I 1.0mL, Fe 液 2.0mL, pH7.0。

Fe 溶液(g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0, HCl(37%) 4.0 mL

微量元素I(g/L): $ZnCl_2$ 0.07, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, H_3BO_3 0.06, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.035,

HCl(37%) 0.9 mL。

微量元素II(g/L): EDTA 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.003, H_3BO_3 0.03, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.001, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.002, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.003, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01。

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 原始菌株的活化

分别将装有原始菌株的安瓿管用75%的酒精消毒开封后立即通入纯氮气,以防止氧气进入。分别用无菌注射器吸取已经灭菌的液体活化培养基0.3 mL~0.5mL,注入安瓿管内,轻轻振荡使其呈悬浊状后,吸取一定量菌液分别移植到相对应的活化培养基上,分别于35℃、37℃条件下培养48h。继续传代培养2次,取生长良好的菌株保藏,并进行革兰氏染色观察菌株形态。

2.1.2.2 培养方法

分别挑取新鲜活化培养基或RCM梭菌增强培养基上的菌苔一环,接种于装有预还原液体种子培养基中进行厌氧培养。

液体种子培养可以采用以下三种方法:

- a. 厌氧培养: 向装有30mL液体种子培养基的50mL厌氧瓶中充入氮气保持厌氧状态,于30-37℃条件下静置培养。
- b. 好氧培养: 150mL三角瓶中装液50mL,瓶口用六层纱布封口,于37℃条件下,转速120rpm摇床中培养。
- c. 微氧培养: 150mL三角瓶中装液50mL,棉塞封口,于37℃条件下转速120rpm摇床中培养。

发酵培养: 50mL 厌氧瓶装 30mL 发酵培养基,充入氮气保持厌氧条件,121℃温度下灭菌 15min,取出冷却至室温。将培养好的液体种子按一定比例(除了特殊说明外,一般为 5%v/v)的接种量,接入厌氧发酵培养基中,在 30℃厌氧培养箱中静置培养 48 小时左右。

2.1.2.3 厌氧培养基的制备

将称量好的培养基各组分解后装入细口平底烧瓶内,煮沸一段时间(5~10min)初步驱除氧气,再通入高纯度氮气继续驱氧。与此同时在培养基内加入 0.1%刃天青指示剂溶液。当指示剂由蓝色变为砖红色时,加入少量半胱氨酸或半胱氨酸盐酸盐,同时用 1mol/L 的 KOH 将 pH 值调至所要求的范围。当培养基变成无色时,迅速用注射器分装到事先已置换高纯氮气的厌氧培养瓶或厌氧试管中,于 121℃灭菌 15min,备用。

刃天青(Resazurin)的氧化还原指示电位为-42mV,它在氧化态时呈绛紫色,还原时无色。刃天青反应时,首先不可逆地还原为桃红色的 resorufin,然后在可逆地还原为无色的二氢 resorufin。如果培养基呈现桃红色时说明培养基已经被氧化(郝林,2001)。

2.1.2.4 生长曲线的测定

生长曲线的测定采用平板记数法，具体步骤如下：

(1) 先向装有少量玻璃珠的 500mL 带塞玻璃容器中通入高纯氮气，来置换其中的氧气；

(2) 加入 300mL 经过预还原的厌氧发酵培养基，在 121℃ 条件下高压灭菌 15min；

(3) 按 5% 接种量从培养 18h 的液体种子培养基中取液，接种于发酵培养基中，在 37℃ 条件下进行静置培养，其中用 1mol/L KOH 调节酸碱度，使其 pH 控制在范围 6.0~7.0 之间。

(4) 分别于不同时间从已接种的发酵培养基中取液 1mL，并用已灭菌的厌氧生理盐水逐级稀释至 10^{-3} ~ 10^{-7} ，取适当稀释度的菌液 0.1mL 涂平板，每个稀释度做 3 个重复。

(5) 37℃ 条件下培养 48h，计算各个时期平板的菌落数。以培养时间为横坐标、菌落的对数值为纵坐标，绘制菌株的生长曲线。

2.1.2.5 分析方法

1) 甘油的测定

采用改进的高碘酸钠氧化法（王剑峰等，2001b）：取 10~15mL 发酵液于 12000rpm 下离心 10min，用移液管准确移取 2mL 上清液置于 250mL 的三角瓶中，加水 10mL，加入酚酞指示剂一滴，用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液滴定至变色。然后加入 10mL 0.1mol/L 高碘酸钠溶液，避光反应 5min，再加入 25% 乙二醇溶液 5mL，避光反应 5min。然后用上述 NaOH 标准溶液滴定至变色，变色程度应与前次变色程度相当，记录这一次所用 NaOH 标准溶液的量。

$$\text{甘油浓度(mg/mL)} = 92.1 \times C \times V/n$$

C—NaOH 标准溶液浓度 (mol/L)

V—第二次消耗 NaOH 标准溶液的体积 (mL)

n—所取发酵液上清的体积(mL)

2) 1,3-丙二醇的测定

采用高效液相色谱法：色谱柱为 Carbohydrate 柱，柱温：30℃，流动相为乙腈：水（65:35），流速为 0.6mL/min，检测器为 Waters 2410 示差检测器，温度：30℃，进样量为 10μL。

3) 细菌生长量的测定

取 1ml 培养液稀释 20~30 倍，在 UV-1100 紫外可见分光光度计上于 650nm 读取 OD

值，再乘以稀释倍数折算为培养液的OD值。

2.2 结果与分析

2.2.1 出发菌株的确定

配制相同甘油浓度的发酵培养基，分别按相同接种量接入经过活化的克氏肺炎杆菌As1.1736，弗氏柠檬酸菌As1.1732和丁酸梭杆菌As1.335，进行厌氧发酵。As1.1732菌株和As1.335菌株的发酵温度30℃，As1.1736发酵温度为37℃。发酵结果见表2.1。

表 2.1 菌种筛选
Table 2.1 Screening of strains

菌 种	1,3-PD产量(g/L)	1,3-PD生产率(g/L·h)	发酵时间(h)
As1.1736	4.55	0.126	36
As1.1732	3.53	0.074	48
As1.335	4.16	0.104	40

从表2.1可以看出，在相同的培养条件下，克氏肺炎杆菌As1.1736菌株展现出较强的甘油消耗能力和相对较高的1,3-PD生产强度。考虑到下一步要通过诱变处理筛选出高产菌株，所以选择一株生长能力强，且生产能力强的强势菌株有利于提高诱变效率。虽然，丁酸梭杆菌也具有一定生产能力，但由于它为严格厌氧菌，这就对实验环境有很高的要求，而克氏肺炎杆菌属于兼性厌氧菌，结合本实验条件的现实因素，它更有利于诱变育种的顺利进行。

2.2.2 出发菌株性状分析

肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 属于克雷伯杆菌属 (*Klebsiella*)，兼性厌氧菌，细胞革兰氏染色为阴性，为较短粗的杆菌，大小0.5-0.8×1-2μm，单独、成双或短链状排列。无芽胞，无鞭毛，有较厚的荚膜，多数有菌毛。在普通琼脂培养基上，形成较大的灰白色粘液菌落，表面光滑。生长在肉膏培养基上产生粘初度不等的稍呈半球形有闪光的菌落。

2.2.3 出发菌株生长曲线的测定

生长曲线是专指单细胞微生物的，它是将一定量的单细胞微生物纯种接种到一定体积的新鲜液体培养基中，在适宜的条件下进行培养，定时取样来测定细胞数量。细胞生长曲线一般可分为四个阶段：延迟期、对数期、稳定期与衰亡期。

测定生长曲线，应选择细菌生长代谢旺盛的对数期菌株进行接种培养。

测定微生物生长曲线的方法主要有比浊法、血球计数法、平板菌落计数法、称重法等。本实验采用平板菌落计数法测定生长曲线，以培养时间为横坐标、菌落的对数值为纵坐标，绘制 *K. pneu.* 菌株的生长曲线。结果见图2.2。

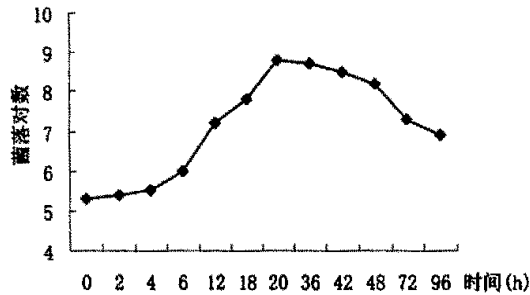


图 2.2 *K. pneu.* 菌株生长曲线

Figure 2.2 Kinetics of cell growth of *K. pneu.*

肺炎克雷伯氏杆菌的生长曲线表明，该菌株的生长周期为：0—6h为生长延迟期，这时细菌一般不会立即繁殖，菌数增长较为缓慢，在实际生产中一般要选择延迟期短的菌株；6—20h为对数生长期，这时菌体代谢活跃，消耗营养多，生长率快速率快，菌数增长十分迅速而且菌株很健壮；20—48h为稳定期，这时细胞的生长活力逐渐减弱代谢产物开始大量积累，并且菌数基本保持不变；48h以后为衰亡期，这时细胞开始死亡丙伴有自溶现象，菌体数量递减。

2.2.4 种子培养条件的确定

由于肺炎克雷伯氏杆菌为兼性厌氧菌，在有氧或厌氧条件下均可生长，考虑到液体种子培养阶段的目的是如何获得大量且高活性的菌体，所以本实验对在不同培养环境下生长的菌株的生长代谢情况进行了考察。

2.2.4.1 氧气对种子培养的影响

考虑到氧气条件的差异将对菌体生长有不同的影响，因此我们首先研究了氧气对种子培养的影响。我们从活化培养基中分别挑取一环菌体接种于相同的液体培养基中，在好氧、厌氧及微氧条件下，对菌体进行种子扩大培养，18h后考察菌体生长情况。

表 2.2 氧气对种子培养的影响

Tab.2.2 Effect of culture condition on oxygen

培养方法	菌量 (OD650nm)	甘油浓度 (%)
好氧培养	1.264	0.521
微氧培养	0.988	1.542
厌氧培养	0.836	1.315

从表2.2可以看出, 在好氧培养条件下种子生长代谢比较旺盛, 菌量为1.264, 菌体密度较大, 底物消耗较快, 而在厌氧和微氧条件下菌体生长缓慢且底物消耗慢, 这说明有氧条件能促进细胞的生长。因此, 好氧培养可以获得高密度的菌体。

2.2.4.2 不同种子培养环境对发酵的影响

为了考察不同种子培养环境对厌氧发酵产物的影响, 将分别由好氧培养和厌氧培养所得的液体种子, 分别按5%接种量接种于相同的厌氧发酵培养基中进行对比实验。

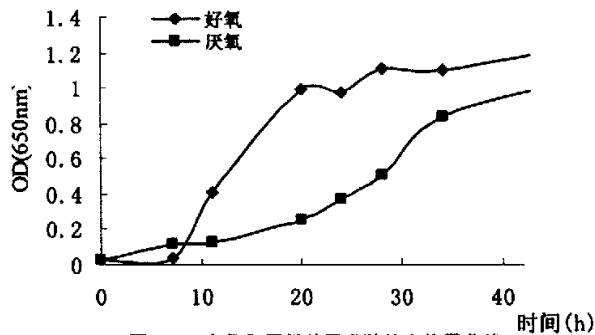


图 2.3 有氧和厌氧种子发酵的生物量曲线
Fig.2.3 Biomass under anaerobic or aerobic inoculum

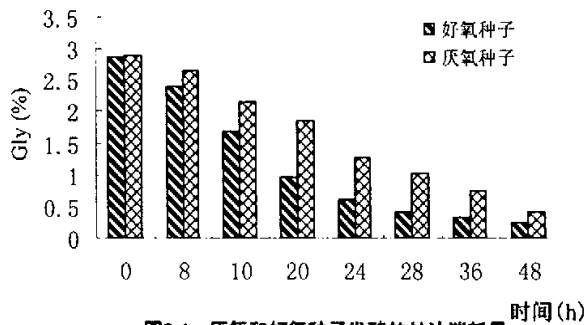


图2.4 厌氧和好氧种子发酵的甘油消耗量
Fig.2.4 Glycerol consumption under anaerobic or aerobic inoculum

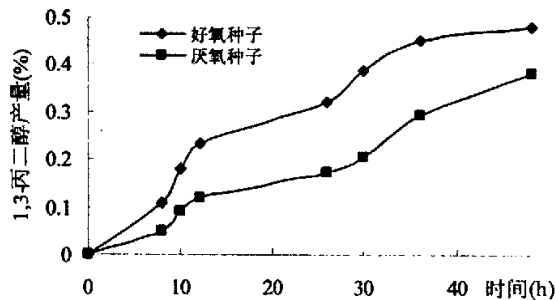


图 2.5 好氧和厌氧种子发酵1,3-丙二醇生成量
Fig.2.5 1,3-PD production under aerobic or anaerobic inoculum

从图2.3、2.4、2.5可以看出在相同的接种量下, 有氧种子在发酵初期细胞生长几乎

没有滞待期，可以很快地适应厌氧环境；而厌氧种子发酵时细胞的迟滞期几乎达到20个小时，细胞生长极其缓慢，从而使得厌氧种子发酵时甘油的消耗率低于有氧种子发酵时甘油的消耗量，相应地1,3-丙二醇的产率和甘油转化率也比有氧种子发酵时低。所以说有氧环境下培养的种子不仅可以获得较高密度的菌体，而且还有利于1,3-丙二醇的厌氧发酵。

因此，在以后的实验中，我们均采用有氧条件下进行种子的扩大培养，促使菌体大量生长。

2.2.4.3 种子培养时间的确定

通过上述实验可知，在有氧条件下培养种子有利于菌体的快速大量生长。因此，选择在有氧条件下培养种子，每隔一段时间从种子培养基中吸取相同体积的菌液，利用平板计数法得出细胞的生长曲线，如图2.6所示。

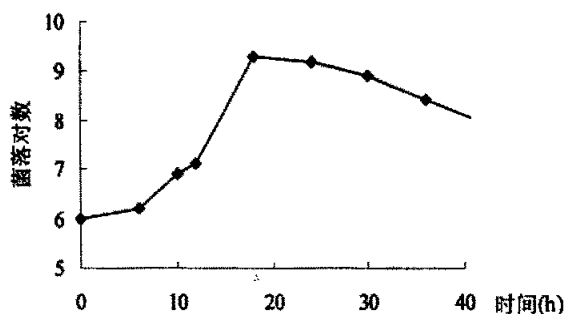


图 2.6 好氧种子生长曲线

Fig.2.6 Biomass under aerobic condition

从图2.6可以看出，在前6h菌体处于生长适应期，生长速度较为缓慢。6-18h菌体处于对数生长期，这时菌体代谢活跃，消耗营养多，生长速率快，菌数增长十分迅速而且菌株很健壮。18-40h菌体进入稳定期，这时菌体活力逐渐减弱并且代谢产物大量积累，因此以后实验选择培养时间为15-18h的好氧种子进行发酵培养。

2.2.4.4 不同温度对种子培养的影响

温度是影响微生物生长代谢的重要环境之一。因为克雷伯氏杆菌属于肠道细菌，其生长的温度可近似采用人体的温度。在筛选温度时可在保持其它条件不变的情况下，采用32℃、37℃、40℃三个不同温度进行实验，结果如图2.7所示。

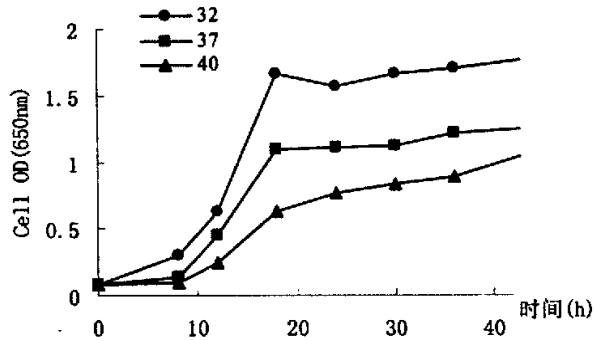


图2.7 不同温度下好氧种子培养的生物量曲线

Fig.2.7 Different temperature on biomass under aerobic condition

从细胞生长曲线可以看出, 32℃时菌种生长较快, 培养液中菌浓度较高, 随着温度的升高细胞生长存在减缓趋势。当温度为40℃时细胞生长明显缓慢, 菌量密度较低, 这说明较高的温度会抑制细胞的生长, 而较低的温度比较有利于菌体的生长。

2.3 讨论

2.3.1 出发菌株的选择

微生物发酵法具有条件温和、操作简单、副产物少、绿色环保等优点, 所以这方面的研究正受到国内外越来越多的重视。甘油可被许多菌种转化为1,3-PD, 其中克氏肺炎杆菌、丁酸梭状芽孢杆菌、弗氏柠檬酸菌具有较高的1,3-PD转化率, 是研究得比较多的三种菌。甘油作为上述微生物的唯一碳源和供能物质, 经过微生物代谢后除目的产物1,3-PD外, 还能产生乙酸、乙醇、丁酸等副产品。由于底物、产物及副产物都能抑制微生物生长, 因此在选择菌种时应充分考虑所选菌种对底物和副产物的耐受能力。克氏肺炎杆菌和丁酸梭状芽孢杆菌具有较高的甘油耐受力, 较高的转化率及1,3-PD生产能力, 因而受到更多的关注(Biebl H, et al, 1999; Deckwer W-D, 1995)。这点在上述实验中得到了证实。从工业应用的安全性角度考虑, 梭状芽孢杆菌比肠道细菌更合适, 但从甘油和1,3-PD的忍受程度及生产强度两方面看, 丁酸梭状芽孢杆菌较肺炎杆菌略逊一筹。另外, 丁酸梭状芽孢杆菌要求严格的厌氧条件, 而克氏肺炎杆菌与弗氏柠檬酸杆菌则属兼性菌, 并且克氏肺炎杆菌的生化特性与大肠杆菌(*E.coli*)非常相近, 这就为菌种下一步要进行的基因改良和利用基因工程构建新的菌种提供了便利(Cameron D C, et al, 1998; 蔡文涛等, 2003)。

除此之外, 由于下一步要进行诱变筛选工作, 所以在选择出发菌株时首先要从遗传方面来考察该菌种是否具有所需要的特性。一般说来, 用来育种处理的起始菌株或成为出发菌株, 应该具有特定生产性状的能力或潜力, 即菌株要具有产生特定代谢产物的催

化酶系的基因。自然界直接分离到的野生型菌株，它们具有较完整的酶系统，染色体或DNA未损伤，但它们的性能通常较差，通过诱变育种，它们正突变（即产量或质量性状向好的方向改变）的可能性大（岑沛霖等，2000）。在甘油转化成1,3-PD的过程中，GDH、GDHt和PDOR是关键酶，Forage和Lin(1982)研究表明，编码甘油代谢的酶的基因属于同一个调节子dha系统，由此可见，dha调节子是微生物代谢产生1,3-PD的关键基因系统。研究表明克氏肺炎杆菌中具有这种dha调节子，且近年来对它的调节机制研究得比较清楚。综上所述，选择克氏肺炎杆菌作为本实验的出发菌株具有一定优势。

2.3.2 影响微生物生长的环境因子

出发菌株在进行诱变处理之前，应该处于生长最旺盛时期，因为此时的菌体对理化诱变因子有较强的敏感性，且菌体密度大、活性高。所以，获得性状较为理想的菌体与其生长环境有着密不可分的关系。

微生物与所处的环境之间具有复杂的相互影响和相互作用：一方面，微生物需要从环境中摄入生长和生存所必需的营养物质，只能在一定的环境条件（如温度、湿度及pH等）下才能够生存，而环境条件的变化会引起微生物的形态、生理、生长和繁殖特征发生变化；另一方面，微生物也向环境中排泄出各种代谢产物，抵抗和适应环境变化，甚至影响和改变环境。

环境因子对微生物的影响主要有三种情况：(1)有利于微生物进行正常代谢；(2)不利于微生物正常代谢，微生物生长受到抑制或被迫改变其原有的一些特征；(3)恶劣的环境可造成微生物死亡或发生遗传变异。

本实验主要从温度、培养时间、氧气等物理因子方面讨论对微生物生长的影响。

温度主要通过影响微生物细胞膜的流动性和生物大分子的活性来影响微生物的生命活动。一方面，随着温度的升高，细胞内酶反应速度加快，代谢和生长也相应的加快；另一方面，随着温度进一步增高，生物活性物质（如蛋白质、核酸等）发生变性，细胞功能下降，甚至死亡。所以，每种微生物都有个最适生长温度。最适生长温度是指某微生物群体生长繁殖速度最快的温度，但它不等于发酵的最适温度，也不等于积累代谢产物的最适温度，更不等于积累某一代谢产物的最适温度。由于微生物不同的生理活动需要在不同的温度条件下进行，所以，生长速率、发酵速度、代谢产物积累速度的最适温度往往不在同一水平的温度下。在较高温度下，细胞分裂虽然较快，但维持时间不长，容易老化。相反，在较低温度下，细胞分裂虽较慢，但维持时间较长，结果细胞的总产量

反而较高。所以,研究不同微生物在生长或积累代谢产物阶段时不同的最适温度,对提高发酵生产的效率具有十分重要的意义。本实验中*K.pneumoniae*原始菌株在较低温度下获得的菌体浓度大于较高温度下培养的菌体浓度,说明该出发菌株在种子培养时期的最适培养温度为32℃;此温度下培养的菌体具有较高的菌体密度。

根据微生物生长变化规律,可把培养过程分为四阶段:延迟期、对数生长期、稳定期、衰亡期。当微生物进入一个新的培养环境时,一般并不立即进行繁殖,而是需要一个从微生物接种到培养基后的适应期;当细菌适应了新环境后,细胞开始分裂,并以几何级数增长,这一时期称为对数生长期。微生物在这个时期,菌体高速增长,生长速率常数最大,增代时间和原生质增倍的时间最短。该阶段养分充足,空间充裕,排出的代谢产物还不会影响生长;同时,处于该阶段前期的细胞对理化因素影响仍很敏感,菌体大小、形态、生理特征比较一致,大多是单个存在。所以,研究微生物遗传和代谢性能时宜采用该阶段的菌体,生产中接种的种子也应该用处于对数生长期的菌体。本实验通过测定细菌生长曲线,确定达到菌体对数生长期的培养时间为18小时,此时的菌体应该具有较高的菌体活性。

自然界微生物生活在含氧量不同的环境中,不同微生物对氧的需求或耐性是不一样的。氧气是强氧化剂和需氧性微生物呼吸链的最终电子受体。在有氧条件下微生物可通过好氧呼吸产生更多能量,满足机体的生长需要。兼性厌氧微生物如酵母菌和一些肠道细菌在有氧和无氧环境中都能生存。是因为它们具有两套呼吸酶系,一套是以氧作为最终电子受体的好氧呼吸酶系,另一套是不需要氧的以中间产物为氢受体进行发酵作用的酶系。由于克氏肺炎杆菌是兼性厌氧菌,通过实验证明,菌体在好氧条件下不仅可以生长,而且生长代谢速度比厌氧条件下生长的菌体还要快,这说明在有氧条件下培养可诱导种子好氧途径中的甘油激酶活性,促使代谢走有氧代谢途径,产生较多能量,所以菌体生长较快;而在厌氧条件下,甘油激酶被抑制,甘油脱氢酶被诱导,代谢过程中产生的能量较少,菌体生长较有氧条件下相比较慢。由此认为,好氧条件下培养种子会获得较高的细胞浓度。

2.4 小结

本章通过比较三株不同原始菌株的发酵结果,最终选择克氏肺炎杆菌As1.1736作为下一步诱变育种中所需的出发菌株。实验表明,克氏肺炎杆菌As1.1736属于兼性厌氧菌,具有较高的甘油耐受力,较高的转化率和1,3-PD生产能力;并且其生化特性与大肠杆菌

非常相近,可为菌种的基因改良及基因工程菌的构建提供便利(Cameron D C,et al,1998)。同时,为能获得高活性的菌体,对克氏肺炎杆菌种子培养条件进行考察,最终得出,菌种在32℃,好氧培养18h的条件下,可以获得活性较高、浓度较大的菌体量。

第三章 克氏肺炎杆菌高产 1,3-丙二醇菌株的选育

3.1 材料与方法

3.1.1 实验材料

3.1.1.1 菌种

肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)编号As1.1736, 购于中国普通微生物菌种保藏中心。

3.1.1.2 试剂

均为国产生化试剂或分析纯化学试剂。

3.1.1.3 实验仪器

同第二章2.1.1.3。

3.1.1.4 培养基(g/L)

- (1)液体活化培养基: 酵母膏5.0, 蛋白胨10.0, NaCl10.0, 蒸馏水1.0L, pH=7.0;
- (2)分离培养基: 不加微量元素I和Fe液, 琼脂15g, 其它同种子培养基I;
- (3)液体选择培养基: 为分离培养基中添加120g1,3-PDO, pH=7.0;
- (4)S-1培养基: 为分离培养基中添加90g1,3-PDO和15.0g琼脂, pH=7.0;
- (5)S-2培养基: 为分离培养基中添加1%~3%的2.0g/L的刚果红溶液;
- (6)鉴别培养基: 酵母膏 1.0, 溴百里酚兰 (0.2%) 20mL, 刃天青 0.3mL, 半光氨酸盐酸盐 0.5, 其它同种子培养基 I;
- (7)种子和发酵培养基同第二章2.1.1.4。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 培养方法

取新鲜斜面活化培养基上的菌苔一环, 接种于液体种子培养基中, 于 32℃条件下培养 18h。

发酵培养时按一定比例 (除了特殊说明外, 一般为 5%v/v) 转接于厌氧的液体发酵培养基中, 在 37℃培养 48h, 其中用 1mol/LKOH 调节酸碱度, 使其 pH 控制在 7.0 左右。

3.1.2.2 诱变方法

微生物诱变育种, 一般按照图3.1所示程序进行。

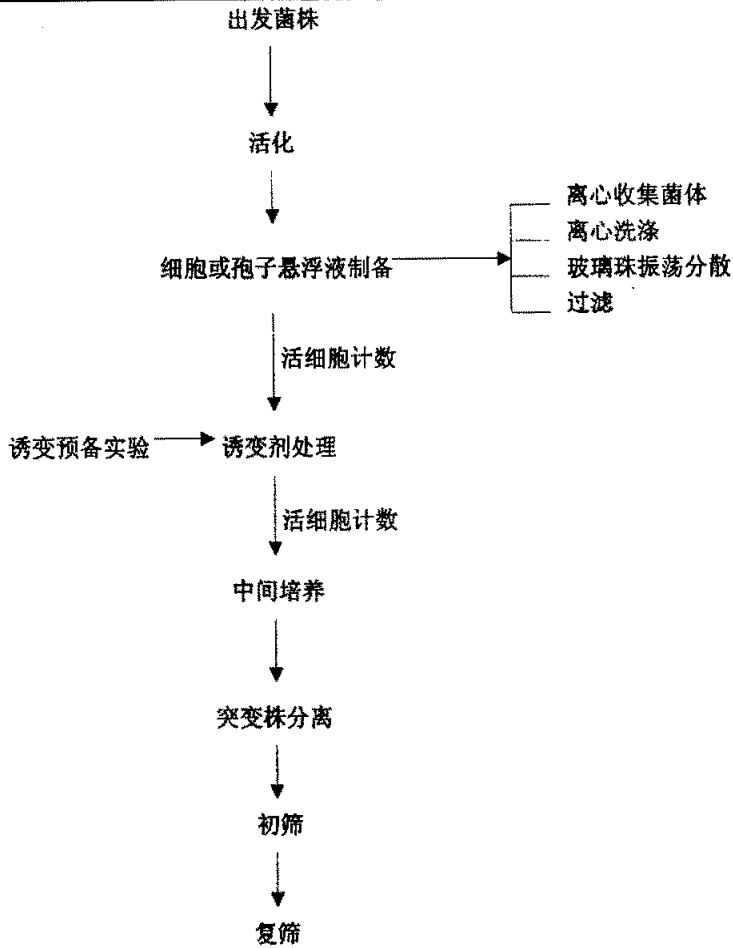


图 3.1 肺炎克氏杆菌诱变一般程序

Figure 3.1 The general procedure of mutation on *K. pneumoniae*

紫外(UV)诱变

1) 单细胞悬液制备 从新鲜斜面活化培养基中取菌种一环，接种于20mL种子培养基中，于32℃预培养15h-18h。从其中取5mL，4℃下4000rpm/min，离心15min，弃上清液，沉淀用无菌生理盐水洗涤2—3次，用生理盐水制备浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL的菌悬液备用。

2) 诱变剂量的选择 分别吸取菌悬液 9mL 于 4 个 9cm 的无菌培养皿中，将平皿放在磁力搅拌器上，在 15W 的紫外灯（紫外灯须预先打开稳定 15min,使其输出功率稳定）下，距离保持在 30cm 左右，分别照射 30s、45s、60s、90s、120s；暗室或红灯下，取处理过的菌液 1mL，采用 10 倍稀释法稀释到 10^{-6} ，并取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 三个稀释度的菌液各 0.1 mL 用无菌涂棒将菌体均匀涂布于分离培养平板上（每个稀释度三个平行），同时取未经诱变处理的菌悬液 0.1mL，逐级稀释到 10^{-6} ，分别取稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、

10^{-5} 的菌悬液各 0.1mL 在分离培养基上涂平板, 作空白实验; 将平皿用报纸包好, 于 32℃ 避光培养 48h, 计算致死率。

3) 初筛 将诱变后的菌液稀释涂布于鉴别平板培养基上, 将接种后的平皿倒置于厌氧培养箱中, 充入一定量的氮气, 放置 500g 钽粒和 500g 变色硅胶, 进行三次空气置换。在 37℃ 中倒置培养 48h, 挑取菌落周围显色圈较大的菌落继续培养, 进行复筛。

4) 复筛 挑取菌落周围显色圈较大的菌落接种到种子培养基中, 32℃ 培养 16-18h 左右, 再按一定比例接到厌氧发酵培养基中, 37℃ 静置培养 48h。发酵液在室温下 12000 rpm/min 离心 10min, 取上清液, 测 1,3-PD 的产量。

硫酸二乙酯 (DES) 诱变

1) 细菌培养 将经紫外诱变后筛选出的相对高产菌株接种于液体种子培养基中, 置于 32℃、120rpm/min 摇床培养 18 小时左右。

2) 单细胞菌悬液制备 将上述菌液室温下 4000 rpm/min, 离心 15min, 弃上清液, 将菌体用 pH7.0 磷酸缓冲液洗涤, 经玻璃珠打碎, 用血球计数器计数制成 10^7 - 10^8 个/mL 菌悬液。

3) 诱变处理 取菌悬液 5mL, 加入 5mL 2% DES 溶液 (剂量 1% V/V) 混合, 样品分别置于 30℃ 恒温水浴中, 122rpm/min 振荡处理 20~80min 后, 用 25% 硫代硫酸钠 1mL 中止诱变。取处理后的菌液 0.1mL, 逐级稀释到 10^{-7} , 分别取稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的菌悬液各 0.1mL 在分离培养基上涂平板; 同时取经诱变处理的菌悬液 0.1mL, 逐级稀释到 10^{-7} , 分别取稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的菌悬液各 0.1mL 在分离培养基上涂平板, 作空白实验, 每个平行作三个重复; 37℃ 培养 48h, 计算致死率, 并绘制致死曲线。

4) 初筛和复筛 方法与紫外诱变相同。

紫外(UV)+LiCl 复合诱变

1) 菌种培养 将经过 DES 诱变筛选出的相对高产菌株接种于液体种子培养基中, 32℃, 静置厌氧培养 24h。

2) 高耐受性菌株的筛选 (浓缩筛选) 将上述培养菌液按 5% 的比例接种到液体选择培养基中, 32℃ 厌氧培养 24h; 再将 24h 后获得的菌液按 10% 的比例接到液体活化培养基中复壮, 培养条件与前面相同; 重复上述操作一次, 完成两次浓缩。

3) 单细胞菌悬液制备 方法同紫外诱变。

4) 诱变处理 取 0.1ml 菌悬液加入含有 0.3% LiCl 的液体种子培养基中, 32℃、120rpm/min 摇床过夜培养。将菌液室温下 4000 rpm/min, 离心 15min, 弃上清液, 将菌

体用无菌生理盐水洗涤 2—3 次, 用生理盐水制备浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL 的菌悬液。分别吸取菌悬液 9mL 于 4 个 9cm 的无菌培养皿中, 将平皿放在磁力搅拌器上, 在 15W 的紫外灯 (紫外灯须预先打开稳定 15min, 使其输出功率稳定) 下, 距离保持在 30cm 左右, 分别照射 30s、45s、60s、90s、120s; 其它方法同紫外诱变。

5) 初筛 选择最适诱变剂量下生长在分离培养基上的菌落用无菌牙签分别一一对应的点种于 S-1 培养基平板和 S-2 培养基平板上, 32°C , 厌氧培养 24h。

6) 复筛 采用影印计术进行筛选, 即挑取在 S-1 培养基平板和 S-2 培养基平板上都能生长且在 S-2 培养基平板上显红色的菌落进行复筛, 其它步骤同前两次诱变。

3.1.2.3 分析方法

1,3-PD 检测方法同上一章。

乙醇检测方法与 1,3-PD 基本相同, 详细内容参见附录。

3.2 结果与分析

3.2.1 紫外(UV) 诱变

紫外线是一种最常用的简便而有效的物理诱变剂, 其最有效作用波长为 $253\text{\AA}$ 。紫外线的诱变机理主要是使同链 DNA 的相邻嘧啶间形成共价结合的胸腺嘧啶二聚体。二聚体的出现会减弱双链间氢键的作用, 引起 DNA 双链结构扭曲变形, 阻碍碱基间的正常配对, 从而引起突变或死亡。因此说, 紫外线对生物体具有杀菌和诱变双重生物学效应。可见光具有光复活作用, 在诱变育种工作中, 经紫外线照射后的菌液都须在暗室或红灯下进行操作或处理。为筛选克氏肺炎杆菌高产菌株, 本次实验分别选用 30s、45s、60s、90s、120s 五个剂量对经过浓缩筛选处理的突变菌株进行 UV 诱变。

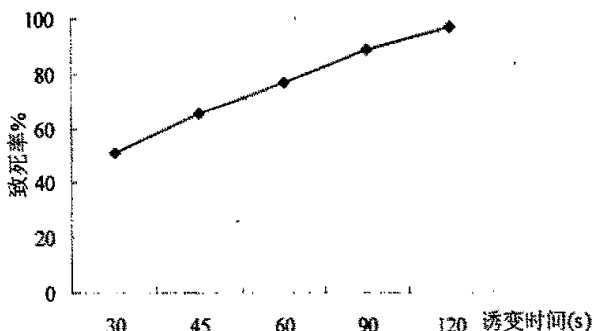


图 3.2 紫外线诱变时间和致死率的关系

Figure 3.2 The relation between mutant time of UV and lethal rate

由图 3.2 可以看出, 当紫外灯照射时间短时, 照射剂量和致死率成正比关系, 剂量越

高,致死率越高,在残存细胞中变异幅度也越广。但正向突变较多地出现在偏低剂量中,而负向突变较多地出现在偏高剂量中;因此,本实验认为致死率在70~80%之间的60s可作为初筛实验的依据。

随意挑取70株初筛平板上显色圈与菌落直径之比较大的菌落,接种到液体种子培养基中过夜培养,再按5%的接种量接种到发酵培养基复筛,测1,3-丙二醇含量。

实验结果表明菌株*K.pneu*1012和*K.pneu*1045产1,3-PD最多,比诱变前分别提高了36.2%和35.6%。

将菌株*K.pneu*1012和*K.pneu*1045继续进行紫外诱变,测得菌株*K.pneu*2007和*K.pneu*2025产1,3-PD最多,分别为7.6g/L、7.9g/L。

3.2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变

硫酸二乙酯(*Diethyl sulfate*, 简称为DES)是无色无味的液体,不溶于水、溶于乙醇,具有一定的毒性,很不稳定,是一种烷化剂,其功能团为: $-SO_2OR$ 。

硫酸二乙酯在溶液中半衰期很短:20℃时为3.34h;30℃时为1h;40℃时仅为0.3h。因此,要严格做到随用随配,并且要在低温、干燥、避光的条件下保存。硫酸二乙酯诱变效率要受酸、碱条件的影响,当pH为中性时诱变效果最好。本实验选择20min、30min、40min、50min、60min和80min诱变剂量,分别对克氏肺炎杆菌进行诱变处理,绘制出致死曲线,结果见图3.3所示。

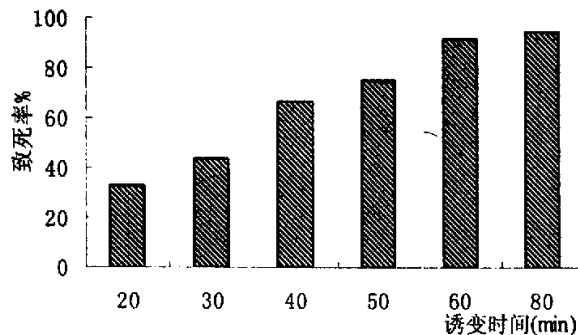


图 3.3 DES 诱变时间和致死率关系

Figure 3.3 Effect of DES on lethal rate of *K. pneumoniae*

由图3.3可知,经DES诱变后菌株的致死率是随着诱变剂量的增加而升高的,当诱变剂量达到80min时,菌株的致死率达到了95%,而且增长的趋势已不明显,这可能与DES在30℃溶液中半衰期短有着直接的联系。本实验认为诱变剂量为40min时的致死率是比较合适的。

经过同样的筛选方法选出两株 1,3-丙二醇产量较高的菌株,产量比出发菌株分别提高了 119% 和 124%, 它们为 *K.pneu3038*, *K.pneu3051*。

3.2.3 紫外线 (UV) + LiCl 复合诱变

氯化锂是一种碱金属卤化物,易溶于水的白色粉末;其本身并无诱变作用,但在微生物诱变育种中,与一些诱变因子具有协同作用。在诱变过程中一般采用氯化锂前处理法或氯化锂平板培养处理法。紫外线是一种非电离辐射,对原核生物而言是一种比较好的诱变因素,它直接作用于 DNA,使生物的遗传物质发生一系列的生物学效应并进而导致变异。本实验采用的是复合诱变处理,可以扩大突变的范围,提高诱变效果。据刘颐屏 (1992) 研究表明,采用氯化锂前处理的诱变效果好。

图 3.4 为在 0.3% 浓度 LiCl 协同作用下,不同的 UV 照射时间下菌株的致死率及正突变率关系。

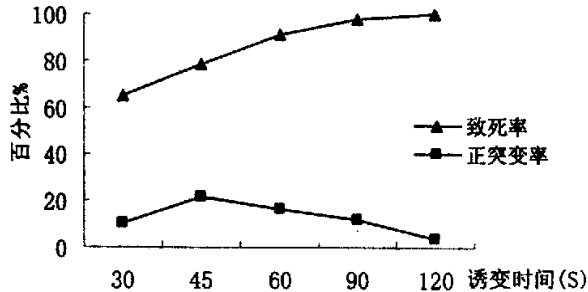


图 3.4 UV+LiCl 复合诱变时间和致死率关系

Figure 3.4 The relation between mutant time of UV+LiCl and lethal rate

从图 3.4 可以看出,在氯化锂的协同作用下,随着紫外线对菌株的致死率明显提高,且随作用剂量的升高,致死率不断增大,但正突变率有所下降。由随机挑选的菌落接入发酵培养基中进行发酵试验,统计试验数据,计算正突变率。结果,作用 45s 时正突变率达到最大值为 21.5%。因而选取致死率在 75% 左右的 45s 为复合诱变的最适剂量。

实验中发现,菌悬液经含有氯化锂的种子培养基培养后,对紫外线的敏感性明显加强;经 UV+LiCl 复合诱变处理,正突变率有所增高,且很少发生回复突变。

两次浓缩和紫外诱变大大增加了目的突变菌株产生的机率,结合影印技术,最终高效的筛选出高产且乙醇合成较弱的突变菌株 *K.pneu4046*。1,3-丙二醇的产量由出发菌株的 4.7g/L 提高到 16.1g/L,提高了三倍多;同时测得发酵液中乙醇的终浓度仅为 0.52g/L。

3.2.4 高产突变株遗传稳定性

K.pneu4046 菌株在种子培养液中培养至对数期,按 5% (V/V) 转接于装有 50mL 发酵培养基的厌氧瓶中,在 37℃ 培养 48h,用 1mol/L KOH 溶液调节 pH 在 6.0~7.0 之间。

连续进行 10 次传代，每隔一代测定 1,3-PD 含量。实验结果（见图 3.5）表明，突变株 *K.pneu4046* 经过连续传代后，液体发酵产 1,3-PD 的产量变化幅度不大，说明其遗传性能是稳定的。

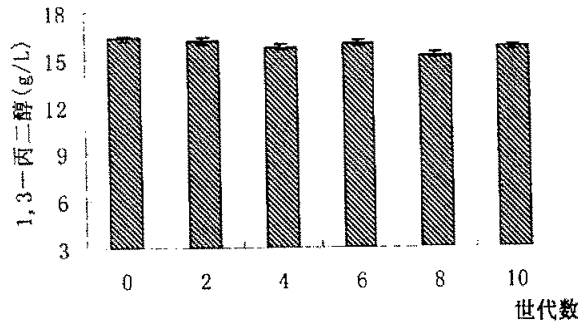


图 3.5 *K.pneu4046* 突变株产 1,3-PD 的遗传稳定性

Figure 3.5 Genetic property of *K.pneu4046* by pass-generation tests

3.3 讨论

3.3.1 菌悬液制备的选择影响

菌悬液制备的目的在于使诱变处理的效果提高。一般在诱变育种中，采用生理状态一致的单细胞或单孢子悬液进行诱变处理；一方面分散状态的细胞可以均匀地接触诱变剂，另一方面又可避免长出不纯菌落，减少分离性表型延迟现象的发生。单细胞悬液的质量将直接影响诱变效果。因此，诱变处理前的细胞应尽可能达到同步培养状态和对数生长期的状态。

根据所使用的诱变剂不同，细胞悬浮液可用生理盐水或缓冲液配制。一般情况下，使用物理诱变剂处理时，用生理盐水配制细胞悬浮液；而使用化学诱变剂处理时，由于 pH 值变化易引起诱变剂性质的改变而都使用缓冲液配制细胞悬浮液。

肺炎克氏杆菌 As1.1736 是无芽孢的原核细菌，属肠道杆菌。因此本实验选用新培养的处于对数期的细胞作为首次诱变对象，并对每一轮筛选出的突变株进行复壮扩大培养，以达到供试细胞既能处于生长代谢旺盛的对数期，又具有生理活性方面同步的目的。这样的细胞对诱变剂的敏感性和 DNA 复制都是有利的，易产生突变率高、重现性好的突变株。

3.3.2 诱变剂的选择

3.3.2.1 诱变剂及处理方法的选择

诱变剂的选择主要决定于诱变剂对基因作用的特异性和出发菌株的特性。不同的诱

变剂作用机制和作用效率不同, 在选育菌株时选择正确的诱变剂非常重要。一般说来, 一种诱变因素对一种微生物有较强的作用, 对其它微生物效应也较强, 但由于不同微生物对诱变剂的细胞透性可能不同, 对同一种诱变剂可能表现不同作用。这也决定了目前的诱变育种还达不到定向改变某一性状的目的。

一个菌种的产物多少并非是由基因控制的, 而是多基因决定的结果。诱变剂进入生物体的变异机制是非常复杂的, 诱变剂进入细胞对 DNA 分子上的基因的某一位点发生作用而引起突变, 但不一定形成突变体。原因是菌体为了生存, 具有一套自我修复系统, 不同的菌株修复能力是不同的, 能力弱的菌株对已形成的突变进行复制而被遗传下来, 表型上成为突变体。修复能力强的菌株, 由于自身修复而恢复到原原型状态, 即回复突变或新的负变。

诱变剂种类很多, 作用方式多样。如紫外线能引起 DNA 结构变化, 使 DNA 链断裂、发生分子内部和分子间的交联, 使得 DNA 两条链间或同一条链相邻的胸腺嘧啶形成二聚体, 阻碍碱基间的正常配对, 从而引起生物体的基因突变或死亡。DES 和 NTG 等烷化剂主要通过烷化基团使 DNA 分子上的碱基及磷酸部分被烷化, 当 DNA 复制时导致碱基配对错误而引起突变。因此, 诱变剂应该选择能使遗传物质改变较大且不易产生回复突变的诱变剂, 这样容易获得突变性状较稳定的突变株。

在利用选定的诱变剂进行处理时, 既可以选择单一诱变因子处理, 也可以使用复合处理。各种诱变因子的作用机制不一样, 主要是 DNA 分子上的不同基因位点对各种诱变剂吸收值有较大差异。即不同诱变剂对基因作用位点有其一定的专一性, 有的甚至具有特异性。因此, 多因子复合处理, 可以取长补短, 动摇 DNA 分子上多种基因的遗传稳定性, 以弥补某种不亲和性或热点饱和现象, 容易得到更多突变类型。而且经验表明, 诱变剂的复合处理常呈现一定的协同效应。如氯化锂与紫外线、乙烯亚胺、羟胺、硫酸二乙酯复合诱变处理能收到良好效果。复合因子适合于遗传性稳定的纯种及生活能力强的菌株处理, 能导致较大的突变。一般在诱变育种过程中, 只经过一次诱变是不能够得到理想的突变株的, 往往要通过多次筛选和诱变处理才可以。常见的处理方法主要有: 两种或多种诱变因子先后使用; 同一种诱变剂重复使用; 两种或两种以上诱变剂交替使用等几种方式。

因此, 本实验选择了在微生物诱变育种中最常用且诱变效果较好的三种诱变剂紫外线、氯化锂、DES, 对出发菌株进行多次重复诱变。

3.3.2.2 诱变剂量的选择

在微生物产量性状诱变育种中, 诱变剂的作用有三方面: 一是提高突变频度; 二是扩大产量变异频度; 三是使产量变异朝正向突变(即提高产量幅度大)的方向移动。因此, 凡是在提高突变率的基础上, 既能扩大变异幅度又能使变异向正向突变范围移动的剂量称为诱变剂的最适剂量(施巧琴等, 2003)。

化学诱变剂主要是调节浓度、处理时间和处理条件(温度、pH 等); 物理诱变剂则主要调节照射距离、时间及照射过程的条件(氧、水等), 以达到最佳的诱变效果。其实, 诱变剂量的选择是个复杂的问题, 不单是剂量和变异率之间的关系, 而是涉及到许多因素, 如菌种的遗传特性、诱变史、诱变剂种类及处理的环境等。由于本实验所选用的菌株为低产、未诱变株, 所以选用了较高的诱变剂量。

从前面的诱变实验可以看出, 正向突变较多地出现在偏低剂量中, 而负向突变较多地出现在偏高剂量中。所以认为, 杀菌率在70—80%或更低剂量, 诱变效果好; 特别是经过多次诱变后的高产菌株更是如此。

3.3.2.3 突变株的分离与筛选

不管是传统的诱变育种还是现代的基因工程育种, 在通过各种手段改变菌体的遗传性状之后, 如何将具有所要特性的菌种从数量庞大的菌体族群中筛选出来, 常是育种上至关重要也是最耗时费力的工作。因此, 要设计和采用效率较高的筛选方案和适宜的筛选方法。一般认为筛选过程分为初筛和复筛。

微生物经过诱变因子处理后群体中会产生各种类型突变体, 其中有正突变型、负突变型和稳定型, 需要经过分离筛选逐个地挑选出来。经过连续数代诱变选育, 才有可能选育出一个优良的菌种。在产量性状诱变育种中, 诱变处理后的微生物群体不论是高产菌株还是负变菌菌株都能在同一个培养基上生长, 难以采用选择性培养法进行筛选。经过一次诱变而引起的产量突变的菌株, 其菌落形态的表型几乎和出发菌株相同, 没有明显指示性。因此, 初筛平板的设计及初筛方法的选定对结果影响甚大。为了选出正突变株, 本实验选用含溴百里酚兰的鉴别培养基平板进行初筛。克氏肺炎杆菌发酵生产 1,3-丙二醇的过程中会伴有乳酸、乙酸和乙醇等副产物生成, 从而使培养基的 pH 值下降, 在其周围形成呈色圈, 通过测量呈色圈直径与菌落直径之比, 作为初筛淘汰的依据。但由于乙酸等副产物的产生与 1,3-PD 产量的高低并没有正相关性, 因此该筛选方法并不能完全衡量突变株的产量高低。为了进一步摸索高产突变株的筛选路线, 本实验利用浓

缩筛选和影印技术的结合,对复合处理后的菌株进行筛选。克氏肺炎杆菌厌氧发酵甘油过程中,产物 1,3-丙二醇的生成对发酵也起着抑制作用,曾安平等人认为 (Menzel K,et al.1998),较高浓度的 1,3-丙二醇(PDO)对 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)活性较高的菌株是致死条件,而 PDOR 活性较低、氧化还原酶(HOR)活性较高的菌株却可以存活下来。而在 HOR 的参与下,可以降低 3-羟基丙醛的浓度水平,同时可以催化 3-羟基丙醛生成 PDO 反应,获得较高浓度的 1,3-丙二醇。因此,利用浓缩筛选可以大量淘汰对产物耐受性差的突变菌株。甘油代谢沿乙酸途径是获得 PDO 的最佳途径之一(Zeng A P,et al,1994;王剑锋等,2001a),那么乙酸代谢活性较高的突变体,会在含有 0.2%刚果红培养基上显红色。因此,可以利用影印技术挑选在 S-1 培养基和 S-2 培养基上都能生长且在 S-2 培养基上显红色的菌落作为目的突变株。通过该方法可以筛选出生产能力较强且合成副产物乙醇较弱的突变菌株。

3.4 小 结

为了获得 1,3-PD 的高产突变株,以克氏肺炎杆菌为出发菌株进行诱变处理。经过两次紫外线(UV)物理诱变得到两株高产正突变株 *K.pneu*2007 和 *K.pneu*2025,再经过硫酸二乙酯(DES)化学诱变得到突变株 *K.pneu*3038 和 *K.pneu*3051。再经氯化锂(LiCl)和紫外线(UV)复合诱变并结合两次浓缩筛选和影印技术获得高产菌株 *K.pneu*4046。并且相对简化了筛选路线。经过多次传代实验,表明其是稳定的突变株。*K.pneu*4046 的 1,3-PD 产量由出发菌株的 4.7g/L 提高到 16.1g/L。

第四章 高产菌株发酵条件的优化

4.1 材料与方法

4.1.1 实验材料

4.1.1.1 菌种

克氏肺炎杆菌 *K.pneu*4046, 沈阳农业大学食品学院生物技术实验室选育。

4.1.1.2 试剂

同第二章 2.1.1.2。

4.1.1.3 实验仪器

同第二章 2.1.1.3。

4.1.1.4 培养基(g/L)

种子培养基 I

基础发酵培养基: K_2HPO_4 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 甘油 50, 酵母膏 1.0, 半胱氨酸盐酸盐 0.5, $CaCl_2$ 0.02, 微量元素 I 1.0mL, Fe 液 2.0mL, pH7.0。

4.1.2 实验方法

4.1.2.1 培养方法

取新鲜活化培养基上的菌苔一环, 接种于装有液体种子培养基中, 于 32℃ 条件下培养 15—18h 左右, 再按一定比例转接于厌氧瓶的发酵培养基中, 在 37℃ 培养 48h, 其中用 1mol/L KOH 调节酸碱度, 使其 pH 控制在 7.0 左右。

4.1.2.2 发酵培养基和发酵条件优化

发酵培养基的优化

1) 添加不同浓度甘油

采用甘油浓度不同而其它组分相同的一组发酵培养基, 在 37℃ 条件下静置厌氧培养 40—48h, 测定菌液浓度及发酵液中产物浓度, 绘制曲线进行比较。

2) 添加不同氮源

在发酵培养基中, 分别加入不同种类和浓度的氮源, 其它成分不变, 在 37℃ 的厌氧恒温箱里静置培养 36—48h, 测定菌体浓度和 1,3-PD 产量。

3) 添加不同磷酸盐

在发酵培养基中,分别添加不同浓度的磷酸盐,其它成分不变,在 37℃ 的厌氧恒温箱里静置培养 40—48h,测定 1,3-PD 产量进行比较。

4) 添加不同金属离子

在发酵培养基中,分别采用不同浓度的 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} ,其它成分相同,在 37℃ 的厌氧恒温箱里静置培养 40—48h,比较菌体生长及发酵情况。

5) K^+ 、 Na^+ 对发酵的影响

对同一组分的基础发酵培养基,分别采用不同的碱液对发酵液的 pH 值调控在 7.0 左右,37℃ 厌氧静置培养 40—48h,测定发酵液中的产物含量,进行比较。

发酵条件的优化

1) 培养温度对 1,3-丙二醇的影响

分别采用不同温度对具有相同组分的基础发酵培养基进行发酵培养,测定发酵液中菌体生长状况及 1,3-丙二醇产量。

2) pH 对发酵的影响

在相同的酸碱调控方式下,对一组成分相同的基础发酵培养基,调控初始 pH 在 7.0 左右,37℃ 静置培养 40—48h,测定细胞生长代谢情况。

3) 利用 $L_9(3^4)$ 正交实验对 *K.pneu4046* 菌株发酵甘油生成 1,3-PD 的最适接种量、pH、时间、温度进行研究。

4.1.2.3 分析方法

1. 发酵液中 1,3-PD、乙醇含量测定

采用高效液相色谱法,条件同第三章 3.1.2.3。

2. 发酵液中残余甘油的测定

采用改进的高碘酸氧化法(王剑锋,2001b)。

3. 生物量的测定

采用比浊法,方法同第二章 2.1.2.5。

4.2 结果与分析

4.2.1 甘油浓度对发酵的影响

配制甘油浓度分别为 3%、6%、9%,其余条件相同的一组发酵培养基,进行厌氧发酵。由图 4.1 可以看出,在最初的 4h 内,菌体处于生长适应期,在甘油浓度为 3%时,

菌体生长最快，当甘油初始浓度为 9% 时，细胞的生长明显减慢，可见较高的初始甘油浓度对菌株生长产生一定程度的抑制作用。

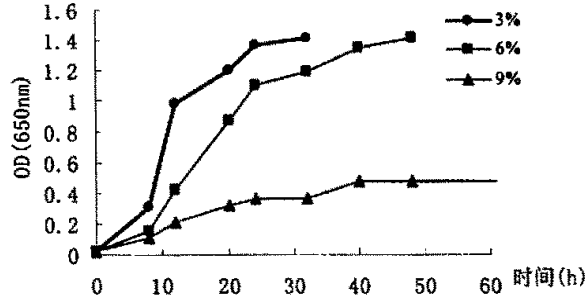


图 4.1 不同初始甘油浓度下细胞生长曲线

Figure 4.1 Biomass under various initial glycerol concentration

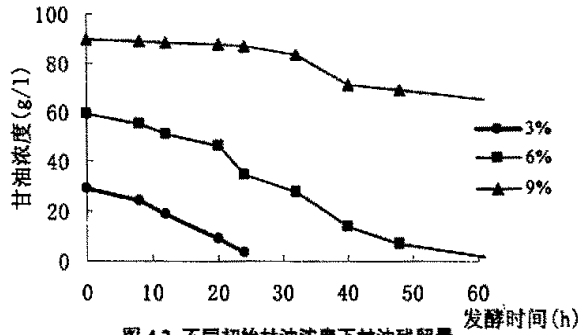


图 4.2 不同初始甘油浓度下甘油残留量

Figure 4.2 Residual glycerol under various initial glycerol concentration

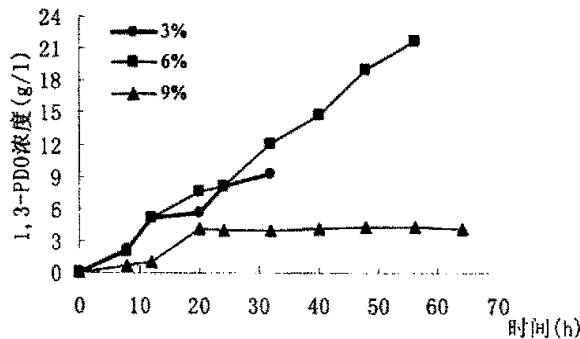


图 4.3 不同初始甘油浓度对 1,3-PD 产量的影响

Figure 4.3 Effect of different temperature on the fermentation to 1,3-PD

由图 4.2、4.3 可见，培养 4h 后，各浓度的甘油消耗速率和产物生成速率均有所加快，3%、6% 初始浓度的甘油消耗速度远大于 9% 初始甘油浓度的速度，这说明过高的底物浓度反而抑制了该菌的代谢。从代谢途径而言，因为菌株生长既是生成能量 ATP

的过程,也是生成还原当量 NADH_2 的过程,所以甘油浓度过高导致的菌浓度明显下降,不利于消耗 NADH_2 过程的 1,3-PDO 的成。3%的甘油有利于细胞生长,但其甘油消耗最快,在 24h 几乎就耗尽而达到稳定期;相比较而言,6%的初始甘油浓度的发酵液中 1,3-PD 终产量最高,甘油消耗几乎完全。由此可见,6%的初始甘油浓度有利于 1,3-PD 生成及甘油的转化。

4.2.2 不同氮源对 1,3-丙二醇产量的影响

4.2.2.1 不同有机氮源对 1,3-PD 产量的影响

在基础发酵培养基(不含无机氮)中,分别添加相同质量百分比的牛肉膏、酵母膏、蛋白胨作为有机氮,在 37°C 厌氧培养箱中静置培养 48h,观察其对菌体生长及 1,3-PD 产量的影响。

表 4.1 不同有机氮源对 1,3-PD 产量的影响

Table 4.1 Effect of different organic nitrogen on the fermentation to 1,3-PD

有机氮源(0.1%)	1,3-PD 产量(g/L)	OD(650nm)	时间(h)
牛肉膏	12.1	1.13	48
酵母膏	13.9	1.25	48
蛋白胨	10.9	1.01	48

从实验结果(表 4.1)可以看出,含不同有机氮的培养基发酵所产生的 1,3-PD 产量有一定的差别,在所用的三种有机氮源中酵母膏是效果最好的,而蛋白胨效果较差。这与文献报道的结论(A.P.Zeng,1996; Reimann A,Biebl,1996)相一致。为了进一步考察酵母膏对发酵的影响,在其它条件相同(有无无机磷和氮)的发酵培养基中添加不同浓度的酵母膏进行发酵比较。结果如图 4.4 所示。

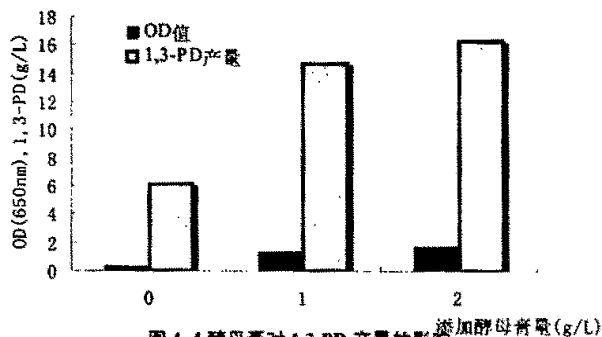


图 4.4 酵母膏对 1,3-PD 产量的影响

Figure 4.4 Effect of yeast extract on the fermentation to 1,3-PD

图 4.4 表明, 酵母膏是 1,3-PD 发酵所必需的营养成分, 不加酵母膏, 菌体几乎不生长, 甘油代谢极其缓慢, 发酵产物生成量很低; 酵母膏的存在可促使菌体生长代谢, PDO 产量较高, 原因可能在于酵母膏含有菌体生长所必要的 V_{B12} 等生长因子; 由实验可知, 酵母膏浓度为 2g/L 时更有利于发酵产物的生成。

4.2.2.2 不同无机氮源对 1,3-丙二醇产量的影响

在不含有机氮的基础发酵培养基中, 分别加入不同种类无机氮(含量均为 0.2%), 其它成分和条件相同, 37℃厌氧静置培养 48h, 测定菌体生长速率及 1,3-PD 产量。

表 4.2 不同无机氮源对 1,3-PD 产量的影响

Table 4.2 Effect of different inorganic nitrogen on fermentation 1,3-PD

	KNO_3	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl
1,3-PD 产量(g/L)	6.3	8.1	8.5
OD(650nm)	0.32	0.51	0.58

实验结果表明, KNO_3 与其它两种无机氮源相比, 菌株的生长相对较弱, 1,3-PD 产量也不如 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 。说明 NH_4^+ 比 K^+ 有利于细胞的生长, 而无机氮源 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 两者对 1,3-PD 产量和菌体生长的影响并无显著差异, 相比之下后者略好一些; 据报道(陈宏文等, 2004) NH_4Cl 相比于 $(NH_4)_2SO_4$ 对甘油脱水酶的促进作用较大, 更有利于发酵产物的积累。因此可以选用 NH_4Cl 作为无机氮源。

4.2.2.3 不同浓度配比的复合氮源的对 1,3-丙二醇产量影响

在酵母膏含量为 2g/L 的基础发酵培养基中, 控制发酵液中 NH_4Cl 含量分别在 1.0g/L、1.6g/L、2.0g/L、2.4g/L、3.0g/L, 测定发酵液中 1,3-PD 的产量。

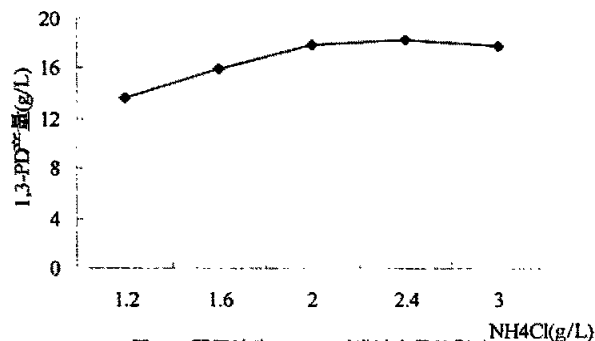


图 4.5 不同浓度 NH_4Cl 对发酵产量的影响

Figure 4.5 Effect of different NH_4Cl concentration on the fermentation to 1,3-PD

从实验结果(图 4.5)可以看出, 不同 NH_4^+ 浓度对 *K.pneu*4046 菌株 1,3-PD 产量有一

定影响,随着 NH_4^+ 含量增加,发酵产量有逐渐增加的趋势,当 NH_4^+ 浓度达到 2.4g/L 时,产量最大为 18.1g/L ,之后 NH_4^+ 含量再增加,1,3-PD 产量没有明显变化,可能细胞生长所需的 NH_4^+ 基本达到饱和。同时,根据图 4.4、4.5 比较可知,复合氮源更有利于菌体的发酵。

4.2.3 不同磷酸盐对 1,3-丙二醇产量的影响

磷是组成核酸、核蛋白和磷脂的成分,也是许多酶的活性剂成分。微生物主要从无机磷中获得磷。且磷酸盐对培养基 pH 值的变化有缓冲作用。为考察不同磷酸盐对发酵的影响,在基础发酵培养基中,分别选取 7.3mmol/L 、 9.4mmol/L 和 11.5mmol/L 三种初始磷酸盐浓度进行发酵实验。结果如图 4.6。

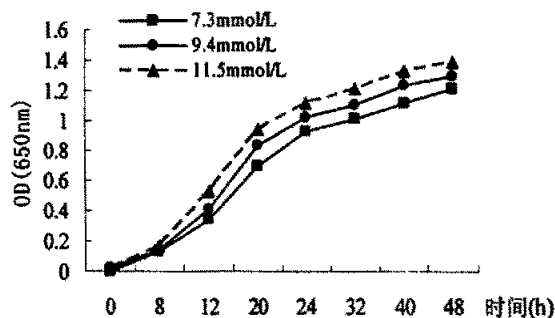


图 4.6 磷酸盐对菌体生长的影响

Figure 4.6 Effect of phosphate on biomass

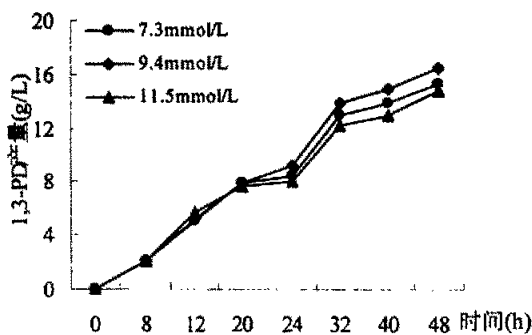


图 4.7 磷酸盐对 1,3-PD 产量的影响

Figure 4.7 Effect of phosphate on 1,3-PD

从图4.6,4.7可知,随着P浓度的增加,菌体生长速度也增加,而产物1,3-PD的产量却先增加后减少。当P浓度为 9.4mmol/L 时,1,3-PD的产量比P源浓度分别为 11.5mmol/L 和 7.3mmol/L 时的产量分别增加了 1.7g/L 和 1.2g/L 。其原因可能是,一方面P有利于菌体的生长代谢且P对于代谢途径中的丙酮酸激酶有激活作用,有利于 NADH_2 的形成,因而增

加了1,3-PD的产量；另一方面，过多的P却会引起菌体过量生长，大量甘油用于菌体生长而没能有效地将甘油转化为1,3-PD，降低了甘油转化率以及1,3-PD的产量。因此，本实验条件下，较为适宜的P源初始浓度为9.4 mmol/L。

由于培养基中同时含有K₂HPO₄·3H₂O和KH₂PO₄两种磷酸盐，在P源浓度为9.4mmol/L时，考察不同磷酸盐缓冲剂组合对1,3-PD产量的影响。

表4.3 不同磷酸盐组合对1,3-PD产量的影响
Table 4.3 Effect of mixed phosphate on fermentation to 1,3-PD

Phosphate(g/L)		1,3-PD(g/L)
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2.1 KH ₂ PO ₄ 0	16.1
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.7 KH ₂ PO ₄ 0.26	16.7
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.3 KH ₂ PO ₄ 0.5	16.9
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.9 KH ₂ PO ₄ 0.73	16.6
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.5 KH ₂ PO ₄ 0.94	16.3
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0 KH ₂ PO ₄ 1.3	15.9

由上表可知，K₂HPO₄和KH₂PO₄含量分别为1.3g/L和0.5g/L时对发酵生产1,3-PD最为有利，1,3-PD的产量高达16.9g/L，这可能是因为不同磷酸盐组合引起的缓冲能力差异造成的。

4.2.4 金属离子对 1,3-丙二醇产量的影响

4.2.4.1 Fe²⁺对 1,3-PD 产量的影响

在甘油初始浓度为 6%，2%酵母膏、磷源浓度为 9.4mmol/L 的发酵培养基中，控制 Fe²⁺含量(‰)分别为：0.01、0.03、0.05、0.07、0.09，进行 *K.pneu*4046 菌株厌氧 1,3-PD 液体发酵，结果见图 4.8。

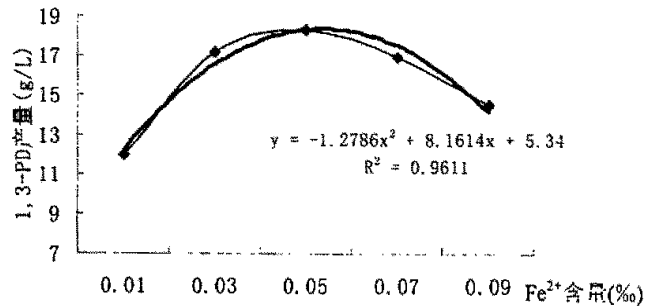


图 4.8 Fe²⁺对 1,3-PD 产量影响

Figure 4.8 Effect of Fe²⁺ on the fermentation to 1,3-PD

从下图 4.8 可以看出, 极其微量的 Fe^{2+} 对发酵产物的生成有着较大的影响, 当 Fe^{2+} 含量达到 0.05% 时, *K.pneu*4046 菌株的 1,3-PD 产量达到最大值, 但随着含量的增大, 其产量反而下降。这种现象可能由于含量在 0.01%—0.05% 之间, Fe^{2+} 成分能激活 1,3-PD 脱氢酶活性, 从而促进 1,3-PD 的产生; 同时, 由于 Fe^{2+} 又是甘油脱氢酶的抑制剂, 所以 Fe^{2+} 含量过高会抑制甘油脱氢酶的活性, 从而抑制了氧化途径中能量 ATP 及还原当量 NADH_2 的形成, 使得产物产量降低。因而, 本实验条件下, 最适 Fe^{2+} 含量应为 0.05%。

4.2.4.2 Ca^{2+} 对 1,3-PD 产量的影响

有研究表明 (陈宏文等, 2004), Ca^{2+} 对 GDH、GDHt、PDOR 三种甘油转化 1,3-PD 关键酶的活力和菌体浓度都有促进作用。因此, 本实验在控制氮源、碳源、磷源及 Fe^{2+} 浓度较佳的情况下, 调整 Ca^{2+} 在发酵液中的不同含量, 进行发酵比较。

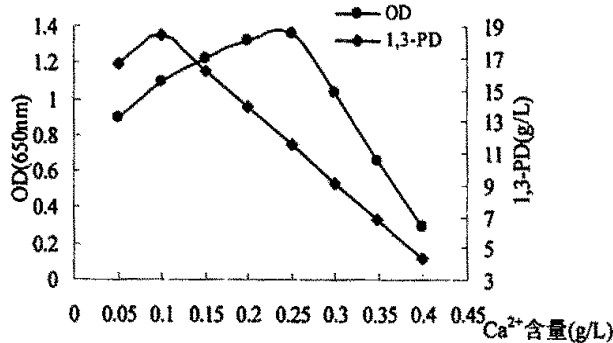


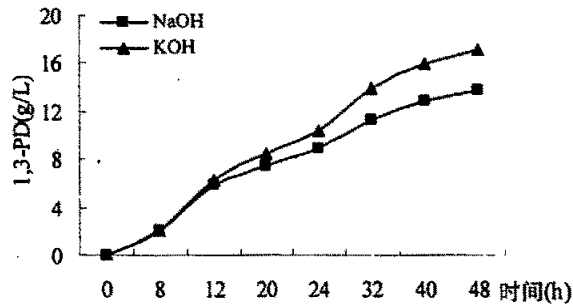
图 4.9 Ca^{2+} 对 1,3-PD 产量的影响

Figure 4.9 Effect of Ca^{2+} on the fermentation to 1,3-PD

从图可知, 当 Ca^{2+} 浓度在 0g/L—0.1g/L 时, 菌体生成量和 1,3-PD 产量随着 Ca^{2+} 浓度增加而增加, 这主要是因为 Ca^{2+} 是甘油转化过程中氧化途径上二羟丙酮激酶的激活因子, 适量的增加 Ca^{2+} 浓度有利于菌体代谢更多的 ATP 和 NADH_2 , 从而增加 1,3-PD 的产量。当 Ca^{2+} 浓度在 0.1g/L—0.25g/L 时, Ca^{2+} 浓度的增加, 引起菌体过度生长, 使得用于菌体生长的甘油量增加而降低了甘油对 1,3-PD 转化率, 因而在这过程中 1,3-PD 的产量减少。当 $\text{Ca}^{2+} > 0.25\text{g/L}$ 时, Ca^{2+} 浓度的增加, 造成了菌体生成量和 1,3-PD 产量的迅速下降, 这可能与 Ca^{2+} 的絮凝作用有关。因而实验表明, 在该菌发酵过程中, 最为合适的 CaCl_2 浓度为 0.1g/L。

4.2.5 K^+ 、 Na^+ 对 1,3-丙二醇产量的影响

对基础培养基发酵过程中, 分别用 2mol/L KOH, 2mol/L NaOH 调节 pH 7.0, 以此来考察 K^+ 、 Na^+ 对发酵的影响。

图 4.10 K^+ 、 Na^+ 对 1,3-PD 的影响Figure 4.10 Effect of K^+ 、 Na^+ on the fermentation 1,3-PD

从图可知,在发酵初期,两种pH调节方式对发酵影响并无太大区别,随着发酵的进行, K^+ 、 Na^+ 浓度增加,采用NaOH调节的1,3-PD产量(13.7 g/L)明显低于KOH调节的产量(17.1g/L)。研究表明(Lin E C C, 1960; 王剑锋等, 2001c), Na^+ 是胞内关键酶—甘油脱氢酶的抑制因子,而 K^+ 是甘油脱水酶的促进因子,是甘油脱水酶起催化作用不可缺少的(Forage R G, et al, 1982)。在发酵过程中,随着 Na^+ 浓度的增加对酶的抑制作用增强,1,3-PD的产出逐渐减少;而 K^+ 浓度的增加对酶的活化作用增强,所以在发酵过程中应用2mol/L KOH来调控发酵液的pH值。

4.2.6 培养温度对发酵的影响

温度是影响微生物生长代谢的重要环境因素之一。甘油在微生物体内代谢是各种酶综合作用的结果,而酶活性对温度的变化是很敏感的,合适的温度将有利于酶促作用,促进甘油代谢,提高1,3-PD的产量。*K.pneumoniae*为人体肠道菌群,生长温度应该与人体体温相差不大,所以,分别在30℃、32℃、35℃、37℃、40℃温度下,对菌株进行发酵培养,结果见图4.11、图4.12所示。

从细胞生长和甘油消耗曲线可以看出,30℃左右细胞生长和甘油消耗较快,随着温度的升高,细胞生长速率和甘油消耗速率都在逐渐下降。从发酵结果看,温度较低时有利于细胞生长,甘油的消耗主要用于细胞生长,1,3-丙二醇的产量少,使得甘油的转化率相对较低。从图4-13还可看出随着温度的增加,1,3-丙二醇的产量和转化率先增加后减少,在本实验条件下,37℃下1,3-丙二醇浓度和转化率最高,分别达到16.8g/L, 38.3%,比30℃时的浓度和转化率二倍还高,在此温度时细胞生长已受到限制,甘油的代谢主要转化为1,3-丙二醇,而40℃时细胞生长受到限制更为严重,致使甘油消耗缓慢,进而影响了甘油的转化。因此得出结论,过低或过高的培养温度,均会影响发酵产

物的生成。

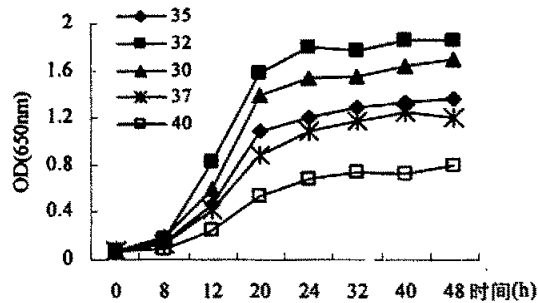


图 4.11 不同温度下细胞的生长曲线

Figure 4.11 Biomass under different temperature

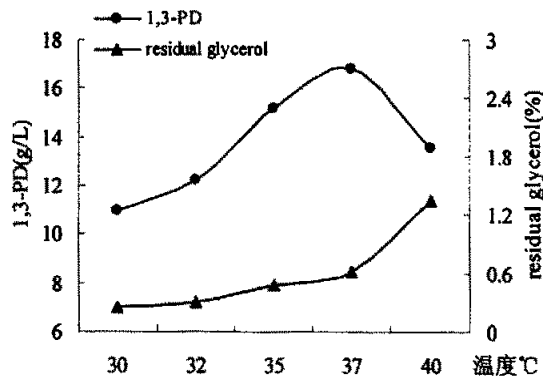


图 4.12 不同温度对发酵的影响

Figure 4.12 Effect of temperature on the fermentation

4.2.7 pH 对发酵的影响

酸碱度对微生物的生长代谢有着重要影响，不同的微生物对酸碱又不同的适应环境。在确定了发酵液初始 pH 之后，整个发酵过程中不再人为改变发酵液 pH 值的情况下，考察了发酵过程中发酵液 pH 的变化对克氏肺炎杆菌生长量的影响。

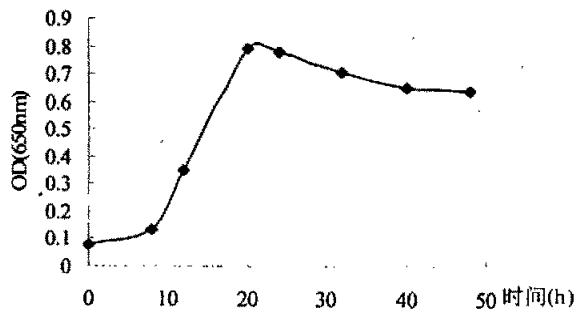


图 4.13 不调 pH 时细胞生长代谢曲线

Figure 4.13 Biomass without pH control

从细菌生长曲线（图 4.13）可以看出 pH 对细胞生长代谢有着明显的影响，细胞生

长缓慢, 18h 达到最大生长量, 随后菌液浓度开始下降。这说明菌体代谢过程中产生的酸改变了发酵液的 pH, pH 值的变化改变了营养物质的可给性和有毒物质的毒性, 从而影响了细胞的生长状态, 同时也影响了代谢过程中酶的催化活性, 进而影响到甘油转化率及 1,3-PD 的产量。

4.2.8 发酵培养基正交实验

微生物的培养基为细胞的生长和代谢提供了必需的物质和能量, 其中包括碳、氮、磷、硫等营养成分。为了获得理想的培养基, 在单因素实验确定培养基的主要影响因素后, 用正交实验法进行培养基优化。当培养基中其它成分过量供应的情况下, 选择三种关键性底物甘油、酵母膏和 NH_4Cl 作为下一步实验的因素; 再考虑到微量元素溶液对发酵有所帮助, 且其中含有合成 $\text{V}_{\text{B}12}$ 所必需金属离子 Co^{2+} , 它可以通过影响辅酶来影响甘油脱水酶的活性, 最终影响 1,3-PD 的产生。(Cameron D C et al, 1998)。下面利用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验对培养基进行优化。实验设计见表 4.4, 实验结果及极差分析见表 4.5。

表 4.4 发酵培养基 $\text{L}_9(3^4)$ 正交实验表头设计
Table 4.4 Factors and levels in $\text{L}_9(3^4)$ orthogonal tests

A	B	C	D
甘油(g/L)	酵母膏 (g/L)	NH_4Cl (g/L)	微量元素(g/L)
40	1	2.0	0.5
60	1.5	2.4	1
80	2	2.8	1.5

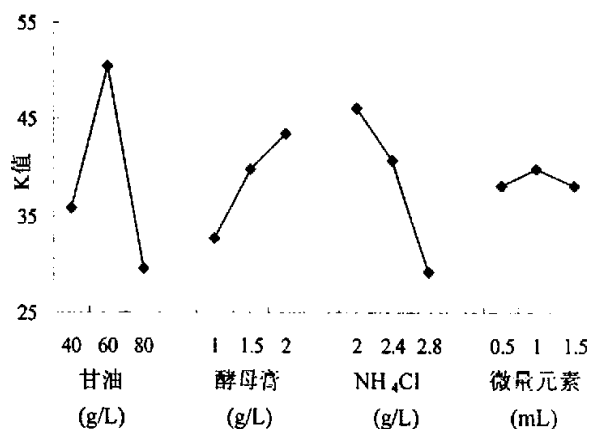


图 4.14 各因素不同水平的生物效应

Figure 4.14 Biological effects of different factors on the fermentation

第四章 高产菌株发酵条件的优化

表 4.5 正交实验结果极差分析

Table 4.5 Extreme value analysis of $L_9 (3^4)$ orthogonal tests

试验号	A 甘油(g/L)	B 酵母膏(g/L)	C NH_4Cl (g/L)	D 微量元素(mL)	1,3-PD 产量 (g/L)
1	1	1	1	1	12.23
2	1	2	2	2	13.4
3	1	3	3	3	10.19
4	2	1	2	3	15.34
5	2	2	3	1	13.89
6	2	3	1	2	21.3
7	3	1	3	2	5.08
8	3	2	1	3	12.52
9	3	3	2	1	11.94
K_1	35.86	32.65	46.05	38.06	$\Sigma 115.89$
K_2	50.53	39.81	40.68	39.78	
K_3	29.54	43.43	29.16	38.05	
k_1	11.94	10.88	15.35	12.69	
k_2	16.84	13.27	13.56	13.26	
k_3	9.85	14.47	9.72	12.68	
R	6.99	3.59	5.63	0.58	

注: K_i 为对应于各因素水平的实验结果总和; k_i 为对应于各因素水平的实验结果总和的平均数;

R 为同一列中不同水平极差。

4.2.8.1 极差分析

为了便于确定影响甘油发酵因素的主次和选择最佳条件,对实验结果进行了极差分析,极差结果 R 的大小,反映了各因素的水平变化对发酵产量的影响。根据极差 R 排出因素作用的主次顺序为: $A > C > B > D$

从而可以看出,菌种对甘油浓度的改变反应敏感,对 NH_4Cl 和酵母膏的浓度改变反应其次,微量元素对发酵单位有较弱的影响。图 4.13 可以更加直观地看到各因素水平不同效应的变化范围,变幅越大作用越大。因素 A 中以 A_2 的 K 值最高, B 中为 B_3 , C 中为 C_1 , D 中为 D_2 , 所以最佳优势水平组合为: $A_2B_3C_1D_2$; 即甘油为 60 g/L、 NH_4Cl 为 2.0 g/L、酵母膏为 2 g/L 时分别是最好的水平。

4.2.8.2 方差分析

为了判断实验因素之间的差异是来自于随机误差,还是来自于其本质的差异,对实验结果进行方差分析。

表 4.6 正交实验结果方差分析
Table 4.6 Variance analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal tests

误差源	平方和 (SS)	自由度 (f)	方差 (V)	F 比	F 临界	显著水平
因素 A	77.38	2	38.69	117.062	19.000	*
因素 B	20.06	2	10.03	30.364	19.000	*
因素 C	49.65	2	24.83	75.109	19.000	*
因素 D	0.661	2	0.33	1.000	19.000	
误差	0.66	2	0.33			
总和	147.75	8				

在正交表的各列都被因素占满,未留空闲列,而且整个试验未设重复之时,试验误差的自由度等于零。所以不能获得有关误差的情况。在这种情况下,一个进行弥补的办法,就是将均方值较小的因素项权当作误差项(萧兵等,1985)。由表 4.6 可知,均方值较小的因素项为 D,所以本实验将因素 D 作为误差项参加检定。

查 F 分布表得临界值 $F_{0.05}(2,2)=19.0$, F_A 、 F_B 、 F_C 均大于此值,说明因素 A、B、C 对克氏肺炎杆菌 *K.pneu*4046 发酵特性均有显著影响。因此,该菌种的培养基组分确定为:甘油 60g/L、 NH_4Cl 2.0g/L、酵母膏 2.0g/L、微量元素 1mL。在该优化条件下经发酵测得 1,3-PD 产量为 21.3g/L。

4.2.9 最适发酵条件的优化

在最适发酵培养基的基础上,利用 $L_9(3^4)$ 正交实验对菌株发酵甘油生成 1,3-PD 的最适接种量、时间、pH、温度进行研究,实验表头设计如表 4.7。

根据 $L_9(3^4)$ 表头设计,在厌氧培养瓶中装入营养成分相同的发酵优化培养基 50mL,按照表 4.7 设计的正交方案, pH、温度、接种量、时间等因素不同的条件下发酵,分别测定各处理下 1,3-PD 的产量,并对 1,3-PD 产量进行直观分析,结果见表 4.8。

由表 4.8 极差 R 值的大小,可以排出因素作用的主次顺序为: $A > C > D > B$, 其中 pH 值对发酵的影响最大,其次为接种量。通过正交实验,确定了 *K.pneu*4046 菌株发酵甘油生成 1,3-PD 的最适发酵条件: pH 值 7.0、温度 37℃、培养时间 42h、接种量 5%。在该发酵条件下, 1,3-PD 最高产量可达 24.38g/L。

第四章 高产菌株发酵条件的优化

表 4.7 发酵参数因素及水平表

Table 4.7 Factor and treatment table of fermenting parameter

水平	A	B	C	D
	pH	时间(h)	接种量(%)	温度(℃)
1	6.5	36	5	32
2	7.0	42	10	37
3	7.5	48	15	40

表 4.8 $L_9(3^4)$ 实验结果及统计分析表

Table 4.8 $L_9(3^4)$ test and the statistical result

试验号	A	B	C	D	1,3-PD 产量 (g/L)
	pH	时间(h)	接种量(%)	温度(℃)	
1	1	1	1	1	13.78
2	1	2	2	2	17.75
3	1	3	3	3	13.31
4	2	1	2	3	18.45
5	2	2	3	1	17.01
6	2	3	1	2	24.38
7	3	1	3	2	10.03
8	3	2	1	3	14.17
9	3	3	2	1	12.11
K_1	44.85	42.27	52.32	42.90	$\Sigma 140.99$
K_2	59.85	48.93	48.30	52.17	
K_3	36.30	49.80	40.35	45.93	
k_1	14.95	14.09	17.44	14.30	
k_2	19.95	16.31	16.10	17.39	
k_3	12.10	16.60	13.45	15.31	
R	7.84	2.51	3.99	3.09	

注: K_i 为对应于各因素水平的实验结果总和; k_i 为对应于各因素水平的实验结果总和的平均数; R 为同一列中不同水平极差。

4.3 讨论

4.3.1 关于发酵培养基对 1,3-PD 产量的影响

1,3-PD 是以甘油为底物发酵生产的产物, 目前为止还没有发现可以利用其它有机物质为单一底物产生 1,3-PD 的自然菌(Abbad-Andaloussi S et al, 1996; 王剑锋等, 2001d)。甘油作为微生物生产 1,3-PD 的唯一碳源和供能物质, 是微生物生长、产物 1,3-PD 及副产物乙醇、

乙酸、乳酸等的反应物，其初始浓度的大小对菌体生长及1,3-PD的产量有很大影响。实验表明，过高的初始甘油浓度对菌株生长、1,3-PD甘油的转化率及1,3-PD生产强度均有一定程度的抑制作用。这主要是由于甘油代谢途径中共有三个关键酶：甘油脱水酶、甘油脱氢酶和1,3-丙二醇氧化还原酶，过量的初始甘油浓度会对三种酶的活性产生不利影响。菌株生长既是生成能量ATP也是生成还原当量 NADH_2 的过程，所以甘油浓度过高导致的菌浓降低，也不利于消耗 NADH_2 过程的1,3-PD的生成。所以认为甘油作为反应物，低浓度时是激活剂，高浓度时是抑制剂。当初始甘油浓度达到6%时，刚好达到底物微过量状态，此时菌体浓度最大；当初始甘油浓度达到9%时，底物抑制作用明显，菌体生长十分缓慢，致使1,3-PD转化率受到影响。但有报道（张健等，2002；程可可，2004），葡萄糖单独作为底物发酵时不能生成1,3-PD，而采用克氏肺炎杆菌以葡萄糖为辅助底物甘油发酵生产1,3-PD时，以葡萄糖和甘油为混合底物，并在发酵过程中流加葡萄糖与甘油混合液，不仅可以得到较高的菌体浓度及1,3-PD产量，而且可以降低以甘油为单一底物时的生产成本。本论文由于客观原因没有对其它碳源进行可行性研究。

除了碳源之外，通过实验可知培养基中氮源的含量对发酵也有较大影响。而磷酸盐对1,3-PD的影响则不太显著。实验表明酵母膏作为有机氮源，能够为微生物培养提供大量的B族维生素、氨基酸、嘌呤及生物素等营养物质，是1,3-PD发酵所必需的营养组分。酵母膏的存在可促使菌体生长代谢；原因在于酵母膏含有菌体生长所必需的 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 等生长因子，甘油可以在以 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 为辅酶的甘油脱水酶作用下生成3-羟基丙醛，再被1,3-丙二醇氧化还原酶还原生成1,3-PD；不加酵母膏，培养基中又无其它生长因子来源，菌体几乎不生长；有文献报道，直接添加 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 可以缓解由于酵母膏缺乏而带来的对发酵的影响（Himmi E H et al, 1999）。而作为无机氮源主要来源的， NH_4^+ 既为菌体生长提供氮源，又能激活胞内多种酶。研究表明（Lin E C C, 1960；王剑锋，2001c）， NH_4^+ 对甘油转化过程中三种关键酶（甘油脱水酶、甘油脱氢酶及1,3-丙二醇氧化酶）有激活作用， NH_4^+ 浓度逐渐提高，对细胞胞内酶的激活作用增强，代谢朝乙酸途径转移，有利1,3-PD的合成。

另外，培养基中金属离子也会在代谢水平上影响甘油代谢途径上的各种酶的活性。本实验初步考察了 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 对发酵过程的影响。 Fe^{2+} 是甘油转化过程中氧化途径上铁蛋白氧化还原酶的激活因子，足量的 Fe^{2+} 使得电子在铁氧化还原蛋白酶代谢时被大量消耗，产生了较多的 H_2 ，而减少了 NADH_2 的形成，最终降低了1,3-PD的产量。但同时 Fe^{2+}

还是1,3-PD氧化脱氢酶的激活因子,从实验中可以看出 Fe^{2+} 的缺乏也抑制了1,3-PD的形成。本实验条件下, Fe^{2+} 最适的浓度为0.05%。 Ca^{2+} 是甘油转化过程中氧化途径上二羟基丙酮激酶的激活因子,适量的增加 Ca^{2+} 浓度有利于菌体代谢更多的ATP和 NADH_2 ,从而增加1,3-PD的产量。

除 NH_4^+ 之外,培养基中其它一价阳离子的存在也会在代谢水平上影响甘油代谢途径中的一些酶的活性。本实验在用于调节pH的碱的选择过程中,对 K^+ 、 Na^+ 对发酵的影响进行了考察。 Na^+ 是胞内关键酶——甘油脱氢酶的抑制因子, K^+ 是甘油脱水酶的促进因子(Lin E C C,1960;王剑锋,2001c)。在发酵过程中,随着 Na^+ 浓度的增加对酶的抑制作用增加,1,3-PD的产出逐渐减少。修志龙(2001)经实验证明,在实际发酵过程中 NH_4^+ 、 K^+ 、 Na^+ 三种离子往往共存,它们对酶的作用也就成为抑制和激活的综合结果。在底物过量的条件下,高浓度钠离子对甘油生物歧化过程会产生不利影响,因此在培养基中含有足量铵的情况下,选择氢氧化钾调控pH更好些。

4.3.2 关于发酵培养方式对1,3-PD产量的影响

同一种菌种采取不同的培养方式得到效果不同。分批发酵最终浓度较高。而连续发酵在生产强度上较有优势。在同样条件下,分批发酵每摩尔甘油得到0.55-0.65mol/L, 3-PD,其生产强度为1-2.5g/L.h,最终浓度达到50-60g/L。而连续发酵可以提高生产强度到5-6g/L·h⁻¹,但发酵液中产物浓度却不及批式发酵的一半。值得一提的是,Menzel等(1997)采用*K. pneumoniae*进行甘油连续发酵高产1,3-PD的研究。结果发现当稀释率在10%-25%时,最终1,3-PD含量为35.2~48.5g/L。由于在分批发酵中高浓度甘油对产物1,3-PD具有强烈的抑制作用。为了减少高浓度甘油的抑制作用,补料分批培养是很好的甘油底物提供方式。Zeng等(1997)的研究发现,*K.pneumonia*采用该形式培养发酵生产1,3-PD时,甘油的含量为240-780mmol/L,转化率均可达100%,1,3-PD的产量为156-429mmol/L。当甘油起始浓度为5%,可以获得最大产率。一般在12-16h后再补加甘油20g/L,随着稀释度的增加,酶的活性也随之提高,从而转化速率没有改变。以上结果说明:*K. pneumonia*采用补料分批发酵的方式会取得较好的效果。

本研究中采用的是恒温箱培养而不是摇床培养,这是由于用厌氧瓶发酵培养过程中产生大量气体,如果用摇床培养,其中大量气体因无法释放而产生很大压力,在震荡中容易发生爆炸,所以采用静止培养。但是静止培养过程中容易出现菌体生长不均从而影响1,3-PD产量的问题,因此我们下一步应该考虑选择补料分批发酵法来进行放大试验生

产1,3-PD,以期获得更高的甘油转化率和产率。

4.4 小结

本章以诱变菌株*K.pneu*4046为发酵菌种,对克氏肺炎杆菌甘油发酵转化1,3-PD的发酵培养基及发酵条件进行初步优化。经单因素实验,确定了培养基中碳源、氮源对菌种的发酵有重要影响,然后,利用正交实验确定了最佳发酵培养基的配方:甘油60g/L、酵母膏2.0g/L、 NH_4Cl 2.0g/L、 K_2HPO_4 1.3g/L、 KH_2PO_4 0.5g/L、Fe液1mL、微量元素1mL。培养条件优化的结果表明,pH、接种量对发酵起着显著的影响,通过 $L_9(3^4)$ 正交实验确定了1,3-PD发酵条件:最适接种量、pH、温度、发酵时间分别为5%、7.0、37℃、42h;在最适发酵培养基条件和最适发酵条件下,菌株*K.pneu*4046发酵产生1,3-PD量为24.38g/L。

结 论

1 本论文主要结论

1. 克氏肺炎杆菌是兼性厌氧菌，细胞革兰氏染色为阴性，为较短粗的杆菌；具有较高的甘油耐受力，较高的转化率和 1,3-PD 生产能力；并且其生化特性与大肠杆菌非常相近。通过对克氏肺炎杆菌种子培养条件的研究表明，菌种在 32℃，好氧培养 18h 的条件下，可以获得活性较高、浓度较大的菌体量。
2. 以克氏肺炎杆菌为出发菌株，经过紫外线（UV）诱变、硫酸二乙酯（DES）诱变得得到两株高产正突变株 *K.pneu3038*, *K.pneu3051*, 比出发菌株分别提高了 119% 和 124%。
3. 在两次浓缩和影印技术的基础上，采用紫外线（UV）和氯化锂（LiCl）复合诱变的方法得到高产突变株 *K.pneu4046*，其 1,3-PD 产量由出发菌株的 4.7g/L 提高到 16.1g/L，提高了 3.43 倍，且相对简化了筛选流程。经过传代实验，表明其是稳定的突变株。
4. 酵母膏是 1,3-PD 发酵所必需的营养组分，添加适量的酵母膏将有利于 1,3-PD 的产生。
5. 高浓度甘油对 *K.pneu4046* 的生长具有较大的抑制作用，当甘油浓度为 9% 时抑制作用较明显。
6. K^+ 是甘油脱水酶的促进因子，因此在培养基中含有足量铵的情况下，选择氢氧化钾调控 pH 更有利于发酵产物的生成。
7. 温度、pH 对发酵有着重要的影响。在其它条件相同的情况下，当温度为 37℃ 时最终 1,3-PD 浓度最高；克氏肺炎杆菌在中性偏酸的环境下生长较好。
8. 通过对菌株 *K.pneu4046* 培养基优化，确定最佳发酵培养基 (L^{-1}) 是：甘油 60g/L、酵母膏 2.0g/L、 NH_4Cl 2.0g/L、 K_2HPO_4 1.3g/L、 KH_2PO_4 0.5g/L、Fe 液 1mL、微量元素 1mL。在最适发酵培养基条件和最适发酵条件下，菌株 *K.pneu4046* 发酵产生 1,3-PD 量为 24.38g/L。

2 本论文的创新点

关于发酵产物 1,3-PD 的分析测定，国内主要采用气相色谱分析法，极少数采用高效液相色谱分析方法；本文改进了高效液相色谱条件，采用 Waters 高效液相色谱分析系统对发酵结果进行分析，而此色谱条件之前无相关报道。

3 下一步工作设想

1. 进一步完善优异菌株的快速、高效筛选技术路线。
2. 进行菌株的高浓度底物—甘油抗性筛选实验。
3. 进行甘油批式流加发酵的研究，以便提高产物的浓度。
4. 研究甘油发酵 1,3-PD 的动力学，为其工业放大提供理论上的指导。
5. 进行降低发酵终期副产物生成及发酵产物下游分离的研究。
6. 进行高产突变株构建基因工程菌的构建工作的研究，为利用廉价碳源生产 1,3-PD 开辟新途径。

参考文献

1. 陈天寿. 1998. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 2-337.
2. 迟乃玉, 张庆芳, 王圆, 李晓艳, 李爱民, 谷瑛, 刘长江. 2003. *C.pasteurianum* 高产 1,3-丙二醇菌株的选育及发酵培养基的研究(I). 食品与发酵工业, 29(6): 10-12.
3. 迟乃玉, 任大明, 张庆芳, 袁玉莲, 唐乾, 刘长江. 2003. *C.pasteurianum* 高产 1,3-丙二醇菌株发酵条件的研究(II). 食品与发酵工业, 29(7): 14-16.
4. 陈宏文, 王蔚, 方柏山, 胡宗定. 2004. 克雷伯杆菌生产 1,3-丙二醇关键酶发酵条件研究. 高校化学工程学报, 18(5): 621-627.
5. 程可可, 凌宏志, 张丽莉, 孙燕, 刘德华. 2004. 葡萄糖作辅助碳源对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的影响. 过程工程学报, 4(6): 561-566.
6. 方文, 吴蕾, 葛新, 张瑛, 甘一如. 2002. 肺炎克雷伯氏菌培养工艺的研究, 19(1): 6-11.
7. 郝林. 2001. 食品微生物学实验技术. 中国农业出版社, 49-52.
8. 黄象安. 2000. 新型聚酯 PTT 纤维的应用与发展. 针织工业, (6): 65-67.
9. 金平, 张建刚, 佟明友, 刘树臣. 2004. 甘油发酵制取 1,3-丙二醇菌株筛选. 精细与专用化学品, 12(16): 13-15.
10. 姜兴茂. 1999. 1,3-丙二醇的合成. 上海化工, 6: 35-39.
11. 林稚兰, 黄秀梨. 2000. 现代微生物与实验技术. 北京: 科学出版社.
12. 刘海军, 王剑峰, 张代佳, 修志龙. 2001. 用克雷伯氏菌批式流加发酵法生产 1,3-丙二醇. 食品与发酵工业, 27(7): 4-7.
13. 刘银乾, 段启伟. 2002. 1, 3-丙二醇的制备方法. 合成纤维工业, 25(2): 42-45.
14. 罗抚英, 徐冉舟, 唐人成. 2002. 新型聚酯 PTT 纤维的染色. 国外丝绸, (5): 23-26.
15. 吕瑞芳. 2003. 工业微生物. 北京: 人民卫生出版社.
16. 岑沛霖, 蔡谨. 2000. 工业微生物. 北京: 化学工业出版社.
17. 瞿国华. 2000. PTT 的工业开发与 1,3-丙二醇的合成. 合成纤维工业, 23(4): 31-34.
18. 邵敬伟, 刘长江. 2001. 1, 3-丙二醇发酵生产的研究进展. 沈阳农业大学学报, 32(1), 57-60.
19. 邵敬伟, 刘长江, 迟乃玉等. 2002. 1, 3-丙二醇发酵条件的正交设计实验. 襄樊学院学报, 23(5): 45-49.
20. 施巧琴, 吴松刚. 2003. 工业微生物育种 (第二版). 北京: 科学出版社.
21. 萧兵, 钟俊维. 1985. 农业多因素试验设计与统计分析. 长沙: 湖南科学技术出版社, 102-120.
22. 徐冠仁. 1996. 植物诱变育种学. 北京: 中国农业出版社.
23. 王熙庭, 陈曼华. 2000. 1,3-丙二醇生产方法及用途. 煤化工, (4): 39-42.
24. 王剑峰, 修志龙等. 2001a. 克雷伯氏菌微氧发酵生产 1,3-丙二醇的研究. 现代化工, 21(5): 28-31.
25. 王剑峰, 修志龙, 范圣第. 2001b. 甘油转化生产 1,3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定. 工业微生物, 31(2): 33-35.

26. 王剑锋, 刘海军, 修志龙等. 2001c. 1,3-丙二醇间歇发酵培养基的优化. 食品与发酵工业, 27 (8): 5-8.
27. 王剑锋, 刘海军, 修志龙, 范圣第. 2001d. 生物转化生产 1, 3-丙二醇的研究进展. 化学通报, (10): 621-626.
28. 王剑锋, 李慧. 2002. 1, 3-丙二醇的工业应用和生产. 化工科技市场, (2): 12-14.
29. 吴斌, 何冰芳, 孙志浩, 欧阳平凯. 2004. 丁酸梭杆菌发酵甘油制备 1,3-丙二醇的研究. 工业微生物, 34(1): 21-25.
30. 修志龙. 1999. 1, 3-丙二醇微生物法生产和市场分析. 现代化工, 19(3) :33-35
31. 修志龙. 2000. 微生物发酵法生产 1, 3-丙二醇的研究进展. 微生物学通报, 27(4): 300-302.
32. 修志龙. 2001. 甘油连续生物歧化过程培养基和 pH 调控策略研究. 高校化学工程学报, 15(4): 397-402.
33. 俞大绂, 李季伦. 1985. 微生物学(第二版). 北京: 科学出版社.
34. 张从容. 2000. 新型 PTT 聚酯工业现状及进展. 精细石油化工, (5):49-52.
35. 张贵友. 2003. 普通遗传学实验指导. 北京: 清华大学出版社.
36. 张健, 赵红英, 刘宏娟, 向波涛, 刘德华. 2002. 以葡萄糖为辅助底物发酵生产 1,3-丙二醇的研究. 现代化工, 22 (6) : 32-35.
37. 赵斌, 何绍江. 2002. 微生物学实验. 北京: 科学出版社.
38. 赵红英, 程可可, 向波涛, 刘德华. 2002a. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇. 精细与专用化学品, 13: 21-23.
39. 赵红英, 张健, 刘宏娟, 向波涛, 刘德华. 2002b. 1,3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究. 现代化工, 22 (7) : 34-38.
40. 朱丙田, 刘德华, 任海玉. 1, 3-丙二醇发酵条件的探索. 化工冶金, 2000, 21 (8) : 420-422.
41. Abbad-Andaloussi S, Manginot-Dürr C, Amine J et al. 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. Appl. Environ Microbiol, 61 :4413-4417.
42. Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P et al. 1996. Properties of allyl alcohol mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. Appl. Environ Microbiol, 62(9): 3499-3501.
43. Abbad-Andaloussi S, Dürr C, Raval G et al. 1996. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. Microbiology, 142:1149-1158.
44. Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E, Petitdemange H. 1996. Glycerol Dehydratase Activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431. Lett. Appl. Microbiol, 22 :311-314.
45. Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P. 1998. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. J. Appl. Microbiol, 84:515-522.
46. A. P. Zeng. 1996. Pathway and Kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. Bioprocess Engineering, 14: 169-175.

47. Barbirato F, Astruc S, Soucaille P et al. 1997. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitation and regulations. *Microbiol*, 143:2423-2432.
48. Biebl H. 1991. Glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35:701-705.
49. Biebl H, Marten S, Hippe H et al. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36:592-597.
50. Biebl H, Menzel K, Zeng A P et al. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 289-297.
51. Biebl H. 2001. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 18-26.
52. Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. 1998. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol., Progress*. 14:116-125.
53. Colin T, Bories A, Lavigne C et al. 2001. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Current Microbiol*, 43: 238-243.
54. Colin T, Bories A, Moulin G. 2000. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diol during glycerol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 201-205.
55. Daniel R, Thomas A, Gottschalk G. 1998. Biochemistry of coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol. Rev*, 22:553-566.
56. Deckwer W D. 1995. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol. Review*, 16: 143-149.
57. Diaz-torres, Maria, Dunn-Coleman et al. Method for the recombinant production of 1,3-propanediol. US 6,136,576.
58. Forsberg C W. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl. Environ. Microbiol*, 53(4): 639-643.
59. Günzel B, Yonsel S, Deckwer W-D. 1991. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 36: 289-294.
60. Hassiba M, Marczak R. 2001. Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild type and mutant D[J]. *Journal of Applied Microbiology*. 90:1006-1014.
61. Himmi E H, Bories A, Barbirato F. 1999. Nutrient requirements for Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, 67:123-128.
62. Huang H, Gong C.S, Tsao G.T. 2002. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Applied Biochemical Biotechnology*. 98-100:687-698.

63. Lin E C C, Magasanik B. 1960. The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations. *J. Biological Chemistry*, 235(6): 1820-1823.
64. Malaoui H , Marczak R. 2000. Purification and characterization of the 1,3-propanediol dehydrogenase activities of *Clostridium butyricum* E5. *Enzyme Microb. Technol.*, 27: 399-405.
65. Malaoui H, Marczak R. 2001. Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild type and mutant D. *J. Appl. Microbiol.*, 90:1006-1014.
66. Menzel K, Zeng A P, Biebl H, Deckwer W D. 1996. Kinetic,dynamic,and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in continuous culture I. the phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. *Biotechnol. Bioeng.*, 52:549-560.
67. Menzel K, Zeng A P, Deckwer W D. 1997. High concentration and productivity of 1, 3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 28:82-86.
68. Menzel K, Zeng A P. et al. 1998. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture:IV. Enzymes and fluxes of pyruvate metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, 60(5): 617-626.
69. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B et al. 2000. High production of 1, 3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* , 77 : 191-208.
70. Petitdemange E, Manginot-Durr C, Abbad-Andaloussi S et al. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol f by new strains of *Clostridium butyricum*. *J. Indu. Microbiol.*, 15: 498-501.
71. Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles et al. 2003. Molecular characterization of 1, 3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(9):5010-5015
72. Reimann A, Biebl H. 1996. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnol. Lett.*, 18: 827-832.
73. Reimann A, Biebl H, Deckwer W D. 1998a. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 45: 47-50.
74. Reimann A, Biebl H, Deckwer W D. 1998b. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 359-363.
75. Reimann A, Abbad-Andaloussi S, Biebl H et al. 1998c. 1,3-propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 1125-1130.
76. Ruch F E, Lin E C C.1975. Independent constitutive expresstion of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* , 124: 348-352.
77. Saint-Amans S, Perlot P, Goma G et al. 1994. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*

- VIP 3266 in simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett.*, 16: 832-836.
78. Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J et al. 2001. Regulation of carbon and flow in *Clostridium butyricum* VIP 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J. Bacteriol* , 183: 1748-1754.
79. Solomon B O, Zeng A P, Biebl H, et al. 1994. Effects of substrate limitation on products distribution and H₂/CO₂ ratio in *Klebsiella pneumoniae* during anaerobic fermentation of glycerol. *J. Appl Microbiol. Biotechnol*, 42: 222-226.
80. Toraya T. 2000. Radical catclysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mole Life Sci.*, 57(1): 106-127.
81. Zeng A P, Biebl H , Schlieker et al. 1993. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Rugulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 770-779.
82. Zeng A P, Ross A, Biebl H et al. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 902-911.
83. Zeng A P. 1996. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14: 169-175.

附录

1. 磷酸缓冲溶液 (L^{-1})

A 液: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.21g/L

B 液: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 71.64g/L

将两种溶液以 97.5:152.5 (v/v) 的比例混合

2. 2%DES 溶液配制 取 DES 原液 0.4mL 于灭菌试管中, 加入无水乙醇 0.2~0.3mL 将其溶解, 再加入 pH7.0 的预还原磷酸缓冲液 19.3mL~19.4mL, 配成 2% (v/v) 的 DES 溶液, 于低温下保存。

3. 2%溴百里酚兰溶液配制 取 0.1g 溴百里酚兰加入 1.6mL 0.1mol/L NaOH, 最后定容至 50mL。

4. 甘油转化率的计算公式:

甘油转化率(%) = 1,3-丙二醇的物质的量 / 消耗的甘油物质的量 * 100

5. 1,3-丙二醇标准曲线的制作

用 1-1000 μ l 量程的微量移液枪分别取不同体积的色谱纯 1,3-PD 溶液, 配制质量浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的 1,3-PD 标准溶液, 并以 1,3-PD 质量浓度(%)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制 1,3-PD 标准曲线, 计算出质量浓度和峰面积的关系式。

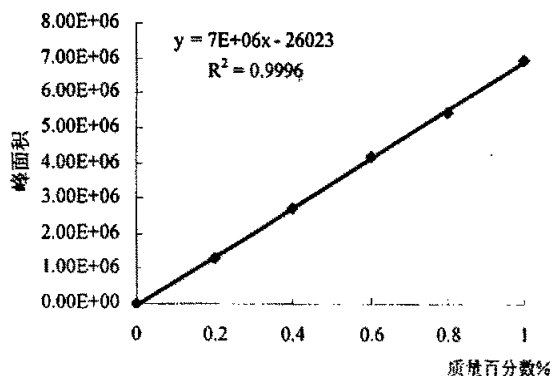


图 A-1 1,3-PD 标准曲线图

Figure A-1 Standard curve of 1,3-PD

6. 乙醇标准曲线的制作

用 1-1000 μ l 量程的微量移液枪分别取不同体积的色谱纯乙醇溶液, 配制质量浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的乙醇标准溶液, 并以乙醇质量浓度(%)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制乙醇标准曲线, 计算出质量浓度和峰面积的关系式。

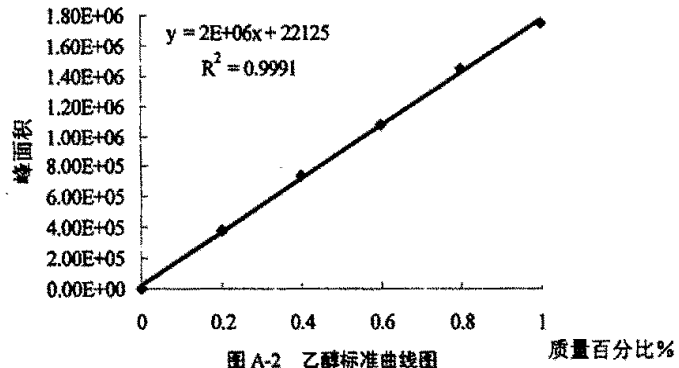


图 A-2 乙醇标准曲线图

Figure A-2 Standard curve of ethanol

致 谢

本文是在导师刘长江教授精心指导下完成的。春风化雨、润物无声，三年来，导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作精神，严于律己宽于待人的大家风范，深深地印刻在我的脑海里，并将成为我今后工作和学习的榜样与动力。几年来，从导师那里获得的不仅仅是专业知识，还有对人生、对工作、对生活的深思和领悟。在此，谨向我的导师表示深深的谢意！

在此，还要衷心的感谢沈阳农业大学分析测试中心周艳明教授三年来在我的学习生活过程中给予的关心、支持和帮助！

同时衷心的感谢沈阳农业大学食品学院的孟宪军教授、李淑霞书记、程玉来教授、岳喜庆副教授、纪淑娟教授、张春红副教授、吴朝霞副教授、魏宝东副教授、郑艳、刘玲等领导和老师在工作学习上给予的强力支持和无私的帮助。同时感谢王淑琴老师在实验过程中给予的大力协助。

衷心感谢与我朝夕相处的同门兄弟姐妹，李长彪博士、赵秀红博士、查恩辉、孙凌、高荣海、王传杰、孟宪文及姜玲玲、修娇、刘欣等学友给我的关爱，她们的热心帮助使我深刻地体验到同学之间那种无间的友谊，并非常珍惜一起走过的日子。

特别感谢我的父母三年来的支持与理解，关心和爱护，正是他们在我求学道路上的莫大支持和鼓励，伴我走过风风雨雨，使我顺利地完成学业，渡过这段难忘的求学生涯。

在此，再次向热心支持、帮助过我的老师、亲人、同学、朋友表示最衷心的感谢和最诚挚的谢意！因为你们，才成就了现在的我。

管艺飞

2006年6月

攻读学位期间发表的学术论文目录

1. 克雷伯氏杆菌产 1,3-丙二醇培养条件研究. 第一作者. 2005. 扬州大学学报(自然科学版), 8(5): 14-16.
2. 1,3-丙二醇氧化还原酶基因克隆及序列分析. 第二作者. 2006. 安徽农业科学.(已录用, 待发表)
3. 甘油脱水酶基因克隆及序列分析. 第二作者. 食品科学 (已录用, 待发表)