

# 固定化乳酸杆菌发酵纤维素水解液的研究\*



沈雪亮, 夏黎明\*

(浙江大学 材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310027)

SHEN X L

**摘 要:** 采用海藻酸钙凝胶包埋法固定德氏乳酸杆菌, 固定化细胞可有效地利用纤维素水解液发酵生产乳酸。与游离细胞相比, 固定化细胞具有发酵时间短、乳酸得率高等优点, 其最适发酵温度为 48 ℃, 添加适量的麸皮水解液对乳酸发酵有明显的促进作用, 乳酸得率可达 90.1%。利用固定化细胞重复分批发酵纤维素水解液生产乳酸, 连续 16 批发酵试验表明, 固定化细胞性状稳定, 产酸能力强, 乳酸平均得率为 88.6%。利用固定化细胞在柱式反应器中连续发酵纤维素水解液, 当稀释率为 0.12 h<sup>-1</sup> 时, 乳酸得率和生产效率分别达到 80.2% 和 4.97 g/(Lh)。

**关键词:** 固定化德氏乳酸杆菌; 纤维素水解液; 乳酸; 发酵

中图分类号: TQ921.3; TQ353.14 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2004)02-0035-04

## LACTIC ACID FERMENTATION BY IMMOBILIZED *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* CELLS USING CELLULOSIC HYDROLYSATE

SHEN Xue-liang, XIA Li-ming

(College of Materials Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** Cellulosic material is the most abundant renewable carbon source in the world. Using cellulosic hydrolysate instead of starch for lactic acid production is meaningful. *Lactobacillus delbrueckii* cells were immobilized by entrapped into calcium alginate gels. The immobilized cells were quite stable, and could utilize cellulosic hydrolysate to produce lactic acid efficiently. Optimum fermentation temperature was 48 ℃, and wheat bran hydrolysate could promote the production of lactic acid obviously. Comparing with free cells, the fermentation term of immobilized cells was shortened, and the yield of lactic acid could reach 90.1% on cellulosic hydrolysate from com cob. During 16 repeated batch fermentation processes, average yield of lactic acid was 88.6% using the immobilized cells on cellulosic hydrolysate. Continuous fermentation process was carried out in a 250 mL column reactor with immobilized cells on cellulosic hydrolysate, the lactic acid yield and production efficiency under 0.12 h<sup>-1</sup> dilution rate were 80.2% and 4.97 g/(Lh), respectively.

**Key words:** immobilized *Lactobacillus delbrueckii*; cellulosic hydrolysate; lactic acid; fermentation

乳酸广泛应用于食品、制药、环保和化工等领域中, 由乳酸缩聚得到的高分子化合物具有可生物降解的优良品质, 是一种前景良好的新材料<sup>[1]</sup>。目前国内生产乳酸大多以粮食为原料, 近年来由于粮价上涨, 生产成本已明显偏高<sup>[2]</sup>。纤维素是地球上最丰富、最廉价的可再生资源, 以纤维素为原料代替粮食

\* 收稿日期: 2003-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29876036)

作者简介: 沈雪亮(1977-), 女, 浙江杭州人, 博士生, 从事生物工程研究。

\* 通讯联系人

生产乳酸,其意义十分重大。本研究采用固定化乳酸杆菌发酵纤维素水解液生产乳酸,旨在促进可再生纤维素资源的生物转化与利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

德氏乳酸杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*),实验室保藏菌种,保存于20%脱脂牛奶试管中,置于4℃冰箱中备用。

### 1.2 纤维素水解液的制备

将玉米芯(河北产)风干,粉碎至直径3 mm左右的颗粒,按固液比 18(质量体积)加入1%的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液,于110℃下处理3 h,过滤,用水清洗滤渣至pH值5.0左右。

以上述纤维素残渣(100 g/L)为酶解底物,酶制剂采用自制的复合纤维素酶,由里氏木霉所产的纤维素酶<sup>[3]</sup>和黑曲霉所产的纤维二糖酶<sup>[4]</sup>配合而成,每克底物的酶用量为:滤纸酶活20 IU、纤维二糖酶活8.5 IU,在50℃、pH值4.8条件下水解48 h,过滤去除固体残渣,水解液用于乳酸发酵。水解液中总还原糖含量为55.3 g/L,其中葡萄糖含量为51.6 g/L。

### 1.3 麸皮水解液的制备

将麸皮粉碎至60目左右,加入10倍体积的水,调节pH值至5.0左右,加入自制的里氏木霉酶制剂(含纤维素酶和半纤维素酶),麸皮与酶的质量比为5:1。在50℃、pH值4.8条件下水解48 h,过滤去除固体残渣,水解液用于乳酸发酵。

### 1.4 培养基

1.4.1 种子培养基 葡萄糖20 g,蛋白胨10 g,酵母粉10 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, 蒸馏水1 000 mL。

1.4.2 发酵培养基 纤维素水解液1 000 mL, 酵母粉5 g, 麸皮水解液10 mL(个别变动将在文中指出), MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, 发酵过程中通过加入CaCO<sub>3</sub>控制pH值在5.0左右。

### 1.5 乳酸杆菌的固定化

将牛奶试管中的菌种移入种子培养基,于48℃下静置培养15~20 h,离心10 min(4℃, 5 000 r/min),收集菌体加入到2%的海藻酸钠溶液中,搅拌均匀,用注射器将此混合液滴入到1%的CaCl<sub>2</sub>溶液中,形成直径为2.5~3 mm的海藻酸钙凝胶珠,置于4℃冰箱中继续固化10 h。

### 1.6 固定化乳酸杆菌的发酵试验

1.6.1 固定化细胞的增殖 将制成的固定化凝胶珠放入种子培养基中,在48℃下静置培养16~18 h,增殖后的固定化细胞用于乳酸发酵。

1.6.2 重复分批发酵 在250 mL三角瓶中加入150 mL发酵培养基和30 mL固定化细胞,于48℃下静置培养48 h,倾出发酵液,加入新鲜培养基重复进行发酵。测定每一批发酵液的乳酸浓度和残糖浓度,并计算乳酸得率。

1.6.3 连续发酵 在250 mL柱式反应器(内径2.8 cm,内高40 cm)中装填80 mL固定化凝胶珠,培养基从底部进入,发酵液从顶部流出,在48℃和一定稀释率下进行连续发酵。定时取样测定顶部出口处的乳酸浓度和残糖浓度,达到稳定态后计算乳酸得率和生产效率。

$$\text{乳酸得率}(\%) = \frac{\text{生成的乳酸浓度}}{\text{初始葡萄糖浓度}} \times 100$$

$$\text{生产效率} = \text{生成的乳酸浓度} \times \text{稀释率}$$

### 1.7 分析测定方法

1.7.1 酶活测定 滤纸酶活和纤维二糖酶活按照IUPAC推荐的国际标准方法测定<sup>[5]</sup>,以IU表示。一个滤纸酶活国际单位等于酶促反应中每分钟生成1.0 μmol葡萄糖(以还原糖表示)的酶量;一个纤维二糖酶活国际单位等于标准反应条件下每分钟生成2.0 μmol葡萄糖的酶量(以纤维二糖为酶解底物)。

1.7.2 糖量测定 还原糖含量采用DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定<sup>[6]</sup>,葡萄糖含量采用葡萄糖氧化酶

测定试剂盒(卫生部上海生物制品研究所生产)测定。

1.7.3 乳酸测定 采用 EDTA 定钙法测定<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化细胞与游离细胞发酵进程的比较

图 1 为固定化和游离的乳酸杆菌发酵纤维素水解液生成乳酸的时间进程, 结果表明: 游离细胞的发酵周期为 72 h, 发酵液中残余葡萄糖浓度和乳酸浓度分别为 1.37 和 42.5 g/L, 乳酸得率为 82.4%; 固定化细胞的发酵周期缩短至 48 h, 残糖浓度和乳酸浓度分别为 0.92 和 46.3 g/L, 乳酸得率为 89.7%, 比游离细胞发酵提高了 8.86%。

由于固定化细胞的菌体密度比游离细胞大得多, 所以反应速度快, 生产效率高。在游离细胞发酵过程中, 发酵初期需要消耗一部分糖用于菌体生长; 而在固定化细胞发酵条件下, 则可省去这一部分糖的消耗, 而且发酵培养基限制了氮源浓度, 使得细胞在固定化凝胶珠中主要进行乳酸生产, 而不是进行细胞增殖, 因而乳酸得率明显提高。此外, 用海藻酸钙包埋形成的固定化环境非常适合厌氧菌发酵, 与酒精发酵不同, 乳酸发酵过程中不产生 CO<sub>2</sub> 气体, 并且大量存在的 Ca<sup>2+</sup> 有效地维持了载体强度, 因而发酵过程中没有出现凝胶珠的破裂与软化现象。

### 2.2 温度对固定化细胞发酵的影响

固定化乳酸杆菌在不同温度下发酵纤维素水解液, 48 h 后的结果如表 1 所示。固定化细胞的最适发酵温度为 48 °C, 在此温度下, 产酸速率快, 乳酸产量高, 乳酸得率达 90.1%; 温度为 50 °C 时, 乳酸得率仍保持 89.5%。这说明固定化细胞的耐热性能好, 而且与纤维素酶的适宜酶解温度(50 °C)一致, 有利于同步糖化发酵乳酸的进行。当温度过高或过低时, 细胞活力降低, 乳酸产量和得率均有所下降。

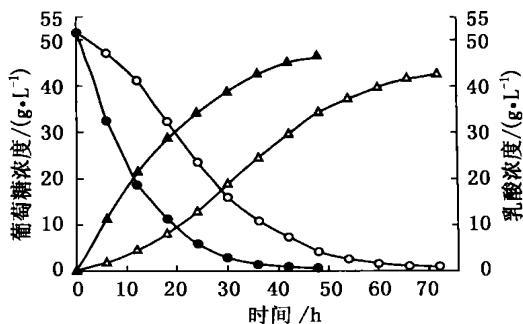
### 2.3 麸皮水解液对固定化细胞发酵的促进作用

麸皮是小麦加工后剩下的废料, 价格便宜, 营养成分丰富, 含多种维生素和微量元素。实验发现, 添加麸皮水解液对固定化细胞发酵纤维素水解液生成乳酸具有促进作用(图 2), 当麸皮水解液的浓度为 10 mL/L 时, 乳酸得率可达 90.1%, 进一步增加麸皮水解液用量, 乳酸得率无明显提高。

### 2.4 固定化乳酸杆菌的重复分批发酵实验

表 2 是利用同一批固定化细胞重复分批发酵纤维素水解液生成乳酸的结果, 共进行了 16 批。可以看出, 各批实验的结果比较一致, 乳酸的平均得率为 88.6%, 说明固定化细胞具有持续、稳定、高效的乳酸生产能力。

### 2.5 固定化乳酸杆菌的连续发酵实验



—●— 固定化细胞发酵的葡萄糖 glucose for immobilized cells; —○— 游离细胞发酵的葡萄糖 glucose for free cells; —▲— 固定化细胞生产的乳酸 lactic acid produced by immobilized cells; —△— 游离细胞生产的乳酸 lactic acid produced by free cells

图 1 固定化细胞和游离细胞发酵纤维素水解液生成乳酸的时间进程

Fig. 1 Time courses of lactic acid fermentation of cellulosic hydrolysate with immobilized cells and free cells of *L. delbrueckii*

表 1 温度对固定化细胞发酵纤维素水解液生成乳酸的影响

Table 1 Effects of temp. on lactic acid fermentation of cellulosic hydrolysate with immobilized *L. delbrueckii* cells

温度/°C temp.	残糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) residual glucose concn.	乳酸浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) lactic acid concn.	乳酸得率/% lactic acid yield
44	4.56	36.3	70.3
46	2.97	41.6	80.6
48	1.24	46.5	90.1
50	1.82	46.2	89.5
52	2.63	42.2	81.8

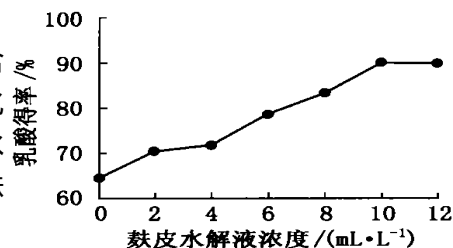


图 2 麸皮水解液对固定化细胞发酵纤维素水解液生成乳酸的促进作用

Fig. 2 Effects of wheat bran hydrolysate on lactic acid fermentation of cellulosic hydrolysate with immobilized *L. delbrueckii* cells

不同稀释率下固定化乳酸杆菌利用纤维素水解液发酵乳酸的结果见表3,表中数据为反应体系达到稳态时出口处的测量值。在本实验条件下,稀释率以 $0.12\text{ h}^{-1}$ 较为适宜。随着稀释率增大,虽然生产效率有所提高,但残糖浓度增加,乳酸浓度和乳酸得率降低。

### 3 结论

**3.1** 采用海藻酸钙凝胶包埋固定德氏乳酸杆菌,固定化细胞可有效地发酵纤维素水解液生成乳酸。

**3.2** 与游离细胞相比,固定化细胞具有发酵时间短、乳酸得率高等优点,其最适发酵温度为 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,添加适量的麸皮水解

液对乳酸发酵有明显的促进作用,由纤维素水解液发酵生成乳酸的得率可达 $90.1\%$ 。

表3 固定化细胞在不同稀释率下利用纤维素水解液连续发酵结果

Table 3 Results of continuous fermentation at different dilution rate of cellulosic hydrolysate with immobilized *L. delbrueckii* cells

稀释率/ $\text{h}^{-1}$ dilution rate	残糖浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ residual glucose concn.	乳酸浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ lactic acid concn.	乳酸得率/ $\%$ lactic acid yield	生产效率/ $[\text{g}(\text{Lh})^{-1}]$ production efficiency
0.08	3.84	43.5	84.3	3.48
0.10	5.16	42.6	82.6	4.26
0.12	6.72	41.4	80.2	4.97
0.14	8.95	36.1	70.0	5.05
0.16	11.6	31.2	60.5	4.99

**3.3** 固定化细胞重复分批发酵纤维素水解液的实验表明,固定化细胞性状稳定,产酸能力强,连续16批发酵的乳酸平均得率为 $88.6\%$ 。

**3.4** 固定化细胞在柱式反应器中连续发酵纤维素水解液,当稀释率为 $0.12\text{ h}^{-1}$ 时,乳酸得率和生产能力分别达到 $80.2\%$ 和 $4.97\text{ g}/(\text{Lh})$ 。这一研究结果为进一步实现自动化控制乳酸发酵提供了可靠的实验依据。

### 参考文献:

- [1] 金其荣,张继民,徐勤.有机酸发酵工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [2] 钱志良,胡军,等.乳酸的工业化生产、应用和市场[J].工业微生物,2001,31(2):49-53.
- [3] XIA L M, CEN P L. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry[J]. Process Biochemistry, 1999, 34: 909-912.
- [4] 夏黎明. 固态发酵生产高活力纤维二糖酶[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 1-5.
- [5] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure & Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [6] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1986. 9-11.
- [7] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1980.

表2 固定化细胞利用纤维素水解液重复分批发酵结果

Table 2 Results of repeated batches fermentation of cellulosic hydrolysate with immobilized *L. delbrueckii* cells

批次 batches	残糖浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ residual glucose concn.	乳酸浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ lactic acid concn.	乳酸得率/ $\%$ lactic acid yield
1	1.28	44.3	85.9
2	1.32	44.5	86.2
3	0.95	45.7	88.6
4	0.89	46.3	89.7
5	1.16	45.2	87.6
6	0.67	45.6	88.4
7	1.07	46.1	89.3
8	0.54	46.5	90.1
9	0.36	46.6	90.3
10	0.73	45.8	88.8
11	0.95	45.3	87.8
12	1.24	45.5	88.2
13	1.13	44.6	86.4
14	0.82	46.0	89.1
15	0.61	46.4	90.0
16	0.49	46.7	90.5