

L-乳酸高产菌株的选育和产酸条件的研究*

葛春梅 古绍彬 姚建铭 潘仁瑞 余增亮

(中国科学院离子束生物工程重点实验室 合肥 230031)

摘要: 为了获得更适于工业生产的产乳酸菌株, 采用低能离子诱变方法, 对出发菌米根霉 (*Rhizopus oryzae*) PW352 进行改良, 获得高产 L (+) -乳酸菌株 RE3303, 其产酸比亲株提高 75%。用正交试验方法对突变株适宜产酸条件进行了研究, 在最优条件下, 其产酸量可达 131 ~ 136 g/L, 最高可达 140 g/L, 糖转化率为 86% ~ 90%。

关键词: 离子注入, L (+) -乳酸, 米根霉, 选育

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0005-04

Studies on the Breeding and Cultivation of L-Lactic Acid Producing Strain

GE Chun-Mei GU Shao-Bin YAO Jian-Ming PAN Ren-Rui YU Zeng-Liang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, CAS, Hefei 230031)

Abstract: In order to obtain higher L-lactic acid yield industrial strain, the original strain *Rhizopus oryzae* PW352 was mutated by means of N^+ ions implantation and a mutant strain *Rhizopus oryzae* RE3303 was obtained. Its lactic acid yield was increased by 75% than that of the original one. The acid producing condition was optimized by orthogonal design. The concentration of L-lactic acid reached to 131 ~ 136 g/L and the conversion rate of glucose was as high as 86% ~ 90% under the optimum condition.

Key words: Ion implantation, L (+) -lactic acid, *Rhizopus oryzae*, Breeding

低能离子注入是一种新颖诱变源, 具有损伤轻, 突变率高, 突变谱广, 其应用于生物工程已取得了丰硕成果^[1-3]。

乳酸广泛应用于食品, 医药, 农业和化工业。聚乳酸可用于制造完全生物降解性塑料, 生产绿色包装材料和农用薄膜, 聚乳酸还广泛应用于医药及医用行业, 包括医用缝合线, 药物缓释材料, 骨固定修复材料及其它组织工程用材料等^[4-6]。但是, 聚乳酸在实际应用中还有一些困难, 如由于 L (+) -乳酸的纯度不够, 导致聚乳酸及其共聚物体系制品的强度不够及生产成本较高等问题。因此目前诱变筛选乳酸产量高, 及乳酸纯度高的菌株, 对乳酸产业进一步的发展具有重要的意义。米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 因其制得的 L (+) -乳酸纯度高, 是国内外乳酸发酵行业采用的菌株之一, 本实验室采用离子注入技术, 筛选到一株高产 L (+) -乳酸菌株, 产酸达 131 ~ 136 g/L, 糖转化率为 86% ~ 90%。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 米根霉 (*Rhizopus oryzae*) PW352 和 RE3303。

* 国家十五攻关项目 (No. 2001BA302B)

收稿日期: 2003-09-24, 修回日期: 2003-11-18

1.1.2 培养基: 产孢子培养基: 3 × PDA 加适量 CaCO₃。分离培养基: 溴甲酚绿平板, 1 L PDA 中加入溴甲酚绿 1.0 g。琥珀酸平板: 琥珀酸 30 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 0.3 g, ZnSO₄·7H₂O 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.75 g, 琼脂 20 g。种子培养基: 每升葡萄糖 100 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 0.3 g, ZnSO₄·7H₂O 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.75 g, pH6.8, CaCO₃ (单独灭菌)。发酵培养基: 每升葡萄糖 150 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 0.3 g, ZnSO₄·7H₂O 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.75 g, pH6.8, CaCO₃ 过量 (单独灭菌)。

1.2 方法

1.2.1 培养方法: 斜面培养: 36℃, 4~7 d。平板培养: 36℃, 36 h。种子培养: 250 mL 的三角瓶中装入 50 mL 种子培养基, 接种一定量的孢子悬液, 使初始培养的孢子浓度在 1.0 × 10⁶ 个 / mL, 置于 36℃ 摇床, 200 r/min, 振荡培养 12 h。发酵培养: 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 的发酵培养基, 并将培养好的种子液按 1:20 的量接种到发酵培养基中, 置于 36℃ 摇床, 200 r/min 振荡培养 36 h。

1.2.2 低能离子注入: 7~10 mL 生理盐水洗下生长好的新鲜斜面的孢子, 用双层无菌纱布过滤得到无菌丝体的孢子悬液, 取稀释 10 倍的孢子悬液 0.1 mL 均匀涂布于无菌平皿风干。然后用 15keV 氮离子, 不同剂量进行注入。注入后的样品用 1 mL 生理盐水洗涤, 将洗脱液稀释到 10²~10³, 后取 0.05 mL 涂布于溴甲酚绿平板或琥珀酸平板上, 34℃~36℃ 培养, 挑取单菌落进行初筛, 复筛。

1.2.3 分析方法: pH, 采用国产精密 pH 试纸和 pHS-2C 型精密酸度计。孢子浓度的计算, 血球计数板法。残糖的测定, 斐林试剂法。发酵液中 L (+)-乳酸的定性测定, 反相-HPLC 检测^[7], uBondpak C18 柱 (3.9 × 300 mm), 流动相, 甲醇-水-磷酸 (10-90-0.3), 流速: 0.8 mL/min, 柱温, 25℃, 检测波长 210 nm, 仪器型号 WATERS600, 检测器 996PDA 195~400 nm。发酵液中 L (+)-乳酸的定量测定, EDTA 滴定法, 酶电极法 (SBA-40C 型生物传感器)。

2 结果与讨论

2.1 低能离子诱变

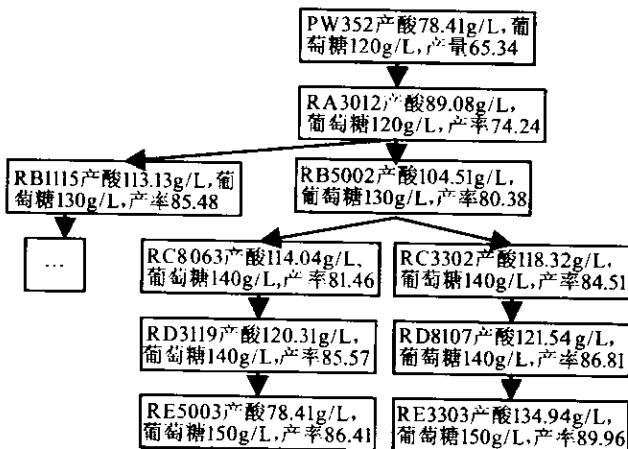


图1 L (+) 乳酸生产菌筛选谱系

实验选用 15keV 能量, 2.6 × 10¹³ ions/cm²·s 剂量率, 7.8 × 10¹⁴ ~ 2.08 × 10¹⁵ ions/cm² 剂量对菌种进行注入处理。图 1 为 L (+) 乳酸生产菌筛选谱系, 经过筛选, 得到高产菌株 RE3303, 在投糖 15% (W/V) 的情况下, 产酸基本上维持在 130 g/L 以上, 转化率在 86% ~ 90%。

2.2 产物的鉴定

采用反相 HPLC 对发酵液进行分析 (如图 2), 从与标准乳酸的

比较中可以看出,除乳酸形成的色谱峰外,没有其他有机酸形成的杂峰出现。

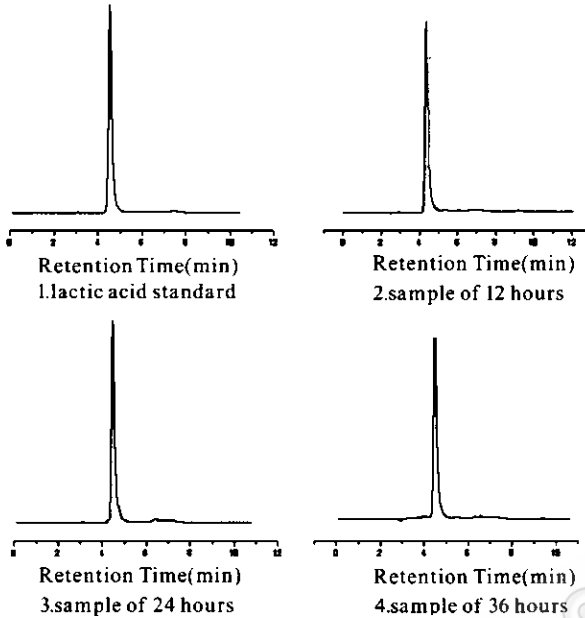


图2 RE3303不同发酵时间液相色谱图

2.3 发酵工艺的研究

2.3.1 种龄,接种量对发酵的影响:种龄与接种量对发酵周期的影响很大,它不仅关系到设备的利用率,而且不适的发酵周期可能会导致底物的浪费或副产物的增多。该菌株在8h后进入快速生长期,20h后生长缓慢,图3是种龄与产酸的关系图,从图中可以看出,接种培养12h的种液,产酸最高。试验对接种量与产酸的关系进行了研究,当接种量为5%时,产酸为130g/L,低于4%或高于10%,产酸水平都有较大幅度的下降。

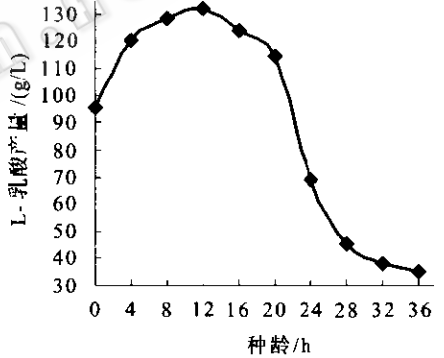


图3 RE3303种龄与产酸的关系

2.3.2 通气量对乳酸发酵的影响:从摇床转数和装液量两个方面研究通气状况对产酸的影响。(如图4和表1)。在250mL的摇瓶中,装液量在50~80mL之间对该菌产酸较为理想,而摇床转数对产酸有显著影响,其中200r/min,50mL/250mL装液量对产酸最为有利。

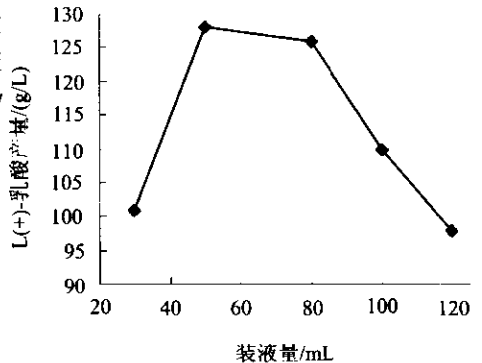


图4 摇瓶装液量对RE3303产酸的影响

表1 摇床转数及装液量对RE3303产酸的影响

摇床转数	装液量	
	50 mL/250 mL	80 mL/250 mL
150 r/min	103.58	98.72
200 r/min	129.3	113.8

2.3.3 发酵培养基组成的优化: 为了获得根霉 RE3303 的最佳营养条件, 对影响发酵产酸的碳源及四种无机盐 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 进行正交优化。结果如表 2。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交实验结果

实验号	因 子					酸产量 (g/L)	对糖转化 率 (%)
	葡萄糖 (%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	KH_2PO_4 (%)	ZnSO_4 (%)	MgSO_4 (%)		
1	13	0.20	0.02	0.010	0.025	92.5	71.15
2	13	0.30	0.03	0.015	0.050	99.32	76.4
3	13	0.40	0.04	0.020	0.075	97.29	74.84
4	13	0.50	0.05	0.025	0.100	95.52	73.48
5	15	0.20	0.03	0.020	0.100	127.81	85.21
6	15	0.30	0.02	0.025	0.075	128.51	85.67
7	15	0.40	0.05	0.010	0.050	111.25	74.17
8	15	0.50	0.04	0.015	0.025	121.16	80.77
9	16	0.20	0.04	0.025	0.050	115.08	71.92
10	16	0.30	0.05	0.020	0.025	115.71	72.32
11	16	0.40	0.02	0.015	0.100	113.91	71.19
12	16	0.50	0.03	0.010	0.075	115.53	72.21
13	17	0.20	0.05	0.015	0.075	112.38	66.11
14	17	0.30	0.04	0.010	0.100	114.36	67.27
15	17	0.40	0.03	0.025	0.025	111.93	65.84
16	17	0.50	0.02	0.02	0.050	113.05	66.5
k1	96.1575	111.9425	111.9925	108.41	110.325		
k2	122.1825	114.475	113.6475	111.6925	109.675		
k3	115.0575	108.595	111.9725	113.465	113.4275		
k4	112.93	111.315	108.715	112.76	112.9		
R	26.025	5.88	4.9325	5.055	3.7525		

通过以上分析结果可以看出根霉 RE3303 最佳的发酵培养基组成为 15% 葡萄糖, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.020% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。各因素主次顺序为葡萄糖 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > ZnSO_4 > KH_2PO_4 > MgSO_4 。

2.4 菌株稳定性测试

对诱变选育菌株 RE3303 进行传代试验, 在投糖 15% 的情况下, 从 F1 ~ F6 代, 产酸基本上维持在 130 g/L 以上, 最高可达 140 g/L, 转化率在 86% ~ 90% 的较高水平。

参 考 文 献

- [1] 虞 龙, 余增亮. 高技术通讯, 2002, 12 (11): 41 ~ 46.
- [2] Wang H B, Gao X W, Guo J H, *et al.* Plasma Science & Technology, 2002, 4 (6): 1591 ~ 1596.
- [3] Yuan C L, Wang J, Shang Y, *et al.* Food Technol Biotechnol, 2002, 40 (4): 311 ~ 315.
- [4] 金其荣, 金丰秋. 食品科学, 2001, 22 (3): 90 ~ 91.
- [5] 陈丹云, 王敬平, 柏 艳. 化工进展, 2002, 21 (4): 243 ~ 246.
- [6] 朱惠光, 计 剑, 高长有, 等. 功能高分子学报, 2001, 14 (4): 488 ~ 492.
- [7] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定, 等. 工业微生物, 2001, 31 (1): 8 ~ 11.