

L-乳酸发酵的代谢调控育种及发酵影响因素的研究*

仇俊鹏 徐 岩** 阮文权 严 群

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘要 :以嗜热乳杆菌(*Lactobacillus Thermophilus* ATCC8317)为出发菌,采用乙酸-乙酸钠平板为初筛方法,通过复合诱变乳酸产量提高到原来的 3.1 倍。培养基碳源为玉米粉糖化液,混合氮源为麦芽粉 30g/L、蛋白胨 5g/L。根据不同温度下细胞比生长速率及产物比生成速率的变化,确定了分阶段控制温度的策略:即在发酵前 16h 控制温度 48℃、后 44h 控制温度 54℃。L-乳酸产量达到 135g/L,乳酸的对糖转化率为 95%,平均产酸速率为 2.25g/(L·h)。

关键词 :L-乳酸,育种,优化,温度控制策略

中图分类号 :TQ922 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)05-0929-05

The Metabolic Control Breeding of L-Lactic Acid Fermentation and Optimization of Media and Cultivation Conditions*

QIU Jun-Peng XU Yan** RUAN Wen-Quan YAN Qun

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122)

Abstract :Based on the strain breeding theory and metabolic engineering theory, A high-yield mutant of *Lactobacillus Thermophilus* ATCC8317 was obtained through the compound inducements by the original Acetic acid-Sodium acetate plate and the productivity increased 210%. The best media components included saccharifying corn malt powder 30g/L, peptone 5g/L. Based on the variety of specific cell growth rate and specific L-lactic acid production rate at different temperatures, the strategy of temperature control was obtained. The total product of L-lactic acid reached 135g/L besides the rate of glucose consumed and the average L-lactic acid productivity were up to 95% and 2.25g/(L·h) respectively.

Key words :L-lactic acid, Breeding, Optimization, Strategy of temperature control

L-乳酸(L-3-羟基丙酸, L-lactic acid)应用领域广泛,可合成 100% 可生物降解材料聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)和环保型无毒溶剂乙烷基乳酸(ethyl lactate),近年来需求量不断增长。

与根霉好氧发酵生产 L-乳酸相比,乳酸细菌发酵法具有对糖转化率高、无通气能量消耗、成本低等优点。C. Vishnu 等人用食淀粉乳杆菌直接利用各种淀粉厌氧发酵生产 L-乳酸,对糖转化率可达到 93%^[1]。Young-Jung Wee 等人使用粪肠球菌可利用木质材料水解物生产 L-乳酸,产量达 93g/L^[2]。M Taniguc 等人用黄色肠球菌和干酪乳杆菌混合培养发酵木糖和葡萄糖,可利用木质纤维素作为乳酸发酵的原料^[3]。本实验菌种为嗜热乳杆菌,发酵温度高达 50℃ 以上,极大减少微生物污染,培养基不需

灭菌,节省了热量及冷却水;可以直接加糖化酶发酵,简化了工艺并且一定程度减弱底物抑制。

野生菌株因不耐高渗及产物抑制一般乳酸产量不高,需要进行菌种选育以获得性能优良的高产菌株。菌种选育的筛选方法有:利用乳酸的性质设计初筛平板,如 CaCO₃-溴甲酚绿平板, KMnO₄-溴化钾平板;根据乳酸的代谢途径,运用推理育种技术针对性的筛选,如利用琥珀酸平板筛选 EMP 途径强化且 TCA 途径减弱的菌株^[4];筛选耐高糖高酸的菌株,提高菌种的耐高渗能力^[5]。本研究根据代谢调控育种的原理,第一次使用乙酸-乙酸钠平板针对性筛选丙酮酸生成乙酰 CoA 的途径相对弱化的菌株,从而使代谢朝有利于乳酸积累的方向进行。

乳酸细菌发酵法对氮源的要求较高从而生产

* 新世纪优秀人才支持计划资助项目,长江学者和创新团队发展计划资助项目(No. IRT0532)

** 通讯作者 Tel: 0510-85918196, E-mail: yxu@sytu.edu.cn

收稿日期:2007-01-22,修回日期:2007-04-23

成本偏高,降低氮源的成本具有极大的实践意义。丁绍峰,谭天伟以豆粕水解液为氮源代替酵母粉,细菌厌氧流加发酵生产 L-乳酸^[6]。本研究以麦芽粉为主要氮源,添加少量蛋白胨既提高 L-乳酸产量又可降低生产成本,为进一步工业化奠定了基础。嗜热乳杆菌对温度敏感,针对菌体最适生长温度与乳酸最适发酵温度存在差异,确定了分阶段控制温度的策略,与单一温度相比,乳酸产量提高了 21%。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜热乳杆菌 (*Lactobacillus Thermophilus* ATCC8317), 发酵产 L-乳酸的纯度在 97% 以上。

1.2 培养基

MRS 培养基:酪朊水解物 10g/L,酵母膏 5g/L,牛肉膏 5g/L,葡萄糖 20g/L,柠檬酸二铵 2g/L,吐温 80 1.0mL/L,乙酸钠 25g/L, KH_2PO_4 6g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, CaCO_3 25g/L,琼脂 20g/L,用冰醋酸调 pH 值至 5.4。

优化前种子培养基:葡萄糖 40g/L,酵母粉 10g/L,蛋白胨 15g/L, KH_2PO_4 6g/L,乙酸钠 25g/L,吐温 80 1.0mL/L, CaCO_3 2g/L 优化前发酵培养基:蛋白胨 45g/L,葡萄糖 90g/L,乙酸钠 20g/L, CaCO_3 4g/L,吐温 80 1.0mL/L。

优化前发酵培养基:蛋白胨 45g/L,葡萄糖 90g/L,乙酸钠 20g/L, CaCO_3 4g/L,吐温 80 1.0mL/L。

乙酸-乙酸钠培养基:在 MRS 培养基基础上,以乙酸 15g/L 代替葡萄糖,调 pH 值为 5.4。

1.3 诱变方法

亚硝基胍(NTG)诱变处理^[7]

紫外诱变(UV)处理^[8]

1.4 培养方法

(1)摇瓶培养方法:接一环斜面培养物至装有 100mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中静置培养 20h,温度 51℃。在装有 30mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶中接入 3mL 种子液,53℃下静置培养 60h。

(2)7L 发酵罐培养:7L 发酵罐的装液量为 5L,接种量 10%,发酵过程中以 20% 石灰乳控制 pH 值 5.5,温度控制在 48℃~54℃,转速为 100r/min。

1.5 检测方法

还原糖 菲林试剂法^[9]

菌体生长的生物量:将发酵液以 1000r/min 转速离心 2 次,除去残渣,将上清液稀释 5 倍以分光光度计测定菌体 OD_{660} 吸光光度值。

乳酸总量测定:高压液相色谱法^[10]。

L-乳酸的测定:用 SBA-40C 生物传感分析仪测定。L-乳酸含量与乳酸总量之比即为 L-乳酸的光学纯度。

2 结果与讨论

2.1 L-乳酸高产菌株的代谢调控育种

乳酸代谢途径及调节机制比较复杂,要选育 L-乳酸高产菌株,就必须对细胞原有的代谢途径进行改造(图 1)。主要思路之一就是使重要中间代谢物丙酮酸的流向主要朝利于生成乳酸的方向进行。丙酮酸和乙酸均可生成乙酰 CoA 维持菌体正常代谢,若菌体在以乙酸-乙酸钠为碳源的平板上可以生长且生长良好,则丙酮酸生成乙酰 CoA 的途径可能相对弱化。从代谢调控的角度设计筛菌方案,将诱变处理后的菌悬液涂步于乙酸-乙酸钠平板,挑取可以生长且生长良好的菌落进行发酵试验,使诱变育种更有针对性和目标性。

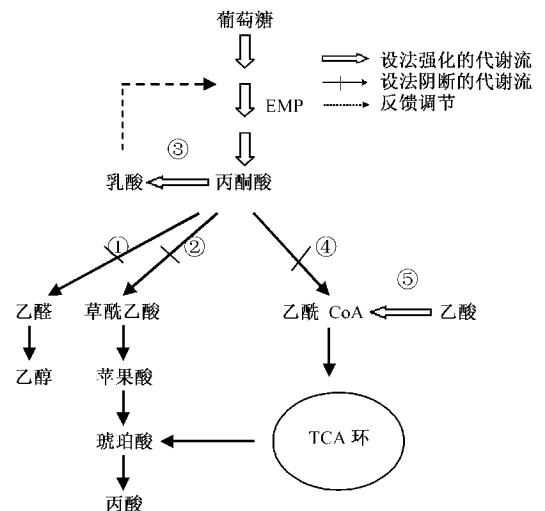


图 1 L-乳酸代谢及其相关途径

①丙酮酸脱羧酶 ②丙酮酸羧化酶 ③乳酸脱氢酶
④丙酮酸脱氢酶复合体 ⑤乙酰 CoA 合成酶

本研究采用了亚硝基胍(NTG)诱变和紫外诱变(UV)相结合的复合诱变处理,随机挑选 200 株在乙酸-乙酸钠培养基上生长的突变株(I 型)和在乙酸-

乙酸钠培养基上不生长但在 MRS 培养基上生长的突变株(Ⅱ型)分别进行发酵产酸试验,结果见表 1。从表 1 可以看出,突变株Ⅰ型比突变株Ⅱ型在 22.5g/L 以上的产酸水平上分布更多,且高产菌株出现的概率更大。结果证明以乙酸为碳源筛选 L-乳酸高产菌种的策略比完全随机筛选更为有效。

表 1 突变株Ⅰ型和Ⅱ型产酸能力的比较

L-乳酸产量 (g/L)	< 22.5	22.5 ~ 30	30 ~ 40	40 ~ 50	> 50	正向突 变率
突变株Ⅰ型(株)	120	44	23	10	3	40%
突变株Ⅱ型(株)	178	14	7	1	-	11%

经过一系列菌种选育步骤,最后获得 1 株 L-乳酸产量相对提高最大的菌株,产量从原来的 22.5g/L 提高到 69g/L,提高到原来的 3.1 倍。通过测定诱变前后亲株和突变株的丙酮酸脱羧酶、丙酮酸羧化酶、乳酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和乙酰 CoA 合成酶 5 种酶的酶活,比较后发现突变株比亲株的乳酸脱氢酶和乙酰 CoA 合成酶的酶活提高很大,而另外 3 种酶的酶活却均有下降,表明在有葡萄糖时丙酮酸的其它代谢支路减弱。实验结果证明,乙酸-乙酸钠平板作为乳酸高产菌的筛选方法高效可行,并且为日后从代谢工程角度改造菌株以进一步提高乳酸产量提供了依据,即强化乳酸脱氢酶和乙酰 CoA 合成酶,弱化丙酮酸向乙醛、草酰乙酸和乙酰 CoA 的流向。

2.2 氮源的选择及优化

实验选取了常见农业产品作为氮源,并且与酵母膏作氮源进行比较。结果如图 2 所示。图中显示数据为每种氮源在含量(g/L)分别为 15、25、35、45、55 的不同浓度下的最大值。

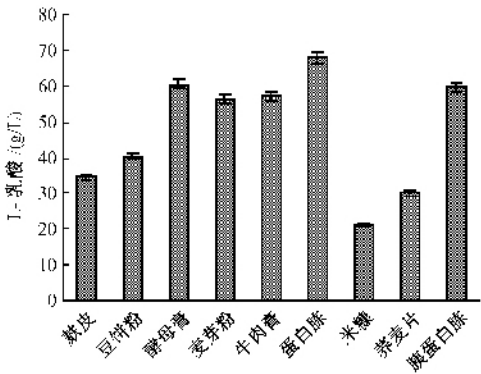


图 2 不同氮源对发酵的影响

从图 2 结果可以看出,蛋白胨作为单一氮源,与其它氮源相比更有利于乳酸发酵,其原因是蛋白胨中的某些物质是嗜热乳杆菌的生长因子^[11]。农业粗产品麸皮、豆饼粉、麦芽粉、米糠中,麦芽粉作为氮源时的发酵产量远远高于其它 3 种。因此考虑使用混合氮源蛋白胨和麦芽粉,结果如表 2 所示。从表 2 结果可以看出,使用混合氮源既降低了生产成本,又使 L-乳酸产量略有提高。最佳氮源组成为麦芽粉 30g/L、蛋白胨 5g/L。

表 2 复合氮源对 L-乳酸产量的影响

麦芽粉(g/L)	蛋白胨(g/L)	L-乳酸产量(g/L)
20	5	49.1
20	10	54.4
20	15	62.7
30	5	76.2
30	10	72.2
30	15	67.6
40	5	62.3
40	10	60.4
40	15	57.0

2.3 碳源的选择

选取价廉且含糖高的农业产品玉米粉、甘薯粉、大米粉、小麦粉,用淀粉酶和糖化酶水解完全,DNS 显色法测还原糖,配成不同葡萄糖浓度的糖化液作为碳源。

从图 3 可以看出,玉米粉糖化液含葡萄糖浓度为 75g/L 时,L-乳酸产量达到 73g/L,对糖转化率达到 97%。甘薯粉的相应产量和对糖转化率最低,其原因是甘薯粉糖化液颜色较深粘度较大,影响整个体系的传质。大米粉糖化液含葡萄糖 90g/L 时,L-乳酸产量可达 75g/L,但是其对糖转化率较低。综合考虑,玉米粉糖化液最适作为工业乳酸发酵的主料。

2.4 分批发酵过程的温度控制策略

2.4.1 不同温度条件下的分批发酵过程:嗜热乳杆菌生产 L-乳酸的分批发酵过程是菌体生长和产物合成属部分偶联型,为了得到较高的 L-乳酸的产量、产率系数及生产强度,控制不同发酵阶段的较佳环境条件非常重要。温度是影响嗜热乳杆菌发酵过程的重要环境条件。本文以提高 L-乳酸产量及生产强度为研究目标,研究了 7L 小罐培养中控制

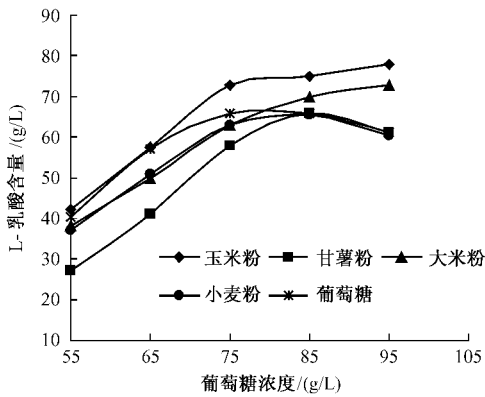


图3 不同碳源对发酵的影响

温度为 48℃ ~ 54℃ 的情况下 L-乳酸分批发酵过程的动力学特性。实验首先考察了维持温度分别为 48℃、51℃ 和 54℃ 时对菌体生长和发酵的影响。

由图 4、图 5 可见,控制不同温度条件对最终生物量及细胞比生长速率均有一定的影响。维持温度条件分别为 48℃、51℃ 和 54℃ 时,在 10h 左右细胞比生长速率能达到最大,温度为 48℃ 时最终的菌体量 OD_{660} 为 2.512,最有利于细胞的生长。

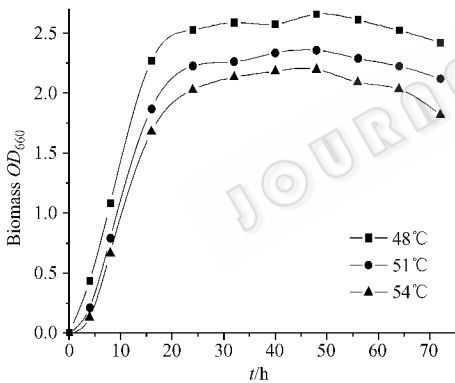


图4 不同温度下细胞生长曲线

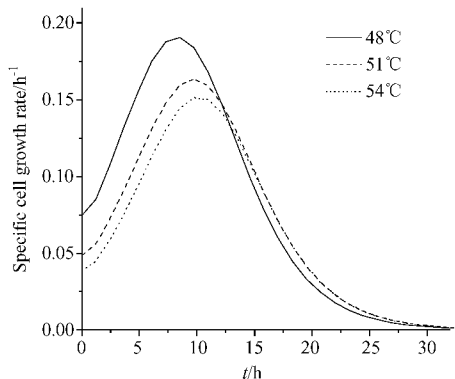


图5 不同温度下细胞比生长速率变化曲线

控制不同温度时 L-乳酸生成的过程如图 6 所示。在发酵前 16h,不同温度对 L-乳酸产量影响不

大。发酵 16h 后,控制温度 54℃ 时,产量增加较快,在 65h 时达到最大值为 112g/L。从图 7 产物比生成速率曲线可以看出,温度控制 54℃ 时产物比生成速率能维持较大的值,其它温度条件下的产物最大比生成速率相对较低,且维持时间较短。

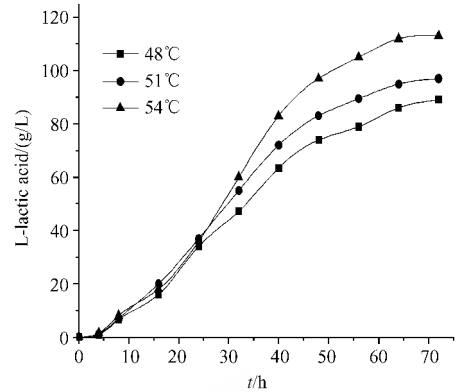


图6 不同温度下 L-乳酸的生成过程曲线

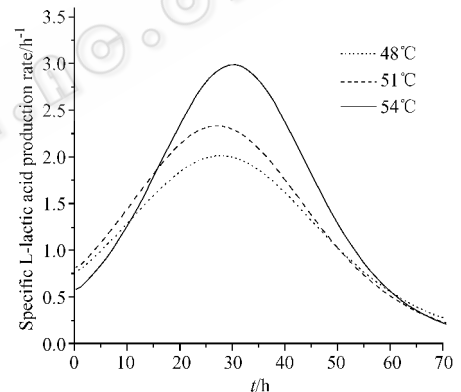


图7 不同温度下 L-乳酸比生成速率变化曲线

2.4.2 分阶段温度控制策略 从上述单一温度控制的分批发酵过程可以看出,在 L-乳酸的发酵过程中,生长的最适温度与产物合成的最适温度不同。前期适当降低温度后可缩短细胞生长的延滞期,有利于菌体的生长。在发酵中后期,可适当提高温度促进产酸,提高整个 L-乳酸发酵过程的生产水平。

因此从图 5 细胞比生长速率及图 7 L-乳酸比合成速率随时间的变化关系可以得出,利用嗜热乳杆菌突变株生产 L-乳酸过程可以进行温度分阶段控制,其温度控制策略为 10h ~ 16h,控制温度为 48℃,16h 后将温度切换到 54℃。采用此温度控制策略在 7L 小罐上进行 L-乳酸发酵,其发酵过程曲线如图 8 所示。由图 8 可见,采用分阶段温度控制策略,发酵前期温度 48℃ 条件下细胞生长延滞期短,生长速率较快,有利于菌体生长,培养 16h 左右,最大菌体量

OD_{660} 达到 2.575。发酵中后期温度 54°C 条件下, 达到较大的产物比生成速率, 有利于 L-乳酸的合成, 60h 左右 L-乳酸达到了 135g/L , 比未分阶段控制温度时的最好水平提高了 21%, 发酵时间也缩短了 5h。采用分阶段温度控制策略有利于菌体生长和 L-乳酸的合成。

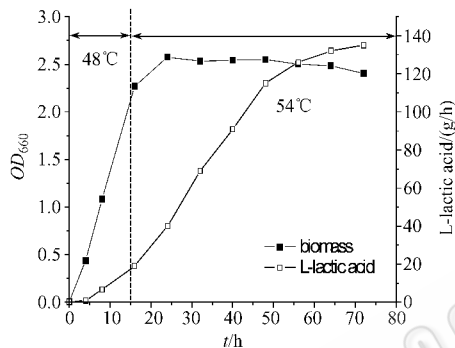


图 8 分阶段温度控制下的 L-乳酸发酵过程曲线

3 结论

采用乙酸-乙酸钠平板以乙酸为碳源筛选 L-乳酸高产菌株是有效的、可行的, 并且为日后运用代谢工程手段进一步改造菌株提供了依据。经过亚硝基胍和紫外复合诱变, 产量提高到原来 3.1 倍。

研究了多种农业产品作为发酵培养基组分的可行性, 确定了最佳培养基组成: 以玉米粉糖化液

为碳源, 以麦芽粉 30g/L 、蛋白胨 5g/L 为混合氮源。嗜热乳杆菌对温度敏感, 根据不同温度下发酵过程中细胞比生长速率及产物比生成速率的变化, 确定了分阶段控制温度的策略, 即在发酵前 16h 控制温度 48°C 、后 44h 控制温度 54°C 。L-乳酸比未控制温度时的最好水平提高了 21%, 发酵时间也缩短了 5h。

参考文献

- [1] Vishnu C, Seenayya G, Reddy Gopal. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, **18**: 429 ~ 433.
- [2] Wee Young-Jung, Yun Jong-Sun, Park Don-Hee, *et al.* *Biotechnology Letters*, 2004, **26**: 71 ~ 74.
- [3] Taniguchi M, Tokunaga T, Horiuchi K, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**: 160 ~ 165.
- [4] 乔长晟, 汤凤霞, 苏建宇, 等. *食品工业科技*, 2002, **23**(2): 35 ~ 38.
- [5] 乐晓洁, 王昌禄, 顾晓波, 等. *中国食品添加剂*, 2004, **1**: 67 ~ 69.
- [6] 丁绍峰, 谭天伟. *过程工程学报*, 2006, **6**(1): 77 ~ 81.
- [7] 施巧琴, 吴松刚. *工业微生物育种学*(第二版). 北京: 科学出版社, 2003. pp. 157 ~ 159.
- [8] 诸葛健, 王正祥. *工业微生物实验技术手册*. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. pp. 391 ~ 392.
- [9] 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院, 大连轻工业学院. *工业发酵分析*. 北京: 中国轻工业出版社, 1979. pp. 16 ~ 17.
- [10] 张军, 韩英素, 高年发, 等. *酿酒科技*, 2004, **2**: 91 ~ 93.
- [11] 高年发, 石膏松, 马燃, 等. *天津科技大学学报*, 2005, **20**(2): 14 ~ 18.