

营养条件对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

李 寅¹ 陈 坚^{*1} 梁大芳¹ 伦世仪¹ 芮新生² 龚小玉²

¹(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室 无锡 214036)

²(常州曙光化工厂 常州 213016)

关键词 丙酮酸,光滑球拟酵母,营养条件,碳氮比,流加培养

中图分类号 TQ920 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0225-04

丙酮酸是多种氨基酸、维生素及其它有用物质的重要前体,广泛应用于化工、制药及农用化学品工业。能够直接发酵生产丙酮酸的菌种主要有 *Acinetobacter*^[1], *Enterobacter*^[2], *Enterococcus*^[3], *Escherichia*^[4], *Agaricus*^[5], *Schizophyllum*^[6], *Debaryomyces*^[7], *Candida*^[8] 和 *Torulopsis*^[9], 但国内一直未有关于发酵法生产丙酮酸的研究报道。在前期研究中,作者筛选得到了一株能以葡萄糖为底物积累丙酮酸的光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) WSH-IP12。本文报道蛋白胨浓度、葡萄糖的补加、分批培养中的供氧方式、初糖浓度及碳氮比等营养条件对该菌株发酵生产丙酮酸的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌种

光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) WSH-IP12, 硫胺素、生物素、烟酸和吡哆醇的营养缺陷型。

1.2 培养基

1.2.1 斜面 and 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20 (斜面用), pH 5.5, 自来水配制。

1.2.2 发酵培养基 (L): 葡萄糖 80 g, 蛋白胨 15 g (含氮量 12%), KH_2PO_4 5g, KCl 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g, 烟酸 4 mg, 盐酸硫胺素 20 μg , 盐酸吡哆醇 100 μg , 生物素 10 μg , 核黄素 50 μg , CaCO_3 40g (摇瓶时添加), pH 5.0, 自来水配制。

1.3 培养方法

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基 (50 mL/500 mL

锥形瓶), 在 30 $^\circ\text{C}$ 、200r/min 下培养 12 h 后, 以 10% 接种量接入发酵培养基。摇瓶发酵装液量为 50 mL/500 mL 锥形瓶, 温度 30 $^\circ\text{C}$, 转速 220 r/min, 发酵时间如无特指均为 48 h。分批培养时, KF-5L 发酵罐装液量 2L, 温度 30 $^\circ\text{C}$, 通气量 2 L/min, 搅拌转速不低于 700 r/min, 用 5mol/L KOH 控制 pH 为 5.0。当残糖降至 4% 左右时, 按一定速率流加 400 g/L 的葡萄糖液进行流加培养。

1.4 分析方法

2 mL 发酵液在 8000 r/min 离心 5 min 后, 上清液分别用乳酸脱氢酶法^[10]和 3,5-二硝基水杨酸法分析丙酮酸和葡萄糖浓度。菌体用蒸馏水洗 2 次后 (摇瓶样品还需加 2 mL 2mol/L 盐酸溶解 CaCO_3), 在 90 $^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重后称重。摇瓶发酵中的乙醇浓度用气相色谱法定量, 发酵罐内乙醇浓度则用乙醇浓度监测仪^[11]在线监测。

2 结果与讨论

2.1 蛋白胨浓度对丙酮酸发酵的影响

对于多重维生素营养缺陷型菌株 WSH-IP12, 蛋白胨浓度较高时虽然不会抑制细胞生长, 但当其浓度高于 20 g/L 后丙酮酸产量开始下降, 而乙醇含量明显升高, 很可能是因为蛋白胨中的硫胺素积累到一定浓度后激活了丙酮酸脱羧酶, 将丙酮酸转变为乙醇 (表 1)。然而, 消耗 80 g/L 的葡萄糖又至少需要 10 g/L 蛋白胨 (碳氮比约为 26:1), 表明适宜的蛋白胨浓度对丙酮酸发酵是很重要的。

表 1 蛋白胨对 WSH-IP12 生产丙酮酸的影响

Peptone/(g/L)	0	3	7	10	15	20	30	45	60
Pyruvate/(g/L)	3.16	6.60	11.77	20.21	23.43	20.06	16.22	15.71	13.15
Residual glucose/(g/L)	45.19	32.30	15.17	2.92	0.53	0.71	0.38	0.23	2.40
Dry cell weight/(g/L)	10.25	14.1	17.35	18.6	17.55	19.2	22.2	23.5	23.75
Ethanol/(g/L)	2.32	2.88	3.04	3.34	3.54	4.15	5.50	6.28	7.84

1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added as basal nitrogen source.

收稿日期:1999-03-10, 修回日期:1999-11-29。

基金项目:江苏省“九五”工业重大科技攻关项目 (No. BG98015-3)。

2.2 摇瓶中简单补糖对丙酮酸发酵的影响

如图 1 所示,在总糖浓度均为 80 g/L 的前提下,初糖浓度 20 g/L、分 3 次补足 80 g/L 的方式(48 h 丙酮酸浓度 30.2 g/L),其产酸速率、丙酮酸产率均优于初糖浓度 80 g/L(48 h 丙酮酸 23.5 g/L)的操作方式,表明流加培养有可能提高丙

酮酸的生产水平。

2.3 不同供氧方式对丙酮酸发酵的影响

选择了 2 种不同的供氧方式进行研究: I—搅拌转速恒定在 700 r/min; II—搅拌转速按相对溶氧不低于 40% 的要求逐渐升高。图 2 表明,相对较高的溶氧有利于丙酮酸的积累。

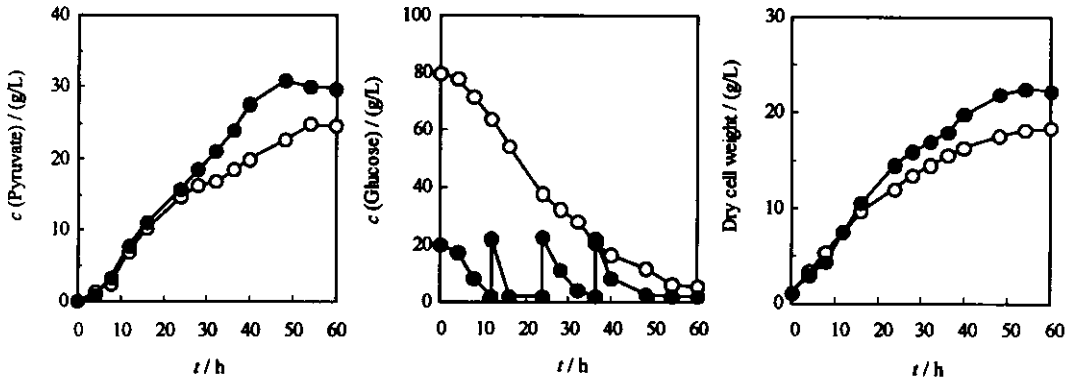


图 1 摇瓶补糖对丙酮酸发酵的影响

●补加葡萄糖;○不补加葡萄糖

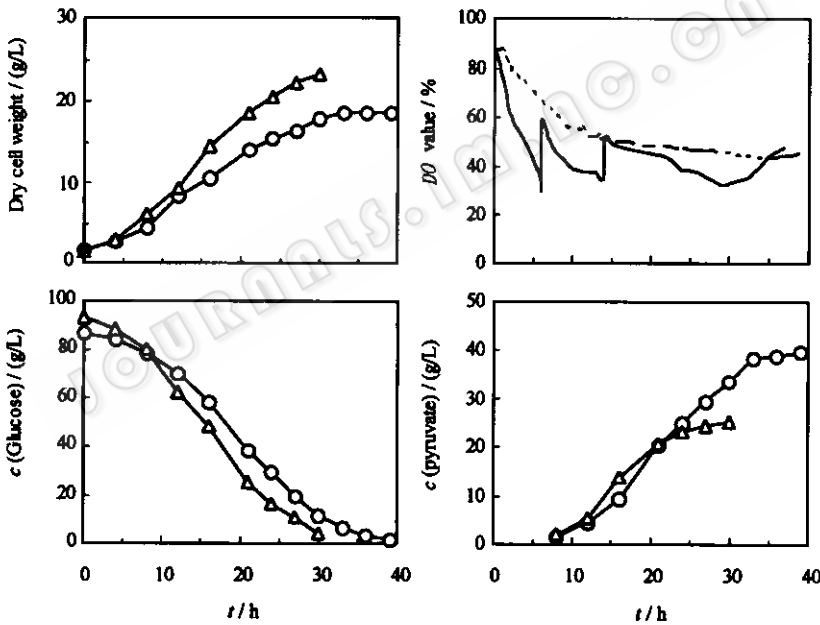


图 2 不同供氧方式下的丙酮酸发酵过程

○和---:供氧方式 I(0~39h,700 r/min);△和—:供氧方式 II(0~6 h,400 r/min;6~14 h,500 r/min;14~37 h,600 r/min)

2.4 分批培养中不同初糖浓度和碳氮比(C:N)对丙酮酸发酵的影响

图 3 表明,若在提高葡萄糖浓度的同时提高蛋白胨浓度(以保持 C:N 不变),则丙酮酸生产也会得到促进;然而,若仅提高葡萄糖浓度,蛋白胨浓度却保持不变(即 C:N 增大),则发酵后期(40 h 后)细胞生长速度和耗糖速度明显下降(图 3),丙酮酸产率也显著降低。氮源缺乏条件下 EMP 途径中某些关键酶的合成受阻,可能是葡萄糖消耗受抑制并造成丙酮酸产率明显降低的原因。流加培养实验进一步证明了氮

水平在丙酮酸发酵中的重要性。

2.5 流加培养中氮的供给对丙酮酸发酵的影响

如图 4 所示,当流加培养进行到 28 h 时,细胞生长和丙酮酸合成停滞,葡萄糖浓度迅速上升。此时发酵罐内的总糖大约为 120 g/L,而初始蛋白胨浓度为 12 g/L(C/N 为 36:1),故作者推测原因可能是氮源缺乏所致,于是分别在 34 h 和 40 h 补入 10 g 蛋白胨和 5 g(NH₄)₂SO₄,葡萄糖浓度的迅速下降表明氮水平在丙酮酸发酵中的重要作用。丙酮酸产量在发酵 64 h 时达到 54.5 g/L(对葡萄糖产率 0.471 g/g)。

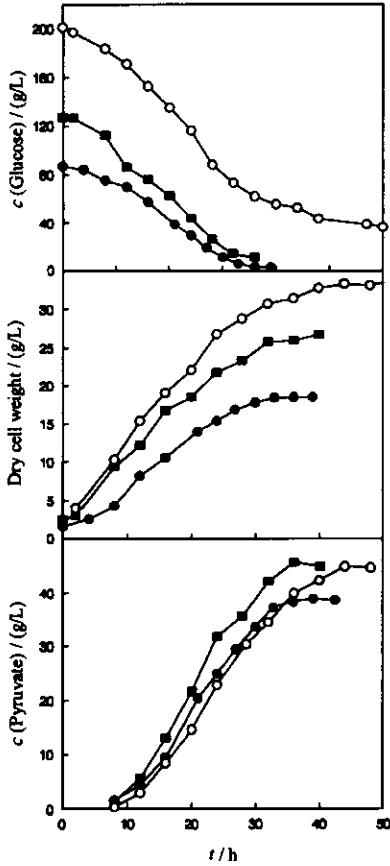


图3 不同初糖浓度和碳氮比对丙酮酸批发酵的影响

●初始葡萄糖 87.9 g/L, 蛋白胨 12 g/L(C/N 25:1) ■初始葡萄糖 127.1 g/L, 蛋白胨 16 g/L(C/N 25:1) ○初始葡萄糖 201.1 g/L, 蛋白胨 16 g/L(C/N 16:1)

以上实验表明,氮源的缺乏会降低丙酮酸的产量和产率。为此,作者在其它条件都相同的前提下,改用氨水代替 KOH 控制发酵过程的 pH(相当于连续流加氮源)进行流加培养实验。如图 5 所示,在整个发酵过程中细胞均表现出很强的丙酮酸合成能力,55 h 丙酮酸产量达到 57.3 g/L(对葡萄糖产率 0.498 g/g)。尽管 34 h 后由于糖流加速率过快,造成罐内葡萄糖也有所积累,但对产酸没有影响。

3 结 论

培养基中的氮含量与葡萄糖消耗及丙酮酸积累密切相关。氮源缺乏时,葡萄糖消耗和丙酮酸生产均受到抑制。在

小型反应器流加发酵中采用氨水控制 pH 值(相当于同时提供氮源),细胞能够持续、快速地积累丙酮酸。

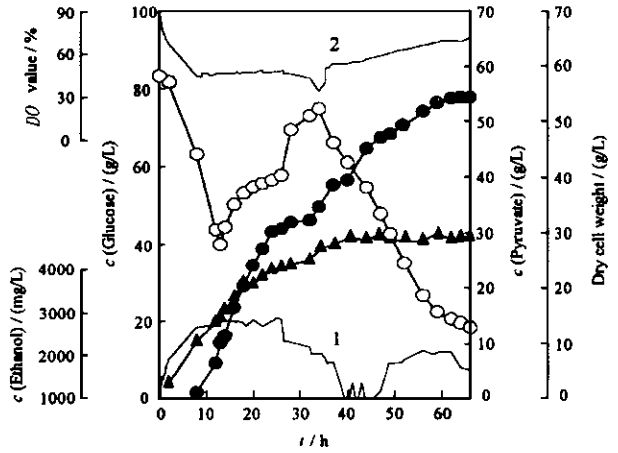


图4 T. glabrata WSH-IP12 流加培养过程曲线

●丙酮酸;○葡萄糖;▲细胞量;1.乙醇;2.溶氧。初始葡萄糖和蛋白胨浓度分别为 83 和 12 g/L。13 h 后 400 mL 浓缩葡萄糖液以 13~17 h(20 mL/h),17~28 h(15 mL/h),28 h 后(10 mL/h)的速率加入发酵罐中

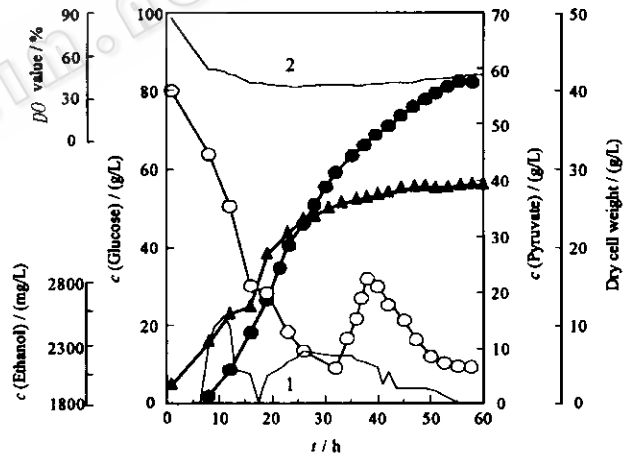


图5 用氨水替代 KOH 控制过程 pH 的流加培养过程曲线

●丙酮酸;○葡萄糖;▲细胞量;1.乙醇;2.溶氧。初始葡萄糖和蛋白胨浓度分别为 80 和 12 g/L。15 h 后 350 mL 浓缩葡萄糖液以 15~34 h(10 mL/h),34~38h(20mL/h),34~38 h(15 mL/h)的速率加入发酵罐中

参 考 文 献

[1] Izumi Y, Matsumura Y, Tani Y et al. *Agric Biol Chem*, 1982, 46:2673~2679
 [2] Yokota A, Takao S. *Agric Biol Chem*, 1989, 53:705~711
 [3] Yanase H, Mori N, Masuda M et al. *J Ferment Bioeng*, 1992, 73:287~291
 [4] Yokota A, Terasawa Y, Takaoka N et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58:2164~2167
 [5] Takao S, Tanida M. *J Ferment Technol*, 1982, 60:277~280
 [6] Moriguchi M, Shuto K, Hashimoto T. *J Ferment Technol*, 1982, 62:243~248
 [7] Morguchi M. *Agric Biol Chem*, 1982, 46:995~961

- [8] Bernard B, Dominique G, Claire S. European Patents, EP312,453, 1989
- [9] Miyata R, Yonehara T. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**:475~479
- [10] Lamperecht W, Heinz F. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. Bergmeyer, H. U. VCH, Weinheim, 1984, **6**: pp. 570~577
- [11] 李 寅, 潘 丰, 陈 坚等. 见: 曹竹安等编. 第八届全国生物化工学术会议论文集, 北京: 化学工业出版社, 1998, pp. 665~669

Effect of Nutritional Conditions on the Fermentative Production of Pyruvic Acid by *Torulopsis glabrata*

LI Yin¹ CHEN Jian¹ LIANG Da-Fang¹ LUN Shi-Yi¹ RUI Xin-Sheng² GONG Xiao-Yu²

¹(*Lab of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036*)

²(*Changzhou Shuguang Chemical Engineering Factory, Changzhou 213016*)

Abstract The effects of some nutritional conditions, such as peptone concentration, feeding glucose as well as oxygen supply manner and ratio of C/N in batch culture, on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata* WSH-IP12 were investigated. In shaking-flask culture: (1) peptone of more than 20 g/L inhibited the accumulation of pyruvic acid; (2) production of pyruvic acid was increased from 23.5 g/L to 30.2 g/L by simply feeding glucose. In 5 L jar-fermentor batch culture: (1) high level of dissolved oxygen and (2) increasing the concentration of glucose and peptone proportionally with constant C/N ratio (26:1) improved the production of pyruvic acid. It was also found that, glucose consumption and pyruvic acid production almost stopped under the condition of nitrogen deficiency while recovered by adding peptone and (NH₄)₂SO₄. By using ammonia water instead of potassium hydroxide for the control of pH, the cells kept stronger ability for synthesizing pyruvic acid within the whole process, 57.3 g/L pyruvic acid with the yield of 0.498 g/g was achieved at 55 h of fermentation.

Key words *Torulopsis glabrata*, pyruvic acid, nutritional conditions, ratio of C:N, fed-batch culture