

基于 2-酮基-D-葡萄糖酸高产的发酵条件优化研究

罗秋玲, 刘佳, 张权, 杨彬, 陈修来, 刘立明*

(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了实现异维生素 C 前体 2-酮基-D-葡萄糖酸在沙雷氏菌 *Serratia* sp. FMME043 中的高效生产, 在 30 L 发酵罐中对补料策略和发酵条件进行了优化, 建立了补料分批发酵工艺。最终确定发酵策略为: 溶氧控制在 40%, 在发酵 16、22 h 及 28 h 时分别补加 64、80 g 和 96 g 硫酸铵, 并且当残糖浓度降至 15~25 g/L 时, 分五次等量补加 801 g 葡萄糖, 优化后, 发酵 44 h, 2-KGA 的产量和转化率分别达到 268.5 g/L 和 1.04 g/g, 分别比优化前提高了 58.4% 和 9.9%。本研究结果为目前报道的产量和转化率在国内外属领先水平, 为 2-酮基-D-葡萄糖酸及异维生素 C 工业化生产打下了坚实的基础。

关键词: 沙雷氏菌属; 2-酮基-D-葡萄糖酸; 发酵优化; 溶氧

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)02-0022-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.004

Optimization of the Fermentation Condition for 2-Keto-D-Gluconic Acid Producing Strain

LUO Qiuling, LIU Jia, ZHANG Quan, YANG Bin, CHEN Xiulai, LIU Liming*

(State Key Lab. Food Sci. Technol., Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to achieve the high production of 2-keto-D-gluconic acid (2-KGA) by *Serratia* sp. FMME043, feeding strategy and fermentation conditions are optimized in 30 L fermentor, and fed batch fermentation is established. The optimal fermentation conditions are as follows: the dissolved oxygen is 40%, the quality of 64, 80 g, and 96 g ammonium sulfate is added at 16, 22 h, and 28 h, respectively, and the quality of 801 g glucose is supplemented with five times at the residual sugar concentration between 15~25 g/L. Under these conditions, at 44 h, the production and the yield of 2-KGA reached 268.5 g/L and 1.04 g/g, which are 58.4% and 9.9% higher than that not optimized, respectively.

Keywords: *Serratia* sp., 2-keto-D-gluconic acid, fermentation optimization, dissolved oxygen

收稿日期: 2016-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270079, 21422602); 国家 973 项目子课题(2013CB733602); 国家 863 计划项目(2012AA022108, 2014AA021501, 2014AA021701)。

作者简介: 罗秋玲(1988—), 女, 硕士, 助理工程师, 主要从事生物发酵方面研究。E-mail: luoqiuling88@126.com

* 通信作者: 刘立明(1976—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物生理功能解析与调控研究。

E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

引用本文: 罗秋玲, 刘佳, 张权, 等. 基于 2-酮基-D-葡萄糖酸高产的发酵条件优化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 22-27.

2-酮基-D-葡萄糖酸 (2-Keto-D-gluconic Acid, 2-KGA), 属于有机酸, 是大宗生产产品, 其主要应用于 D-异抗坏血酸钠 (sodium erthorbate, EN) 以及 D-抗坏血酸 (Erthorbate acid, EA) 的合成, D-异抗坏血酸又称异维生素 C, 在食品工业上被广泛用为食品抗氧化剂^[1]。目前, 2-KGA 的生产方法主要有酶法、化学合成法和发酵法, 与其他方法相比, 微生物发酵法生产 2-KGA 原料来源丰富、条件温和、产品安全性好、视为纯天然, 从而是最具有竞争力的生产方法。

在自然界中, 有许多微生物能发酵生产 2-KGA, 主要包括沙雷氏菌属、假单胞菌属和产碱杆菌属^[2]等。其中, 因荧光假单胞菌易培养、发酵效价高等优点而被用作国内工业化发酵生产的菌株。但发酵过程中仍存在一些弊端: 1) 培养基氮源使用昂贵的有机氮源, 蛋白胨、酵母膏等; 2) 发酵产物成分复杂, 不利于下游提取等; 3) 灭菌不彻底易引发噬菌体污染。虽然可以通过筛选抗噬菌体菌株^[3-4]、并采用发酵优化及固定化方式来降低噬菌体感染、提高发酵效价、降低下游提取难度, 但仍避免不了噬菌体感染问题^[5-7]。因此, 筛选一株以无机氮为氮源的 2-KGA 生产菌株对工业化生产 2-KGA 以及扩大其在食品、化工及医药等领域的应用具有重要作用。

目前, 国内工业化发酵生产 2-KGA 过程中使用无机氮源的报道较少。本研究以硫酸铵作为唯一氮源的沙雷氏菌属 *Serratia* sp. FMME043 为出发菌株^[8], 通过在 30 L 发酵罐上调控发酵补料和溶氧策略提高 2-酮基-D-葡萄糖酸的产量, 结果表明通过优化促进了葡萄糖向 2-KGA 转化、提高了 2-KGA 的产量和生产强度, 进而有效地降低了生产成本、分离纯化难度以及噬菌体污染的风险, 为后期放大实验和工业化发酵生产提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株为沙雷氏菌 *Serratia* sp. FMME043, 由实验室筛选保藏。

1.2 主要试剂与设备

2-酮基-D-葡萄糖酸钙 (Sigma), Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), Bio Flo 115 型 30 L 全自动搅拌式发酵罐 (瑞士 Infors), UVmini-

1240 分光光度计 (日本岛津公司)。

1.3 培养基

斜面培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂 0.2, pH 7.0。121 °C 灭菌 15 min。

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 牛肉浸取物 3, NaCl 5, pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

发酵培养基 (g/L): 初始葡萄糖 100, 初始硫酸铵浓度为 5, KH₂PO₄ 1, Na₂SO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.8, MnCl₂·4H₂O 0.036, FeSO₄·7H₂O 0.036。葡萄糖和硫酸铵分别单独 115 °C 灭菌 15 min。

1.4 培养条件

斜面培养: 将活化的保藏菌种接至斜面培养基上, 在 30 °C 培养箱中培养 20 h。

种子培养: 用接种针从斜面上挑取 3~4 环菌, 接入种子培养基中 (50 mL/500 mL), 在 30 °C、200 r/min 转速下的摇床中培养 12~14 h。

30 L 发酵罐培养: 30 L 发酵罐中初始装培养基 16 L, 温度 30 °C, 接种量 13%, 自动流加 8 mol/L NaOH 控制 pH 值在 6.0。初始搅拌转速 500 r/min, 通气量 24.0 L/min, 随着发酵的进行, DO 由 100% 逐渐降低, 当降到 40% 时, 关联转速使 DO 维持在 40% 左右。发酵过程中每隔 4 h 取一次样, 并测定菌浓 OD₆₀₀、底物葡萄糖和产物 2-KGA。

1.5 葡萄糖及 2-KGA 产物的检测

取发酵液 12 000 r/min 离心 5~10 min, 收集上清液并稀释相应倍数, 用高效液相色谱 (HPLC) 分析。HPLC 条件见文献^[8]。

发酵生产 2-KGA 的糖酸转化率计算为

$$\text{发酵糖酸转化率} / (\text{g/g}) = \frac{\text{发酵液中 2-KGA 的浓度} (\text{g/L}) \times \text{发酵结束时发酵液的体积} (\text{L})}{\text{加入发酵液中无水葡萄糖总质量} (\text{g})} \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖补料方式对发酵的影响

在发酵生产 2-KGA 的过程中, 若一次性投入过高浓度的葡萄糖等营养物质, 会生成并积累大量的代谢副产物, 并降低单位细胞转化 2-KGA 能力; 通过补料降低初始发酵培养基的黏度, 可有效促进细胞对环境氧和营养成分的充分利用, 并解除底物的抑制作用。此外, 前期的摇瓶实验发现, 发酵初期葡萄糖浓度越低, 生产 2-酮基-D-葡萄糖酸生产强

度越高^[8]。

以前期实验为基础,在种子和发酵条件以及补料液相同的条件下,考察了发酵培养基的葡萄糖的初始浓度为 100 g/L 时,补加葡萄糖次数、补加时间对发酵产 2-KGA 的影响。采用以下 3 种补料方式进行发酵,补料分批发酵结果见图 1。

一次定量补料:当葡萄糖浓度降为 15~25 g/L

时,一次性补加含 4 005 g 葡萄糖补料液。

三次定量补料:当葡萄糖浓度降为 15~25 g/L 时,分 3 次相等的量进行补加(1 335 g/次),使发酵过程中补加总糖质量为 4 005 g。

五次定量补料:当葡萄糖浓度降为 15~25 g/L 时,分五次相等的量进行补加(801 g/次),使发酵过程中补加总糖质量为 4 005 g。

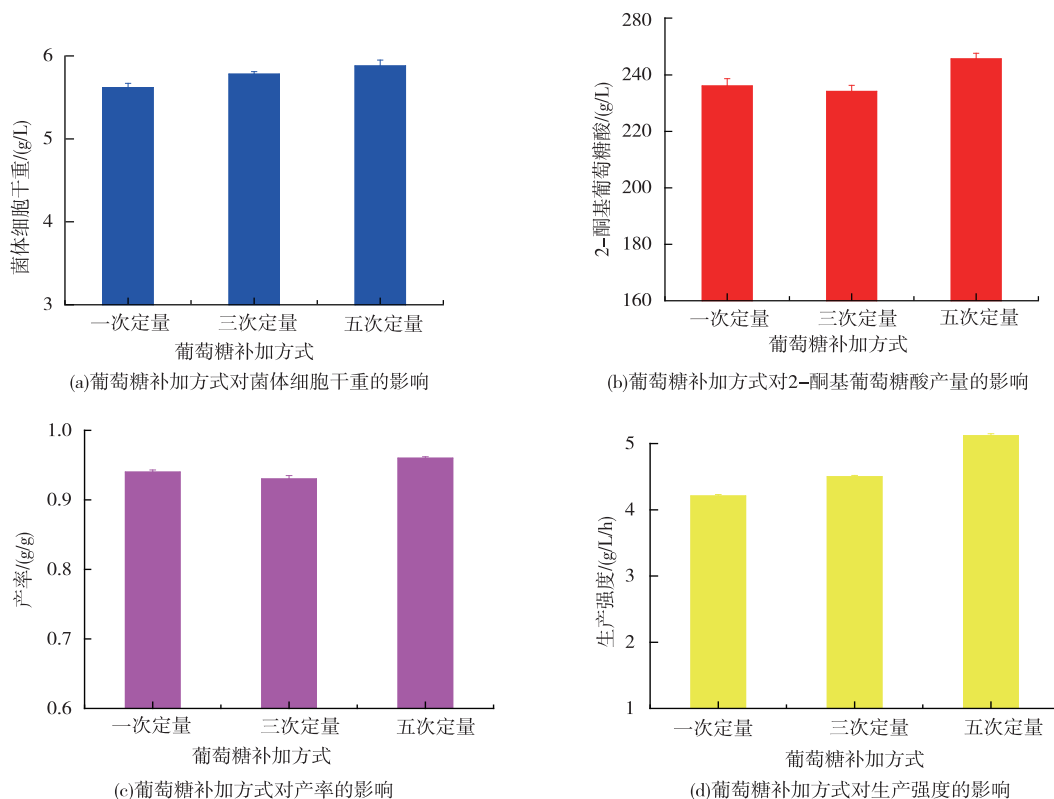


图 1 不同葡萄糖补料方式对 2-KGA 发酵的影响

Fig. 1 Effect of different glucose feeding modes on the production of 2-KGA

通过比较 2-KGA 的产量、产率和生产强度发现五次相等量的补加葡萄糖策略的效果最好(图 1)。此时,2-KGA 的产量、产率和生产强度分别达到 245.7 g/L、0.96 g/g 和 5.12 g/L/h。出现这种情况的原因是通过补料降低了底物浓度、发酵液黏度,从而降低了底物抑制作用,并促进细胞对环境氧和营养物质的利用,提高了葡萄糖向 2-KGA 的转化速率提高了 2-KGA 的生产强度^[9]。

2.2 硫酸铵补料方式对发酵的影响

在微生物发酵时,氮源是维持菌体自身生长必要的生长因子,其量的维持是保证菌体生长和转化的必要条件^[10],故考虑在发酵过程中根据菌体生长速率的变化加入适量的硫酸铵补充一定的氮源,保

持菌体的正常生长和转化。

在最优葡萄糖补料方式、维持种子和发酵条件以及补料液相同条件下,在发酵培养基的初始硫酸铵浓度为 5 g/L 时,采用以下 3 种补硫酸铵方式进行发酵生产。

一次定量补料:在发酵 16 h,一次性补加含 240 g 硫酸铵补料液。

间歇定量补料:在发酵 16 h 补加含 64 g 硫酸铵补料液,22 h 补加含 80 g 硫酸铵补料液,28 h 补加含 96 g 硫酸铵补料液。

间歇恒速补料:在发酵 16 h,就以 1.25 g/L/h 的速度流加硫酸铵补料液,直至含 240 g 硫酸铵补料液全部补完。

从图2表明,硫酸铵的分次添加可以使发酵液中硫酸铵质量浓度维持在一个稳定的水平,既利于菌体的生长又利于葡萄糖向2-KGA的转化。通过

比较发现间歇定量补料方式效果最好,2-KGA的产量、糖酸转化率和生产强度分别达到251.3 g/L,1.01 g/g和5.23 g/L/h。选择间歇定量补硫酸铵方式。

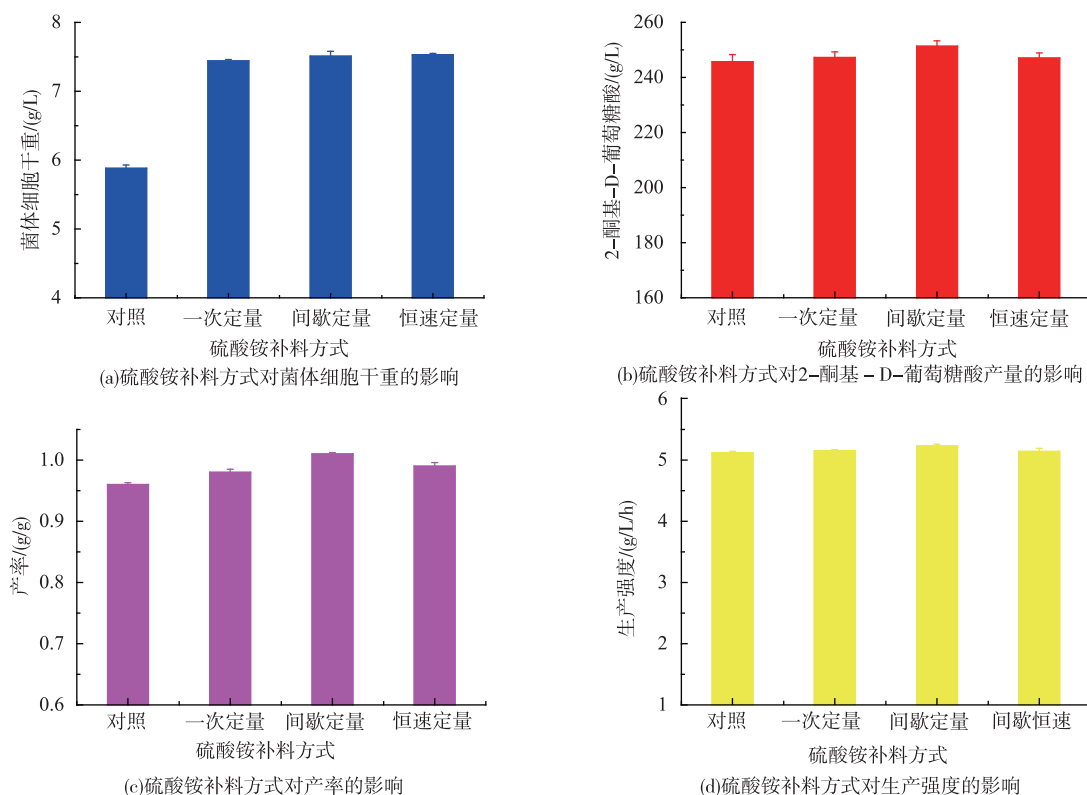


图2 硫酸铵补料方式对2-KGA发酵的影响

Fig. 2 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ feeding modes on the production of 2-KGA

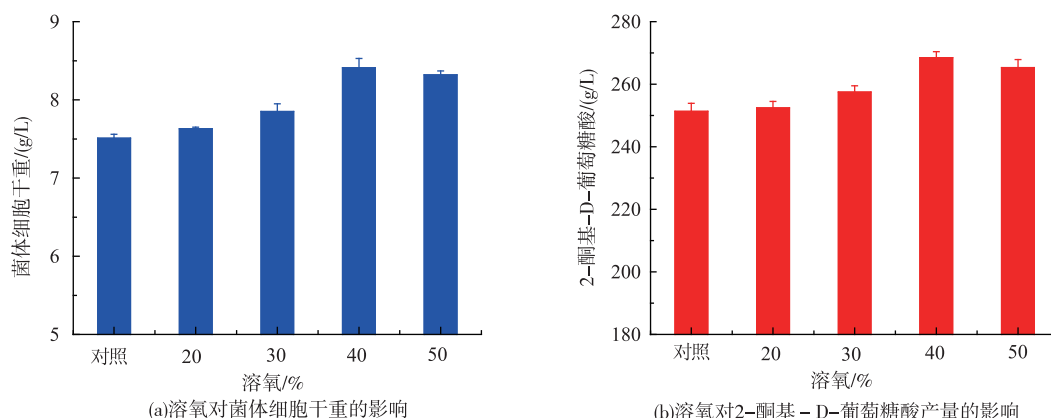
2.3 不同溶氧水平对发酵的影响

对于好氧发酵生产代谢产物来说,溶氧(Dissolved oxygen, DO)值的控制直接关系着细胞的生长和代谢产物的形成^[11-12]。

在研究了葡萄糖和硫酸铵补料策略之后,考察了在最优补料策略下,不同DO浓度对2-KGA合成的影响。

由图3知,当DO值分别为20%、30%和40%时,随着其值的提升,细胞生物量逐渐增加,40%时达最大为8.11 g/L;当DO值50%时,细胞生物量反而减少。再综合2-KGA的产量、得率和产率指标,溶氧为40%时最优,其值分别达到268.5 g/L、1.04 g/g和6.10 g/L/h。

综上可知,发酵生产2-KGA是需氧型,DO值



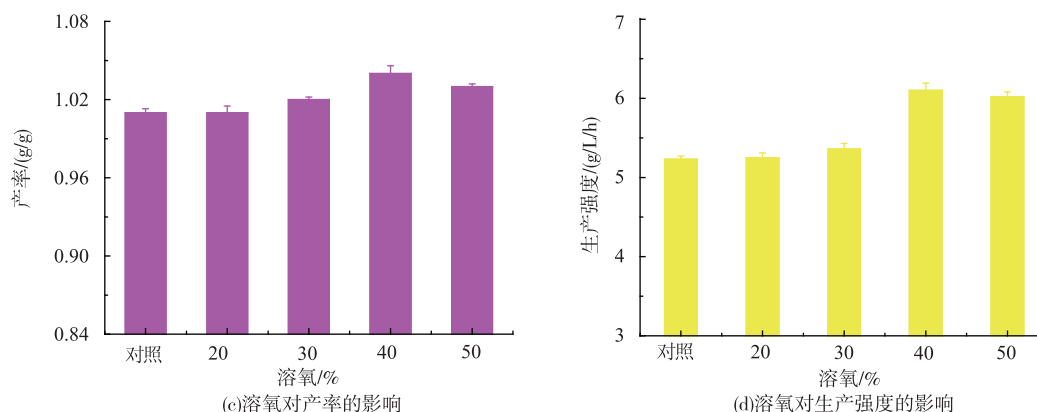


图3 溶氧水平对 2-KGA 发酵的影响

Fig. 3 Effect of dissolved oxygen levels on the production of 2-KGA

的控制要适宜,不是越高越好。可能因为,氧的过高容易产生含氧自由基破坏细胞组分,从而严重影响菌体的生长代谢^[13]。

2.4 30 L 发酵罐上 FMME043 发酵生产 2-KGA

在最优葡萄糖和硫酸铵补加策略下维持溶氧为 40%,菌株 FMME043 发酵生产 2-KGA 的过程曲线表明,2-KGA 发酵生产属于部分生长偶联型。如图 4 所示,1)菌体生物量:0~4 h 为菌体的适应阶段为延滞期,之后菌体快速生长为对数生长期,32 h 菌体生长减慢为稳定期,在 36 h 菌体干重达到最大值为 8.41 g/L。2)底物葡萄糖:前期 0~12 h 葡萄糖的量下降很少,12 h 之后葡萄糖的量迅速降低,28 h 耗糖速率减慢,至发酵结束糖耗尽。3)产物 2-KGA:0~12 h 产物生成较少,12 h 之后进入快速生成产物时期,28 h 后产物的生成速度减慢,至发酵结束 44 h,2-KGA 产量为 268.5 g/L,糖酸转化率为 1.04 g/g。与在 30 L 发酵罐上优化前^[2]相比,2-KGA 的产量、产率和生产强度分别提高了 58.4% ,11.6% 和

72.8%。与其他生产 2-酮基-D-葡萄糖酸菌株相比,FMME043 产量和转化率最高,对今后的扩大化生产也具有重要的指导意义(见表1)。

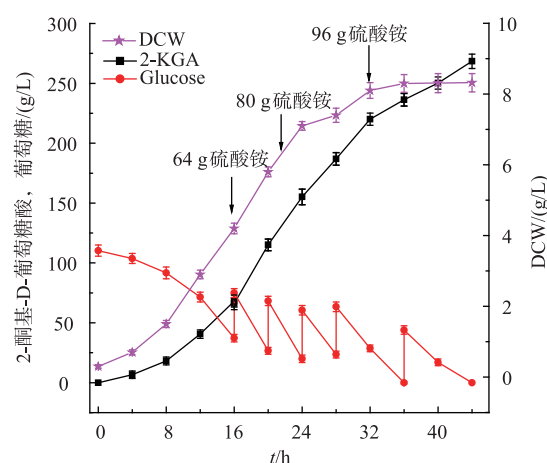
图4 30 L 发酵罐上 *Serratia* sp.FMME043 发酵产 2-KGA 的过程曲线Fig. 4 Time curves of 2-KGA fermentation by *Serratia* sp. FMME043 in a 30 L fermentor

表1 高产 2-KGA 菌株及其产量

Table 1 Strains for high 2-KGA production

菌株	2-KGA/(g/L)	产率/(g/g)	生产强度/(g/L/h)	氮源	容器	参考文献
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K1005	165.1	0.91	2.75	酵母粉	1000 L	[14]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AR4	135.8	0.97	3.4	玉米浆	50 L	[15]
<i>Arthrobacter globiformis</i> K1022	173.6	0.96	2.85	酵母粉	摇瓶	[16]
<i>Alcaligenes ketogenes</i> E54	151	1.00	2.10	玉米浆和尿素	摇瓶	[17]
<i>Serratia marcescens</i> NRRL B-486	114	0.95	7.13	硫酸铵	20 L	[18]
<i>Serratia</i> sp. BK-98	211	1.03	6.39	蛋白胨和尿素	100 L	[19]
<i>Serratia</i> sp. FMME043	268.5	1.04	6.10	硫酸铵	30 L	本研究

3 结 语

1) 在30 L发酵罐上优化确定了发酵生产2-KGA的最优补加策略及溶氧条件:当初糖浓度由100 g/L降至15~25 g/L,采用五次定量补料方式,使整个发酵过程中葡萄糖浓度低于7%;硫酸铵采用间歇定量补料,16 h补加64 g,22 h补加80 g,28 h

补加96 g;溶氧控制在40%。

2) 在最优条件下,菌体生长延滞期为4 h,36 h菌体干重达到最大值为8.41 g/L,发酵44 h时,2-KGA产量达到268.5 g/L,产率达到1.04 g/g。

3) 通过对溶氧、葡萄糖和硫酸铵等发酵条件和培养基进行优化控制,提升了发酵效价,为今后的2-KGA工业化生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] AL ASAKURA A, HOSHINO T, KIYASU T, et al. Manufacture of L-ascorbic acid and D-erythorbic acid [P]. US patent : 6146860, 2000-11-14.
- [2] LIANG Gaiqin, CAO Guifang, YIN Guanglin. Studies on food antioxidant-D-isoascorbic acid—Screening and identification of 2-based -D-glucose acid producing strain[J]. **Microbiology**, 1987, 14(6): 246-24. (in Chinese)
- [3] SUN Wenjing, ZHAO Fenmei, ZHAO Shenwang, et al. Effects of the Bacteriophages on 2-keto-D-gluconic acid fermentation in industrial process[J]. **Food Science**, 2005, 26(8): 36-41. (in Chinese)
- [4] ZHAO Fenmei, SUN Wenjing, WANG Muhua, et al. Selection of phage-resistant strains from 2-keto-D- gluconic acid producing strain[J]. **Industrial Microbiology**, 2000, 30(4): 45-49. (in Chinese)
- [5] DANIEL Y N B, MARK D. Enhanced product formation in continuous fermentations with microbial cell recycle [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1981, 23(2): 373-389.
- [6] SUN Wenjing, ZHAO Fenmei, YANG Qingwen, et al. Studies on the fermentative production of 2-keto-D-gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* in fed-batch culture[J]. **Food Science**, 2004, 23(11): 115-117. (in Chinese)
- [7] ZHENG Zhiyong, ZHAO Zhanjun. Immobilization of *Pseudomonas* cell for production of 2-keto-D-gluconic acid [J]. **Journal of Shanxi Agricultural University**, 2003, 23(2): 158-160. (in Chinese)
- [8] NIU Panqing, YANG Aihua, YANG Songxin, et al. Screening and identification of 2-keto-D-gluconic acid-producing strain[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2012, 12(6): 1008-1013. (in Chinese)
- [9] TENG W H, SUN W J, YU B, et al. Continuous conversion of rice starch hydrolysate to 2-keto-D-gluconic acid by *Arthrobacter globiformis* C224[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2013, 18(4): 709-714.
- [10] 冯晓燕. 2- 酮基 -D- 葡萄糖酸补料分批发酵工艺的优化及动力学研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2009.
- [11] LI Jiawei, LIU Long, LI Jianghua, et al. Strategy of two-stage agitation rate for citric acid Production [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(2): 131-136. (in Chinese)
- [12] WEI Gongyuan, WANG Dahui, CHEN Jjian. Analysis of batch fermentation process of glutathione under different control modes of dissolved oxygen[J]. **CIESC Journal**, 2007, 9: 2330-2332. (in Chinese)
- [13] GAO Nianfa, ZHANG Xianqing, WU Di. The effects of dissolve oxygen on pyruvate fermentation [J]. **Journal of Tianjing University of Science & Technology**, 2004, 19(3): 5-7. (in Chinese)
- [14] LIN Yaohui, BAI Zengmei, WANG Yongshun, et al. D-isoascorbic acid sodium indirect fermentation medium test [J]. **Food and Fermentation Industries**, 1985, 11(4): 18-24. (in Chinese)
- [15] SUN Wenjing, YANG Qingwen, HUANG Huiying, et al. Studies on the fermentation conditions of *Pseudomonas fluorescens* AR4 Producing 2-Keto-D-gluconic Acid[J]. **Food Science**, 2004, 25(10): 46-49. (in Chinese)
- [16] JIANG Mingzhu, BAI Zhaoxi, ZHANG Junxian, et al. Fermentation test of 2-keto-D-gluconic acid by *Arthrobacter globiformis* K1022[J]. **The Industrial Microbial**, 1989, 19(1): 3-7. (in Chinese)
- [17] CAO Guifang, LIANG Gaiqin, YI Guanglin. Fermentation conditions of food antioxidant-D-isoascorbic acid [J]. **Microbiology**, 1988, 15(1): 7-11. (in Chinese)
- [18] MISENHEIMER T J, ANDERSON R F, LAGODA A A, et al. Production of 2-Keto-gluconic acid by *Serratia marcescens* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1965, 13(3): 393-396.
- [19] ZHANG Wei, XIE Zhipeng, LUO Wei, et al. Fermentation process optimization and kinetics studies of 2-keto-D-gluconic acid production by *Serratia* sp. BK-98[J]. **CIESC Journal**, 2011, 62(5): 1371-1376. (in Chinese)