

固定化丁酸梭菌转化甘油生产 1,3-丙二醇的研究

张蓝蓝^{1,2}, 王世珍^{1,2}, 朱春杰^{1,2}, 方柏山^{1,2,3*}

(1.厦门大学化学化工学院, 2.厦门市合成生物技术重点实验室(厦门大学),

3.醇醚酯化工清洁生产国家工程实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

摘要: 通过比较棉纤维织物、聚乙烯醇缩甲醛柱体、活性炭颗粒在 35 ℃、厌氧条件下吸附丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)将甘油转化为 1,3-丙二醇的有效性, 选择活性炭颗粒作为固定化丁酸梭菌的较佳载体. 以活性炭颗粒作为吸附载体时, 初始甘油质量浓度从 20 g/L 提高至 252 g/L, 最终 1,3-丙二醇质量浓度从 9.5 g/L 增加至 38.3 g/L, 同时残余甘油质量浓度从 0 g/L 提高至 96.3 g/L, 1,3-丙二醇的时空产率从 0.7 g/(L·h) 提高至 2.2 g/(L·h), 摩尔得率从 0.65 mol/mol 降低至 0.58 mol/mol.

关键词: 甘油; 1,3-丙二醇; 填充床; 固定化细胞; 发酵

中图分类号: TQ 92

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2014)02-0000-00

1,3-丙二醇是一种广泛用于制备聚酯、聚醚和聚氨酯的重要单体原料^[1-4], 这类聚合物合成塑料具有生物可降解性等许多其他二元醇所不具有的优良性质, 因而 1,3-丙二醇在有机合成领域的应用正日益增加.

填充床固定化细胞生物反应器操作简单、易于扩大生产规模, 可实现连续化生产, 生产费用较低, 但难以清除细胞, 混合度较差^[5]. 膜式固定化细胞生物反应器催化效率很高, 易于放大及控制反应过程, 下游处理简便, 是目前连续化大生产中应用最多的一种生物反应器^[6]. 目前, 利用生物法发酵生产 1,3-丙二醇主要有分批发酵、补料发酵、连续发酵 3 种方式, 不同的发酵方式对最终产物的浓度及时空产率都有着较大的影响^[3,5,7-9]. Pflügl 等^[10] 利用 *Lactobacillus diolivorans* 进行补料分批发酵, 通过控制培养基中葡萄糖和甘油的摩尔比及添加维生素 B₁₂ 的方式, 1,3-丙二醇最高质量浓度可达 84.5 g/L. 赵亚楠等^[11] 利用 NaCS/PDMDAAC 微胶囊包埋克雷伯氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 进行连续发酵, 1,3-丙二醇最高质量浓度达到 13.6 g/L, 时空产率为 4.49 g/(L·

h), 摩尔得率为 0.43 mol/mol. 而 Casali 等^[12] 利用填充床反应器固定化成团泛生菌 (*Pantoea agglomerans*) 菌体进行连续发酵, 在水力停留时间为 2 h 时时空产率达到最高值 3.6 g/(L·h). 而利用棉纤维织物、聚乙烯醇缩甲醛 (PVF) 柱体、活性炭颗粒固定化丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 进行连续发酵生产 1,3-丙二醇的研究尚未报道, 故本文考虑采用不同的固定化载体及不同的连续发酵条件对其进行初步研究, 旨在提高菌株的发酵生产能力, 为今后大规模的工业化发酵应用打下基础.

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum* CGMCC 6317), 4 ℃ 保存于生长培养基.

1.1.2 培养基

1) 生长培养基 (RCM 培养基) (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母粉 3, 葡萄糖 5, NaCl 3, NaAc 3, 可溶性淀粉 1, 半胱氨酸盐酸盐 0.5; pH 7.5.

2) 种子培养基 (g/L): 甘油 20, K₂HPO₄·3H₂O 4.45, KH₂PO₄ 1.3, (NH₄)₂SO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.02, 酵母粉 1; 另加微量元素溶液 1 mL, Fe 溶液 1 mL.

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21076172); 福建省高校产学研合作科技重大项目 (2010H6023)

* 通信作者: fbs@xmu.edu.cn

3) 发酵培养基(g/L):甘油,视具体情况而定; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, KH_2PO_4 0.5, $(NH_4)_2SO_4$ 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, 酵母粉 1;另加微量元素溶液 1 mL, Fe 溶液 1 mL; pH 7.

4) 补料培养基(g/L):甘油及酵母粉视具体情况而定,其余同种子培养基.

5) 微量元素溶液(g/L): $ZnCl_2$ 0.07, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1, H_3BO_3 0.06, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.035; HCl(质量分数 37%,下同), 0.9 mL.

6) Fe 溶液(g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5; HCl(37%) 4 mL.

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件

1) 培养基制备:将配制好的培养基分装至血清瓶,通氮气除氧 30 min,使用胶塞和铝盖密封,高压灭菌(121 °C, 20 min);补料培养基灭菌后持续通入无菌氮气,以保持厌氧环境.

2) 种子培养:无菌注射器取 2 mL 菌液接种至内含 50 mL 种子培养基的血清瓶, 37 °C、200 r/min 摇床培养,培养 16 h;再以 10%(体积分数,下同)的接种量转接,培养条件同前,4 h 后接入发酵罐培养.

3) 发酵罐培养:以 10%的接种量转接入罐中发酵培养基, 150 r/min、35 °C、pH 7.0 条件下恒温培养一定时间.

4) 连续发酵培养:将新鲜发酵培养基用恒流泵以恒定流速(依具体实验而定)输入固定化反应器,反应器保持在 35 °C 水浴恒温条件下;流出液取样点为反应器出口处;反应器与发酵罐连成回流系统,采用蠕动泵控制回流系统内部循环流速为 2 mL/min;发酵罐中发酵培养基体积为 1 L;采用发酵罐控制整个系统 pH 为 7.0, 转速 150 r/min.

5) pH 调节:除特殊说明外, pH 调节均采用 4 mol/L 的 NaOH 溶液自动调节发酵液 pH 为 7.0.

1.2.2 载体处理方法

采用的吸附型载体包括棉纤维织物、聚乙烯醇缩甲醛柱体、活性炭颗粒.

棉纤维织物预处理:34 cm(宽)×30 cm(高)棉纤维织物(市售纯白色毛巾,厚 5 mm,孔隙率>95%,密度 0.25 g/cm³,比表面积>40 m²/m³)沸水浴 30 min, 60 °C 烘箱烘干 24 h.将经过处理的棉纤维织物铺放在稍大面积的不锈钢丝网上,两者共同以短边为轴垂直卷成圆筒状,形成织物层和钢丝网层交替分布的

圆柱体.将圆柱体置于夹套玻璃柱反应器(Φ 4 cm×38 cm)内,工作(填充)体积 355 mL.

PVF 柱体预处理:PVF 柱体为 Φ 4 cm×12.5 cm 圆柱体(密度 1.2 g/cm³,孔隙率约为 80%,比表面积约为 0.5 cm²/g,台湾长春石化公司).去离子水浸泡 24 h, 60 °C 烘箱烘干 24 h.夹套玻璃柱反应器(Φ 4 cm×38 cm)内部填充 PVF 柱体,工作(填充)体积 157 mL.

活性炭颗粒预处理:20~50 目活性炭颗粒(比表面积 500~1 000 m²/g,相对密度约 1.9~2.1,表观相对密度约 0.08~0.45,分析纯,国药集团化学试剂有限公司,冲洗粉尘,1 mol/L HCl 溶液浸泡 24 h,去离子水冲洗,20 g/L NaOH 溶液浸泡 24 h,去离子水再次冲洗;生理盐水(9 g/L NaCl)浸泡 24 h, 60 °C 烘箱烘干 24 h.称取定量材料,牛皮纸包裹于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 60 °C 烘箱烘干.使用时,称取定量材料(Φ 4 cm×25 cm)装填入玻璃反应柱,工作(填充)体积 295 mL.

1.2.3 细胞动态吸附

夹套玻璃柱反应器(Φ 4 cm×38 cm)35 °C 水浴恒温,通入氮气保持厌氧环境.发酵罐取样口由软管与玻璃柱反应器连接,初始菌液 OD 值控制在 2.5~3.0.夹套玻璃柱反应器内部填充任一载体材料,上端加盖密封.菌液由蠕动泵经软管循环至玻璃柱反应器内(见图 1),循环流速控制为 2 mL/min.在发酵温度下动态吸附 4~6 h(或者至进出口 OD₆₅₀ 值平衡).

1.2.4 发酵方法

菌体细胞动态吸附结束后,将新鲜补料培养基替换玻璃柱反应器及发酵罐内甘油耗尽的发酵液(见图 1).将补料培养基连续补加至玻璃柱反应器中,利用蠕动泵控制玻璃柱反应器进出口流速及发酵罐与玻璃柱反应器的内循环流速(2 mL/min),保持发酵过程中反应液体积恒定.操作过程均采用无菌氮气保持厌氧环境.

1.2.5 分析方法

发酵液摇匀,于 650 nm 处测定 OD 值,根据细胞质量浓度和 OD 的关系曲线,可推算游离细胞质量浓度.OD 值与细胞质量浓度的换算比例为 1 OD 为细胞质量浓度 0.48 g/L.

每次取发酵液 10 mL,离心后取上清液于 4 °C 保存,稀释,并用 20 nm 微孔滤膜过滤 3 次,采用高效液相色谱(HPLC)分析甘油和 1,3-丙二醇的质量浓度.

色谱条件:高效液相色谱 Aminex-HPX-87H

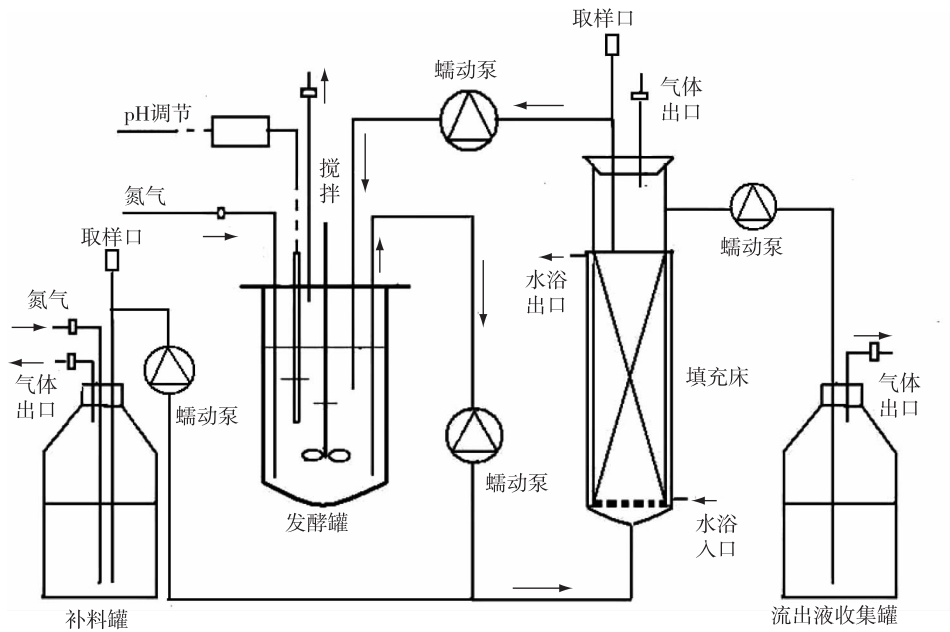


图 1 填充床生物反应器操作流程

Fig. 1 Schematic diagram of operation process for the fixed-bed bioreactor

色谱柱,流动相为 0.5 mmol/L 的硫酸超纯水水溶液,流速为 0.5 mL/min,柱温 30 ℃,示差折光检测器.

1,3-丙二醇摩尔得率=1,3-丙二醇生成量/甘油消耗量;1,3-丙二醇时空产率=1,3-丙二醇生成量/(发酵时间·工作体积).

2 结果与讨论

2.1 不同载体对固定化丁酸梭菌连续发酵过程的影响

反应器内的流体流型、传质状态和发酵液的停留时间均与反应器中的固定化载体类型有联系.本文选取棉纤维织物、PVF 柱体、活性炭颗粒这 3 种常见的吸附型载体作为研究对象,考察不同载体对丁酸梭菌的固定化效果和对固定化丁酸梭菌连续发酵过程的影响.将 4 种连续发酵条件下的结果列于表 1 和 2 中.

从表 1 和 2 的结果可知,与游离连续发酵相比,以棉纤维织物、活性炭颗粒和 PVF 柱体为固定化材料的固定连续发酵水平都得到显著提高,因为菌体固定化后可使更多的菌体保留在反应器内;相比于游离连续发酵,反应器内菌体得到提高,故有效提高了丁酸梭菌代谢甘油生产 1,3-丙二醇的水平.

在补料培养基中甘油质量浓度和发酵时间接近的条件下,以棉纤维织物和活性炭颗粒为固定化载体时,甘油几乎被完全消耗,残余甘油质量浓度接近为

零,最终 1,3-丙二醇的质量浓度分别为 17.1 和 13.4 g/L.以颗粒状活性炭为固定化载体时,1,3-丙二醇的摩尔得率较高,为 0.61 mol/mol;以棉纤维织物为固定化载体时,1,3-丙二醇的时空产率较高,为 2.4 g/(L·h).

表 1 不同载体下的填充床连续发酵稳定态结果

Tab.1 Steady-state results of continuous cultures in the fixed-bed bioreactor at different carriers g/L

载体	初始甘油	残余甘油	游离细胞	1,3-丙二醇	乙酸	丁酸
棉纤维织物	20	1	0.7	17.1	0	4.1
PVF	252	36.1	1.1	39.6	0.1	11.1
活性炭颗粒	36.5	0.1	1.5	13.4	0.1	3
对照样	36.5	30	0.1	2.8	0	0.1

注:对照样为无载体.

在 3 种固定化载体中,以 PVF 柱体为固定化载体时,1,3-丙二醇的时空产率最高,为 6.3 g/(L·h);但在其发酵过程中,泡沫现象严重,PVF 柱体具有一定的压缩性,对工业化生产不利.

以上结果表明,棉纤维织物和活性炭颗粒较 PVF 柱体为较优的固定化载体,另外,活性炭颗粒较棉纤维织物成本更低且容易装填,因此后续研究以活性炭颗粒为固定化载体.

表 2 不同载体下的填充床连续发酵最终结果

Tab.2 Total results of continuous cultures in the fixed-bed bioreactor at different carriers					
载体	甘油 总消耗量/g	1,3-丙二醇 总生成量/g	发酵时间/ h	1,3-丙二醇摩尔 得率/(mol·mol ⁻¹)	1,3-丙二醇 时空产率/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
棉纤维织物	25	11.8	14	0.57	2.4
PVF	164.4	77.1	71.5	0.57	6.3
活性炭颗粒	78.6	39.5	68.5	0.61	1.9
对照样	76.3	29.2	67	0.46	0.3

注:工作(填充)体积:棉纤维织物 355 mL,PVF170 mL,活性炭颗粒 295 mL;工作(液体)体积,对照样1 500 mL.

2.2 补料培养基中初始甘油质量浓度对固定化发酵的影响

固定化细胞反应器能适应的底物质量浓度和可重复利用性是衡量一个固定化细胞反应器成功与否的重要指标.选用活性炭颗粒作为固定化载体,考察补料培养基的甘油质量浓度对固定化丁酸梭菌发酵的影响.将经前处理的活性炭颗粒装填入反应器,操作过程同 1.2.2,操作条件见表 3(补料培养基中甘油质量浓度不同),相应的连续发酵结果分别见图 2(a)~(c).

环过程,菌体在此过程中吸附于玻璃柱反应器的载体上;操作条件Ⅲ为玻璃柱反应器中发酵液的置换过

表 3 固定化丁酸梭菌的发酵操作条件

Tab.3 Operational conditions for continuous fermentation of glycerol by <i>C.butyricum</i>					
序号	操作条件	质量浓度/(g·L ⁻¹)		水力停留时间/h	甘油流加速率/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
		甘油	酵母粉		
(a)	I	60	2		11
	II				7
	III	40	2		0.5
	IV	252	2	84	3
(b)	I	60	2		11
	II				4.5
	III	20	2		0.5
	IV	20	2	83.3	0.24
(c)	I	60	2		11
	II				5
	III	20	2		0.5
	IV	135	2	83.3	1.62

在表 3 中,操作条件 I 为发酵罐的菌体培养过程;操作条件 II 为发酵罐和玻璃柱反应器之间的内循

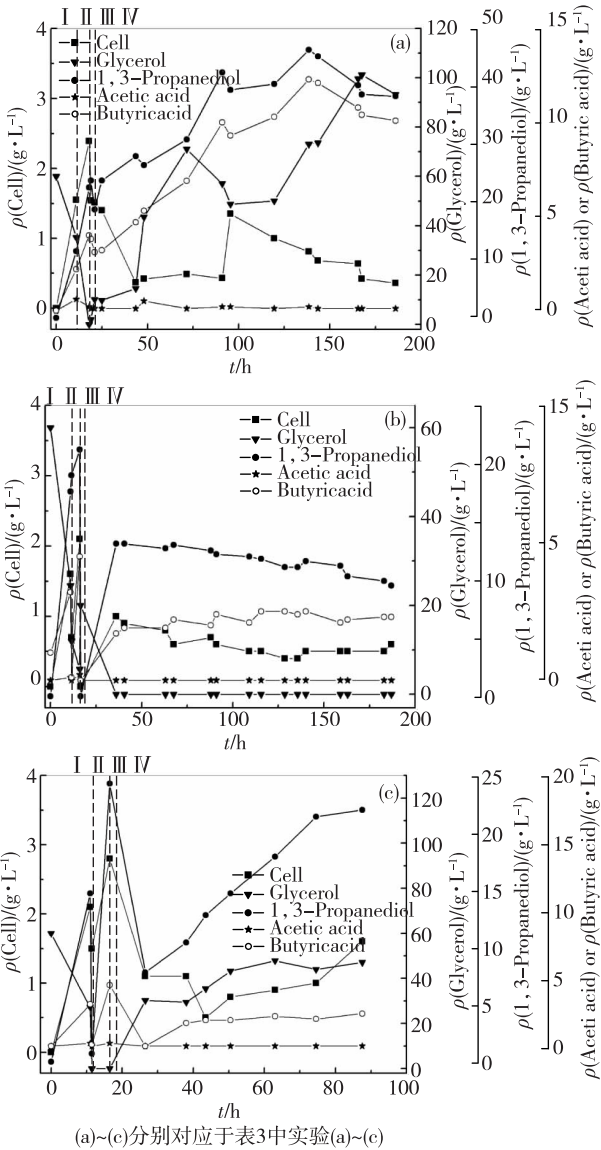


图 2 动态吸附、置换及连续发酵曲线
Fig.2 The curves of cell adsorption to carbon granules, replacement of medium,continuous fermentation

程,用新鲜补料培养基替换甘油耗尽的发酵液;操作条件Ⅳ为玻璃柱反应器中补料流加的连续发酵过程.

由图 2(a)可以看出,发酵液中残余甘油质量浓度较高,可能原因是发酵液中产物和副产物的抑制作用,使菌体活性下降.

由于补料培养基中甘油质量浓度较高,图 2(a)中的发酵结束时甘油残留量较高,因此,将补料培养基中的甘油质量浓度降至 20 g/L,其他操作条件见表 3(b).

由图 2(b)可见,连续发酵过程中情况较为稳定,游离细胞质量浓度、甘油质量浓度、1,3-丙二醇质量浓度略有下降,丁酸质量浓度及乙酸质量浓度变化均较小,在连续发酵开始时甘油质量浓度为 20 g/L,固定化丁酸梭菌可将甘油彻底转化为 1,3-丙二醇.

由于补料培养基中甘油质量浓度较低,图 2(b)中的发酵结束时,虽然底物完全消耗,但最终 1,3-丙二醇较低,因此,将补料培养基中的甘油质量浓度折中调整为 135 g/L,其他操作条件见表 3(c).

综合以上(补料培养基中初始甘油质量浓度、最终甘油质量浓度、最终 1,3-丙二醇质量浓度、1,3-丙二醇摩尔得率、1,3-丙二醇时空产率等)结果,得出表 4.

由表 4 中的结果可以看出,补料培养基中甘油质量浓度越低,残余甘油质量浓度越低.当甘油质量浓度为 20 g/L 时,甘油基本完全消耗;为 252 g/L 时,最终残余甘油质量浓度 96.3 g/L,约为 135 g/L 时的 2 倍.

当初始甘油质量浓度为 20 g/L 时,1,3-丙二醇的摩尔得率最高,但 1,3-丙二醇的时空产率最低,为 135 g/L 时的 54%,为 252 g/L 时的 32%.同时,当甘油质量浓度为 20 g/L 时,最终 1,3-丙二醇质量浓度最低,为 135 g/L 时的 43%,为 252 g/L 时的 25%.

以上结果表明,补料培养基的甘油质量浓度对固定化连续发酵的有较大影响,甘油质量浓度越高,1,3-丙二醇质量浓度随之升高,1,3-丙二醇的时空产率也随之升高,但残余甘油质量浓度也越高;对 1,3-丙二醇的摩尔得率影响不大,但有降低趋势.

3 结 论

本文采用活性炭颗粒作为丁酸梭菌固定化载体发酵甘油生产 1,3-丙二醇,同条件下,1,3-丙二醇连续发酵平衡质量浓度 1.9 g/L 远高于无载体时的 0.3 g/L,说明该方法可有效稳定细胞活性;残余状态甘油质量浓度 0.1 g/L 远低于无载体时的 30 g/L,1,3-丙二醇质量浓度 13.4 g/L 远高于无载体时的 2.8 g/L,说明该方法可提高细胞对底物的利用率及对产物的耐受性;最后,采用固定化方法可降低产物后期处理工序难度.与赵亚楠等^[1]利用 NaCS/PDMDAAC 微胶囊包埋克雷伯氏肺炎杆菌进行补料分批发酵相比,我们采用的固定化载体成本低廉,便于操作.补料培养基的甘油质量浓度对固定化连续发酵有较大影响,甘油质量浓度越高,残余甘油质量浓度就越高,1,3-丙二醇质量浓度随之升高,1,3-丙二醇时空产率也随之升高,但对 1,3-丙二醇摩尔得率影响不大.综上,我们将更广泛地研究多类适用于工业化的固定化载体,对反应器、培养基、反应条件等多方面进行优化综合,最终提高工业化生产 1,3-丙二醇的转化率和时空产率.

参考文献:

[1] 吴从意,陈静.1,3-丙二醇制备研究进展[J].分子催化, 2012,3:38-40.

[2] Metsoviti M,Zeng A P,Koutinas A A,et al.Enhanced 1, 3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses [J]. Journal of Biotechnology,2013,163(4):408-418.

[3] Kaur G,Srivastava A K,Chand S.Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol[J].Biochemical Engineering Journal,2012,64:106-118.

[4] Kubiak P,Leja K,Myszka K,et al.Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-

表 4 不同初始甘油质量浓度下的填充床连续发酵最终结果

Tab.4 Total results of continuous cultures in the fixed-bed bioreactor at different initial glycerol concentrations

质量浓度/(g·L ⁻¹)				甘油 总消耗量/ g	1,3-丙二醇 总生成量/ g	1,3-丙二醇 摩尔得率/ (mol·mol ⁻¹)	1,3-丙二醇 时空产率/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
初始甘油	残余甘油	1,3-丙二醇	游离细胞				
20	0	9.5	0.5	58	31	0.65	0.7
135	47.1	22	1	61	28	0.55	1.3
252	96.3	38.3	0.6	227	109	0.58	2.2

注:工作(填充)体积,295 mL.

- propanediol from glycerol [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(9): 1 308-1 319.
- [5] Chang H N. 2.40-Multistage continuous high cell density culture[M] // Comprehensive Biotechnology. 2nd ed. [s. l.]: Pergamon, 2011: 537-577.
- [6] Sotenko M V, Rebros M, Sans V S, et al. Tandem transformation of glycerol to esters[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162(4): 390-397.
- [7] Metsoviti M, Paraskevaidi K, Koutinas A, et al. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 1 872-1 882.
- [8] Clomburg J M, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(1): 20-28.
- [9] Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, et al. Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1, 3-propanediol fermentation [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10 625-10 632.
- [10] Pflügl S, Marx H, Mattanovich D, et al. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans* [J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 133-140.
- [11] Zhao Yanan, Chen Guo, Yao Shanqing. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(2): 93-99.
- [12] Casali S, Gungormusler M, Bertin L, et al. Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol(1,3-PDO) from crude glycerol[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 64: 84-90.

Microbial Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by Immobilized *Clostridium butyricum*

ZHANG Lan-lan^{1,2}, WANG Shi-zhen^{1,2}, ZHU Chun-jie^{1,2}, FANG Bai-shan^{1,2,3*}

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, 2.Key Laboratory of Synthetic biotechnology, Xiamen University, 3.National Engineering Laboratory for Green Chemical Productions of Alcohols-Ethers-Esters, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Clostridium butyricum* was immobilized on the cotton fiber, polyvinyl alcohol column and activated carbon granule to produce 1,3-propanediol (PDO) from glycerol. Fermentation in continuous culture was carried out in a fixed-bed bioreactor. Results showed that the activated carbon granule has desirable properties, such as biomass enrichment on the granule and operation convenience for continuous culture. When glycerol continuous loading rate raised from 0.24 g/(L·h) to 3 g/(L·h), the productivity of 1,3-propanediol raised from 0.7 g/(L·h) to 2.2 g/(L·h), the residual concentration of 1,3-propanediol raised from 9.5 g/L to 38.3 g/L, the yield of 1,3-propanediol reduced from 0.65 mol/mol to 0.58 mol/mol.

Key words: glycerol; 1,3-propanediol; packed-bed; immobilized cell; fermentation