

硫酸锌($ZnSO_4$)对米根霉发酵产乳酸的影响

葛春梅, 潘仁瑞, 张洁, 蔡敬民, 余增亮

合肥学院生物与环境工程系, 合肥 230022

摘要: 【目的】为了了解无机盐与米根霉 L-乳酸代谢之间的关系, 提高米根霉菌株 RLC41-6 发酵产 L-乳酸的产率与质量, 研究了 $ZnSO_4$ 浓度与菌株乳酸代谢和细胞内乳酸脱氢酶活性的关系。【方法】在米根霉培养基中加入不同浓度 $ZnSO_4$, 经过 36℃ 培养 36 h 后, 应用 HPLC-反相色谱法测定产物中的 L-乳酸含量, 并利用活性 PAGE 分析法测定细胞内乳酸脱氢酶的活性和组成。【结果】实验结果显示, $ZnSO_4$ 对除 LDH_1 之外的其它几条同工酶都有促进作用, 尤其对 LDH_4 , LDH_5 作用明显, 当 $ZnSO_4$ 浓度大于 0.02% 时, LDH_4 , LDH_5 达到最大水平, 同时高浓度的锌离子在体外抑制了 LDH 的活性。当 $ZnSO_4$ 浓度为 0.02% 时 LDH 酶活达到最大 200 U/mL, HPLC 图谱表明, 此时发酵产物的只有 L-乳酸, 且产量达到最大 137g/L, 乳酸转化率为 91%。【结论】 Zn^{2+} 会影响米根霉的乳酸代谢过程, 并导致发酵过程中产物类型的变化, 合适浓度的 $ZnSO_4$ 在米根霉代谢产乳酸的过程中, 提高了乳酸脱氢酶 LDH 的表达, 抑制丙酮酸进入苹果酸和富马酸途径, 从而有利于提高葡萄糖到乳酸的代谢。

关键词: L-乳酸, 米根霉, HPLC, 乳酸脱氢酶, $ZnSO_4$

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)05-0515-06

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, 骨固定及修复材料及其它组织工程用材料等^[1]。

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。米根霉通过 EMP 途径转化葡萄糖为丙酮酸, 丙酮酸在细胞内有四种去向: 一是通过丙酮酸脱羧酶和醇脱氢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; 四是丙酮酸进入三羧酸循环^[2-3]。欲提高 L-乳酸的产量, 就必须降低丙

酮酸流入乙醇支路、草酰乙酸等支路的流量, 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, 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。Thitiprasert S 等^[4]在米根霉发酵过程中加入醇脱氢酶抑制剂, 发现更少的丙酮酸转化为乙醇, 获得更多的乳酸。

根霉发酵类型是同型还是异型除了主要决定于菌种特性外, 也与发酵条件相关。白冬梅等^[5]通过代谢通量分析, 得出米根霉利用葡萄糖转化为乳酸的理论转化率为 98.2%。在发酵过程中, 合适的无机盐浓度, 能够提高乳酸的产量, 抑制富马酸等杂酸的产生。Yao W 等^[6]采用均匀设计的方法, 研究了

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (KJ2012A249); 安徽省微生物学重点学科

作者简介: 葛春梅 (1978-), 女, 安徽亳州人, 副教授, 博士, 研究方向为应用微生物。E-mail: gecm@hfu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-14; **修回日期:** 2012-12-27

葡萄糖,牛粪粗蛋白, ZnSO_4 , MgSO_4 , KH_2PO_4 五因素与乳酸产量之间的关系,得出 ZnSO_4 对乳酸产量的影响最大。潘丽君等^[7]研究了锌、镁离子对米根霉的代谢调控,显示 Zn^{2+} 对乙醇脱氢酶(ADH)有强烈的激活作用,但抑制 LDH 活性。徐志南^[8]在研究培养条件对米根霉 LDH 的影响时发现,在添加 CaCO_3 的培养基中, Zn^{2+} 能够提高 LDH 的比活力。

为了提高米根霉代谢产 L-乳酸的产量,作者研究了多种无机盐与乳酸代谢之间的关系,本文主要探讨 ZnSO_4 浓度与米根霉乳酸代谢及乳酸脱氢酶表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 甲醇,色谱纯,美国 TEDIA; L-乳酸,苹果酸,富马酸, NAD^+ , Sigma 公司; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT), 甲硫吩嗪(PMS), Acr-Bis, Tris-HCl, 过硫酸铵, TEMED, 甘氨酸, 上海生工生物工程有限公司; 其他试剂国药集团化学试剂有限公司。Waters 600 液相色谱, 996PDA 检测器; Phenomenex Luna C_{18} 柱; SBA40C 葡萄糖乳酸分析仪, 山东省科学研究院; 普析通用 TU-1901 紫外可见分光光度计。

1.1.2 菌种: 米根霉 *Rhizopus oryzae* RLC41-6 (以 PW352 为出发菌株,经离子辐射育种筛选得到)^[9]。

1.1.3 培养基: (1) 产孢子培养基:改进 PDA 培养基(L), 土豆 600 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加 CaCO_3 1 g; (2) 种子培养基:葡萄糖 10%, 无机盐, pH6.8, CaCO_3 (单独灭菌); (3) 发酵培养基:葡萄糖 15%, 无机盐, pH6.8, CaCO_3 5% (单独灭菌)。

1.2 培养方法

1.2.1 斜面培养: 36°C , 4-7 d。

1.2.2 液体种子培养: 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,使培养初的孢子浓度在 1.0×10^6 个孢子/mL,置于 36°C , 200 r/min, 振荡培养 12 h。

1.2.3 发酵培养: 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 发酵培养基,并将培养好的种子液按 4% 的量接种到发酵培养基中,于 36°C , 200 r/min 振荡培养 36 h。

1.3 分析方法

1.3.1 发酵液中 L-乳酸的定性测定: 反相-HPLC

检测^[10]: Luna C18 3.9 nm \times 300 nm, 流动相, 甲醇:水:磷酸(10-90-0.3), 流速:0.8 mL/min, 柱温, 25°C , 检测波长 210 nm。

1.3.2 发酵液中 L-乳酸的定量测定: EDTA 滴定法, SBA40C 酶电极法^[11-12]。

1.3.3 乳酸脱氢酶(LDH)活力的测定及乳酸脱氢酶(LDH)电泳染色: 方法参照文献[13]进行。

2 结果和分析

2.1 ZnSO_4 浓度与发酵 L-乳酸纯度的关系

锌是许多酶的辅助因子,硫是半胱氨酸和蛋氨酸等氨基酸的组成成分,也是辅酶因子的组成成份。实验过程中通过添加不同浓度的 ZnSO_4 , 考察它对米根霉发酵产酸的影响。图 1 为不同浓度 ZnSO_4 的培养液培养菌株 RLC41-6 发酵 36 h 时产物的 HPLC 图。从图片中可以看出, ZnSO_4 浓度为 0.005% 时, 发酵产物中有苹果酸和少量的未知杂酸, L-乳酸产量通过滴定法及酶电极法测得为 84 g/L。随着 ZnSO_4 浓度的增加, 苹果酸等杂酸开始减少, 当浓度达到 0.015% - 0.02% 时, 杂酸基本上为零, 而乳酸的产量达到最大, 为 137g/L。当 ZnSO_4 浓度小于 0.02% 时, 发酵液中未检测到富马酸, 而浓度高于 0.02% 时, 发酵过程中又产生了富马酸和另一种未知杂酸。

RLC41-6 在含不同初浓度 ZnSO_4 的培养基中发酵, 产物的 HPLC 图如图 1, 对 HPLC 图中各种有机酸的洗脱峰进行面积积分, 积分面积和各种有机酸的含量成正比关系。以 ZnSO_4 浓度为横坐标, 色谱图中各产物的积分面积为纵坐标, 结果如图 2 所示, 当 ZnSO_4 浓度在 0.02% 时, 该菌株产 L-乳酸的量最高, 且无其他杂酸。低浓度的 ZnSO_4 , 发酵所产的 L-乳酸洗脱峰由于和苹果酸等物质的洗脱峰没有很好的分开, 不能反映出乳酸的产量。通过 EDTA 滴定法, 及酶电极法, 测得浓度在 0.005% 时, L-乳酸产量为 84g/L。在 ZnSO_4 浓度达到 0.025% 以后, 发酵液中除了乳酸外, 还含有较多的富马酸。

2.2 ZnSO_4 与乳酸脱氢酶活性及与 L-乳酸产量三者之间的关系

用含不同浓度 ZnSO_4 的发酵培养基, 培养米根霉菌株 RLC41-6, 考察它对发酵产乳酸及 LDH 代谢的影响, 结果如图 3。当 ZnSO_4 浓度为 0.005% 时,

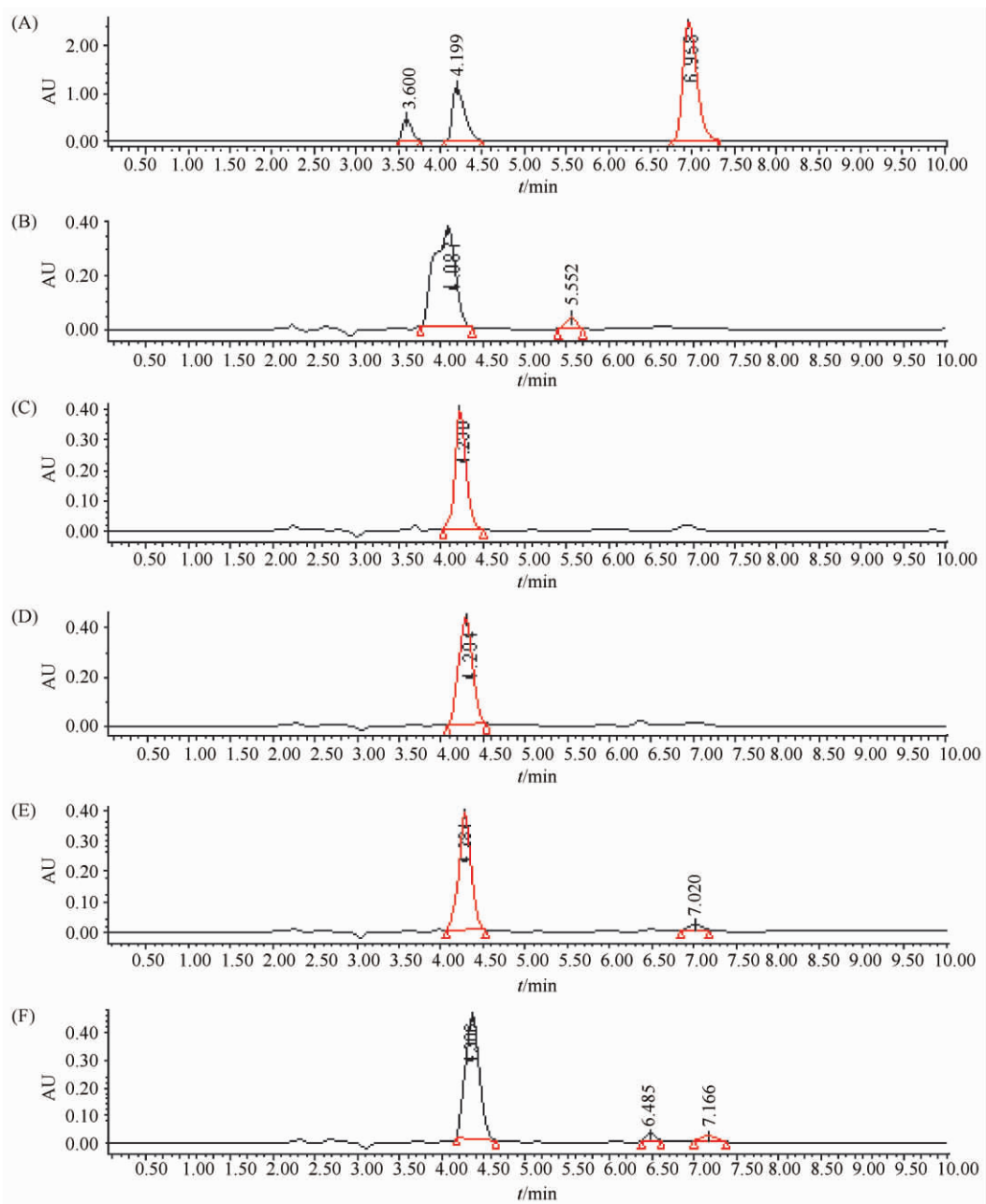


图 1. RLC41-6 发酵产物的 HPLC 分析

Figure 1. HPLC analysis of fermentation broth of RLC41-6. A: Standard HPLC chart, from left to right, malic acid, L-lactic acid, fumaric acid; B: 0.005% $[ZnSO_4]$, from left to right, malic acid and L-lactic acid, unknown acid 1; C: 0.015% $[ZnSO_4]$, L-lactic acid; D: 0.020% $[ZnSO_4]$, L-lactic acid; E: 0.025% $[ZnSO_4]$, from left to right, L-lactic acid, fumaric acid; F: 0.035% $[ZnSO_4]$, from left to right, L-lactic acid, unknown acid 2, fumaric acid.

菌株产 L-乳酸仅为 84 g/L, 当 $ZnSO_4$ 浓度为 0.02% 时, 产 L-乳酸达到 137 g/L。LDH 的活力也随着发酵液中 $ZnSO_4$ 浓度的改变出现和 L-乳酸相同的趋势。在 $ZnSO_4$ 浓度很低时, LDH 的活性很低, 当 $ZnSO_4$ 浓度为 0.02% 时, LDH 的活性处于最大值为 199 U/mL, 随后 LDH 活性降低, 当 $ZnSO_4$ 浓度大于

0.025% 时, LDH 活力变化不大。

我们在体外研究了 $ZnSO_4$ 对 LDH 活性的影响, 发现浓度低于 0.025% $ZnSO_4$ 对 LDH 活性没有影响, 高于 0.025% $ZnSO_4$ 对 LDH 活性有一定的抑制作用。这说明 $ZnSO_4$ 在米根霉代谢过程中, 主要通过影响 LDH 的表达量来调节乳酸的代谢过程。

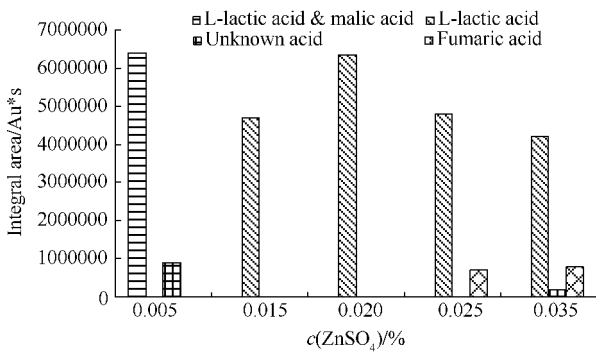


图 2. ZnSO₄ 浓度对 RLC41-6 发酵产物的影响

Figure 2. Effect of ZnSO₄ concentration on products of RLC41-6 fermentation.

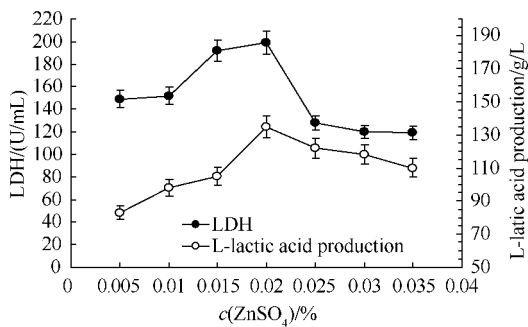


图 3. ZnSO₄ 浓度对 L-乳酸发酵及 LDH 活性的影响

Figure 3. Effect of ZnSO₄ concentration on L-lactic acid and activities of LDH.

2.3 ZnSO₄ 对 RLC41-6 发酵产 LDH 同工酶组成和表达的影响

培养基中 ZnSO₄ 浓度的变化, 在细胞代谢过程也引起了 RLC41-6 发酵产 LDH 表达的变化, 结果如图 4 所示, 从图片中可以看出 ZnSO₄ 浓度对 LDH 的

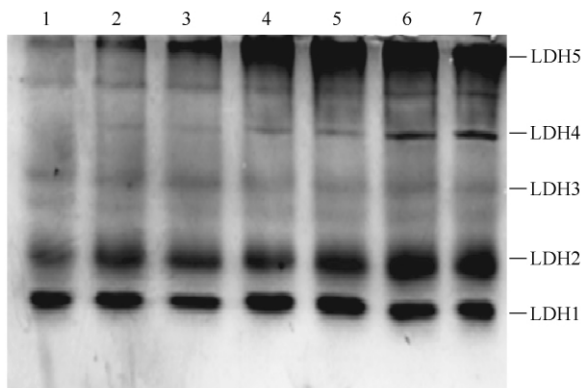


图 4. ZnSO₄ 浓度对 LDH 同工酶的影响

Figure 4. Effect of ZnSO₄ concentration on LDH isoenzymes. Lane 1, [ZnSO₄] 0.005%; lane 2, [ZnSO₄] 0.01%; lane 3, [ZnSO₄] 0.015%; lane 4, [ZnSO₄] 0.02%; lane 5, [ZnSO₄] 0.025%; lane 6, [ZnSO₄] 0.03%; lane 7, [ZnSO₄] 0.035%.

表达产生明显的影响, 随着培养基中 ZnSO₄ 浓度的增加, LDH 的表达量也随着增加, 从 LDH 各个同工酶的条带来看, ZnSO₄ 对除 LDH₁ 之外的其它几条同工酶都有作用, 尤其对 LDH₅ 作用明显, 在 Zn²⁺ 浓度为 0.02% - 0.025%, LDH₅ 表达量最大。

3 结论

在培养基中添加不同浓度的 ZnSO₄, 对米根霉发酵产酸造成较大的影响。不同的锌离子会影响米根霉的代谢过程, 造成发酵产物种类的变化。ZnSO₄ 通过影响乳酸脱氢酶的表达, 影响丙酮酸的代谢流向。ZnSO₄ 浓度过高或过低时, 丙酮酸代谢进入乳酸的通路被降低, 产生较多的苹果酸和富马酸, 0.02% ZnSO₄ 培养米根霉菌株 RLC41-6, 发酵产物的 HPLC 的图谱中只有 L-乳酸且产量达到最大 137 g/L, 乳酸转化率为 91%。

参考文献

- [1] Chen D, Wang J, Bo Y. Survey of synthesis of lactic esters and its derivatives. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2002, 21 (4): 243-246. (in Chinese)
- [2] 陈丹云, 王敬平, 柏艳. 乳酸酯及其衍生物的合成研究进展. *化工进展*, 2002, 21 (4): 243-246.
- [3] Meussen B, Graaff L, Sanders JM, Weusthuis R. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94 (4): 875-886.
- [4] He H, Li S, Xu Q, Fu Y, Huang H. The study of enzymatic activity of mutant strain *Rhizopus oryzae* with L-malic acid accumulation. *Microbiology*, 2009, 36 (3): 316-319. (in Chinese)
- [5] 何皓, 李霜, 徐晴, 付永前, 黄和. 积累 L-苹果酸的米根霉突变株酶活性初探. *微生物学通报*, 2009, 36 (3): 316-319.
- [6] Thitiprasert S, Sooksai S, Thongchul N. In vivo regulation of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae* to improve L-lactic acid fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164 (8): 1305-1322.

- [5] Bai D, Fu W, Zhao X, Dai H, Li X, Xu S. Optimization of L (+)-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae* R1021 by metabolic flux analysis. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21 (6) : 554-558. (in Chinese)
白冬梅, 付卫明, 赵学明, 代海霞, 李鑫钢, 徐世民. 代谢通量分析优化米根霉 R1021 发酵生产 L-乳酸过程. 无锡轻工大学学报, 2002, 21 (6) : 554-558.
- [6] Yao W, Zhu J, Sun B, Miller C. Development and optimization of a culture medium for L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using crude protein from dairy manure as nitrogen source. *Journal of Environmental Science and Health - Part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2009, 44 (12) : 1306-1313.
- [7] Pan L, Fu P, Zheng Z, Luo S, Jiang S. Screening of a low alcohol dehydrogenase activity mutant of *Rhizopus oryzae* and the regulation of Zn^{2+} and Mg^{2+} . *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46 (4) : 586-590. (in Chinese)
潘丽军, 付萍, 郑志, 罗水忠, 姜绍通. 米根霉乙醇脱氢酶突变株的筛选及其锌镁离子的调控研究. 微生物学报, 2006, 46 (4) : 586-590.
- [8] Xu Z. Effects of culture conditions on dehydrogenase activity and product composition with *Rhizopus oryzae*. *Journal of Zhejiang University*, 2003, 37 (6) : 743-747. (in Chinese)
徐志南. 米根霉培养条件对脱氢酶活力和产物组成的影响. 浙江大学学报, 2003, 37 (6) : 743-747.
- [9] Zhou X, Ge C, Yao J, Pan R, Yu Z. Optimization of L-lactic acid production of *Rhizopus Oryzae* mutant RLC41-6 by ion beam implantation at low-energy. *Plasma Science and Technology*, 2005, 7 (5) : 3078-3080.
- [10] Bai D, Zhao X, Hu Z. Determination of organic acid in lactic acid fermentation broth of *Rhizopus oryzae* by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Industrial Microbiology*, 2001, 31 (1) : 8-11. (in Chinese)
白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 应用 HPLC-反相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中的有机酸. 工业微生物, 2001, 31 (1) : 8-11.
- [11] Fan Y, Wang L, Liu D, Li W, Yang Y, Zheng Z, Yu Z. Studies on analytical methods of lactic acid content in fermentation broth. *Biotechnology*, 2007, 17 (1) : 54-55. (in Chinese)
樊永红, 王丽, 柳丹, 李文, 杨英歌, 郑之明, 余增亮. 米根霉发酵液中乳酸含量的测定方法研究. 生物技术, 2007, 17 (1) : 54-55.
- [12] Sun S, Yang J, Zhang L, Yang Y, Shi J, Liu C. Determination of L-lactic acid in malolactic fermentation solution with enzyme electrode. *Shandong Science*, 2009, 22 (3) : 7-10. (in Chinese)
孙士青, 杨俊慧, 张利群, 杨艳, 史建国, 刘长胜. 酶电极法检测苹果酸-乳酸发酵过程中乳酸变化, 山东科学, 2009, 22 (3) : 7-10.
- [13] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 袁明秀, 陈丽蓉, 陈雅蕙, 陈来同. 生化实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994: 354-358.

Effect of ZnSO₄ on L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*

Chunmei Ge^{*}, Renrui Pan, Jie Zhang, Jingmin Cai, Zengliang Yu

Department of Biology & Environment Engineering, Hefei College, Hefei 230022, China

Abstract: [Objective] To improve the yield and quality of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*, we aim to understand the relationship between inorganic salts utilization and the L-lactic acid metabolism of the strain RLC41-6, through systematic analysis of the effects of zinc ion concentration on the production of L-lactic acid and the Lactic Dehydrogenase (LDH) activity. [Methods] *Rhizopus oryzae* was cultured at 36°C for 36h with different quantity of ZnSO₄ in fermentation medium. The fermentation products were monitored by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), LDH isoenzyme composition in the cell was analysed by non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). [Results] Our results showed that the concentration of ZnSO₄ in medium could modulate the expression of LDH isoenzyme except LDH₁, especially stimulated the expression of LDH₄ and LDH₅. When initial concentration of ZnSO₄ is above 0.02%, the LDH₄ and LDH₅ reached the highest level. However, the activity of LDH was inhibited by higher concentration zinc ion in extracellular environment. When ZnSO₄ concentration is 0.02%, LDH activity reaches its maximum 200U/mL, the HPLC assay showed only L-lactic in the fermentation products (137 g/L), while the conversion rate of glucose to lactic acid is 91%. [Conclusion] Zinc ion can regulate the metabolic processes of *Rhizopus oryzae* and modulate the types of the final fermentation products. An optimal concentration of ZnSO₄ can not only facilitate the LDH expression but also prevent pyruvate from transformation into the malic acid and fumaric acid during the metabolism process, thereby enhance the metabolism of glucose to lactic acid of *Rhizopus oryzae*.

Keywords: L-lactic acid, *Rhizopus oryzae*, HPLC, Lactic dehydrogenase, ZnSO₄

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Anhui education department (KJ2012A249) and by the Anhui Key Subject of Microbiology

^{*} Corresponding author. E-mail: gecm@hfu.edu.cn

Received: 14 November 2012/Revised: 27 December 2012

微生物学一直是生命科学中领先的学科

微生物学学科的研究对象决定了它有如下两方面的显著特点:

微生物作为最简单的生命体而成为生命科学研究不可替代的基本材料,由此也奠定了微生物学在生命科学中的基础地位;

微生物极其丰富的生物多样性决定了它们具有代谢产物多样性,同时又与人类、动植物和环境有着密切的相互作用,使得微生物学也成为应用领域里十分活跃的一门学科。

摘自《国家自然科学基金 1999 年度项目指南》