

丙酮酸发酵过程中光滑球拟酵母过程功能的强化

许庆龙, 刘立明, 堵国成, 陈 坚

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 对不同葡萄糖浓度下光滑球拟酵母分批发酵生产丙酮酸的动力学模型分析发现, 葡萄糖浓度是影响光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸过程功能的关键因素。在发酵初始阶段, 低浓度葡萄糖可维持较高的菌体比生长速率; 对数生长中前期, 葡萄糖快速进料使菌体浓度接近最大值, 并实现碳流从菌体生长转向丙酮酸积累; 对数生长后期葡萄糖浓度控制在 33.4 g/L 以维持高丙酮酸对葡萄糖产率系数 (0.71 g/g)。采用奇异控制的葡萄糖流加方式, 在 7 L 发酵罐上控制不同发酵阶段葡萄糖浓度处于最佳水平以强化光滑球拟酵母过程功能, 丙酮酸产量 (83.1 g/L)、产率 (0.621 g/g)、生产强度 [1.00 g/(L·h)] 与批发酵对比, 分别提高了 21.3%、21.6% 和 29.9%。

关键词: 光滑球拟酵母, 过程功能, 强化策略

Optimized Pyruvate Production Through Enhancing *Torulopsis glabrata* Process Performance

Qinglong Xu, Liming Liu, Guocheng Du, and Jian Chen

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Based on kinetic parameters analysis, a 4-stage glucose-control strategy was used to optimize pyruvate production by *Torulopsis glabrata*. At 0~18 h, 40 g/L glucose was fed to get a higher specific growth rate, and then glucose was quickly fed to the fermentation broth at 19~25 h to achieve the maximum dry cell concentration and to redirect the carbon flux from cell growth to pyruvate formation. At 26~63 h, a highest pyruvate yield (0.71 g/g) was achieved through maintaining glucose at 33.4 g/L by a singular control strategy. After 64 h, pyruvate fermentation was continued as batch process. A high concentration (83.1 g/L), yield (0.621 g/g) and productivity (1.00 g/(L·h)) of pyruvate were achieved by applying this strategy, which were 21.3%, 21.6% and 29.9% higher than that of the batch process.

Keywords: *Torulopsis glabrata*, glucose concentration shifting strategy, pyruvate production

在利用微生物细胞过量合成生物基化学品的过程中, 需要考虑的问题是: 如何优化或强化微生物

Received: April 12, 2007; **Accepted:** July 3, 2007

Supported by: the National Outstanding Youth Foundation of China (No. 20625619); the National Natural Science Foundation of China (No. 30670066, 20706025); the National High-Tech Research Development Plan of China (863) (No. 2006AA020301, 2007AA100402); and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714303).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Liming Liu. E-mail: Mingll@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619), 国家自然科学基金(Nos.30670066 and 20706025), 863 (Nos. 2006AA02Z201 and 2007AA100402)和 973 项目(No. 2007CB714303)。

细胞代谢和过程功能,以提高目标代谢产物的生产效率^[1,2]。基因工程技术的进步,为强化微生物代谢功能提供了更为合理、高效的手段^[3-5]。另外,还应在准确分析环境因素对微生物过程影响的基础上,根据不同发酵阶段微生物对环境适应能力的差异而调控适宜的环境条件,是强化微生物细胞过程功能的关键途径之一^[6]。

近年来,围绕进一步强化微生物发酵法生产丙酮酸效率的研究主要集中在:(1)分阶段控制策略(溶氧^[7]和温度^[8]);(2)生物反应与电渗析耦合工艺^[9]和耐盐突变株的选育^[10];(3)调控微生物细胞内辅因子形式^[11,12]和浓度^[13]等方面。然而,利用发酵过程参数,通过动力学模型解析影响发酵过程功能的关键因素,提出相应调控策略强化丙酮酸发酵生产过程功能,最终提高丙酮酸发酵的效率的研究则鲜见报道。本研究以光滑球拟酵母 CCTCC M202019 发酵生产丙酮酸的过程为研究模型,在对丙酮酸分批发酵动力学模型进行详尽分析的基础上,发现葡萄糖浓度是影响丙酮酸高效积累的关键因素之一,采用奇异优化控制策略流加葡萄糖,使不同发酵阶段葡萄糖浓度处于最佳水平,从而强化丙酮酸发酵过程中光滑球拟酵母的过程功能,实现了丙酮酸高效生产。

1 材料和方法

1.1 菌株

光滑球拟酵母 *T. glabrata* CCTCC M202019, NA、Bio、B₁、B₆ 4 种维生素营养缺陷型,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,为本研究室选育。

1.2 培养基

1.2.1 斜面和种子培养基(g/L)

葡萄糖 30, 蛋白胨 10, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 1, 琼脂 20 (斜面添加); pH 5.0。

1.2.2 发酵培养基

参见文献[14]。补料培养基中含有葡萄糖 800 g/L, 氯化铵 58 g/L。

1.3 培养方法和分析方法

参见文献[14]。

1.4 数据处理

微分方程组的求解采用四阶龙格库塔法,模型参数求解采用单纯形法。

2 结果与讨论

2.1 丙酮酸分批发酵动力学模型的构建

初始葡萄糖浓度对 *T. glabrata* CCTCC M202019 生长的影响如图 1 所示。在一定的葡萄糖范围内(< 120 g/L), 菌体浓度随着初始葡萄糖浓度的增加而增加; 继续增加葡萄糖浓度(> 120 g/L)则抑制了菌体生长, 导致细胞比生长速率下降。Logistic 模型是描述细胞生长的最佳动力学模型之一, 然而 Logistic 模型仅描述了细胞生长的自身抑制作用^[15-17], 而缺乏基质浓度对细胞生长的抑制项^[18]。在丙酮酸分批发酵中, 由于高浓度葡萄糖对细胞生长具有抑制作用, 结合 Logistic 模型的优点, 在 Logistic 模型中增加基质抑制因素项^[19, 20], 得到描述 *T. glabrata* CCTCC M202019 发酵生产丙酮酸过程中的菌体生长动力学模型如下:

$$dX/dt = \mu_{\max} X(1 - X/X_{\max})(1 + S/k_i)^{-1} \quad (1)$$

其中: X 为菌体浓度(g/L); X_{\max} 为最大菌体浓度(g/L); S 为底物浓度(g/L); μ_{\max} 为菌体最大比生长速率(h⁻¹); k_i 为对菌体生长产生抑制的葡萄糖临界浓度(g/L)。

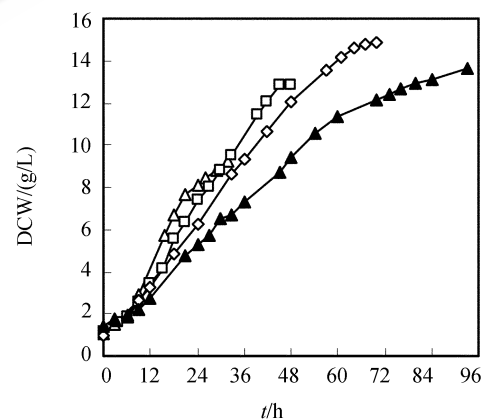


图1 初始葡萄糖浓度对细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of glucose concentration on cell growth

Glucose (g/L)

△ 40 □ 80 ◇ 120 ○ 160

前期研究发现, 丙酮酸发酵为细胞生长与产物合成部分偶联型发酵, 在发酵后期高浓度葡萄糖对丙酮酸合成具有一定的抑制作用。在充分考虑底物浓度对丙酮酸合成的非竞争性抑制的基础上, 结合描述生长部分偶联型的 Luedeking-Piret 方程^[19], 得到描述 *T. glabrata* CCTCC M202019 发酵生产丙酮

酸的动力学模型:

$$dP/dt = \alpha dX/dt + \beta(1 + K_{SP}/S)^{-1}(1 + S/K_{IP})^{-1} X \quad (2)$$

其中: α 为与菌体生长相关的产物合成常数; β 为与菌体浓度相关的产物合成常数; K_{IP} 为对产物合成产生抑制的葡萄糖临界浓度(g/L); K_{SP} 为对产物生成的葡萄糖饱和浓度(g/L)。

类似地, 丙酮酸分批发酵过程中葡萄糖消耗模型为^[19]:

$$-dS/dt = Y_X^{-1}dX/dt + Y_P^{-1}dP/dt + mX \quad (3)$$

其中: m 为细胞维持消耗系数(h^{-1}); Y_X 为菌体对葡萄糖的产率系数(g/g); Y_P 为丙酮酸对葡萄糖的产率系数(g/g)。

2.2 模型参数求解与适用范围

采用初始葡萄糖浓度为 80 g/L 时的丙酮酸发酵过程数据, 通过模型计算, 得到丙酮酸分批发酵动力学模型参数, 与参数的 95% 可信范围一并列于表 1。

在葡萄糖浓度为 80 g/L 时, 所拟合的丙酮酸分批发酵动力学模型最大相对误差为 8.8%, 平均相对误差为 2.3%。采用初始葡萄糖浓度为 40 g/L(Fig. 2A)、80 g/L(Fig. 2B)、120 g/L(Fig. 2C)和 160 g/L(Fig. 2D)的丙酮酸分批发酵结果对所拟合模型进行验证。发现: 模型计算结果与不同初始葡萄糖下的丙酮酸分批发酵结果具有一致性(图 2)。表明所拟合的模型较好地描述了丙酮酸分批发酵过程。

表 1 丙酮酸发酵动力学模型参数估计值与可信范围

Table 1 Estimation value of Kinetics model parameters of pyruvate fermentation

Parameters	μ_{max}	X_{max}	K_i	α	β	K_{sp}	K_{ip}	Y_X	Y_P	m
Values	0.16	15.88	98.32	4.41	0.16	26.12	42.59	0.58	0.96	0.010
95% Confidence interval	(0.148, 0.172)	(14.29, 17.36)	(89.13, 110.70)	(4.21, 4.62)	(0.145, 0.175)	(25.01, 27.23)	(40.19, 44.98)	(0.57, 0.59)	(0.92, 0.99)	(0.006, 0.014)

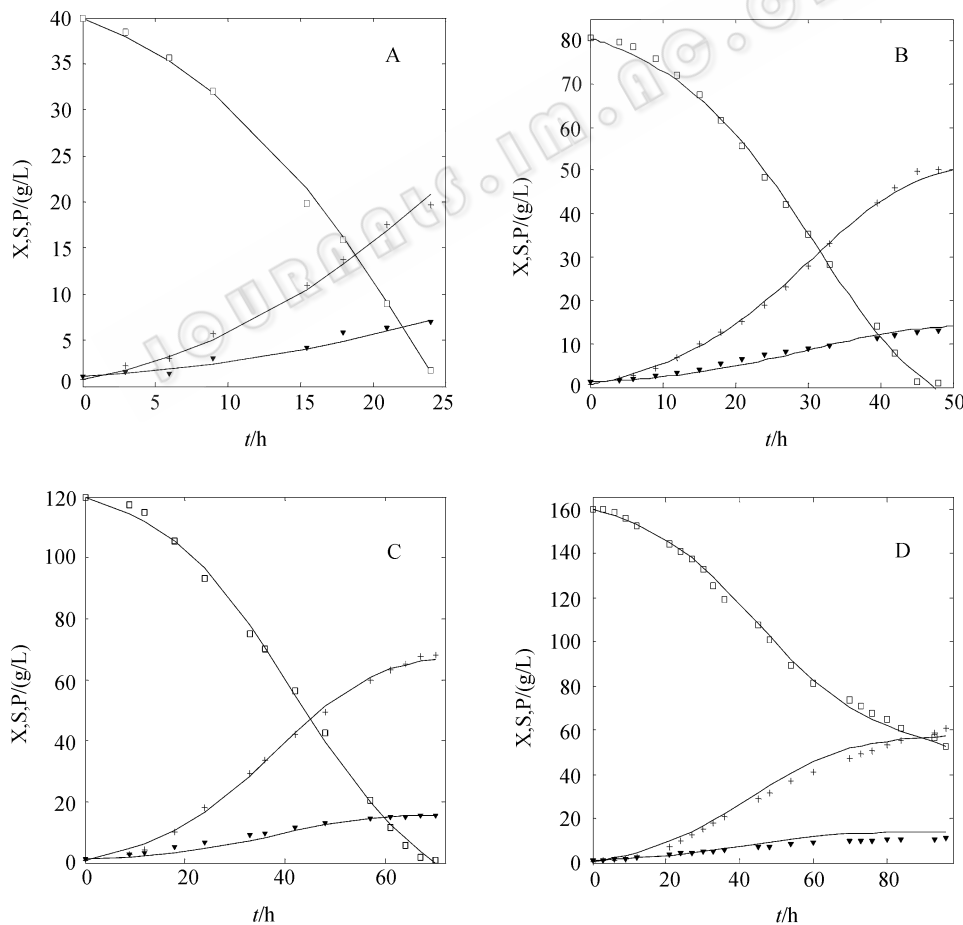


图2 实验值与模型值的比较

Fig. 2 Comparison between the experimental data and the model prediction

▼ X; S; +P; ----Model value. Initial glucose: (A) 40 g/L; (B) 80 g/L; (C) 120 g/L; (D) 160 g/L

2.3 丙酮酸分批发酵动力学模型分析

结合表 1, 对所拟合的动力学模型分析发现: (1) 不同发酵阶段的细胞浓度和生长速率受发酵体系中葡萄糖浓度精密调控; (2) 较高的细胞浓度和生长速率有利于丙酮酸的合成; (3) 在不同发酵阶段控制适宜的葡萄糖浓度能促进丙酮酸高效生产。

不同初始葡萄糖浓度下的丙酮酸分批发酵结果总结于图 3A 中。发现: (1) 较低的葡萄糖浓度可维持较高的细胞比生长速率, 但过低的葡萄糖浓度导致最终菌体浓度(X)下降(初始葡萄糖浓度为 40 g/L 时, 细胞干重仅 8.4 g/L), 从而导致丙酮酸生产效率下降; (2) 较高的葡萄糖浓度能获得较高的菌体浓度, 但过高的葡萄糖浓度则导致细胞比生长速率和丙酮酸比生成速率下降(初始葡萄糖浓度为 160 g/L 时的细胞比生长速率和产物比合成速率与 120g/L 比较, 分别下降了 28.8%和 32.1%)。在给定的统一初始条件($X_0=1$ g/L)下, 不同初始葡萄糖浓度下丙酮酸产量、产率和生产强度的变化如图 3B 所示。表明葡萄糖浓度为 119.5 g/L、119.5 g/L、80.3 g/L 时丙酮酸产量、产率和生产强度分别达到最大值。

基于以上分析, 为了进一步强化丙酮酸发酵过程中 *T. glabrata* 的过程功能, 需使不同发酵阶段中葡萄糖浓度处于最适水平。而采用合适的葡萄糖流加策略能实现这一目标。

2.4 丙酮酸流加发酵过程的准优化控制

基于分批发酵的实验数据和动力学模型分析, 丙酮酸发酵准优化控制策略应为: (1) 发酵起始阶段 (0~18 h): $X_{max}=16.28$ g/L, $Y_x=0.58$ g/g 理论计算得

培养基中葡萄糖浓度大于 28 g/L 时, 可获得满足产物合成所需的细胞比生长速率和临界菌体浓度。实际发酵中, 添加 40 g/L 葡萄糖; (2) 随着葡萄糖浓度降到 10 g/L 以下时, 丙酮酸进入介于发酵起始阶段和奇异控制阶段的过渡阶段 (shifting phase) (19~25 h), 这一阶段以菌体浓度接近或超过 X_{man} 为目标, 快速流加葡萄糖, 以满足菌体比生长速率和基质比消耗速率达到最大值的碳源需要; (3) 奇异控制阶段^[20] (Singular control phase, 26~63 h), X 接近 X_{man} , 细胞比生长速率 $\mu(s, x) \rightarrow 0$, 由方程(2)和方程(3)得丙酮酸比生成速率 $\pi(s, x)$ 和丙酮酸对葡萄糖转化率 $Y(s, x)$ 分别为

$$\pi(s, x) = \alpha\mu(s, x) + \beta(1 + K_{sp}/S)^{-1}(1 + S/K_{ip})^{-1} \approx \beta(1 + k_{sp}/S)^{-1}(1 + S/k_{ip})^{-1} \quad (4)$$

$$Y(s, x) = \frac{\pi(s, x)}{\mu(s, x)/Y_x + \pi(s, x) + m} \approx \frac{\pi(s, x)}{\pi(s, x) + m} = \frac{1}{1 + m/\pi(s, x)} \quad (5)$$

为获得较高的丙酮酸浓度, 须控制葡萄糖浓度为 S^* 以维持较高的 $\pi(s, x)$ 和 $Y(s, x)$ 。由方程(5)知, $\pi(s, x)$ 取最大值时, $Y(s, x)$ 亦最大。由于 x 接近 X_{man} , 所以:

$$\text{由 } \frac{d(\pi(s, x))}{ds} \approx \frac{d(\beta(1 + k_{sp}/S)^{-1}(1 + S/k_{ip})^{-1})}{ds} = 0$$

计算得 $S^* = \sqrt{k_{sp} \cdot k_{ip}} = 33.4$ g/L。即葡萄糖浓度为 $S=S^*$ 时, 可以获得最大的丙酮酸比生成速率 $\pi(s, x)$, 同时, 丙酮酸对葡萄糖转化率 $Y(s, x)$ 达到最大。(4) 分批发酵阶段 (64~84 h): 流加结束后维持一定时间使发酵体系中葡萄糖浓度低于 5 g/L, 发酵结束。

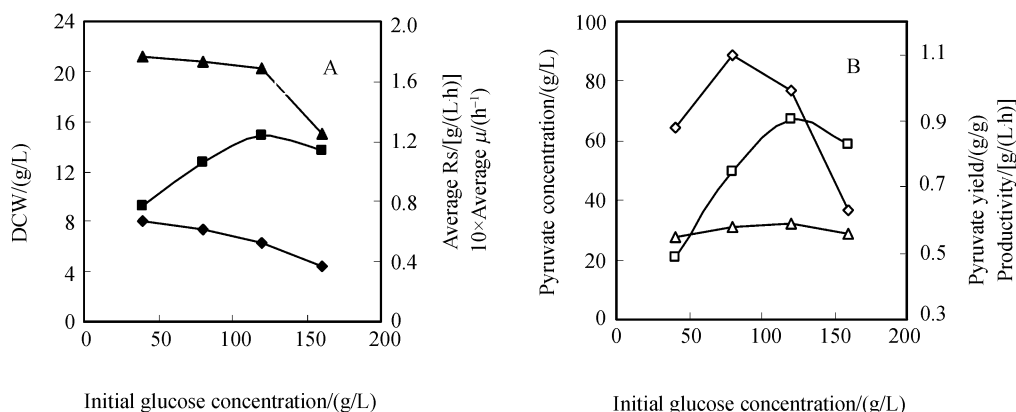


图3 初始葡萄糖浓度对丙酮酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of initial glucose concentration on the cell growth(A) and pyruvate production(B) by *T. glabrata*

DCW; ▲ Average glucose consumption rate; ◆ 10×Average specific growth rate; ◇ Pyruvate productivity; Pyruvate concentration; △ Pyruvate yield on glucose

葡萄糖奇异控制策略下的丙酮酸发酵过程曲线如图 4 B 所示。与丙酮酸分批发酵(图 4 A)比较, 结果列于表 2。

对图 4 和表 2 分析表明, 葡萄糖奇异控制策略下的发酵过程, 较低的葡萄糖使细胞以较高的比生长速率生长并迅速进入快速产酸阶段; 在过渡阶段, 菌体浓度快速接近最大值, 进而促使碳流由菌体生长转向丙酮酸合成; 在奇异控制阶段, 维持葡萄糖浓度 $S^*=33.4$ g/L, 丙酮酸对葡萄糖的产率达到最大值(0.71 g/g), 进一步提高丙酮酸产率和生产强度。在总葡萄糖浓度相同的条件下, 采用葡萄糖奇异控制策略的丙酮酸发酵, 与分批发酵过程相比: (1) 发酵周期缩短了 5 h; (2) 细胞干重提高了 24.8%(18.1

g/L); (3) 细胞平均比生长速率和葡萄糖比消耗速率分别提高了 22.9%和 20.7%; (4)丙酮酸浓度、产率和和生产强度分别提高了 21.3%、21.6%和 29.9%。

3 结论

对不同葡萄糖浓度丙酮酸分批发酵过程建立动力学模型并进行分析, 表明葡萄糖浓度是影响细胞生长和丙酮酸高效积累的关键因素, 光滑球拟酵母在不同发酵阶段对葡萄糖需求不尽相同。提出了不同发酵阶段控制与之适宜的葡萄糖浓度的奇异控制流加策略。使最终丙酮酸浓度、产率和和生产强度分别提高了 21.3%、21.6%和 29.9%。这一结果表明, 根据不同发酵阶段微生物细胞表观特性的差异, 调

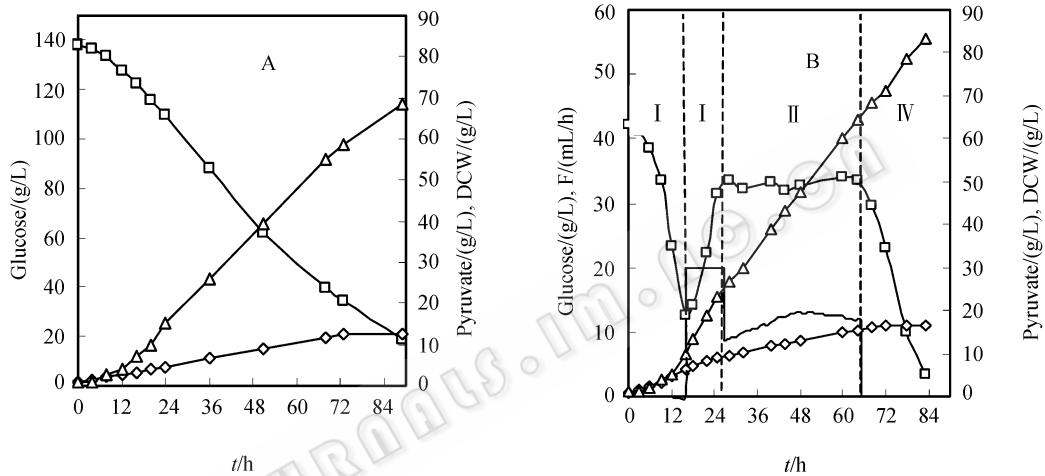


图4 葡萄糖浓度相同时分批发酵和准优化流加发酵的过程比较

Fig. 4 Comparison of batch culture (A) and fed-batch culture (B) based on kinetic model

Glucose; Δ Pyruvate; \diamond DCW; - F(feeding rate)

表 2 丙酮酸流加发酵与分批发酵的比较

Table 2 Comparison of batch culture and model based culture

Parameters	Batch culture (A)	Model based culture (B)	(B/A-1)×100%
Initial glucose concentration/(g/L)	138.7	42.5	
Residual glucose concentration/(g/L)	19.8	3.6	
Total consumed glucose/(g/L)	118.9	135.1	
Culture time/h	88	83	
Maximum dry cell weight/(g/L)	14.5	18.1	24.8%
Maximum pyruvate concentration/(g/L)	68.5	83.1	21.3%
Average specific growth rate (μ)/(h ⁻¹)	0.048	0.059	22.9%
Average glucose consumption rate/[(g/(L·h))]	1.35	1.63	20.7%
Cell productivity/[g/(L·h)]	0.16	0.22	37.5%
Pyruvate productivity/[g/(L·h)]	0.77	1.00	29.8%
Cell yield on glucose/(g/g)	0.10	0.13	30%
Pyruvate yield on glucose/(g/g)	0.51	0.62	21.5%
Pyruvate yield on cell/(g/g)	5.07	4.86	-4.1%

控适宜的环境条件, 强化微生物的过程功能, 提高目标代谢产物生产效率的研究策略对其他的工业生物过程具有一定的指导意义。

REFERENCES

- [1] Bailey JE. Towards a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**: 1668–1674.
- [2] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, **409**: 258–268.
- [3] Lin H, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng*, 2005, **7**: 116–127.
- [4] Causey TB, Shanmugam KT, Yomano L P, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *PNAS*, 2004, **101**: 2235–2240.
- [5] Wang QH, He P, Lu DJ, *et al.* Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for improved pyruvate production. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**: 832–839.
- [6] Li Y, Cao ZA. Microbial metabolic engineering: gateway to develop blueprint for cell factory. *J Chem Industry and Engineering(China)*, 2004, **55**: 1573–1580.
李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图. *化工学报*, 2004, **55**: 1573–1580.
- [7] Li Y, Hugenholtz J, Chen J, *et al.* Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 101–106.
- [8] Wang CH, Li YY, *et al.* Effects of temperature on the kinetics and level of energy charge and oxidation reduction state in pyruvate biosynthesis. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22** (2): 316–321.
王翠华, 李友元 等. 温度对丙酮酸生物合成动力学、能荷和氧化-还原度的影响. *生物工程学报*, 2006, **22**(2): 316–321.
- [9] Bruno Zelic, Srdan Gostovic, Ralf Takors, *et al.* Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: From repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **6** (85): 638–646.
- [10] Liu LM, Xu QL, Li Yin, *et al.* Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **4** (97): 825–832.
- [11] Liu LM, Li Y, Chen J, *et al.* Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD⁺ availability. *J Biotechnol*, 2006, **2** (126): 173–185.
- [12] Liu LM, Du GC, LiY, Chen J. Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation. *J Appl Microbiol*, 2006, **100** (5): 1043–1053.
- [13] Li Y, Chen J, Lun SY, *et al.* Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**: 680–685.
- [14] Liu LM, Li Y, Li HZ, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39**: 199–206.
- [15] Zeng AP. A kinetic model for product formation of microbial and mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**: 314–324.
- [16] Batt BC, Kompala, DS. A structured kinetic modeling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1989, **34**: 515–531.
- [17] Gaden EL. Fermentation kinetics and productivity. *J Biochem Microbiol Technol*, 1959, **1** (4): 413–429.
- [18] Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** (4): 1004–1011.
- [19] Gong H, Lun SY. The kinetics of lysine batch fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, **12**: 219–225.
宫衡, 伦世仪. 赖氨酸分批发酵动力学的研究. *生物工程学报*, 1996, **12**: 219–225.
- [20] Gong H, Lun SY. Optimization of lysine fed-batch fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, **12**(4): 482–488.
宫衡, 伦世仪. 赖氨酸流加发酵最优控制的研究. *生物工程学报*, 1996, **12** (4): 482–488.

《生物工程学报》2008年新网页、新系统正式开通

伴随着新年的钟声,《生物工程学报》以崭新的面貌迎来2008年。继我刊改为月刊之后,2008年1月1日又将更新网页,开通新的稿件处理系统,新网址为 <http://journals.im.ac.cn/cjbcn>,欢迎广大作者、读者和审稿专家登陆浏览。

为保证新旧系统的平稳过渡,我们将保留原系统一段时间,在新址首页设置“旧版入口”,作者和审稿专家若需要查询或审阅2007年12月29日之前投来的稿件(即编号带有gc2007-前缀的稿件),请从这里点击进入。相信新的系统将使稿件处理更加方便快捷,但因为使用初期有一个磨合的过程,可能会给您带来一些不便,对此我们深表歉意。

您在使用过程中有任何问题,或者有任何建议和意见,欢迎随时与编辑部联系。

电话: 010-64807509; E-mail: cjb@im.ac.cn。

《生物工程学报》编辑部