

豆粕水解液为氮源细菌厌氧流加发酵生产 L-乳酸

丁绍峰, 谭天伟

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要: 采用细菌厌氧发酵法生产 L-乳酸, 由实验确定了最佳接种量、发酵温度和 pH 调节剂, 考察了初始葡萄糖浓度对 L-乳酸生产的影响, 确定初始糖浓度为 70~90 g/L 时得率、产率、最终生物量分别达到 92.68 g/g, 3.17 g/(L·h) 和 8.5×10^7 mL⁻¹. 为进一步降低 L-乳酸生产成本, 以豆粕水解液为氮源代替酵母粉, 同时应用流加发酵技术, L-乳酸产量、得率、产率及转化率分别达到 155 g/L, 95.5 g/g, 1.64 g/(L·h) 和 96.9%. 在保证 L-乳酸最终浓度的同时可降低生产成本, 为进一步工业化奠定了基础.

关键词: L-乳酸; 豆粕水解液; 流加发酵

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)01-0077-05

1 前言

发酵法生产 L-乳酸的菌种主要有乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和根霉属 (*Rhizopus*)^[1]. 用根霉发酵生产 L-乳酸为好氧发酵, 存在工艺能耗大、糖利用率低等缺点. 采用乳酸菌发酵生产 L-乳酸具有糖利用率高、不耗氧、能耗低、设备简单、操作方便等优点, 在乳酸工业中具有广阔的发展前景^[2-4].

目前国外关于 L-乳酸发酵的研究主要集中在连续发酵及发酵与分离技术相偶联, 如 Li 等^[5]将电渗析与双极膜电渗析技术相结合, 能及时分离乳酸, 控制 pH 值. Gao 等^[6]使用连续电渗析发酵装置, L-乳酸产率、得率分别达到 8.18 g/(L·h) 和 0.69 g/g. 连续发酵可以消除产物抑制, 大幅度提高 L-乳酸的生产效率, 但应用于大规模生产还不够成熟^[7,8]. 国内采用乳酸菌发酵生产 L-乳酸的研究以分批发酵为主, 如乐晓洁等^[9]通过培养基优化, L-乳酸产量达到 103 g/L. 闫智慧等^[10]用氨水中和乳酸, L-乳酸浓度、产率分别达到 136.8 g/L 和 1.71 g/(L·h). 李剑等^[11]在培养基中添加多种氨基酸及生长因子, L-乳酸产量、得率及产率分别达到 140.3 g/L, 0.94 g/g 和 1.95 g/(L·h). Bai 等^[12]应用恒速流加发酵策略, L-乳酸产量、得率及产率分别达到 210 g/L, 0.97 g/g 和 2.2 g/(L·h). 以上研究存在的不足是培养基成分比较复杂, 其中包括酵母粉、蛋白胨等高成本原料. Kwon 等^[13]的研究表明, 乳酸发酵中酵母粉等氮源的成本占总发酵成本的 30%左右. 针对以上问题, 本研究以豆粕水解液作为氮源代替酵母粉, 结合流加发酵技术, 在保证 L-乳酸产量的同时可降低生产成本.

2 材料与方 法

菌种: 干酪乳杆菌属的细菌菌株 (*Lactobacillus* LA-04-01), 本研究室分离诱变得到.

主要设备: HYG-A 摇床(太仓市实验设备厂), 5 L 发酵罐(镇江东方生物工程设备公司), SBA-40C 生物传感分析仪(山东科学院), 血球计数板(上海科宇科技公司).

主要原料: 工业葡萄糖(河北康欣制药公司), 豆粕(吉林裕龙植物油公司), 玉米浆(华北制药厂).

种子培养基(%): 葡萄糖 3, 酵母粉 1, 蛋白胨 1.5, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸铵 0.5, 轻质碳酸钙 2. 调节 pH 为 6.25, 108 °C 灭菌 20 min.

发酵培养基(%): 工业葡萄糖 3~18.5, 豆粕水解液(干重) 2.5, 玉米浆 1. 调节 pH 为 6.25, 108 °C 灭菌 20 min.

豆粕水解液生产方法: 采用低温浸出工艺副产的豆粕, 按豆粕干重的 4 倍加入 1.5% 的稀硫酸, 90 °C 水解 20 h.

培养方法: 接种量及培养温度的确定采用摇瓶实验, 250 mL 摇瓶装液量 100 mL. 摇床转速为 150 r/min, pH 调节剂为 2 g CaCO₃, 单独灭菌, 在接种时无菌加入. 其他发酵过程均在 5 L 发酵罐内进行, 装液量 3.5 L, 搅拌转速 200 r/min. 由蠕动泵分别将浓度为 50% 的 CaCO₃ 乳液、50% 的 Ca(OH)₂ 乳液、25% 的氨水自动加入发酵罐内, 使 pH 值稳定在 6.25.

分析方法: 葡萄糖和 L-乳酸的定量分析采用 SBA-40C 型生物传感分析仪.

菌体生长及杂菌污染情况分析: 血球计数板显微镜观察, 计数方法按照文献[14]进行.

收稿日期: 2005-02-25, 修回日期: 2005-04-22

基金项目: 国家“973”基金资助项目(编号: 2003CB716002); 国家“863”基金资助项目(编号: 2002AA217022)

作者简介: 丁绍峰(1977-), 男, 吉林省辽源市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 谭天伟, 通讯联系人, E-mail: tantw@mail.buct.edu.cn.

3 结果与讨论

3.1 接种量的确定

图 1 为不同接种量的 L-乳酸发酵结果. 培养基为(%): 工业葡萄糖 3, 豆粕水解液(干重) 2.5, 玉米浆 1. 由图可见, 接种量为 10% 时最终 L-乳酸产量最高; 接种量为 5% 时, 由于菌体不足, 产酸速度较慢; 接种量 15% 时前期产酸速度过快, 营养消耗过多, 后期菌体老化产

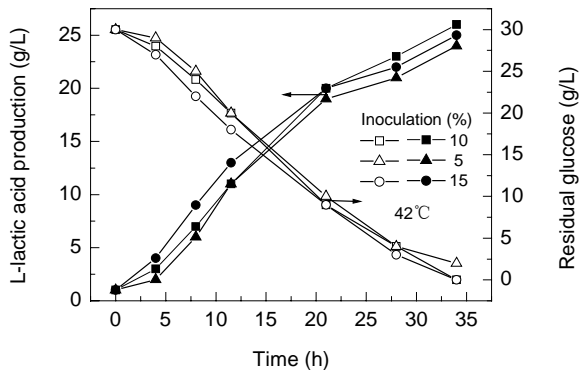


图 1 不同接种量时 L-乳酸发酵结果

Fig.1 L-lactic acid production with different inoculations

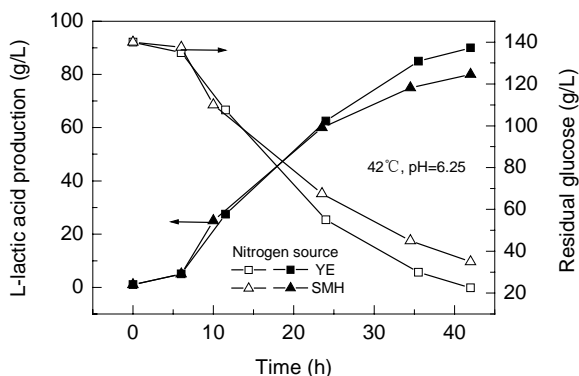


图 3 豆粕水解液和酵母粉为氮源的 L-乳酸发酵结果

Fig.3 Comparison of fermentations supplemented with soybean meal hydrolysate (SMH) and yeast extract (YE)

3.3 豆粕水解液代替酵母粉的可行性

乳酸菌对营养要求苛刻, 发酵培养基中常要加入酵母粉、蛋白胨等昂贵氮源, 因此增加了发酵成本. 图 3 是分别用豆粕水解液和酵母粉为氮源时发酵结果的比较. 培养基分别为(%): (1) 工业葡萄糖 14, 豆粕水解液(干重) 2.5, 玉米浆 1; (2) 工业葡萄糖 14, 酵母粉 2, KH_2PO_4 0.02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00%, 乙酸钠 0.05, 柠檬酸铵 0.02. 从图中可以看出, 两者作为氮源前 24 h L-乳酸生产差别不大, 24 h 后豆粕水解液提供的营养成分显现出不足. 但与酵母粉相比, 豆粕水解液价格低廉, 以降低工业化生产成本为研究目的, 本

酸速度放慢. 因此以后的实验均采用 10% 的接种量.

3.2 培养温度的确定

大多数乳酸菌在 37~42°C 生长最好. 图 2 是不同温度下 L-乳酸发酵结果. 培养基为(%): 工业葡萄糖 3, 豆粕水解液(干重) 2.5, 玉米浆 1. 可以看出 42°C 时最终 L-乳酸产量最高, 38°C 时前期产酸较慢, 最终糖利用不完全, 46°C 时 L-乳酸产量最低. 因此后续实验均采用 42°C 发酵.

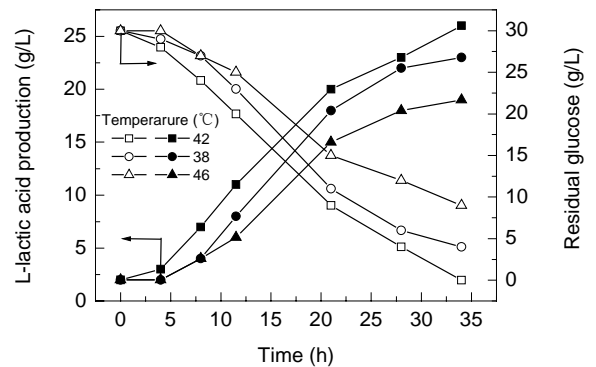


图 2 不同温度时 L-乳酸发酵过程

Fig.2 L-lactic acid production at different temperatures

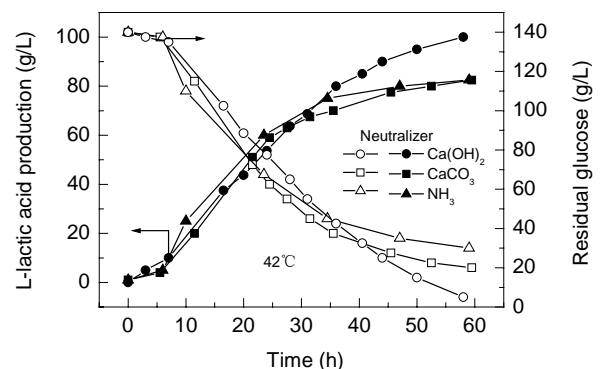


图 4 添加不同 pH 调节剂的 L-乳酸发酵结果

Fig.4 L-lactic acid production with different pH neutralizers

工作采用豆粕水解液为氮源.

3.4 pH 调节剂的确定

发酵法生产 L-乳酸, 随着 L-乳酸的积累, pH 降低, 使乳酸的离解平衡朝着非离子形式进行. 非离子状态的乳酸对微生物是有毒的, 细胞的生长和 L-乳酸的生产都会受到抑制. 为了解决发酵过程中游离乳酸对乳酸菌的生长和乳酸生产带来的影响, 发酵过程必须加入 pH 调节剂.

图 4 为添加不同 pH 调节剂时的 L-乳酸发酵结果. 培养基为(%): 工业葡萄糖 14, 豆粕水解液(干重) 2.5, 玉米浆 1. 从图可以看出, 用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 优于

CaCO₃ 和 NH₄OH. 这主要是由于 Ca(OH)₂ 碱性强于 CaCO₃, 易同乳酸反应; 而用 CaCO₃ 调节 pH 值时会产生大量 CO₂, 过量的 CO₂ 会对菌体造成毒害; 用 NH₄OH 调节 pH, 发酵前期 L-乳酸生产速度快, 这是由于 NH₄OH 增加了发酵液中氮源的浓度, 从而促进了菌体生长, 但是由于菌体生长过快, 导致乳酸过快积累, 抑制了后期菌体的生长, 且 NH₄OH 比 Ca(OH)₂ 刺激性大, 过量的氨水对菌体有毒害作用. 因此以后的实验均采用 Ca(OH)₂ 调节 pH.

3.5 菌体生长与 L-乳酸发酵的偶联关系

图 5 为菌体生长与 L-乳酸发酵的关系. 接种后的 6 h 内, 菌体生长处于延迟期, 6~28 h 为指数生长期, 28 h 后为停滞期. 可以看出该菌株既属生长相关, 也属生长不相关, 在细胞停止生长后菌体会继续发酵. 但在不同生长期 L-乳酸的生产速度不同, 延迟期、指数期、停滞期产率分别为 1.25, 3.89 和 0.66 g/(L·h).

3.6 初始葡萄糖浓度的影响

表 1 为初始葡萄糖浓度对分批发酵的影响. 培养基为(%): 工业葡萄糖 3~18.5, 水解豆粕(干重) 2.5, 玉米浆 1. 由表可以看出, 最终 L-乳酸浓度随着初始糖浓度的增加而增加, 初始糖浓度在 70~90 g/L 时, 得率、产

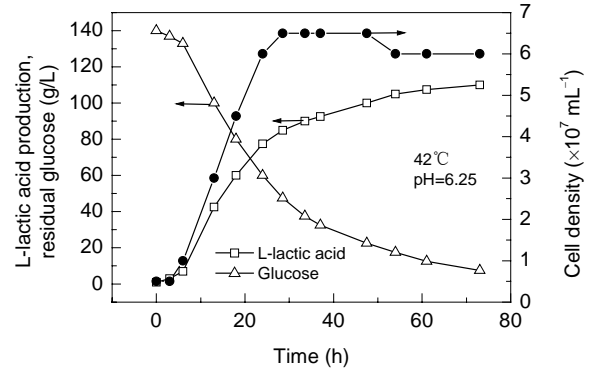


图 5 菌体生长与 L-乳酸发酵的关系
Fig.5 Relationship between cell density and production of L-lactic acid

率、最终生物量分别约为 0.93 g/g, 3.17 g/(L·h), 8.5×10⁷ mL⁻¹, 达到最大.

出现上述情况的原因是, 在低糖浓度下, 乳酸菌通过磷酸己糖途径发酵, 同型发酵转化为异型发酵; 而在高糖浓度培养基中, 渗透压增大, 使菌体不能正常生长和代谢. 综上所述, 为了得到高的 L-乳酸产率及得率, 可以将初糖浓度控制在 70~90 g/L 附近.

表 1 初始葡萄糖浓度对 L-乳酸发酵的影响

Table 1 Effect of initial glucose concentrations on L-lactic acid production

Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)	Fermentation time (h)	The rate of glucose consumed (%) ¹⁾	Yield (g/g) ²⁾	Productivity [g/(L·h)]	Final cell density (×10 ⁷ mL ⁻¹)	L-lactic acid production (g/L)
32.0	0.0	11.0	100.0	0.88	2.64	6.0	29
50.0	0.0	14.0	100.0	0.89	3.14	7.5	44
72.0	0.0	20.5	100.0	0.92	3.17	8.5	65
90.0	0.0	27.5	100.0	0.93	2.91	8.0	80
115.0	0.0	34.0	100.0	0.91	2.50	7.5	85
127.5	0.0	35.0	100.0	0.90	2.30	7.0	90
142.5	7.5	73.0	94.2	0.89	1.51	7.0	110
162.5	10.0	107.5	93.9	0.87	1.09	6.0	118
185.0	30.0	120.0	81.9	0.87	1.02	6.0	123

Note: Temperature was 42°C, and pH was maintained at 6.25 by automatic addition of Ca(OH)₂; 1) Glucose consumed/total glucose added; 2) Yield of L-lactic acid on total glucose consumed.

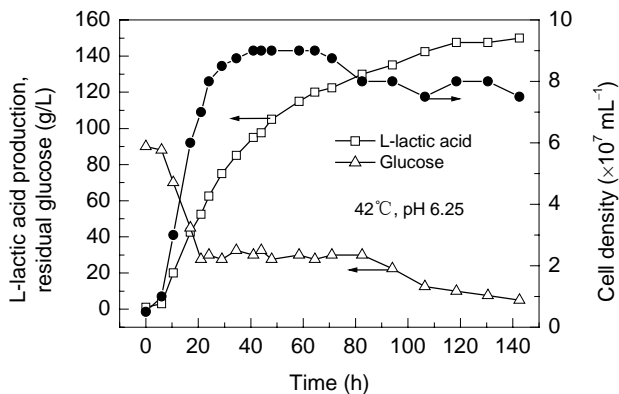


图 6 流加碳源的 L-乳酸发酵结果
Fig.6 L-lactic acid production fed with glucose only

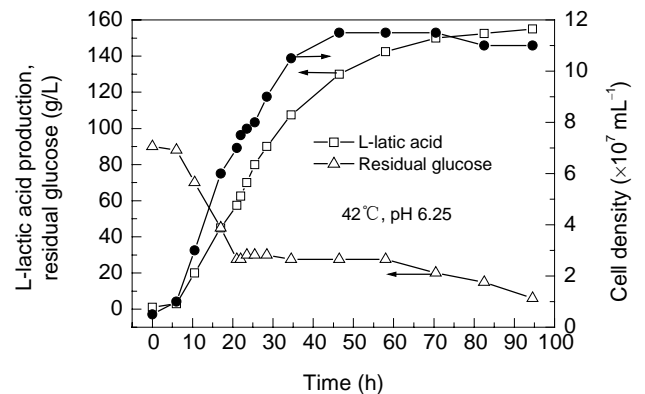


图 7 同时流加碳源氮源的 L-乳酸发酵过程
Fig.7 L-lactic acid production fed with both glucose and SMH

3.7 流加技术用于L-乳酸发酵

流加碳源: 初始培养基为工业葡萄糖 90 g/L, 豆粕水解液(干重) 2.5%, 玉米浆 1%。整个发酵过程只流加浓度为 830 g/L 的葡萄糖。图 6 是流加碳源的 L-乳酸发酵结果。当发酵 20 h 后, 菌体生长处于最旺盛时期, 此时开始流加, 保持残糖浓度维持在 30 g/L 附近, 即保持菌体生长环境的相对稳定。为了降低发酵结束时残糖的浓度, 当发酵进行到 82.5 h 时停止流加。

同时流加碳源氮源: 初始培养基与只流加碳源时相同, 流加底物含有 830 g/L 的葡萄糖及干重 2.5 g/L 的豆粕水解液。图 7 是同时流加碳源氮源时的 L-乳酸发酵结果。当发酵进行到 20 h, 菌体生长处于最旺盛时期, 此时开始流加, 保持残糖浓度在 30 g/L 附近, 当发酵进行到 58 h 时停止流加。

表 2 是分批发酵中 L-乳酸产量最高的批次、流加碳源发酵、同时流加碳源氮源发酵的比较。从表 2 和图 6, 7 可以看出: (1) 流加发酵最终 L-乳酸产量、得率、产率及转化率均高于 L-乳酸产量最高的分批发酵; (2) 在流加发酵中, 外加氮源能明显提高生物量, 延长指数生长期, 使发酵过程缩短了约 50 h, 产酸速率得到提高; (3) 流加发酵因加入了 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 乳液及底物使最终发酵液体积增加约 60%, 远高于只加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 乳液分批发酵的发酵液体积增加量(11.3%), 表明流加发酵生产能力大, 有利于工业化生产。

表 2 分批发酵中 L-乳酸产量最高的批次与流加发酵的比较
Table 2 Comparison of the batch culture of maximum L-lactic acid production with fed-batch culture

	Batch culture	Fed-batch culture I ¹⁾	Fed-batch culture II ²⁾
L-lactic acid production (g/L)	122.5	150	155
Residual glucose (g/L)	30	5	6
Yield (g/g)	0.87	0.96	0.96
Productivity [g/(L·h)]	1.02	1.05	1.64
Rate of glucose consumed (%)	81.9	97.1	96.9
Initial broth volume (L)	2.9	2.0	2.0
Final broth volume (L)	3.23	3.2	3.22

Note: Temperature was 42°C, and the pH was maintained at 6.25 by automatic addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$; 1) L-lactic acid production fed with glucose; 2) L-lactic acid production fed with both glucose and SMH.

流加发酵的产率低于表 1 中大多数批次发酵, 主要是因为 L-乳酸发酵产物抑制明显。从图 7 流加发酵过程可以看出, L-乳酸生产速度随着产物浓度增加而降低, 因此使整个过程产率偏低。而批次发酵最终 L-乳酸浓度较低, 产物抑制不明显。工业生产中, 从是否有利于下游分离的角度考虑, 非常重视发酵液中 L-乳酸的浓度, 因此流加发酵是有优势的。以后的工作重点可以放在优化氮源及流加发酵策略, 以进一步提高 L-乳酸产率和产量。

4 总结

价格因素阻碍了 L-乳酸的大规模应用, 因此提高 L-乳酸产量并找到廉价的生产原料尤为重要。刘勇军等^[15]曾用玉米浆、番茄汁作为廉价原料, L-乳酸产量、得率分别达到 104 g/L 和 0.90 g/g。Kwon 等^[13]用大豆粉水解物代替酵母浸出物, 并添加泛酸等多种维生素, L-乳酸产量、得率及产率分别达到 125 g/L, 0.92 g/g, 2.27 g/(L·h)。本实验以降低 L-乳酸生产成本为目的, 采用细菌厌氧发酵, 验证了以豆粕水解液作为氮源的可行性, 结合流加发酵技术, L-乳酸产量、得率、产率及转化率分别达到 155 g/L, 0.96 g/g, 1.64 g/(L·h) 和 96.9%, 在保证 L-乳酸产量的同时可降低生产成本, 为进一步工业化奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yun J S, Wee Y J, Ryu H W. Production of Optically Pure L(+)-lactic Acid from Various Carbohydrates by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, 33: 416-423.
- [2] 徐忠, 汪群慧, 江兆华. L-乳酸的制备及其应用的研究进展 [J]. 2004, 25(4): 185-188.
- [3] 闫智慧, 高静, 周丽亚, 等. 乳酸的应用与发酵生产工艺 [J]. 河北工业大学学报, 2004, 33(3): 15-19.
- [4] 路福平, 戚薇, 王进华, 等. 芽孢乳酸菌产乳酸条件的研究 [J]. 天津轻工业学院学报, 1998, 2: 10-14.
- [5] Li H, Mustacchi R, Knowles C. An Electrokinetic Bioreactor: Using Direct Electric Current for Enhanced Lactic Acid Fermentation and Product Recovery [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(3): 655-661.
- [6] Gao M T, Michiteru K, Rie G. Development of a Continuous Electrodeialysis Fermentation System for Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Process Biochem.*, 2005, 40(3): 1033-1036.
- [7] 卢金照, 高年发, 杨枫. 乳酸的发酵与提取耦合工艺 [J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 17-19.
- [8] Wang, F S, Lin K J. Performance Analysis and Fuzzy Optimization of a Two-stage Fermentation Process with Cell Recycling Including an Extractor for Lactic Acid Production [J]. *Chem. Eng. Sci.*, 2003, 58(16): 3753-3763.
- [9] 乐晓洁, 王昌禄, 顾晓波, 等. 细菌发酵生产 L-乳酸培养基的优化 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 55-58.
- [10] 闫智慧, 白冬梅, 高静, 等. 氨水中和 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* BME5-18M 发酵生成 L-乳酸铵的研究 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 30-33.
- [11] 李剑, 高年发, 刘伟, 等. *Lactobacillus delbrueckii* 营养条件的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 27-30.
- [12] Bai D M, Wei Q, Yan Z H. Fed-batch Fermentation of *Lactobacillus lactis* for Hyper-production of L-lactic Acid [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2003, 25: 1833-1835.
- [13] Kwon S, Lee P C, Lee E G. Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* with Vitamin-supplemented Soybean Hydrolysate [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26(2): 209-215.
- [14] 范秀容, 沈萍. 微生物学实验 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 48-50.
- [15] 刘勇军, 王昌禄, 乐晓洁, 等. 细菌 L-乳酸发酵的研究—响应面分析法(RSA)优化培养基及控氧研究 [J]. 食品工业科技, 2003, 2: 41-47.

Production of L-Lactic Acid by Anaerobic Fed-batch Fermentation by Lactic Acid Bacteria with Soybean Meal Hydrolysate as Nitrogen Source

DING Shao-feng, TAN Tian-wei

(Key Lab Bioprocess of Beijing, Col. Life Sci. & Technol., Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The L-lactic acid production by anaerobic fermentation of lactic acid bacteria was studied. The effects of fermentation conditions such as inoculation, temperature and pH neutralizer on the fermentation of L-lactic acid were determined. When the initial medium containing 70~90 g/L glucose was used, the maximum L-lactic acid yield (92.68%) on total glucose consumed, L-lactic acid productivity [3.17 g/(L·h)] and the cell final biomass ($8.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) were obtained. A new promising nitrogen source, soybean meal hydrolysate (SMH), can replace yeast extract (YE) completely in order to reduce the manufacturing cost of lactic acid. The maximum L-lactic acid concentration (155 g/L) in fed-batch culture was obtained besides L-lactic acid yield, productivity and the rate of glucose consumed were up to 95.5 g/g, 1.64 g/(L·h) and 96.9% respectively.

Key words: L-lactic acid; soybean meal hydrolysate; fed-batch fermentation