应用氧化还原电位调控拟干酪乳杆菌发酵产乳酸过程

张 泽，杭海峰，李晓雪，王永红*

（华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室，上海 200237）

摘要：在拟干酪乳杆菌分批发酵产乳酸过程中，通过自反馈的氧化还原电位控制系统改变通入空气和氮气的比例控制发酵液氧化还原电位（oxidation-reduction potential，ORP）于不同水平，研究了氧化还原电位对乳酸发酵过程中菌体生长和代谢的影响。较高的 ORP（通入 1.5 L/min 空气、-100 mV、-150 mV）条件下的菌体浓度是较低 ORP 时的（-200 mV、-300 mV、通入 1.5 L/min 纯氮）2 倍以上，且乳酸产量较高，但糖酸转化率较低。ORP 为-100 mV 时，乳酸产量最高，达到 153.00 g/L；ORP 为-200 mV 时，糖酸转化率最高，为 100.32%。最后分析了胞外 ORP 对胞内表征氧化还原状态的参数 NADH / NAD^+比值变化的影响，证实胞外 ORP 可通过影响胞内氧化还原状态，进而影响菌体代谢和乳酸合成，胞外 ORP 可作为乳酸发酵过程的有效调控参数。

关键词：拟干酪乳杆菌；氧化还原电位；乳酸；辅酶

中图分类号：TQ 920.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2012)10—1025—06

Effect of Oxidoreduction Potential on Lactic Acid Production by *Lactobacillus paracasei*

ZHANG Ze，*HANG Hai-feng*，*LI Xiao-xue*，*WANG Yong-hong**

（State Key Laboratory of Bioreactor Engineering，East China University of Science and Technology，Shanghai 200237，China）

Abstract：The aim of this research was to investigate the impact of extracellular oxidoreduction potential（ORP）on lactic acid production in batch culture by Lactobacillus paracasei. The ORP control was conducted by regulating the ratio of air flow rate to nitrogen flow rate in the inlet aeration of fermentor. As the results shown，the high ORP levels（the inlet air 1.5 L/min，-100mV，-150mV）resulted in higher lactic acid production but lower sugar-lactic acid conversion ratio，and the biomass was more than two times than that in the low ORP conditions（-200 mV，-300 mV，the inlet nitrogen 1.5 L/min）. The highest lactic acid production（153 g/L）was obtained at the ORP level of -100 mV. The highest lactic acid yield（100.3%）was obtained at ORP level of -200 mV. Further more，the impact of ORP on the intracellular redox potential（NAD^+/NADH）was investigated.

Keywords：*Lactobacillus paracasei*，redox potential，lactic acid，cofactor

收稿日期：2011-04-08

基金项目：国家 973 计划项目（2007CB714303）。

* **通信作者**：王永红（1966-），女，湖南桂阳人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物过程工程和生物反应器工程的研究。

E-mail：yhwang@ecust.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

乳酸是一种重要的有机酸，广泛应用于酿造、医药、食品、皮革、卷烟、印染、化工等领域[1-2]。乳酸的衍生产物聚乳酸(Poly Lactic Acid，PLA)，具有良好的生物可降解性，是聚苯乙烯塑料的最佳替代品。目前大多数可生物降解塑料仍处于研究或试生产阶段，但聚乳酸及其制品已商品化生产，这使得乳酸的市场前景良好，极大地促进了乳酸的生产[3]。

工业生产乳酸主要采用乳酸菌同型乳酸发酵法，葡萄糖通过糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnan Pathway，EMP)，转化为乳酸[4]。关于乳酸菌代谢的研究很多，但始终还没有形成对乳酸菌糖代谢和调控方式的综合性认识。乳酸菌代谢受糖运输、糖酵解通量、能量状态、胞内氧化还原平衡的影响，并可能在几个水平共同调控或者某一方面起主要作用[5]。

Bourel 等[6]认为每种微生物都有一个合适的 ORP 范围，在这个范围内微生物生长迅速或者产物积累较快。Snoep 等[7]发现在 *Enterococcus fuecalis* 中丙酮酸脱氢酶和丙酮酸甲酸裂解酶代谢流的分配与胞内辅酶 NAD^+/NADH 比例所代表的胞内稳态氧化还原状态有关。对于乳酸菌，其胞内代谢的很多反应及其调控是氧化还原型的，其胞内 NAD^+和 NADH 分别在底物分解过程中作为电子受体和为细胞提供还原力，它们氧化还原形式的平衡是合成和分解代谢连续进行的前提条件，因此可通过改变胞外氧化还原状态，研究其对胞内氧化还原状态的影响，从而观察对碳代谢流的影响。

由于缺乏合适的调控参数，厌氧和微通气发酵过程的优化相对较难。关于 pH 值、温度等对乳酸菌代谢影响相关的报道已经很多，也有把微量通气调控代谢流应用在乳酸发酵上[4]，但目前还没有把胞外氧化还原电位作为过程控制参数以优化乳酸菌细胞生理代谢功能、促进微生物合成乳酸的代谢流最大化方面的研究。针对微生物细胞的氧化还原状态，目前调节氧化还原电位的主要方法有：1)通过添加外源电子受体和不同氧化还原态底物等调节氧化还原电位[8]，这在工业上很难应用；2)通过通气策略来实现，这个技术简单方便，比较容易应用到工业生产上。因此作者采用本实验室研发的通过调节生物反应器进气中空气和氮气比例来调控 ORP 的自反馈氧化还原电位控制系统调节发酵液 ORP 于不同水平，研究了胞外氧化还原电位对拟干酪乳杆菌发酵产乳酸代谢过程的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

拟干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei*：作者所在实验室保藏。

1.2 培养基配方

种子培养基(g/L)：蛋白胨 10，葡萄糖 40，酵母膏 10，牛肉膏 6，硫酸镁 0.2，硫酸锰 0.2，氯化钠 0.03，硫酸亚铁 0.01，醋酸钠 4，柠檬酸二胺 2，磷酸二氢钾 2，碳酸钙 15；吐温-80 1 mL，NaOH 调 pH 6.0，葡萄糖 115 ℃灭菌 15 min，其他 121 ℃灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L)：蛋白胨 13.33，葡萄糖 200，酵母膏 13.33，硫酸镁 0.013 3，硫酸锰 0.013 3，氯化钠 0.013 3，硫酸亚铁 0.013 3，醋酸钠 0.67，NaOH 调 pH 6.0，葡萄糖 115 ℃灭菌 15 min，其他 121 ℃灭菌 15 min。

1.3 发酵

取一个新鲜茄瓶菌种斜面，将菌种细胞悬浮于 50 mL 无菌水，取悬浮液 15 mL 接于液体种子培养基(100 mL/250 mL 锥形瓶)，在 37 ℃、转速为 100 r/min 下培养 12 h。以体积分数 20%将种子液接入发酵培养基，2.5 L 发酵罐装液 1.5 L，搅拌转速 300 r/min，温度控制 37 ℃，用 25%氨水控制 pH 值为 6.0。

1.4 ORP 的控制策略

根据实验要求，采用作者所在实验室研发的自反馈的氧化还原电位控制系统[9]，见图 1。通过调节进气中空气与氮气比例控制发酵过程发酵液 ORP 于不同水平，分别为：全程通 1.5 L/min 空气、-100 mV、-200 mV、-300 mV、全程通 1.5 L/min 纯氮。

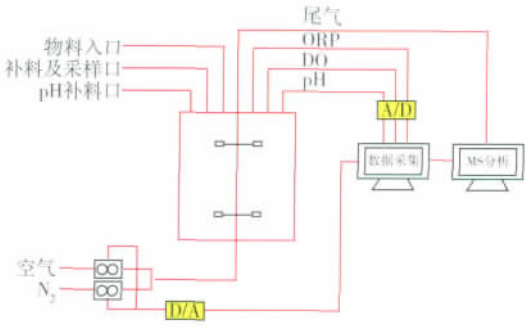


图 1 ORP 自控发酵系统参数检测与控制示意图

Fig.1 Schematic overview of the fermentor with oxidation-reduction potential detection and control system

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 分析方法

菌体生物量测定[10]：根据菌悬液在分光光度计620 nm处的吸光度与菌体干重的关系曲线，将吸光度转化为菌体干质量。

葡萄糖质量浓度测定：葡萄糖试剂盒，其测定原理为葡萄糖由葡萄糖氧化酶氧化成葡萄糖酸并产生过氧化氢，后者与苯酚及4-氨基安替比林在过氧化物酶作用下产生红色化合物，此化合物在505 nm波长处有吸收峰，测定其吸光度，计算出葡萄糖质量浓度。

乳酸、乙酸、丙酮酸等有机酸质量浓度的测定：使用高效液相色谱测定有机酸质量浓度。色谱仪：Agilent 1100（检测器：G1314A 紫外可见波长检测器；进样器：G1328A）；色谱柱：Metacarb-H plus column（300 mm×7.8 mm; Varian Inc., PaloAlto, CA）；流动相0.005 mol/L硫酸，流速0.4 mL/min，柱温50 ℃，进样量10 μL，检测波长210 nm。

辅因子NADH、NAD^+测定：利用酸碱法分别提取NAD^+和NADH，然后在紫外可见分光光度计波长570 nm酶循环法测定。

2 结果与分析

2.1 ORP的控制

从图2可看出，随着发酵的进行，所有ORP都很快达到初始设定的范围。初始设定的ORP值越低，达到控制条件所需要的时间相对越长。全程通空气时，前12小时ORP从-34 mV降低到-76 mV，12 h之后ORP又逐渐上升到-20 mV左右；全程通纯氮，ORP逐渐降低，并在4 h后维持在-450 mV~-400 mV。

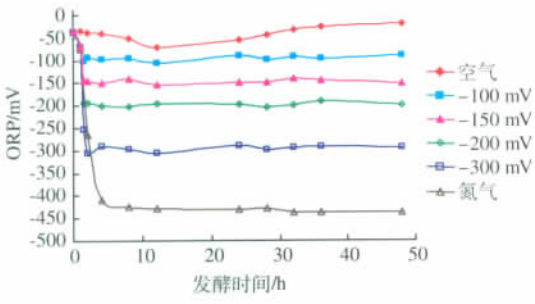


图2 乳酸发酵过程ORP随时间变化曲线

Fig.2 ORP time course in lactic acid fermentation

2.2 ORP对拟干酪乳杆菌生长和代谢的影响

2.2.1 ORP对拟干酪乳杆菌生长的影响 如图3所示，在5种控制条件下，拟干酪乳杆菌都经过较短的延滞期，很快进入对数生长期，相对较高的ORP（全程通空气、-100 mV和-150 mV）比相对较低ORP（-200 mV，-300 mV和通纯氮）有利于菌体生长，最终菌体浓度是较低ORP条件下的2倍以上；全程通空气和通纯氮时，菌体浓度分别为最大和最小；控制ORP于-150 mV时，前8小时菌体生长与ORP较低时的情况相似，而8 h后，菌体生长速率快速增加，并且在整个发酵过程菌体保持了一定的比生长速率，而其他控制条件下，24 h后菌体不再生长，进入稳定期。

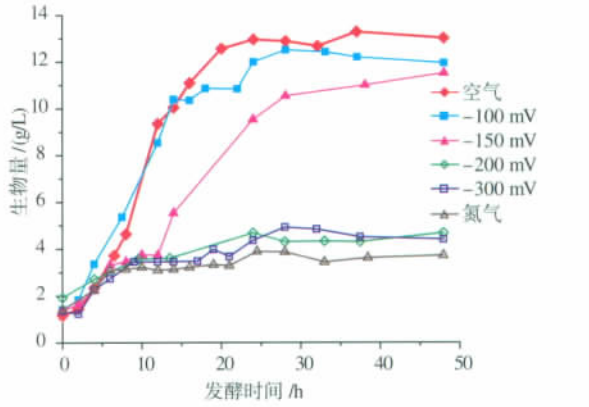


图3 乳酸发酵过程菌体生物量随时间变化曲线

Fig.3 Biomass profiles in lactic acid fermentation

2.2.2 ORP对拟干酪乳杆菌葡萄糖消耗和乳酸合成的影响 不同ORP对葡萄糖消耗和乳酸合成的影响见图4和表1。在相对较高ORP条件下，其菌体消耗葡萄糖和产乳酸速率都比较低ORP条件时的值要大；ORP为-100 mV时产乳酸最多，为153.00 g/L；ORP为-200 mV时糖酸转化率最高，为100.32%，这暗示在发酵过程中菌体中碳元素的主要来源是酵母膏、蛋白胨等，菌体消耗的葡萄糖完全转化为乳酸；全程通纯氮时单位菌浓单位时间产乳酸量最高，为0.55 g/(g·h)。控制ORP为-200 mV，-300 mV和通纯氮时，随着ORP的降低和环境厌氧程度的加深，菌体消耗的葡萄糖量依次增加，分别为93.00、93.60、116.96 g/L，而产乳酸量分别为93.30、90.70、97.70 g/L，这使得糖酸转化率随着ORP的降低而降低；但较低ORP条件下单位菌浓单位时间产乳酸量都高于ORP较高时的情况，见表1。在发酵36 h之后，除ORP为-150 mV以外，其他控制条件下葡萄糖消耗量和合成乳酸量都很少，所以比较发酵后24 h（也就是除ORP为-150 mV时

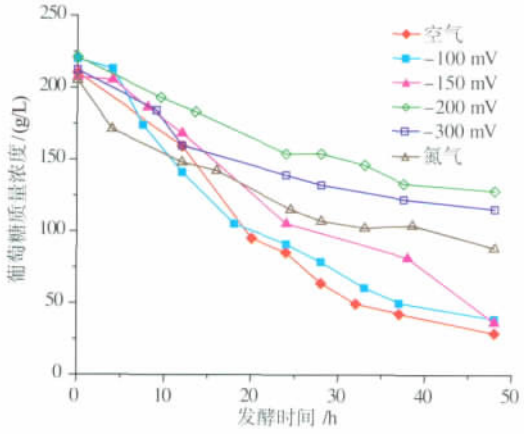
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其他控制条件菌体都处于稳定期),ORP 为−150 mV 时葡萄糖消耗量和乳酸合成量都为最多，分别为 68.86 g/L 和 51.79 g/L，但后 24 小时糖酸转化率并不高,仅为 75.21%。

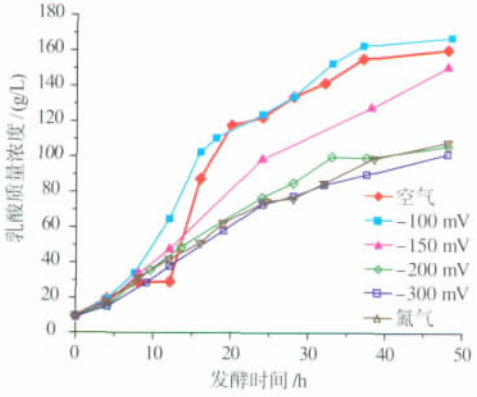
表 1　不同 ORP 条件下乳酸批发酵代谢参数的比较

Tab.1　Comparison of parameters for lactic acid batch fermentation unde different ORP levels

控制条件	葡萄糖消耗速率/(g/(L·h))	乳酸产生速率/(g/(g·h))	乳酸产生速率/(g/(L·h))	主要产物得率/%			
				乳酸	乙酸	丙酮酸	苹果酸
空气	2.52	0.24	2.09	82.81	0.24	0.44	0.06
−100 mV	2.52	0.27	2.13	84.35	0.28	0.27	0.03
−150 mV	2.38	0.25	1.94	81.87	0	0.24	0.04
−200 mV	1.29	0.42	1.30	100.32	0	0.14	0
−300 mV	1.35	0.41	1.31	96.91	0	0.18	0
氮气	1.63	0.55	1. 36	83.53	0	0.00	0



(A)葡萄糖随时间变化曲线



(B)乳酸随时间变化曲线

图 4　不同水平 ORP 对发酵过程葡萄糖消耗和乳酸合成的影响

Fig.4　Effect of ORP level at the broth on glucose consumption and lactic acid prodution

2.2.3　ORP 对拟干酪乳杆菌产生其他有机酸的影响

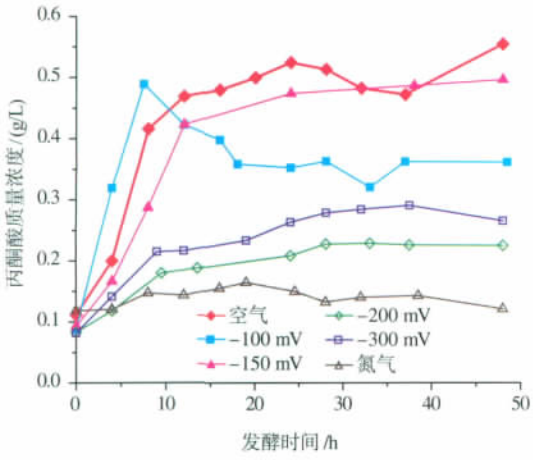
各种控制条件下,都没有甲酸积累,乙酸和丙酮酸是除乳酸外的主要有机酸产物,苹果酸和延胡索酸有少量积累,见表 1。从图 5(A)可发现,在发酵前期，不同 ORP 条件下的丙酮酸质量浓度都在增加,而在发酵后期,随着菌体进入稳定期,丙酮酸质量浓度也趋于稳定,达到动态平衡。较高 ORP 比较低 ORP 条件下积累的丙酮酸质量浓度高；以−150 mV 为界划分的两个 ORP 范围内,−100 mV 和通纯氮时丙酮酸质量浓度相对最小,这与菌体产生乳酸的情况正好相反,可得出菌体代谢生成乳酸的通量和发酵液中积累的丙酮酸质量浓度有一定的相关性,这与前人的研究结果一致。

在较高 ORP 条件下,乙酸的质量浓度先减小后增加,证明发酵前期菌体生长利用乙酸,稳定期后菌体代谢生成乙酸,并且 ORP 越高,发酵后期积累的乙酸量越大;在较低的 ORP 条件下,整个发酵过程中,乙酸的质量浓度都基本保持不变,如图 5(B)所示。

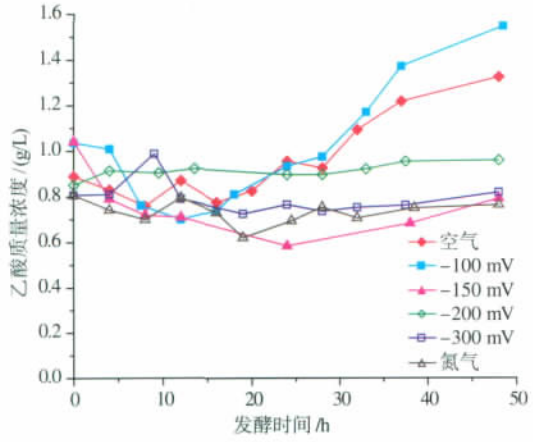
种子培养基中的柠檬酸二胺会在接种时进入到发酵培养基中,从图 5(C)可知,在各种 ORP 条件下,柠檬酸都有部分被代谢。从图 5(D,E)可看出,只有在较高 ORP 条件下,才有延胡索酸和苹果酸的积累。已知延胡索酸和苹果酸是 TCA 循环的中间代谢物,证明在较高 ORP 条件下,菌体的 TCA 循环代谢较强;并且 ORP 越高,发酵液中延胡索酸和苹果酸的最终质量浓度也越多。在全程通空气的控制条

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

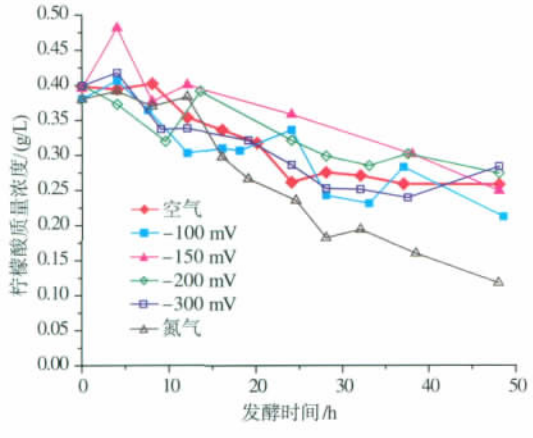
件下整个发酵过程中,延胡索酸和苹果酸的质量浓度在逐渐增加;而 ORP 为−100 mV 和−150 mV 时,苹果酸的质量浓度在 36 h 后,趋于稳定,而 ORP 在−150 mV 时延胡索酸的质量浓度在 12 h 后即逐渐减少。



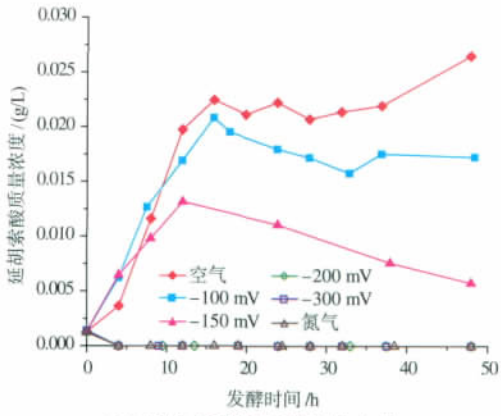
(A)丙酮酸随时间变化曲线



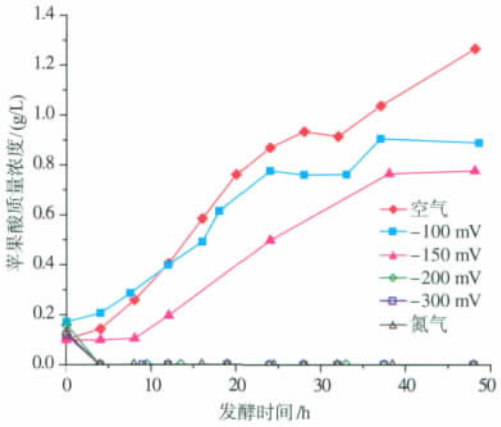
(B)乙酸随时间变化曲线



(C)柠檬酸随时间变化曲线



(D)延胡索酸随时间变化曲线



(E)苹果酸随时间变化曲线

图 5 不同水平 ORP 对发酵过程有机酸生成的影响

Fig.5 Effect of ORP level at the broth on organic acid prodution

2.2.4 ORP 对胞内 NADH/NAD⁺的影响 如图 6 所示,在不同 ORP 条件下,胞内 NADH/ NAD⁺比例变化整体趋势是相似的,并在稳定期各自维持在一定的水平;发酵进入稳定期之后(24 h),较高 ORP 条件下的 NADH/NAD⁺比较低 ORP 条件下的比值都相对要低;而除了−150 mV,其他 ORP 条件下,发酵 36 h 之后,NADH/NAD⁺比值都有不同程度的回升。

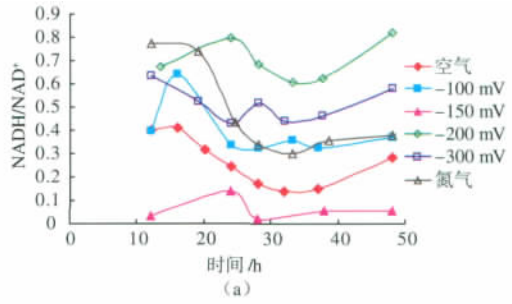


图 6 不同水平ORP 对发酵过程胞内 NADH/NAD⁺的影响

Fig.6 Effect of extracellular ORP level on the intracellular NADH/NAD⁺ ratio in lactic acid fermentation

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 结 语

拟干酪乳杆菌产生乳酸是半生长相关型的,菌体主要在生长期产生乳酸,讨论了 ORP 影响菌体浓度的原因。随着 ORP 的降低,其对菌体生长抑制作用不断增强,较高的 ORP(通入 1.5 L/min 空气、-100 mV、-150 mV)下的菌体浓度是较低 ORP(-200 mV、-300 mV、通入 1.5 L/min 纯氮)的 2 倍以上。已知乳酸菌丙酮酸脱氢酶需要在一定的氧气浓度环境下才有活性,而丙酮酸甲酸裂解酶对氧气极端敏感,微量氧气足以使其失去活性[14]。ORP 较低的情况下(-200 mV、-300 mV、通入 1.5 L/min 纯氮),为维持发酵液相应的 ORP 通入的空气相对较少,这可能使得丙酮酸甲酸裂解酶没有活性和丙酮酸脱氢酶没有活性或者活性很低,菌体主要由 EMP 途径产生能量,而糖的运输和其他合成代谢途径消耗能量,产生的能量不足以维持菌体的合成代谢,使菌体的生长受限;丙酮酸脱氢酶的低活性也可使 TCA 循环的通量较弱,从而合成代谢所需的某些前体物质可能缺乏,菌体生长受到限制。

在较低的 ORP 下,由于菌体比生长速率较小和最终菌体浓度较低,整个发酵过程中乳酸产量较少,但菌体代谢主要向产乳酸方向进行,糖酸转化率较高。从-200 mV 到-300 mV 和纯氮,糖酸转化率依次降低,主要是由于随着厌氧环境的加深,菌体生长和维持代谢消耗的葡萄糖量逐渐增加;而在较高 ORP 下,葡萄糖碳代谢有一部分朝向 TCA 循环进行,菌体浓度较高和菌体维持能消耗较多,虽然产乳酸量较大,但糖酸转化率较低。

在不同ORP下,随着发酵进入稳定期,NADH/NAD^+比例各自维持在一定水平,但较高 ORP 条件下的 NADH/NAD^+比较低 ORP 条件的 NADH/NAD^+比例都相对要低,这与糖酸转化率和单位时间单位菌体产酸量的情况正好一致,这可证实胞外 ORP 会影响胞内的氧化还原状态,发酵后期相对较高的 NADH/NAD^+有利于菌体产生乳酸。ORP 为-150 mV 时,38 h 之后 NADH/NAD^+维持不变,菌体继续在生长,此时菌体葡萄糖消耗和乳酸合成量都为各种 ORP 条件中最大的;但其他控制条件下,发酵进行到 38 h 之后,NADH/NAD^+比例又有一定程度的回升,这伴随着菌体葡萄糖消耗和乳酸合成速率的快速下降,证实了胞外 ORP 可以影响胞内的氧化还原状态,进而影响到菌体的生长和代谢。

参考文献:

[1] Benninga H. A history of lactic acid making[M]. **Dordrecht**, **Netherlands**: **Kluwer Academic Publishers**, 1990:1-61.

[2] Konings W N,Kok J, Kuipers O P,et al. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2000, 3:276 - 282

[3] 高江婧, 严群,阮文权.一株产 L-乳酸菌株的筛选、鉴定及营养条件的初步研究[J].食品与生物技术学报,2010,29:454-457. GAO Jiang-jing,YAN Qun,RUAN Wen-quan. Screening,identification of a bacteria strain for the production of L-lactic acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29:454-457.(in Chinese)

[4] Jensen N B, Melchiorsen C R, Jokumsen K V, et al. Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate[J]. **Appl Environ Microbiol**,2001,67:2677-2682.

[5] Neves A R, Pool W A, Kok J, et al. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*-the input from in vivo NMR[J]. **FEMS Microbiol**, 2005, 29: 531-554.

[6] Bourel G, Hinnini S, Divies C, et al. The response of *Leuconostoc mesenteroides* to low external oxidoreduction potential generated by hydrogen gas[J]. **J Appl Microbiol**,2003, 94:280-288.

[7] Snoep J L, Teixeira de Mattos M J, Postma P W, et al. Involvement of pyruvate dehydrogenase in product formation in pyruvate limited anaerobic chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775[J]. **Arch Microbiol**, 1990,154:50-55.

[8] Kieronczyk A, Cachon R. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*[J]. **J Appl Microbiol**, 2006,101(5):1114-1122.

[9] 王强.小型生物反应器氧化还原电位控制系统研制及其在乙醇发酵中的应用[D].上海:华东理工大学,2008.

[10] Kwon S, Yoo I K, Lee W G,et al. High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2001,73(1):25-31.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net