

利用玉米浸泡水发酵生产 $L(+)$ -乳酸*

赵寿经¹ 朱克卫² 齐红彬³ 钱延春¹

1(吉林大学 生物与农业工程学院, 长春, 130025) 2(黄埔出入境检验检疫局, 广州, 510700)

3(长春大成实业集团有限公司, 长春, 130118)

摘要 对以玉米浸泡水浓缩液(CCSL)为基础的简化培养基进行了优化。结果表明,由 80 g/L 葡萄糖、40 g/L 玉米浸泡水浓缩液和 0.2 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 组成的发酵培养基获得了 68.5 g/L 的乳酸产量,与完全培养基产量基本相同。使用数学模型对发酵过程中乳酸的生成和葡萄糖的消耗进行了模拟和预测分析。

关键词 干酪乳杆菌鼠李糖亚种, L -乳酸, 玉米浸泡水(CSL), 数学模型

乳酸是世界上公认的三大有机酸之一,乳酸及其衍生物可用于食品、医药、化工、皮革和印染等工业。由于人体仅含有 L -乳酸脱氢酶, D -乳酸不能被人体吸收,因此,世界卫生组织提倡使用 L -乳酸作为食品添加剂和内服药取代目前使用的 D -乳酸和 DL -乳酸^[1,2]。此外,聚 L -乳酸作为无毒、可降解的高分子材料,已广泛应用于制造生物可降解塑料、绿色包装材料和药用修复材料,应用前景非常广阔。

由于乳酸菌自身合成 B 族维生素和氨基酸的能力有限^[3],需要添加可吸收的氮源和维生素来维持自身生长繁殖^[4]。在一般研究中通常使用酵母膏、蛋白胨等来提供乳酸菌所需的这些生长因素^[5],但高昂的价格阻碍了它们在大规模生产上的应用^[6]。因此寻找一种低成本营养成分,优化出高产的发酵培养基是目前乳酸工业发酵所面临的重大问题^[7]。

玉米浸泡水(CSL)是湿法生产玉米淀粉时的副产品,含有多种氨基酸、无机盐和维生素,其营养成分组成很适合乳酸菌生长繁殖的需要^[8]。我国的玉米浸泡水资源十分丰富,目前市场价格为 750 元/t 左右。本文的研究目标是干酪乳杆菌 L1013 的 L -乳酸发酵生产选择一种以玉米浸泡水为基础的低成本高产发酵培养基。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌种:干酪乳杆菌鼠李糖亚种 L1013 (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*), 吉林大学发酵工程实验室保存。

试剂: L -乳酸标准品,购于 Sigma 公司。玉米浸

泡水由长春大成实业集团有限公司提供。

种子培养基:葡萄糖 50 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 10 g、乙酸钠 0.5 g、柠檬酸铵 0.2 g、 K_2HPO_4 0.2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,蒸馏水 1 L,灭菌前 pH6.5。

发酵培养基 I:葡萄糖 80 g、 $CaCO_3$ 5 g,其他同种子培养基灭菌前 pH6.5。

发酵培养基 II:葡萄糖 80 g、玉米浸泡水浓缩液(CCSL)、 $CaCO_3$ 5 g,蒸馏水 1 L,灭菌前 pH6.5。

以上培养基,灭菌条件均为 121 ~ 126℃, 15 min; $CaCO_3$ 灭菌后加入,其灭菌条件为 150℃,干热灭菌 2 h。

1.2 试验方法

还原糖及 L -乳酸的测定采用岛津高效液相色谱仪。

发酵培养:以无菌吸管吸取 10 mL 种子培养液,接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,37℃ 静置培养 96 h。

1.3 统计分析方法

Logistic 曲线方程

微分形式为:

$$dXd t = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X \quad (1)$$

代数方程为:

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{\mu_r t}}{X_{\max} - X_0 + X_0 e^{\mu_r t}} \quad (2)$$

T 为时间、 X 为乳酸浓度、 X_0 为最初乳酸浓度、 X_{\max} 为最大乳酸浓度、 μ_r 是自然增长率。

2 结果和讨论

2.1 初始糖浓度的确定

选择不同葡萄糖浓度(60、80、100、120 和 140 g/L)的发酵培养基 I 进行发酵,检测其对菌株 L1013

第一作者:博士,教授。

* 吉林省科技发展规划项目(No. 20050201)

收稿日期:2006-05-24,改回日期:2006-10-10

产酸的影响,结果见图1所示。在80 g/L 葡萄糖的条件下得到的最大乳酸产量为70.5 g/L,得率为91.8%。随着初始糖浓度的提高,乳酸产量不断增加,当葡萄糖浓度超过100 g/L时,乳酸产量反而下降,这与乳酸菌利用葡萄糖的机制是一致的。在高浓度葡萄糖基质中,发酵液渗透压增大,使一些不耐受高渗透压的菌体不能很好地进行正常的代谢活动,从而导致产量下降和残糖量增大^[9]。在低浓度葡萄糖条件下,有些乳酸菌是通过己糖磷酸途径(HMP)利用葡萄糖,很少通过EMP途径,因此导致L-乳酸产量下降。

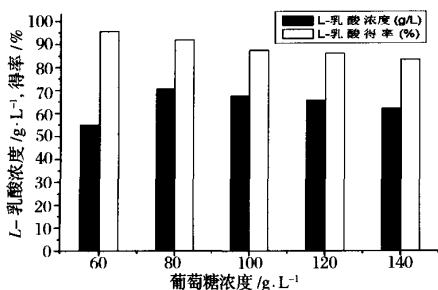


图1 初始葡萄糖浓度对L-乳酸发酵的影响

2.2 玉米浸泡水对L-乳酸发酵影响的研究

将干酪乳杆菌 L1013 在含不同浓度 CCSL (10、20、30 和 40 g/L) 的发酵培养基 II 中发酵。图 2 中显示了发酵 96 h 后乳酸和残糖的浓度。40 g/L CCSL 培养基在发酵结束时获得最高的乳酸浓度为 40.05 g/L, 低浓度 CCSL 培养基发酵获得的 L-乳酸浓度较低。这表明当 CCSL 浓度低于 40 g/L 时, 不能提供乳酸菌新陈代谢所需的营养。40 g/L CCSL 的培养基在发酵结束时残糖为 26 g/L。在低浓度 CCSL 培养基中, 残糖浓度更高。这表明单独使用 CCSL 不能完全提供乳酸菌生长所需的营养物质。

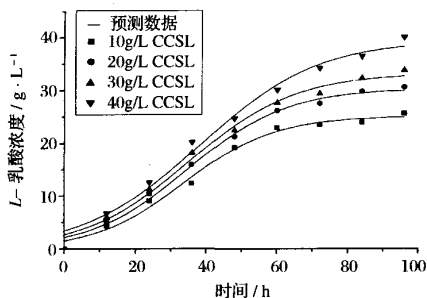


图2 不同浓度CCSL培养基产物合成
模型曲线和实验值

2.3 CCSL和其他营养成分组成培养基(复合培养基)的研究

为提高乳酸的产量和经济效益,使用40 g/L的CCSL和种子培养基的一种成分组成简单培养基进行发酵。结果表明,含有FeSO₄和MnSO₄的CCSL培养基L-乳酸的产量有很大的提高。特别是由40 g/L CCSL和2.0 g/L MnSO₄组成的培养基乳酸产量为68.5 g/L,与发培养基I乳酸产量相似。添加醋酸钠或柠檬二铵的CCSL培养基L-乳酸浓度有一定的提高,这与乳酸菌L1013新陈代谢循环过程中含柠檬酸盐和醋酸盐有关。据报道,锰是乳酸脱氢酶的组成成分,是乳酸菌生长所必需的营养因素^[10]。在我们的研究中,添加MgSO₄几乎不影响乳酸发酵的产量,这与玉米浸泡水中含有1.5%左右的镁有关。

2.4 L-乳酸发酵统计学分析

Logistic分布是个具有较大实用价值的连续型分布,在经济学、政治学、人口统计学、人类肿瘤增生、化学、植物种群动态、昆虫生态等诸方面都有广泛的应用^[11]。本实验中使用Logistic方程来模拟L-乳酸发酵过程。表1中列举了各种类型培养基发酵生产L-乳酸和葡萄糖消耗的回归分析结果。

在CCSL对L-乳酸发酵的影响研究中,以实验所得的数据为依据,应用软件Originlab 7.5进行非线性曲线拟合,可以求得不同浓度CCSL发酵培养基的动力学参数。图3中,列举了测定数据和模型拟合曲线。根据模型曲线,40 g/L CCSL培养基乳酸产量为39.45 g/L,与实验数据基本吻合。由决定系数 r^2 值可以看出,模型拟合曲线与实验数据有很好的一致性,说明所建数学模型能较好地反应L-乳酸发酵过程。获得的回归参数,通过使用Originlab7.5曲线拟合可以获得各参数与CCSL的浓度的关系方程。

$$X_0 = 1.05479 + 0.05978C_{\text{CCSL}} \quad (3)$$

$$X_{\text{max}} = 20.97113 + 0.44632C_{\text{CCSL}} \quad (4)$$

$$\mu_r = 0.08408 - 0.0005673C_{\text{CCSL}} \quad (5)$$

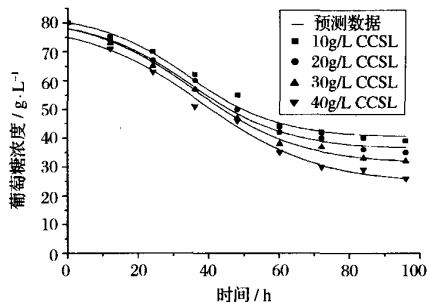


图3 不同浓度CCSL培养基底物消耗
模型曲线和实验值

表 1 各种发酵培养基 L-乳酸生产和葡萄糖消耗回归分析结果

培养基	L-乳酸生产			葡萄糖消耗		
	X_0	X_m	μ	r^2	$Y_{X/S}$	r^2
10 g/L CCSL	1.705 09	25.519 5	0.078 07	0.994 34	0.592 88	0.998 6
20 g/L CCSL	2.206 45	30.355 42	0.072 84	0.992 74	0.656 04	0.997 93
30 g/L CCSL	2.778 21	33.189 76	0.067 86	0.988 57	0.672 14	0.997 46
40 g/L CCSL	3.507 05	39.452 16	0.060 82	0.985 74	0.694 29	0.991 97
40 g/L CCSL + 2.0 g/L 乙酸钠	2.827 12	46.223 14	0.066 2	0.995 37	0.723 39	0.997 27
40 g/L CCSL + 0.8 g/L 柠檬酸铵	3.517 96	48.182 75	0.060 57	0.991 28	0.723 52	0.992
40 g/L CCSL + 0.15 g/L FeSO ₄	3.712 99	50.514 02	0.068 1	0.986 71	0.728 45	0.994 24
40 g/L CCSL + 0.2 g/L MnSO ₄	3.685 76	68.402 46	0.074 08	0.995 7	0.858 88	0.988 76

由方程(2)、(3)、(4)和(5)可以得到不同浓度的CCSL培养基随时间变化的L-乳酸浓度的数学模型。图4为随CSL浓度和时间变化的L-乳酸浓度的响应面图形。

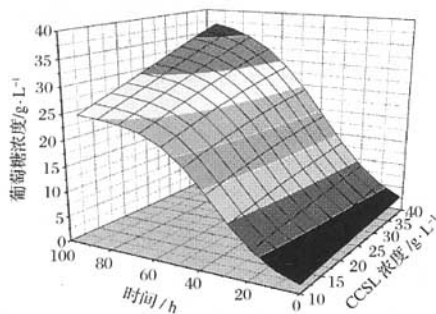


图 4 不同浓度 CCSL 培养基不同时间的 L-乳酸生产模型

干酪乳杆菌鼠李糖亚种 L1013 为同型乳酸发酵菌株,L-乳酸理论转化率为 100%。因此,葡萄糖的消耗过程可以通过下面的等式模拟:

$$S = S_0 = \frac{1}{Y_{X/S}}(X - X_0) \tag{6}$$

S 是葡萄糖的浓度(g/L),S₀是最初的葡萄糖浓度,Y_{X/S}是 L-乳酸的得率。以实验数据和方程(2)的参数为依据,使用 Originlab7.5 进行曲线拟合。如图 3 所示,根据模型拟合曲线,40 g/L CCSL 培养基在发酵结束时残糖浓度为 26.051 g/L,与实验测得数据基本吻合。每一种浓度的 CCSL 发酵培养基的模型参数 Y_{X/S}能够计算出来。通过曲线拟合可以得出参数 Y_{X/S}与 C_{CCSL}的关系方程:

$$Y_{P/S} = 0.70126 - \frac{1.2365}{1 + e^{(C_{CCSL} + 15.69532)/10.962384}} \tag{7}$$

由方程(6)和(7)即能得到在不同 CCSL 浓度培养基上不同时间葡萄糖消耗的数学模型。图 5 为随 CSL 浓度和时间变化的葡萄糖消耗的响应面图形。

在复合培养基 L-乳酸发酵生产研究中,L-乳酸

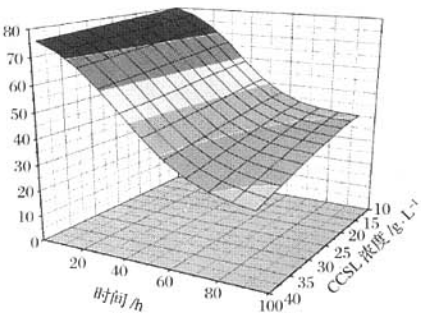


图 5 不同浓度 CCSL 培养基不同时间的葡萄糖消耗模型

的生产和葡萄糖消耗可以由等式(2)和等式(6)计算获得。如图 6 和图 7 所示,其中列举了添加对乳酸产量影响较大的 4 种营养物质的发酵培养基ⅡL-乳酸生产和葡萄糖消耗的模型拟合曲线和实验值。将实验值与模型曲线比较,可以看出拟合情况较好。根据 Logistic 曲线,由 40 g/L CCSL + 0.2 g/L 硫酸锰组成的发酵培养基在 96 h 的 L-乳酸产量是 67.44 g/L,残糖量为 4.7 g/L,与实验测定值接近。X₀的数值较理论值要高,是因为玉米浸泡水中含有低浓度的乳酸。说明 Logistic 方程能较好地反映 L-乳酸发酵过程。

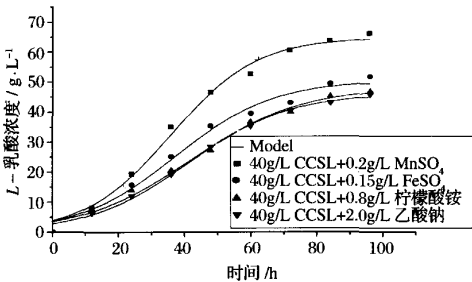


图 6 复合培养基发酵产物合成模型曲线和实验值

3 结 论

通过以 CCSL 为基础的发酵培养基优化,确定了干酪乳杆菌鼠李糖亚种 L1013 的最佳初始碳源浓

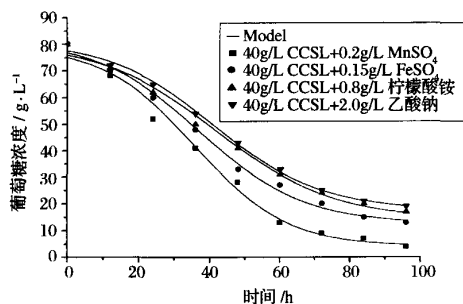


图7 复合培养基发酵底物消耗模型曲线和实验值

度。从生产成本与工业化可行性考虑,选择 80 g/L 葡萄糖作为最佳初始碳源。研究了不同浓度 CCSL 作为单独营养源对 *L*-乳酸发酵的影响,40 g/L CCSL 培养基的 *L*-乳酸产量最高,为 40.05 g/L。对以 40 g/L CCSL 为基础,通过添加其他物质组成的简单培养基进行优化。最终表明,由 40 g/L CCSL 和 0.2 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 组成的培养基 *L*-乳酸产量为 68.5 g/L,与发酵培养基 I 的产量接近,生产成本比其他乳酸发酵培养基相降低。使用 Logistic 方程对发酵过程进行模拟和预测,由决定系数 r^2 的值也可以看出模型拟合曲线和实验数据有很好的一致性,表明 Logistic 方程能较好地反应 *L*-乳酸的发酵过程中产物的生成和底物的消耗。

参考文献

- 1 刘勇军,王昌禄,曹伟锋,等. 细菌 *L*-乳酸发酵的研究——耐高糖高酸菌株的选育[J]. 广州食品工业科技, 2003,19(2):26~29
- 2 郑艳,薛景珍,刘长江. *L*-乳酸发酵菌株的选育[J]. 微生物学杂志, 2004,24(3):26~28

- 3 Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources[J]. Enzyme Microb Technol, 2000,26(2~4):87~445
- 4 Nancibh A, Nancib N, Meziane-cherif D, et al. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. Rhamnosus[J]. Bioresource Technology, 2005,96(1):63~67
- 5 Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, et al. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. Rhamnosus[J]. Bioresource Technology, 2001,78(1):149~153
- 6 Bustos G, Moldes A B, Alonso, et al. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology[J]. Food Microbiology, 2004, 21(2): 143~148
- 7 Amrane A, Prigent Y. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment[J]. Microbiology Biotechnology, 1994, 40(5): 644~649
- 8 Rivas B, Moldes A B, Dominguez J M. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 97(1): 93~98
- 9 Hujanen M, Linko S, Linko Y Y, et al. Optimisation of media and cultivation conditions for *L*(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRLB-441[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(1~2):126~130
- 10 Fitzpatrick J J, Ahrens M, Smith S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate [J]. Process Biochemistry, 2001,36(7):671~675
- 11 殷祚云. Logistic 曲线拟合方究[J]. 数理统计与管理, 2002,21(1):41~46

Study of *L*(+)-lactic Acid Production on Corn Steep Liquor Media with *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus L1013

Zhao Shoujing¹ Zhu Kewei² Qi Hongbin³ Qian Yanchun¹

1(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130025, China)

2(Huangpu Entry-exit Inspection and Quarantine, Huangpu 510700, China)

3(Changchun Da Cheng Industry Group Company Limited, Changchun 130118, China)

ABSTRACT Lactic acid bacteria have limited capacity to synthesize B-vitamins and amino acids. The complexity of the media increases the cost of lactic acid production. Low-cost media for lactic acid fermentation are desired to enhance the economics of the *L*-lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus L1013. The aim of this work was to optimize the production of *L*-lactic acid from glucose in a reduced nutritional medium based on concentrated corn steep liquor (CCSL). The maximum *L*-lactic acid concentration (68.5g/L) was obtained at 96 h using the media composed by 80g/L glucose, 40g/L CCSL and 0.2g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. The product yields were similar to those obtained in a fully supplemented medium. Additionally, a mathematical model was adopted from another study to model and predict the process of lactic acid production and glucose consumption.

Key words *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus, *L*-lactic acid, corn steep liquor (CSL), mathematical model