

L- 乳酸米根霉发酵体系 LDH 活力及代谢调控研究

姜绍通^{1,2}, 郑志^{1,2}, 潘丽军^{1,2}, 李兴江¹, 张志英¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

2. 农产品生物化工教育部重点实验室, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 乳酸脱氢酶(LDH)是米根霉代谢生产 L- 乳酸过程的关键酶, 研究其在发酵过程中的活力变化, 从酶水平分析发酵条件对 L- 乳酸发酵的影响, 对米根霉发酵生产 L- 乳酸的人工代谢调节、菌种选育具有重要意义。本文研究了摇瓶条件下的米根霉 AS3.1208 发酵体系中乳酸脱氢酶的活力调控条件及与 L- 乳酸即时产率的关系, 结果表明, 发酵体系中 L- 乳酸产率与 LDH 活力在 36~40h 时最高。葡萄糖作为 C 源的 L- 乳酸产率与 LDH 活力比甘薯淀粉高。与牛肉膏和蛋白胨相比, 硫酸铵是米根霉代谢的最佳 N 源, 0.40% 的硫酸铵具有较高的乳酸产率与 LDH 活力。发酵培养基中添加 CaCO₃ 与否, 对乳酸产率与 LDH 活力有极大影响。以甘薯淀粉为碳源, 在 250ml 三角瓶中的装液量为 100ml, 发酵 36~40h 时的 L- 乳酸即时产率最大, 此时 LDH 活力也最高。

关键词: 米根霉; 乳酸脱氢酶; L- 乳酸; 代谢调控

Study on Lactate Dehydrogenase Activity of *Rhizopus oryzae* Fermentation System and Its Metabolic Control

JIANG Shao-tong^{1,2}, ZHENG Zhi^{1,2}, PAN Li-jun^{1,2}, LI Xin-jiang¹, ZHANG Zhi-ying¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

2. Key Laboratory of Bioprocess of Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Lactate dehydrogenase (LDH) is a key enzyme that catalyzes the transformation of L-lactic acid from pyruvate in *Rhizopus oryzae*. Investigations of its activity during the fermentation have important significances on metabolic engineering and strains selection for increasing lactate production. In this study, the relationship between LDH activity and L-lactic acid production rate of *Rhizopus oryzae* AS3.1208 in shaking flask was investigated. The results indicated that glucose as carbon source had a higher L-lactic acid production rate and LDH activity than the sweet potato starch source. (NH₄)₂SO₄ was the optimum nitrogen source compared with beef extract and peptone. It had the highest L-lactic acid production rate and LDH activity at a concentration of 0.40%. The addition of CaCO₃ to fermentation medium for the neutralization of lactic acid produced had an absolute effect on lactate production as well as LDH activity. A higher L-lactic acid production and LDH activity could be achieved at 36~40h fermentation when the 250ml flask was filled by 100ml fermentation liquid with sweet potato starch as carbon source.

Key words: *Rhizopus oryzae*; lactate dehydrogenase; L-lactic acid; metabolic control

中图分类号: TQ921.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)01-0041-04

L- 乳酸是一种重要的天然有机酸, 在食品、医药、生物降解塑料的制造上有广泛应用^{[1][5]}。发酵法是大规模生产高光学纯度的 L- 乳酸的主要方法。米根霉(*Rhizopus*

oryzae) 由于具备好氧发酵、可直接利用淀粉做 C 源, 发酵产物 L- 乳酸纯度高、易于分离等特点, 而成为目前制备高光学纯度 L- 乳酸的主要菌种^[2,3]。

收稿日期: 2004-09-17

基金项目: 安徽省“十五”攻关重点项目(01703003)

作者简介: 姜绍通(1954-), 男, 教授, 博导, 研究方向为农产品加工及贮藏工程。

米根霉发酵淀粉生产L-乳酸的代谢基本途径是：淀粉经米根霉胞外淀粉酶降解成葡萄糖，进入细胞内，通过EMP途径生成丙酮酸。丙酮酸在细胞内有三种去向^[6]：一是通过丙酮酸脱羧酶进入产乙醇的途径；二是通过丙酮酸羧化酶形成草酰乙酸，再生成苹果酸和富马酸；三是通过L-乳酸脱氢酶直接生成L-乳酸。可以看出，欲提高L-乳酸的产量，就必须降低丙酮酸流入乙醇支路、草酰乙酸支路的流量，这可以通过抑制支路关键酶如丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶等的活性来实现。但提高乳酸脱氢酶的活性，增强其对底物的竞争能力，也是提高乳酸转化率的一个途径。本实验以米根霉AS3.1208为实验菌株，通过研究不同发酵条件下，乳酸脱氢酶活力及发酵产L-乳酸之间的关系，为实现通过代谢调控手段提高米根霉发酵生产L-乳酸的产量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

米根霉AS3.1208菌株，合肥工业大学生物与食品工程学院发酵工程实验室保藏。

1.1.2 试剂

耐高温 α -淀粉酶购于无锡杰能科生物工程有限公司；NAD-Na购于北京经科公司，进口分装；丙酮酸钠购于上海化学试剂公司，进口分装。其余试剂均为分析纯或化学纯。

1.1.3 培养基

(a) 斜面培养基：PDA培养基。

(b) 种子培养基(%)：葡萄糖8；甘薯淀粉2； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025； $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.044； KH_2PO_4 0.02； FeSO_4 0.001。100ml三角瓶中装入10ml种子培养基，115℃灭菌20min，接入孢子，30±1℃，200r/min，培养16~18h。

(c) 发酵培养基(%)：甘薯淀粉15； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4； KH_2PO_4 0.03； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025； $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.044； CaCO_3 6.0。250ml三角瓶中装入40ml发酵培养基，115℃灭菌20min，接种种子培养液10ml，30±2℃，200r/min，培养52h。

1.2 仪器设备

实验中使用的紫外分光光度计、高速冷冻离心机、超净工作台、超声波细胞粉碎机、恒温水浴振荡器、灭菌锅、微量进样器等设备均为本实验室所有。

1.3 实验方案

1.3.1 不同碳源对米根霉发酵及LDH活力的影响

甘薯淀粉、葡萄糖两种C源质量分数均为15%。甘薯淀粉用耐高温 α -淀粉酶稍作液化后使用。发酵每隔

5h取一次样，将样液过滤，洗净菌丝体，发酵液用于测L-乳酸含量，菌丝体有部分干燥后称其生物量，另一部分称重后破碎，测其乳酸脱氢酶活力。取样直至50h，每次每种C源取样三次，测定亦取样三次，均取其平均值。

1.3.2 不同N源对米根霉发酵及LDH活力的影响

取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏、蛋白胨三种N源浓度均为0.4%，其取样及检测同上。

1.3.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对米根霉发酵及LDH活力的影响

分别取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度0.2%、0.4%、0.6%，其取样及检测同上。

1.3.4 添加 CaCO_3 对米根霉发酵及LDH活力的影响

于两个250ml三角瓶中各装入100ml发酵培养基，其中一个三角瓶加了3g CaCO_3 ，另一个不加，灭菌后接入种子培养液10ml，其培养、取样及检测方法同上。

1.3.5 装液量对米根霉发酵及LDH活力的影响

250ml三角瓶中分别装发酵培养基50、100、150ml后发酵，其取样及检测方法同上。

1.4 分析方法

1.4.1 乳酸含量测定 反相HPLC法^[4]，以5h内乳酸产率计算。

1.4.2 乳酸脱氢酶活力测定 紫外分光光度法^[7]，折算为单位质量的菌丝体具有的活力。

2 结果与分析

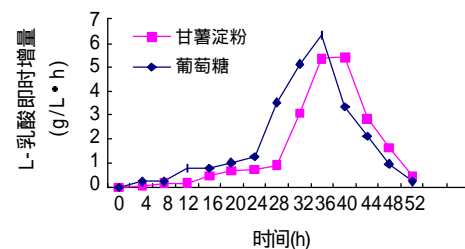


图1-A 不同碳源对L-乳酸即时增量的影响
Fig.1-A Effect of carbon source on L-lactic acid productivity

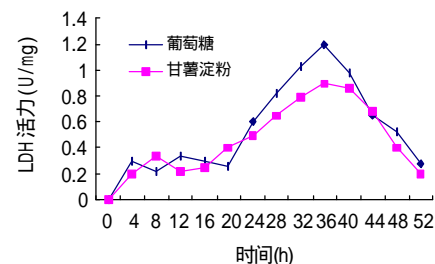


图1-B 碳源对LDH活力影响
Fig.1-B Effect of carbon source on LDH activity

2.1 不同C源对L-乳酸产量及LDH活性的影响

甘薯淀粉是一种来源广泛、价格便宜的C源, 本实验研究了甘薯淀粉、葡萄糖两种C源对米根霉乳酸脱氢酶活力及其产L-乳酸的影响, 结果见图1-A和1-B。

由图1-A和1-B可以看出, 米根霉以葡萄糖为C源时的L-乳酸的产率和LDH的活力比甘薯淀粉为C源的高, 且最大产率与最大LDH活力出现的时间比甘薯淀粉为C源的早。米根霉可以诱导分泌葡萄糖淀粉酶, 将淀粉水解成葡萄糖后进入细胞代谢。本实验对发酵培养基进行液化处理时间较短, 导致在发酵初期甘薯淀粉为C源的发酵培养基中仍需诱导淀粉酶降解淀粉, 这使得降解后的产物葡萄糖运输至细胞内代谢比直接以葡萄糖为C源的延迟一段时间, 所以其L-乳酸最大产率与LDH最大活力出现的时间也有延迟。上两图还可以看出, L-乳酸产率和LDH活力的最大值出现在发酵36h左右。乳酸脱氢酶是一种诱导酶, 其诱导量受其底物丙酮酸的含量影响, 发酵36h LDH活力最高, 说明发酵36h时丙酮酸的流量最大。

2.2 不同N源对产L-乳酸及LDH活性的影响

N是组成核酸和蛋白质的重要元素, 是微生物的生长繁殖所必需。菌体摄入足够的N, 既保证菌体数量的增长, 也保证细胞内各种酶的及时大量的合成。实验研究了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏、蛋白胨三种常用N源对米根霉发酵及LDH活性的影响, 结果见图2-A和2-B。

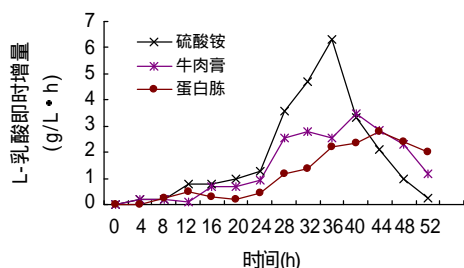


图2-A 不同氮源对L-乳酸发酵影响

Fig.2-A Effect of nitrogen source on L-lactic acid productivity

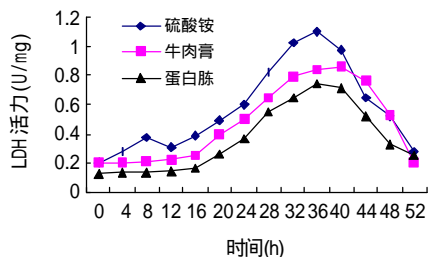


图2-B 不同氮源对LDH活力影响

Fig.2-B Effect of nitrogen source on LDH activity

由图2-A和2-B可以看出, 米根霉在利用上述N源中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的效果较好。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是速效型N源,

NH_4^+ 易被菌株吸收, 因而相同时间内LDH活力最大, L-乳酸的产率最高。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源36h时L-乳酸产率为 $6.3\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 36h达最大酶活 $1.11\text{U}/\text{mg}$ 。牛肉膏和蛋白胨是迟效型N源, 在进入细胞前必须由蛋白酶将其降解成小分子物质, 才可被摄入细胞内。实验数据表明牛肉膏比蛋白胨效果稍好一些, 这可能与牛肉膏营养丰富, 比蛋白胨含更多的无机盐有关。

2.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对产L-乳酸及LDH活性的影响

发酵培养基以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一N源, 按0.2%、0.4%、0.6%浓度添加N源进行发酵, 实验结果见图3-A和3-B。

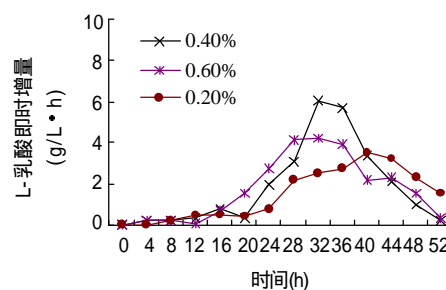


图3-A 氮源浓度对L-乳酸发酵影响

Fig.3-A Effect of nitrogen concentration on L-lactic acid productivity

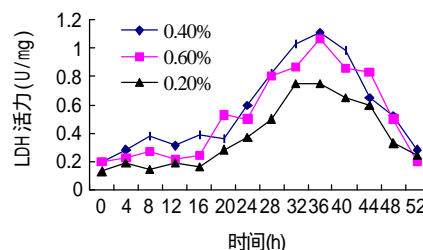


图3-B 氮源浓度对LDH活力影响

Fig.3-B Effect of nitrogen concentration on LDH activity

从图3-A和3-B可以看出, 不同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对L-乳酸产率及LDH活力有较大影响。随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的提高, 其乳酸产率和LDH活力都相应提高。但当N源质量浓度大于0.4%时, L-乳酸产量随着N源浓度的提高反而有所下降, 这可能是由于N源的丰富, 导致菌体生长旺盛, 致使培养基中的C源消耗较多, 引起了发酵水平的下降。因此, N源浓度过高或过低, 都不利于L-乳酸发酵水平的提高。C源浓度为0.4%时发酵水平最好, 发酵至32~36h时乳酸产率基本在 $6\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 左右。

2.4 添加 CaCO_3 对L-乳酸产率及LDH活性的影响

微生物都有它们生长的最适pH范围, 当微生物的代谢物使得培养基pH改变较大时, 如不及时调节, 则会抑制发酵行为。所以设计培养基时, 必须考虑培养基的pH缓冲能力, 一般可加入磷酸缓冲液或 CaCO_3 , 使培养液的pH稳定在一定范围。 CaCO_3 在水溶液中溶

解度很低, 体系中加入 CaCO_3 , 可以使发酵体系 pH 保持在 6.4~6.8。本实验中考察添加 CaCO_3 对 L-乳酸产量和乳酸脱氢酶活力的影响, 所得见图 4-A 和 4-B。

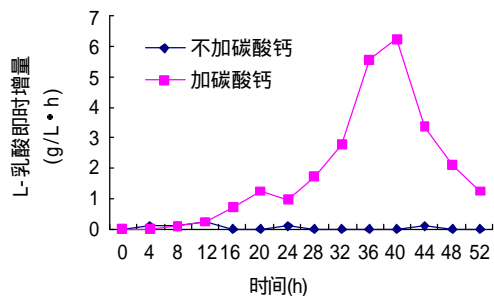


图4-A 添加碳酸钙对乳酸产率影响

Fig.4-A Addition of CaCO_3 on L-lactic acid productivity

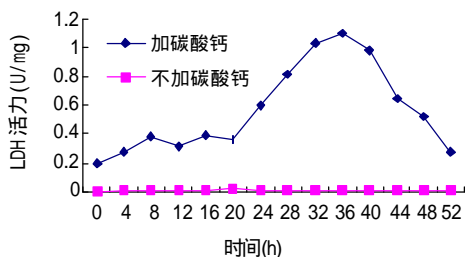


图4-B 添加碳酸钙对LDH活力影响

Fig.4-B Addition of CaCO_3 on LDH activity

由图 4-A 和 4-B 可以看出, 发酵体系中加入 CaCO_3 , LDH 活力明显高于未加入 CaCO_3 的体系。未加入 CaCO_3 体系发酵几乎没有活性, 从而导致 L-乳酸产量极低。

2.5 通气量对产 L-乳酸及 LDH 活力的影响

一般认为米根霉发酵生产 L-乳酸属于好氧发酵, 通气量大小对乳酸产量有较大影响。实验中采用同规格的三角瓶装发酵液, 通气量的改变通过装液量的改变来实现。对 L-乳酸产率、乳酸脱氢酶活力进行了考察, 结果见图 5-A 和 5-B。

由图 5-A 和 5-B 可知, 不同装液量下发酵, LDH 活力都是先增大后减小, 36~40h 达活力最大值, 此时 L-乳酸产率增加较快。米根霉发酵产 L-乳酸过程中, 菌丝体生长需要氧气, 但发酵产酸对氧的要求并不高, 有报道认为发酵阶段给予一定的厌氧环境对提高乳酸转化

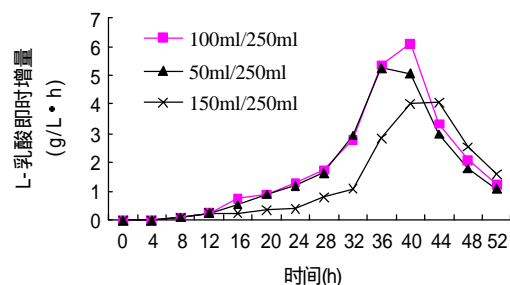


图5-A 通气对乳酸产率的影响

Fig.5-A Effect of aeration on L-lactic acid productivity

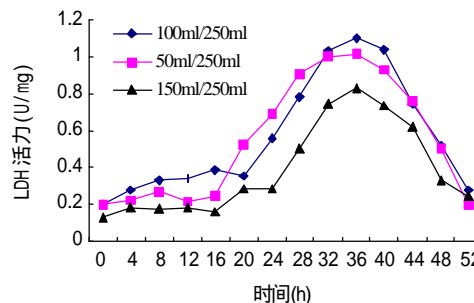


图5-B 通气对LDH活力影响

Fig.5-B Effect of aeration on LDH activity

率有利^[8]。装液量 50ml 和 100ml 的发酵液在发酵 36~40h 左右, L-乳酸产率较高, 此时胞内 LDH 活力也较高。但装液量为 150ml 的发酵培养基在整个发酵过程 L-乳酸产率与 LDH 活力均较低。本研究中采用 250ml 的三角瓶, 其最佳装液量为 100ml, 此情况下, 36h 达最大 LDH 活力 1.10U/mg, 此时 L-乳酸即时增量达 5.34g/L·h。

3 结 论

通过上述对米根霉发酵产 L-乳酸中 C 源、N 源及浓度、添加 CaCO_3 、通气等发酵条件对乳酸产量及 LDH 活力的影响研究, 得出如下结论:

- 3.1 乳酸脱氢酶的活力大小与乳酸产率增量基本一致, 即 LDH 活力越高, 其产乳酸的速率越大。
- 3.2 米根霉发酵产 L-乳酸, 前 20h 左右发酵进展很缓慢, LDH 活力很低, 所产 L-乳酸产率较低; 20h 以后, 酶活开始增长加快, L-乳酸产率也迅速提高, 约到 36~40h, 酶活最大, 产酸率也达到最高。

参考文献:

- [1] 曹本昌, 徐建林, 匡群. L-乳酸研究综述[J]. 食品与发酵工业, 1993, 19(3): 56-61.
- [2] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 中国轻工业出版社, 1997. 402-404.
- [3] 白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 等. 米根霉发酵生产 L(+)-乳酸研究进展[J]. 现代化工, 2002, 22(6): 9-12.
- [4] 郑志, 姜绍通, 潘丽军. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 102-105.
- [5] Mobley D. Plastics from microbes[M]. New York: Hanser/Gardner Publications Inc, 1994. 93-137.
- [6] Barbara E Wright, Angelika Longacer, Jacqueline Rrimers. Models of Metabolism in Rhizopus oryzae[M]. J Theor Biol, 1996, 182: 342-346.
- [7] Christopher D Skory. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from Rhizopus oryzae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2343-2348.
- [8] Angelika Longacre, Jacqueline M Reimers, James E Gannon, et al. Flux analysis of glucose metabolism in Rhizopus oryzae for the purpose of increasing lactate yields[J]. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21: 30-39.