

重组解脂酵母发酵生产琥珀酸的条件优化

于青林, 孟令莉, 霍海亮, 高翠娟*

(临沂大学生命科学学院, 山东省 临沂市, 276000)

摘要: 采用 2.5 L 发酵罐对重组解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) PGC11505 的琥珀酸发酵条件进行系统优化。结果表明, 发酵罐转速、通气量、初始甘油浓度、蛋白胨浓度、发酵罐的 pH 值设置经过优化后, 琥珀酸的产量得到明显提高。发酵罐的转速 600 r/min 好于 400 r/min, 琥珀酸产量较之提高了一倍。通气量为 1.0 vvm 时最佳, 较低时 (0.5 vvm) 溶氧不足、通气量较高时 (2.0 vvm) 溶氧过多, 造成能源浪费。初始甘油浓度为 100 g/L 既能保证菌体较好的生长, 并且发酵较充分, 琥珀酸产量达到 21.0 g/L。蛋白胨的浓度为 10.0 g/L 比较适宜。发酵罐的不同 pH 值比较结果为, 不控制 pH 值的自然发酵获得最高的琥珀酸产量和产率, 分别为 26.3 g/L 和 0.27 g/g。依据以上确定的最适发酵条件进行不控制 pH 值的补料-分批发酵 138 h, 经过两次补料共消耗 192.5 g/L 甘油, 合成 46.9 g/L 琥珀酸, 产率为 0.24 g/g, 生产率为 0.34 g/L/h。琥珀酸的产量是优化初的 5.7 倍。

关键词: 解脂酵母; 琥珀酸; 发酵

Fermentation optimization of recombinant *Yarrowia lipolytica* for its efficient succinic acid production

YU Qing-lin, MENG Ling-li, HUO Hai-liang, GAO Cuijuan*

(School of Life Science, Linyi University, Linyi 276000, China)

Abstract: Fermentation was optimized for succinic acid production of recombinant *Yarrowia lipolytica* PGC11505 using 2.5-L bench-top fermenter. The results showed that, the output of succinic acid was enhanced substantially after the optimization of speed of revolution, aeration rates, initial concentrations of glycerol and peptone, pH value of the fermenter. For detail, production of succinic acid was doubled under the speed of 600 r/min versus 400 r/min. Aeration rate of 1.0 vvm was appropriate when compared with 0.5 vvm and 2.0 vvm. Oxygen was deficient if aeration rate was low and it would waste power and energy when aeration rate was high. PGC11505 grew well and fermentation was done totally when the initial glycerol concentration was 100 g/L, the output of succinic acid reached 21.0 g/L. It was optimal for succinic production with 10.0 g/L peptone. PGC11505 performed the best when the pH value was kept natural as compared with pH value of 4.0, 5.0 and 6.0, which achieved 26.3 g/L succinic acid and a yield of 0.27 g/g. Finally, fed-batch fermentation was taken under natural pH value for 138 hours. A total of 192.5 g/L glycerol was consumed and 46.9 g/L succinic acid was produced with a yield of 0.24 g/g and productivity of 0.34 g/g/h. After optimization, the output of succinic acid was improved by 4.7.

Key words: *Yarrowia lipolytica*; succinic acid; fermentation

琥珀酸是一种具有重要应用价值的生物基平台化合物, 被美国能源部认为是未来十二组最具价值的生物炼制产品之一^[1]。琥珀酸可以广泛地应用于清洁剂、表面活性剂、食品添加剂、抗菌剂, 并用以合成 γ -丁内酯、四氢呋喃等多种重要化学品^[2]。同时, 作为一种重要的有机合成中间体, 琥珀酸还

作者简介: 于青林, 本科在读, E-mail: 201508140117@lyu.edu.cn。

*通信作者: 高翠娟, 博士, 讲师, 研究方向为微生物代谢工程、发酵工程。E-mail: gaocuijuan@lyu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(31700074); 山东省重点研发计划(2016GSF121019); 2017 年国家级大学生创新创业训练计划项目(201710452026)

是合成多种聚酯的重要前体物质^[3]。琥珀酸近年来逐渐攀升为大宗化学品,全球琥珀酸的年产量在 3 万~5 万吨^[4]。传统的化学法合成琥珀酸需要金属 Pd 和 Ru 的催化,通过丁烷制备顺式丁烯二酸酐再经化学方法加工而成^[5]。由于石油资源的减少和环境污染问题的日益严重,资源可再生的、高效环保的琥珀酸生产方式愈来愈受到关注。琥珀酸是微生物细胞中心代谢三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)的中间代谢产物之一,并且还是多种兼性厌氧菌和严格厌氧菌的代谢末端产物,可以通过微生物利用可再生的碳水化合物资源进行生产^[6-8]。

解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)属于非传统酵母,具有生物安全(GRAS)、鲁棒性的特点^[9]。经过遗传改造后的解脂酵母可以作为细胞工厂有效生产许多高附加值的化学品和脂肪/脂肪酸衍生的燃料,如柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸等^[10-13]。2009 年, Kamzolova 等人利用构建好的产 α -酮戊二酸解脂酵母首先生产 α -酮戊二酸,再以乙醇为底物在过氧化氢存在的情况下脱羧生产琥珀酸,琥珀酸的产量为 63.4 g/L^[14]。2010 年, Yuzbashev 等人首先突变解脂酵母的琥珀酸脱氢酶 Sdh2 亚基,然后采用 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍进行化学诱变,获得的突变株 Y-3314 以甘油为底物、碳酸钙为缓冲剂进行低 pH 琥珀酸发酵,得到 45 g/L 的琥珀酸盐^[15]。笔者实验室通过基因敲除琥珀酸脱氢酶 Sdh5 亚基成功获得可产琥珀酸的重组解脂酵母 PGC01003,该重组酵母在琥珀酸发酵的同时还产生较多的副产物乙酸^[16]。随后,在 PGC01003 的基础上进一步敲除乙酰辅酶 A 水解酶编码基因 *ach1*,获得重组酵母 PGC11505,乙酸溢出得到有效控制^[17]。本研究以重组酵母 PGC11505 为宿主,甘油作底物,对生产琥珀酸的发酵罐转速、通气量、初始甘油浓度、蛋白胨浓度以及发酵罐的 pH 控制进行了全面细致的优化。经过发酵优化后的重组酵母琥珀酸产量得到明显提高,为琥珀酸的工业化生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母粉、蛋白胨,均为 OXOID 公司;甘油(分析纯),天津大茂化学试剂厂;重组解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*) PGC11505 为本研究室保藏。

1.2 仪器与设备

2.5 L 发酵罐,德国贝朗医疗有限公司;0.22 μ m 水溶性滤膜,天津市东康科技有限公司;高压液相色谱,日本岛津公司;UV-1800 分光光度计,日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 种子培养与发酵

采用 YPG(酵母粉 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、甘油 20 g/L)培养种子,发酵培养基含酵母粉 10 g/L、蛋白胨和甘油的浓度除特殊说明分别为 20 g/L 和 100 g/L。所有培养基在 121℃ 灭菌 20 min。从固体平板上刮取适量菌苔至内含 50 mL YPG 的 250 mL 锥形瓶,28℃、200 r/min 培养 24 h,然后无菌接种至发酵罐。依次对转速、溶氧、碳源浓度、蛋白胨浓度、发酵罐的 pH 值进行优化。定时取样测菌体浓度、发酵上清液的甘油与有机酸浓度。补料分批发酵的初始甘油浓度为 100 g/L,不控制发酵罐的 pH 值、28℃、600 r/min、1 vvm,当甘油浓度低于 20 g/L 时补加 80 mL 浓度为 750 g/L 的甘油母液。

1.3.2 分析方法

采用分光光度计测量 600 nm 的菌体吸光值,然后依据菌体 OD 值与菌体干重(DCW)之间的线性关系进行换算。甘油、琥珀酸、乙酸浓度采用高压液相色谱进行测定。具体操作为,1 mL 发酵液离心后取上清液,用 0.22 μ m 水溶性滤膜过滤,加至高压液相色谱专用的小瓶内,放置在自动进样器中。色谱柱为美国伯乐 Aminex HPX-87H 糖分析柱,检测器为示差折光检测器,流动相为 5 mM 稀 H₂SO₄,流速为 0.6 mL/min,柱温箱的温度设定在 65℃。利用发酵罐的在线自动 pH 值监测系统记录发酵液的 pH 值。

2 结果与分析

2.1 溶氧对琥珀酸产量的影响

解脂酵母是严格好氧菌，氧气对菌体生长和产物合成都非常重要。影响溶氧的主要因素是发酵罐内置挡板的转速和通气量。首先实验了不同转速和通气量对琥珀酸产量的影响。图 1 所示转速分别为 400 r/min 和 600 r/min 对琥珀酸发酵的影响。经过 72 h 发酵，转速 400 r/min 和 600 r/min 的菌体生物量为 6.2 g/L 和 14.2 g/L (以 DCW 计)，分别产生了 1.3 g/L 和 1.5 g/L 乙酸，证实重组解脂酵母 PGC11505 的乙酸溢出得到有效控制。转速为 600 r/min 时，重组菌 PGC11505 可消耗 52.0 g/L 甘油产生 17.0 g/L 琥珀酸，而转速为 400 r/min 时只消耗了 21.9 g/L 甘油产生 8.3 g/L 琥珀酸。较高的转速可以为发酵液提供更充分的溶氧，利于菌体生长和琥珀酸的生产。随后实验了通气量分别为 0.5、1.0、2.0 vvm 对琥珀酸发酵的影响。图 2 可见，通气量对重组菌 PGC11505 的甘油消耗、菌体生长及琥珀酸发酵影响较小。重组解脂酵母 PGC11505 在发酵 72 h 后，菌体生物量依次为 17.7、21.9、21.0 g/L，分别产生了 18.6、20.1、19.7 g/L 琥珀酸。从节能和琥珀酸的产量综合考量，确定 1.0 vvm 为最适通气量。

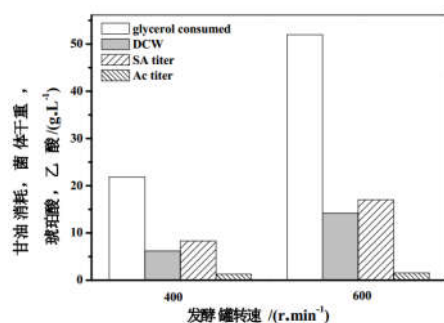


图 1 发酵罐不同转速对琥珀酸发酵的影响

Fig. 1 Influence of speed of revolution on succinic production of *Y. lipolytica*

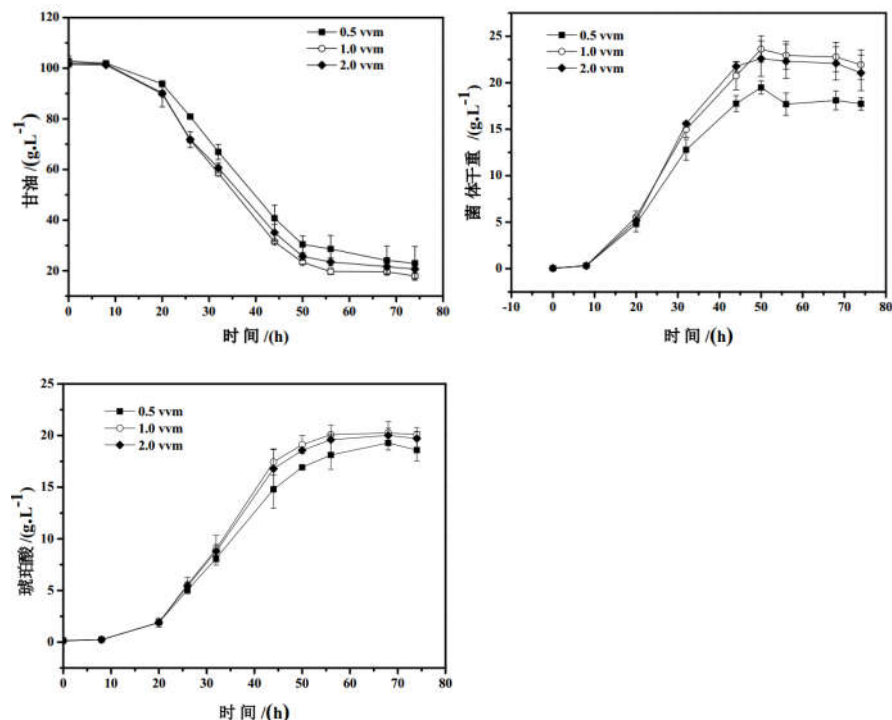


图 2 不同通气量对琥珀酸发酵的影响

Fig. 2 Influence of various aeration rates on succinic production of *Y. lipolytica*

2.2 初始甘油浓度对琥珀酸产量的影响

解脂酵母具有较高的渗透压耐受性，然而初始碳源浓度过高可能会产生底物抑制，菌体分泌甘露

醇、赤藓糖醇等多元醇以对抗高渗透压。本组实验比较了初始甘油浓度为 50、100、150 g/L 对琥珀酸发酵的影响。图 3 显示不同初始甘油浓度对琥珀酸发酵的影响较大。甘油浓度为 50 g/L 时，菌体在 40 h 消耗全部甘油，产生 14.2 g/L 琥珀酸。随着甘油浓度的增加，发酵周期延长，菌体生物量和琥珀酸产量也相应的提高。甘油初始浓度为 100 g/L 时，22.6 g/L 菌体发酵 72 h 产生 20.1 g/L 琥珀酸。当甘油浓度增加至 150 g/L 时，发酵 98 h 仍残余 69.3 g/L 的甘油，菌体生长受到抑制，生长差，最大生物量为 19.0 g/L，琥珀酸产量为 21.0 g/L。初始甘油浓度为 100 g/L 既能保证菌体较好的生长，并且发酵较充分，获得较高的琥珀酸产量。

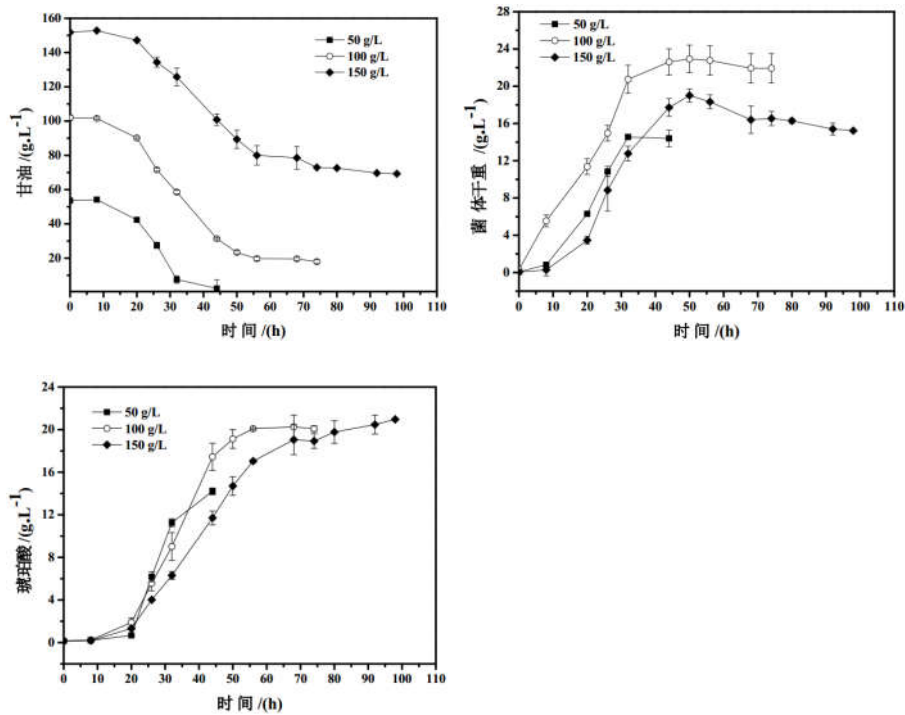


图 3 不同甘油浓度发酵产琥珀酸比较

Fig. 3 Succinic acid production from various concentrations of glycerol

2.3 蛋白胨含量对琥珀酸产量的影响

作为构成生物体的蛋白质、核酸及其他氮素化合物的材料，微生物生长和产物合成需要充足的氮源。氮源过低菌体生长代谢差，过高则造成营养物质的浪费。因此合适的碳氮比对发酵至关重要。本实验固定甘油浓度为 100 g/L，比较了蛋白胨的添加浓度为 0、10、20 g/L 对琥珀酸发酵的影响。由表 1 可见，不添加蛋白胨菌体生长差，消耗的甘油量较少，只生产 9.9 g/L 琥珀酸。蛋白胨浓度为 10 g/L 和 20 g/L 菌体生长良好，菌体量分别为 18.6 g/L 和 17.9 g/L，分别产生 20.3 g/L 和 20.7 g/L 琥珀酸。另外，蛋白胨含量较高时的乙酸产量也升高。因此，选择 10 g/L 蛋白胨作为后续实验的适宜浓度。

表 1 添加不同蛋白胨对琥珀酸发酵的影响

Table 1 Succinic acid production in medium containing varied concentratons of peptone

蛋白胨 /(g L ⁻¹)	甘油 /(g L ⁻¹)	DCW /(g L ⁻¹)	琥珀酸 /(g L ⁻¹)	产率 /(g g ⁻¹)	乙酸 /(g L ⁻¹)
0	35.9	17.8	9.9	0.28	0.39
10	80.2	18.6	20.3	0.25	0.64
20	83.4	17.9	20.7	0.25	1.22

2.4 发酵液 pH 对琥珀酸产量的影响

为减少弱酸环境对有机酸发酵的影响，通常采用控制发酵液 pH 值接近中性的策略进行琥珀酸发

酵^[15]。然而近中性环境的发酵产物是琥珀酸盐而非琥珀酸，并且发酵过程需要持续流加碱液以调节 pH 值，增大了发酵过程染菌的概率和发酵后提取的工序。鉴于解脂酵母的鲁棒性，我们比较分析了不同 pH 值条件下 PGC11505 的琥珀酸发酵，发酵罐的 pH 值分别控制在 4.0、5.0、6.0 以及不控制 pH 的自然 pH 值（图 4）。发酵罐 pH 值设定为 6.0 的实验组，重组菌 PGC11505 消耗了最多的甘油、积累最高的菌体（42.4 g/L），产生 22.1 g/L 琥珀酸。发酵罐 pH 值较低实验组（pH4.0、pH5.0），初始 pH 值较低的环境不利于菌体的快速生长与琥珀酸合成代谢，菌体量和琥珀酸的浓度都偏低。发酵罐自然 pH 值发酵组，在发酵初始阶段发酵液的 pH 值接近中性（pH6.5），这对菌体快速进入指数生长期有利。随着菌体生长和发酵的进行，菌体进入旺盛的合成代谢阶段，琥珀酸不断积累，生产高达 26.3 g/L 琥珀酸。这充分表明，重组解脂酵母可以耐受天然的弱酸性环境，适合在自然低 pH 值下进行琥珀酸发酵。

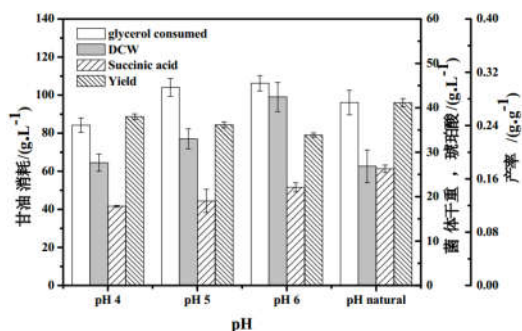


图 4 不同 pH 对琥珀酸发酵的影响

Fig. 4 Succinic acid production under varied pH conditions

2.5 补料分批琥珀酸发酵

最后，根据上述实验确定的最适条件进行不控制 pH 值的补料分批发酵。如图 5 所示，发酵初始时 pH 值为 6.5，24 h 即降至 4.5，48 h 后持续维持在 3.5 左右。乙酸积累量始终低于 0.5 g/L。菌体生长曲线表明，重组菌 PGC11505 在自然弱酸性条件下生长良好，最高菌体量为 26.8 g/L DCW。经过两次补料共消耗 192.5 g/L 甘油，合成 46.9 g/L 琥珀酸，琥珀酸对甘油的产率为 0.24 g/g，生产率为 0.34 g/L/h。琥珀酸的产量较优化之前提高了 4.7 倍。

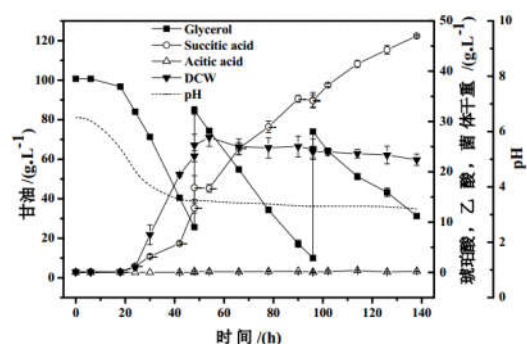


图 5 重组解脂酵母 PGC11505 自然低 pH 值琥珀酸发酵情形

Fig. 5 Fed-batch fermentation profile of engineered *Y. lipolytica* strains PGC11505 under natural low pH

3 结论

琥珀酸是一种重要的有机合成中间体。通过 2.5 L 发酵罐对重组解脂酵母 PGC11505 的琥珀酸发酵的发酵罐转速、通气量、初始甘油浓度、蛋白胨浓度、发酵罐的 pH 值设置优化后，琥珀酸的产量提高 4.7 倍。其中，发酵罐的转速 600 r/min 好于 400 r/min，通气量为 1.0 vvm 时最佳。初始甘油浓度设定为 100 g/L 既能保证菌体较好的生长，并且发酵充分。蛋白胨的浓度为 10.0 g/L 较适宜。不控制 pH 值的自然发酵获得最高的琥珀酸产量和产率，分别为 26.3 g/L 和 0.27 g/g。经过 138 h 补料-分批发

酵，共消耗 192.5 g/L 甘油，合成 46.9 g/L 琥珀酸，产率为 0.24 g/g，生产率为 0.34 g/L/h。研究表明，解脂酵母作为鲁棒性微生物，可以在不调节 pH 值的自然低 pH 值环境进行琥珀酸发酵，具备工业化生产琥珀酸的潜力。然而，实验中还发现，重组解脂酵母 PGC11505 除了合成琥珀酸之外，还通过磷酸戊糖途径产生较多的副产物赤藓糖醇。赤藓糖醇的生成造成底物甘油的浪费，影响甘油对琥珀酸的产率，这也为下一步的菌株改造提供了新的研究思路 and 方向。

参 考 文 献

- [1] WERP Y T, PETERSEN G, ADEN A, et al. Top value added chemicals from biomass, volume 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Washington, DC: US Department of Energy, 2004.
- [2] CHAO Yu, CAO Yujin, ZOU Huibin, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89:573-583.
- [3] XU Jun, GUO Baohua. Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5:1149-1163.
- [4] NATTRASS L, AYLOTT M, HIGSON A. NNFCC Renewable chemicals factsheet: Succinic acid. NNFCC, 2013.
- [5] JUNG S M, GODARD E, JUNG S Y, et al. Liquid phase hydrogenation of maleic anhydride over PdSn/SiO₂[J]. Catalysis Today, 2003, 87:171-177.
- [6] JANSEN M L, van GULIK W M. Towards large scale fermentative production of succinic acid[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 30:190-197.
- [7] YANG L, Lübeck M, AHRING B K, et al. Enhanced succinic acid production in *Aspergillus saccharolyticus* by heterologous expression of fumarate reductase from *Trypanosoma brucei*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016 100(4):1799-809.
- [8] JOST B, HOLZ M, AURICH A, et al. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015 99(4):1675-86.
- [9] ZHU Q, JACKSON E N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 36:65-72.
- [10] XUE Z, SHARPE P L, HONG S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8):734-40.
- [11] ZHANG Baixi, RONG Chunchi, CHEN Hhunchi, et al. De novo synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia Lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11:51-58.
- [12] KAMZOLOVA S V, DEDYUKHINA E G, SAMOILENKO V A, et al. Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20):9133-44.
- [13] YOVKOVA V, OTTO C, AURICH A, et al. Engineering the α -ketoglutarate overproduction from raw glycerol by overexpression of the genes encoding NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5):2003-2013.
- [14] KAMZOLOVA S V, YUSUPOVA A I, VINOKUROVA N G, et al. Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83:1027-1034.
- [15] YUZBASHEV T V, YUZBASHEVA E Y, SOBOLEVSKAYA T I, et al. Production of Succinic Acid at Low pH by a Recombinant Strain of the Aerobic Yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(4):673-682.
- [16] GAO Cuijuan, YANG Xiaofeng, WANG Huaimin, et al. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology for Biofuels. 2016, 9(1):179-189.
- [17] CUI Zhiyong, GAO Cuijuan, LI Jiaojiao, et al. Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH[J]. Metabolic Engineering, 2017, 42:126-133.