

细胞工厂与发酵工程

碳源和氮源对 5-酮基-葡萄糖酸生成的影响

谭之磊, 王洪翠, 魏彧翹, 李艳艳, 钟成, 贾士儒

天津科技大学生物工程学院 教育部工业发酵微生物重点实验室, 天津 300457

谭之磊, 王洪翠, 魏彧翹, 等. 碳源和氮源对 5-酮基-葡萄糖酸生成的影响. 生物工程学报, 2014, 30(1): 76-82.

Tan ZL, Wang HC, Wei YQ, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on 5-keto-gluconic acid production. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 76-82.

摘要: 氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* 可以将葡萄糖氧化成葡萄糖酸, 并进一步氧化成 2-酮基-葡萄糖酸(2KGA)和 5-酮基-葡萄糖酸(5KGA), 其中 5KGA 在催化剂的作用下能够转化为 L(+)-酒石酸。为了提高 5-酮基-葡萄糖酸产量, 以仅生成 5KGA 的氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 为出发菌株, 研究不同碳源(蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、葡萄糖)和有机氮源(酵母浸粉、鱼粉、玉米浆、黄豆饼粉、棉籽饼粉)对 5KGA 产量的影响。500 mL 摇瓶试验结果表明, 当葡萄糖浓度为 100 g/L 时, 5KGA 产量最高为 98.20 g/L; 当有机氮源为酵母浸粉、鱼粉和玉米浆, 其添加量的蛋白含量为 1.60% 时, 5KGA 产量分别为 100.20 g/L、109.10 g/L 和 99.83 g/L, 其中, 使用鱼粉的 5KGA 产量最高, 使用玉米浆的 5KGA 产量比酵母浸粉略低。出于经济考虑, 文中选择玉米浆作有机氮源, 并在 5 L 发酵罐中进行分批发酵放大试验, 5KGA 的产量为 93.80 g/L, 最大生成速率为 3.48 g/(L·h), 平均生成速率为 1.56 g/(L·h)。结果表明, 葡萄糖和玉米浆分别为 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 规模化生产 5KGA 的最适碳源和氮源, 可利用葡萄糖几乎全部(85.93%)转化为 5KGA。

关键词: 氧化葡萄糖杆菌 HGI-1, 5-酮基-葡萄糖酸, 碳源, 氮源, 分批发酵

Effects of carbon and nitrogen sources on 5-keto-gluconic acid production

Zhilei Tan, Hongcui Wang, Yuqiao Wei, Yanyan Li, Cheng Zhong, and Shiru Jia

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *Gluconobacter oxydans* is known to oxidize glucose to gluconic acid (GA), and subsequently, to

Received: June 23, 2013; **Accepted:** October 10, 2013

Supported by: Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT1166).

Corresponding author: Shiru Jia. Tel: +86-22-60601598; E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

长江学者和创新团队发展计划(No. IRT1166)资助。

2-keto-gluconic acid (2KGA) and 5-keto-gluconic acid (5KGA), while 5KGA can be converted to L-(+)-tartaric acid. In order to increase the production of 5KGA, *Gluconobacter oxydans* HGI-1 that converts GA to 5KGA exclusively was chosen in this study, and effects of carbon sources (lactose, maltose, sucrose, amyllum and glucose) and nitrogen sources (yeast extract, fish meal, corn steep liquor, soybean meal and cotton-seed meal) on 5KGA production were investigated. Results of experiment in 500 mL shake-flask show that the highest yield of 5KGA (98.20 g/L) was obtained using 100 g/L glucose as carbon source. 5KGA reached 100.20 g/L, 109.10 g/L, 99.83 g/L with yeast extract, fish meal and corn steep liquor as nitrogen source respectively, among which the optimal nitrogen source was fish meal. The yield of 5KGA by corn steep liquor is slightly lower than that by yeast extract. For the economic reason, corn steep liquor was selected as nitrogen source and scaled up to 5 L stirred-tank fermentor, and the final concentration of 5KGA reached 93.80 g/L, with its maximum volumetric productivity of 3.48 g/(L·h) and average volumetric productivity of 1.56 g/(L·h). The result obtained in this study showed that carbon and nitrogen sources for large-scale production of 5KGA by *Gluconobacter oxydans* HGI-1 were glucose and corn steep liquor, respectively, and the available glucose almost completely (85.93%) into 5KGA.

Keywords: *Gluconobacter oxydans* HGI-1, 5-keto-gluconic acid, carbon source, nitrogen source, batch culture

L(+)-酒石酸是一种天然有机酸,其他旋光性酒石酸在自然界尚未被发现^[1],其盐类较稳定,应用广泛。在食品和饮料中可用作食品添加剂,如酸味剂和膨化剂,酸味值约为柠檬酸的 1.3 倍,而且是葡萄酒生产过程中唯一一种允许添加的酸味剂^[2],对葡萄酒的味道及口感有很重要的影响^[3];在医药方面,可作外科绷带硬化剂、药物拆分剂和酒石酸异丁嗪等药品的成盐剂^[4];在纺织工业上,用作酸性还原剂^[5]。此外,还可作印染的防染剂、照相显影剂^[6]以及应用于电镀、制革^[7]等行业。酒石酸的生产方法主要有提取法^[8]、半生物合成法^[9-10]和酶法^[11],目前国内生产 L(+)-酒石酸主要是采用酶法,利用微生物转化顺式环氧琥珀酸^[11]的方法,能产生顺式环氧琥珀酸水解酶的菌种^[12-13]有很多,其常用生产菌种主要是棒状杆菌^[14]和诺卡氏菌^[15],此工艺的底物为顺式环氧琥珀酸,其来源复杂^[16],安全性低,耗能高。氧化葡萄糖杆菌^[17]*Gluconobacter oxydans* 可以将葡萄糖氧化成葡萄糖酸,并进一步氧化成 2-酮基-葡萄糖酸(2KGA)和 5-酮基-葡萄糖酸^[9](5KGA),其中 5KGA 在催化剂^[10]的作用下能够转化为 L(+)-酒石酸^[18],此方法改善了以上不足之处。Helmut Görisch 等^[19-20]筛选出一株核黄素依赖型

GA-2-DH 酶活缺失型突变株 *Gluconobacter oxydans* MF1,此突变株不生成 2KGA,使 5KGA 的转化率达到 84%。文中以不生成 2KGA 的氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 为生产菌株,研究不同碳源和氮源对 5KGA 生成的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种

氧化葡萄糖杆菌 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 由日本玉川大学 Tatsuo Hoshino 教授赠送。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L):甘露醇 25,酵母浸粉 5,蛋白胨 3。

摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖 100,玉米粉 3,酵母浸粉 1.67, NH₄Cl 1.50, KH₂PO₄ 0.10, MgSO₄·5H₂O 0.25, MnSO₄·5H₂O 0.03, CaCO₃ 30。

发酵罐发酵培养基(g/L):葡萄糖 100,玉米粉 3,酵母浸粉 1.67, NH₄Cl 1.50, KH₂PO₄ 0.10, MgSO₄·5H₂O 0.25, MnSO₄·5H₂O 0.03, CaCO₃ 0.34。

1.2 培养和检测方法

1.2.1 种子液制备

从斜面上挑取两环菌种于液体种子培养基

中, 摇床 (30 °C, 180 r/min) 培养 20 h。

1.2.2 摇瓶培养

500 mL 三角瓶装液量为 50 mL, 接种量为 10%, 摇床 (30 °C, 180 r/min) 培养 72 h。

1.2.3 5 L 发酵罐放大培养

采用 5 L 全自动发酵罐 (BLBIO-XGJG, 上海百仑生物科技有限公司), 培养基装液量为 3 L, 接种量为 10%(V/V), 在发酵过程中, 控制温度为 30 °C, 搅拌转速为 750 r/min, 通气速率为 1 vvm, 自动流加 6 mol/L KOH 控制发酵过程中的 pH 在 5.50, 葡萄糖浓度降至 0 g/L 时, 不再控制 pH。发酵过程由发酵罐控制系统软件进行在线控制和数据采集。

1.2.4 5-酮基-D-葡萄糖酸的测定

采用高效液相色谱仪(型号:1100, 安捷伦(中国)有限公司)测定 5-酮基-D-葡萄糖酸的含量。具体条件: 反相色谱柱 Themom BDS C18 (4.6 mm ID×250 mm), 流动相为 10 mmol/L HClO₄^[21], 流速 0.5 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。

2 结果与分析

2.1 碳源对 5KGA 生产的影响

2.1.1 碳源种类对 5KGA 产量的影响

分别以初始浓度为 100 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉作碳源, 三角瓶振荡培养 72 h。由图 1 可知, 当碳源分别为乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉和葡萄糖时, 5KGA 的产量分别为 16.50、11.90、25.00、45.60 和 98.20 g/L, 其中葡萄糖为碳源时 5KGA 产量最高, 这可能是由于蔗糖、麦芽糖、乳糖为二糖, 可溶性淀粉为多糖, 不易被菌体利用, 菌体利用上述碳源时, 需先将其水解为单糖, 才能被菌体利用生成 5KGA。而葡萄糖能被直接菌体利用, 更有利于 5KGA 的生成, 因此选用葡萄糖作碳源。

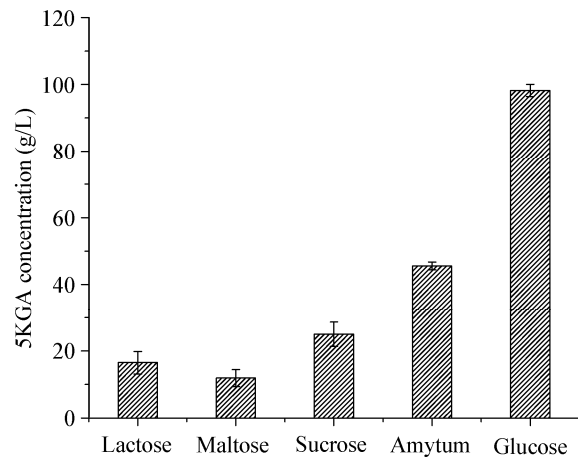


图 1 不同碳源对 5KGA 产量的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources on the 5-keto-gluconic acid production.

2.1.2 葡萄糖浓度对 5KGA 产量的影响

选择葡萄糖初始浓度分别为 60、80、100、120 和 140 g/L, 三角瓶振荡培养 72 h。由图 2 可知, 当葡萄糖浓度在 60–100 g/L 时, 5KGA 的产量随葡萄糖浓度的增大而增大, 100 g/L 时最高为 98.21 g/L, 而当葡萄糖浓度再增大时 5KGA 的产量反而下降, 这说明较低或较高的葡萄糖浓

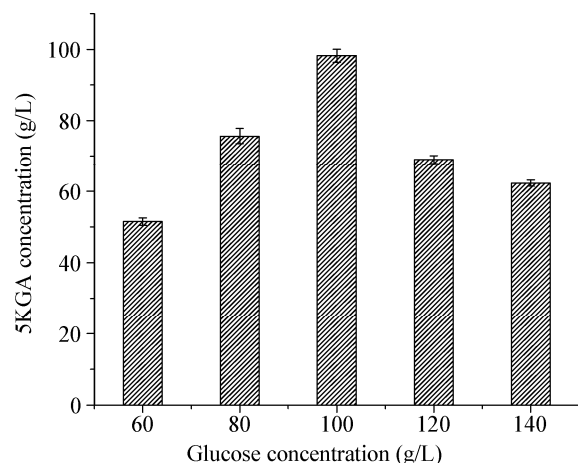


图 2 不同葡萄糖浓度对 5KGA 产量的影响

Fig. 2 Effects of different glucose concentrations on the 5-keto-gluconic acid production.

度皆不适宜 5KGA 的生成,这可能是由于高浓度的葡萄糖抑制了菌体的生长^[22],从而影响了 5KGA 的生成。

2.2 有机氮源对 5KGA 生产的影响

2.2.1 有机氮源种类对 5KGA 产量的影响

以鱼粉、玉米浆、黄豆饼粉和棉籽饼粉为氮源,其蛋白含量分别为 55%、40%、38%和 40%,按蛋白终含量为 1.20%分别添加 2.20、3.00、3.15 和 3.00 g,以酵母粉为(蛋白含量为 68%)对照,其添加量为 1.67 g/L,三角瓶振荡培养 72 h。由图 3 可知,当使用酵母粉作氮源时,5KGA 产量为 98.21 g/L。当使用鱼粉、玉米浆、黄豆饼粉、棉籽饼作有机氮源时,5KGA 产量分别为 101.40、79.20、70.10 和 62.10 g/L。鱼粉和玉米浆作氮源产量较黄豆饼粉、棉籽饼高。鱼粉作氮源时产量超过酵母粉作氮源时的产量,虽然差异未达到显著性水平(数据未列出),但考虑到鱼粉和玉米浆的价格优势,有望作为工业化生产氮源。

2.2.2 鱼粉、玉米浆起始浓度对 5KGA 产量的影响

分别添加鱼粉(1.50/2.20/3 g)、玉米浆(2/3/4 g)

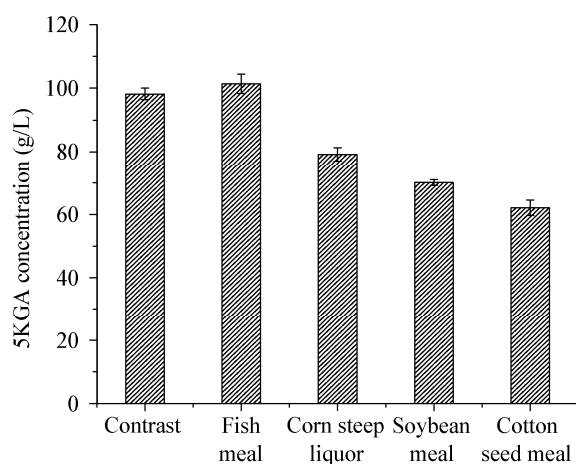


图 3 不同氮源对 5KGA 产量的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on the 5-keto-gluconic acid production.

作为氮源,其最终蛋白含量分别为 0.80%、1.20%和 1.60%,三角瓶振荡培养 72 h。由图 4 可知,当培养基中蛋白含量为 1.60%时,鱼粉作有机氮源,5KGA 产量最高为 109.10 g/L,其次是使用玉米浆时,5KGA 产量最高为 93.80 g/L。考虑到玉米浆作氮源与鱼粉作氮源 5KGA 产量接近,但价格仅为鱼粉的 40%左右,文中选择了玉米浆为氮源,进一步做了 5 L 发酵罐放大研究。

2.3 5 L 自动发酵罐分批发酵

5 L 自动发酵罐分批发酵过程中,葡萄糖浓度降至 0 g/L 之前,自动流加 6 mol/L KOH 控制发酵过程中的 pH 在 5.50,葡萄糖浓度降至 0 g/L 后,不再控制 pH。这是由于 1991 年 Qazi 等^[23]发现 pH 为 5.50 最利于 *G. oxydans* 的细胞生长,且是葡萄糖脱氢酶的最适 pH。5KGA 生成过程可分为两个阶段,即先将葡萄糖氧化生成葡萄糖酸,葡萄糖酸再进一步转化成 5KGA^[20],葡萄糖氧化生成葡萄糖酸后,pH 下降,葡萄糖浓度降为

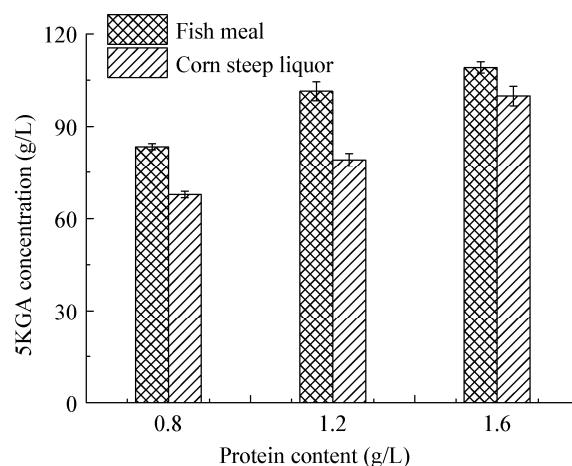


图 4 不同蛋白浓度鱼粉、玉米浆对 5KGA 产量的影响

Fig. 4 Effects of different protein concentrations of fish meal and corn steep liquor on the 5-keto-gluconic acid production.

0 g/L, pH 不再降低。在第一阶段中,为了保证菌体最大限度地利用葡萄糖并将其氧化成葡萄糖酸,控制 pH 为 5.50,这有利于细胞生长和葡萄糖转化成葡萄糖酸^[24]。

由图 5(A)和图 6(A)可知,以酵母粉作有机氮源时,发酵 9 h 葡萄糖的浓度降至 0 g/L、5KGA 开始生成,10.5 h 时生成速率最大、达到 8.60 g/(L·h),72 h 时 5KGA 产量达到最大、为 105.41 g/L,转化率为 90.60%,平均生成速率为 1.44 g/(L·h)。由图 5B 和 6B 可知,

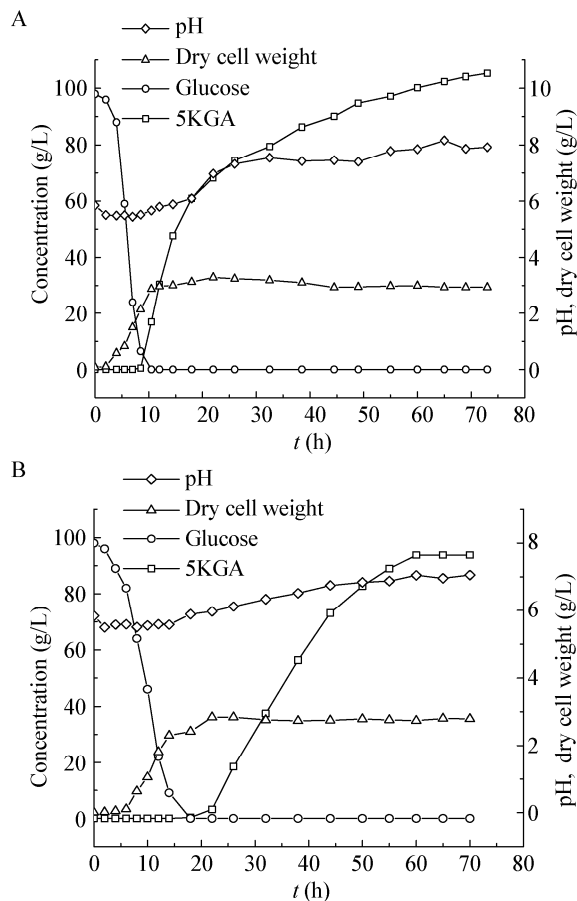


图 5 以酵母粉(A)和玉米浆(B)作氮源分批发酵生产 5KGA

Fig. 5 Time course of batch 5KGA production with yeast extract (A) and corn steep liquor (B) as nitrogen source.

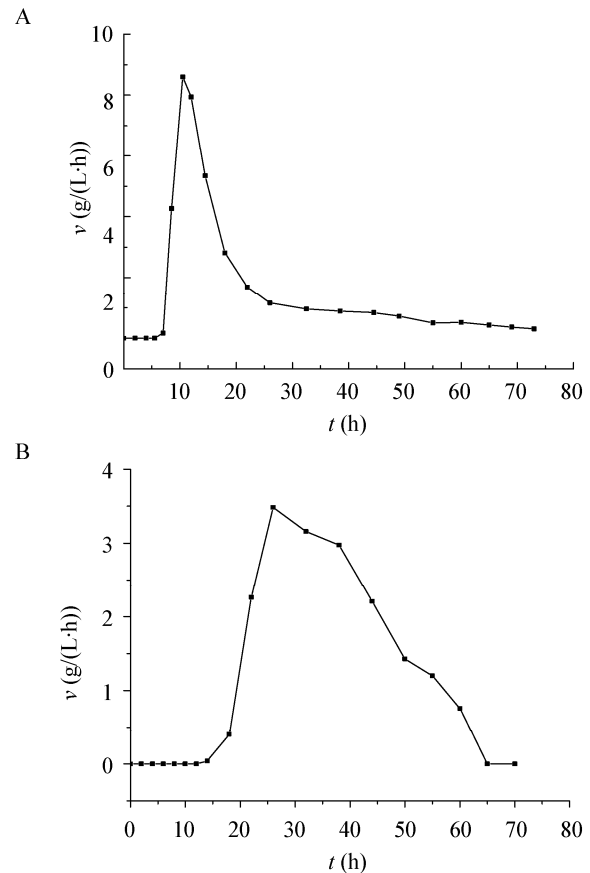


图 6 以酵母粉(A)和玉米浆(B)作氮源 5KGA 生成速率曲线

Fig. 6 Time course of 5KGA specific production rate with yeast extract (A) and corn steep liquor (B) as nitrogen source.

以玉米浆作有机氮源,18 h 时 5KGA 开始生成,5KGA 生成速率在 26 h 时达最大,为 3.48 g/(L·h),60 h 时 5KGA 产量达到最大,为 93.80 g/L。平均生成速率为 1.56 g/(L·h),转化率为 85.93%。

以玉米浆作有机氮源 5KGA 的产量与酵母粉作有机氮源接近,玉米浆成本远低于酵母粉,同时发酵周期缩短,平均生成速率为 1.56 g/(L·h) 高于以酵母粉作有机氮源的平均生成速率 1.44 g/(L·h)。

3 讨论

三角瓶和 5 L 发酵罐分批发酵放大试验结果表明:采用菌株 *Gluconobacter oxydans* HGI-1 生产 5KGA, 最佳碳源为葡萄糖, 最佳浓度为 100 g/L。最佳氮源为酵母粉, 其次为鱼粉、玉米浆。考虑工业生产成本问题, 选择玉米浆作为有机氮源, 其最佳添加量为 4 g/L。以葡萄糖为碳源、玉米浆为有机氮源 5KGA 的发酵水平达到了 93.80 g/L, 平均生成速率为 1.56 g/(L·h), 转化率为 85.93%, 发酵周期较酵母粉缩短 15 h 5KGA 平均生成速率提高 8.26%, 取得了较好的实验效果。

Hirohide TOYAMA 等^[25]研究了以葡萄糖为唯一碳源, 在葡萄糖浓度为 20 g/L (111 mmol/L)、不控制 pH 条件下, *G. suboxydans* IFO 12528 生成 5KGA 的产量为 12.61 g/L, 转化率仅为 59%。Helmut Görisch 等^[19]筛选出一株核黄素依赖型 GA-2-DH 酶活缺失型突变株 *Gluconobacter oxydans* MF1, 使用酵母粉作有机氮源, 葡萄糖浓度为 25 g/L 时, 5KGA 的产量为 22.70 g/L, 其葡萄糖转化率为 84%。与其相比, *Gluconobacter oxydans* HGI-1 以葡萄糖为碳源、玉米浆为有机氮源生产 5KGA 转化率与文献水平相当, 但以玉米浆作氮源降低了生产成本, 更有利于工业化生产。

REFERENCES

- [1] Kodama S, Yamamoto A, Matsunaga A, et al. Direct chiral resolution of tartaric acid in food products by ligand exchange capillary electrophoresis using copper(II)-D-quinic acid as a chiral selector. *J Chromatogr A*, 2001, 932(1): 139–143.
- [2] Palma M, Barroso CG. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Anal Chim Acta*, 2002, 458(1): 119–130.
- [3] Bastos SST, Tafulo PAR, Queiros RB, et al. Rapid determination of tartaric acid in wines. *Comb Chem High Throughput Screening*, 2009, 12(7): 12–722.
- [4] Lou JF. Study on cis-epoxysuccinate hydrolase [D]. Zhengjiang: Zhejiang University, 2006 (in Chinese).
楼锦芳. 顺式环氧琥珀酸水解酶的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2006.
- [5] Willaert R, Vuyst LD. Continuous production of L-(+)-tartaric acid from cis-epoxysuccinate using a membrane recycle reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(2): 155–163.
- [6] Cao XM, Lü AZ. Optimization of extraction Conditions of tartaric acid from grapes pomace. *Hubei Agric Sci*, 2011, 50(14): 2930–2933 (in Chinese).
曹熙敏, 吕爱枝. 葡萄渣中酒石酸的提取条件优化. *湖北农业科学*, 2011, 50(14): 2930–2933.
- [7] Olivato JB, Nobrega MM, Müller CM, et al. Mixture design applied for the study of the tartaric acid effect on starch/polyester films. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2): 1705–1710.
- [8] Mi S, Li H, Liu J. Optimization of extraction process for L-(+)-tartaric acid from vitis quinquangularis lees via response surface methodology. *Food Sci Technol*, 2012, 33(8): 49–53 (in Chinese).
米思, 李华, 刘晶. 响应面法优化毛葡萄酒泥中 L-(+)-酒石酸. *食品科学*, 2012, 33(8): 49–53.
- [9] Merfort M, Herrmann U, Ha SW, et al. Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J*, 2006, 1(5): 556–563.
- [10] Matzerath I, Kläui W, Klasen R, et al. Vanadate catalysed oxidation of 5-keto-D-gluconic acid to tartaric acid: the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorg Chim Acta*, 1995, 237(1): 203–205.
- [11] Lou JF, Zhang JG. Research on microbial productions of L-(+)-Tartaric acid. *Food Sci*

- Technol, 2006, (11): 162–164 (in Chinese).
- 楼锦芳, 张建国. 酶法合成 L(+)-酒石酸的研究进展. 食品科技, 2006, (11): 162–164.
- [12] Pan KX, Min H, Xia Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Rhodococcus* sp. strain M1 producing cis-epoxysuccinate hydrolase and optimization of production conditions. Acta Microbiol Sin, 2004, 44(3): 276–280 (in Chinese).
- 潘克侠, 闵航, 夏颖, 等. 产顺式环氧琥珀酸水解酶的红球菌 M1 菌株的分离鉴定及其产酶条件优化. 微生物学报, 2004, 44(3): 276–280.
- [13] Pan HF, Xie ZP, Bao WN, et al. Isolation and identification of a novel cis-epoxysuccinate hydrolase-producing *Bordetella* sp. BK-52 and optimization of enzyme production. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(8): 1075–1081 (in Chinese).
- 潘海峰, 谢志鹏, 鲍文娜, 等. 产顺式环氧琥珀酸水解酶的博德特氏菌 BK-52 的筛选、鉴定及其产酶条件优化. 微生物学报, 2008, 48(8): 1075–1081.
- [14] Zhang JG, Qian YJ. Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Corynebacterium* sp. JZ21. Chin J Biotech, 2000, 16(2): 188–192 (in Chinese).
- 张建国, 钱亚娟. 棒状杆菌固定化细胞生产 L(+)-酒石酸. 生物工程学报, 2000, 16(2): 188–192.
- [15] Zheng P, Sun ZH. Enzymatic Conversion of Cis-Expoxy succinate into L(+)-Tartarate by *Nocardia* sp. SW 13-57. Ind Microbiol, 1994, 4 (3): 12–17 (in Chinese).
- 郑璞, 孙志浩. 用诺卡氏菌酶法转化顺式环氧琥珀酸生产 L(+)-酒石酸的研究. 工业微生物, 1994, 4(3): 12–17.
- [16] Lu ZF, Dong W, Xia MZ, et al. Synthesis of epoxy succinic acid. special petrochem, 2001, 5(3): 7–9 (in Chinese).
- 吕志芳, 董伟, 夏明珠, 等. 环氧琥珀酸的合成条件研究. 精细石油化工, 2001, 5(3): 7–9.
- [17] Muynck CD, Pereira CSS, Naessens M, et al. The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. Crit Rev Biotechnol, 2007, 27(3): 147–171.
- [18] lassen R, Zam H, Korloy W, et al. Preparation of tartaric acid: CN, 951961381. 2000-12-27 (in Chinese).
- R·克拉森, H·扎姆, W·克劳伊, 等. 酒石酸的制备方法: CN, 95196138.1. 2000-12-27.
- [19] Elfari M, Ha SW, Bremus C, et al. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66(6): 668–674.
- [20] Marcel Merfort, Herrmann U, Stephanie BM, et al. High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(2): 443–451.
- [21] Herrmann U, Merfort M, Jeude M, et al. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 86–90.
- [22] Velizarov S, Beschkov V. Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations. Process Biochem, 1998, 33(5): 527–534.
- [23] Qazi GN, Parshad R, Verma V, et al. Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. Enzyme Microb Technol, 1991, 13(6): 504–507.
- [24] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, et al. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 92–98.
- [25] Ano Y, Shinagawa E, Adiach O, et al. Selective, high conversion of D-glucose to 5-Keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(3): 586–589.

(本文责编 陈宏宇)