研究论文

氧化葡萄糖酸杆菌发酵 L-山梨糖工艺

王小北[1]，周景文[1]，刘 杰[2]，堵国成[*1]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江苏江山制药有限公司，江苏 靖江 214500）

摘要：为了实现 L-山梨糖的高效生产，利用代谢改造的手段构建获得一株过量表达山梨醇脱氢酶基因（*sldhAB*）的重组菌氧化葡萄糖酸杆菌（*Gluconobacter oxydans* SLDH）。利用海藻酸钠和硅藻土包埋法固定化细胞，并在 1 L 发酵罐中对发酵条件和补料策略进行了优化，通过对发酵过程中底物消耗进行数学模拟，最终建立了分批补料发酵工艺。研究发现，和野生菌相比，在 1 L 发酵罐水平上重组菌 L-山梨糖的产量提高了 20.3%，且发酵周期缩短了 1/3 以上。利用固定化重组菌进行分批补料发酵可完成 19 d 的补料发酵，其 L-山梨糖净累积量比野生菌提高了 30.3%。

关键词：维生素 C；山梨醇脱氢酶；过量表达；固定化；分批补料发酵

中图分类号：S 665.2　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)05—0498—06

Efficient Production of L-Sorbose by *Gluconobacter oxydans*

WANG Xiaobei[1]，*ZHOU Jingwen*[1]，*LIU Jie*[2]，*DU Guocheng*[*1]

（1. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Jiangsu Jiangshan Pharmaceutical Co.，Ltd. Jinjiang 214500，China）

Abstract：In order to achieve more efficient production of L-sorbose from D-sorbitol by Gluconobacter oxydans WSH-003，an engineered strain *G. oxydans* SLDH with overexpressed sorbitol dehydrogenase gene *sldhAB* was constructed. Effect of immobilized cells on a combination carrier of sodium alginate and diatomite to produce L-sorbose was investigated. Feeding strategies of immobilized fermentation were optimized in 1-L fermentor. A fed-batch fermentation model was established based on the kinetic model of D-sorbitol consumption in batch fermentation. By self-overexpressing the *sldhAB* gene in *G. oxydans*，the yields of L-sorbose increased by 20.3% while the fermentation time was shortened by 1/3 compared to the control strain in 1-L fermentor. Besides，the L-sorbose yield was raised by 30.3% using the fed-batch fermentation with a 19 days fermentation period in a bioreactor.

Keywords：vitamin C，D-sorbitol dehydrogenase，overexpression，immobilized，fed-batch fermentation

收稿日期：2013-07-18

基金项目：国家 863 计划项目（2012AA022103）。

*通信作者：堵国成（1965—），男，江苏常州人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术、代谢工程技术方面的研究。E-mail：gcdu@jiangnan.edu.cn

L-山梨糖作为一种重要的化学原料,通常由D-山梨醇氧化脱氢获得,主要被用来作为生产维生素 C(VC)的原料[1]。VC 是一种人体必需维生素,具有极其广泛的生理作用和应用价值,已广泛应用于制药、食品、饮料、化妆品和饲料等工业中[2]。目前国内 VC 工业化生产采用二步发酵法,第一步便是利用氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖,第二步再由巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和古龙酸菌(*Ketogulonigenium vulgare*)混合培养将 L-山梨糖转化为 2-酮基-L-古龙酸[2-4]。其中由 *G. oxydans* 将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖是工业上利用二步法生产 VC 的关键步骤,因此优化 L-山梨糖的生产工艺有着重要的经济学意义[5-6]。

山梨醇脱氢酶基因(*sldhAB*)是 *G. oxydans* 细胞中转化 D-山梨醇的关键基因[7]。作者通过构建一株过量表达 *sldhAB* 的重组菌以实现 L-山梨糖的高效生产。由于我国工业中以 D-山梨醇为底物发酵 L-山梨糖大都采用游离菌批式发酵,每批制备种子液会造成培养基的大量消耗,从发酵液中提取分离 L-山梨糖需要消耗大量能耗,发酵过程自动化程度低,不但延长了生产周期,还造成能源和人力的大量浪费[8]。针对此问题,作者采用固定化细胞发酵 L-山梨糖[3,9-10],并建立了分批补料发酵工艺,利用固定化细胞进行 L-山梨糖的半连续发酵生产。通过放掉发酵液再补入新鲜培养基,补充养分和前体,同时稀释有害代谢物,有利于 L-山梨糖的继续合成。采用此方法不仅可以使 *G. oxydans* 细胞生长维持在最低限度,同时可以使细胞内的酶活力得到最大限度的保护[11-13],从而可达到较高的生产强度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans* WSH-003):本研究的产糖及代谢工程改造菌株,由江苏江山制药集团馈赠。该菌株作为代谢工程改造的宿主,用于研究固定化细胞和强化 D-山梨醇脱氢途径对产 L-山梨糖的影响。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 用于构建质粒的宿主菌。穿梭质粒 pBBR1MCS-2:由华东理工大学花强教授馈赠[14],用于后续重组质粒的构建。

1.1.2 培养基

1) LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,去离子水定容至 1 L,固体培养基添加 20 g/L 的琼脂。

2) 种子培养基:山梨醇 150 g,酵母粉 6 g,$CaCO_3$ 2 g,pH 4.8~5.1,去离子水定容至 1 L,固体培养基添加 20 g/L 的琼脂。

3) 发酵培养基:山梨醇 150 g,酵母膏 2 g,$CaCO_3$ 2 g,初始 pH 5.1~5.4,去离子水定容至 1 L。

1.1.3 酶、引物、DNA Marker 及相关试剂盒 pMD18-T Simple Vector、LATaq、DNA Marker、大肠杆菌感受态制备试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、细菌总 DNA 提取试剂盒、以及各种内切酶:均购自宝生物工程(大连)有限公司。D-山梨醇和 L-山梨糖色谱级标准品:购自 Sigma-Aldrich 公司。本研究中所用的引物合成和测序工作均由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作方法 *G. oxydans* WSH-003 中总 DNA 提取、*E. coli* JM109 中质粒提取,DNA 片段胶回收、酶切、连接,*E. coli* JM109 感受态细胞的制备和转化等操作参见相应试剂盒说明书。

1.2.2 *G. oxydans* 重组菌的构建

1) *G. oxydans* 表达载体的构建:首先将 PCR 得到的来源于 *G. oxydans* WSH-003 的目的基因 tufB 和 *sldhAB* 分别连入载体 PMD-18T,得到重组质粒 pMD-18T-*tufB* 和 pMD-18T-*sldhAB*,然后用 *Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切质粒 pMD-18T-*tufB*,得到 0.5 kb 的目的基因 *tufB*,并将其连入表达载体 pBBR1MCS-2,得到重组表达载体 pBBR1MCS-2-*tufB*,再用 *Xho*I 和 *EcoR*I 双酶切重组质粒 pMD-18T-*sldhAB*,得到的 2.7 kb 的目的基因 *sldhAB*,将其连入重组表达载体 pBBR1MCS-2-*tufB*,得到重组表达载体 pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB*,见图 1。随后将连接产物转化 *E.coli* JM109。挑取转化子,提取重组质粒 pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB* 进行酶切验证,此过程引物序列见表 1。

2) 重组质粒电激转化 *G. oxydans* WSH-003:见文献[15]。

1.2.3 培养方法

1)种子培养条件:挑取 *G. oxydans* WSH-003 单菌落接种于含有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中,在 30 ℃,200 r/min 的摇床上培养至对数期。

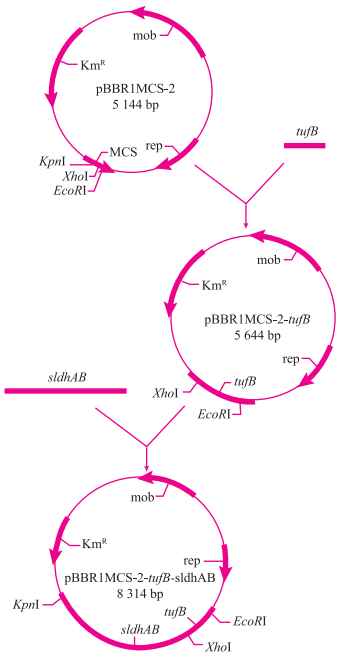


图 1　pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB* 表达载体的构建

Fig. 1　Construction of pBBR1MCS -2 -*tufB* -*sldhAB* expression vectors

表 1　构建表达载体时使用的引物序列

Table 1　Oligonucleotides sequence used in vectors construction

引物	碱基序列 (5'→3')	酶切位点
P1	GGGGTACCGTACGATGGTAAGAAATCCACTGCC	*Kpn*I
P2	CCGCTCGAGCGTCTTTCTCCAAAACCCCGCTCCA	*Xho*I
P3	CCGCTCGAGGTGATTGTGAAATATTTCCAA	*Xho*I
P4	CGGAATTCAAATTTAAATTTTCAGTGCTTGATGGCATCAG	*Eco*RI

* 下划线部分为各自相对应的酶切位点。

2)发酵条件:取上述种子培养物按接种体积分数 15%接种于 500 mL 摇瓶或者 1 L 发酵罐中,摇瓶发酵条件为:30 ℃、200 r/min 发酵 36 h; 发酵罐发酵条件为:通气量 2.0 v/(v·min),30 ℃,500 r/min 发酵 36 h,发酵前期添加 2 g/L 的碳酸钙调节 pH。

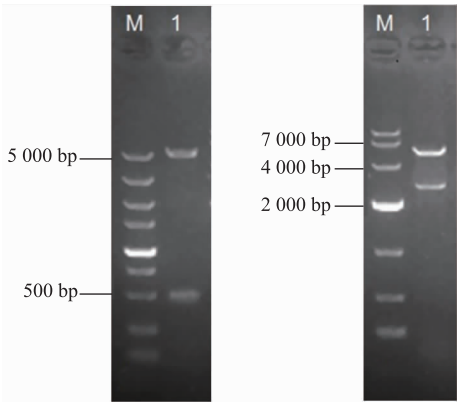
3)固定化细胞制备及培养:见文献[16]。

1.2.4　分批补料发酵　将完成增殖培养的固定化细胞接入 1 L 发酵罐, 培养一定时间后进行补料发酵,补料发酵实验在同一个 1 L 发酵罐中进行,每隔一定时间排出全部发酵醪液,再用电子蠕动泵流加相同体积的新鲜培养基, 每隔一定时间取样检测 D-山梨醇的转化情况,直至整个流加发酵结束。

2 结果与分析

2.1　基因工程菌构建

参照 1.2.2 步骤, 构建得到了分别携带重组载体 pBBR1MCS-2-*tufB*、pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB* 的重组菌 *G. oxydans* P-*tufB* 与 *G. oxydans* SLDH,分别提取质粒,依次用 *Kpn*I 和 *Xho*I,*Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切重组质粒得到 0.5 kb 的目的基因 *tufB* 片段与 2.7 kb 的目的基因 *sldhAB* 片段, 与预期结果一致,表明 *G. oxydans* 重组菌构建成功,见图 2。



(a) pBBR1MCS-2-*tufB*　(b) pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB*

图 2　双酶切验证重组质粒 pBBR1MCS -2 -*tufB* 和 pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB*

Fig. 2　Restriction map of pBBR1MCS -2 -*tufB* and pBBR1MCS-2-*tufB*-*sldhAB*

2.2　过量表达 *sldhAB* 对 L-山梨糖产量的影响

为了验证过量表达 *sldhAB* 基因对 *G. oxydans* 产糖的影响, 在 500 mL 摇瓶和 1 L 发酵罐上进行重组菌发酵性能的验证,并与 *G. oxydans* WSH-003 和 *G. oxydans* P-tufB 做比较。图 3 表明,过量表达 *sldhAB* 有效强化了 L-山梨糖的生产, 在摇瓶水平上,所构建重组菌 *G. oxydans* SLDH 与对照组相比,L-山梨糖产量提高了 17.0%,在发酵罐水平上提高了 20.3%,同时发酵周期缩短了 1/3 以上。

2.3　补料方式对固定化细胞生产 L-山梨糖的影响

采用海藻酸钠与硅藻土包埋法固定化 *G. oxydans* SLDH 细胞, 待固定化细胞增殖完成后,接入 1 L 发酵罐中进行补料发酵实验。作者设计了间歇流加和匀速流加两种补料策略对固定化重组菌发酵 L-山梨糖进行研究,流加策略如下:

1) 间歇流加策略: 当发酵培养基中的 D-山梨醇消耗殆尽后,DO 突然上升,此时手动开泵先排出

发酵醪液，再一次性流加新鲜发酵培养基，可使 DO 可在短时间内重新降低到其稳定的基线水平，至下次 DO 上升时继续下一次补料；

2）匀速流加策略：DO 突然上升（D-山梨醇消耗殆尽）后，匀速流加 D-山梨醇溶液，流加速率为 6.5 g/(L·h)（此速率为分批发酵时 D-山梨醇最大消耗速率）。

结果见图 4。间歇流加发酵 24 h 后 L-山梨糖的净累积量为 129.7 g，而匀速流加发酵 24 h 后 L-山梨糖的累积量为 115.3 g，表明在此发酵过程中间歇流加效果较优。

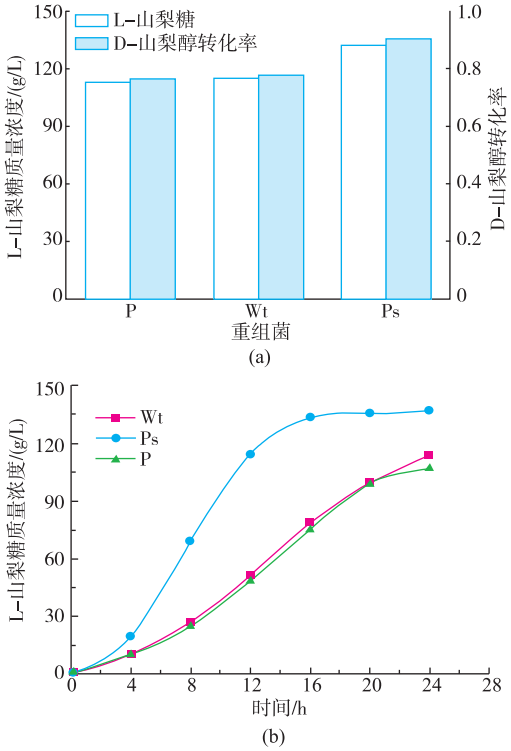
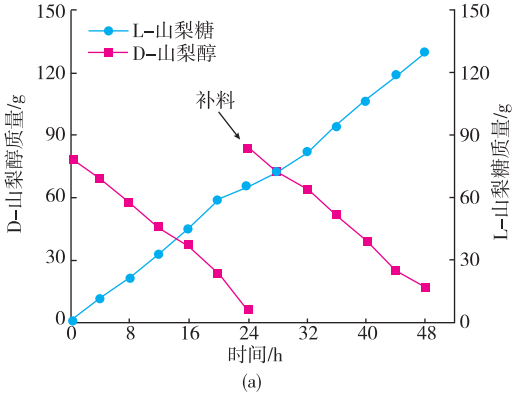


图 3　过量表达 *sldhAB* 基因对 L-山梨糖产量的影响

Fig. 3　Effects of the overexpression of *sldhAB* on L-sorbose production



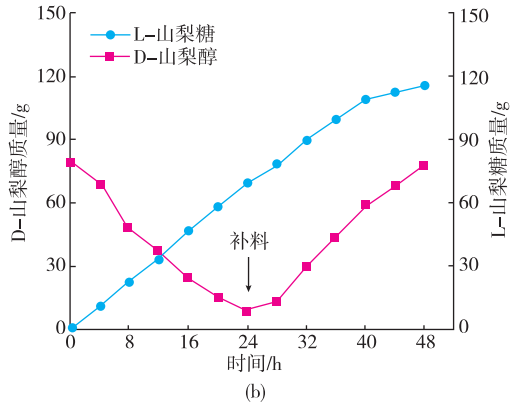


图 4　补料方式对固定化细胞发酵 L-山梨糖的影响

Fig. 4　Effect of feeding approach on L-sorbose production

2.4　固定化细胞分批补料发酵的研究

从 D-山梨醇消耗与发酵时间的关系出发，图 5a、c 所示的是在一个发酵周期过程中，初始 D-山梨醇质量浓度为 150 g/L 的发酵培养基，固定化细胞分批发酵生产 L-山梨糖过程中底物残留质量浓度随发酵时间的变化情况，采用 OriginPro8.5 软件，对固定化 *G. oxydans* WSH-003、*G. oxydans* SLDH 细胞在发酵过程中 D-山梨醇消耗数据进行线性估计与拟合，分别得到方程 y_{Wt}=-3.988x+147.301，y_{Ps}=-5.938x+146.464。从参数变化的连续性和相关性系数 R^2=0.994 可以看出，该模型对于底物消耗动力学的模拟具有较好的适用性。

依据动力学方程可发现两株菌的固定化细胞在 L-山梨糖发酵过程中底物消耗基本呈线性，其中 *G. oxydans* WSH-003 的发酵周期为 36 h 左右，而 *G. oxydans* SLDH 为 24 h。据此设定 *G. oxydans* WSH-003 补料间隔在 36 h，*G. oxydans* SLDH 补料间隔为 24 h，一次流加新鲜发酵培养基 500 mL。图 5b、d 表明，文中制备的固定化细胞重复发酵性能稳定。固定化 *G. oxydans* WSH-003、*G. oxydans* SLDH 细胞分别完成了 14、20 批次补料发酵，其中固定化 *G. oxydans* SLDH 细胞的 L-山梨糖净累积量为 1 154 g，和 *G. oxydans* WSH-003 相比提高了30.3%，生产相同质量的 L-山梨糖可节约生产时间 30%以上。

3　结　语

随着人们生活水平的提高和对 VC 用途的不断开发，VC 的需求量不断增加，进而促进了对其生产

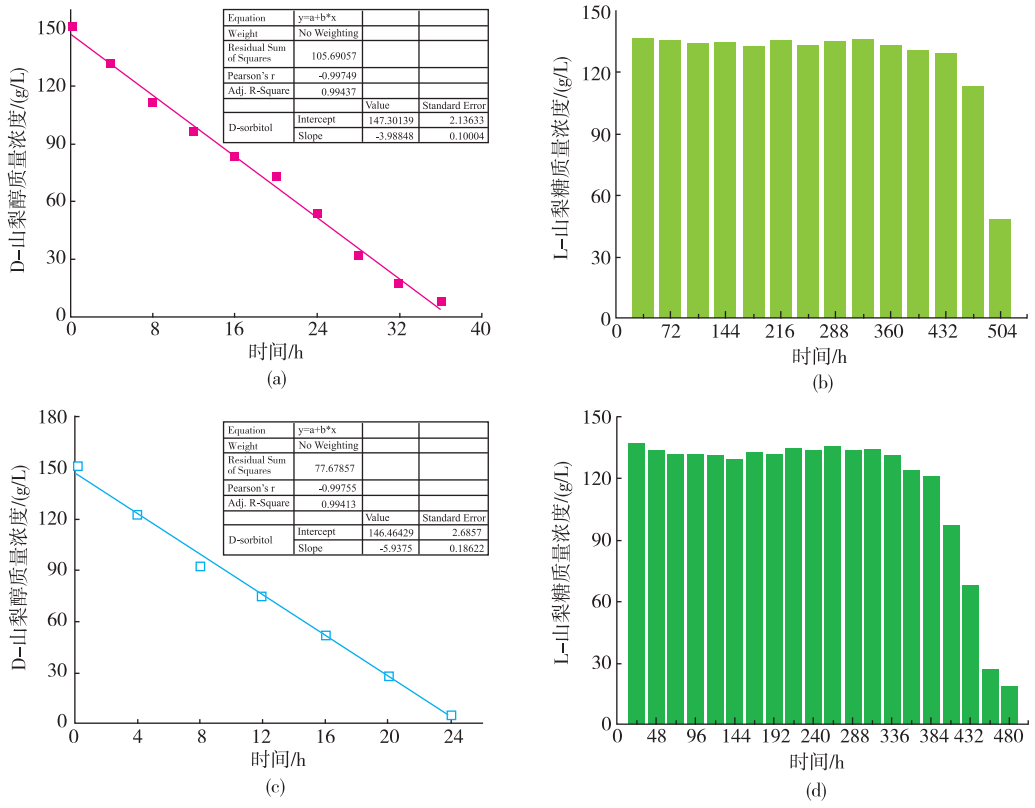


图 5　分批补料发酵对固定化细胞发酵 L-山梨的影响

Fig. 5　Effect of fed-batch fermentation on L-sorbose production

工艺的研究改进。近年来国外 VC 发酵技术发展很快,我国 VC 发酵技术的革新迫在眉睫。而固定化细胞发酵具有可以重复使用、利于产品的分离提纯、易于机械化和自动化、发酵性能稳定、反应过程容易控制等优点，应用于 VC 工业生产有望有效降低生产成本,发展潜力日趋明显。

作者构建了一株过量表达 *sldhAB* 的重组菌生产 L-山梨糖，使发酵周期和野生菌相比缩短了 1/3 以上,并对固定化细胞发酵方法进行了研究,优化了补料策略,探索了分批补料发酵对 L-山梨糖生产的贡献,减少了非生产时间,最终在数学模拟确定了补料时间的基础上实现了连续 19 d 的 L-山梨糖半连续发酵,采用固定化重组菌发酵使 L-山梨糖的累积量提高了 30.3%，为进一步研究改进 VC 生产工艺提供了依据。今后工作将在继续提高发酵终糖、延长固定化细胞重复利用时间方面进行深入研究,以期早日实现利用固定化细胞进行工业化生产 L-山梨糖。

参考文献:

[1] Wang X,Liu J,Du G,et al. Efficient production of L-sorbose from D-sorbitol by whole cell immobilization of *Gluconobacter oxydans* WSH-003[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2013,77:171-176.

[2] Zhu Y B,Liu J,Du G C,et al. Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis[J]. **Bioresource Technology**,2012,107:399-404.

[3] 段学辉,欧阳军梅,高鹤,等. 产脂肪酶菌 *Geotrichum candidum* NS3 的固定化及其稳定性[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(2):224-228.

DUAN Xuehui,OUYANG Junmei,GAO He,et al. Immobilization and stability of lipase-producing strain *Geotrichum candidum* NS3[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(2):224-228.(in Chinese)

[4] 吕淑霞,牛建双,马镝,等. VC 混菌发酵中大菌不同胞外组分对小菌的影响[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):701-704.

LU Shuxia,NIU Jianshuang,MA Di,et al. Effect of different components of bacillus megaterium on *Gluconobacter oxydans* in

mix-cultured of vitamin C fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(5):701-704.(in Chinese)
[5] De Wulf P,Soetaert W,Vandamme E J. Optimized synthesis of L-sorbose by C_5-dehydrogenation of D-sorbitol with *Gluconobacter oxydans*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2000,69(3):339-343.
[6] Sefcovicová J,Vikartovská A,Patoprsti V,et al. Off-line FIA monitoring of D-sorbitol consumption during L-sorbose production using a sorbitol biosensor[J]. **Analytica Chimica Acta**,2009,644(1-2):68-71.
[7] Gao L,Zhou J,Liu J,et al. Draft genome sequence of *Gluconobacter oxydans* WSH-003,a strain that is extremely tolerant of saccharides and alditols[J]. **Journal of Bacteriology**,2012,194(16):4455-4456.
[8] Hekmat D,Bauer R,Neff V. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*[J]. **Process Biochemistry**,2007,42(1):71-76.
[9] Dervakos G A,Webb C. On the merits of viable-cell immobilisation[J]. **Biotechnology Advances**,1991,9(4):559-612.
[10] Lidia SR,Stanislaw B. Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 [J]. **European Food Research and Technology**,2012,235:1-8.
[11] Yildirim S,Borer M E,Wenk E,et al. Development of silk fibroin-based beads for immobilized cell fermentations [J]. **Journal of Microencapsulation**,2010,27(1):1-9.
[12] Ercan Y,Irfan T,Mustafa K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor[J]. **Bioresource Technology**,2012,Accepted
[13] Ding W W,Wu Y T,Tang X Y,et al. Continuous ethanol fermentation in a closed-circulating system using an immobilized cell coupled with PDMS membrane pervaporation[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**,2011,86(1):82-87.
[14] Shinagawa E,Matsushita K,Adachi O,et al. Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**,1982,46(1):135-141.
[15] Zhang L,Lin J,Ma Y,et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Gluconobacter oxydans* [J]. **Molecular Biotechnology**,2010,46(3):227-233.

会　议　信　息

会议名称(中文):第十二届全国菌根学术研讨会

所属学科:动植物微生物学,作物学及林木育种、生物学,农林植物保护学
开始日期:2014-07-11　　结束日期:2014-07-13
所在城市:甘肃省　兰州市　　具体地点:兰州大学
主办单位:中国菌物学会菌根及内生真菌专业委员会和兰州大学
摘要截稿日期:2014-04-30　　联系人:刘永俊(13993163234) 冯虎元(13609369534)
联系电话:0931-8912537　　传真:0931-8912561
E-MAIL:myco12@163.com
会议网站:http://www.ecologica.cn/stxb/ch/reader/view_news.aspx?id=20140305044935001

会议背景介绍:　由中国菌物学会菌根及内生真菌专业委员会和兰州大学主办的“第十二届全国菌根学术研讨会”定于2014年7月11-13日在甘肃兰州召开。本次会议为与会代表提供一个学术交流、成果展示以及项目合作的平台,研讨菌根学领域微观至宏观、个体至生态系统、基础理论至技术实践等国内外动态,最新成果与发展趋势,并邀请国内外知名学者做大会报告。