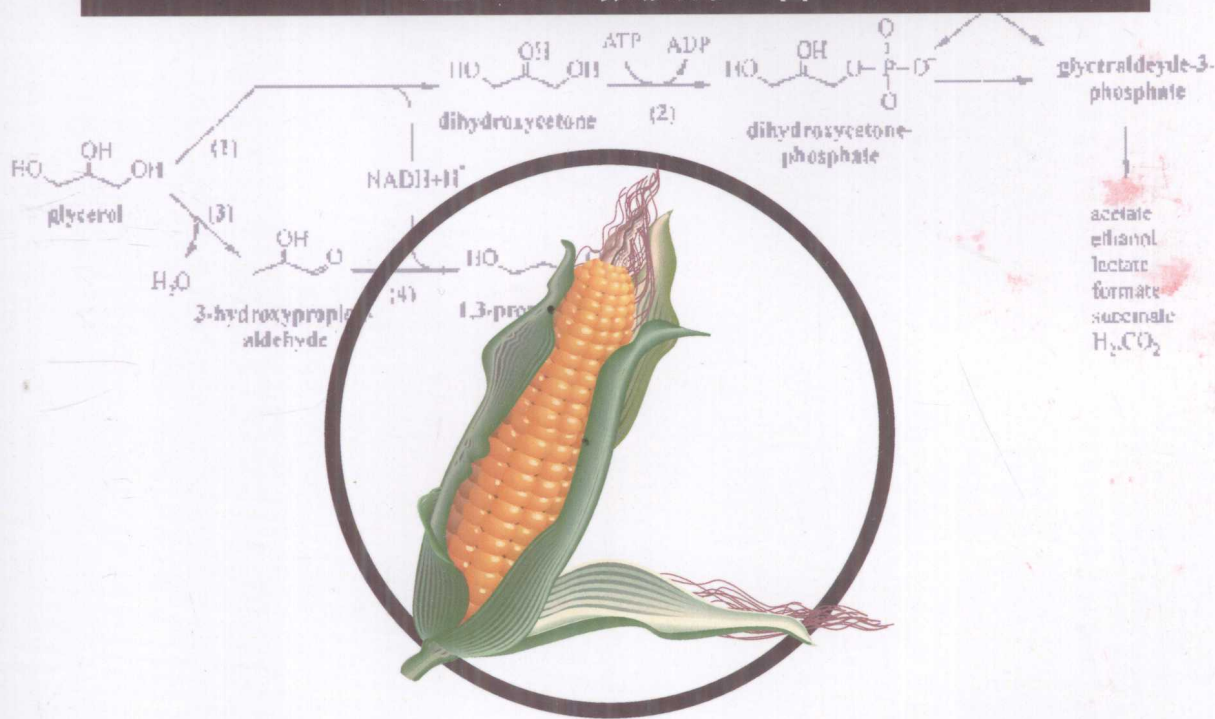


1,3-PD发酵 及 *dhaT* 基因的研究

glucononogenesis

迟乃玉 张庆芳 著



辽宁科学技术出版社
LIAONING SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

1,3-PD 发酵及 *dhaT* 基因的研究

迟乃玉 张庆芳 著

辽宁科学技术出版社

沈阳

图书在版编目(CIP)数据

1,3-PD 发酵及 *dhaT* 基因的研究 / 迟乃玉, 张庆芳
著. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010.4

ISBN 978-7-5381-6445-9

I. ①1… II. ①迟…②张… III. ①发酵工程—文集
②基因—遗传工程—文集 IV. ①TQ92-53②Q78-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 072723 号

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路 29 号 邮编: 110003)

印刷者: 沈阳天择彩色广告印刷有限公司

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 7.25

字 数: 170 千字

出版时间: 2010 年 4 月第 1 版

印刷时间: 2010 年 4 月第 1 次印刷

责任编辑: 郭敬斌

封面设计: 辛晓习

版式设计: 袁 舒

责任校对: 辛 静

书 号: ISBN 978-7-5381-6445-9

定 价: 22.00 元

联系电话: 024-23280336

邮购电话: 024-23284502

<http://www.lnkj.com.cn>

本书网址: www.lnkj.cn/uri.sh/6445

摘要

本书选育出两株用于玉米连续发酵生产 1,3-丙二醇高产菌株——玉米甘油发酵高产菌株 CJ₂₀ 和 1,3-丙二醇 (1,3-PD) 厌氧发酵高产菌株 CpN-86, 确定了 CJ₂₀ 和 CpN-86 菌株的最适发酵条件; 在最适发酵条件下 CJ₂₀ 菌株甘油产量为 88.30 g/L, 生产率为 29.43g/(L·d), 糖的转化率为 48%; 在最适发酵条件下, 5L 发酵罐中 CpN-86 菌株 1,3-PD 产量为 49.07g/L, 生产率为 29.38g/(L·d); CJ₂₀ 和 CpN-86 连续发酵 200g/L 玉米淀粉的糖化液, 1,3-PD 产量达 57.58g/L。

在上述实验基础上, 采用 PCR 法克隆了编码 CpN-86 菌株 1,3-丙二醇氧化还原酶基因 (*dhaT* 基因); 完成了 *dhaT* 基因测序、表达载体构建并在大肠埃希菌中表达; 分离和纯化了 *dhaT* 基因表达的重组蛋白; Western Blotting 证实 *dhaT* 基因表达的重组蛋白和 CpN-86 菌株天然蛋白有相同的抗原显色反应, 实验结果: (1) PCR 法克隆的 *dhaT* 基因和 *Klebsiella pneumoniae* 菌株 *dhaT* 基因同源性的 82.9%; (2) *dhaT* 基因表达蛋白的酶活力为 18U/mg; (3) *dhaT* 基因表达的蛋白分子量为 43kD; (4) *dhaT* 基因表达的蛋白和 CpN-86 菌株天然蛋白有相同的抗原显色反应, 以上实验结果可以得出同一个结论, 即编码 CpN-86 菌株的 1,3-丙二醇氧化还原酶基因在大肠埃希菌 (*E.coli* JM109) 中得到表达。

前 言

我国是世界第二大玉米生产国,年总产量稳定在 1.3 亿吨以上,约占全球玉米总产量的 20%左右,但用于深加工的仅占 7.9%,只局限初级转化。而美国深加工的玉米占总产量 18%左右,主要侧重于新产品的开发。我国由于玉米深加工技术落后,造成玉米虽然增产但不增收的局面,严重挫伤了农民生产的积极性,阻碍了农业的可持续发展。因此开拓玉米深加工市场,以提高玉米的利用率和经济附加值是当务之急。利用生物技术将玉米转化为无污染、生物可降解、可反复回收利用的新型纤维,是世界玉米深加工研究的热点,该项技术可使玉米的经济附加值提高几十倍甚至上百倍。

利用生物技术手段将玉米转化为纤维主要包括以下转化过程:玉米→1,3-丙二醇(1,3-PD)→新型聚酯纤维。其中玉米转化为 1,3-PD 是玉米转化为纤维研究的重中之重。我国在玉米转化为甘油上有着得天独厚的优势,在该领域已研究几十年,但 1,3-PD 的研究尚属空白。

利用 1,3-PD 生产的新型聚酯纤维 (PTT) 具有以下优点: (1) 环保性——不产生任何环境污染; (2) 降解性——很容易降解为原始单体,可以不断回收利用; (3) 耐热性和可缩性——高温下不变性,纤维丝可以伸长至少 15%,而且可复原,不出现“变形”现象; (4) 抗污性和染色性——对水汽稳定,并能抗大多数食品着色剂。而且用传统聚酯同样染色方法染色时,它又易于着色; (5) 应用广泛性——广泛应用于纺织、食品、化工、医药等行业。

1,3-PD 生产总体可分为:化学合成法和微生物发酵法两大类,其中化学合成法主要有 3 条路线: (1) 丙烯醛路线; (2) 环氧乙烷路线; (3) 环氧丙烷路线。但由于化学合成法 4 000 美元/吨的高成本及工艺条件苛刻、设备投资大、并产生严重环境污染等问题,限制了 1,3-PD 在多聚纤维等领域应用的开发。为降低生产成本,避免环境污染等问题,微生物发酵法生产 1,3-PD 的研究成为一个热点。微生物发酵法生产 1,3-PD 又可分为二步法和一步法,国外微生物发酵法生产 1,3-PD 的研究始于 20 世纪 90 年代初期,此期间主要研究二步法中甘油转化为 1,3-PD 菌株选育, *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneu*) 和 *Clostridium butyricum* (*C.but*) 是研究最多的菌株,在分批培养中得到 1,3-PD 的最大浓度是 50~60g/L,在常规的连续培养中, *C.but* 只能获得 *K.pneu* 菌株 1,3-PD 最大产量 (约为 48.75g/L) 的一半,但由于前者是病原菌而逐渐被淘汰,鉴于 *C.but* 菌株的安全性,在国外它是最具有工业使用潜力的菌株。20 世纪 90 年代中期以后,主要侧重于研究 1,3-PD 产生机制、用基因工程方法构建一步法生产 1,3-PD 高产工程菌,目前处于构建阶段,我国

玉米转化为 1,3-PD 的研究还未见报道。

目前,国际上化学合成法 1,3-PD 年总产量为 9 万吨,发酵法生产 1,3-PD 尚属空白,如果 1,3-PD 生产的纤维能占纺织市场 10% 的份额,每年将需要 60 万吨,如果再考虑 1,3-PD 作为制药原料、有机溶剂、抗冻剂、保护剂等市场份额,1,3-PD 的市场需求将超过百万吨。

为了使玉米转化为 1,3-PD 及聚酯纤维 (PTT) 的工业化生产在我国早日实现,同时填补国内该领域空白,创造玉米显著经济效益、环境效益和社会效益。本论文拟完成二步法转化玉米为 1,3-PD 研究,重点完成一步法转化玉米为 1,3-PD 工程菌构建的第一阶段工作,具体内容如下:

玉米

↓ (1) 高产菌株选育及其最适发酵条件的建立

甘油

↓ (2) 高产菌株选育及其最适发酵条件的建立

1,3-PD

↓ (3) *dhaT* 基因的克隆、测序

dhaT 基因

↓ (4) *dhaT* 基因的表达

dhaT 蛋白

↓ (5) Western blotting

编码 *CpN*-86 菌株 *dhaT* 基因在大肠埃希菌中得到了表达

目 录

第一章 绪论	001
第一节 玉米深加工现状及发展趋势	001
1.1 玉米深加工综合利用现状	001
1.2 玉米深加工综合利用的主要内容	002
1.3 我国玉米深加工利用现状、存在的问题及对策	003
第二节 玉米发酵生产甘油研究现状及存在问题	004
2.1 甘油生产的方法	004
2.2 甘油发酵的历史	005
2.3 国外甘油发酵的研究现状	006
2.4 国内甘油发酵的研究现状	007
2.5 甘油供求情况	007
2.6 发酵法生产甘油经济效益分析	008
2.7 玉米发酵甘油存在的问题及对策	008
第三节 1,3-丙二醇生产及开发应用的现状及发展趋势	009
3.1 1,3-PD 的理化性能与质量标准	009
3.2 1,3-PD 的生产方法	009
第二章 玉米连续发酵生产 1,3-丙二醇菌株选育 及其最适发酵条件的建立	016
第一节 前言	016
第二节 玉米发酵生产甘油高产菌株的选育及其最适发酵条件的建立	017
2.1 材料与方法	018
2.2 结果与分析	019
2.3 结论	035
2.4 讨论	035
第三节 1,3-丙二醇高产菌株选育及其最适发酵条件的建立	037
3.1 材料与方法	037
3.2 结果与分析	038
3.3 结论	053
3.4 讨论	054

第三章 编码 1,3- 丙二醇氧化还原酶基因的克隆	059
第一节 前言	059
第二节 材料与方法	060
2.1 材料	060
2.2 方法	061
第三节 结果与分析	063
3.1 <i>CpN</i> -86 菌株基因组 DNA 的提取	063
3.2 PCR 法克隆 <i>dhaT</i> 基因	064
第四节 讨论	069
4.1 PCR 法克隆 <i>dhaT</i> 基因	069
4.2 <i>CpN</i> -86 菌株 <i>dhaT</i> 基因分析	070
第五节 结论	070
第四章 编码 1,3- 丙二醇氧化还原酶基因的表达 及重组蛋白的分离与纯化	071
第一节 前言	071
第二节 <i>dhaT</i> 基因表达载体构建	071
2.1 材料与方法	071
2.2 结果与分析	073
2.3 讨论	075
2.4 结论	075
第三节 <i>dhaT</i> 基因表达及 <i>dhaT</i> 蛋白的分离与纯化	077
3.1 材料与方法	077
3.2 结果与分析	078
3.3 结论	079
第五章 编码 1,3- 丙二醇氧化还原酶基因表达蛋白的免疫学鉴定	080
第一节 前言	080
第二节 材料与方法	080
2.1 材料	080
2.2 方法	080
第三节 结果与分析	082
第四节 结论	083

第六章 总讨论	084
第一节 总设想的实施	084
1.1 玉米连续发酵生产 1,3- 丙二醇菌株选育及其最适发酵条件的建立	084
1.2 编码 1,3- 丙二醇氧化还原酶基因的克隆、测序、表达	084
第二节 后续问题	085
2.1 编码甘油脱水酶基因的克隆与表达	085
2.2 玉米直接转化为 1,3-PD 重组微生物构建	086
2.3 玉米糖直接发酵生产 1,3-PD 机制的探讨	086
2.4 1,3-PD 的分离与纯化	086
第三节 前景展望	087
附录 基础分子生物学方法	089
参考文献	098

第一章 绪 论

第一节 玉米深加工现状及发展趋势

近年来,我国玉米年总产量稳定在 1.3 亿吨以上,约占全球玉米总产量的 20%,是世界上第二大玉米生产国,用于深加工的只占 7.9%。由于玉米深加工技术落后,深加工产品品种单一,出现了玉米相对过剩和经济附加值低的现象,造成玉米增产不增收的局面。逐年增长的玉米产量要求我们利用生物技术手段开发玉米深加工技术,以提高玉米的利用率和经济附加值;逐年严峻的环境问题也要求我们从玉米中寻找新的原料,如利用生物技术将玉米转化为无污染、生物可降解、可反复回收利用的新型聚酯纤维等非污染性产品,可使玉米的经济附加值提高几十倍甚至上百倍。因此,开发玉米深加工及综合利用技术的研究是当务之急。

1.1 玉米深加工综合利用现状

玉米深加工是指从玉米中提取淀粉、玉米皮、胚芽、蛋白质等成分后,再对它们进行加工。世界上玉米深加工最发达的国家是美国,自 1980 年起,用于深加工的玉米以每年 6.1% 的速度递增,目前用于深加工的玉米达 4 191 万吨,占玉米总产量的 17.75%。美国玉米淀粉工业生产的淀粉有 45.7% 用于甜味剂生产, 33.2% 用于酒精生产, 13.6% 用于变性淀粉及糊精生产, 7.5% 作为其他工业用途。在甜味剂生产中,玉米高果糖浆已占全美糖料市场的 53%,年产高果糖浆 1 308.1 万吨。美国的饮料工业用糖已经全部使用玉米高果糖,例如可口可乐和百事可乐两大饮料集团已经完全以果糖取代了蔗糖用于饮料的生产。除甜味剂和酒精工业外,变性淀粉也是玉米淀粉深加工的一个重要出路,美国年产变性淀粉 200 多万吨,主要应用于造纸、纺织、食品、医药、卫生保健等行业。据统计,美国以玉米为原料加工生产的食品已达 1 160 多种,占每天商场陈列食品的 10%。欧共体国家的玉米深加工也很发达,在每年生产的淀粉中,有 55% 用于甜味剂生产, 16% 用于生产变性淀粉,其余 29% 用于发酵等其他工业。

我国玉米深加工过程中的综合利用起步较晚,与发达国家相比还有很大的差距。20 世纪 80 年代初期淀粉总产量不足 30 万吨,到 1996 年玉米淀粉的年产量为 260 万吨,以玉米淀粉为原料的再次加工生产的淀粉糖为 40 万~50 万吨,其中果葡糖浆 10 万吨,淀粉甜味剂仅占食用糖总量的 5% 左右,变性淀粉年产量仅 10 万吨。以玉米为原料的酒精到 1994 年占酒精行业的 40%;味精行业是玉米淀粉的最大用户,1995 年耗纯玉米淀粉 130 万吨。在我国玉米虽然直接作为主食的用量越来越少,但是作为一种热门保健食品,一些

粗粮细做的玉米食品却深受城市居民的欢迎,如传统的玉米面发糕、玉米膨化食品、玉米糝、风味玉米粥、玉米片等也有一定数量的开发。目前,山东省百老汇食品公司已经开发出 10 多种玉米脆饼食品投放市场,年生产能力 3 000 吨。

从淀粉生产企业来看,全国有 266 家,其中玉米淀粉厂 206 家,万吨以上玉米淀粉企业有 48 家,但只有少数几家生产规模相对较大的玉米深加工企业,如吉林黄龙公司,年加工玉米 60 万吨,生产淀粉 42 万吨、玉米油 2.2 万吨、颗粒饲料 12 万吨、蛋白粉 3 万吨,玉米原料利用率为 97%。但从总体上看,绝大多数玉米淀粉生产企业生产规模小,生产淀粉过程中的副产品回收率低,大多数玉米只能以初加工产品形式进入市场,降低了经济效益。

1.2 玉米深加工综合利用的主要内容

从资源、经济和环境等方面考虑,未来对玉米的深加工及综合利用主要是朝着工业化、非污染及高经济附加值的方向发展,以求获得最高的经济效益、社会效益和生态效益。目前玉米深加工及综合利用主要包括以下几方面内容:

1.2.1 以玉米淀粉为原料的深加工

1.2.1.1 燃料酒精:以玉米淀粉为原料生产燃料酒精势在必行。原因如下:①玉米酒精燃料价格低廉,同时不会造成环境污染;②玉米单产高,作为一种再生资源,将是一种取之不尽,用之不竭的原料;③以玉米为原料生产燃料酒精后的酒糟液中可溶性营养高,灰分低,可制成有价值的饲料,使玉米综合利用率提高。目前国家已经在山东、河南、吉林等省投资几亿元建设玉米燃料酒精生产基地。

1.2.1.2 发酵产品:通过微生物发酵方法,生产增值幅度较高的玉米深加工产品。目前主要是以玉米淀粉制取玉米糖浆,再经微生物发酵转化为乳酸、柠檬酸等有机酸、多糖、抗生素等产品。沈阳农业大学玉米 L-乳酸发酵的研究,取得了突破性进展,填补了国内空白,达到世界领先水平。在该项研究中选育出一株耐高温(46℃)乳酸菌株 HT。该菌株玉米乳酸发酵 4d 达到终点,还原糖浓度小于 0.1%,总乳酸为 45.28g/L, L-乳酸含量为 40.19g/L, L-乳酸旋光纯度为 85.57%,在此条件下糖转化率为 92.6%。

1.2.1.3 变性淀粉:由于玉米原淀粉性质的局限,它不适于各种应用的要求,而变性淀粉可以广泛地应用到造纸、食品、纺织、医药、卫生、保健等行业。因此,变性淀粉是国内科研院所研究的一个热点。

1.2.1.4 可降解塑料:随着白色污染的日益严重,为生物、光照或氧化机制得以降解的塑料必然诞生。目前,这种产品是在高聚化合物塑料(如聚乙烯)中加入适量的玉米淀粉,以提高可降解性。塑料中含玉米淀粉的比例已从 6%提高到 90%,目标是达到 100%,以彻底解决聚乙烯类物质对环境的污染。这种产品可以广泛应用于——农用地膜、各种包装袋、一次性使用容器以及包装用泡沫填充物等。

1.2.2 玉米皮的深加工

膳食纤维是不被人体消化吸收的多糖类化合物和木质素的统称。它可作为一种功能性食品基料,是继碳水化合物等 6 种营养素之外的第 7 种营养素。

玉米皮又称麸质,是玉米加工过程中产生的副产品,传统上作为饲料,经济价值较

低。玉米纤维中含有 35%~40%的半纤维素, 20%~25%的淀粉, 10%~20%的蛋白质, 2%~4%的油脂。玉米纤维可以通过生物技术处理, 使其成为膳食纤维, 并将其用于膨化食品、点心、汉堡包、面包、饼干、面条、乳制品、肉制品等行业, 具有较高的开发利用价值。

1.2.3 玉米蛋白粉的深加工利用

玉米蛋白的不溶性, 限制了它在食品中的直接应用, 利用生物技术, 改变玉米蛋白的溶解性, 调节其营养平衡, 可拓展它的应用范围。

1.2.3.1 玉米蛋白粉制取活性肽

活性肽是指那些具有消除自由基, 降低血压和提高机体免疫力等特殊生理功能的肽, 属于功能性肽的有: 谷胱甘肽、降血压肽、促进钙吸收肽和易消化吸收肽四种。湿法玉米淀粉生产中获得的黄浆粉统称玉米蛋白粉, 其中含有 60%的蛋白质, 主要为醇溶蛋白(68%), 以此为原料通过生物方法可以制取活性肽。

1.2.3.2 玉米蛋白粉制取食品

玉米蛋白粉的蛋白质含量高于普通奶粉, 可以用玉米蛋白粉代替奶粉, 加工面包, 具有改善面包色泽、柔软性和降低原料成本等优点。玉米醇溶蛋白具有优良的被覆性、薄膜性、凝胶性、抗氧化等功能特性, 经脱臭脱色处理, 是食品行业理想的材料。

1.2.4 玉米胚的深加工利用

玉米胚是玉米深加工过程中一个主要的副产品, 通常情况下是从玉米胚中提取玉米油, 取油后的胚饼作为饲料而消耗掉。但研究表明, 玉米胚饼也是一种高蛋白的食品强化剂, 含 20%以上的蛋白质, 这种蛋白质营养价值丰富, 各种必需氨基酸齐全, 尤其赖氨酸高达 5.9%。玉米胚饼蛋白质的价值与鸡蛋蛋白质相似。可以通过适当的技术进行玉米胚饼蛋白质改良, 应用到食品行业。

1.3 我国玉米深加工利用现状、存在的问题及对策

玉米全身是宝, 玉米通过深加工及综合利用, 不仅是发展食品工业和其他工业的需要, 而且也是进一步发展农业的需要; 玉米通过深加工及综合利用, 不仅使资源得到合理利用, 而且也可减少环境污染和改善生态环境, 是实现种、养、加良性循环及三个效益统一, 促进农业产业化有效途径。

我国玉米产量大, 进行玉米深加工和综合利用有得天独厚的优势。目前, 我国玉米深加工和综合利用的技术落后, 这样不仅资源没有得到合理利用, 而且经济效益低下, 甚至有些企业根本谈不上效益。如一些中小型淀粉厂, 在生产玉米淀粉过程中, 产生的淀粉渣等副产品, 绝大部分作为粗饲料处理掉了, 或者积压在工厂里, 含原料的 20%浸泡水也被当做废水一起排放掉了, 这样的加工不但浪费了资源, 也污染了环境, 如能将玉米通过微生物工程、酶工程、生化工程、基因工程等生物技术手段, 转化为高层次的食品或工业原料, 就可以显著地提高玉米的经济价值, 减少浪费和环境污染, 从而创造更高的经济效益和社会效益。玉米一次加工可增值 1~2 倍, 二次加工可增值 5~10 倍, 三次加工可增值 10~100 倍, 可见玉米深加工和综合利用的经济效益是相当可观的。因此, 开发玉米深加工及综合利用技术的研究是当务之急。

第二节 玉米发酵生产甘油研究现状及存在问题

2.1 甘油生产的方法

甘油学名丙三醇，是一种含有 3 个羟基的多元醇，为一种无色透明、无毒无臭、黏稠味甜的液体。因为甘油具有吸湿性强、黏度高、冰点低等特点，故广泛应用于国防、医药、油漆、化妆品、食品、造纸、纺织、印染等十几个行业的 1 700 多种产品中。据不完全统计，我国目前甘油的消费构成是：涂料工业 35.7%，牙膏工业 32.6%，医药工业 5.9%，烟草工业 6.0%，化妆品 4.8%，聚醚生产 4.8%，其他 10.2%。

根据甘油生产途径不同，可以将甘油生产方法分为：油脂提取法、化学合成法和发酵法 3 种。

2.1.1 油脂提取法

从天然油脂中提取甘油，它包括油脂皂化法和油脂水解法。油脂皂化法是指油脂与烧碱皂化生成脂肪酸钠（即肥皂）和甘油，其反应式为： $C_3H_5(RCOO)_3 + 3NaOH \rightarrow C_3H_5(OH)_3 + 3RCOONa$ ；油脂水解法提取甘油，是指油脂加水分解后生成脂肪酸和甘油，其反应式如下： $C_3H_5(RCOO)_3 + 3H_2O \rightarrow C_3H_5(OH)_3 + 3ROOH$ ，油脂皂化法和油脂水解法得到的含有甘油的混合液，经过蒸发浓缩、蒸馏、脱色，才能得到甘油精品。

2.1.2 化学合成法

是指以石油化工产品为原料，经化学反应合成甘油，它包括氯化法、丙烯醛法和氧化丙烯法等。其中氯化法工业化生产最早，生产技术成熟，这种合成方法生产的甘油占合成甘油产品的 80%，生产工艺流程分为四阶段进行：①丙烯高温氯化生产氯丙烯，反应式为 $CH_2=CHCH_3 + Cl_2 \rightarrow CH_2=CHCH_2Cl + HCl$ ；②3-氯丙烯次氯酸化制二氯丙醇，反应式为 $CH_2=CHCH_2Cl + Cl_2 + H_2O \rightarrow CH_2Cl-CHOH-CH_2Cl$ ；③二氯丙醇加碱进行环化，生产环氧氯丙烷，反应式为 $CH_2Cl-CHOH-CH_2Cl + Ca(OH)_2 \rightarrow CH_2-CH-CH_2Cl + CaCl_2 + H_2O$ ；④环氧氯丙烷进

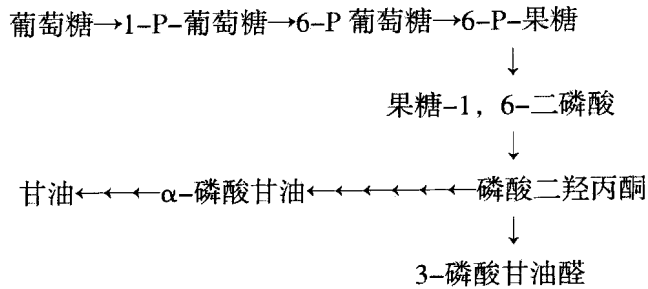
行水解反应合成甘油，反应式为 $CH_2-CH-CH_2Cl + NaOH \rightarrow CH_2OH-CHOH-CH_2OH + NaCl$

2.1.3 发酵法

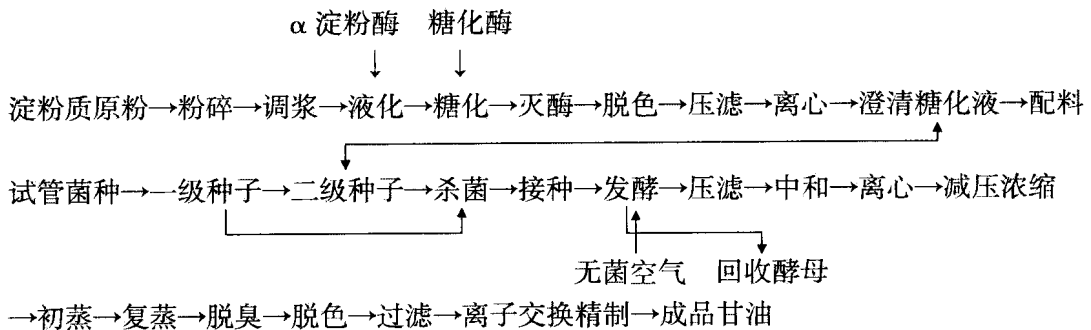
主要指以糖蜜、淀粉质等原料通过酵母菌等微生物发酵生产甘油。以前以低价值的糖蜜、淀粉质为原料研究发酵法生产甘油较多，目前主要侧重于淀粉质原料（尤其是玉米）发酵法生产甘油的研究。玉米发酵生产甘油可以用以下反应式表示：

2.1.3.1 玉米淀粉转化为葡萄糖： $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow{\text{淀粉酶}} nC_6H_{12}O_6$ ；

2.1.3.2 葡萄糖转化成甘油：



玉米发酵生产甘油的工艺流程为：



2.2 甘油发酵的历史

早在 1779 年，瑞典药剂师 K.W.Sheelee 偶然从橄榄油与一氧化铅的反应中发现了甘油，并于 1811 年由法国人 Chevreul 命名为甘油（Glycerol）。后来发现所有的植物油与动物油经相似的处理都可以得到这种甜味物质。那时候称这种物质为“油脂的甘基”。1823 年 Chevreul 发表关于油脂组成成分，认定油脂是由脂肪酸和甘油结合而成。至 1836 年才由 Pelouze 确定甘油是碳、氢、氧三种元素组成。1853—1855 年由 Berthelot、Lucca 和 Wurtz 确定了甘油的化学结构，证明它的化学分子式是 $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ 。1855 年俊卜氏发明用甘油和硝酸制造甘油硝酸脂——硝化甘油。1853 年，H·H·зинин 就曾试图将硝化甘油在工业、军事上应用。当 Nobel（诺贝尔）知道 H·H·зинин 的工作后不久，于 1867 年用硝化甘油与硅藻土制成安全炸药后，甘油用量大为增加，甘油工业生产获得迅速发展。

1858 年生物学家巴斯德在酒精发酵研究中发现有甘油产生。1914 年第一次世界大战爆发，德国因甘油缺乏，首创以糖类为原料发酵生产甘油，而且开始大规模生产，最高年产量达 1.7 万吨。这是甘油发酵工业史上一个里程碑。

发酵法生产甘油，在第一次世界大战后就停止了。但各国研究开发工作从未间断并获得很多专利著述。工艺路线已由过去的“亚硫酸盐”诱导控制法被先进的“耐高渗酵母”发酵法所取代。虽然合成甘油在用途上受到限制，但是世界各国并没有放弃用天然原料生产甘油，而将淀粉质原料发酵生产甘油次之。

2.3 国外甘油发酵的研究现状

2.3.1 亚硫酸盐法

该方法是传统的发酵法,在第一次世界大战期间由 W.Connstein 和 K.Ludecke 实现工业化,其甘油生成机制是乙醇发酵的 Neuberg 途径。该方法生产甘油的研究至今仍在继续,而且进展很快。Kalle (1985) 和 Naik (1987) 等报道,利用游离细胞酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 进行甘油发酵,在一个工作容积为 2L 的发酵罐内,用蔗糖为原料,接种量为 10%、pH6.8~7.0、控制通风量为 1.4v/(v.m) 时,甘油产量是 92~96g/L,产率为 15.3~16.0g/(L·d);若在发酵阶段采用真空(真空度为 80mmHg)或连续喷入 CO₂ (CO₂ 喷入速度为 0.4v/(v.m)) 时,甘油的含量可高达 230g/L,产率为 15g/(L·d)。

利用固定化细胞生产甘油,Bisping 和 Rehm (1982) 用角叉胶固定酿酒酵母生产甘油,在 30℃发酵 118h 甘油浓度为 27.4g/L,产率为 4.64g/(L·d);而在 21℃时发酵甘油浓度为 25.9g/L,产率为 5.29g/(L·d)。由于角叉胶实际应用太昂贵,而限制了该方法研究的进一步深入。Bisping (1984) 等认为,用海藻酸钙凝胶包埋酿酒酵母细胞,由于海藻酸对 Na₂SO₃、NaHSO₃ 和 MgO 的混合物及 (NH₄)₂SO₄ 稳定性不很好等因素影响,导致甘油浓度降为 16.3g/L。用聚丙烯酰胺酰肼包埋酿酒酵母细胞,在一固定床塔式反应器中,颗粒具有良好的稳定性,甘油浓度可达 32g/L。Bisping 等 (1986) 认为,一种具有 60%开孔率,孔直径为 60~100μm 的烧结玻璃,对酿酒酵母有良好的吸附性。这种固定酵母细胞的烧结玻璃用于一固定床气升式反应器中,其总容积为 20L,工作容积为 8L,采用半连续发酵,每批发酵持续 38h,甘油浓度可达 26.2~29.5g/L,甘油生产率为 16.58~18.67g/(L·d)。

Hecker.D (1990) 等研究认为,分批补料发酵过程中,通入 CO₂ 气体可使较高温度下发酵醪中的甘油浓度增至 85g/L,代谢糖的 67%转化为甘油。最近的研究表明,连续培养吸附在玻璃烧结管上的酿酒酵母甘油发酵,在稀释率 $D=0.06/h$ 时,成熟醪中甘油浓度为 24~25g/L。

2.3.2 耐高渗透压酵母法

20 世纪 50 年代中期,J.F.T.Spencer 等 (1956) 发现耐高渗透压酵母在高糖浓度培养基中和通气的条件下,能产生高浓度甘油。之后,便开始了这方面的研究,其机制非常复杂,一般认为它是 EM 和 HMP 途径的混合途径,该法不添加亚硫酸盐,有 40%~50%的糖转化为甘油,比亚硫酸盐法高一倍。Hajny 等 (1960) 从自然界选择分离获得一株只产甘油的木兰拟球酵母 12B,该菌株在 60L 发酵罐以流加法间歇甘油发酵 10d,纸层析测定甘油是唯一的积累产物,发酵液中甘油含量达 17%。国外近十年来,发酵法生产甘油菌种研究最多的是粉状毕赤氏酵母 (*Pichia farinosa*)。Vijaikishore 等 (1984, 1986) 认为,在碱性条件下添加碳酸盐,可得到好的结果,发酵时间少于 120h,甘油转化率为 45%。Vijaikishore 等 (1987) 研究了发酵罐流加法生产甘油,温度控制在 30℃,pH8.2,当葡萄糖浓度低到 2%时,添加葡萄糖粉,使其浓度达到 10%,连续发酵 168~192h。当发酵时间达到 192h 时,总量为 500ml 的发酵液甘油浓度达 30%,产率为 18.75g/(L·d)。用固定化粉状毕赤酵母来生产甘油,在酸性条件下通风振荡培养,其甘油产生速率为 0.07g/(L·h)。采用流化床反应器,在恒定期连续甘油发酵,成熟醪中甘油含量为 13.5g/L。Bisping 等

(1990) 在固定床塔式反应器上, 采用间歇、流加和半连续发酵方式, 用固定化粉状毕赤酵母细胞对照游离细胞甘油发酵进行了系列研究, 研究表明: 每克烧结玻璃吸附了 2.6×10^9 个细胞, 甘油产率为 $8.1 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$, 游离细胞间歇发酵最高甘油浓度达 86 g/L 。

2.3.3 其他菌种甘油发酵

Rohr.M 等 (1988) 指出, 用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (蔗糖 150 g/L) 进行柠檬酸发酵时能积累高达 9 g/L 的甘油产物; 在发酵阶段甘油、赤藓醇、阿拉伯糖醇和甘露醇等物质能被霉菌再次消耗。Honecker.S 等 (1988) 也观察到黑曲霉会产生与糖浓度有关的甘油。限制氮源的深层培养, 在 240 g/L 蔗糖的浓度下, 产生甘油 4.9 g/L , 赤藓醇 1.6 g/L , 阿拉伯糖醇 0.3 g/L , 但不产生甘露醇。甘油的产生还有赖于氧的浓度, 限制性的磷源能产生最多的甘油。

这些年来, 有关藻类 *D.tertiole* 和 *D.bardawil* 在高浓度 NaCl 下产甘油的研究也不少。Ben-amotz A (1981, 1982) 研究了这类藻类在生长时, 胞内甘油浓度与 NaCl 浓度成线性比例关系, 当藻类生长在 5 mol/L NaCl 溶液中, 胞内甘油浓度达 7 mol/L , 相当于 56% 的甘油溶液。许多研究报告都对利用这种藻类以再生资源 CO_2 和太阳光为基质得到甘油产生兴趣。但藻类胞外分泌甘油则由 Grizean.D 等 (1986) 采用固定这些藻类在海藻酸钙上才发现, 在 NaCl 浓度高达 4 mol/L 时, 胞外甘油量为 5 g/L 。

2.4 国内甘油发酵的研究现状

我国对发酵法生产甘油的研究始于 20 世纪 50 年代中期, 60 年代初非常活跃, 这时主要局限于亚硫酸盐法。1962 年, 张树政等研究了耐高渗透压酵母生产甘油及阿拉伯糖醇, 并进行了菌种的分离和筛选。1970 年开始, 无锡轻工业学院开展了耐高渗透压酵母生产甘油的研究, 全面进行了菌种选育、工艺设计, 选育出 61-4-A8 产甘油优良菌株。该菌株甘油发酵甘油含量可稳定在 10% 左右, 总糖转化率在 40% 以上。原料由糖蜜原料拓宽到淀粉质原料, 使甘油发酵研究进入一个崭新的阶段。1986 年国家科学技术委员会将淀粉质原料发酵法生产甘油的研究列为国家“七五”科技攻关项目。经无锡轻工业学院和四川发酵研究所 5 年的研究, 取得了明显的进步, 诸葛健等 (1994) 研究结果表明, 采用耐高渗透压酵母, 在淀粉水解糖液浓度为 25% 的培养液中, 甘油产量为 10.61% 。全糖转化率达 43.07% , 居世界领先水平。最近的研究表明, 四川制糖工业研究所利用嗜渗酵母——木兰拟球酵母选育出辐射变异株川甘 10 号, 经甘油发酵实验表明, 以糖蜜为原料时甘油产量稳定在 $8\% \sim 10\%$, 糖转化达到 48% 。无锡轻工业大学又选育出了 WL-2002-5 菌株, 在含糖 25% 的基质中, 发酵甘油产量为 $10\% \sim 12\%$, 总糖转化率为 $48\% \sim 50\%$ 。利用这些技术目前全国已建立了十几个甘油发酵厂, 它们主要分布在江苏、山西、湖北、河南、山东、甘肃、吉林、黑龙江等省市。生产规模从年产 $500 \sim 3\,000$ 吨不等, 多数厂规模在 $1\,000$ 吨左右。

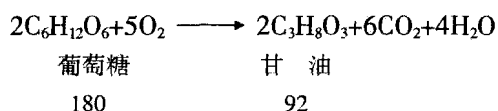
2.5 甘油供求情况

根据世界市场预测, 年需要甘油 100 万吨, 实际上包括我国在内, 只能生产 50 万吨左右。据不完全统计, 世界各甘油生产国甘油产量如下: 美国 23 万吨、德国 6 万吨 (统

一前的数字)、日本 5.75 万吨、中国 4.0 万吨、法国 3.1 万吨、英国 3.5 万吨、荷兰 2.5 万吨。不同生产途径甘油产量总的比例是天然甘油占 60%~70%，合成甘油 20%~30%，发酵甘油 5%~10%。我国虽甘油来源呈多元化，即油脂皂化和水解法、化学合成法、发酵法兼有，但数量不足。为满足国内市场的需要，多年来不得不进口部分甘油，1991 年全国对甘油的需求量为 6.8 万吨，而国内产量只有 3 万吨左右。近几年每年甘油产量只有几千吨，但目前我国甘油需求量约为 12 万吨左右。我国由于油脂缺乏，合成洗涤剂工业的飞速发展，人们消费习惯的改变，皂化甘油的产量每况愈下；再者合成法制甘油的主要原料——环氧氯丙烷本身价格已接近甚至超过市场甘油售价，这就限制合成法生产甘油；因此，发酵法生产甘油则是新的有效途径。

2.6 发酵法生产甘油经济效益分析

微生物发酵法生产甘油的反应式如下：



由此可算出甘油的理论转化率为 $\frac{92}{180} \times 100\% = 51.11\%$ 。从目前的生产水平看，全糖转化率大都在 42% 以上，提取总回收率在 72% 以上。现以低限计，则甘油对糖的实际转化率为 $42\% \times 72\% = 30.24\%$ 。即生产 1 吨甘油需淀粉量为 $1/30.24\% = 3.31$ 吨。如淀粉纯度为 92%，那么生产 1 吨甘油需玉米淀粉为 $\frac{3.31}{92\%} = 3.60$ 吨。淀粉成本以 3 000 元/吨计，主要原料成本为 10 800 万元。经计算每吨甘油的成本如下：可变成本为 15 000 元，固定成本为 1 500 元，车间成本为 14 750 元，销售成本为 15 250 元。销价以 17 200 元/吨计，那么吨甘油的利税为 1 950 元。若建一个年产 1 000 吨的甘油厂，其年产值为 1 700 万元，年利税为 195 万元。从上述的经济指标分析不难看出，利用玉米为原料单纯生产甘油而言，经济效益不是很高。

2.7 玉米发酵甘油存在的问题及对策

虽然目前全国范围内年产 500 吨、1 000 吨的发酵法生产甘油厂有十几座，个别企业年产可达 4 500 吨世界级规模。但由于这是一个新领域，技术上问题（菌株、分离和纯化）使玉米及其他原料发酵法生产甘油没有突破性进展。所以，要想使发酵法生产甘油有一个质的飞跃，还需选育耐高渗透压，转化糖能力强的优良菌种，采用更先进分离与纯化技术，提高甘油得率，使发酵法产甘油获得较理想的经济效益，使其健康长久地发展下去。