

结冷胶固定化保加利亚乳杆菌及在玉米秸秆连续发酵 D-乳酸中的应用

郭勇鑫¹, 王刚^{1*}, 李柯欣¹, 韩嘉棋¹, 陈欢¹, 张斯童¹, 李艳丽^{1,2}, 陈光^{1,2}

1 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

2 教育部秸秆综合利用与黑土地保护重点实验室, 吉林 长春 130118

郭勇鑫, 王刚, 李柯欣, 韩嘉棋, 陈欢, 张斯童, 李艳丽, 陈光. 结冷胶固定化保加利亚乳杆菌及在玉米秸秆连续发酵 D-乳酸中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1083-1095.

GUO Yongxin, WANG Gang, LI Kexin, HAN Jiaqi, CHEN Huan, ZHANG Sitong, LI Yanli, CHEN Guang. Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* with gellan gum and its application in continuous fermentation of D-lactic acid from corn straw[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1083-1095.

摘要: 秸秆生物炼制化学品是解决秸秆资源利用附加值低、减轻秸秆焚烧带来的环境污染的主要方法之一。本研究制备了结冷胶固定化保加利亚乳酸杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*) T15 凝胶珠(结冷胶-T15 凝胶珠), 并对其性质进行表征, 建立了结冷胶-T15 凝胶珠固定化细胞循环连续发酵产 D-乳酸发酵工艺。结冷胶-T15 凝胶珠的断裂应力为(91.68±0.11) kPa, 较海藻酸钙固定化 T15 凝胶珠(海藻酸钙-T15 凝胶珠) 提高了 125.12%, 表明结冷胶-T15 凝胶珠的强度更强。以结冷胶-T15 凝胶珠为出发菌株, 葡萄糖为发酵基质, 10 批次循环(720 h)发酵, 其 D-乳酸最高批次产量为(72.90±2.79) g/L, 较海藻酸钙-T15 凝胶珠提高了 33.85%, 较游离 T15 提高了 37.70%。将葡萄糖更换为玉米秸秆酶解液, 使用结冷胶-T15 凝胶珠进行 10 批次循环(240 h)发酵, D-乳酸生产强度可达(1.74±0.79) g/(L·h), 远高于游离菌。10 批次循环发酵后结冷胶-T15 凝胶珠磨损率小于 5%, 表明结冷胶是一种细胞固定化的良好载体, 可广泛应用于细胞固定化工业发酵领域。本研究为细胞循环发酵产 D-乳酸工业化生产提供基础数据, 为玉米秸秆生物炼制 D-乳酸提供了新途径。

关键词: 海藻酸钙; 结冷胶; 保加利亚乳杆菌; 固定化; 循环发酵; 玉米秸秆

资助项目: 吉林省重点研发计划(202000402097NC)

This work was supported by the Key Research and Development Plan of Jilin Province (202000402097NC).

*Corresponding author. E-mail: wanggang@jlau.edu.cn

Received: 2022-07-13; Accepted: 2022-08-29

Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* with gellan gum and its application in continuous fermentation of D-lactic acid from corn straw

GUO Yongxin¹, WANG Gang^{1*}, LI Kexin¹, HAN Jiaqi¹, CHEN Huan¹, ZHANG Sitong¹,
LI Yanli^{1,2}, CHEN Guang^{1,2}

1 College of life sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 Key Laboratory of Straw Comprehensive Utilization and Black Land Protection of the Ministry of Education, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: Biorefinery of chemicals from straw is an effective approach to alleviate the environmental pollution caused by straw burning. In this paper, we prepared gellan gum immobilized *Lactobacillus bulgaricus* T15 gel beads (LA-GAGR-T15 gel beads), characterized their properties, and established a continuous cell recycle fermentation process for D-lactate (D-LA) production using the LA-GAGR-T15 gel beads. The fracture stress of LA-GAGR-T15 gel beads was (91.68±0.11) kPa, which was 125.12% higher than that of the calcium alginate immobilized T15 gel beads (calcium alginate-T15 gel beads). This indicated that the strength of LA-GAGR-T15 gel beads was stronger, and the strain was less likely to leak out. The average D-LA production was (72.90±2.79) g/L after fermentation for ten recycles (720 h) using LA-GAGR-T15 gel beads as the starting strain and glucose as the substrate, which was 33.85% higher than that of calcium alginate-T15 gel beads and 37.70% higher than that of free T15. Subsequently, glucose was replaced by enzymatically hydrolyzed corn straw and fermented for ten recycles (240 h) using LA-GAGR-T15 gel beads. The yield of D-LA reached (1.74±0.79) g/(L·h), which was much higher than that of using free bacteria. The wear rate of gel beads was less than 5% after ten recycles, which indicated that LA-GAGR is a good carrier for cell immobilization and can be widely used in industrial fermentation. This study provides basic data for the industrial production of D-LA using cell-recycled fermentation, and provides a new way for the biorefinery of D-LA from corn straw.

Keywords: calcium alginate; gellan gum; *Lactobacillus delbrueckii*; immobilized; cyclic fermentation; corn straw

乳酸(lactic acid), 学名 α -羟基丙酸、丙醇酸^[1]。按其光学活性可分为 D-乳酸(D-LA)与 L-乳酸(L-LA)。其中, L-乳酸主要应用于食品加工领域, D-乳酸应用于医药、化工、食品、环保等众多领域。从 2014 年开始, 全球聚乳酸市场需求以 20%–30% 的速度增长, 其合成前体高光学纯度 D-乳酸因其可显著改善聚乳酸的耐热

性, 需求量也快速增加。

D-乳酸的生产包括两种方法^[2], 微生物发酵法和化学合成法。化学合成法容易产生消旋体、污染高、光学纯度低, 应用较少。微生物发酵法生产 D-乳酸, 具有产物光学纯度高、污染低等优点, 是目前 D-乳酸工业生产的主要方法, 世界上 90% 以上的 D-乳酸均以微生物发酵法生

产^[3]。目前微生物发酵生产 D-LA 的原料以六碳糖(葡萄糖)为主。随着世界粮食危机的日益严峻,寻找新的葡萄糖替代发酵原料尤为重要。此时,可水解为可发酵糖的生物资源引起世界各国科学家的兴趣^[4-5]。以玉米秸秆为例,玉米秸秆经常被我国北方居民用作燃烧产热产能的主要燃烧原材料之一,但是这种处理方式是通过对玉米秸秆的资源利用,焚烧会导致玉米秸秆产生大量的 CO₂ 排放,从而引起不可避免的大气污染。而秸秆当中含有的大量木质纤维素却正是实现生物炼制制备 D-乳酸过程的优质原材料,预处理、秸秆脱毒、水解/酶解、微生物作用和分离纯化^[6-7]这些步骤,生产 D-LA。

微生物发酵法生产 D-乳酸仍存在菌种产酸性能低、耐受性差、生产成本高等问题亟待解决^[8-11],为解决上述问题,研究人员利用细胞固定化连续发酵方法来提高 D-乳酸产量、提高菌株耐受性。目前细胞固定化方法多种多样,以交联法^[12-13]、吸附法^[14-15]、包埋法^[16-20]为主,部分可使用介质截留法、复合固定法^[21]等。包

埋法因其条件温和、密度高、稳定性好、细胞增殖速度相对较快,是细胞固定化的首选方法。包埋法固定化微生物细胞,选材是关键,既要选用机械强度高、对外界环境耐受性强的材料,又要考虑包埋材料的制备工艺是否可行。海藻酸钠(sodium alginate)作为被广泛用作乳酸菌包埋的壁材,能够显著提高乳酸菌的冷冻存活率,延长其货架期,但其发酵产酸效果一般。结冷胶(gellan gum, LA-GAGR)是一种新型微生物阴离子胞外多糖,具有生物相容性好的优点,在较少的添加量下就能达到较好的悬浮效果,在酸性、高温条件下均表现出良好的稳定性能,可以形成性质良好、凝胶速率适中的酸性凝胶。以上两种材料因其自身具有的多孔基质特性,在经过 CaCl₂ 固化后形成的凝胶珠很适合作为乳酸菌菌种固定化的包埋材料^[21-24]。

基于细胞固定化手段来进行的细胞循环发酵这种模式已被证实可以提高乳酸的生产量(表 1)。2020 年 Rasosavljević 等^[25]利用了“冻融”技术对鼠李糖乳杆菌 ATCC 7469 进行固定化产酸发酵,选用聚乙烯醇/海藻酸钙作为固定化载

表 1 近三年固定化微生物发酵法产乳酸或 D-乳酸研究成果

Table 1 Production of LA or D-LA by immobilized microbial fermentation in the past three years

Strain	Substrate	Carrier material	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	Year
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	Glucose	PVA/Ca-alginate	—	0.976	0.780	2020 ^[25]
<i>Rhizopus oryzae</i> PTCC 5263	Soluble potato starch	Loofah sponge	4.00	0.400	0.370	2020 ^[26]
<i>Enterococcus faecalis</i> -58 and <i>Enterococcus hirae</i> -68	Ice cheese	Sodium alginate	31.00±0.08	0.850	0.327	2022 ^[27]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Carob waste	Sodium alginate	40.00	0.769	1.220	2019 ^[28]
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	Glucose	Chitosan-modified polypropylene	8.20±1.20	0.410	0.114	2021 ^[29]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> T15	Glucose	LA-GAGR	72.90±2.79	0.630±0.940	1.420±0.140	This study
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> T15	Corn straw	LA-GAGR	41.85±1.26	0.670±1.450	1.740±0.790	This study

“—” indicates no explanation.

体进行固定化重复分批发酵。结果表明,固定化生物催化剂的产率较游离细胞发酵系统高出 37.1%,在 7 次的循环分批发酵过程中,生物催化剂表现出良好的机械稳定性与操作稳定性。同年,Shahri 等^[26]则采用一步发酵法测定了米根霉 PTCC 5263 从马铃薯淀粉当中合成 LA 的能力,选用丝瓜海绵自然形成的生物膜作为固定化载体进行产乳酸发酵,最终可在 48 h 内获得 5 g/L 的乳酸。2022 年,Dosuky 等^[27]以乳制品工业的废弃物为基质,使用从腌制干酪乳清当中分离得到的 74 株乳酸菌进行耐高盐浓度的分离与鉴定,并从中获得细胞使用海藻酸钠进行固定化分批静态发酵,最终获得最大的 LA 产量为 36.95 g/L,同时在重复分批培养过程中达到了 126 d 以上,在这个过程中同时表现出了良好的机械强度。

本研究选用结冷胶作为细胞固定化材料,对保加利亚乳酸杆菌 T15 (*Lactobacillus bulgaricus* T15)进行固定化,建立细胞循环连续

发酵工艺,初步验证玉米秸秆酶解液为发酵基质进行细胞循环发酵产 D-乳酸的可行性(图 1)。旨在为固定化 *L. bulgaricus* T15 细胞循环发酵产 D-乳酸工业化生产工艺的建立提供基础数据,也为玉米秸秆生物炼制 D-乳酸提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

L. bulgaricus T15 由秸秆生物学与利用教育部重点实验室提供。

菌种活化培养基: MRS 肉汤培养基购自青岛海博生物技术有限公司;发酵培养基:在 MRS 液体培养基中添加 8% 的纳米 CaCO_3 (购自北京化工厂);海藻酸钠购自 Oiaqdon Ityztlin 公司;结冷胶购自仟味食品添加剂有限公司;葡萄糖检测试剂盒购自上海荣海生物药业。

1.2 仪器和设备

S/N 415-2903 Omega 酶标仪购自 Omega 公司;Waters 1525 高效液相色谱购自沃斯特公司。

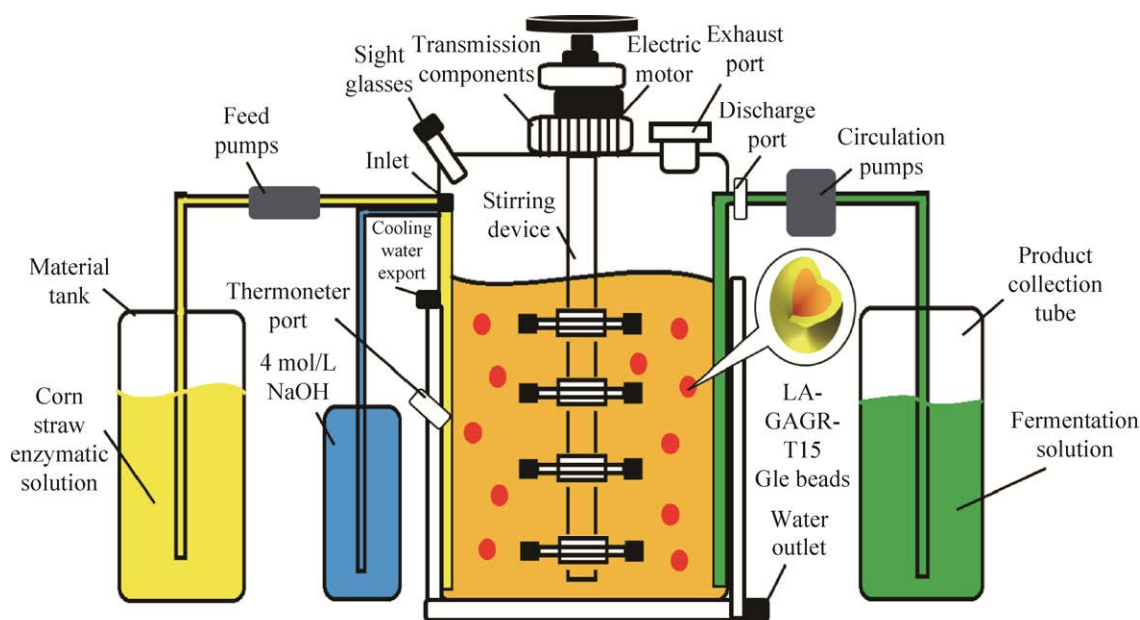


图 1 固定化细胞循环发酵概念图

Figure 1 Conceptual diagram of cell-recycled fermentation system using immobilized cells.

1.3 方法

1.3.1 海藻酸钙-T15 和结冷胶-T15 凝胶珠制备

参考文献[30]的方法,稍作修改。准确称取 0.75 g 海藻酸钠与 1.8 g 结冷胶于 80 °C 溶于 100 mL 无菌水,115 °C 灭菌 15 min,冷却至室温,保存备用。

将 T15 菌悬液($OD_{600}=0.8-1.2$)和结冷胶溶液以 1:10 (体积比)的比例混合,用无菌注射器吸取上述混合液,以距离液面 30 cm 的高度逐滴滴入到 $CaCl_2$ 溶液中,形成凝胶珠,固化 30 min,无菌去离子水洗去凝胶珠表面的 $CaCl_2$,4 °C 冰箱贮存备用。

海藻酸钙-T15 凝胶珠制备过程同上。

1.3.2 海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠(未固定 T15)物性分析

使用 TA-XT 2i 物性分析仪进行单轴应力压缩法进行测试,选用夹具模型为 P/36R、测试模式为 compression。具体测试参数为下压速率 1 mm/s,压缩应变 80%直至凝胶破碎。用于机械强度分析主要参数为断裂应变、断裂应力和杨氏模量。由于在测试过程中凝胶珠横截面积会发生变化,因此根据公式(1)和(2)进行矫正,分别转化为 Hencky 应力(σ 力)和 Hencky 应变(ε 变):

$$\sigma_H = \frac{F_{(t)} \cdot H_{(t)}}{(H_0 \cdot A_0)} \quad (1)$$

$$\varepsilon_H = -\ln\left[\frac{H_{(t)}}{H_0}\right] \quad (2)$$

式中: $F_{(t)}$, t 时刻的应力, N; $H_{(t)}$, t 时刻时试样的高度, mm; A_0 , 试样的初始横截面积, mm^2 ; H_0 , 试样的初始高度, mm。

断裂应力和断裂应变分别是断裂应力和断裂曲线最高点所对应的应力和应变。

1.3.3 *L. bulgaricus* T15 的活化

取-80 °C 冰箱保存的 T15 100 μ L 接种至 100 mL MRS 液体培养基中。37 °C 过夜培

养至 OD_{600} 为 0.8-1.0。

1.3.4 *L. bulgaricus* T15 发酵产 D-乳酸

将游离 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠分别以 6% 菌种接种量接种至初始葡萄糖浓度为 80 g/L 的发酵培养基中,41 °C 发酵 72 h,过滤,凝胶珠与发酵液分别保存备用。

1.3.5 高效液相色谱法测定发酵液 D-乳酸与副产物乙酸含量

准确吸取发酵 72 h 发酵液 1 mL,加入 1% H_2SO_4 置换后, HPLC 法测 D-LA 含量。

Waters 1525 高效液相色谱仪测定 D-LA 的含量,测定条件如下。色谱柱: Astec CLC-L, 15 cm CLC-L 色谱柱; 流动相: 5 mmol/L $CuSO_4 \cdot Cu_2O$; 流速 1.2 mL/min; 柱温: 常温; 检测器: Waters 1525, 254 nm 检测波长; 进样量: 10 μ L。

Waters 1525 高效液相色谱仪测定乙酸的含量,测定条件如下。色谱柱 PRONTOSIL 120-10-C18 H (购自 Sigma 公司), 250 mm \times 4.6 mm; 流动相: 10% 甲醇溶液; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 常温; 检测器: Waters 1525, 检测波长为 210 nm; 进样量: 10 μ L。

1.3.6 不同初始葡萄糖浓度对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸影响

按 60、70、80、90、100 g/L 初始葡萄糖浓度,以 6% 接种量、41 °C 条件发酵 72 h,整个发酵过程中不添加葡萄糖,测产酸量与葡萄糖利用率。

1.3.7 不同接种量对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸影响

按 1%、2%、4%、6%、8% 的接种量,初始葡萄糖浓度选用 1.3.6 实验结果的最佳浓度,41 °C 发酵 72 h,期间每 12 h 对葡萄糖含量进行测定并补充葡萄糖至最适糖浓度,发酵 72 h,测产酸量与葡萄糖利用率。

1.3.8 不同发酵温度对游离 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸影响

设置发酵温度 37、39、41、43、45 °C 并以 1.3.6 与 1.3.7 结果中各处理组最适初糖浓度与接种量条件发酵 72 h, 期间每 12 h 对补充葡萄糖至最适糖浓度, 发酵 72 h, 测产酸量与葡萄糖利用率。

1.3.9 以葡萄糖为发酵基质细胞连续循环发酵产 D-乳酸

以 72 h 发酵为一个循环周期, 过滤分离凝胶珠及发酵液, 补充与第一次等量的 MRS 培养基, 41 °C 再次发酵 72 h, 不断循环。收集每个循环的发酵液, 检测 D-乳酸及残余糖量。

1.3.10 玉米秸秆水解液制备

秸秆预处理参考文献[31]方法处理, 向玉米秸秆(颗粒 40 目)质量分数 9% (质量分数)添加 6% NaOH 12% 尿素(urea)并于 80 °C 处理 20 min, 过滤, 水洗至 pH 为中性, 40 °C 烘箱干燥备用。

称取上述预处理秸秆, 酶添加量为 1.78 mg/mL、温度为 50 °C、180 r/min 酶解 72 h。酶解后将酶解液 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 计算葡萄糖含量。

1.3.11 固定化 T15 利用玉米秸秆酶解液循环发酵产 D-乳酸

每隔 24 h 发酵, 过滤分离凝胶珠及发酵液, 添加与第一次等量 100 mL 玉米秸秆酶解液, 41 °C 发酵 24 h, 进入下一循环。收集每个循环的发酵液, 测 D-乳酸、残余糖量。每次循环结束后, 无菌条件测量凝胶珠质量, 使用公式(3)计算凝胶珠磨损率。

$$\text{磨损率} = \frac{W_x}{W_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中, W_x 为 x 批次凝胶珠质量, W_0 为未发酵时凝胶珠质量。

1.4 数据统计分析

试验数据利用 origin 2019b 和 SPSS 17.0 进

行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钙、结冷胶凝胶珠(未固定 T15)物性分析

海藻酸钙与结冷胶凝胶珠都具有极好的机械强度, 且大小形状接近(表 2)。海藻酸钙与结冷胶凝胶珠直径平均在 2.5 mm 左右, 横截面积均约为 4.91 mm², 海藻酸钙凝胶珠断裂应力为 40.73 kPa, 而结冷胶凝胶珠断裂应力为 91.68 kPa, 说明结冷胶机械强度要优于海藻酸钙凝胶珠, 该结果与陈青等^[32]研究结果一致, 这种凝胶珠能在细胞循环发酵中对发酵菌种起到良好的保护作用, 同时越高的断裂应力值也能表明其在发酵过程中所受产生的外力影响更小, 凝胶珠或菌种在发酵过程中的损失也更小, 因此结冷胶凝胶珠适合作为细胞循环发酵产酸的固定化载体。

2.2 初始葡萄糖浓度对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸及耗糖的影响

初始葡萄糖添加量为 60、70、80 g/L 时, 游离菌 T15 可发酵产酸, 而当初始糖浓度大于 90 g/L 时, 游离菌 T15 未能进行发酵产酸, 说明糖浓度过高导致菌体死亡, 而 80 g/L 时 D-乳酸产量低于 60 g/L, 说明 T15 菌受到了抑制, 并未死亡。海藻酸钙-T15 凝胶珠与结冷胶-T15 凝胶珠发酵, 在初始糖浓度大于 90 g/L 时, 依然可以进行发酵产酸, 说明固定化 T15 对高浓度的葡萄糖渗透压具有较好的耐受性(图 2)。海藻酸钙-T15 凝胶珠在 80、90、100 g/L 时 D-乳酸产量分别为(44.23±2.26)、(43.56±2.36)、(42.48±2.15) g/L, 结冷胶-T15 凝胶珠产酸量分别为(44.57±2.14)、(42.93±2.17)、(40.62±2.55) g/L。海藻酸钙-T15 凝胶珠在 60–100 g/L 的范围内,

表 2 海藻酸钙、结冷胶凝胶珠物性分析

Table 2 Analysis of physical properties of calcium alginate and LA-GAGR gel beads

Material	Diameter (mm)	Cross-sectional area (mm ²)	Hencky stress (kPa)	Hencky strain
Calcium alginate-gel beads	2.50±0.28	4.91±0.24	40.73±0.29	0.66±0.33
LA-GAGR-gel beads	2.50±0.75	4.91±1.76	91.68±0.11	0.67±0.43

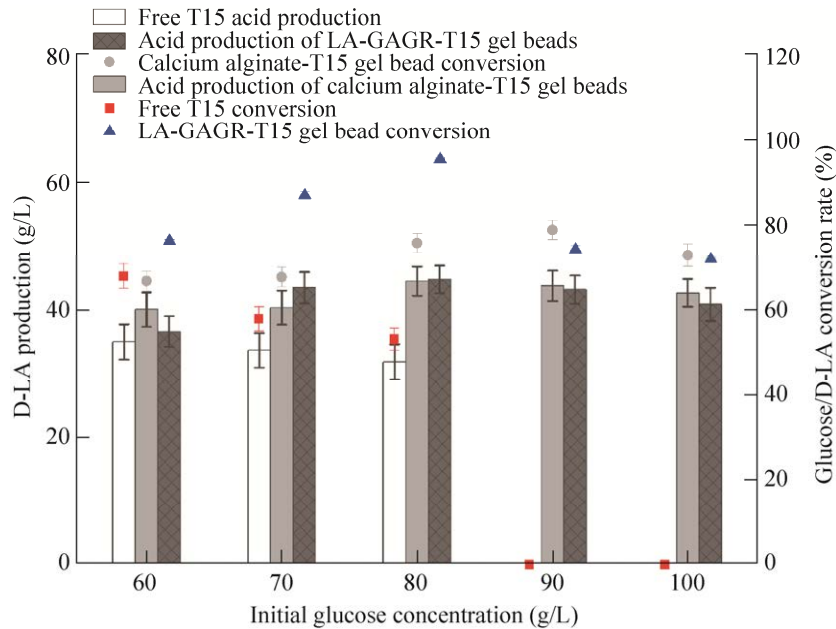


图 2 初始葡萄糖浓度对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸及耗糖的影响

Figure 2 Effects of different initial glucose concentrations on acid production and sugar consumption of free strain T15, calcium alginate-T15 gel beads and LA-GAGR-T15 gel beads.

葡萄糖与乳酸的转化率呈负相关($P < 0.05$), 而结冷胶-T15 凝胶珠发酵产 D-乳酸在 60–80 g/L 的区间内呈正相关, 在 80–100 g/L 的范围内呈负相关, 且 P 值小于 0.05, 其原因可能是在低葡萄糖浓度条件下, 菌体的生长环境由液体转换为胶体所表现的不适应性导致菌体优先消耗葡萄糖进行菌体的生长与繁殖, 而不是进行发酵产酸。在高浓度葡萄糖胁迫条件下, 结冷胶固定化 T15 表现出更好的耐受性, 且 80 g/L 为最适初始葡萄糖浓度。

2.3 接种量对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠发酵产酸及耗糖的影响

在接种量 1%–6% 范围内, 发酵 72 h, 各处理组的发酵产酸量与接种量呈正相关, 游离菌 T15 在 6% 接种量乳酸产量达到最高

(36.94±2.68) g/L, 且糖酸转化率达到 21.6%。海藻酸钙-T15 凝胶珠与结冷胶-T15 凝胶珠发酵产酸量与接种量在接种量 1%–6% 范围内呈正相关 ($P < 0.05$, 6% 接种量条件下 D-乳酸产量达到最高, 分别为 (75.54±3.49) g/L 与 (89.16±3.61) g/L, 且糖酸转化率分别达到 50.36% 与 68.58%, 随着接种量的继续增加, 当接种量为 8% 时, 产酸量有所降低, 糖酸转化率也降低。可能是由于菌体数量过多导致菌体老化加快, 产酸量降低(图 3)。综上所述, 选择 6% 接种量为后续发酵最适接种量。

2.4 发酵温度对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸及耗糖的影响

各处理组在 37–39 °C 的范围内, 温度与 D-乳酸产量呈正相关, 在 41–45 °C 区间内, 呈

负相关, 且 P 值小于 0.05 (图 4)。游离 T15, 海藻酸钙-T15 凝胶珠与结冷胶-T15 凝胶珠在 39 °C 发酵产 D-乳酸量最高, 分别为 87.16、

107.16、131.84 g/L, 由此得出 39 °C 为 *L. bulgaricus* T15 最适发酵温度。在发酵温度为 43 °C 与 45 °C 时, 游离菌发酵法产酸量

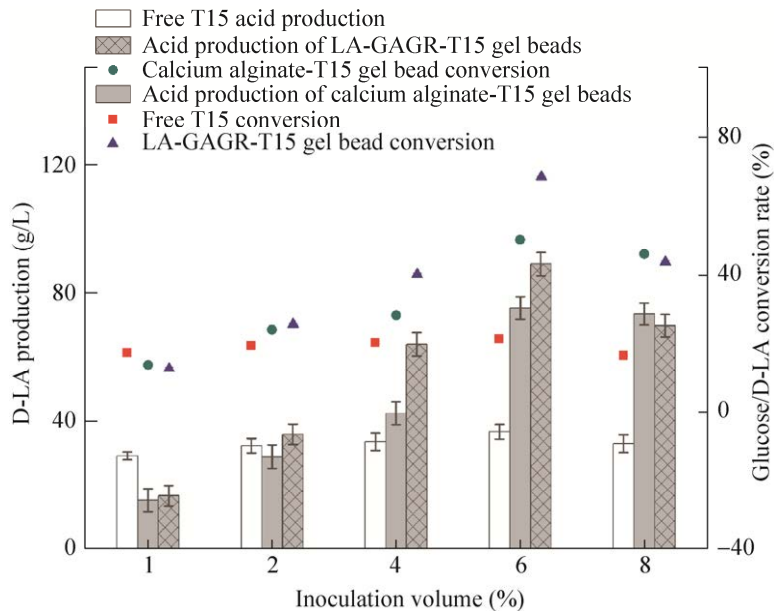


图 3 接种量对游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸及耗糖的影响

Figure 3 Effects of different inoculation amounts on acid production and sugar consumption of free strain T15, calcium alginate-T15 gel beads and LA-GAGR-T15 gel beads.

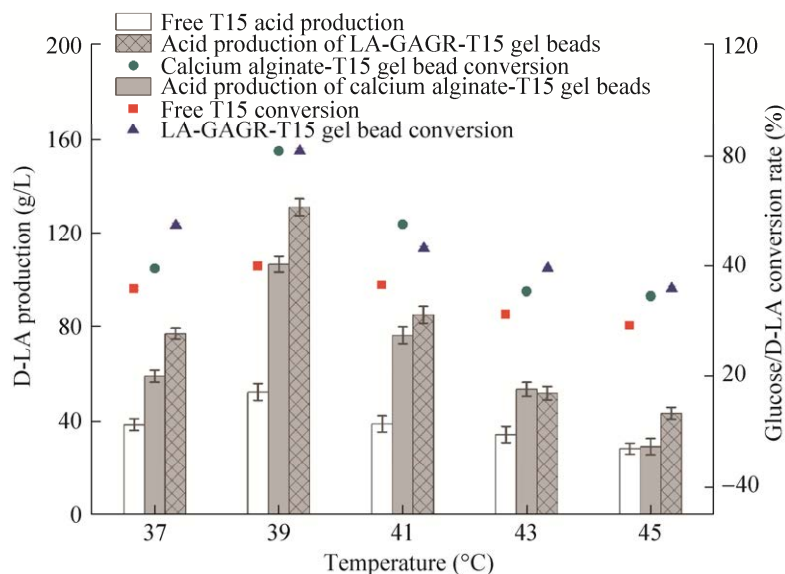


图 4 不同发酵温度与游离菌 T15、海藻酸钙-T15 凝胶珠、结冷胶-T15 凝胶珠产酸及耗糖的影响

Figure 4 Effects of different fermentation temperatures on acid production and sugar consumption of free strain T15, calcium alginate-T15 gel beads and LA-GAGR-T15 gel beads.

分别为 (34.72 ± 3.49) g/L 和 (28.66 ± 2.38) g/L, 说明过高的温度使菌体的发酵产酸受到了抑制, 海藻酸钙-T15 凝胶珠发酵产 D-乳酸量分别为 (53.76 ± 2.97) g/L 与 (29.55 ± 3.55) g/L, 结冷胶-T15 凝胶珠发酵产 D-乳酸分别为 (52.05 ± 2.81) g/L 与 (43.64 ± 2.48) g/L, 说明固定化后菌体耐高温能力有所提升, 且结冷胶作为固定化材料的温度耐受性最优。

2.5 以葡萄糖为发酵基质进行 10 批次细胞循环连续发酵产酸及测定

与游离菌 T15 相比, 海藻酸钙-T15 凝胶珠与结冷胶-T15 凝胶珠都在各自的最优发酵条件下进行发酵, 每批次产酸量均高于游离菌 T15 产酸量。以悬浮培养和海藻酸钙-T15 凝胶珠细胞循环连续发酵为对照, 结冷胶-T15 凝胶珠效价约为 0.62 g/g, D-LA 平均产率为 (1.42 ± 0.14) g/(L·h), 平均每批次 D-乳酸产量为 (72.90 ± 2.79) g/L, 较海藻酸钙固定化 T15 凝胶珠(海藻酸钙-T15 凝胶珠)产量提高了 33.85%,

较游离 T15 悬浮培养提高了 37.70% (图 5)。结果表明, 以结冷胶为固定化载体固定化乳杆菌 T15 并利用葡萄糖发酵产 D-乳酸效果最佳, 并为后续利用玉米秸秆酶解液作为发酵基质进行细胞循环连续发酵产 D-乳酸提供了理论依据。

2.6 以玉米秸秆酶解液为发酵基质进行 10 批次细胞循环连续发酵产 D-乳酸及测定

利用玉米秸秆酶解液作为发酵基质, 使用结冷胶-T15 凝胶珠循环发酵 10 批次。以游离菌 T15 发酵为对照, 结果表明结冷胶-T15 凝胶珠循环发酵总 D-LA 产酸为 419.51 g, 平均糖酸转化率为 $(66.59\%\pm 1.45\%)$, 且每批次平均产量均高于游离菌发酵 29.60%–67.51%, 同时在 10 批次循环后凝胶珠磨损率均保持在 5%以下, 表明其仍具有后续进一步发酵的潜力(图 6, 表 3)。

3 讨论

本实验选用结冷胶作为 *L. bulgaricus* T15 的固定化材料, 制备了结冷胶-T15 凝胶珠, 结

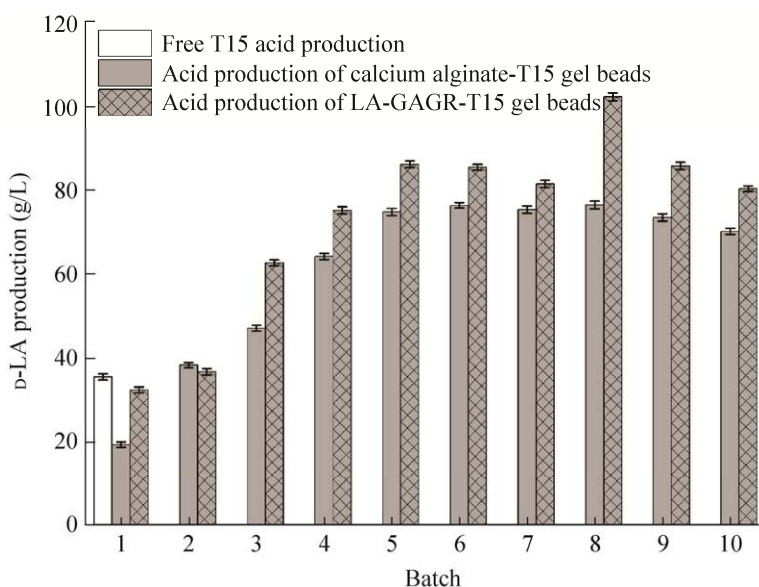


图 5 以葡萄糖为发酵基质进行 10 批次细胞循环连续发酵产酸及测定

Figure 5 Ten batches of continuous cell-recycled fermentation using glucose as substrate.

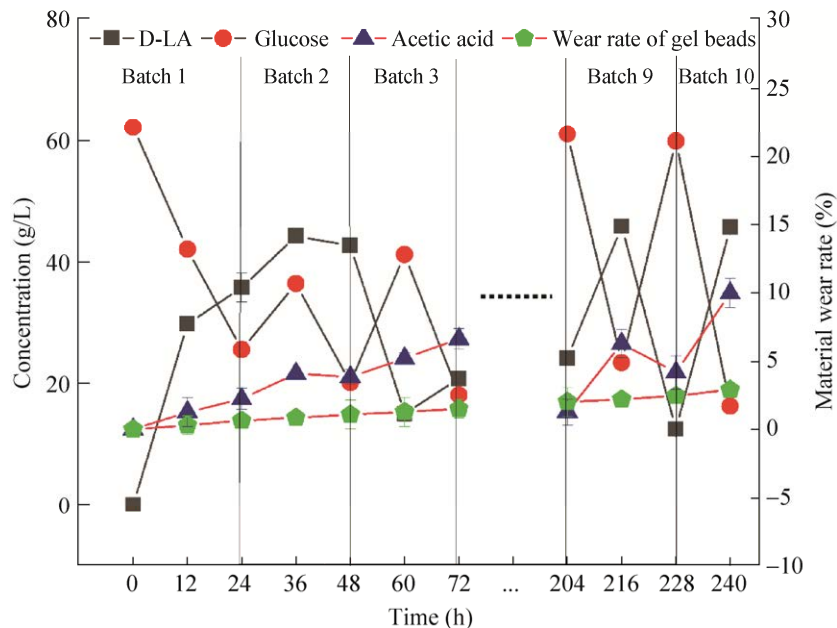


图 6 结冷胶-T15 凝胶珠利用玉米秸秆酶解液作为发酵基质进行细胞循环连续发酵

Figure 6 Continuous cell-recycled fermentation using LA-GAGR-T15 gel beads and corn straw enzymatic hydrolysate as substrate.

表 3 结冷胶-T15 凝胶珠利用玉米秸秆酶解液作为发酵基质进行细胞循环连续发酵主要参数

Table 3 Main parameters of continuous cell-recycled fermentation using LA-GAGR-T15 gel beads and corn straw enzymatic hydrolysate as substrate

Materials	Batch	Substrate	Titer (g/L)	Yield (g/g)	D-LA productivity (g/(L·h))	Acetic acid productivity (g/(L·h))
Free strain	1	Corn straw	27.42±1.24	0.37	1.14	0.12
LA-GAGR	1	Corn straw	35.84±2.37	0.58	1.49	0.09
LA-GAGR	2	Corn straw	42.78±0.54	0.61	1.78	0.15
LA-GAGR
LA-GAGR	9	Corn straw	45.93±1.29	0.64	1.91	0.26
LA-GAGR	10	Corn straw	45.77±0.33	0.62	1.90	0.41

“...” indicates ellipsis.

冷胶凝胶珠直径平均在 2.50 mm 左右, 横截面积均约为 4.91 mm², 对照组海藻酸钙凝胶珠断裂应力为 40.73 kPa, 而结冷胶凝胶珠断裂应力为 91.68 kPa, 较海藻酸钙凝胶珠提高了 125.12%, 说明结冷胶机械强度要优于海藻酸钙凝胶珠, 试验制备的凝胶珠性质与陈青等^[32]研究结果一致, 说明其在发酵过程中所受产生的外力影响更小, 凝胶珠或菌种在发酵过程中的损失也更小, 鉴于其对菌种的保护作用优于海

藻酸钙凝胶珠, 我们认为其更适合作为乳杆菌 T15 的固定化载体。

试验以游离 T15 与海藻酸钙-T15 凝胶珠为对照, 发现结冷胶-T15 凝胶珠细胞循环连续发酵产 D-乳酸分别是对照组的 2.89 倍和 2.16 倍。与 Roukas 等^[33]、徐阳等^[34]利用海藻酸钙对乳酸杆菌固定化发酵产酸结果一致。与 2018 年韩文静等^[35]对保加利亚乳杆菌发酵产酸量相比, 海藻酸钙与结冷胶固定化发酵, D-乳酸产量提高了

50%–60%左右,与2019年肖雨^[36]使用海藻酸钙固定化保加利亚乳杆菌产酸量接近。本研究的凝胶珠使用批次高于近3年利用葡萄糖或其他材料作为碳源进行发酵产乳酸的研究(表1)。连续发酵的第1–2批次,发酵的产酸量略低,可能是由于菌种尚处于对新环境的适应期,在10个批次的发酵产酸过程中,结冷胶-T15凝胶珠产酸量明显优于海藻酸钙-T15凝胶珠,其原因可能是结冷胶的高机械强度、低磨损率和合适的孔径,说明结冷胶更适合作为菌株T15的固定化材料。

4 结论

本研究建立了海藻酸钙、结冷胶固定化细胞循环发酵产D-乳酸的发酵工艺。海藻酸钙-T15凝胶珠发酵10批次,平均产酸量达(76.53±2.24) g/L,较游离菌发酵产酸提高了35.5%。结冷胶-T15凝胶珠发酵10批次,平均产酸量为(102.42±2.79) g/L,较海藻酸钙固定化T15凝胶珠(海藻酸钙-T15凝胶珠)产量提高了33.85%,较游离T15悬浮培养提高了37.70%。利用玉米秸秆酶解液为发酵基质,结冷胶-T15凝胶珠循环发酵240 h, D-乳酸总产量为419.55 g, D-乳酸产率为(1.74±0.79) g/(L·h)。本研究为固定化细胞循环发酵产D-乳酸的工业生产提供了基础数据,也为玉米秸秆生物炼制D-乳酸提供了新的途径。

REFERENCES

- [1] 徐阳. 海藻酸钙固定化乳酸菌及其发酵降解大豆分离蛋白的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2020.
XU Y. Immobilization of *Lactobacillus* by calcium alginate and its fermentation degradation of soybean protein isolate[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [2] 邵莲月. 玉米秸秆NaOH-Urea预处理及发酵生产D-乳酸初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2021.
SHAO LY. A preliminary study on pretreatment of corn stover via NaOH-urea and fermentation production of D-lactic acid[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [3] ABDEL-RAHMAN MA, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 877-902.
- [4] 于波, 曾艳, 姜旭, 王丽敏, 马延和. 聚合级L-乳酸的非粮生物质发酵研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 411-421.
YU B, ZENG Y, JIANG X, WANG LM, MA YH. Trends in polymer-grade L-lactic acid fermentation by non-food biomass[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(4): 411-421 (in Chinese).
- [5] 姜绍通, 郑志, 朱羽, 吴学风, 潘丽军, 罗水忠, 杜威. 无载体固定化米根霉重复间歇发酵生产L-乳酸[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(10): 1729-1733.
JIANG ST, ZHENG Z, ZHU Y, WU XF, PAN LJ, LUO SZ, DU W. Repeated intermittent L-lactic acid fermentation technology by self-immobilized *Rhizopus oryzae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(10): 1729-1733 (in Chinese).
- [6] JAHAN MS, HARIS F, RAHMAN MM, SAMADDAR PR, SUTRADHAR S. Potassium hydroxide pulping of rice straw in biorefinery initiatives[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 219: 445-450.
- [7] SCHROEDTER L, STREFFER F, STREFFER K, UNGER P, VENUS J. Biorefinery concept employing *Bacillus coagulans*: LX-lignin and L-(+)-lactic acid from lignocellulose[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1810.
- [8] 李中. 基于甘油和乳酸的体外合成生物学研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2018.
LI Z. Study on in vitro synthetic biology based on glycerol and lactic acid[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2018 (in Chinese).
- [9] 姜珊. 利用木质纤维素高温生产乳酸的研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2019.
JIANG S. High temperature production of lactic acid from lignocellulose[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [10] 王胜锋, 黄毅, 廖芬艳, 曾红宇, 许岗. 酶法催化转

- 化乳酸生产D-丙氨酸[J]. 中国新技术新产品, 2019(4): 5-7.
- WANG SF, HUANG Y, LIAO FY, ZENG HY, XU G. Enzymatic conversion of lactic acid to produce D-alanine[J]. *New Technology & New Products of China*, 2019(4): 5-7 (in Chinese).
- [11] 陈浩. 利用廉价生物质生产L-乳酸[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2020.
- CHEN H. L-lactic acid production using cheap biomass[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2020 (in Chinese).
- [12] 宋云皓. 内蒙古自治区东部地区玉米秸秆微贮菌剂的开发及利用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2018.
- SONG YH. Exploitation and utilization of corn stalks silage agents in the eastern part of Inner Mongolia autonomous region[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [13] 陈建伟. 副干酪乳杆菌HD1.7的固定化方法及条件的优化[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学硕士学位论文, 2009.
- CHEN JW. Optimization of immobilization methods and conditions of *Lactobacillus paracasei* HD1.7[D]. Harbin: Master's Thesis of Helongjiang University, 2009 (in Chinese).
- [14] 徐伟. 微波诱变乳酸高产菌选育及淀粉废水发酵制乳酸工艺研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2010.
- XU W. Study on the breeding of high lactic acid producing strain by microwave mutagenesis and the fermentation production of lactic acid from starch wastewater[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2010 (in Chinese).
- [15] DJUKIĆ-VUKOVIĆ AP, MOJOVIĆ LV, JOKIĆ BM, NIKOLIĆ SB, PEJIN JD. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 454-458.
- [16] 李绍壮, 林建平, 卢英华, 李学梅, 姚恕, 岑沛霖. 三相流化床中固定化米根霉萃取发酵生产L-乳酸[J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 252-257.
- LI SZ, LIN JP, LU YH, LI XM, YAO S, CEN PL. Extractive L lactic acid fermentation with immobilized *rizopus oryzae* in a three phase fluidized bed[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, 13(3): 252-257. (in Chinese).
- [17] 仲松. 固定化乳酸菌发酵产L-乳酸的研究与应用[D]. 芜湖: 安徽工程大学硕士学位论文, 2011.
- ZHONG S. Immobilized *Lactobacillus* fermentation L-lactic acid study and application[D]. Wuhu: Master's Thesis of Anhui Polytechnic University, 2011 (in Chinese).
- [18] 包永华. 乳酸菌液芯胶囊固定化技术及其模拟酸奶连续发酵的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2006.
- BAO YH. Study on encapsulation of lactic acid bacteria in liquid-core capsules by immobilization technique and simulation for continuous fermentation of yoghurt[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [19] YEN HW, LEE YC. Production of lactic acid from raw sweet potato powders by *Rhizopus oryzae* immobilized in sodium alginate capsules[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(2): 607-615.
- [20] CORBO MR, BEVILACQUA A, SPERANZA B, DI MAGGIO B, GALLO M, SINIGAGLIA M. Use of alginate beads as carriers for lactic acid bacteria in a structured system and preliminary validation in a meat product[J]. *Meat Science*, 2016, 111: 198-203.
- [21] 孙欣. 吸附与包埋技术固定化乳酸菌及其性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2007.
- SUN X. Immobilization of *Lactobacillus* based on adsorption and microencapsulation technology and study of the properties of the immobilized *Lactobacillus*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 (in Chinese).
- [22] GARBAYO I, VÍLCHEZ C, VEGA JM, NAVA-SAUCEDO JE, BARBOTIN JN. Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in calcium alginate gel beads[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(23): 1825-1827.
- [23] RUFATO KB, SOUZA PR, de OLIVEIRA AC, BERTON SBR, SABINO RM, MUNIZ EC, POPAT KC, RADOVANOVIC E, KIPPER MJ, MARTINS AF. Antimicrobial and cytocompatible chitosan, N, N, N-trimethyl chitosan, and tanfloc-based polyelectrolyte multilayers on gellan gum films[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 183: 727-742.
- [24] NOVAC O, LISA G, PROFIRE L, TUCHILUS C, POPA MI. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with

- potential dermal applications[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2014, 35: 291-299.
- [25] RADOSAVLJEVIĆ M, LEVIĆ S, BELOVIĆ M, PEJIN J, DJUKIĆ-VUKOVIĆ A, MOJOVIĆ L, NEDOVIĆ V. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(2): 315-322.
- [26] SHAHRI SZ, VAHABZADEH F, MOGHAREI A. Lactic acid production by loofah-immobilized *Rhizopus oryzae* through one-step fermentation process using starch substrate[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(2): 333-345.
- [27] DOSUKY AS, ELSAYED TR, YOUSEF ET, BARAKAT OS, NASR NF. Isolation, identification, and application of lactic acid-producing bacteria using salted cheese whey substrate and immobilized cells technology[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2022, 20(1): 26.
- [28] BAHRY H, ABDALLA R, PONS A, TAHA S, VIAL C. Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus Rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 306: 81-88.
- [29] BASTARRACHEA LJ, BRITT DW, WARD RE, DEMIRCI A. Development of bioactive solid support for immobilized *Lactobacillus casei* biofilms and the production of lactic acid[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(1): 217-226.
- [30] 肖雨, 王刚, 于潇潇, 张明磊, 王希庆, 张洁静, 刘娟, 张斯童, 苏英杰, 李艳丽, 陈光. 保加利亚乳杆菌微胶囊化工艺研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(6): 654-658.
XIAO Y, WANG G, YU XX, ZHANG ML, WANG XQ, ZHANG JJ, LIU J, ZHANG ST, SU YJ, LI YL, CHEN G. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2018, 30(6): 654-658 (in Chinese).
- [31] SHAO L, CHEN H, LI Y, LI J, CHEN G, WANG G. Pretreatment of corn stover via sodium hydroxide-urea solutions to improve the glucose yield[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123191.
- [32] 陈青, 周涛涛, 程红梅, 韩晓祥. 低酰基/高酰基复合酸性结冷胶凝胶的凝胶特性研究[J]. *农业机械学报*, 2020, 51(6): 360-365.
CHEN Q, ZHOU TT, CHENG HM, HAN XX. Gelation properties of low acyl and high acyl mixed acid gellan gels[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(6): 360-365 (in Chinese).
- [33] ROUKAS T, KOTZEKIDOU P, 陈力力. 用固定化乳酸菌发酵乳浆生产乳酸[J]. *生物技术*, 1991, 1(5): 47-48.
ROUKAS T, KOTZEKIDOU P, CHEN LL. Production of lactic acid from fermented milk by immobilized lactic acid bacteria [J] *Biotechnology*, 1991, 1 (5): 47-48 (in Chinese).
- [34] 徐阳, 陈中, 刘秉杰. 海藻酸钙固定化鼠李糖乳杆菌 LR-D的条件优化[J]. *食品科技*, 2019, 44(11): 1-8.
XU Y, CHEN Z, LIU BJ. Optimization of conditions for immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* LR-D with calcium alginate[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(11): 1-8 (in Chinese).
- [35] 韩文静, 梁颖超, 陶进, 张广昊. 产D-乳酸的德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵工艺研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(7): 4-5, 9.
HAN WJ, LIANG YC, TAO J, ZHANG GH. Production technology of D-lactic acid from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(7): 4-5, 9 (in Chinese).
- [36] 肖雨. 保加利亚乳杆菌诱变育种及玉米秸秆同步糖化发酵产D-乳酸工艺研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2019.
XIAO Y. Research on mutagenesis breeding of *Lactobacillus bulgaricus* and D-lactic acid production by simultaneous saccharification of corn stover[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)