

文章编号 :1009 - 038X(2001)02 - 0137 - 05

葡萄糖对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

陈燕¹, 李寅¹, 陈坚¹, 芮新生², 潘春²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036 ; 2. 常州曙光化工厂, 江苏常州 213016)

摘 要 :在 30 L 发酵罐中研究了初始葡萄糖质量浓度和补料方式对光滑球拟酵母 WSH - IP303 发酵生产丙酮酸的影响. 实验确定 116.4 g/L 左右是较为适宜的初始葡萄糖质量浓度, 发酵 58 h 时丙酮酸质量浓度和产率分别为 58.0 g/L 和 0.516 g/g. 采用初始葡萄糖质量浓度为 53.4 g/L, 发酵 24 h 分批补料至葡萄糖总质量浓度为 115 g/L 的培养方式, 发酵 64 h 时丙酮酸质量浓度和产率分别为 60.2 g/L 和 0.559 g/g. 采用初始葡萄糖质量浓度为 62.6 g/L, 发酵 24 h 开始连续补料至葡萄糖总质量浓度为 115 g/L 的培养方式, 发酵 72 h 时丙酮酸质量浓度和产率分别为 63.3 g/L 和 0.586 g/g. 与葡萄糖总质量浓度相似(115 g/L)的分批发酵相比, 丙酮酸产量分别提高了 3.8% 和 9.1%. 实验结果表明: 适宜的初始葡萄糖质量浓度能促进光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸; 尽管葡萄糖补料培养可适度提高丙酮酸的产量及产率, 但生产强度却有所下降.

关键词 :丙酮酸; 光滑球拟酵母; 葡萄糖; 初始葡萄糖质量浓度; 分批培养; 补料培养

中图分类号 :TQ 921.7

文献标识码 :A

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

CHEN Yan¹, LI Yin¹, CHEN Jian¹, RUI Xin-Sheng², PAN Chun²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China ; 2. Changzhou Shuguang Chemical Engineering Factory, Changzhou 213016, China)

Abstract : The effect of initial glucose concentration and fed - batch culture mode on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata* WSH-IP303 was investigated in a 30 L fermentor. 116.4 g/L was found to be an optimal initial glucose concentration, where the concentration of pyruvic acid reached 58.0 g/L at 58 h with the yield of 0.516 g/g. When the initial glucose concentration was 53.4 g/L, and the additional glucose was added at 24 h to make the total glucose concentration of 115 g/L, the concentration of pyruvic acid reached 60.2 g/L at 64 h with the yield of 0.559 g/g. When the initial glucose concentration was 62.6 g/L, the continuous feeding of glucose was started at 24 h to make the total glucose of 115 g/L, and the concentration of pyruvic acid reached 63.3 g/L at 72 h with the yield of 0.586 g/g. Compared with the batch culture of similar total glucose concentration, the production of pyruvic acid was improved by 3.8% and 9.1% respectively. The result showed that : (1) the production of pyruvic acid can be improved relevantly by using an optimal initial glucose concentration ; (2) although the concentration and yield of pyruvic acid increased in a glucose fed -

收稿日期 2000 - 06 - 20 ; 修订日期 2000 - 12 - 22.

基金项目 : 江苏省“九五”工业重大科技攻关项目资助课题(BG98015 - 3).

作者简介 : 陈燕(1978 -), 女, 广东清远人, 硕士研究生.

batch culture , the productivity decreased.

Key words : pyruvic acid ; *Torulopsis glabrata* ; glucose ; initial glucose concentration ; batch culture ; fed-batch culture

丙酮酸(Pyruvic acid)是糖代谢中重要的中间产物^[1],是多种氨基酸、维生素及其它有用物质的重要前体,在化工、食品保健业、制药及农用化学品等工业中有着广泛的用途^[2]. 发酵法生产丙酮酸具有原料成本低、来源广、产物纯度高、反应条件温和等许多优点,引起了越来越多的研究者的兴趣^[3-8].

作者在摇瓶和 2.5 L 小罐发酵^[9,10]上确定了较优的丙酮酸发酵条件. 在此基础上,又将丙酮酸发酵放大到 30 L 规模,重点考察葡萄糖质量浓度及补料方式对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响,以期为进一步扩大试验提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

乳酸脱氢酶和还原型辅酶 I (NADH)为 SIG-MA 公司产品,葡萄糖购自无锡润生淀粉油脂公司(口服级),其余试剂为国产分析纯.

1.2 菌种

光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) WSH - IP303 是硫胺素、生物素、烟酸和吡哆醇 4 种维生素的营养缺陷型,能以氯化铵为唯一氮源,作者所在研究室多次改良选育获得.

1.3 培养基

1.3.1 斜面及种子培养基(g/L) 葡萄糖 20 ,蛋白胨 10 ,KH₂PO₄ 1 ,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 ,琼脂 20(斜面用). pH 5.5 ,自来水配制.

1.3.2 发酵培养基(g/L) KH₂PO₄ 5 ,MgSO₄ · 7H₂O 0.8 ,pH 5.0 ,自来水配制,烟酸、硫胺素、吡哆醇、生物素和核黄素按一定浓度(见文献 [10])配成

浓缩液,18 L 发酵液中加入 40 mL ,葡萄糖和 NH₄Cl 的质量浓度根据实验要求定,保持碳氮质量比为 22:1.

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养 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 ℃、200 r/min 下摇瓶培养 12 h.

1.4.2 30 L 罐发酵 30 L 发酵罐(韩国发酵罐公司 KF - 30L)装液量 18 L ,接种量 15% ,温度 30 ℃ ,通气量 1.5 L/(L · min) ,搅拌转速不低于 230 r/min ,用 5 mol/L NaOH 控制 pH 恒定在 5.0 ± 0.1 ,溶氧自动显示.

1.5 分析方法

4 mL 发酵液在 10 000 r/min 下离心 5 min 后,取上清液进行分析测定. 上清液分别用乳酸脱氢酶法、3,5 - 二硝基水杨酸比色法^[11]和苯酚—硝普盐法^[12]分析丙酮酸、葡萄糖和氯化铵质量浓度;菌体用蒸馏水洗涤 2 次后,在 80℃ 烘箱内烘至恒重后称重.

2 结果与讨论

2.1 初始葡萄糖质量浓度对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

丙酮酸是由葡萄糖经糖酵解途径(EMP)产生的主流代谢产物,理论上 1 分子葡萄糖产生 2 分子丙酮酸. 在以葡萄糖作为原料的发酵中,初始葡萄糖质量浓度对丙酮酸生产有很大影响,因此寻找一个适宜的初始葡萄糖质量浓度是十分重要的. 作者在 30 L 发酵罐上进行了不同初始葡萄糖质量浓度下的分批发酵实验,结果如表 1 和图 1 所示.

表 1 初始葡萄糖质量浓度对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

Tab.1 The effect of initial glucose concentration on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*

初始葡萄糖 质量浓度/ (g/L)	剩余葡萄糖 质量浓度/ (g/L)	发酵 时间/ h	丙酮酸 产量/ (g/L)	丙酮酸 产率 / (g/g)	丙酮酸 生产强度/ (g/(L · h))	比生长 速率/ h ⁻¹	丙酮酸比 生成速率/ h ⁻¹	葡萄糖比 消耗速率/ h ⁻¹	氯化铵比 消耗速率/ h ⁻¹
116.4	4.0	58	58.0	0.516	1.00	0.075	0.066	0.128	0.010
85.3	2.1	40	43.1	0.515	1.07	0.105	0.081	0.156	0.011
53.4	7.7	24	18.9	0.459	0.781	0.159	0.088	0.214	0.016

万方数据

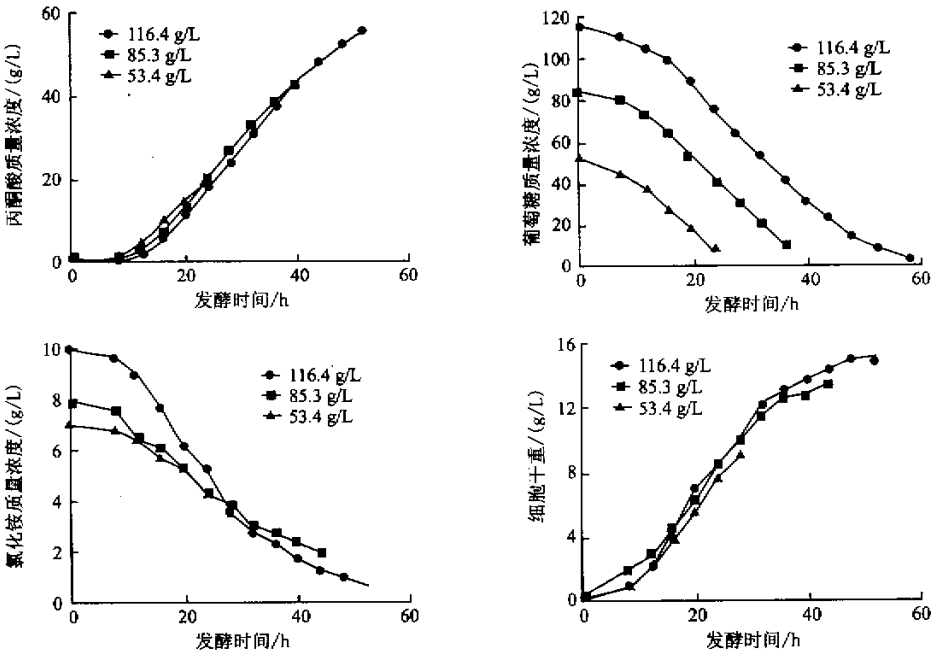


图 1 初始葡萄糖质量浓度对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

Fig.1 The effect of initial glucose concentration on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*

由图 1 和表 1 可知:当初始葡萄糖质量浓度分别为 116.4 g/L 和 85.3 g/L 时,丙酮酸产率相当(0.516 g/g 和 0.515 g/g),丙酮酸生产强度接近(1.00 g/L 和 1.07 g/L)。若考虑发酵准备时间(如清洗、消毒等),高初始葡萄糖质量浓度时丙酮酸生产强度更大,而且采用高初始葡萄糖质量浓度发酵时,丙酮酸最终产量高,这在后续提取时有优势。因此,从几方面分析,作者认为葡萄糖质量浓度在 116.4 g/L 左右是一个较为适宜的初始葡萄糖质量浓度,发酵 58 h,丙酮酸产量和产率分别为 58.0 g/L 和 0.516 g/g。在本实验的初始葡萄糖质量浓度范围内,高初始葡萄糖质量浓度对丙酮酸的生产和细胞生长并无明显的抑制作用。

2.2 补料方式对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

由分批发酵的实验结果可知:在高初始葡萄糖质量浓度下,丙酮酸最终产量/产率高,但细胞生长速度慢,整个发酵过程周期长,丙酮酸生产强度不高;而在低初始葡萄糖质量浓度下,细胞具有更高的比生长速率和葡萄糖比消耗速率。由此,作者认为,如果采用在较低的初始葡萄糖质量浓度下进行发酵,后期再进行补料的方法进行实验,有可能将整个发酵过程分为两个阶段:1)细胞大量生长;2)丙酮酸大量积累。即细胞在尽可能短的时间内生长达到较高的细胞密度,然后再大量积累丙酮酸。此

外,前期研究发现^[2],氮源缺乏会抑制丙酮酸的合成,因此,补料时还需考虑将发酵液中的碳氮比维持在一定的水平。

2.2.1 分批补料对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响 由前面的分批发酵实验得知,当初始葡萄糖质量浓度为 53.4 g/L 时,细胞具有较高的比生长速率,丙酮酸的生成速率和比葡萄糖消耗速率较理想,因此,作者采用初始葡萄糖质量浓度为 53.4 g/L 先进行分批发酵,当发酵进行至 24 h,残糖质量浓度降至低于 10 g/L 时一次性补入葡萄糖和氯化铵,使葡萄糖总质量浓度保持在 115 g/L 左右。此后细胞仍保持良好的产酸能力,直到末期才逐渐减缓,发酵 64 h,丙酮酸产量和产率分别为 60.2 g/L 和 0.559 g/g(图 2),与葡萄糖总质量浓度相似(115 g/L)的分批发酵相比,丙酮酸产量和产率分别提高了 3.8% 和 8.3%。

2.2.2 连续补料对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响 将底物以可控制的方式连续地添加到培养液中可使底物浓度始终处于理想的水平,这种补料方式有可能更有利于细胞生长及产酸。在本研究中作者考察了连续流加葡萄糖、氯化铵及维生素对丙酮酸发酵的影响。采用初始葡萄糖质量浓度为 62.6 g/L、维生素浓缩液加量为 30 mL/18 L 发酵液,进行分批发酵。由前期研究得知,葡萄糖质量浓度降至 30 g/L 左右是一个较好的流加点^[2],而在本

批实验中,发酵 24 h 时葡萄糖质量浓度已降至 27 g/L,再考虑到分批补料实验中葡萄糖也是在 24 h 时补入,因此当发酵进行 24 h 时开始流加葡萄糖,直至葡萄糖总质量浓度为 115 g/L、维生素浓缩液的总加入量为 40 mL/18 L 发酵液。发酵进行 50 h,停止流加,发酵 72 h 时丙酮酸产量和产率分别为 63.3 g/L 和 0.586 g/g,与葡萄糖总质量浓度相似(115 g/L)的分批发酵相比,丙酮酸产量和产率分别提高了 9.1% 和 13%,见图 3。

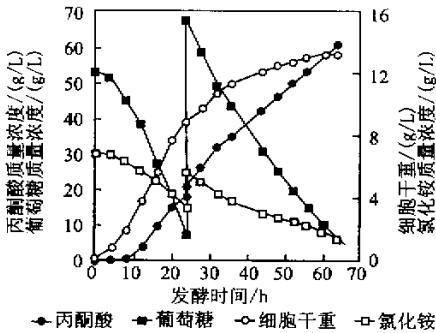


图 2 分批补数对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

Fig. 2 The effect of fed - batch on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*

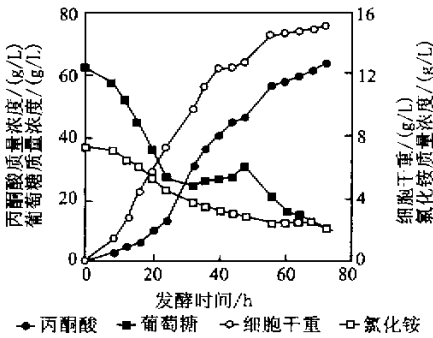


图 3 连续补料对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

Fig. 3 The effect of continuous feeding on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*

2.3 不同培养方式对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

从表 2 可看出,发酵过程中进行分批补料或连续补料,丙酮酸的产量及产率虽然有所提高,但幅度不大,而生产强度、葡萄糖消耗速率反而下降。由此表明,采用简单的葡萄糖补料培养方式不能有效地提高丙酮酸的整体生产水平,应进一步优化补料培养中的工艺条件。

表 2 不同培养方式对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响

Tab.2 The effect of different culture mode on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*

	发酵时间/ h	剩余葡萄糖 质量浓度/(g/L)	丙酮酸 质量浓度/(g/L)	丙酮酸 产率/(g/g)	生产 强度/(g/(L·h))	葡萄糖消耗 速率/(g/(L·h))
分批培养	58	4.0	58.0	0.516	1.00	1.94
分批补料	64	6.3	60.2	0.559	0.939	1.68
连续补料	72	7.0	63.3	0.586	0.865	1.52

另外,高质量浓度丙酮酸对细胞代谢活性的抑制作用也可能是制约丙酮酸产量进一步提高的重要因素。采用随程提取技术,去除或减轻高质量浓

度丙酮酸对细胞活性的抑制,有可能可以进一步提高丙酮酸的生产强度,这方面的研究正在进行。

参考文献：

[1] 段长强,孟庆芳,张泰等.现代化学试剂手册(第一分册) [M].北京:化学工业出版社,1988.

[2] 梁大芳.发酵法生产丙酮酸 [D].无锡:无锡轻工大学,1998.

[3] YONEHARA T, MIYATA R. Fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1994, 78: 155~159.

[4] MIYATA R, YONEHARA T. Improvement of fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* IFO0005 [J]. *J Ferment Bioeng*, 1996, 82: 475~479.

[5] HUA Q, YANG C, SHIMIZU K. Metabolic flux analysis for efficient pyruvate fermentation using vitamin-auxotrophic yeast of *Torulopsis glabrata* [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87: 206~213.

[6] HUA Q, SHIMIZU K. Effect of dissolved oxygen concentration on the intracellular flux distribution for pyruvate fermentation [J]. *J Biotechnol*, 1999, 68: 135~147.

- [7] YOKOTA , SHIMIZU H , TERASAWA Y , *et al.* Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485[J]. **Appl Microbial Biotechnol** , 1994 , 41 : 638 ~ 643.
- [8] YOKOTA A , HENMI M , TAKAOKA N , *et al.* Enhancement of glucose metabolism in a pyruvic acid – hyperproducing *Escherichia coli* mutant defective in F1 – ATPase activity[J]. **J Ferment Bioeng** , 1997 , 83 : 132 ~ 138.
- [9] 李寅 陈坚 梁大芳等. 营养条件对光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的影响[J]. 生物工程学报 2000(3): 225 ~ 228.
- [10] 李寅 陈坚 伦世仪等. 维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用[J]. 微生物学报 2000 40(5) 528 ~ 534.
- [11] 蔡武城. 生物物质常用化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社 , 1987. 56 ~ 58.
- [12] SCHEINER D. Determination of ammonia and kjeldahl nitrogen by indophenol method[J]. **Water Research** , 1976 , 10 : 31 ~ 36.