DOI:10.12441/spyswjs.20241206002 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0062-10

固定化谷氨酸棒状杆菌产*L*-赖氨酸发酵工艺研究

刘庆国[1,2] 应汉杰[1] 孙文俊[1*]

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院,江苏 南京 211816; 2. 南京高新工大生物技术研究院有限公司,江苏 南京 210032)

摘要:【目的】探究固定化谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)产*L*-赖氨酸发酵工艺的可行性。**【方法】**考察不同体积分数的种子培养基对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵稳定性的影响,分析不同规格的固定化载体对谷氨酸棒状杆菌发酵性能的影响,并对比游离谷氨酸棒状杆菌和固定化谷氨酸棒状杆菌发酵工艺的差异。**【结果】**添加体积分数5%的种子培养基可以满足谷氨酸棒状杆菌的生长和代谢活动需求,体积分数过高会使碳源流向谷氨酸棒状杆菌生长,限制产物的合成。载体规格为0.061 g/cm^{2}时,发酵效果最好。相较于游离谷氨酸棒状杆菌,固定化谷氨酸棒状杆菌发酵具有高密度群体优势和保护机制,其发酵周期大幅缩短,产酸率提高了16.24%,且生物量的下降使得更多的碳源流向产物合成,表现出较高的转化率。**【结论】**该固定化谷氨酸棒状杆菌发酵工艺具有较强的应用可行性,为其工业化应用提供了重要参考。

关键词:谷氨酸棒状杆菌;*L*-赖氨酸;固定化;间歇式发酵

Fermentation Technology of *L*-Lysine Production by Immobilized *Corynebacterium glutamicum*

LIU Qingguo[1,2] *YING Hanjie*[1] *SUN Wenjun*[1*]

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. Nanjing Hi-Tech Biological Technology Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210032, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to investigate the feasibility of the fermentation process for *L*-lysine production by immobilized *Corynebacterium glutamicum*. [**Method**] Firstly, the effects of different volume fractions of seed medium on the fermentation stability of immobilized *Corynebacterium glutamicum* were examined. Subsequently, the impacts of immobilization carriers with different specifications on the fermentation performance were analyzed. Finally, a comparative analysis was conducted on the differences between the fermentation processes with free and immobilized *Corynebacterium glutamicum*. [**Result**] The addition of 5% volume fraction of seed medium adequately sustained the growth and metabolic activities of *Corynebacterium glutamicum*. Higher volume fractions diverted carbon sources towards bacterial growth, thereby limiting product synthesis. The most favorable fermentation metrics were achieved with a specification of 0.061 g/cm^2. Compared with free *Corynebacterium glutamicum* fermentation, immobilized *Corynebacterium glutamicum* exhibited a significantly shortened fermentation cycle and an increase of 16.24% in the acid production rate, which was attributable to the high cell density and protective effects of immobilization. Furthermore, the reduced biomass redirected more carbon sources towards product synthesis, resulting in higher conversion rates. [**Conclusion**] The novel fermentation process employing immobilized *Corynebacterium glutamicum* demonstrates strong application feasibility, providing important insights for its future industrial implementation.

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BEE01011);碳达峰碳中和科技创新项目(202211019)。

通信作者:孙文俊(1993—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:sunwenjun@njtech.edu.cn

收稿日期:2024-12-06 **修回日期:**2025-01-16

Keywords: C*orynebacterium glutamicum*; *L*-lysine; immobilization; repeated fed-batch fermentation

L-赖氨酸是一种必需氨基酸，可促进人体或动物生长发育、增强机体免疫力、抗病毒、促进脂肪氧化等，同时也能促进某些营养素的吸收，可与一些营养素协同作用，更好地发挥各种营养素的生理功能[1-2]。由于*L*-赖氨酸具有显著的营养功效，目前已被广泛应用于饲料添加剂领域，近年来，全球*L*-赖氨酸年产量超260万t[3]，且呈持续增长的趋势。

在工业上，*L*-赖氨酸通常是由谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌产生[4-5]，这些底盘生物生长速度快，且遗传背景清晰[6]。相比较而言，谷氨酸棒状杆菌是较为安全的生产菌种，因此其相关研究较多。有研究者采用物理或化学方法对谷氨酸棒状杆菌进行不定向改造，结果表明，该方法能显著提高*L*-赖氨酸产量[7-8]。Becher等[9]通过系统代谢工程提高了谷氨酸棒状杆菌中赖氨酸产量。此外，辅因子再生、能量供应、跨膜运输和底物摄取等相关研究进一步增强了*L*-赖氨酸的生物合成途径[10-12]。目前，*L*-赖氨酸质量浓度可达到235 g/L，转化率为67%[13]，因此从合成途径进一步提高*L*-赖氨酸生产菌株的生产效率的难度较大。

L-赖氨酸生产工艺主要为游离细胞补料式发酵，每批发酵需要培养新的种子以及清洗、消杀和发酵等工艺环节，工艺路线较复杂。由于游离谷氨酸棒状杆菌在液体中受流体剪切压力大，对不利环境的耐受性差，极易出现衰退、死亡现象，导致生产效率较低。采用大接种量可以明显提高发酵强度，但同时也将更多的碳源消耗在菌体生长方面，从而造成整体发酵过程糖耗和能耗较高等问题。

针对目前*L*-赖氨酸生产存在的产量瓶颈和效率不佳的问题，固定化技术是一种较为理想的解决方案。与传统游离细胞发酵相比，固定化细胞发酵的菌体被限定在一定空间范围内，可避免细胞流失，提高利用率[14]。同时，单位空间的细胞数量多，具有较强的菌群优势，发酵强度大，抗不利环境的能力强[15]。常规的固定化方法包括吸附法、包埋法和交联法。吸附法中的固定化材料主要有硅胶、硅藻土和陶瓷等[16]，其优点是传质相对较佳，死细胞容易脱落，缺点是密度过大，对装备要求高。包埋法采用的介质有海藻酸钠、琼脂和卡拉胶等凝胶材料[17-18]，其最大优点是操作方便，细胞密度高，缺点是传质效果差，且载体强度弱。交联法是通过交联剂与细胞的表面基团反应，使细胞相互连接形成网状结构以达到将细胞固定的目的，但反应过程过于剧烈，细胞死亡率较高，无法再生。近年来，有研究者采用亲水磁珠或磁性纳米材料作为固定化介质[19-20]，但将其应用于*L*-赖氨酸发酵工艺的研究仍较少。

在前期研究中，作者采用改性纤维进行酵母细胞的固定化发酵，成功完成了百吨级放大试验[21]。在前期研究基础上，采用纤维床发酵优化固定化谷氨酸棒状杆菌产*L*-赖氨酸（以*L*-赖氨酸盐酸盐产量进行表征）的工艺，并评估其应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

谷氨酸棒状杆菌0206：由作者所在单位提供。

1.1.2 主要试剂

蔗糖、葡萄糖、无水硫酸镁、硫酸铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钾、生物素、七水硫酸亚铁、五水硫酸铜、七水硫酸锌、氯化胆碱等：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；蛋白胨、酵母：分析纯，美国OXOID公司；*D*-泛酸钙、烟酰胺：分析纯，生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备

搅拌发酵罐：T&J-10L型，迪必尔生物工程（上海）有限公司；分光光度计：752N型，上海仪电物理光学仪器有限公司；高效液相色谱仪：1260型，美国安捷伦科技有限公司；生物传感分析仪：SBA-40E型，山东科学院生物研究所；扫描电镜：JSM-6010型，日本电子株式会社。

1.2 方法

1.2.1 固定化载体与反应器

固定化载体为棉纤维，于10 L搅拌罐挡板内侧缠绕一圈，呈圆筒状，直径约15 cm，高度25 cm。10 L搅拌罐内径约20 cm，高度32 cm（不计底部高度）。搅拌罐分为2层，上层为6叶斜叶桨，下层为6叶平叶桨。

1.2.2 培养基

1）种子培养基：蔗糖 22 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、硫酸铵 5 g/L、磷酸二氢钾 4 g/L、磷酸氢二钾 8 g/L、无水硫酸镁 1 g/L、生物素 0.2 mg/L，用体积分数 20% 的 KOH 溶液调节 pH 至 7.0，于 121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

2）发酵培养基：葡萄糖 30 g/L、硫酸铵 10 g/L、玉米浆 3 g/L、磷酸二氢钾 0.8 g/L、糖蜜 20 mL/L、磷酸 0.4 mL/L、无水硫酸镁 0.87 g/L、生物素 1.2 mg/L、一水硫酸锰 50 mg/L、七水硫酸亚铁 50 mg/L、*D*-泛酸钙 6.3 mg/L、烟酰胺 40 mg/L、维生素 B_1 6.0 mg/L，用体积分数 20% 的 KOH 溶液调节 pH 至 7.0，于 121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

3）补料培养基：葡萄糖 700 g/L、体积分数 0.2% 玉米浆、无水硫酸镁 1.5 g/L、磷酸氢二钾 1.3 g/L、*D*-泛酸钙 50 mg/L、烟酰胺 63 mg/L、维生素 B_1 19.5 mg/L、生物素 1.5 mg/L、七水硫酸亚铁 33.4 mg/L、五水硫酸铜 1.6 mg/L、七水硫酸锌 1.6 mg/L、氧化胆碱 1 g/L，于 121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

1.2.3 菌种培养

将 600 mL 种子培养基置于 3 L 摇瓶中，灭菌后降温，从平板上刮取一环活化的菌至摇瓶培养基中。34 ℃、120 r/min 条件下于往复式摇床中培养 6~8 h，至 OD_{562} 值达 7~10。

1.2.4 固定化谷氨酸棒状杆菌发酵

在 10 L 固定化生物反应器中用水清洗载体 2 次，将 3.6 L 培养基放入反应器中，待灭菌后，将 200 mL 补料培养基泵入培养基中，通过管道接入 600 mL 种子液。培养条件为：温度 37 ℃、pH 7.0、通风量 6 L/min、转速 400 r/min、压力 0.05 MPa。发酵过程中调节通风量至 9 L/min，或者将转速调节至 500~700 r/min，保持溶解氧（DO）水平不低于 20%。每 2 h 取一次样品，测定残余葡萄糖质量浓度、氨氮质量浓度、生物量（OD_{562} 值），以 *L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度表征 *L*-赖氨酸产量。根据试验结果，调整补料培养基和硫酸铵（450 g/L）的流加速率，使残余葡萄糖质量浓度为 1.0 g/L 左右、氨氮质量浓度为 0.10~0.15 g/dL。反应 12 h 后，控制残余葡萄糖质量浓度为 0.5~1.0 g/L、氨氮质量浓度为 0.15~0.20 g/dL，试验分为以下 3 组。

1）不同体积分数种子培养基对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵稳定性的影响：发酵周期 40 h，每种体积分数下连续发酵 3 批次。第 1~3 批次，种子培养基添加体积分数为 0%；第 4~6 批次，种子培养基添加体积分数为 15%；第 7~9 批次，种子培养基添加体积分数为 10%；第 10~12 批次，种子培养基添加体积分数为 5%。重复 3 次。

2）不同规格的固定化载体对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵性能的影响：每种规格载体连续发酵 3 批次。第 1~3 批次，载体规格为 0.041 g/cm^2；第 4~6 批次，载体规格为 0.051 g/cm^2；第 7~9 批次，载体规格为 0.061 g/cm^2；第 10~12 批次，载体规格为 0.075 g/cm^2。每批次均加入体积分数 5% 的种子培养基，每批次发酵周期 40 h，重复 3 次。

3）最优发酵条件下的固定化谷氨酸棒状杆菌发酵：在最优条件下，连续发酵 12 批次，其中前 2 批次，留体积分数 10% 的发酵液作为种子液，后续批次全部排空加入新鲜发酵液，且每批次加体积分数 5% 的种子培养基。*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度达 220 g/L 以上时结束发酵。

1.2.5 游离谷氨酸棒状杆菌发酵

在 10 L 的生物反应器中加入 3.6 L 的发酵培养基。灭菌后泵入 200 mL 补料培养基。当罐内温度为 37 ℃时，将 600 mL 种子液转移到生物反应器中。培养条件为：温度 37 ℃、pH 7.0、通风量 6 L/min、转速 400 r/min、压力 0.05 MPa。发酵过程中调节通风量至 9 L/min，或者将转速调节至 500~700 r/min，保持 DO 水平不低于 20%。每 2 h 取一次样品，测定生物量以及葡萄糖、氨氮和 *L*-赖氨酸盐酸盐的质量浓度。根据试验结果，调整补料培养基和硫酸铵（450 g/L）的流加速率，使残余葡萄糖质量浓度为 1.0 g/L 左右、氨氮质量浓度为 0.10~0.15 g/dL。反应 12 h 后，控制残余葡萄糖质量浓度为 0.5~1.0 g/L、氨氮质量浓度为 0.15~0.20 g/dL。*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度达 220 g/L 以上时结束发酵，试验重复 3 次。

1.2.6 分析方法

发酵前测定初始葡萄糖和氨氮质量浓度，发酵 6 h 后，每隔 2 h 取样检测残余葡萄糖、氨氮和 *L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度以及生物量，记录补料糖的消耗量和中间放料体积。DO 水平回升时开始补糖，根据残余葡萄糖和氨氮质量浓度，及时调整补料培养基的流加速率；发酵 6 h 后，每隔 2 h 用

显色法测定*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度。

1）残余葡萄糖质量浓度测定：每2 h取样，离心后，用纯水稀释上清液，用生物传感分析仪测定发酵液中残余葡萄糖质量浓度。

2）*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度测定：分别取2、3、4、5 mL的*L*-赖氨酸盐酸盐标准品，定容至100 mL，配制成质量浓度分别为0.2、0.3、0.4、0.5 g/L的*L*-赖氨酸盐酸盐标准溶液。样品则用相应倍数的纯水稀释，混合后于3 000 r/min离心10 min，取上清液进行测定。分别取1 mL标准溶液和样品置于试管中，各加入1 mL茚三酮，盖上铝盖，煮沸10 min，用水冷却至室温，然后加入8 mL去离子水。于475 nm处测定吸光度，通过标准曲线计算*L*-赖氨酸盐酸盐的质量浓度。

3）氨氮质量浓度测定：取50 μL样品于50 mL比色管中，定容至50 mL，加1 mL的500 g/L酒石酸钾钠和1 mL纳氏试剂，摇匀，室温静置10 min，以纯水作为对照于420 nm处测定吸光度。按照式（1）计算氨氮质量浓度。

$$C_{AN}=\frac{(A_S-A_0)-0.008\,5}{0.003\times V}\times 10^{-4} \quad (1)$$

式中：

C_{AN}——氨氮质量浓度，g/dL；

A_s——样品吸光度；

A_0——对照组吸光度；

V——反应体积，mL；

0.008 5——校准曲线的截距；

0.003——校准曲线的斜率，mg^{-1}。

发酵结束后，计量发酵液体积，并根据式（2）~（3）分别计算转化率和产酸率。

$$Y=\frac{V_{L1}\times C_{L1}+V_{L2}\times C_{L2}}{V_S\times C_S}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y——转化率，%；

V_{L1}——中间排料的体积，L；

V_{L2}——发酵结束后的体积，L；

C_{L1}——中间排料的产物质量浓度，g/L；

C_{L2}——发酵结束后的产物质量浓度，g/L；

V_S——补料培养基体积，L；

C_S——补料培养基葡萄糖质量浓度，g/L。

$$P=\frac{V_{L1}\times C_{L1}+V_{L2}\times C_{L2}}{V_F\times T} \quad (3)$$

式中：

P——产酸率，g/（L·h）；

V_{L1}——中间排料的体积，L；

V_{L2}——发酵结束后的体积，L；

C_{L1}——中间排料的产物质量浓度，g/L；

C_{L2}——发酵结束后的产物质量浓度，g/L；

V_F——发酵罐体积，L；

T——发酵周期，h。

4）扫描电子显微镜观察：对固定化谷氨酸棒状杆菌先进行真空冷冻干燥，然后利用扫描电子显微镜观察谷氨酸棒状杆菌形态。

1.2.7 数据分析

所有试验均进行3次，采用平均值±标准差表示试验结果。使用GraphPad Prism和Origin软件进行绘图和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同体积分数的种子培养基对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵稳定性的影响

固定化细胞发酵技术的目标是利用固定化细胞实现长期高效稳定的发酵，其核心技术内容包括载体中细胞载荷量最大化和反应器内传质传氧最适化。其中，前者涉及细胞表面官能团特点、固定化载体形式与性质以及细胞数量的调控，而后者侧重于生物反应器的理性化设计。在前期研究中，为了提高载体固定化吸附效率，作者所在课题组开展了谷氨酸棒状杆菌生物膜改造相关研究，通过异源表达*cslA*基因大幅提高了生物膜合成效率，显著提高了载体对细胞的吸附率[22]。为进一步提高*L*-赖氨酸发酵性能，作者主要从微生物所需营养和载体形式两方面开展相应研究。

基于10 L玻璃反应器规模，作者首先研究了不同体积分数的种子培养基对发酵的影响。在工业化生产中，一般采用浓缩的玉米糖化液和无机氮作为主体碳氮源进行发酵，这些具有足够营养成分的种子培养基带入发酵系统可以满足菌体生长需求。在固定化发酵中，作者分析了种子培养基添加体积分数为0%~15%时对菌体生长和发酵指标的影响。

如图1（a）所示，不添加种子培养基时，谷氨酸棒状杆菌生物量随着批次的增加呈显著下降趋

势，导致*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度、耗糖量和总产酸量也呈明显下降趋势，见图1(b)~(d)。如图1(e)~(f)所示，第3批次的产酸率仅为第1批次的60%左右，而转化率相较于第1批次有一定程度的提升。将种子培养基添加体积分数提高至15%后，生物量有明显的回升现象，尤其第5批次和第6批次，生物量已超过正常发酵水平，耗糖量恢复至第1批次水平，但转化率下降明显。将种子培养基添加体积分数下调至10%后，生物量明显下降，生物量为75~90，耗糖量和产酸率明显提升，但转化率无明显变化。再次下调种子培养基添加体积分数至5%，生物量下降至60~66，总产酸量和产酸率均明显上升，转化率达到70%以上。这些结果表明，添加一定体积分数的种子培养基可以满足细胞生长和代谢的需求，但要避免种子培养基添加体积分数过高使得碳源流向细胞生长，限制产物的合成。该结论与作者前期通过固定化酵母产乙醇的研究结果类似[23]。此外，由图2可知，固定化载体对谷氨酸棒状杆菌具有较好的吸附能力，且能形成较为明显的生物膜，这也说明相较于第1批次发酵，固定化谷氨酸棒状杆菌的产酸率更高。表明固定化谷氨酸棒状杆菌拥有较好的菌群优势，可明显提升发酵强度，这与Chen等[24]和Kupryashina等[25]的相关研究结果一致。

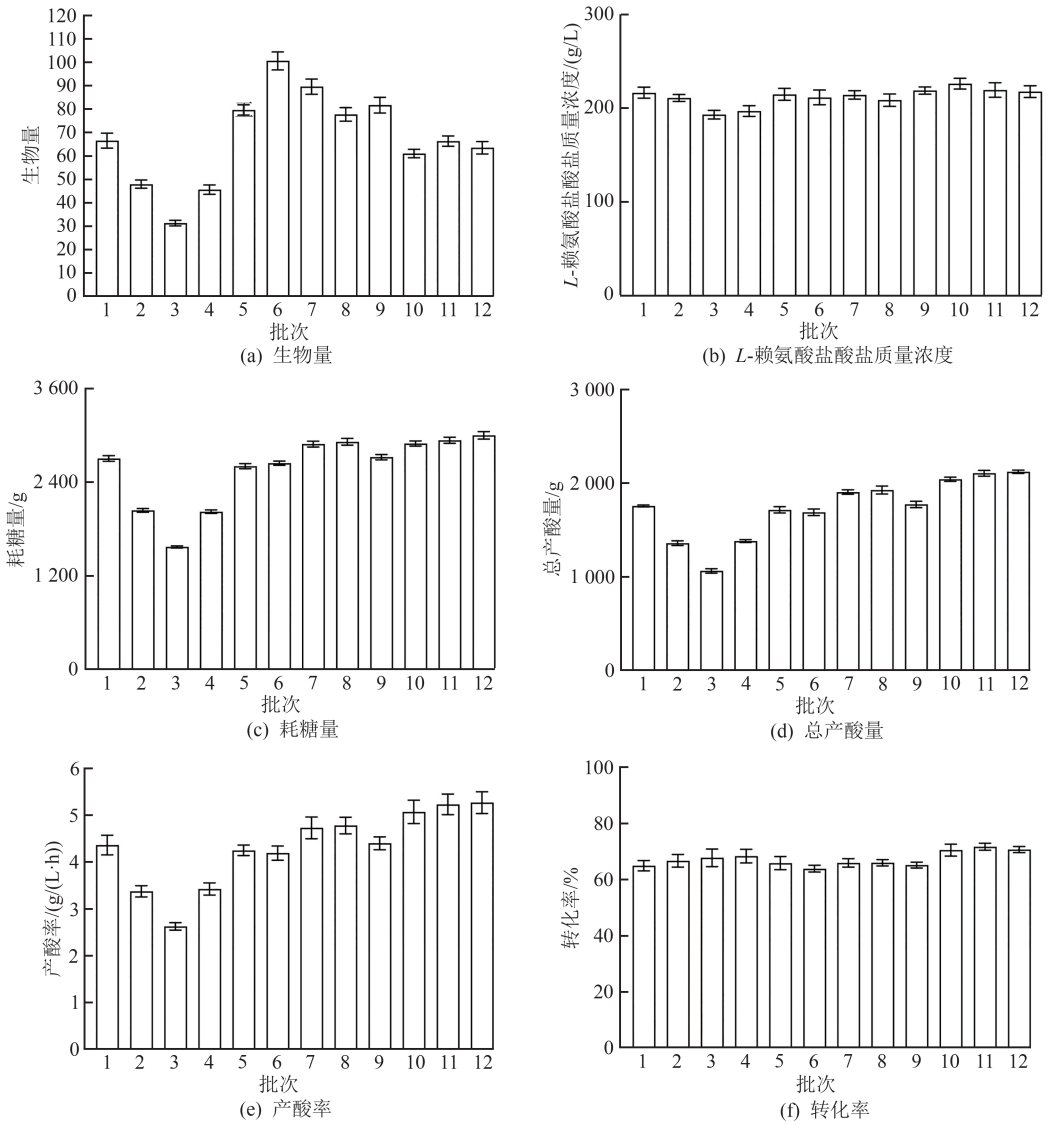
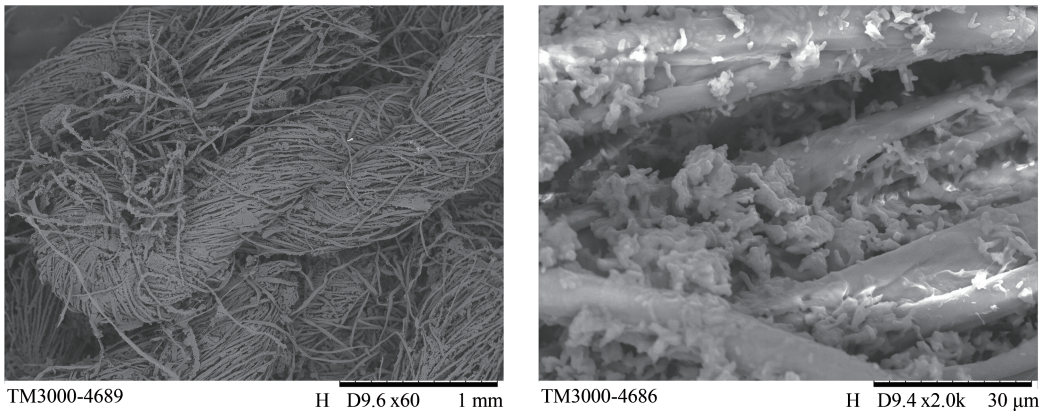


图1 不同体积分数的种子培养基对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵的影响

Fig. 1 Effects of different volume fractions of seed medium on the fermentation of immobilized *Corynebacterium glutamicum*



(a) 60×的电镜图　　(b) 100×的电镜图

图2　固定化谷氨酸棒状杆菌的扫描电子显微镜图

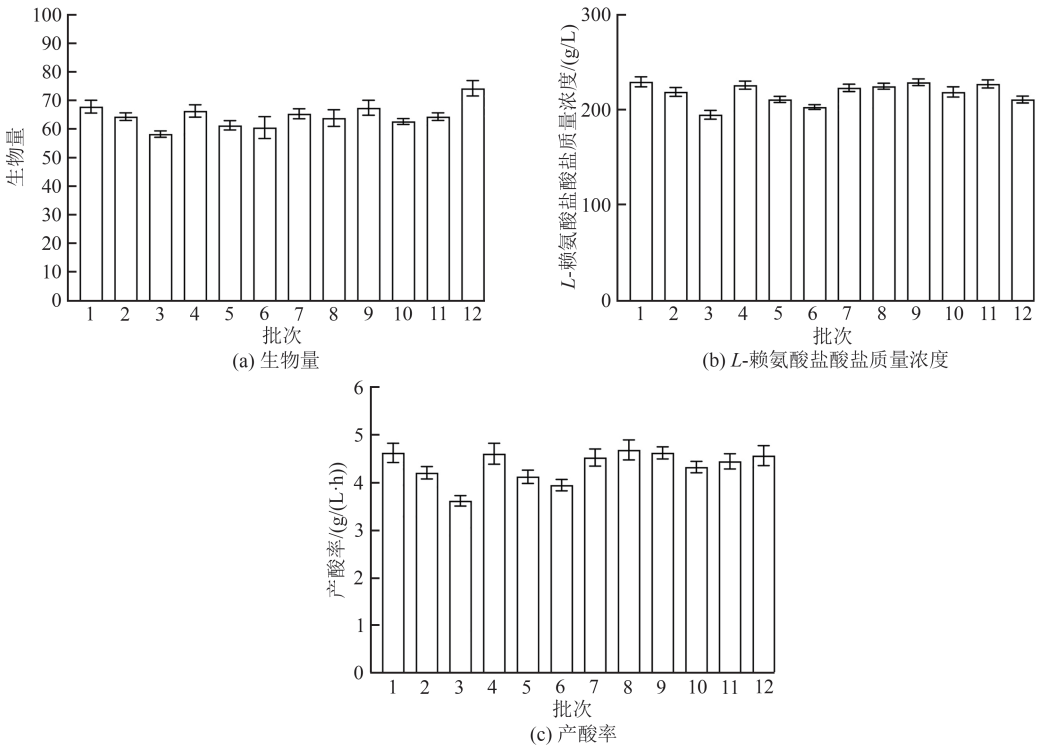
Fig. 2　Scanning electron microscopy images of immobilized *Corynebacterium glutamicum*

综上，种子培养基添加体积分数过低会无法满足菌体正常生长需求，导致产酸率过低；而种子培养基添加体积分数过高，会导致菌体生长量过大，影响糖、酸转化率。因此最优种子培养基添加体积分数为5%，在此条件下，可以维持菌体稳定生长和较高的产酸率和转化率。

2.2　固定化载体规格对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵性能的影响

相较于包埋法固定化谷氨酸棒状杆菌发酵，吸附法采用的固定化载体具有更高的比表面积，传质、传氧以及材料稳定性等方面的优势较为明显[26-27]。作者采用纤维材料进行固定化谷氨酸棒状杆菌发酵，考察了不同规格的固定化载体对谷氨酸棒状杆菌发酵性能的影响。

如图3所示，当纤维材料的规格为0.041 g/cm^{2}时，随着批次增加，游离的菌体生物量呈明显下降趋势，*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度和产酸率也呈下降趋势。当纤维材料规格提高至0.051 g/cm^{2}时，发酵指标



(a) 生物量　　(b) *L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度

(c) 产酸率

图3　不同规格载体对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵影响

Fig. 3　Effects of carriers with different specifications on the fermentation of immobilized *Corynebacterium glutamicum*

（生物量、*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度和产酸率）升高程度较小。而当规格上调至 0.061 g/cm^{2}时，发酵指标明显升高，且表现出较强的稳定性。再进一步提高载体规格后，生物量呈明显上升趋势，而*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度和产酸率并未相应升高。载体规格的增大，意味着单位反应器空间内载体材料更多，可吸附的菌体数量也越多。然而，载体装填密度或厚度的增加，也会加剧传质与传氧的阻力。这与包埋法发酵过程类似，载体装填密度过大，使得发酵强度呈下降趋势[17]。因此，选用 0.061 g/cm^{2}作为固定化载体的最优规格。

2.3　游离谷氨酸棒状杆菌与固定化谷氨酸棒状杆菌的发酵指标对比分析

以游离谷氨酸棒状杆菌发酵为对照，验证固定化谷氨酸棒状杆菌的发酵性能。如图 4（a）所示，在发酵前 24 h，游离谷氨酸棒状杆菌生长速率较快，糖消耗速率呈线性关系提升，从而使得*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度也表现出类似的增长规律；发酵 24 h 后，生物量趋于稳定，糖消耗速率上升缓慢；发酵 28 h 后，糖消耗速率呈现明显下降趋势，这与高浓度酸环境下的抑制作用有直接关系。

相较于游离谷氨酸棒状杆菌，固定化谷氨酸棒状杆菌在前期表现出较强的发酵性能，这主要是因为固定化谷氨酸棒状杆菌发挥了群体优势作用，缩短了延滞期，提前进入快速发酵阶段。由图 4（b）~（d）可知，发酵 12 批次，*L*-赖氨酸盐酸盐终质量浓度和稳定期的生物量波动幅度较小。而第 2~3 批次的糖消耗速率较早出现下降现象，随着批次增加，后期的糖消耗速率下降幅度较小，使得后续批次的发酵周期在 30~34 h 波动，这主要是由于固定化谷氨酸棒状杆菌发酵体系避免了搅拌造成的剪切应力对谷氨酸棒状杆菌的损伤，使得谷氨酸棒状杆菌活性高于游离谷氨酸棒状杆菌，因此固定化谷氨酸棒状杆菌在整个发酵过程中的发酵强度均较高[28]。该结论也可由固定化谷氨酸棒状杆菌发酵的产酸率和转化率指标得出。由图 5 可知，从第 4 批次

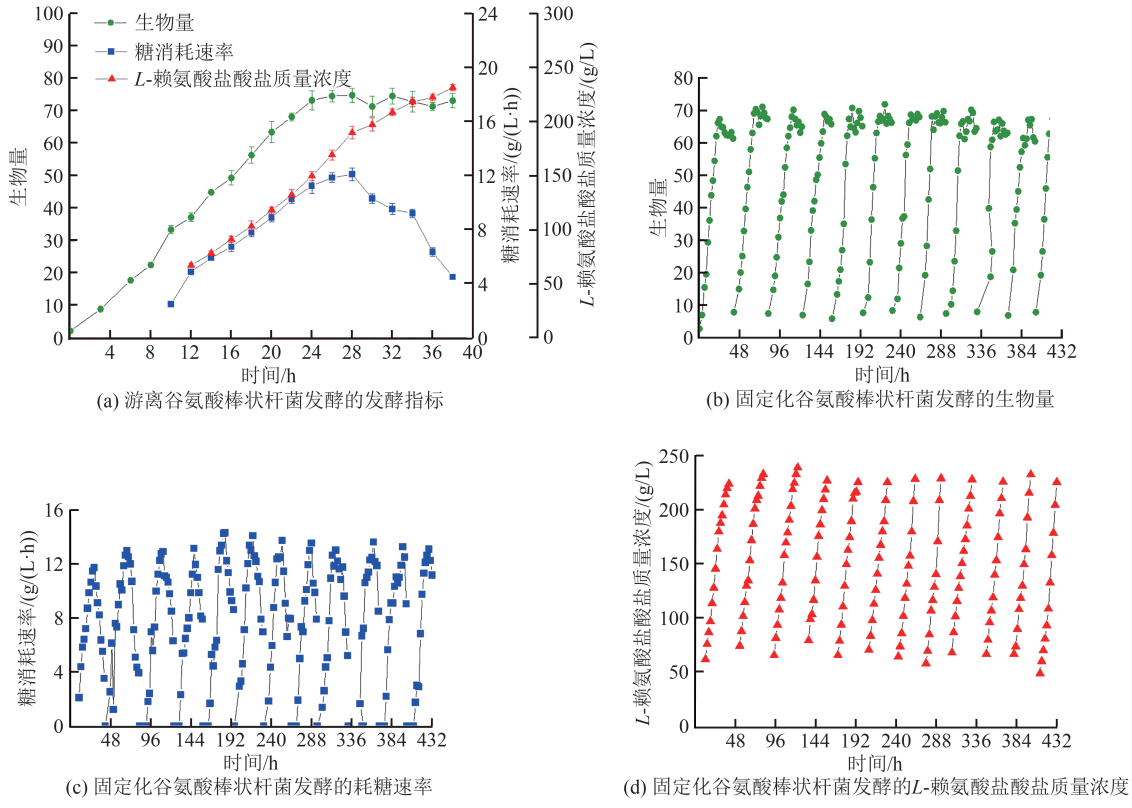


图 4　游离谷氨酸棒状杆菌和固定化谷氨酸棒状杆菌发酵过程的动力学变化

Fig. 4　Kinetic changes of fermentation processes of free and immobilized *Corynebacterium glutamicum*

开始，产酸率明显上升。另外，相较于第1批次和第2批次，后续10个批次的转化率提高幅度较为明显。

由表1可知，与游离谷氨酸棒状杆菌发酵相比，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵周期明显缩短，平均缩短了10.53%，平均产酸率提高了16.24%。而菌体生物量明显下降，下降了8.52%，从而表现为较高的转化率，平均提高了5.22%。

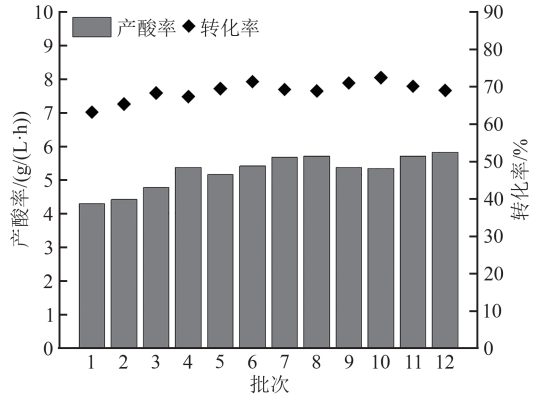


图5　固定化谷氨酸棒状杆菌不同批次的指标变化

Fig. 5　Changes in indexes of immobilized *Corynebacterium glutamicum* fermentation in different batches

表1　游离谷氨酸棒状杆菌和固定化谷氨酸棒状杆菌发酵最终指标差异

Table 1　Differences in final fermentation indexes between free and immobilized *Corynebacterium glutamicum*

发酵方式	发酵周期/h	生物量	*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度/（g/L）	产酸率/（g/(L·h)）	转化率/%
游离谷氨酸棒状杆菌发酵	38	71.70	231.32	4.68	66.26
固定化谷氨酸棒状杆菌发酵	34	65.59	227.72	5.44	69.72

结果表明，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵性能显著优于游离谷氨酸棒状杆菌发酵。相较于游离谷氨酸棒状杆菌发酵，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵由于具有高密度群体优势和保护机制，发酵周期大幅缩短，产酸率明显提高；生物量的下降使得更多的碳源流向产物合成，表现出较高的转化率。

本研究的目的是探讨固定化谷氨酸棒状杆菌在工业化中应用的可能性，因此，验证稳定性和发酵性能的提升是必要的。基于种子培养基添加体积分数和载体规格2个方面的优化获得了最佳的工艺条件，并从菌体生物量、*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度以及糖消耗速率等指标进行分析，结果表明，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵有较强的工艺稳定性。与游离谷氨酸棒状杆菌发酵相比，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵的产酸率和转化率等关键指标均得到明显提升。根据Feng等[29]的研究，分批发酵周期之间的停留时间约为6 h，其中包括发酵罐清洁和消毒、菌种扩培等阶段。而本研究仅计算了发酵过程中的产酸率，若将上游环节的生产周期也纳入计算，则平均生产周期可下降22%以上，即产能将进一步提升，这将显著降低设备折旧和人力消耗等生产成本。另外，与游离谷氨酸棒状杆菌发酵相比，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵使用的营养物质较少，节约了原料成本。此外，固定化谷氨酸棒状杆菌的转化率和产量明显提高，经济效益提升。因此，固定化谷氨酸棒状杆菌发酵工艺具有较高的技术和经济效益，有望进一步应用于工业化生产。

3　结论

作者考察了不同体积分数的种子培养基和载体规格对固定化谷氨酸棒状杆菌发酵稳定性和发酵性能的影响，发现添加体积分数5%的种子培养基可以满足谷氨酸棒状杆菌生长和代谢活动的需求。当载体规格为0.061 g/cm^{2}时，发酵指标明显提升。通过对比游离谷氨酸棒状杆菌发酵工艺和固定化谷氨酸棒状杆菌发酵工艺，发现固定化谷氨酸棒状杆菌发酵的高密度群体优势和保护机制使其发酵周期大幅缩短，产酸率提高了16.24%，且生物量的下降使得更多的碳源流向产物合成，表现出较高的转化率。固体化谷氨酸棒状杆菌发酵工艺具有较强的重复利用性能和良好的发酵指标，大幅节约了菌种制备环节的人力、物力和时间成本，显著提高了*L*-赖氨酸产量（以*L*-赖氨酸盐酸盐质量浓度计），表现出极大的产业化应用潜力。在后续研究中，将从营养精准优化、反应器设计及抗杂菌等方面进一步完善固定化发酵体系的构建，为其工业化应用奠定基础。

参考文献

[1] 李俊霖，郭传庄，王松江，等. 赖氨酸的生物学功能及其在饲料中的应用[J]. 中国饲料，2020(21)：63-66.
LI J L，GUO C Z，WANG S J，et al. Research advance on biological activities and application of lysine[J]. China Feed，2020(21)：63-66.(in Chinese)

[2] ALBREKTSEN S，KORTET R，SKOV P V，et al. Future feed resources in sustainable salmonid production：a review[J]. Reviews in Aquaculture，2022，14(4)：1790-1812.

[3] WENDISCH V F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production[J]. Metabolic Engineering，2020，58：17-34.

[4] LIU J，XU J Z，RAO Z M，et al. Industrial production of *L*-lysine in *Corynebacterium glutamicum*：progress and prospects[J]. Microbiological Research，2022，262：127101.

[5] SCHILLING B，BASISTY N，CHRISTENSEN D G，et al. Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation[J]. Journal of Bacteriology，2019，201(9)：e00768-18.

[6] CHENG J，CHEN P，SONG A D，et al. Expanding lysine industry：industrial biomanufacturing of lysine and its derivatives[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology，2018，45(8)：719-734.

[7] DO CARMO FÉLIX F K，LETTI L A J，DE MELO PEREIRA G V，et al. *L*-Lysine production improvement：a review of the state of the art and patent landscape focusing on strain development and fermentation technologies[J]. Critical Reviews in Biotechnology，2019，39(8)：1031-1055.

[8] IKEDA M. Lysine fermentation:history and genome breeding[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology，2017，159：73-102.

[9] BECHER J，ZELDER O，HAFNER S，et al. From zero to hero design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for *L*-lysine production[J]. Metabolic Engineering，2011，13：159-168.

[10] LIU J，OU Y，XU J Z，et al. *L*-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioresource Technology，2023，387：129701.

[11] RAY D，ANAND U，JHA N K，et al. The soil bacterium，*Corynebacterium glutamicum*，from biosynthesis of value-added products to bioremediation：a master of many trades[J]. Environmental Research，2022，213：113622.

[12] ZHAO Z Q，CAI M M，LIU Y R，et al. Genomics and transcriptomics-guided metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for *L*-arginine production[J]. Bioresource Technology，2022，364：128054.

[13] 王金多，李澜潇，徐庆阳. *L*-赖氨酸全营养流加发酵工艺的研究[J]. 中国调味品，2022，47(10)：93-97.
WANG J D，LI L X，XU Q Y. Study on technology of total nutrient feeding fermentation of *L*-lysine[J]. China Condiment，2022，47(10)：93-97.(in Chinese)

[14] CHACÓN-NAVARRETE H，MARTÍN C，MORENO-GARCÍA J. Yeast immobilization systems for second-generation ethanol production：actual trends and future perspectives[J]. Biofuels，Bioproducts and Biorefining，2021，15(5)：1549-1565.

[15] 张强，嵇冶. 固定化细胞技术应用于酒精发酵中的研究进展[J]. 化工进展，2017，36(4)：1404-1409.
ZHANG Q，JI Y. Research progress on cell immobilization technology in ethanol production[J]. Chemical Industry and Engineering Progress，2017，36(4)：1404-1409.(in Chinese)

[16] 刘芳，于建生. 细胞固定化及其在酿酒工业中的应用研究进展[J]. 酿酒科技，2013(8)：85-87.
LIU F，YU J S. Research progress in cell immobilization and its application in liquor-making[J]. Liquor-Making Science & Technology，2013(8)：85-87.(in Chinese)

[17] 周康熙，吴铮，冯哲瀚，等. 凝胶珠固定化细胞发酵研究进展[J]. 中国酿造，2021，40(3)：27-32.
ZHOU K X，WU Z，FENG Z H，et al. Research progress in immobilized cell fermentation with gel beads[J]. China Brewing，2021，40(3)：27-32.(in Chinese)

[18] 陈耕，倪育军，钟敏，等. 包埋提高异常威克汉姆酵母醛脱氢酶的稳定性[J]. 食品与机械，2022，38(5)：8-11，18.
CHEN G，NI Y J，ZHONG M，et al. Preliminary study of encapsulation to improve stability of ALDH of *Wickerhamomyces anomalus*[J]. Food & Machinery，2022，38(5)：8-11，18.(in Chinese)

[19] 段昌园，姜雪，曾宏威，等. 表面偶极离子亲水磁珠固定化异柠檬酸裂解酶及其表征[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(1)：20-28.
DUAN C Y，JIANG X，ZENG H W，et al. Immobilization of isocitrate lyase on amphoteric ion-rich hydrophilic magnetic beads and its characterization[J].

Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43（1）：20-28.（in Chinese）

[20] 张华伟，樊帅，杨兆勇，等. 来源于*Anoxybacillus* sp. SK3-4的普鲁兰酶PulASK固定化及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（4）：24-30.
ZHANG H W，FAN S，YANG Z Y，et al. Immobilization of pullulanase PulASK from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 and its enzymatic properties [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（4）：24-30.（in Chinese）

[21] LIU Q G，ZHAO N，ZOU Y N，et al. Feasibility of ethanol production from expired rice by surface immobilization technology in a new type of packed bed pilot reactor[J]. Renewable Energy，2020，149：321-328.

[22] PENG X W，ZHANG D，YUAN J Y，et al. Engineering bacterium for biofilm formation and *L*-lysine production in continuous fermentation[J]. Bioresource Technology，2024，414：131567.

[23] LIU Q G，CHENG H，WU J L，et al. Long-term production of fuel ethanol by immobilized yeast in repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation of cassava[J]. Energy & Fuels，2015，29（1）：185-190.

[24] CHEN H Y，KHUMSUPAN D，PATEL A K，et al. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* K21 *via* coaxial electrospinning of PVA and sugarcane bagasse composite for bioethanol production [J]. Applied Energy，2024，356：122405.

[25] KUPRYASHINA M A，PONOMAREVA E G，PYLAEV T E. Immobilization of *Azospirillum* bacteria on various carriers[J]. Microbiology，2024，93（1）：104-111.

[26] CADIZ J P R，AGCAOILI R P，MAMUAD R Y，et al. Fermentation of sweet sorghum（*Sorghum bicolor* L. Moench）using immobilized yeast（*Saccharomyces cerevisiae*）entrapped in calcium alginate beads [J]. Fermentation，2023，9（3）：272.

[27] 高豪，陆家声，章文明，等. 材料介导细胞固定化技术在生物发酵中的应用[J]. 化工进展，2021，40（7）：3923-3931.
GAO H，LU J S，ZHANG W M，et al. Application of material-mediated cell immobilization technology in biological fermentation [J]. Chemical Industry and Engineering Progress，2021，40（7）：3923-3931.（in Chinese）

[28] YANG Z Y. Immobilization of *Enterococcus faecalis* cells with chitosan：a new process for the industrial production of *L*-citrulline [J]. Process Biochemistry，2015，50（7）：1056-1060.

[29] FENG S J，SRINIVASAN S，LIN Y H. Redox potential-driven repeated batch ethanol fermentation under very-high-gravity conditions[J]. Process Biochemistry，2012，47（3）：523-527.

（责任编辑：张馨文）