

产 D-乳酸的德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵工艺研究

韩文静, 梁颖超, 陶进, 张广昊 (玉米深加工国家工程研究中心, 吉林长春 130033)

摘要 [目的]筛选适合德氏乳杆菌保加利亚亚种的生长条件。[方法]以德氏乳杆菌保加利亚亚种为出发菌株, 研究该菌株在不同条件下的生长情况。[结果]德氏乳杆菌保加利亚亚种最适生长温度为 42 ℃, 最适 pH 为 6.5, 最适发酵时间为 72 h; 代谢生成 D-乳酸的适宜发酵条件为葡萄糖添加量 7%、接种量 10%、装液量 125 mL/250 mL, 在上述条件下发酵该菌种, D-乳酸产量达 37.8 g/L。[结论]试验结果为德氏乳杆菌保加利亚亚种产 D-乳酸条件摸索及生产应用提供了参考。

关键词 德氏乳杆菌保加利亚亚种; D-乳酸; 发酵工艺

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)07-0004-02

Production Technology of D-lactic Acid from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

HAN Wen-jing, LIANG Ying-chao, TAO Jin et al (National Engineering Research Center of Corn Deep Processing, Changchun, Jilin 130033)

Abstract [Objective] The aim was to screen out growth condition for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. [Method] Germany's *Lactobacillus Bulgaria* subspecies was as for starting strain to study the growth of the strain under different conditions. [Result] The optimum fermentation temperature of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* was 42 ℃; the optimum pH was 6.5, and the optimum fermentation time was 72 h. The optimum fermentation conditions for D-lactic acid production were glucose 7%, inoculum size 10% and fluid volume 125 mL/250 mL. Under above conditions, the strain of D-lactic acid production reached 37.8 g/L. [Conclusion] The results provide reference for fermentation technology exploration and application of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*.

Key words Germany's *Lactobacillus Bulgaria* subspecies; D-lactic acid; Fermentation technology

乳酸又称丙醇酸, 是自然界最小的手性分子, 具有 L(+) 和 D(-) 2 种光学构型^[1-3]。D-乳酸作为手性中心, 是合成多种手性物质的前体, 在医药、农药、化工等方面应用十分广泛。2000 年以后, 世界乳酸总生产能力已超过 25 万 t/a, 总产量为 13 万 t/a, 并每年递增^[4]。D-乳酸的年生产量约 1.6 万 t, 而发酵法生产 D-乳酸的需求量约 2.6 万 t^[5], 所以 D-乳酸的研究拥有广阔的市场前景。例如德国巴斯夫公司生产的 S-2-氯丙酸除草剂、日本达意赛尔生产的对乙基苯氧丙酸除草剂、德国赫斯特公司生产的威霸除草剂^[4]等。此外, D-乳酸还可用于聚乳酸的生产, 根据生产的聚乳酸的性质, 可以应用于各类食品和化妆品的外包装材料, 在服装方面也有很好的应用前景, 可以做成纱、编织物等。

世界乳酸产量的 90% 是通过发酵法生产的, 其余是化学合成的。国际上的 D-乳酸生产也主要采用微生物发酵法^[6]。我国的 D-乳酸生产量远远不能满足工业需要, 生产技术相对落后, 尤其对 D-乳酸生产菌研究相对落后^[7]。因此, 对 D-乳酸产生菌研究是非常重要的。关于研究发酵法产 D-乳酸的工作有一些报道, 王刚等^[8]对假肠膜明串珠菌进行研究, 得出该菌的最适生长温度为 35 ℃, 最适 pH 为 6.5, 4% 初始葡萄糖浓度, 6% 的接种量, 35 ℃ 有助于发酵产酸, 35 ℃ 耗糖速度最快。刘海燕等^[9]以麦芽汁为培养基发酵德氏乳杆菌 RFXI, 通过优化培养基, 使 RFXI 的活菌数比优化前提高了 4.6 倍。刘联杰^[10]对诱变后的菊糖芽孢乳杆菌进行研究, 得到发酵培养基为: 葡萄糖 152.90 g/L, 蛋白胨 18.25 g/L, 牛肉膏 10.00 g/L, 酵母抽提物 6.25 g/L, 磷酸氢二钾 3.00 g/L, 乙酸钠 3.00 g/L, 七水硫酸镁 0.10 g/L。许婷婷等^[11]对诱变后的乳杆菌进行研究, 得到该菌株在只含

葡萄糖及无机盐的培养基中对糖的总转化率接近理论最大值, 达到 98%, D-乳酸产量达到 48.5 g/L, 光学纯度在 99% 以上。于培星^[12]以凝结芽孢杆菌 JD-063D 为出发菌株, 通过诱变后筛选出一株 JD-76D, 产酸由出发菌株的 61 g/L 提高到 145 g/L, D-乳酸纯度由原菌株的 97.5% 增加到 98.7% 以上。目前鲜见关于德氏乳杆菌保加利亚亚种生长的研究报道。笔者分析了德氏乳杆菌保加利亚亚种在不同条件下的生长情况, 从而筛选出适合其生长的环境, 为德氏乳杆菌保加利亚亚种产 D-乳酸条件摸索及生产应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。德氏乳杆菌保加利亚亚种, 由吉林农业大学提供, 玉米深加工国家工程研究中心活化保藏。

1.1.2 培养基。平板培养基: 蛋白胨 1.000%, 牛肉粉 0.800%, 酵母粉 0.400%, 葡萄糖 2.000%, 磷酸氢二钾 0.200%, 柠檬酸氢二铵 0.200%, 乙酸钠 0.500%, 硫酸镁 0.020%, 硫酸锰 0.004%, 琼脂 1.400%, 吐温-80 0.100%, 118 ℃ 灭菌 15 min, pH 6.3~6.7。种子培养基 (MRS 肉汤培养基): 蛋白胨 1.000%, 牛肉粉 0.800%, 酵母粉 0.400%, 葡萄糖 2.000%, 磷酸氢二钾 0.200%, 柠檬酸氢二铵 0.200%, 乙酸钠 0.500%, 硫酸镁 0.020%, 硫酸锰 0.004%, 吐温-80 0.100%, 118 ℃ 灭菌 15 min, pH 5.5~5.9。发酵培养基: 蛋白胨 1.000%, 牛肉粉 0.800%, 酵母粉 0.400%, 葡萄糖 7.000%, 磷酸氢二钾 0.200%, 柠檬酸氢二铵 0.200%, 乙酸钠 0.500%, 硫酸镁 0.020%, 硫酸锰 0.004%, 吐温-80 0.100%, 发酵前一次性加入碳酸钙 5.000%, 118 ℃ 灭菌 15 min, pH 6.4~6.7。

1.2 方法

1.2.1 产酸量检测。采用 EDTA 定钙法, 按照文献^[13-14]方

作者简介 韩文静(1989—), 女, 吉林长春人, 助理工程师, 从事玉米深加工研究。

收稿日期 2017-05-02

法进行。

1.2.2 不同葡萄糖添加量对产酸量的影响。葡萄糖添加量为 2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%，通过 EDTA 定钙法测定不同葡萄糖浓度的发酵液中产酸量。

1.2.3 不同初始 pH 对菌体生长的影响。菌种分别接种在 pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的发酵培养基中，接种量为 10%。采用分光光度法在 600 nm 波长下测定 OD 值。

1.2.4 不同温度对产酸量的影响。培养温度是细菌生长的一个重要因素，它可以通过改变脂肪酸的组成影响细胞膜和细胞壁结构的组成及其完整^[15]。根据文献记载，德氏乳杆菌保加利亚亚种生长温度为 37~45℃，当温度高于 50℃ 或低于 20℃ 时菌体不能生长^[16]。在其他发酵条件为最佳状态下，选择生长温度分别为 36、38、40、42、44、46℃，采用 EDTA 法测定上述温度下的产酸量。

1.2.5 不同接种量对产酸量的影响。接种量大小影响菌体生长速度。过小，会延长菌种生长的迟缓期，发酵周期变长；过大，会使菌体生长过剩，菌体利用营养物质自身生长，不利于产酸。在最佳发酵温度、pH、装液量条件下，接种量分别为 6%、8%、10% 和 12%，测定产酸量，确定最佳接种量。

1.2.6 不同装液量对产酸量的影响。装液量的多少影响发酵培养基中溶氧值的大小，该试验使用的菌种是兼性厌氧型，溶氧值的大小直接影响产酸量。在其他发酵条件为最佳状态下，装液量分别为 50、75、100、125、150 mL，测定不同装液量下的产酸量。

1.2.7 发酵周期对产酸量的影响。发酵周期过短，菌体的生长不稳定，培养基中的营养物质主要提供给菌体生长，用于产物积累较少；而发酵周期过长，营养物质耗尽和代谢产物的大量积累使菌体自溶，因此发酵周期对菌体的产酸量有很大的影响。在其他发酵条件最佳状态下，在发酵周期 24、32、40、48、56、64、72、78 h 的条件下，测定产酸量。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄糖添加量对 D-乳酸产酸量的影响 由图 1 可知，随着葡萄糖添加量的增加，产酸量也有明显的增加，当葡萄糖添加量达 7% 时，产酸量最高；但随葡萄糖添加量继续增加，产酸量反而降低。故选择 7% 为葡萄糖最佳添加量。

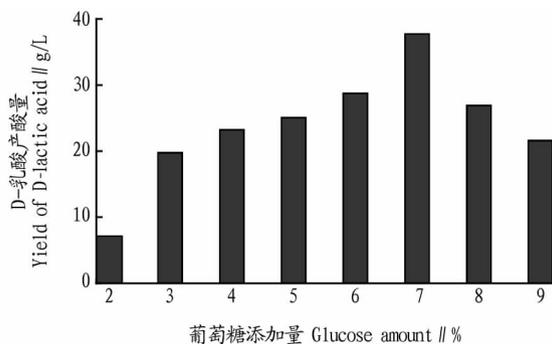


图 1 不同葡萄糖添加量对 D-乳酸产酸量的影响

Fig.1 Effect of different glucose additions on D-lactic acid production

2.2 不同初始 pH 对菌体生长的影响 由图 2 可知，当初始

pH 为 6.5 时，菌体生长状态最佳，故发酵初始 pH 确定为 6.5。

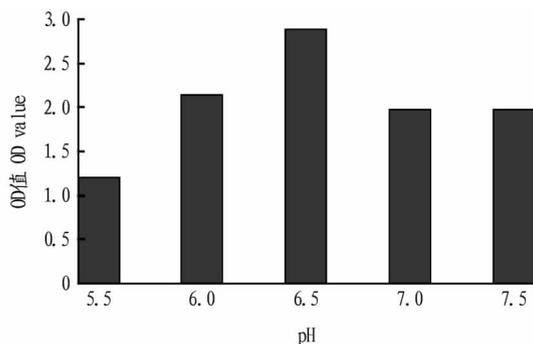


图 2 不同初始 pH 对菌体生长的影响

Fig.2 Effect of different initial pH on cell growth

2.3 不同温度对 D-乳酸产酸量的影响 由图 3 可知，随着温度的升高，菌体产酸量增加，当温度达到 42℃ 时产酸量最高，随着温度的不断增加，菌体产酸量开始降低，温度影响细胞内酶活变化，温度升高，细胞内酶促反应加快，代谢和生长也相应加快；但当温度过高时，生物活性物质发生变性，细胞功能下降甚至死亡。故选择 42℃ 为最佳生长温度。

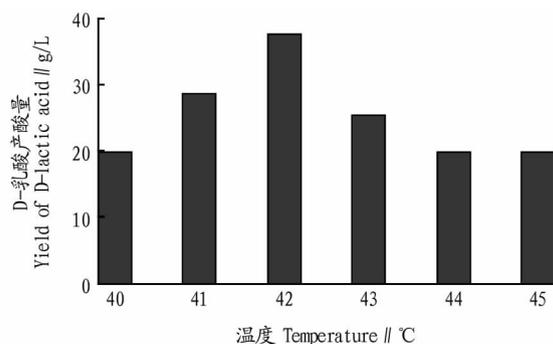


图 3 不同温度对 D-乳酸产酸量的影响

Fig.3 Effect of different temperature on D-lactic acid production

2.4 不同接种量对 D-乳酸产酸量的影响 由图 4 可知，随着接种量的增加，产酸量也不断增加，当接种量为 10% 时，产酸量最大，而接种量继续增加时，产酸量反而下降，可能接种量过大，培养基中的营养成分主要用于菌株的生长，从而造成了产酸量的降低。故以接种量 10% 为最佳值。

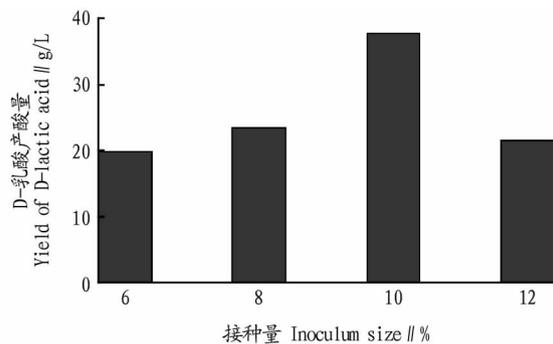


图 4 不同接种量对 D-乳酸产酸量的影响

Fig.4 Effect of different inoculum size on D-lactic acid production

2.5 不同装液量对 D-乳酸产酸量的影响 由图 5 可知，125 mL 为最佳装液量。

结构变化之间的相关性分别为负相关、负相关和正相关,且第一产业固定投资的增长对土地利用结构均质性发展的影响程度远大于二、三产业固定投资,而第二产业固定投资的增长对土地利用结构信息熵变化的作用力远低于第一、三产业。因此,适当加大第一、三产业的投资额和缩小第二产业的投资额不仅有助于进一步优化产业结构,相应地,第一产业的用地规模将会缩减而第三产业的用地数量会得到补充,对于优化调整土地利用结构也具有重要意义。

(3)就土地利用结构信息熵变化与三次产业产值结构的相关性分析而言,第一、二、三产业产值与土地利用结构空间转化之间分别呈现出负相关、正相关和正相关的相关性,且它们对土地利用结构变化的影响力由第一产业至第三产业渐次减弱。因此,鉴于农用地面积缩小无碍于第一产业产值上升,而建设用地面积的减少则有可能阻碍第二、三产业生产效益的增长,特别是第二产业对用地支撑作用的依赖程度较高,在完成农用地基本保有量目标的基础上适当将农用地转换为建设用地特别是城镇住宅用地、商服用地和交通运输用地,带动第三产业产值发展,而对工矿用地则也可予以适度转换为交通运输用地,以促进整体产业结构优化和生产

效益提升。

参考文献

- [1] 冯年华. 略论产业结构优化与土地利用结构调整[J]. 人文地理, 1995, 10(3): 64-67.
- [2] 郝润梅, 赵明. 呼和浩特市土地利用景观生态系统功能研究[M]. 北京: 中央民族大学出版社, 2012: 41.
- [3] 呼和浩特市人民政府. 呼和浩特市土地利用总体规划[A]. 呼和浩特市国土资源局, 2011-12-10.
- [4] 冯尚友. 信息熵与最大熵原理[J]. 水利电力科技, 1995, 22(3): 24-29.
- [5] 张秋月, 严金明. 东莞市双转型背景下产业结构与土地利用结构关系研究[J]. 经济研究参考, 2013(11): 65-69.
- [6] 耿晓伟. 西安市产业结构与土地利用结构关系研究[J]. 地下水, 2012, 34(1): 173-175.
- [7] 王秀兰, 李雪瑞, 冯仲科. 基于信息熵原理的北京城市扩展研究[J]. 中国人口·资源与环境, 2010, 20(3): 89-92.
- [8] 陈彦光. 基于 Excel 的地理数据分析[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 20-25.
- [9] 徐建华. 现代地理学中的数学方法[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 51.
- [10] 杨于成. 城市土地利用结构与产业结构关系研究: 以柳州市为例[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 11-13.
- [11] 黄金鑫. 工业园区土地利用综合效益评价理论与实证研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2007: 58.
- [12] 李小建. 经济地理学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 174.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 国民经济行业分类: GB/T 4754—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [14] 孟媛, 张凤荣, 姜广辉, 等. 北京市产业结构与土地利用结构的关系研究[J]. 地域研究与开发, 2011, 30(3): 108-111, 139.

(上接第 5 页)

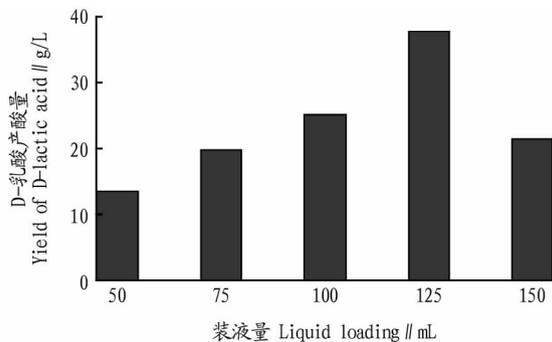


图 5 不同装液量对 D-乳酸产酸量的影响

Fig. 5 Effect of different liquid loading on D-lactic acid production

2.6 不同发酵周期对 D-乳酸产酸量的影响 由图 6 可知,在 72 h 内, D-乳酸的产酸量随着时间的增长而增加,而在 72 h 以后, D-乳酸的产酸量开始减少,故确定 72 h 为最佳发酵周期。

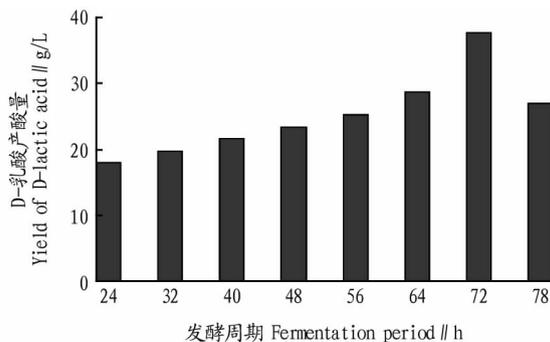


图 6 发酵周期对 D-乳酸产酸量的影响

Fig. 6 Effect of fermentation period on D-lactic acid production

3 结论

通过试验得到产 D-乳酸的德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵工艺条件为葡萄糖添加量 7%, 生长温度 42 °C, 发酵周期 72 h, 初始 pH 6.5, 接种量 10%, 装液量 125 mL/250 mL, 此时产酸量最高, 为 37.8 g/L。

参考文献

- [1] CORMA A, IBORRA S, VELTY A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(6): 2411-2502.
- [2] 李媛, 徐书景, 张庆, 等. 采用钠盐调酸发酵生产 D-乳酸的工艺研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2014, 38(3): 297-300.
- [3] 刘联杰, 周安盛, 方聪明, 等. 产 D-乳酸葡萄糖芽孢乳杆菌的诱变及发酵条件研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(20): 4936-4940.
- [4] 崔小明. 乳酸的生产应用及市场前景[J]. 四川化工与腐蚀控制, 2002, 5(2): 37-41.
- [5] 吕九琢, 徐亚贤. 乳酸应用、生产及需求的现状与预测[J]. 北京石油化工学院学报, 2004, 12(2): 32-36.
- [6] 周丽, 田康明, 陈献忠, 等. 微生物发酵产光学纯度 D-乳酸研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(10): 114-124.
- [7] 刘娟, 王刚, 张明磊, 等. D-乳酸产生菌的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(1): 96-99.
- [8] 王刚, 刘娟, 陈光, 等. 产 D-乳酸假膜明串珠菌生长特性分析[J]. 湖北农业科技, 2016, 55(5): 1239-1241.
- [9] 刘海燕, 李应彪, 徐幸莲, 等. 德氏乳杆菌增殖培养基的优化研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(11): 1160-1163.
- [10] 刘联杰. 产 D-乳酸菌株的选育及发酵过程优化[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2014.
- [11] 许婷婷, 柏中中, 何冰芳. D-乳酸研究制备进展[J]. 化工进展, 2009, 28(6): 991-996.
- [12] 于培星. 高产 D-乳酸生产菌株的选育[J]. 中国食品添加剂, 2010(4): 796-800.
- [13] 郑志, 姜绍通, 潘丽军. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 102-105.
- [14] 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, 1997: 402-404.
- [15] 李银锦. D-乳酸高产菌株的选育、发酵条件的优化及代谢通量分析[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [16] 王伟. 德氏乳杆菌发酵性能研究及发酵工艺优化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.