

生物育种与工艺优化

5-酮基-D-葡萄糖酸发酵生产的工艺条件优化

李博义¹, 潘海峰^{1,2}, 孙伟荣², 程永青¹, 谢志鹏^{1,2}, 张建国²

1 浙江大学 生物化学研究所, 浙江 杭州 310058

2 杭州宝晶生物股份有限公司, 浙江 杭州 311106

李博义, 潘海峰, 孙伟荣, 等. 5-酮基-D-葡萄糖酸发酵生产的工艺条件优化. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1486-1490.

Li BY, Pan HF, Sun WR, et al. Optimization of the fermentation conditions for 5-keto-D-gluconic acid production. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1486-1490.

摘要: 葡萄糖酸氧化杆菌可将葡萄糖转化为 5-酮基-D-葡萄糖酸 (5-KGA), 而 5-KGA 是重要食品添加剂 L(+)-酒石酸的合成前体。为提高 5-KGA 产量及其对葡萄糖的转化率, 对 5-KGA 发酵生产的工艺条件进行优化。在摇瓶水平最适的培养基和培养条件下, 5-KGA 最高产量为 19.7 g/L, 较优化前提高 43.8%。在 5 L 发酵罐上控制恒定 pH 值 5.5、溶氧浓度 15% 条件下, 5-KGA 产量达到 46.0 g/L, 较摇瓶最高产量提高 1.3 倍, 应用葡萄糖流加工艺, 5-KGA 最高产量达到 75.5 g/L, 转化率超过 70%, 与已见报道的最高水平相比提高了 32.0%, 为实现微生物发酵生产 5-KGA、进而合成 L(+)-酒石酸的工业化提供了切实有效的途径。

关键词: 5-酮基-D-葡萄糖酸, L(+)-酒石酸, 条件优化, 工艺调控, 补糖发酵

Optimization of the fermentation conditions for 5-keto-D-gluconic acid production

Boyi Li¹, Haifeng Pan^{1,2}, Weirong Sun², Yongqing Cheng¹, Zhipeng Xie^{1,2}, and Jianguo Zhang²

1 Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 Hangzhou Bioking Biochemical Engineering Co., Ltd., Hangzhou 311106, Zhejiang, China

Abstract: *Gluconobacter oxydans* converts glucose to gluconic acid and subsequently to 5-keto-D-gluconic acid (5-KGA), a precursor of industrially important L(+)-tartaric acid. To increase the yield of 5-KGA, fermentation conditions of 5-KGA production was optimized. Under the optimum medium and culture conditions in the shake flask, the highest 5-KGA production reached 19.7 g/L, increased by 43.8% after optimization. In a 5-L bioreactor, the pH was controlled at 5.5 and dissolved oxygen (DO) at 15%, 5-KGA production reached 46.0 g/L, raised at least 1.3 times than in the shake flask. Glucose feeding fermentation process was further developed, and the highest 5-KGA production of 75.5 g/L with 70% of yield was obtained, 32.0% higher than the highest reported value. Therefore, this newly developed fermentation process provided a practical and effective alternative for the commercial production of 5-KGA, and further of L(+)-tartaric acid.

Keywords: 5-keto-D-gluconic acid, L(+)-tartaric acid, conditions optimization, process regulation, glucose feeding fermentation

Received: December 11, 2013; **Accepted:** January 21, 2014

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA022100)

Corresponding author: Zhipeng Xie. Tel/Fax: +86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA022100) 资助。

网络出版时间: 2014-03-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130627.html>

L(+)-酒石酸是一种重要的食品添加剂, 主要作为饮料、糖果及果酱等食品的酸味剂, 亦可用作防腐剂和稳定剂。目前 L(+)-酒石酸的主要生产方法是以石油化工产品顺丁烯二酸酐为原料, 化学合成为顺式环氧琥珀酸, 再利用顺式环氧化物水解酶将其水解为 L(+)-酒石酸^[1]。为了应对将来石油价格上涨所带来的生产成本攀升, 一种以葡萄糖为原料的生物发酵-化学合成联用生产 L(+)-酒石酸的技术受到了业界的重点关注^[2-3], 其中利用微生物发酵葡萄糖生产 L(+)-酒石酸合成前体——5-酮基-D-葡萄糖酸 (5-KGA) 是该技术路线的核心。

迄今, 已见报道的用于发酵葡萄糖生产 5-KGA 的菌株唯有葡萄糖酸氧化杆菌 *Gluconobacter oxydans*^[4], 研究内容主要集中在野生菌种的分子生物学改造。2004 年, Herrmann 等将 *gno* 基因在 *G. oxydans* ATCC 621H 中过表达, 5-KGA 的产量提高 20%^[5]。2005 年, Elfari 等将 *ga2dh* 基因敲除, 得到工程菌 *G. oxydans* MF1, 该菌株不会生成副产物 2-KGA, 5-KGA 的产量达到 22.7 g/L^[6]。2006 年, Merfort 等将 *gdh* 基因和 *ga5dh* 基因分别在 MF1 中过表达, 结果 5-KGA 产量为 44.6 g/L^[7]。Merfort 等又利用不同的启动子将 *ga5dh* 基因在 MF1 中过表达, 5-KGA 的最高产量达到 57.2 g/L^[8]。

在工业生物技术领域, 除菌种改造外, 对微生物发酵过程的有效调控也是提升菌株生产性能的重要途径。目前, 对 5-KGA 发酵生产过程的调控技术鲜有报道^[9]。本文以葡萄糖酸氧化杆菌为对象, 对 5-KGA 发酵生产的工艺条件进行优化, 使其累积量获得大幅提升, 为微生物发酵生产 5-KGA、进而生产 L(+)-酒石酸的工业化提供试验基础和技术参数。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种

G. oxydans CGMCC 1.637 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 初始培养基及培养条件

种子培养基: 甘油 15 g/L, 酵母抽提物 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 初始 pH 6.8^[10]。

发酵培养基: 葡萄糖 25 g/L, 玉米浆 7.5 g/L, 初始 pH 5.0^[6]。

培养条件: 温度 30 °C, 摇床转速 220 r/min, 发酵周期 48 h。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵条件优化

以 5-KGA 产量为指标, 采用单因子试验对培养基组分和培养条件进行优化, 得到 5-KGA 生产的最佳摇瓶发酵条件。

1.2.2 发酵罐发酵工艺调控

依据摇瓶优化得到的发酵条件, 以 5-KGA 产量为指标, 分别通过流加 NaOH 和 H₂SO₄ 控制 pH, 串级转速控制溶氧, 流加控制补糖速率, 在装液 3 L 培养基的 5 L 发酵罐中优化 5-KGA 生产的工艺条件。

1.2.3 5-KGA 的产量和转化率

HPLC 测定 5-KGA 产量: 色谱柱: Lichrospher NH₂, 流动相: 0.015 mol/L 磷酸二氢铵, pH 3.3, 柱温 30 °C, 流速: 1 mL/min, 波长: 200 nm。

转化率 (Yield)=5-KGA 产量 (mol/L)/总糖浓度 (mol/L)。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵条件优化

2.1.1 初糖浓度的考察

采用不同初糖浓度的发酵培养基, 测定了发酵结束后发酵液中残余葡萄糖浓度、OD₆₀₀、5-KGA 浓度^[11], 结果如表 1 所示。5-KGA 产量随初糖浓度升高而提高, 但初糖浓度 100 g/L 时, 发酵结束残糖 18 g/L, 转化率较初糖浓度 50 g/L 时低 29.5%。另外高浓度葡萄糖对菌体生长有抑制作用, 因此选择 50 g/L 作为发酵试验的最适初糖浓度。

表 1 初糖浓度对 5-KGA 发酵的影响

Table 1 Effect of initial glucose concentration on 5-KGA fermentation

Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)	OD_{600}	5-KGA (g/L)	Yield (%)
25	0	2.18	6.5	24.1
50	0	1.73	13.7	25.4
100	18	1.18	19.3	17.9

2.1.2 氮源及其浓度的考察

在最适初糖 50 g/L 的条件下, 选择 3 个浓度水平 (5、10、20 g/L) 的 3 种氮源 (玉米浆、酵母抽提物、蛋白胨) 进行考察^[12]。结果氮源为玉米浆时, 最有利于 5-KGA 生成, 其浓度为 5 g/L 时, 5-KGA 产量最高 (15.7 g/L), 转化率为 29.1%。因此选择 5 g/L 玉米浆作为发酵生产的最适氮源。

2.1.3 发酵条件的优化

在最适初糖 50 g/L, 最适氮源玉米浆 5 g/L 的条件下, 采用单因子试验依次对温度、种龄、接种量、装液量等条件进行优化^[13], 综合考察菌体生长情况和 5-KGA 生产水平。最终确定最适温度 30 °C、种龄 12 h、接种量 5%, 装液量 20%。

使用优化后的培养基, 在优化后的发酵条件下进行试验, 发酵过程的葡萄糖消耗、菌体生长和 5-KGA 生成情况如图 1 所示。葡萄糖在 22 h 消耗完全, 平均耗糖速率 2.27 g/(L·h), 菌体在 0–26 h 为对数生长期, 之后进入稳定期。由于葡萄糖第一步被转化为葡萄糖酸 (GA), GA 进一步转化为 5-KGA, 因此当糖耗结束时, 5-KGA 的合成并未

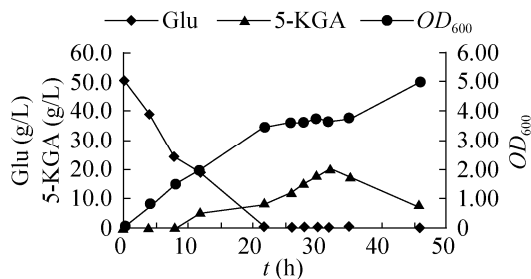


图 1 5-KGA 摇瓶发酵过程曲线

Fig. 1 Time course of 5-KGA fermentation in shake flask.

停止。32 h 菌体生长稳定期结束, 5-KGA 产量达到最高值, 菌体开始二次生长, 5-KGA 减少, 可能为生长所利用。综上所述, 经过摇瓶优化, 5-KGA 最高产量 19.7 g/L, 转化率 36.6%, 较优化前水平 (13.7 g/L) 提高 43.8%。

2.2 发酵罐发酵工艺调控

2.2.1 pH 值对 5-KGA 发酵的影响

在摇瓶发酵过程中, 氧化生成的葡萄糖酸等使发酵液 pH 值不断降低, 因此, 在 5 L 发酵罐上分批发酵, 发酵过程中维持不同的 pH 值, 考察 pH 值对 5-KGA 发酵的影响, 结果见图 2。菌体在酸性环境中生长较差, 在偏碱性环境中 (pH 值 6.5–7.5) 生长较好。5-KGA 产量对 pH 的变化非常敏感, 偏酸或偏碱都不利于其生成, 可能在酸性条件下葡萄糖酸-5-脱氢酶的活性受到抑制, 在碱性条件下生成的 5-KGA 又被菌体生长利用^[14-15]。当 pH 值控制为 5.5 时, 5-KGA 产量最高 (43.9 g/L), 转化率 81.5%, 因此选择 pH 值 5.5 为最适生产的 pH 条件。

2.2.2 溶氧 (DO) 对 5-KGA 发酵的影响

在摇瓶发酵过程中, 菌体生长使溶氧水平动态变化, 因此, 在发酵罐上控制 pH 值 5.5 的前提下, 考察溶氧水平对 5-KGA 发酵的影响, 结果见图 3。溶氧由 5% 提高至 15% 时, 5-KGA 产量及菌体生长量均呈线性递增。继续提高溶氧浓度, 菌体生长情况无明显变化, 供氧超过 30% 时生长量降低; 5-KGA 产量在溶氧浓度 15% 时达到最高值 (46.0 g/L), 超过此浓度即呈现负相关。说明只有提供适宜的溶氧,

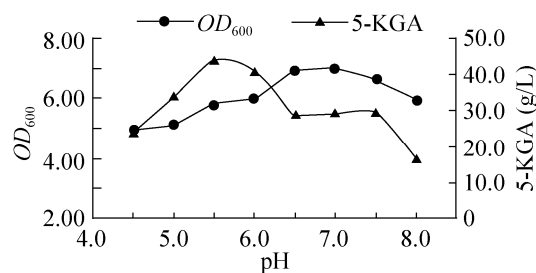


图 2 pH 值对 5-KGA 发酵的影响

Fig. 2 Effect of pH value on 5-KGA fermentation.

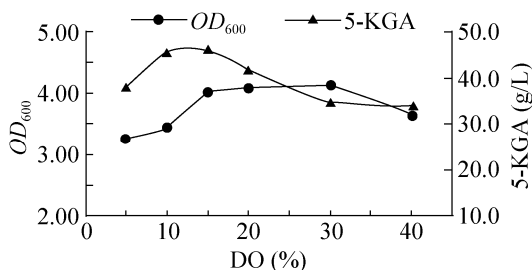


图3 溶氧对5-KGA发酵的影响

Fig. 3 Effect of dissolved oxygen on 5-KGA fermentation.

菌体生长和产酸才能取得较好的效果。供氧充足,菌体可保持较快的生长速率,有利于产酸和糖酸转化;溶氧过低时,菌体生长受限,但过高的溶氧会破坏细胞组分,抑制酶的活性^[14-15],故选择15%溶氧浓度为5-KGA发酵的最佳溶氧条件。

2.2.3 流加补糖策略的确定与实施

在发酵罐上控制pH值5.5,溶氧15%的条件下,发酵过程曲线如图4所示。糖耗速率4.54 g/(L·h),较摇瓶发酵提高了1倍,菌体对数生长期及5-KGA快速积累时间均较摇瓶发酵明显缩短,5-KGA的合成呈现生长关联型,最高产量为46.0 g/L,转化率为85.4%,较摇瓶优化后水平(19.7 g/L)提高了133.5%。

在分批发酵中若糖量过多会抑制细胞生长,解决这个问题可在发酵过程中补糖,补糖的作用是及时供给菌合成产物的需要^[11]。为进一步提高5-KGA的产量,在菌体对数生长的初期和末期,采用不同的流加速率补糖50 g/L,考察不同的补糖策略对5-KGA发酵的影响,结果如表2所示。

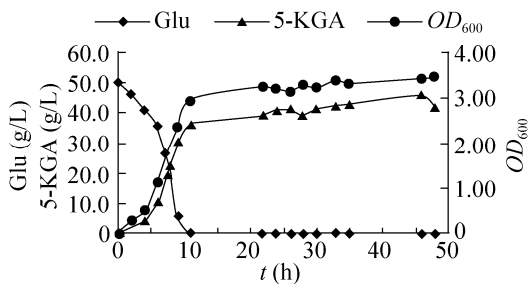


图4 5-KGA发酵罐中分批发酵过程曲线

Fig. 4 Time course of 5-KGA batch fermentation in bioreactor.

表2 补糖策略对5-KGA发酵的影响

Table 2 Effect of glucose feeding strategy on 5-KGA fermentation

Feeding time (h)	Feeding rate (g/(L·h))	OD ₆₀₀	5-KGA (g/L)
0-10	10.0	3.98	53.9
4-12	6.25	4.02	73.3
4-9	10.0	4.00	59.4
10	50.0	4.11	52.5
10-18	6.25	4.39	63.8
10-15	10.0	4.19	75.5

在10 h直接补糖50 g/L得到的5-KGA产量最低,而流加补糖可提高葡萄糖的利用率,其中在10-15 h以速率10.0 g/(L·h)流加得到的5-KGA产量最高,因此为最佳补糖策略。通过流加补糖延长了菌体对数生长期及5-KGA积累时间,流加期间葡萄糖的消耗速率与补糖速率基本一致,菌体比生长速率恒定,最终得到5-KGA最高产量为75.5 g/L,较补糖前最高产量(46.0 g/L)提高了64.1%。

3 结论

本文对*G. oxydans* CGMCC 1.637发酵生产5-KGA的工艺条件进行了优化,确定初糖为50 g/L,玉米浆为5 g/L,温度30℃,接种量5%,装液量20%,种龄12 h,发酵周期48 h。在此最适条件下,5-KGA摇瓶发酵最高产量为19.7 g/L,较优化前提高43.8%。

本文对5 L发酵罐生产5-KGA的pH值和溶氧控制条件进行考察,发现pH对5-KGA的产量影响显著,得到在pH值5.5,溶氧浓度15%条件下,5-KGA产量为46.0 g/L,较摇瓶发酵最高水平提高了1.3倍。通过流加补糖试验,5-KGA的最高产量达到75.5 g/L,比目前报道的最高产量(57.2 g/L)提高了32.0%,转化率超过70%,证明此菌株具有一定的工业化生产5-KGA的潜力。

REFERENCES

- [1] Lou JF, Zhang JG. Research on microbial productions of L(+)-tartaric acid. Food Sci Technol, 2006, 31(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, 31(11): 162–164.
- [2] Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 233–242.
- [3] 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. *Inorganica Chim Acta*, 1995, 237(1): 203–205.
- [4] Salusj ärvi T, Povelainen M, Hvorslev N, et al. Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(3): 306–314.
- [5] 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(1): 86–90.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Merfort M, Herrmann U, Bringer-Meyer S, 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.
- [9] Ano Y, Shinagawa E, Adachi 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.
- [10] Lin YQ, Xie ZP, Zhang JG, et al. Cloning and characterization of a novel NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* CGMCC 1.637. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52(6): 726–735 (in Chinese).
林燕清, 谢志鹏, 张建国, 等. 葡萄糖酸氧化杆菌木糖醇脱氢酶基因的克隆与表达. 微生物学报, 2012, 52(6): 726–735.
- [11] Li Y, Chen J, Zhou ND. The Effect of Environmental Conditions and Glucose Feeding Strategy on Glutathione (GSH) Production. *Chin J Biotech*, 1998, 14(2): 147–152 (in Chinese).
李寅, 陈坚, 周楠迪. 环境条件及摇瓶补糖策略对谷胱甘肽发酵的影响. 生物工程学报, 1998, 14(2): 147–152.
- [12] Lu XH, Zhang QH, Lu MZ, et al. Effects of nitrogen sources and concentration on growth density, lipid yield and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis oculata*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(12): 1865–1869 (in Chinese).
陆向红, 张秋红, 卢美贞, 等. 氮源种类及浓度对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂产率和二十碳五烯酸含量的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1865–1869.
- [13] Lan X, Bao WN, Pan HF, et al. Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Rhizobium* strain BK-20. *Chin J Biotech*, 2014, 30(2): 1–5 (in Chinese).
兰翔, 鲍文娜, 潘海峰, 等. 根瘤菌 BK-20 固定化细胞生产 L(+)-酒石酸. 生物工程学报, 2014, 30(2): 1–5.
- [14] Yang TW, Rao ZM, Zhang X, et al. Effects of pH and oxygen supply on production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(12): 1860–1864 (in Chinese).
杨套伟, 饶志明, 张显, 等. pH 与溶氧控制对解淀粉芽胞杆菌发酵粗甘油生产 2,3-丁二醇的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1860–1864.
- [15] Wei GY, Li Y, Du GC, et al. Effects of dissolved oxygen and pH on *Candida utilis* batch fermentation of glutathione. *Chin J Biotech*, 2003, 19(6): 734–739 (in Chinese).
卫功元, 李寅, 堵国成, 等. 溶氧及 pH 对产朊假丝酵母分批发酵生产谷胱甘肽的影响. 生物工程学报, 2003, 19(6): 734–739.

(本文责编 陈宏宇)