

循环利用重组大肠杆菌细胞转化合成丁二酸

徐冰, 姜岷, 马江锋, 刘树文, 侯顾伟, 隋姗姗

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 研究了回收丁二酸发酵液中的大肠杆菌进行细胞转化的可行性, 以转化率和生产效率为指标, 考察了不同菌体浓度、底物浓度、pH 调节剂对细胞转化的影响。发酵结果表明大肠杆菌可以在仅含有葡萄糖和 pH 调节剂的水环境中转化生产丁二酸, 并确定了最佳的转化条件为: 细胞浓度 (OD_{600})50, 底物浓度 40 g/L, 缓冲盐为 $MgCO_3$ 。基于优化好的条件, 在 7 L 发酵罐中进行重复批次转化, 第 1 次转化的转化率和生产效率分别达到 91% 和 3.22 g/(L·h), 第 2 次转化的生产效率和转化率达到 86% 和 2.04 g/(L·h), 第 3 次转化的转化率和生产效率分别达到了 83% 和 1.82 g/(L·h)。

关键词: 丁二酸, 重复批次转化, 大肠杆菌, 两阶段发酵

Reuse of recombinant *Escherichia coli* to produce succinic acid by bioconversion

Bing Xu, Min Jiang, Jiangfeng Ma, Shuwen Liu, Guwei Hou, and Shanshan Sui

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: The possibility of reusing *Escherichia coli* cells from the broth for succinic acid production was investigated. Using succinic acid yield and productivity as criterion, we investigated the effects of cell concentration, initial glucose concentration, different neutralizers on the bioconversion. The results revealed that *E. coli* could convert glucose to succinic acid in a water solution of glucose and a neutralizer. According to the results, the optimal condition was as follows: the cell concentration was 50 (OD_{600}), glucose concentration was 40 g/L and neutralizer was $MgCO_3$. Under the optimum conditions, we carried out the consecutive batch bioconversion in 7 L fermenter. Succinic acid yield reached 91% with the productivity of 3.22 g/(L·h) for the first conversion. For the second conversion, succinic acid yield reached 86% with productivity of 2.04 g/(L·h). Furthermore, we achieved a high mass yield above 83% with the productivity of 1.82 g/(L·h) for the third bioconversion.

Keywords: succinic acid, consecutive batch bioconversion, *Escherichia coli*, two-stage fermentation

丁二酸, 俗称琥珀酸, 是三羧酸循环的中间代谢产物, 广泛存在于动物、植物及微生物中。作为一种重要的 C4 平台化合物, 丁二酸广泛应用于化工、医药、食品等行业^[1]。利用生物转化可再生资

Received: March 11, 2010; **Accepted:** July 19, 2010

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2011CB707405), National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, “Qinglan Project” of Jiangsu Province, “The Six Talent Summit” of Jiangsu Province (No. 06-A-047).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-83172075; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB707405), 国家自然科学基金项目 (No. 21076105), 材料化学工程国家重点实验室基金, 江苏省“青蓝工程”, 江苏省“六大人才高峰” (No. 06-A-047) 资助。

源生产丁二酸, 以其原料来源广泛、污染小、环境友好、且在发酵过程中固定二氧化碳等优点, 近年来成为国内外关注的热点^[2]。

丁二酸的生产菌株有很多, 主要有产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes*、产琥珀酸曼式杆菌 MBEL55E *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E 以及产琥珀酸厌氧螺杆菌 *Anaerobiospillum succiniciproducens*^[3]。大肠杆菌由于遗传背景清楚、易操作、培养基要求简单和生长迅速等优点, 近年来被广泛用于研究获得产丁二酸的优秀菌株^[4]。大肠杆菌 AFP111 是 NZN111 的自发突变株, 可以进行两阶段发酵, 即在有氧阶段生长菌体, 厌氧阶段发酵并积累高浓度丁二酸^[5-6]。Vemuri 等^[6]通过优化有氧阶段的时间, 获得最终丁二酸产量和生产强度分别是 99.2 g/L 和 1.3 g/(L·h)。姜岷等^[7]通过控制有氧阶段较低的糖浓度, 获得最终丁二酸产量和生产效率为 101.2 g/L 和 1.89 g/(L·h)。重复批次发酵, 即在发酵结束后回收发酵液中的细胞, 转入新鲜培养基, 继续发酵, 进行重复批次生产。重复批次发酵可以延长菌体的发酵时间, 提高产物的总产量, 达到细胞重复利用的效果。重复批次发酵在乙醇生产过程中应用较多, 如李凡等^[8]利用自絮凝酵母重复批次发酵乙醇, 获得了连续生产高浓度乙醇的工艺。大肠杆菌发酵丁二酸后期, 由于产物抑制作用, 产物增加不再明显, 但是细胞仍具有较高发酵能力。因此, 回收细胞, 进行重复批次发酵具有重要意义。

本文根据丁二酸发酵液的主要特点, 回收发酵液中菌体, 进行了重复批次发酵。每批次发酵采用细胞转化的方法, 即将回收的细胞悬浮无菌水中, 仅补加葡萄糖和碳酸镁, 然后进行厌氧发酵, 并考察了细胞浓度、初始葡萄糖浓度、pH 调节剂对细胞转化的影响。相比于两阶段发酵, 细胞转化节约了氮源和细胞生长期的能量消耗。重复批次转化循环利用菌体, 延长丁二酸发酵时间, 提高丁二酸总产量, 有利于丁二酸的工业化生产。

1 材料与方法

1.1 菌株

AFP111 [F+ λ -*rpoS396*(Am) *rph-1* Δ (*pflAB*::Cam)

ldhA::Kan 95 *ptsG*], 由 David P. Clark 教授 (Southern Illinois University) 惠赠。

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 种子培养基

蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min; 卡那霉素 30 mg/L, 氯霉素 30 mg/L, 过滤除菌后加入。

1.2.2 发酵培养基

柠檬酸 3 g/L, Na₂HPO₄·7H₂O 3 g/L, KH₂PO₄ 8 g/L, NH₄Cl 0.2 g/L, (NH₄)₂HPO₄ 0.75 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, CaCl₂·2H₂O 10.0 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg/L, CuCl₂·2H₂O 0.25 mg/L, MnSO₄·H₂O 2.5 mg/L, CoCl₂·6H₂O 1.75 mg/L, H₃BO₃ 0.12 mg/L, Al₂(SO₄)₃ 1.77 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.5 mg/L, 柠檬酸铁 16.1 mg/L, 121℃灭菌 15 min; 维生素 B₁ 20 mg/L, 生物素 2 mg/L, 卡那霉素 30 mg/L, 氯霉素 30 mg/L, 过滤除菌后加入。

1.2.3 转化培养基

转化培养基的主体是无菌水, 流加葡萄糖作为碳源, 并补加 MgCO₃、Na₂CO₃、NaHCO₃ 或者 CaCO₃ 中的一种调节 pH。

1.3 方法

1.3.1 种子培养

将保存于-80℃冰箱的菌种以 1% 的接种量接至 250 mL 三角瓶装液量为 30 mL 的好氧培养基中, 37℃、200 r/min 过夜培养作为一级种子。将一级种子以 1% 的接种量再次转接至 30 mL 好氧培养基中 37℃、200 r/min 培养 5~6 h 作为二级种子。

1.3.2 两阶段发酵

两阶段发酵的培养基采用发酵培养基, 在 7 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter; New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.) 中进行, 装液量 3 L, 接种量 5%, 温度 37℃。有氧阶段控制葡萄糖初始浓度 20 g/L, 当菌体浓度达到 20 (*OD*₆₀₀), 此时发酵液中葡萄糖浓度为零, 流加 800 g/L 葡萄糖, 控制菌体的相对生长速率为 0.7/h, 直到菌体浓度达到 30 (*OD*₆₀₀), 10 mol/L NaOH 调至 pH 6.8; 厌氧阶段通无菌 CO₂, 通气量 0.5 L/min, 并且加入间歇性添加 MgCO₃ 调至 pH 6.4~6.8 之间, 采用分批补糖方式,

控制初始糖为 40 g/L, 当葡萄糖浓度低于 10 g/L, 补加至 40 g/L。

1.3.3 细胞回收

两阶段发酵结束, 收集发酵液, 离心获得细胞 (5 000 r/min, 10 min, 4°C), 用双蒸水悬浮后转入发酵罐进行转化实验。

1.3.4 细胞转化

在 7 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter; New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.) 中细胞悬浮液, 并补加无菌水至总体积为 3 L, 温度 37°C, 转速 200 r/min, 通无菌 CO₂, 通气量 0.5 L/min, 碳酸镁调至 pH 6.4~6.8 之间。采用分批补糖方式, 控制初始糖浓度为 40 g/L, 当葡萄糖浓度低于 10 g/L, 补加至 40 g/L。

1.3.5 分析方法

葡萄糖的测定: 生物传感分析仪 (SBA240C, 山东省科学院生物研究所)。

菌体密度的测定: 紫外可见分光光度计

(Spectrumlab 752S) 于 600 nm 处测定吸光值 (OD_{600})。

发酵液中有机酸的测定: 高效液相 (Ultimate3000, Dionex, America; Alltech 反相 Prevail 有机酸色谱柱; 流动相: 25 mmol/L KH₂PO₄; pH 2.5; 流动相流速: 1 mL/min; 紫外检测波长: 215 nm; 进样量 20 μ L; 柱温为 25°C)。

1.3.6 酶活测定

磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 (PCK) 酶活测定条件及反应体系见文献[9]。

2 结果

2.1 细胞转化的可行性

考察菌体细胞在转化培养基中的发酵能力, 对细胞转化和厌氧发酵的结果进行比较。有氧阶段结束后, 取出一部分发酵液, 离心回收菌体, 并进行细胞转化, 剩余发酵液进行厌氧发酵。葡萄糖的消耗速率小于 0.5 g/(L·h) 时, 终止转化和发酵, 主要数据见表 1。

表 1 两阶段发酵和细胞转化产酸比较

Table 1 Production of succinic acid by dual-phase fermentation and bioconversion^a

| | Biomass (OD_{600}) | Succinic acid (g/L) | Acetic acid (g/L) | Succinic acid productivity (g/(L·h)) | Succinic acid Yield ^a (%) |
|---------------|------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fermentation | 28.8±0.8 | 101.21±0.17 | 3.40±0.09 | 1.61 | 96.1 |
| Bioconversion | 27.2±0.5 | 85.32±0.11 | 2.76±0.06 | 1.57 | 93.2 |

a: Succinic acid yield is defined as the percentage of the concentrations of succinic acid in consumed glucose.

从表 1 中可知, 回收的细胞可以在转化培养基中细胞转化生产丁二酸。虽然最终丁二酸的浓度降低, 但是收率和生产强度与厌氧发酵相当。表明细胞在简单的水环境中仍然能保持细胞活性及胞内丁二酸合成相关酶的活力。

2.2 葡萄糖浓度对全细胞转化的影响

转化培养基中分别添加 20、32、40、52、68、87 g/L 葡萄糖, 转化结束后测定丁二酸产量、乙酸产量及丁二酸转化率的变化, 结果见图 1。

由图 1 可知, 随着葡萄糖浓度的提高, 丁二酸的终浓度也增加, 但转化率下降。当葡萄糖的浓度高于 52 g/L, 丁二酸产量增加不再明显, 且转化率下降明显, 乙酸积累增加。因此, 控制葡萄糖的浓度低于 52 g/L, 有利于提高细胞转化的效率和保持细胞的活性。

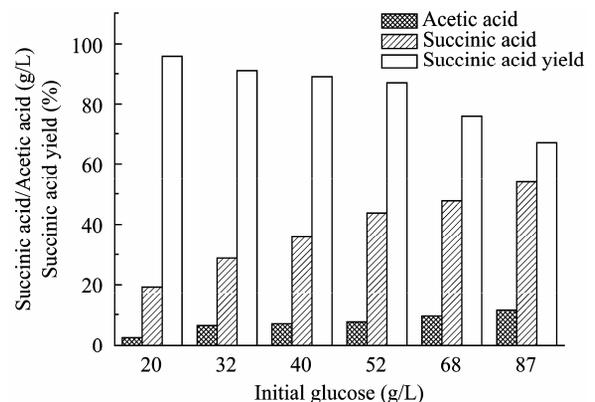


图 1 不同初糖浓度对细胞转化的影响

Fig. 1 Effects of initial glucose concentration on production of succinic acid bioconversion using in sealed serum bottle.

2.3 菌体浓度对细胞转化的影响

控制转化过程中细胞浓度 (OD_{600}) 在 19、38、55、70、86, 转化结束后测定丁二酸转化率及生产

效率, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 随着转化体系中细胞浓度的增加, 丁二酸的生产强度增加, 但是产物转化率不断降低。当细胞浓度 (OD_{600}) 大于 55 时, 产物转化率降低明显, 且乙酸产量增加。因此, 控制细胞浓度 (OD_{600}) 在 50 左右, 既有利于提高丁二酸生产效率, 又保持了较高的转化率。

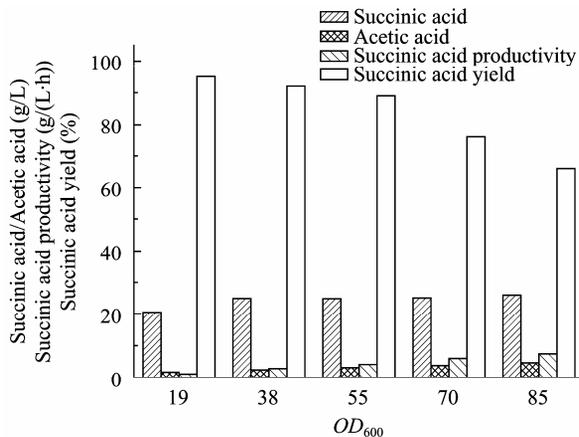


图 2 不同细胞浓度对细胞转化的影响

Fig. 2 Effects of initial cell concentration on production of succinic acid by bioconversion in sealed serum bottle.

2.4 不同缓冲盐对转化的影响

细胞转化过程中, 加入 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 MgCO_3 、 CaCO_3 调节 pH, 控制初糖浓度在 20 g/L, 结果见表 2。

由表 2 可以看出, MgCO_3 作为 pH 调节剂时, 丁二酸的生产强度和收率最大。 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 效果相近, 但由于 1 分子 Na_2CO_3 可以和 2 分子 H^+ 反应, 其用量较 NaHCO_3 少。使用 CaCO_3 时, 细胞利用葡萄糖的能力大幅下降, 有大量残糖。

表 2 不同缓冲盐对全细胞转化的影响

Table 2 Influence of the neutralizers on whole-cell bioconversion

| Neutralizer | MgCO_3 | Na_2CO_3 | CaCO_3 | NaHCO_3 |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|------------------|
| Succinic acid (g/L) | 19.7±0.5 | 14.5±0.6 | 3.3±0.5 | 10.6±0.6 |
| Succinic acid productivity (g/(L·h)) | 3.42 | 2.90 | 0.66 | 2.12 |
| Succinic acid yield ^a (%) | 98.5 | 87.1 | 47.4 | 82.2 |

a: succinic acid yield is defined as the percentage of the concentrations of succinic acid in consumed glucose.

2.5 发酵罐中试验

基于优化好的转化条件, 在 7 L 发酵罐中试验, 考察转化次数对结果的影响。当葡萄糖的消耗速率小于 0.5 g/(L·h), 停止转化, 回收细胞进行下一次转化。考虑到细胞浓度降低的影响, 重复进行 3 次转化, 结果如图 3。

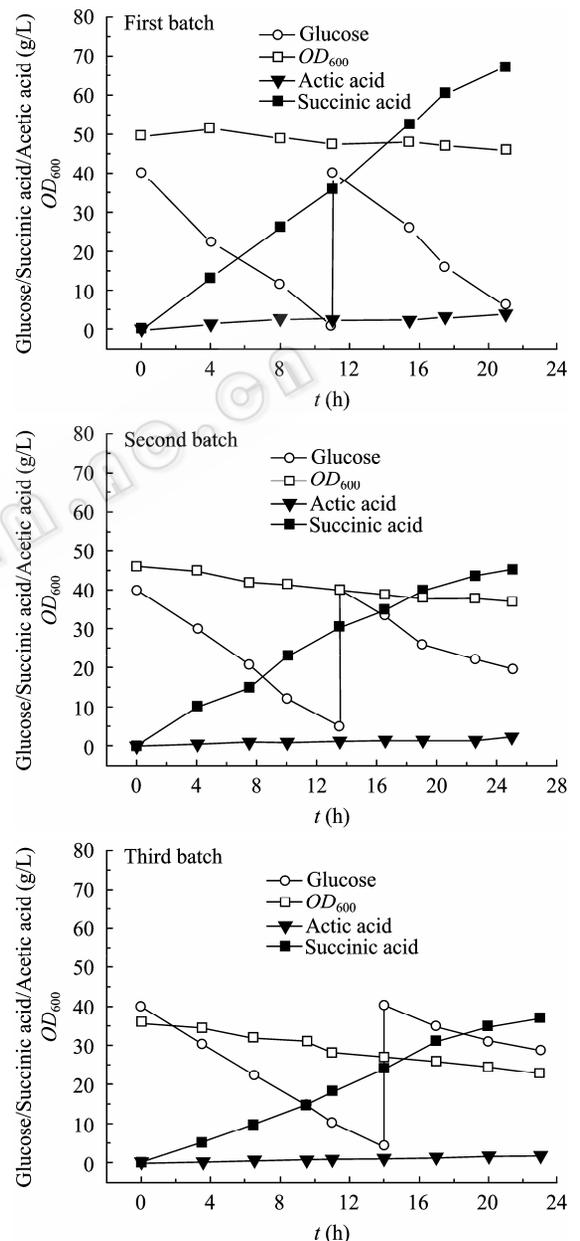


图 3 发酵罐中转化次数对转化的影响

Fig. 3 Time course of cell apoptosis and production of organic acids with in a stirred bioreactor by whole-cell conversion.

由图 3 可以看出, 第 1 次转化, 丁二酸的生产效率和转化率分别达到 3.22 g/(L·h) 和 91%, 丁二酸最终浓度达到 67.7 g/L, 细胞浓度略有降低。第 2 次

转化, 丁二酸生产效率和转化率分别是 2.04 g/(L·h) 和 86%, 最终的丁二酸浓度达到 45.6 g/L, 发酵液中残存 20 g/L 的葡萄糖, 但是细胞浓度 (OD_{600}) 降低明显。第 3 次转化, 丁二酸的生产效率和转化率持续降低, 分别是 1.82 g/(L·h) 和 83%, 丁二酸最终浓度为 36 g/L。由于细胞浓度 (OD_{600}) 降到了 25, 因此终止转化。

2.6 酶活测定

从 7 L 发酵罐中试验可以看出, 随着重复转化次数的增加, 菌体的发酵能力逐渐降低。为了考察菌体发酵能力降低的原因, 在厌氧阶段和每次转化初期, 分离发酵液中的细胞, 测定丁二酸代谢途径中主要酶 PCK 的活性。

酶活测定的结果显示, 厌氧发酵初期 PCK 的活性为 1.96 U/mg, 第 1 次和第 2 次转化初期 PCK 的活性分别为 1.24 U/mg 和 0.75 U/mg, 最后 1 次转化初期 PCK 的活性为 0.42 U/mg, 呈逐渐下降的趋势。

3 讨论

本实验首先考察了细胞转化发酵生产丁二酸的可行性, 结果表明回收的细胞可以在简单的水环境中转化葡萄糖合成丁二酸, 表明细胞能够维持整个丁二酸生产途径相关酶的活性。相比于两阶段发酵, 离心细胞进行细胞转化, 其丁二酸生产效率都有所下降。原因可能是离心过程中对细胞产生了一定的破坏, 以及外部环境的改变导致其发酵能力降低。

通过对葡萄糖初始浓度的考察, 表明随着葡萄糖初始浓度的增加, 丁二酸的转化率降低, 乙酸的产率增加。出现这种现象的原因可能是高浓度葡萄糖会产生高渗透压, 葡萄糖利用酶系活性降低^[10], 代谢途径中的关键酶受到抑制使代谢途径改变生成其他物质^[11-12], 比如乙酸。高浓度的细胞可以产生较高的生产效率, 但是会加速细胞衰亡, 导致细胞发酵能力降低^[13]。另外高浓度的细胞需要大量的能量来维持细胞的活性, 更多的碳源转向能量合成的相关途径, 比如从丙酮酸到乙酸途径, 因而乙酸的产量增加。

影响转化的另外一个重要因素是 pH 调节剂的种类。本文考察了转化过程中几种不同缓冲盐的效

果, 结果表明 $MgCO_3$ 的效果最好。因为 Mg^{2+} 可以和丁二酸结合生成络合物, 减小了丁二酸的浓度, 进而减小了细胞内外的渗透压和产物抑制作用^[14]。另外丁二酸的合成需要固定大量的二氧化碳, 而 $MgCO_3$ 分解生成的二氧化碳可以增加发酵液中二氧化碳的溶解度, 有助于丁二酸的合成。

在重复转化过程中, 随着转化次数的增加, 丁二酸的最终浓度、生产效率和转化率逐渐降低。细胞浓度减小是导致生产效率降低的主要原因之一; 重复的离心对细胞造成伤害, 也会降低其发酵能力; 另外, 丁二酸合成途径中的关键酶是在有氧阶段诱导的, 在长期的厌氧环境中逐渐失去部分活性。酶活测定结果显示, 在厌氧发酵初期, PCK 的活性较高, 但随着转化次数的增加, 其活性逐渐减低。

本文主要研究了在仅含有葡萄糖和 $MgCO_3$ 的培养基中, 利用发酵液中回收细胞转化葡萄糖生产丁二酸, 并进行了重复批次转化。重复批次转化策略延长了厌氧发酵时间, 增加了产物的总产量, 提高了总的生产效率。

REFERENCES

- [1] Willke T, Vorlop KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **66**: 131-142.
- [2] Schilling LB. Chemicals from alternative feedstocks in the United States. *FEMS Microbiol Rev*, 1995, **16**: 101-110.
- [3] Songa H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**: 352-361.
- [4] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 727-740.
- [5] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E, et al. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1715-1727.
- [6] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E, et al. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, **28**: 325-332.

