

# 粘膜乳杆菌发酵乳清生产 L- 乳酸的研究

姜绍通, 罗水忠, 郑志, 潘丽军, 蒋连平

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 粘膜乳杆菌 L-05 是从猪小肠中分离的兼性厌氧革兰氏阳性细菌, 是乳杆菌属中发现的新种。本文研究了粘膜乳杆菌 L-05 利用乳清粉生产 L- 乳酸的摇瓶发酵特性, 并对其发酵动力学进行了初步探讨。研究结果表明, 粘膜乳杆菌生长并合成 L- 乳酸的适宜条件为 37℃, 起始 pH6.0, 摇床转速为 150r/min。在优化发酵培养基(g/L)乳清 30, 蛋白胨 15, 酵母提取物 2, 柠檬酸氢二铵 2,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.16,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 中对乳清的转化率为 88.1%, 并对最适生长条件下的细胞生长模型和 L- 乳酸合成模型进行了拟合。

**关键词:** 粘膜乳杆菌; 乳清; L- 乳酸; 发酵动力学

## Production of L-lactic Acid by *Lactobacillus mucosae* L-05 on Whey

JIANG Shao-tong, LUO Shui-zhong, ZHENG Zhi, PAN Li-jun, JIANG Lian-ping

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract :** *Lactobacillus mucosae* L-05, a new strain was isolated from pig intestine, belonging to  $G^+$  facultative anaerobes. The fermentation characteristics of *Lactobacillus mucosae* L-05 on whey were studied. The high conversion rate of whey to L-lactic acid occurred when the strain was cultured in the optimum conditions (pH6.0) whey 30 g/L, peptone 15 g/L, yeast extract 2 g/L, diammonium citrate 2 g/L,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.16 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L under 37℃ and 150 r/min, with conversion rate 88.1%. The mathematical kinetic models describing the course of cell growth and L-lactic acid fermentation have been established.

**Key words:** *Lactobacillus mucosae* whey L-lactic acid; fermentation kinetics

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0162-04

乳酸按其旋光性分为 D- 乳酸、L- 乳酸和 DL- 乳酸, 广泛应用于食品、医药、环保、化工等领域<sup>[1]</sup>。L- 乳酸是食品工业中重要的酸味剂和防腐剂, 人体内只含有 L- 乳酸脱氢酶, 故只能利用 L- 乳酸。摄入较多的 D- 乳酸会导致代谢紊乱, 影响人的身体健康, 因此, 世界卫生组织(WHO)建议限制使用 D- 乳酸含量高的产品, 尤

其是婴幼儿营养食品应避免使用 D- 型或 DL- 型混合乳酸。此外 L- 乳酸是生产聚 L- 乳酸的重要原料, 而聚 L- 乳酸可用于制造手术缝合线、人造骨等, 亦可制成能生物降解的无永久性污染的包装材料、农用薄膜等。因此, 国内外许多学者都在致力于 L- 乳酸和聚 L- 乳酸的生产技术研究<sup>[2-4]</sup>。

收稿日期: 2006-08-15

基金项目: 教育部博士点基金资助项目(20040359008)

作者简介: 姜绍通(1954-), 男, 教授, 研究方向为农产品加工。

- arachidonic cascade[J]. Chemical and Engineering News, 1982, 60: 1-15.
- [2] 朱敏, 余龙江, 吴元喜. 二十二碳六稀酸和花生四稀酸在婴儿配方奶粉中的应用[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(4): 22-25.
- [3] 王安琪, 戴传超, 陈佳昕, 等. 六种金属离子对轮梗霉生长及产花生四烯酸根的影响[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 67-72.
- [4] CHEN H C, CHANG C C, CHEN C X. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate[J]. JAOCs, 1997, 74: 569-578.
- [5] VANE J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of

- action for aspirin-like drugs[J]. Nature New Biology, 1971, 231(25): 232-235.
- [6] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 495.
- [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: 326-335.
- [8] EROSHIN V K, DEDYUKHINA E G, CHISTYAKOVA T I, et al. Arachidonic acid production by species of *Mortierella*[J]. World J Microbiol, 1996(12): 91-96.

乳清是生产干酪或干酪素的副产品, 含有乳糖、乳清蛋白、多种维生素和无机盐等物质。工业发达的国家十分重视乳清的再利用<sup>[5]</sup>。随着我国干酪产量的不断增加, 乳清的开发利用也日益迫切, 乳清的开发利用对增加企业经济效益和防止环境污染具有重大的现实意义。

粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)是最近从猪小肠中分离到的兼性厌氧革兰氏阳性细菌, 是乳杆菌属中发现的新种, 为公认安全的食品级微生物<sup>[5-6]</sup>。本文对粘膜乳杆菌利用乳清发酵生产 L- 乳酸的摇瓶发酵条件进行优化, 并对其发酵动力学进行了初步研究, 为乳清废弃物再利用生产环境友好的生物产品 L- 乳酸提供一定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

L- 乳酸标品 Sigma 公司; 乳清粉、玉米淀粉、甘薯淀粉等 市售。

HPLC 仪; SHY-2A 型水浴恒温振荡器; HHB11420-BS 型电热恒温培养箱; 721MC 紫外可见分光光度计; AR1140/C 电子分析天平等。

### 1.2 发酵

#### 1.2.1 菌种

粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)L-05, 本实验室选育并保藏。

#### 1.2.2 培养基

菌种保藏与传代培养基: MRS 固体培养基葡萄糖 20g、蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母提取物 5g、柠檬酸氢二铵 2g、无水乙酸钠 5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.25g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.58g、吐温 80 1ml、琼脂 7~10g、蒸馏水 1L、pH6.2~6.4; 种子培养基: MRS 液体培养基; 发酵培养基: 在 MRS 液体培养基组分的基础上, 根据试验需要, 改变其组分和含量。

#### 1.2.3 培养条件

斜面培养: 37 ± 1℃, 培养 1~2d; 种子培养: 100ml 三角瓶装入 10ml 种子培养基, 115℃灭菌 20min, 按 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> 个细胞/ml 的量接种, 37 ± 1℃, 静置培养 24h; 发酵培养: 500ml 三角瓶按试验需要装入一定量发酵培养基, 115℃灭菌 20min, 接种一定量的对数期种子培养液, 在各试验温度和试验转速下培养 24h。

### 1.3 分析方法

还原糖的测定: 斐林氏滴定法<sup>[7]</sup>; L- 乳酸含量的测定: 参考文献<sup>[8]</sup>进行; 菌体的生长: 测定 600nm 处的 OD 值, 并通过标准曲线转换成细胞干重。

$$\text{转化率(\%)} = \frac{\text{L-乳酸含量}}{\text{碳源含量}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 粘膜乳杆菌 L-05 在种子培养基中的培养特性

粘膜乳杆菌 L-05 在 MRS 液体种子培养基培养过程中的细胞生长和产物 L- 乳酸形成特性见图 1。

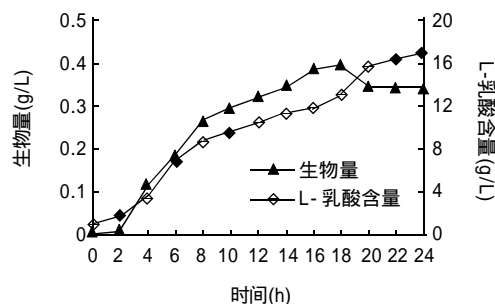


图1 粘膜乳杆菌L-05 种子培养特性

Fig.1 Culture characteristics of *Lactobacillus mucosae* L-05

图1的结果表明, 粘膜乳杆菌 L-05 经过短暂的延滞期, 培养至第 4 h, 菌体量迅速增大, 细胞代谢旺盛, 进入对数生长期; 第 16 h 后, 由于营养物的减少, C/N 比的失调以及培养基中 pH 的下降等原因, 菌体量增加缓慢, 进入平稳期; 第 22 h 后, 细胞出现退化、自溶现象, 整个细胞群体呈负增长, 进入衰亡期。在菌体细胞生长延滞期, L- 乳酸合成较缓慢; 而在细胞生长对数期内, L- 乳酸产量增大迅速; 此后, L- 乳酸合成速率逐渐趋于平缓。因此预测粘膜乳杆菌 L-05 产 L- 乳酸的发酵过程部分相关型。

### 2.2 粘膜乳杆菌 L-05 细胞生长和 L- 乳酸形成的适宜条件

#### 2.2.1 温度

将粘膜乳杆菌 L-05 接种于 MRS 液体培养基中(接种量为 10<sup>8</sup> 个 cell/ml, 下同), 在 25、30、37℃ 和 45℃ 等不同温度下静置振荡培养 24 h。结果表明, 在 37℃ 时, 粘膜乳杆菌 L-05 细胞生长和形成 L- 乳酸的能力最强。

#### 2.2.2 起始 pH

试验结果表明, 粘膜乳杆菌 L-05 的细胞生长和 L- 乳酸形成在 pH5.0~7.0 之间比较稳定, 其中在起始 pH6.0 时效果最佳。

#### 2.2.3 通气条件

首先采用 500ml 摇瓶, 改变其中装液量(50、100、150、200、250、300ml), 37℃ 静置培养; 另外, 改变摇床转速(0、100、150、200、250r/min), 固定装液量为 100ml, 振荡培养 24h。结果表明, 粘膜乳杆菌 L-05 的细胞生长量和糖酸转化率随着摇瓶中装液量的增

加即通气体积的减少稍有下降,装液量为50ml时效果最好;同时,随着摇床转速的加快,粘膜乳杆菌L-05生长和对葡萄糖的转化率先增加后降低,150r/min时,细胞生物量和糖酸转化率最大。由此可见,通气量对粘膜乳杆菌L-05生长和合成L-乳酸具有一定的影响,考虑摇瓶的利用率及动力消耗,选定装液量为100ml,摇床转速为150r/min。

### 2.3 一些碳源对粘膜乳杆菌L-05合成L-乳酸的影响

本着经济节约的配置培养基原则,选择了几种碳源替换MRS培养基中的葡萄糖,探索粘膜乳杆菌L-05对不同价格低廉的碳源的利用情况,结果见图2。图2的结果显示,被试的几种碳源中,粘膜乳杆菌L-05对葡萄糖的转化率最大,其次是乳清,而对玉米淀粉的转化率最小。葡萄糖较昂贵,且存在代谢过快的弊病<sup>[9]</sup>,因此,选择乳清作为碳源。

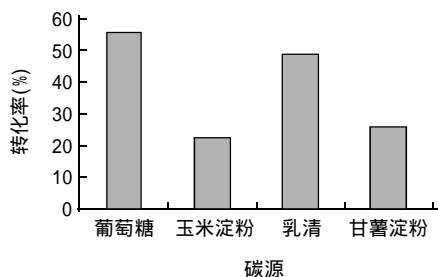


图2 粘膜乳杆菌L-05对不同碳源的转化率

Fig.2 Conversion of various carbon sources by Lactobacillus mucosae L-05

### 2.4 粘膜乳杆菌L-05发酵生产L-乳酸的优化培养基

MRS培养基营养丰富,可以获得较高的生物量;但是,这类培养基因生产成本低,并且含有许多不能被微生物利用而影响分离提纯的含氮物质而不适合工业化大规模生产。为此,本试验将MRS培养基中的碳、氮源以及无机盐分别进行正交试验,正交表安排见表1和2,试验结果见表3和4。

表1 粘膜乳杆菌L-05发酵培养基中碳、氮源的优化(g/L)

Table 1 Optimization of carbon and nitrogen sources in fermentation medium for Lactobacillus mucosae L-05 (g/L)

水平	A 乳清	B 牛肉膏	C 蛋白胨	D 酵母提取物	E 柠檬酸氢二铵
1	20	0	0	0	0
2	30	5	5	2	1
3	40	10	10	5	2
4	50	15	15	8	4

表3、4的试验结果分别表明,粘膜乳杆菌L-05优化发酵培养基中碳、氮源的组成为乳清30g/L,蛋白胨15g/L,酵母提取物2g/L,柠檬酸氢二铵2g/L;无机盐的组成为CH<sub>3</sub>COONa 2.5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.16g/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5g/L。

表2 粘膜乳杆菌L-05发酵培养基中无机盐的优化(g/L)

Table 2 Optimization of inorganic minerals in fermentation medium for Lactobacillus mucosae L-05 (g/L)

水平	A CH <sub>3</sub> COONa	B K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	C MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	E MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O
1	2.5	1	0.29	0.125
2	5.0	2	0.58	0.25
3	10	4	1.16	0.50

表3 粘膜乳杆菌L-05发酵培养基中碳、氮源的优化结果

Table 3 Optimization results of carbon and nitrogen sources in fermentation medium for Lactobacillus mucosae L-05

试验号	1	2	3	4	5	转化率 (%)
1	1	1	1	1	1	55.13
2	1	2	2	2	2	56.25
3	1	3	3	3	3	56.25
4	1	4	4	4	4	59.63
5	2	1	2	3	4	58.50
6	2	2	1	4	3	58.50
7	2	3	4	1	2	63.00
8	2	4	3	2	1	60.75
9	3	1	3	4	2	61.88
10	3	2	4	3	1	63.00
11	3	3	1	2	4	55.11
12	3	4	2	1	3	57.94
13	4	1	4	2	3	68.40
14	4	2	3	1	4	45.63
15	4	3	2	4	1	59.67
16	4	4	1	3	2	55.35
K <sub>1</sub>	56.82	60.98	56.02	55.43	59.64	
K <sub>2</sub>	60.19	55.85	58.09	60.13	59.12	
K <sub>3</sub>	59.48	58.51	56.13	58.28	60.27	
K <sub>4</sub>	57.26	58.42	63.51	59.92	54.72	
R	3.37	5.13	7.49	4.70	5.55	

表4 粘膜乳杆菌L-05发酵培养基中无机盐的优化结果(g/L)

Table 4 Optimization results of inorganic minerals in fermentation medium for Lactobacillus mucosae L-05 (g/L)

试验号	1	2	3	4	转化率 (%)
1	1	1	1	1	66.40
2	1	2	2	2	73.60
3	1	3	3	3	65.50
4	2	1	2	3	68.20
5	2	2	3	1	68.20
6	2	3	1	2	63.70
7	3	1	3	2	70.00
8	3	2	1	3	66.40
9	3	3	2	1	55.60
K <sub>1</sub>	68.50	68.20	65.50	59.50	
K <sub>2</sub>	66.70	69.40	65.50	58.38	
K <sub>3</sub>	64.00	61.60	67.90	63.25	
R	4.50	6.60	2.40	4.87	

### 2.5 粘膜乳杆菌L-05发酵动力学的初步分析

粘膜乳杆菌L-05在优化发酵培养基培养过程中基质消耗、细胞生长、产物形成等参数的变化见图3。

从图3的试验可以看出,粘膜乳杆菌L-05合成L-乳

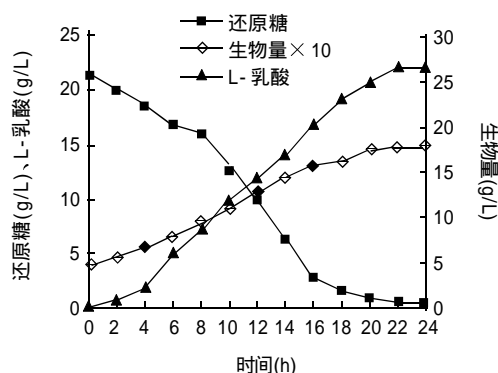


图3 粘膜乳杆菌 L-05 在优化发酵培养基中的培养特性曲线  
Fig.3 Culture curve of *Lactobacillus mucosae* L-05 in optimal fermentation medium

酸的反应体系中,基质的消耗用于细胞生长和 L-乳酸的合成, L-乳酸的合成与细胞生长呈部分相关模型。考虑到粘膜乳杆菌 L-05 细胞生长存在约 4h 的延滞期,采用修正后的 Logistic 方程来描述细胞生长动力学,其基本形式为:

$$\ln \frac{X}{X_m - X} = K \times t - \ln \left( \frac{X_m}{X_0} - 1 \right) \quad (1)$$

微分得:

$$\frac{dX}{dt} = K \times \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \times X \quad (2)$$

式中,  $X_0=0.38\text{g/L}$ ;  $X_m=1.477\text{g/L}$ ; 采用最小二乘法求得  $K=0.2347$ , 则对数生长期细胞生长的动力学方程经整理后如下:

$$X(t) = 0.38 \times e^{0.2317(t-4)} \left\{ 1 - \frac{0.38[1 - e^{0.2317(t-4)}]}{1.477} \right\} (t \geq 4h) \quad (3)$$

根据粘膜乳杆菌 L-05 产 L-乳酸的发酵过程属于部分相关模型,采 Lurdeking-Piret 方程描述产酸速率和细胞生长速率的关系:

$$r_p = am + b \quad (4)$$

$$\text{式中, } r_p = \frac{dP}{dt} / X; \quad m = \frac{dX}{dt}。$$

则(4)式变形为:

$$\frac{dP}{dt} = a \frac{dX}{dt} + bX \quad (5)$$

将(5)式从 0~t 积分后得:

$$P(t) = P_0 + a[X(t-4) - X_0] + b \left\{ \frac{X_m}{K} \times \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{Kt}) \right] \right\} \quad (6)$$

采用最小二乘法求得  $\alpha=60.79$ ,  $\beta=-0.69$ , 考虑细胞生长延滞期的影响,最终得到产酸动力学方程如下:

$$P(t) = 60.79[X(t-4) - 0.38] - 4.40 \ln[1 - 0.26(1 - e^{0.2317(t-4)})] \quad (t \geq 4h) \quad (7)$$

### 3 结论

粘膜乳杆菌 L-05 能够以乳清为碳源合成 L-乳酸,这为乳清的再利用提供了新途径。粘膜乳杆菌 L-05 生长适宜条件为  $37^\circ\text{C}$ , 起始 pH6.0, 摇床转速为  $150\text{r/min}$ 。适宜培养条件下,粘膜乳杆菌 L-05 在优化培养基中细胞生长模型为

$$X(t) = 0.38 \times e^{0.2317(t-4)} \left\{ 1 - \frac{0.38[1 - e^{0.2317(t-4)}]}{1.477} \right\} (t \geq 4h)$$

L-乳酸合成动力学方程为:

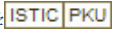
$$P(t) = 60.79[X(t-4) - 0.38] - 4.40 \ln[1 - 0.26(1 - e^{0.2317(t-4)})] \quad (t \geq 4h)$$

与真菌相比,兼性厌氧菌粘膜乳杆菌 L-05 具有节能、生产周期短等优点。作为近年来发现的新种,粘膜乳杆菌 L-05 是否适于工业化发酵生产 L-乳酸,我们将做深入的研究,为 L-乳酸的生产开拓新的微生物资源,亦为乳清的再利用提供新的处理工艺。

### 参考文献:

- [1] 刘雄伟. 乳酸和聚乳酸的最新进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 27(3): 61-65.
- [2] 葛春梅, 古绍彬, 姚建铭, 等. L-乳酸高产菌株的选育和产酸条件的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 5-8.
- [3] GAO M T, HIRATA M H, KOIDE M, et al. Production of L-lactic acid by electrodialysis fermentation[J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 1903-1907.
- [4] BAI Dong-mei, ZHAO Xue-ming, LI Xin-gang, et al. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18: 41-48.
- [5] NELSON P, GUERRA M, LUISA R, et al. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 70: 267-281.
- [6] ROOS S, KARNER F, AXELSSON L, et al. *Lactobacillus mucosae* sp. Nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 251-258.
- [7] 天津轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 16-17.
- [8] 郑志, 姜绍通, 潘丽军, 等. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, 26(3): 102-105.
- [9] 俞俊棠, 唐孝宣, 邬行彦, 等. 新编生物工艺学: 上册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 101.

# 粘膜乳杆菌发酵乳清生产L-乳酸的研究

作者: [姜绍通](#), [罗水忠](#), [郑志](#), [潘丽军](#), [蒋连平](#), [JIANG Shao-tong](#), [LUO Shui-zhong](#), [ZHENG Zhi](#), [PAN Li-jun](#), [JIANG Lian-ping](#)  
作者单位: [合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽, 合肥, 230009](#)  
刊名: [食品科学](#)   
英文刊名: [FOOD SCIENCE](#)  
年, 卷(期): 2007, 28 (2)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(9条)

1. [NELSON P;GUERRA M;LUISA R](#) [Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey](#)[外文期刊] 2001 (3)
2. [天津轻工业学院;大连轻工业学院;无锡轻工业学院](#) [工业发酵分析](#) 1991
3. [ROOS S;KARNER F;AXELSSON L](#) [Lactobacillus mucosae sp.Nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine](#)[外文期刊] 2000 (part1)
4. [俞俊棠;唐孝宣;邬行彦](#) [新编生物工艺学](#) 2003
5. [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](#)[期刊论文]-[食品科学](#) 2003 (03)
6. [BAI Dong-mei;ZHAO Xue-ming;LI Xin-gang](#) [Strain improvement of Rhizopus oryzae for over-production of L\(+\)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants](#)[外文期刊] 2004 (1)
7. [GAO M T;HIRATA M H;KOIDE M](#) [Production of L-lactic acid by electrodialysis fermentation](#)[外文期刊] 2004 (12)
8. [葛春梅;古绍彬;姚建铭](#) [L-乳酸高产菌株的选育和产酸条件的研究](#)[期刊论文]-[微生物学通报](#) 2004 (05)
9. [刘雄伟](#) [乳酸和聚乳酸的最新进展](#)[期刊论文]-[食品与发酵工业](#) 2000 (03)

## 引证文献(1条)

1. [龙淼](#), [邢欣](#), [逢晓阳](#), [李颖](#), [朱连勤](#), [刘国文](#), [王哲](#) [犊牛瘤胃内黏膜乳杆菌的分离鉴定及生物学特性研究](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#) 2009 (3)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_spkx200702040.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702040.aspx)