

知识介绍

固定化米根霉发酵生产有机酸的 现状及发展趋势

付永前¹, 黄 和^{1,2}, 李 霜^{1,2}, 徐 晴¹, 何 皓¹, 韦 萍^{1,2}

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009;

2. 南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要:米根霉是生产绿色平台生物化学品 L-乳酸、富马酸等有机酸的理想菌种。游离的米根霉发酵生产有机酸时存在菌种利用率低、生产效率低等一系列问题, 菌体固定化发酵研究旨在克服这些困难。目前米根霉固定化发酵生产有机酸技术的研究主要集中于载体固定化技术的研究, 然而无载体固定化技术作为一种全新的细胞固定化技术正在迅速的发展与完善。本文对固定化米根霉发酵生产有机酸的研究现状以及未来发展趋势进行了综合评述与分析。

关键词:米根霉; 固定化; L-乳酸; 富马酸

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)12-0088-04

Development and status quo in organic acid fermentation by immobilized *Rhizopus oryzae*

FU Yong-qian¹, HUANG He^{1,2}, LI Shuang^{1,2}, XU Qing¹, HE Hao¹, WEI Ping^{1,2}

(1. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: *Rhizopus oryzae* is a preferable species for its outstanding ability to directly produce almost optimally pure L-lactic acid and fumaric acid (two green platform biochemicals) from starch with low nutritional requirement. The organic acid fermentation by the free *Rhizopus oryzae* leads to a series of questions, including the lower *Rhizopus oryzae* availability and the lower product yield. So the research of immobilization cell technology is necessarily to be carried out. Current studies on organic acid fermentation by immobilized *Rhizopus oryzae* is mainly focused on the research of carrier immobilization cell technology. The self-immobilization cell technology as a new immobilization cell one is increasingly developed and consummated. In this article, the development and status quo in organic acid fermentation by immobilized *Rhizopus oryzae* are reviewed and discussed in this paper.

Key words: *Rhizopus Oryzae*; immobilization; L-lactic acid; fumaric acid

米根霉菌 (*Rhizopus oryzae*) 具有发酵产物光学纯度高、产酸能力强、营养要求简单、产物容易提纯等优点而被广泛应用于 L-乳酸和富马酸等有机酸的发酵生产中^[1]。传统的根霉菌发酵生产有机酸, 多利用游离的米根霉菌丝在搅拌罐中发酵生产有机酸, 米根霉的菌丝发达, 在罐中易形成大的菌丝团, 造成氧气及其他营养物质的传递困难, 或缠绕在搅拌桨上, 使搅拌阻力增加, 因而有机酸的发酵过程具有产物生成速率低、得率低、生产不稳定等缺点。

固定化技术是利用物理或化学手段将游离的微生物(细胞)或酶, 定位于限定的空间区域, 并使其保持活性且能反复利用的一项技术。它具有处理效率高、稳定性强、无二次污染、能耗低以及菌种高纯高效、生物浓度高、反应易于控制、丧失活性可恢复等优点, 而越来越引起人们的重视。固定化技术最早应用于醋酸的生产, 随着固定化技术的发展, 针对米根霉的固定化技术也应运而生, 与游离细胞发酵工艺相比较, 米根霉固定化技术在发酵生产中的应用

收稿日期: 2008-08-25

基金项目: 国家高科技研究发展计划("863"计划) 专题课题(2006AA02Z240); 国家自然科学基金(20576054; 20706031); 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2007CB707805) 资助

作者简介: 付永前(1980-), 男, 博士生; 韦萍(1961-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事工业微生物及代谢工程的研究, 通讯联系人, 025-86990023, biotech@njut.edu.cn。

具有产品生理活性高、便于提取等优点,有利于工业生产连续化的实现及生产效率的提高,尤其能有效地解除产物抑制型发酵过程中产物的抑制效应。目前固定化米根霉发酵生产有机酸主要集中于载体固定化技术的研究,然而载体固定化细胞技术均使用各种载体材料,载体材料的使用随之带来了许多细胞生理、生态、工艺、工程和经济方面的问题,因此载体固定化细胞技术研究虽然已有近40年的历史,但真正实现大规模工业化应用成功的实例却不多;无载体固定化即利用细胞自絮凝形成的颗粒^[2]作为一种固定化细胞的方法,是固定化细胞技术中全新的概念,随着生物技术及材料、化工等各相关学科的发展,无载体固定化作为一种全新的细胞固定化技术,也在不断地成熟与完善。下文简要介绍了固定化米根霉发酵生产有机酸技术的研究和应用以及未来发展趋势。

1 米根霉固定化技术

1.1 载体固定化

载体固定化即传统的微生物固定化技术,总体上可分为包埋法、吸附法、共价法和交联法四大类,相关文献报道米根霉载体固定化发酵生产有机酸宜采用包埋法和吸附法。

1.1.1 包埋法

包埋法是使细胞扩散进入多孔性载体内部,或利用高聚物在形成凝胶时将细胞包埋在其内部。对于米根霉的固定化技术,研究者大多使用软凝胶,如海藻酸钙等。Hang等^[3]采用海藻酸钙包埋米根霉发酵生产L-乳酸,连续发酵5批后,L-乳酸产量仍能达到62 g/L左右,葡萄糖的利用率达到72%;李学梅等^[4]采用海藻酸钙包埋米根霉在三相流化床中进行间歇或者连续发酵,结果表明固定化米根霉的产酸率达2.7~3.6 g/(L·h),得率为70%~80%。但海藻酸钙在生产过程中,存在凝胶颗粒易发生破损、软化等问题,使得凝胶颗粒的稳定性和机械强度相对较差,不利于固定化细胞的多次利用,因此尚难以实现工业化。鉴于海藻酸钙的不足,研究者开始对米根霉其他的载体固定方法进行研究。

1.1.2 吸附法

载体对微生物的吸附,主要是载体与微生物之间的静电相互作用的结果。固定化对于吸附载体的要求包括:具有抗物理降解、抗化学降解、抗生物降解的稳定性,以及具有一定的机械强度和结构稳定性。

(1)聚氨酯泡沫吸附。聚氨酯泡沫固定与海藻酸钙固定法相比,固定化成本低,固定化后形成的菌丝球内部空隙率较高,菌丝球内传质较好。白姝等^[5]1996年首次开展了聚氨酯泡沫固定米根霉发酵生产L-乳酸工艺的研究,发现聚氨酯泡沫固定化发酵产酸速率是游离菌的3倍以上,糖转化率达77.70%,反复间歇发酵可稳定10批次以上;陈育如等^[6]对聚氨酯泡沫和海藻酸钠固定米根霉发酵乳酸的用量及最大比反应速率进行比较,得出聚氨酯泡沫是较好的米根霉固定化载体。

(2)固定化生物反应器。固定化生物反应器在生物过程中为细胞代谢提供了一个适宜的物理及化学环境,促使细胞更好生长,并得到更多的生物量或代谢产物,是实现生物技术产品工业化的关键设备。目前米根霉吸附固定化生物反应器主要集中于纤维膜反应器和转盘反应器的研究。Tay等^[7]利用纤维膜生物反应器固定米根霉发酵生产L(+)-乳酸,其最大产酸速率达到了2.5 g/(L·h),乳酸产量达到了127 g/L;Cao等^[8]利用生物转盘反应器与离子交换树脂耦合技术进行富马酸发酵的研究,发酵周期缩短到20 h,产酸速率达到了4.25 g/(L·h),是传统富马酸发酵的4.7倍。

(3)其他载体固定化吸附。还有研究者使用其他的高分子载体如聚乙烯醇凝胶、海绵或脱脂纱布等作为载体固定化米根霉发酵生产有机酸。Efremenko等^[9]将聚乙烯醇的水溶液冷冻处理后就得到大孔黏性凝胶材料,批次发酵生产乳酸,乳酸得率达到94%,半连续发酵生产乳酸,乳酸得率达到54%,最高乳酸产量能达到174 g/L以上;Ganguly等^[10]在每100 mL培养基中放入4块经过一定处理的1.008 cm³的海绵,经过48 h的发酵,能够得到80.75 g/L的最大乳酸产量,并且能够循环生产10批次以上;Tamada等^[11]将米根霉细胞固定化到聚二甲基丙烯酸乙二醇酯为单体用 γ 射线诱导得到的高分子载体上,固定化后的乳酸得率大于65%,比产酸速率与游离菌相比,提高了1.8倍。

虽然用于米根霉固定化发酵生产有机酸的载体种类相对比较多(如表1所示),但是很少能优化出用于大规模生产并创造出良好的经济效益的载体规格,同时载体材料的使用随之带来了许多细胞生理、生态、工艺、工程和经济方面的问题,因此载体固定化米根霉发酵生产有机酸技术较难实现于大规模的工业化应用。

表 1 载体固定化米根霉发酵生产有机酸

固定化载体	产量/ g·L ⁻¹	生产速率/ g·L ⁻¹ ·h ⁻¹	得率/%	文献
海藻酸钙	62.4	2.60	72	[3]
	—	2.7~3.6	70~80	[4]
	100	2.8	76.9	[12]
聚氨酯泡沫	—	—	77.7	[5]
	82.2	—	82.5	[6]
纤维膜反应器	127	2.5	—	[7]
转盘反应器	85	4.25	91	[8]
聚乙烯醇凝胶	174	—	94	[9]
海绵	80.75	1.84	—	[10]
PVP 高分子	50	0.7	71	[11]

1.2 无载体固定化

某些微生物细胞具有自絮凝形成颗粒的能力,而无载体固定化技术即利用细胞自絮凝形成的颗粒作为一种固定化细胞的方法,无需附加固定化载体,成本低廉,具有操作简便、生产强度高、对菌体损伤小、生产稳定性好等优点。

米根霉菌球的形成以及菌球形态的控制,是无载体固定化米根霉发酵生产有机酸的关键。像其他丝状真菌属微生物一样,米根霉表现出复杂的生长形态,主要有菌丝、菌球和大块聚集物,其生长形态主要受以下因素的影响:菌种本身的特性、营养供应情况、培养基的 pH、搅拌、通气、接种量和基质浓度等^[13-14]。目前米根霉发酵生产有机酸的无载体固定化技术的研究,多集中于通过控制菌体形态使之自聚集成为一定大小的球体进行有机酸发酵。Bai 等^[15]通过控制米根霉培养液中 Na⁺ 和 K⁺ 离子浓度形成的菌丝絮凝体,乳酸生产速率达到了 3.26 g/(L·h),循环发酵 10 批次后,乳酸产量还能达到 64 g/L 以上,糖转化率达到 68%;Zhou 等^[16]研究了不同 pH 和金属离子对菌体形态及产酸的影响,发现当种子培养基中 pH 为 3.05, Mg²⁺、Zn²⁺ 和 Fe²⁺ 的质量分数达到 50 × 10⁻⁶、4 × 10⁻⁶ 和 100 × 10⁻⁶ 时,形成菌球直径约为 1.5 mm,在此直径下富马酸产量最高;Du 等^[17]通过控制 CaCO₃ 的添加时间使米根霉呈直径为 1~2 mm 的小球体形态,与菌丝体形态的米根霉乳酸发酵相比,得率由 80% 提高至 86%,乳酸生成速率由 1.46 g/(g·h) 提高为 1.53 g/(g·h)。Liao 等^[18]综合考察了孢子接种浓度和培养基成分对菌

体形态的影响,发现当接种孢子浓度控制在 1.5 × 10⁶ 个/mL,在 PDB 培养液中添加大豆蛋白胨和 CaCO₃ 时,菌球平均直径控制在 1.5~1.7 mm,在此菌球形态下,发酵培养 30 h 后,乳酸产量就达到 65 g/L,而游离细胞发酵 60 h,乳酸产量才达到 32 g/L,利用该菌球形态发酵生产富马酸,富马酸产量比游离细胞提高了 44%。国内外无载体固定化米根霉发酵生产有机酸的研究结果总结于表 2。

表 2 无载体固定化米根霉的研究概况

发酵方式	菌球大小/ mm	产量/ g·L ⁻¹	生产速率/ g·L ⁻¹ ·h ⁻¹	得率/ %	文献
泡罩塔反应器 (L-乳酸)	1~2	66	1.53	86	[17]
摇瓶(L-乳酸)	1.7	65	2.17	—	[18]
搅拌罐(L-乳酸)	1.13 ± 0.22	92	0.7	60	[19]
摇瓶(富马酸)	1~1.5	39.3	0.55	45.32	[16]
	1.5	31	0.33	—	[18]

无载体固定化细胞技术中的自絮凝细胞颗粒对生物反应器的设计和生产原料的前处理工艺具有特殊的要求,实现无载体固定化米根霉工业化生产有机酸还存在一定的难度,但无载体固定化细胞技术所体现出来的细胞固定化过程中无附加成本、生物反应过程的高效率(与游离细胞过程相比其宏观生物反应速率可以提高十几倍到几十倍)、反应后体系中细胞容易分离、细胞可以长期连续使用等突出优点,使米根霉无载体固定化发酵生产有机酸蕴涵着潜在的工业价值。

2 展望

固定化米根霉发酵生产有机酸的技术研究都尚不成熟。米根霉载体固定化技术在载体的毒性及其性能,固定化细胞的机械强度、传质性和无杂菌性等方面还存在不足,同时,发酵设备在发酵过程中通气率和固定化面积对有机酸产率、收率有很大影响,该方法还无法适应大规模的工业化生产。米根霉无载体固定化技术的研究起步较晚,目前还主要集中于米根霉菌球形成的条件、以及菌球生长形态与产酸之间影响的研究,但该技术中自絮凝细胞颗粒对生物反应器的设计和生产原料的前处理工艺却有特殊的要求,使该技术在米根霉发酵生产有机酸产业中的推广与应用还存在很大困难。可是无载体固定化细胞技术所体现出来的突出优点,展示了该新工艺

技术在有机酸发酵工业方面存在广阔的应用前景,相信随着生物技术及材料、化工等各相关学科的发展,无载体固定化米根霉发酵生产有机酸的研究会取得新的突破,而着眼于菌球形成机理和动力学方面的反应器研究,也将有助于无载体固定化米根霉生产有机酸的工业化发展。

参考文献

- [1] Oda Y, Yajima Y, Ohnishi M, et al. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition[J]. Food Microbiology, 2003, 20: 371 - 375.
- [2] 白凤武. 无载体固定化细胞的研究进展[J]. 生物工程进展, 2000, 20(2): 32 - 36.
- [3] Hang Y D, Hamamei H, Woodams E E. Production of *L*(+) -lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels[J]. Biotechnology Letters, 1989, 11(2): 119 - 120.
- [4] 李雪梅, 林建平, 刘茉娥, 等. 固定化米根霉发酵制 *L*-乳酸[J]. 菌物系统, 1998, 17(4): 318 - 326.
- [5] 白姝, 董晓燕, 孙彦. 固定化米根霉生产 *L*-乳酸的研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(3): 140 - 143.
- [6] 陈育如, 夏黎明, 岑沛霖. 利用固定化米根霉在三相流化床中发酵生成 *L*-乳酸[J]. 微生物学报, 2000, 40(4): 415 - 419.
- [7] Tay A, Yang S T. Production of *L*(+) -lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 80(1): 1 - 12.
- [8] Cao N J, Du J X, Gong C S, et al. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column[J]. Applied And Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2926 - 2931.
- [9] Efremenko E N, Spiricheva O V, Veremeenko D V, et al. *L*(+) -lactic acid production using poly(vinyl alcohol)-cryoge *L*-entrapped *Rhizopus oryzae* fungal cell[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81: 519 - 522.
- [10] Ganguly R, Dwivedi P, Singh R P. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1246 - 1251.
- [11] Tamada M, Begun A A, Sadi A. Production of *L*-lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by γ -ray induced polymerization[J]. Biotechnol Bioeng, 1992, 74(6): 379 - 383.
- [12] Lin J P, Zhou M H, Zhao X W, et al. Extractive fermentation of *L*-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed[J]. Chemical Engineering and Processing, 2007, 46: 369 - 374.
- [13] Liao W, Liu Y, Chen S L, et al. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus-*Rhizopus oryzae*[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(18): 3415 - 3423.
- [14] Kelly S, Grimm L H, Jonas R, et al. Investigations of the morphogenesis of filamentous microorganisms[J]. Eng Life Sci, 2006, 6(5): 475 - 480.
- [15] Bai D M, Jia M Z, Zhao X M. *L*-lactic acid product by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor[J]. Chemical Engineering Science, 2003, 58: 785 - 791.
- [16] Zhou Y, Du J, Tsao G T. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84/86: 779 - 789.
- [17] Du J X, Cao N J, Gong C S. Production of *L*-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermentor[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 70/71/72: 323 - 329.
- [18] Liao W, Liu Y, Chen S L. Studying pellet formation of a filamentous fungus *Rhizopus oryzae* to enhance organic acid production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 137 - 140: 1 - 12.
- [19] Liu Y, Liao W, Liu C B, et al. Optimization of *L*(+) -lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 129/132: 844 - 853.

生物炼制技术交流和产业化研讨大会在厦门隆重召开

由中国化工信息中心、厦门大学化学化工学院、中国科学院过程工程研究所、中国科学院广州能源研究所生物质能中心、中国林业科学研究院林产化学工业研究所、教育部生物炼制工程研究中心、中国农业科学院生物质能研究中心、中国科学院海洋研究所、中国科学院青岛生物能源与过程研究所(筹)9家单位联合主办的“生物炼制技术交流和产业化研讨大会——第三届全国化工应用技术开发热点研讨会”于2008年11月11—14日在厦门隆重召开,近200名来自科研单位、大学、企业、跨国公司的专家和代表参加了本次大会。《现代化工》编辑部为本次大会的承办单位。

中国林业科学院首席科学家宋湛谦院士担任了本次大会主席。会议期间,来自国内外的著名专家为代表呈现了25个精彩的大会报告。宋湛谦院士就生物炼制产业与林产化工作了重要报告,报告指出:第十一个五年规划纲要

已经把发展生物质产业作为重要内容,明确提出“实施生物产业专项工程,努力实现生物产业关键技术和重要产品研制的新突破”,介绍了我国林产化学工业现状,并展望了未来林产化工发展方向。国家发展和改革委员会产业经济与技术经济研究所所长王昌林研究员从政策入手,详细介绍了我国生物化工产业现状与发展趋势,并对部分生物化工产品尤其是重点发展产品的研发、生产现状及发展趋势进行了分析介绍。其他24名专家就新一代生物质能源、生物材料、平台化合物、生物炼制关键技术等热点问题做了大会主题报告。

本次大会有以下特点:组织机构阵容强大,9家主办单位均为业内权威单位,专家队伍权威,资深院士挂帅;会场气氛热烈,无论是大会主题报告还是分会报告,均引起了与会代表的浓厚兴趣,代表踊跃参与提问和讨论,专家、代表之间交流积极。(《现代化工》编辑部)