

固定化乳酸菌发酵大豆秸秆酶解液 制备 L-乳酸的研究

徐忠^{1,3}, 杨萍¹, 汪群慧², 姜兆华³

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨工业大学环境科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 哈尔滨工业大学应用化学系, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 对影响固定化乳酸菌发酵大豆秸秆酶解液的因素进行了研究, 并与游离乳酸菌进行了对比。结果表明: 固定化乳酸菌对温度变化的稳定性比游离乳酸菌高, 最适发酵温度都在 30℃; 固定化细胞颗粒大小对乳酸产量没有显著影响; 随着底物糖浓度的增加, 游离乳酸菌与固定化细胞的乳酸产量都相应增大, 游离乳酸菌与固定化乳酸菌发酵的最适接种量为 10%; 固定化细胞与游离乳酸菌发酵的最适 pH 值为 5.5, 固定化细胞对 pH 值变化的稳定性比游离细胞高。

关键词: L-乳酸; 干酪乳杆菌; 发酵; 大豆秸秆

Production of L-lactic Acid from Cellulase Hydrolysis of Soybean Straw Fermented by Immobilized *Lactobacillus casei*

XU Zhong^{1,3}, YANG Ping¹, WANG Qun-hui², JIANG Zhao-hua³

(1. School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Department of Environmental Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. Department of Applied Chemistry, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: The factors affecting cellulose hydrolysis of soybean straw fermented by immobilized *Lactobacillus casei* had been studied, and contrasting with free *Lactobacillus casei*. The result indicated that stability of immobilized cell for temperature is higher than free one. Optimum temperature is 30℃; the bead size of immobilized cell have no effect on output of lactic acid; with the increase of the density of candy, the output of lactic acid of free *Lactobacillus casei* and immobilized cell increased; the optimum inoculating amount of free *Lactobacillus casei* and immobilized cell is 10%. The optimum pH is 5.5, stability of immobilized cell for pH is higher than free one.

key words: L-lactic acid; *Lactobacillus casei*; fermentation; soybean straw

中图分类号 TS201.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0115-04

乳酸是一种重要的有机酸。乳酸、乳酸盐及其衍生物广泛应用于食品、医药、轻工、化工等领域, 其产量和消费量仅次于柠檬酸^[1]。乳酸分子按其构型及旋光性可分为 L-乳酸、D-乳酸和 DL-外消旋乳酸三类。由于人体只具有代谢 L-乳酸的 L-乳酸脱氢酶, 因此只有 L-乳酸能被人体完全代谢, 且不产生任何有毒、副作用的代谢产物, D-乳酸或 DL-乳酸的过量摄入则有可能引起代谢紊乱甚至导致中毒, 因此, 从健康角度考虑,

L-乳酸的制备及应用研究, 正引起世界各国的广泛重视^[2]。传统乳酸制备主要以粮食为原料, 为了节约粮食, 降低乳酸发酵的成本, 结合环境保护, 近年来, 国内外开展了利用食品及农业加工有机废弃物为原料的制备乳酸研究^[3~5]。大豆是我国的主要粮食作物之一, 每年的产量约 1500 万吨, 同时产大豆秸秆 2500 万吨, 大豆秸秆是一种应用价值很高的可再生纤维素资源, 但是这种资源长期没有得到合理的开发, 约 2/3 秸秆被焚烧

收稿日期: 2004-07-04

基金项目: 国家自然科学基金与中国节能投资公司联合研究基金资助项目(50278024)

作者简介: 徐忠(1964-), 男, 副教授, 在读博士, 研究方向为应用化学。

掉,造成了资源的浪费和新的空气污染。利用纤维素酶将大豆秸秆纤维素水解为可溶性糖,再经生物发酵制备L-乳酸,是使大豆秸秆资源化利用、保护环境的有效途径。本工作以经过氨预处理的大豆秸秆的酶解液为原料,对游离及固定化乳酸菌发酵制备L-乳酸工艺过程进行了初步研究。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

干酪乳杆菌,由中国科学院微生物研究所提供。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 种子培养基(MRS培养基) 酪蛋白胨 10.0g,牛肉提取物 10.0g,酵母提取物 5.0g,葡萄糖 5.0g,乙酸钠 5.0g,柠檬酸二胺 2.0g, Tween80 1.0g, K_2HPO_4 2.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, 蒸馏水 1.0L。

1.1.2.2 增殖培养基 葡萄糖 3%, 酵母膏 1.5%, 蛋白胨 1%, K_2HPO_4 0.5%, 碳酸钙 3%, pH6.0。

1.1.2.3 发酵培养基 蛋白胨 5.0g, 酵母膏 5.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, NaCl 0.1g, $CaCO_3$ 20.0g, 酶解液 1.0L。

1.1.3 固定化细胞载体 海藻酸钠,温州市化学用料厂。

1.1.4 主要试剂 乙二胺四乙酸二钠,三乙醇胺,氢氧化钠,3,5-二硝基水杨酸,氨水等均为分析纯。

1.1.5 主要仪器 离心机,粉碎机,高压灭菌锅,恒温培养箱,干燥箱,超净工作台,水浴恒温振荡器。

2 实验方法

2.1 大豆秸秆酶解液的制备

将粉碎过140目筛经10%氨水预处理后的大豆秸秆粉装入250ml具塞三角瓶中,每瓶5g,加入纤维素酶液80ml,醋酸缓冲溶液20ml,在pH4.8,50℃恒温水浴振荡36h。

2.2 固定化方法

取适量的种子培养液经离心分离制得菌体悬液,加入到2%的海藻酸钠溶液中,搅匀,用滴注法或溶剂搅拌法加入2% $CaCl_2$ 溶液中,使之成直径为2~3mm左右的珠子,静止1h,用无菌生理盐水充分洗涤后用于增殖培养实验。

2.3 固定化细胞增殖培养

将固定化细胞按15%的接种量接入增殖培养基中,

于30℃培养24h。增殖培养完毕用无菌生理盐水洗涤三次,留作发酵实验。

2.4 发酵实验

将增殖后的固定化细胞接入发酵培养基中进行发酵,一定时间取样进行乳酸含量分析,并与游离乳酸菌发酵进行比较。

2.5 分析方法

2.5.1 还原糖含量的测定 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[7]。

2.5.2 乳酸含量的测定 EDTA标准溶液滴定法^[8]。

3 结果与讨论

3.1 温度对固定化乳酸菌L-乳酸发酵的影响

底物浓度16.5g/L,将增殖后的固定化细胞和游离乳酸菌按10%的接种量接入发酵培养基中,用 $CaCO_3$ 控制pH值,分别在25、30、35、40℃下进行发酵,得到乳酸发酵曲线。

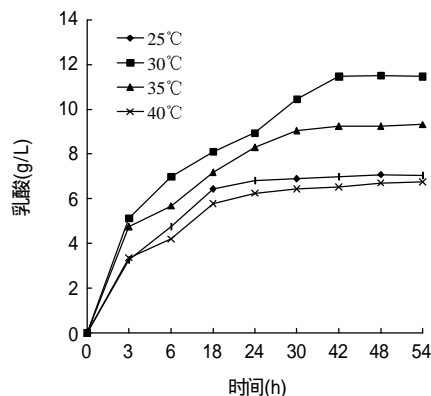


图1 温度对游离乳酸发酵的影响

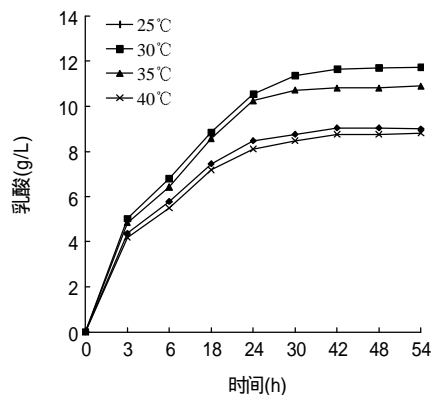


图2 温度对固定化乳酸发酵的影响

从图中可以看出,固定化细胞对温度变化的稳定性比游离细胞高,二者的最适生长温度相同,都在30℃。

3.2 接种量对固定化乳酸菌L-乳酸发酵的影响

在温度 30℃, 底物浓度 13.3g/L, 将增殖培养后的固定化细胞和游离乳酸菌分别按 5%、10%、15%、20% 的接种量接入发酵培养基发酵中, 用 CaCO_3 控制 pH 值, 得到乳酸发酵曲线。

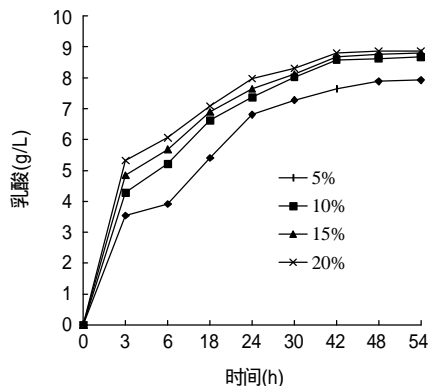


图3 接种量对游离乳酸发酵的影响

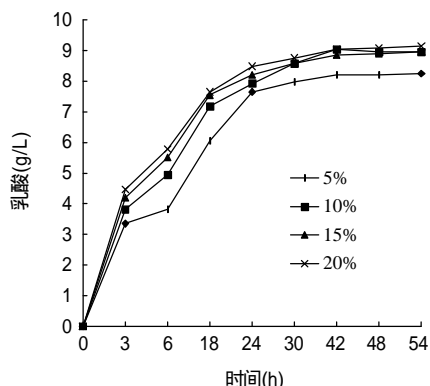


图4 接种量对固定化发酵的影响

从图 3、图 4 中可以看出: 游离乳酸菌与固定化乳酸菌的最适接种量都在 10%, 低于 10% 影响乳酸产量, 高于 10% 乳酸产量几乎没有提高。

3.3 pH 值对固定化乳酸菌 L- 乳酸发酵的影响

在温度 30℃, 底物浓度 13.3g/L 的条件下, 用磷酸缓冲溶液将底物 pH 值分别控制在 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5, 并与没有控制 pH 值的空白液对比, 将增殖后的固定化细胞和游离乳酸菌按 10% 的接种量接入发酵培养基中进行发酵, 得到乳酸发酵曲线。

pH 值是微生物生长的环境条件之一, pH 值的改变首先影响细胞膜的通透性, 影响营养物的吸收和酶的分泌, pH 值过低或过高会抑制菌体的生长。从图 5、图 6 中可以看出, 发酵液的 pH 值对乳酸产量都有较大影响, 固定化细胞与游离乳酸菌乳酸发酵的最适 pH 值都是 5.5, 这与干酪乳杆菌发酵最适 pH 值相附, 此外, 从图中还可以看出, 固定化细胞对 pH 值变化的稳定性比游离细胞高。

3.4 底物糖浓度对固定化乳酸菌 L- 乳酸发酵的影响

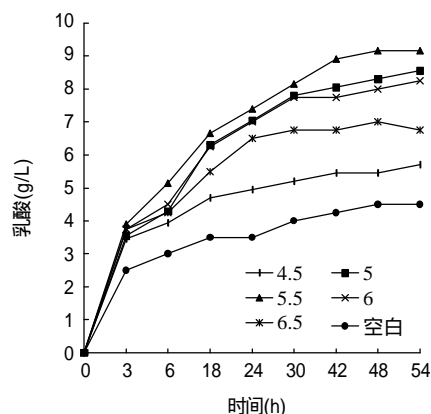


图5 pH值对游离乳酸发酵的影响

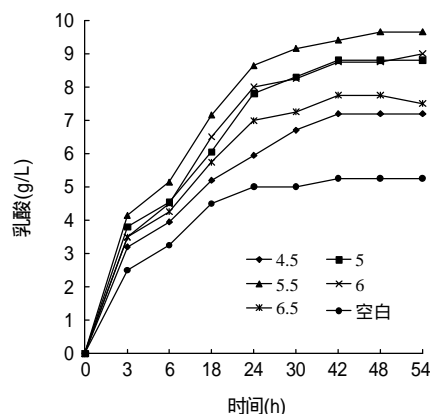


图6 pH值对固定化乳酸发酵的影响

在温度 30℃, 接种量 10% 的条件下, 用 CaCO_3 控制 pH 值, 做了四组不同的底物糖浓度乳酸发酵实验, 观察底物糖浓度与乳酸发酵的关系。

从图 7、图 8 可以看出: 在实验发酵液浓度范围内, 随着底物糖浓度的增加, 游离乳酸菌与固定化细胞的乳酸产量都相应增大, 固定化细胞的乳酸产量要高于游离乳酸菌发酵。

3.5 凝胶粒径大小对固定化乳酸菌 L- 乳酸发酵的影响

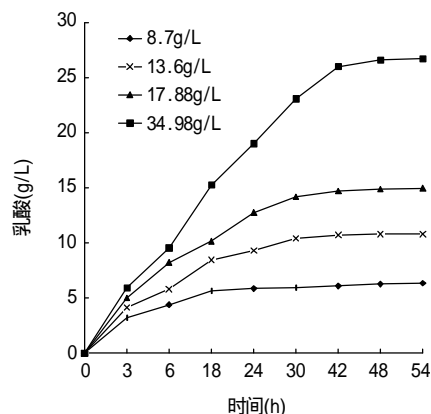


图7 底物浓度对游离乳酸发酵的影响

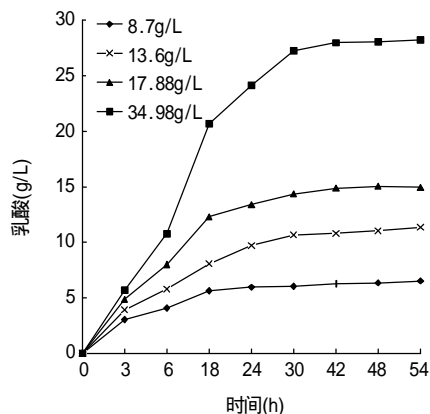


图8 底物浓度对固定化乳酸发酵的影响

用8号针头和12号针头以不同速度制作三种粒径的固定化球体, 1、2、3 mm, 在温度30℃, 底物浓度13.3g/L的条件下, 按10%的接种量接入发酵培养基中进行发酵, 得到乳酸发酵曲线。

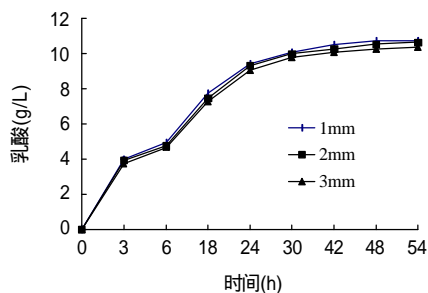


图9 固定化细胞粒径对乳酸发酵的影响

从图9可以看出: 不同粒径的固定化颗粒发酵得到的乳酸发酵曲线几乎贴在一起, 可见, 粒径大小对乳酸发酵没有显著影响, 说明2%海藻酸钙为载体的固定化颗粒通透性较好, 底物糖和产物乳酸均可以较为顺利

地进出凝胶载体。

4 结 论

4.1 利用2%海藻酸钙制备固定化乳酸菌通透性较好, 可用于大豆秸秆酶解液的乳酸发酵。

4.2 温度、接种量、pH值、酶解液糖浓度对游离及固定化乳酸菌乳酸发酵均有显著影响, 较适宜的工艺条件为: 温度30℃, 接种量10%, 发酵液pH值控制在5.5左右, 通过控制酶解条件, 尽可能提高酶解液中糖浓度有利于乳酸发酵。

参考文献:

- [1] 徐忠, 汪群慧, 姜兆华. L-乳酸的制备及其应用的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 185-188.
- [2] 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [3] JPintado, et al. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24: 590-598.
- [4] Yuji Oda, et al. Recycling of bakery wastes using an amylolytic lactic acid bacterium[J]. Bioresource Technology, 1997, 60: 101-105.
- [5] H I Ogawa. Effects of anaerobic/aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage[J]. Bioresource Technology, 2002, 84: 213-220.
- [6] 庄桂. 利用纤维素原料发酵生产乳酸的研究[J]. 郑州粮食学院学报, 2000, (3): 10-12.
- [7] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [8] 黄威坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.

欢迎订阅

《山东食品发酵》

《山东食品发酵》杂志创刊于1971年, 全年出版四期, 至今已发行总第130期, 发行范围遍及全国30多个省(直辖市、市), 在全国食品发酵行业中有着广泛的影响。

本刊着重报道、刊登国内外食品发酵行业内的科研成果、学术论文、发明专利、专题综述性文章, 注重新技术、新产品、新工艺的介绍与宣传。特别是“企业论坛”栏目自开办以来, 广大企业和综合管理人员积极参与宣传、介绍、交流自己在工作中的先进管理经验, 促进了企业与企业之间的交流与合作, 也推动了行业的发展, 因而也受到了众厂家的好评。

本刊采用图文混排, 版式灵活多样, 投稿方式信函、电子邮件都可, 欢迎广大企业、个人踊跃投稿, 稿酬从优。

欢迎广大读者与本编辑部联系征订、互换业务。

联系与投稿方式:

联系地址: 山东省济南市解放路41号

单位: 《山东食品发酵》杂志编辑部

邮编: 250013 Email: sdsfjy2001@sina.com

电话: (0531)8933188

联系人: 李亮 郭秀玲