

钙盐沉淀法从酮酸发酵液中提取 α -酮戊二酸

彭小雨^{1,2,3}, 曾伟主^{1,2}, 周景文^{1,2,3}, 徐国强^{*1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: α -酮戊二酸作为一种重要的有机酸,在食品、化工、医药等领域具有广泛的用途。目前,发酵法是生产 α -酮戊二酸最具优势的方法。但在解脂亚洛酵母发酵生产 α -酮戊二酸的过程中,丙酮酸作为副产物总是大量积累。这2种酮酸物化性质相似,为下游分离提取过程造成了很大的困难。研究对比3种不同钙盐对酮酸分离的影响,建立了一种有效分离发酵液中 α -酮戊二酸的钙盐沉淀方法。采用 CaCO_3 为 α -酮戊二酸的最佳沉淀剂, α -酮戊二酸的回收率和纯度分别为82.5%和98.89%。同时,结果表明在偏中性和高温作用下,丙酮酸的稳定性受到影响,丙酮酸分离不适用于钙盐沉淀法。该研究可为酮酸的分离提取过程提供重要的理论参考。

关键词: 钙盐沉淀法; α -酮戊二酸; 丙酮酸; 解脂亚洛酵母; 有机酸

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2020)03-0065-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.009

Extraction of α -Ketoglutaric Acid from Fermentation Broth by Calcium Precipitation Method

PENG Xiaoyu^{1,2,3}, ZENG Weizhu^{1,2}, ZHOU Jingwen^{1,2,3}, XU Guoqiang^{*1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: α -Ketoglutaric acid is widely used in food, chemical and pharmaceutical industries as an important organic acid. Fermentative production of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* is currently a competitive method. The accumulation of pyruvic acid is unavoidable during the production of α -ketoglutaric acid by *Y. lipolytica*. The two keto acids have similar physical and chemical properties, which brings big challenge for the downstream separation process. In this study, effects of three different calcium salts on the separation of keto acids in the fermentation broth were compared. An effective precipitation method was established for the separation of α -ketoglutaric acid from fermentation broth. CaCO_3 was the optimum precipitant of α -ketoglutaric acid. The recovery and purity rate of α -ketoglutaric acid were 82.5% and 98.89%, respectively. Meanwhile, the

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(21390204)。

* 通信作者: 徐国强(1984—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事发酵工程与代谢工程领域的研究。

E-mail: xuguoqiang@jiangnan.edu.cn

precipitation method could not be used for the separation of pyruvic acid, because pyruvic acid was unstable under the partial neutrality and high temperature. This study can thus provide an important theoretical reference for the separation and extraction of keto-acid.

Keywords: precipitation method, α -ketoglutaric acid, pyruvic acid, *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06, organic acid

α -酮戊二酸(α -KG)作为重要的二元羧酸,参与微生物体内的碳氮代谢,并在整个碳氮代谢过程中起着至关重要的作用^[1-2];在食品、制药、化学以及动物饲料等行业具有广泛的应用^[3-4]。丙酮酸(PA)又称 2-氧代丙酸,是最重要的氧代羧酸之一^[5-6],参与细胞体内的能量代谢,并在其中扮演着极其重要的角色。目前,化学合成法因生产成本低,环境污染严重等缺点逐渐被无污染的生物发酵法所取代。本实验室在 2010 年筛选出了一株以甘油为碳源并过量积累 α -酮戊二酸的菌株(*Yarrowia lipolytica* WSH-Z06),利用此菌株生产 α -酮戊二酸,产量高达 39.2 g/L,但是丙酮酸的产量却高达 16.8 g/L^[7]。为了能够减少丙酮酸的积累,同时又能够过量积累 α -酮戊二酸,研究人员采取了代谢改造^[8-9]和过程优化^[10-11]等策略来达到这一目标,但是丙酮酸积累的问题依然存在。酮酸联产为整个实验提供了一个新的思路。在前期工作中本研究室对于发酵优化联产酮酸已经达到很好的效果, α -酮戊二酸和丙酮酸的产量分别高达 67.4 g/L 和 39.1 g/L^[12]。

由于 α -酮戊二酸和丙酮酸的化学性质和物理性质较为相似,一般常用的分离提取方法无法将两者进行有效的分离。Pal 等对于反应萃取法的研究比较多,先后采用了不同的单一萃取剂(磷酸三丁酯^[13],三辛胺^[14],三丁胺^[15])和混合萃取剂(磷酸三丁酯,三辛胺,季胺氯化物)来分离发酵液中的丙酮酸^[16]。但是大量的有机溶剂的使用以及复杂的操作程序也限制该方法在工业上的广泛应用。在 2013 年,占宏德等通过筛选多种不同类型的交换树脂发现, D301 树脂为分离 α -酮戊二酸的最佳吸附树脂,并且通过阶段洗脱的策略,使 α -酮戊二酸的收率达到了 93.2%^[17]。李斌水等采用氯化钙沉淀发酵液中的 α -酮戊二酸^[18],但是发酵液中会出现大量游离的 Cl^- , Cl^- 对金属容器腐蚀性较强且成本高,在工业上大规模应用受到制约。王东阳等采用氢氧化钙来沉淀发酵液中的 α -酮戊二酸^[19],氢氧化钙和 α -酮戊二酸

沉淀结合较少,收率较低。而本文中主要对比了 3 种不同钙盐(CaCl_2 , CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$)对发酵液中酮酸的影响,最后建立一种有效分离发酵液的 α -酮戊二酸的钙盐沉淀方法。并对分离提取过程工艺进行了探索,希望能为酮酸的提取和纯化提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

丙酮酸和 α -酮戊二酸标品,购于上海国药集团有限公司;浓硫酸、 CaCl_2 、 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 等均为国产分析试剂。酮酸发酵液:由本实验室发酵所得(菌株:*Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 C3),含有 44.68 g/L 的 α -酮戊二酸和 36.93 g/L 的丙酮酸。

恒温培养箱:上海医疗器械研究所产品;恒温摇床:上海精密仪器仪表有限公司产品;15 L 发酵罐:迪必尔生物工程有限公司产品;台式高速离心机:德国艾本德公司产品;pH 计:瑞士梅特勒-托利多公司产品;Agilent 1260 高效液相色谱仪:美国安捷伦公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液的预处理 根据 Zhou 的发酵方法^[7],利用解脂亚洛酵母 WSH-Z06 C3 发酵生产酮酸,待发酵结束后,将酮酸发酵液在 8 000 g 的条件下离心 20 min,去除沉淀物,收集上清液。然后通过纳滤膜仪器除去上清液中的大分子物质相对分子质量(>500),如蛋白质、色素。备用。

1.2.2 钙盐沉淀法分离 α -酮戊二酸 配制 50 g/L 的 α -酮戊二酸标准溶液,取 50 mL α -酮戊二酸水溶液,加入等摩尔质量的钙盐固体。待固体完全溶解后,用质量分数为 50%的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 缓慢调节 pH 至 3 个梯度:6.0、6.5 和 7.0。沸水浴加热至上清液澄清(15 min),抽滤,量取滤液体积,高相液相色谱法(HPLC)检测滤液中 α -酮戊二酸的含量。

1.2.3 钙盐沉淀法分离丙酮酸 配制 50 g/L 的丙酮酸标准溶液,取 50 mL 丙酮酸水溶液,加入等摩

尔质量的钙盐固体。待固体完全溶解后,缓慢加入质量分数为 50%的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 使溶液的 pH 在 6.0~7.0 之间。沸水浴加热至上清液澄清(15 min),抽滤,量取滤液体积, HPLC 检测滤液中 α -酮戊二酸的含量。

1.2.4 数据计算方法

$$R_1 = \frac{m_1}{\rho \times V} \times 100\% \quad (1)$$

$$P_2 = \frac{F_{\text{试样}} \times m_{\text{标样}}}{F_{\text{标样}} \times m_{\text{试样}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: R_1 , 样品的最终回收率, %; m_1 , 烘干后的钙盐沉淀质量, g; ρ , 初始酮酸质量浓度, g/L; V , 初始体积, mL; P_2 , 样品的最终纯度, %; $F_{\text{标样}}$, HPLC 检测标样峰面积; $F_{\text{试样}}$, HPLC 检测试样峰面积; $m_{\text{标样}}$, 标样质量, g; $m_{\text{试样}}$, 试样质量, g。

1.2.5 HPLC 分析 取 1 mL 滤液于 8 000 g 离心 5 min, 将上清液稀释适当的倍数, 然后经 0.22 μL 水系滤膜过滤后, 进行高效液相色谱分析。色谱分析条件根据参考文献^[7]。

1.2.6 钙盐的检测 取 6 管 5 mL 发酵液离心, 去除上清液。将离心后的菌体水洗 2 次后, 向其中 3 管中加入 2 mL 2 mol/L HCl, 另外 3 管中加入等体积的水, 充分混匀后, 离心取上清液。HPLC 检测上清液中 α -酮戊二酸的含量。

2 结果与讨论

2.1 钙盐沉淀法分离 α -酮戊二酸

2.1.1 不同钙盐沉淀对 α -酮戊二酸分离的影响 分别以 CaCl_2 、 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 为沉淀剂, 考察了在 3 个 pH 梯度(6.0、6.5、7.0)下 α -酮戊二酸的回收率, 结果如表 1 所示。由表 1 可知, 以 CaCl_2 为沉淀剂时, 随着 pH 值的增加, 滤液中的 α -酮戊二酸呈下降趋势, 但是 α -酮戊二酸的回收率呈上升趋势。在 pH 6.5 时, α -酮戊二酸的收率达到最高, 为 98.05%。故选用 6.5 作为 CaCl_2 沉淀的 pH。以 CaCO_3 为沉淀剂时, α -酮戊二酸的收率并不是随着 pH 值的上升而呈上升趋势。在 pH 6.5 时, α -酮戊二酸的收率达到最高, 为 96.84%。故选用 6.5 作为 CaCO_3 沉淀的 pH。以 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 为沉淀剂时, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀时 pH 影响不大, 在 pH 7.0 时, α -酮戊二酸的收率达到最高, 为 96.58%。故选用 7.0 作为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀的 pH。

表 1 不同钙盐的沉淀结果

Table 1 Precipitation capacity of different calcium salts

沉淀剂	pH 梯度	初始 pH	滤液 pH	滤液体积/mL	滤液中 $c_{\alpha\text{-酮戊二酸}}$ / (g/L)	收率/%
CaCl_2	6.0	1.38	5.48	21.5	3.257	97.19
	6.5	1.36	5.75	22.5	2.162	98.05
	7.0	1.38	6.71	24.0	2.323	97.72
CaCO_3	6.0	1.36	5.89	27.5	3.313	96.36
	6.5	1.36	6.36	25.5	3.098	96.84
	7.0	1.38	6.70	29.5	2.842	96.64
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	6.0	1.38	5.76	26.5	4.612	95.11
	6.5	1.35	6.24	25.5	3.706	96.21
	7.0	1.38	6.73	24.0	3.554	96.58

2.1.2 α -酮戊二酸钙盐酸化过程参数的确定 量取 200 mL 水, 然后加入不同质量的 α -酮戊二酸固体, 使 α -酮戊二酸的浓度分别为 50、100、150、200 g/L。表 2 所示显示了不同质量浓度下所对应的 α -酮戊二酸的 pH。如表 2 可明显的观察到, 溶液中有有机酸的质量浓度和有机酸的 pH 呈正相关。当质量浓度均达到 300 g/L 时, 此时溶液 pH 为 0.93, 故酸化 α -酮戊二酸钙沉淀过程中可以尽可能提高 α -酮戊二酸质量浓度。但为了完全地置换出 α -酮戊二酸, 溶液 pH 应该调节至低于该质量浓度 α -酮戊二酸的实际 pH 值。溶解沉淀物时加入水的体积为酮戊二酸钙湿重的 1~1.5 倍。

表 2 不同质量浓度有机酸的 pH (25 $^{\circ}\text{C}$)

Table 2 pH values of different organic acid concentrations (25 $^{\circ}\text{C}$)

α -酮戊二酸质量浓度 / (g/L)	pH
50	1.38
100	1.21
150	1.09
300	0.93

2.1.3 α -酮戊二酸钙盐的纯化 前期实验已经探索了 3 种不同的钙盐沉淀法对 α -酮戊二酸的影响, 结果发现 CaCl_2 对 α -酮戊二酸沉淀效果最好, 收率接近 98%。然而向发酵液中加入 CaCl_2 后, 发酵液中会出现大量游离的 Cl^- , Cl^- 对金属容器腐蚀性较强

且成本高,在工业上大规模应用受到制约。考虑到 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的沉淀效果相差不大,继续考察 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 2 种钙盐的纯化效果。

在高质量浓度 α -酮戊二酸条件下,应用 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 都会使溶液呈糊状, α -酮戊二酸在质量浓度为 150 g/L 左右时已十分浓稠, α -酮戊二酸经过 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀和酸化后的得率分别为 84.52% 和 85.19%。两者沉淀出的酮戊二酸钙固体颜色不同, CaCO_3 沉淀出的固体为白色, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀出的为淡黄色。酸化后溶液颜色如图 1 所示,应用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 进行沉淀处理后的 α -酮戊二酸溶液颜色深,应用 CaCO_3 进行沉淀处理后的 α -酮戊二酸溶液颜色较浅。HPLC 检测结果如图 2 所示,酸化后的

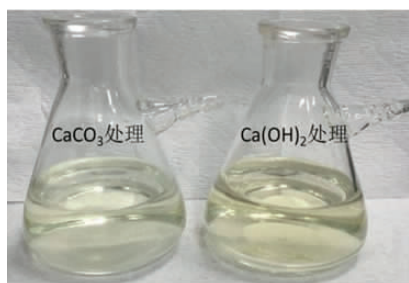


图 1 标液沉淀后过滤图

Fig. 1 Graph of α -ketoglutaric acid model solution after precipitation

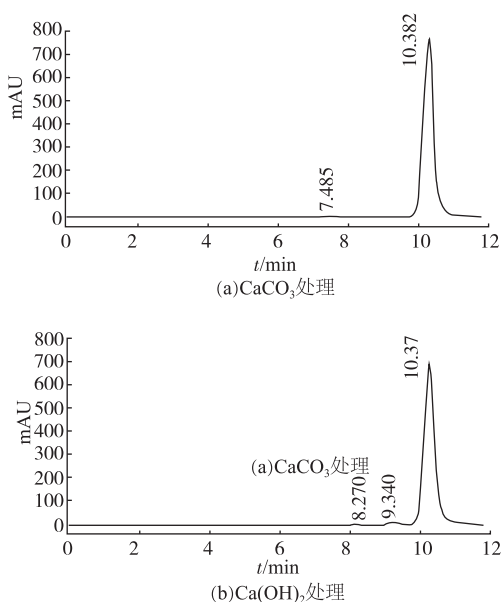


图2 标液沉淀后过滤液 HPLC 检测

Fig. 2 HPLC chromatogram of α -ketoglutaric acid model solution after precipitation

溶液, α -酮戊二酸纯度分别为:99.18% (CaCO_3) 和 96.78% ($\text{Ca}(\text{OH})_2$),结果表明 CaCO_3 是更适合沉淀 α -酮戊二酸的钙盐。

以 CaCO_3 为沉淀剂,按照标液沉淀分离纯化的过程来验证分离发酵液中 α -酮戊二酸。结果显示 α -酮戊二酸的收率和纯度分别为 82.5% 和 98.89%。说明钙盐沉淀法适用于分离发酵液中的 α -酮戊二酸。

2.2 钙盐沉淀法分离丙酮酸

分别以 CaCl_2 、 CaCO_3 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 为沉淀剂,考察了在 pH 6.5 丙酮酸的沉淀效果,结果如图 3 所示。由图 3 可知,丙酮酸溶液澄清透明,说明钙盐沉淀法不适用于丙酮酸的分离提取。



图 3 丙酮酸沉淀结果

Fig. 3 Graph of pyruvic acid model solution after precipitation

2.3 钙盐沉淀法分离发酵液中酮酸

钙盐沉淀法可较好沉淀分离 α -酮戊二酸,而无法沉淀丙酮酸,考察该方法是否可用于联产酮酸的分离。取 50 mL 预处理后的发酵液,缓慢加入 CaCO_3 固体,调节 pH 至 6.5,煮沸 20 min,过滤,HPLC 检测过滤液中有机酸的含量。结果表明 α -酮戊二酸的收率为 93.42%,但过滤液中丙酮酸相对含量明显降低,并存在大量的杂质。如图 4 所示。

由于丙酮酸稳定性差,沉淀过程中的高温、偏中性条件可能对丙酮酸有影响,故对这 2 个因素进行验证试验。

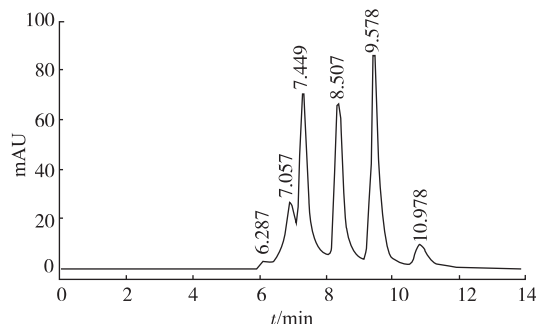


图 4 发酵液沉淀后过滤液 HPLC 检测

Fig. 4 HPLC chromatogram of fermentation broth after precipitation

2.4 丙酮酸稳定性分析

2.4.1 温度的影响 配制 50 g/L 的丙酮酸的标准溶液,分别取 10 mL 于试管中,加入一定量碳酸钙, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 至 6.5,分别置于 0、20、30、40、60、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 20 min。上清液稀释 50 倍后, HPLC 检测丙酮酸相对含量(峰面积表示)。结果如图 5 所示。由图 5 可知,在 0~90 $^{\circ}\text{C}$ 之间,随着温度的升高,丙酮酸的峰面积有所下降,但是效果不明显,所以说温度对丙酮酸的稳定性有较小的影响。

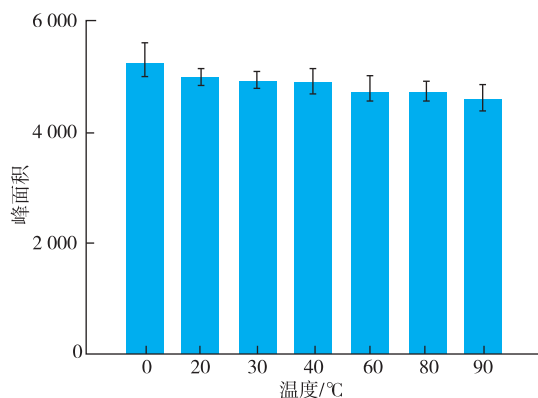


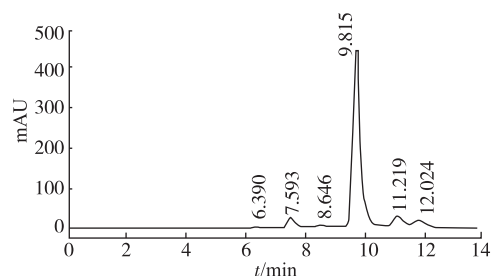
图 5 温度对丙酮酸的稳定性

Fig. 5 Effect of temperature on the stability of pyruvic acid

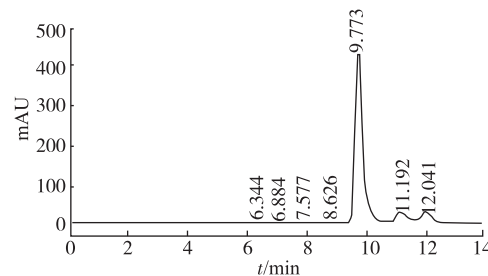
2.4.2 pH 的影响 配制 50 g/L 的丙酮酸标准溶液,分别取 10 mL 于试管中,以 CaCO_3 为钙盐沉淀剂,配制 5 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 6.5。将过滤后的上清液稀释 50 倍,然后用 HPLC 检测溶液中的丙酮酸相对含量(峰面积表示),结果如图 6 所示。由图 6 可知,向丙酮酸溶液中加入 CaCO_3 对丙酮酸成分的影响较小,但是将 pH 调至 6.5 时,丙酮酸的峰面积显著下降,并且周围杂峰的峰面积开始显著增加,这说明在 pH 6.5 时可能导致丙酮酸发生聚合或者其他反应。当在 90 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min 时,丙酮酸的峰面积也下降了,但是没有 pH 对丙酮酸的作用强。

3 结 语

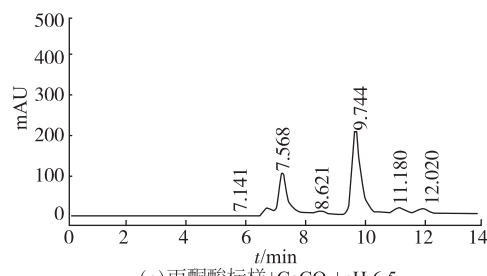
丙酮酸是解脂亚洛酵母生产 α -酮戊二酸的主要副产物,发酵过程中若在以 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 维持较低的 pH 值,发酵过程会积累大量的丙酮酸,而 Ca^{2+} 有利于丙酮酸的积累;若以 NaOH 调节 pH,提取过程中 α -酮戊二酸钙的回收效率低。并且在 α -酮戊二酸提取过程中,在偏中性 pH 和高温作用下, α -酮戊二酸的



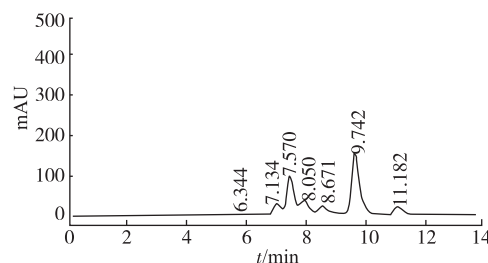
(a) 丙酮酸标样



(b) 丙酮酸标样+ CaCO_3



(c) 丙酮酸标样+ CaCO_3 +pH 6.5



(d) 丙酮酸标样+ CaCO_3 +pH 6.5+90 $^{\circ}\text{C}$

图 6 pH 对丙酮酸的影响

Fig. 6 Effect of pH on PA

稳定性不受影响,丙酮酸却容易发生反应生成大量杂质,且 pH 对丙酮酸稳定性的影响大于温度对它的影响。因此,当发酵液中含有较高浓度的副产物丙酮酸时,钙盐沉淀方法仅能提取纯化出 α -酮戊二酸,无法同时获得高浓度的副产物丙酮酸,这将降低 α -酮戊二酸的整个工业生产效益。后期可以通过代谢改造使解脂亚洛酵母发酵高产 α -酮戊二酸,而减少丙酮酸的积累,然后利用钙盐沉淀法分离发酵液中的 α -酮戊二酸,这样就能很大程度提高生产效益。

参考文献:

- [1] DE BANDT J P, COUDRAY-LUCAS C, LIORET N, et al. A randomized controlled trial of the influence of the mode of enteral ornithine alpha-ketoglutarate administration in burn patients[J]. **Journal of Nutrition**, 1998, 128(3): 563-569.
- [2] MORGUNOV I G, KAMZOLOVA S V, SAMOILENKO V A. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(19): 8711-8718.
- [3] FINOGENOVA T V, MORGUNOV I G, KAMZOLOVA S V, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*; a review of prospects[J]. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2005, 41(5): 418-425.
- [4] OTTO C, YOVKOVA V, BARTH G. Overproduction and secretion of alpha-ketoglutaric acid by microorganisms[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011, 92(4): 689-695.
- [5] LI Y, CHEN J, LUN S Y. Biotechnological production of pyruvic acid[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 57(4): 451-459.
- [6] SONG Y, LI J H, SHIN H D, et al. Biotechnological production of alpha-keto acids: current status and perspectives[J]. **Bioresource Technology**, 2016, 219, 716-724.
- [7] ZHOU J W, ZHOU H Y, DU G C, et al. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for alpha-ketoglutaric acid overproduction[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2010, 51(3): 264-271.
- [8] ZHOU J W, YIN X X, MADZAK C, et al. Enhanced alpha-ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism[J]. **Journal of Biotechnology**, 2012, 161(3): 257-264.
- [9] YIN X X, MADZAK C, DU G C et al. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 96(6): 1527-1537.
- [10] YU Z Z, DU G C, ZHOU J W, et al. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 114, 597-602.
- [11] GUO H W, SU S J, MADZAK C, et al. Applying pathway engineering to enhance production of alpha-ketoglutarate in *Yarrowia lipolytica*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016, 100(23): 9875-9884.
- [12] ZENG W Z, ZHANG H L, XU S, et al. Biosynthesis of keto acids by fed-batch culture of *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 [J]. **Bioresource Technology**, 2017, 243, 1037-1043.
- [13] PAL D, KESHAV A. Extraction equilibria of pyruvic acid using tri-n-butyl phosphate: influence of diluents [J]. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 2014, 59(9): 2709-2716.
- [14] PAL D, TRIPATHI A, SHUKLA A, et al. Reactive extraction of pyruvic acid using tri-n-octylamine diluted in decanol/kerosene: equilibrium and effect of temperature[J]. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 2015, 60(3): 860-869.
- [15] PAL D, KESHAV A. Recovery of pyruvic acid using tri-n-butylamine dissolved in non-toxic diluent (rice bran oil) [J]. **Journal of The Institution of Engineers (India): Series E**, 2015, 97(1): 81-87.
- [16] PAL D, THAKRE N, KUMAR A, et al. Reactive extraction of pyruvic acid using mixed extractants[J]. **Separation Science and Technology**, 2016, 51(7): 1141-1150.
- [17] ZHAN Hongde, Li Jianghua, Liu Long, et al. Ion-exchange purification of alpha-ketoglutaric acid in fermentation broth [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(10): 1673-1689. (in Chinese)
- [18] 李斌水, 王殿涛. 一种从转化液中分离 α -酮戊二酸的方法: 中国, CN104529755A. 2015-04-22.
- [19] 王东阳, 蔡传康, 刘朋朋, 等. 一种从发酵液中提取 α -酮戊二酸的方法: 中国, CN105198732A. 2015-12-30.