

高产L-乳酸干酪乳杆菌的 选育及发酵条件研究

秦浩, 张伟国*, 葛向阳, 康传利

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 以一株产L-乳酸的干酪乳杆菌 G-02 为出发菌, 采用硫酸二乙酯(DES)和亚硝基胍(NTG)进行诱变, 利用高温高糖培养基选育出一株L-乳酸发酵活力较强的菌株 G-04。并且对该菌株 7L 发酵罐发酵条件进行了研究, 探讨了溶氧、中和剂、补料方式对发酵过程的影响。实验结果表明: 在适当的发酵条件下, 该菌株可积累L-乳酸浓度达到 188g/L, 糖转化率大于 90%, 发酵周期小于 44h。

关键词: L-乳酸, 菌种选育, 干酪乳杆菌, 发酵条件

Study on screening the high L-lactic acid production strain of *Lactobacillus casei* and its fermentation conditions

QIN Hao, ZHANG Wei-guo*, GE Xiang-yang, KANG Chuan-li

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Using *Lactobacillus casei* G-02 as a starting strain for induction by diethylsulfate (DES), N-methyl-N-nitro-soguanidine (NTG) treatment, and selecting using high temperature and high sugar concentration culture conditions, a L-lactic acid hyper-producer G-04 was obtained. The effect of dissolved oxygen, neutralizer, and feeding on L-lactic acid production in 7L bioreactor were also discussed. Experimental results showed that the strain can accumulate L-lactic acid 188g/L, sugar conversion efficiency more than 90% and the fermentation period less than 44h under the optimized fermentation conditions.

Key words: L-lactic acid; breeding; *Lactobacillus casei*; fermentation condition

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)07-0223-04

乳酸是一种重要的、多用途的有机酸,可广泛应用于食品、医药、化工、制药、纺织、环保和农业等诸多领域。这种精细化学品被用作酸味剂、调味剂、防腐剂、手性药物中间体、植物生长调节剂、生物可降解材料、化妆品及个人护理品等组分。近年来,随着乳酸及其衍生物应用范围的不断扩大,市场需求也日益增长,目前正以每年 8%~10% 的速度增长,预计在今后 10 年内,世界对 L-乳酸的需求量将猛增至每年 100 万 t,而我国乳酸年生产能力还不足 3 万 t,而且乳酸的生产水平不高,产品主要为消旋的 DL-乳酸,档次低,具有质量不稳定、不耐热、容易变色等缺点^[1-2]。本文以本实验室收藏的一株干酪乳杆菌为出发菌,采用传统的诱变方法,经反复筛选驯化,得到一株产 L-乳酸发酵活力较强的菌株,并对其 7L 罐发酵条件进行了优化,使其产酸达到较高水平。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-07-05 * 通讯联系人

作者简介: 秦浩(1986-),男,在读硕士研究生,主要从事发酵工艺学的研究。

1.1 材料与仪器

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) G-02 本实验室分离收藏的一株 L-乳酸产生菌; 葡萄糖 工业级, 山东西王生化科技有限公司; 玉米浆 华北制药康欣有限公司; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、吐温、 KH_2PO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ 均为分析纯; 种子培养基(g/L) 葡萄糖 25、玉米浆 40、 $(NH_4)_2SO_4$ 5、 KH_2PO_4 1、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、 $CaCO_3$ 10, pH 7.0, 装液量 50mL/250mL, 121℃ 灭菌 20min; 发酵培养基(g/L) 葡萄糖 120、玉米浆 15、 $(NH_4)_2SO_4$ 20、 KH_2PO_4 1、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、吐温 80 1、 $CaCO_3$ 50, pH 7.0, 装液量 50mL/250mL, 115℃ 灭菌 10min; $CaCO_3$ -溴甲酚紫平板培养基(g/L) 在如上种子培养基的基础上添加琼脂 20, 1.6% 溴甲酚紫溶液 1mL, pH 7.0; 高糖、高温培养基在如上种子培养基的基础上分别调节葡萄糖浓度为 200、250、300、350、400g/L; 并调节发酵温度分别为 37、39、41、43、45℃。

SBA-40C 生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所; 立式圆形压力蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂; 往复式摇床 无锡查桥轻机厂; UV-2100 可

见紫外分光光度计 上海尤尼克有限公司; 超净工作台 苏净集团安泰公司; PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 7L 发酵罐 高百特发酵机(上海)有限公司。

1.2 诱变方法

1.2.1 硫酸二乙酯(DES)诱变 取制备好的 10mL 菌悬液装于 10mL 无菌三角瓶中,加入 0.1mL 的 DES 和 0.1mL 无菌乙醇,振荡 15min,用 5.0% 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止反应,离心收集菌体,用 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液洗涤 2~3 次,最后取菌悬液稀释涂布于筛选培养基上培养^[3]。

1.2.2 亚硝基胍(NTG)诱变 称取少量 NTG 溶解在少量丙酮中,再加入磷酸缓冲液,制成浓度为 1.0g/L 的 NTG 溶液。取一定量制备好的菌悬液,加入 NTG 溶液,使其终浓度为 0.25g/L,30℃ 下振荡反应一定时间,诱变结束后快速离心终止反应。用生理盐水洗涤 2~3 次后,加入到新鲜的种子培养基中进行后培养 6h。最后取后培养液离心,用生理盐水洗涤 1~2 次,按梯度稀释涂布筛选平板培养。

1.3 筛选方法

1.3.1 初筛 将诱变后的菌株细胞接种于碳酸钙-溴甲酚紫平板上,37、39、41、43、45℃ 各培养 48h,将透明圈较大的菌株进行复筛。

1.3.2 复筛 将初筛得到的菌株先进行种子培养,然后每株菌分别接 5mL 菌液于 3 瓶装含有发酵培养基的摇瓶中,37、39、41、43、45℃ 各振荡培养 72h,筛出产酸高的菌株。

1.4 分析方法

1.4.1 pH 测定 用国产精密 pH 试纸和 PHS-3C 型精密 pH 计测定。

1.4.2 OD 值的测定 取 0.2mL 的发酵液,用 0.25mol/L 的盐酸溶液稀释 25 倍后,用分光光度计于光程 1cm、波长 520nm 条件下测定吸光度。

1.4.3 L-乳酸和还原糖的测定 SBA-40C 生物传感分析仪。

2 结果与讨论

2.1 L-乳酸菌种选育结果

2.1.1 L-乳酸产生菌的选育谱系 经实验确定,本研究采用的菌种为专性同型发酵乳杆菌,葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸,丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下几乎全部生成乳酸。因此,该菌株具有较高的乳酸脱氢酶活性。然而,在 L-乳酸的发酵中有着明显的底物抑制现象,过高的糖浓度显著抑制菌体的生长,影响发酵的速度和产物的生成速率。因此有必要采用诱变选育和耐高温高糖筛选相结合的育种策略,筛选高产菌株^[4]。

以乳酸菌(*Lactobacillus* sp.) G-02 为出发菌株,采用 DES 和 NTG 诱变处理,采用高温高糖培养基对其筛选,最后获得一株 L-乳酸产生菌 G-04,在摇瓶发酵条件下发酵液中可积累 L-乳酸 151g/L。选育过程如图 1 所示。

2.1.2 DES 诱变筛选结果 将 DES 诱变后的出发菌株,取适当稀释度涂布于碳酸钙-溴酚蓝平板,选择

H/C(变色圈与菌落直径比值)大的菌株。从平板上挑出单菌落共 87 株,经摇瓶复筛选出产酸水平有所提高的 16 株菌株,其 L-乳酸产量见表 1。

菌株	L-乳酸 (g/L)	提高比例 (%)
乳酸菌(<i>Lactobacillus</i> sp.) G-02	92	-
↓ DES		
G-03	118	22.0
↓ NTG		
G-04	151	27.9

图 1 L-乳酸产生菌 G-02 选育谱系

表 1 菌株 G-02 经 DES 诱变后部分突变株 L-乳酸的产量

菌株编号	L-乳酸 (g/L)	菌株编号	L-乳酸 (g/L)
G-02-03	110	G-02-59	103
G-02-07	118	G-02-64	114
G-02-10	109	G-02-67	112
G-02-11	103	G-02-73	100
G-02-37	113	G-02-76	106
G-02-39	98	G-02-77	96
G-02-44	108	G-02-80	113
G-02-48	110	G-02-83	115

由表 1 可知,G-02-07 的 L-乳酸产量最高,为 118g/L,比出发菌提高了 22%,故选取该菌株做进一步研究,并将其重新编号为 G-03。

2.1.3 NTG 诱变筛选结果 以 G-03 为出发菌进行 NTG 诱变处理,经 NTG 诱变后涂布碳酸钙-溴酚蓝平板培养,选择 H/C(变色圈与菌落直径比值)大的菌株。从碳酸钙-溴酚蓝平板上挑出单菌落共 55 株,经摇瓶复筛选出产酸水平较高的 7 株,复筛结果见表 2。

表 2 菌株 G-03 经 NTG 诱变后部分突变株 L-乳酸产量

菌株编号	L-乳酸 (g/L)	菌株编号	L-乳酸 (g/L)
G-03-11	146	G-03-31	151
G-03-15	143	G-03-36	147
G-03-23	149	G-03-52	145
G-03-26	146		

由表 2 可知,G-03-31 产酸较高,将其编号为 G-04。

2.2 乳酸菌 G-04 传代稳定性研究

将菌株 G-04 在斜面上连续接种五代,以初始葡萄糖浓度 160g/L,温度 41℃ 摇瓶发酵条件,考察其产 L-乳酸的稳定性,产酸结果见图 2。由图 2 可以看出,该菌株连续传代五次产酸没有明显变化,说明该菌株的遗传稳定性较好。

2.3 菌株 G-04 最适发酵温度

温度是微生物生长和繁殖过程中重要的影响因素,每种微生物都有其最适的发酵温度范围。温度过低会使酶活降低,而温度过高会使酶失去活性,两者都会影响细胞的生长代谢从而影响最终发酵产物的产量。所以,温度是保证酶活性的重要条件,在发酵过程中要维持菌体生长代谢所需的最适宜温度。由图 3 可知,随着温度的增加,L-乳酸的产量和产酸速率先增加后减小,其中 41℃ 时 L-乳酸的产量和产

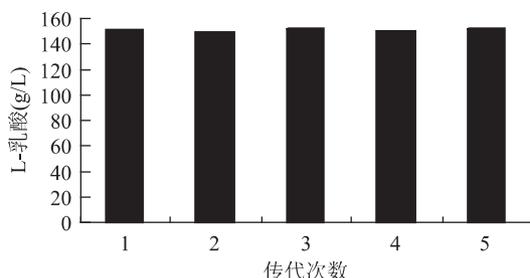


图2 G-04的遗传稳定性实验

酸速率最大。

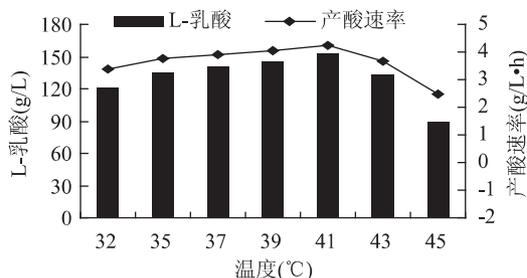


图3 温度对L-乳酸产量的影响

2.4 菌株 G-04 最适初始葡萄糖浓度

碳源是微生物生长繁殖所必需的营养要素,但在乳酸的发酵过程中存在底物抑制现象,过高的初糖浓度会影响菌体的生长和产酸。本实验中选择葡萄糖为唯一碳源,在41℃下考察不同的初糖浓度对其产酸的影响。由图4可知,当初始葡萄糖的含量高于或低于160g/L时,乳酸的产量和转化率都会降低。当葡萄糖浓度为160g/L时,其最终L-乳酸产量为150.4g/L,转化率为94%。这可能是由于当葡萄糖浓度过高时,导致培养基渗透压增高,从而抑制产物的合成;当葡萄糖浓度过低时,不能为微生物提供充足的碳源,导致L-乳酸产量偏低。故只有在培养基中选择合适的初糖浓度才能保证L-乳酸的产量较高。因此,该实验中选择葡萄糖的初始浓度为160g/L。

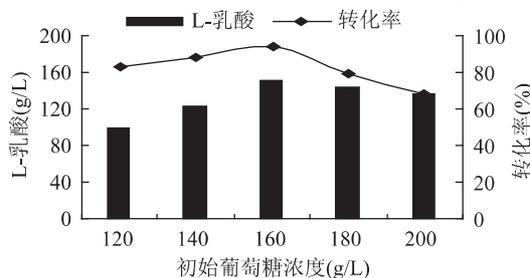


图4 初始葡萄糖浓度对L-乳酸产量的影响

2.5 中和剂对L-乳酸产量的影响

在乳酸的发酵过程中,由于乳酸的不断积累导致发酵液的pH降低,从而抑制菌体的生长和乳酸的生成,因此需要加入中和剂来缓解乳酸的反馈抑制作用^[5]。乳酸发酵中常用的中和剂有碳酸钙、氨水、氢氧化钠和碳酸钠等,碳酸钙作为中和剂可以将乳酸以乳酸钙的形式固定,从而减弱乳酸的反馈抑制作用。但碳酸钙是一种缓慢型的酸中和剂,pH调节能力有限,且发酵后期生成的乳酸钙易造成发酵液粘稠^[6],而氨水和氢氧化钠能更好地将pH调控在合适的范围,且发酵后期不会造成发酵液粘稠。

故实验中选取碳酸钙、25%的氨水和20%的氢

氧化钠为中和剂,又因为钙离子可以提高促进因子(吐温-80)的效力^[7],所以在使用氨水和氢氧化钠来调节发酵液pH时前期加入40g/L的碳酸钙,发酵液的pH通过发酵罐自动控制系统维持在5.8左右。

由图5和图6可以看出,对于菌体的生长和产酸,使用碳酸钙与氢氧化钠比使用氨水效果要好一些。其中在单独使用碳酸钙为中和剂时,发酵后期仅能将pH维持在5.5左右,且发酵30h时发酵液出现粘稠现象,产酸基本结束。这是因为生成的乳酸钙已经超过此温度下的溶解度,导致乳酸钙固体的出现。而氢氧化钠可以解决发酵液后期粘稠的现象,并且可以将pH更好地维持在5.8左右,40h产酸达到155g/L。

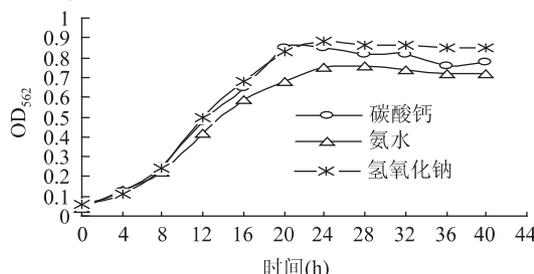


图5 不同中和剂对菌体生长的影响

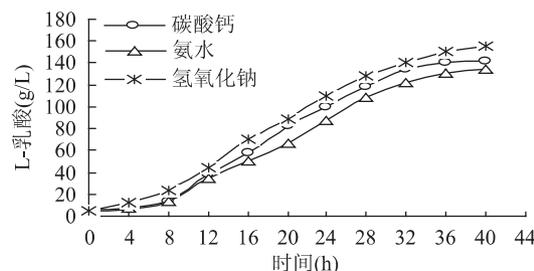


图6 不同中和剂对产酸的影响

2.6 溶氧对L-乳酸产量的影响

对于兼性厌氧菌来说,过高的氧分压不利于菌的生长和代谢,而氧气对于处于生长期的兼性厌氧菌来说可能是必需的。并且干酪乳酸菌发酵产乳酸是一个部分生长偶联型的过程,生物量的积累对乳酸的产生有着正协同作用,故乳酸发酵过程中对通风方式进行了优化,以此来有效地提高乳酸的产量。

由图7可知,发酵过程前期通入适量的空气可以促进菌的生长,发酵后期停止通风比通风产酸有所增高,且发酵过程中产酸速率保持了较高水平,最终L-乳酸产量为157g/L。

2.7 分批补料方式对L-乳酸产量的影响

在乳酸发酵过程中,过高的底物浓度会抑制菌体生长和产酸。为了解除葡萄糖浓度过高造成的抑制,避免在发酵过程中因一次性投糖过多造成细胞生长减缓和产酸降低,所以采用分批补糖方式来进行乳酸发酵。补糖的原则在于控制微生物的中间代谢,使其能够更多地合成所需产物^[8]。为此根据前期实验设计补糖策略:初始葡萄糖浓度为120g/L,当残糖降至50g/L时补加葡萄糖,使总糖浓度达到170g/L,残糖降至50g/L时再次补加葡萄糖,使总糖浓度最终为200g/L。

(下转第245页)

研究[J].食品科学 2006 27(10):372-375.

[6] 贾玲昌,许爱华,宋根萍,等.2种银杏外种皮多糖的成分及药效学比较研究[J].中国新药杂志 2001,10(8):592-594.

[7] 陈华圣,许爱华,王翊,等.银杏外种皮多糖对免疫功能低下小鼠 IL-2 活性及 sIL-2R 的影响[J].中药药理与临床,2001,17(4):17-19.

[8] Matsumura Y, Egami M, Satake C, et al. Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions [J]. Food Chemistry 2003 83: 107-119.

[9] Akihiro N, Hitoshi F, Masayoshi K, et al. Effect of soybean

soluble polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions [J]. Food Hydrocolloids 2003 17: 333-343.

[10] Akihiro N, Taro T, Ryuji Y, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18: 795-803.

[11] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药理学杂志,1996,31(9):550-552.

[12] Lorry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Bio Chemistry, 1951 93: 265-275.

(上接第 225 页)

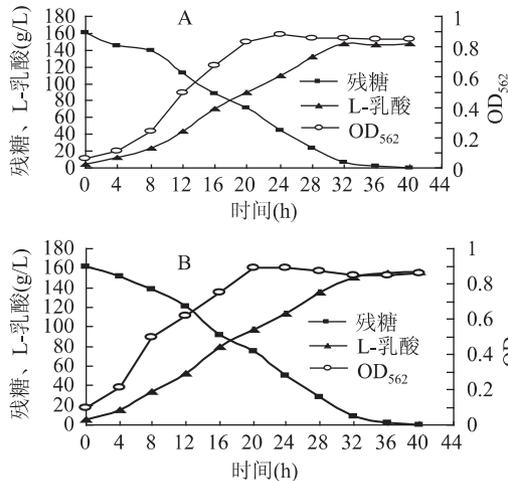


图7 溶氧对乳酸发酵的影响

注: A 为发酵过程中一直以通风量为 1L/min 通入空气; B 为分段控制溶氧 0~20h 通风量为 1L/min 20h 后停止通风。

图 8 比较了一次性加入葡萄糖与两次补糖对菌体生长和产酸的影响。由图 8 (A) 可知,高浓度的葡萄糖对菌的生长和产酸均产生了抑制作用,发酵至 16h 之后 OD 不再增加,40h 时乳酸产率降低,且残留葡

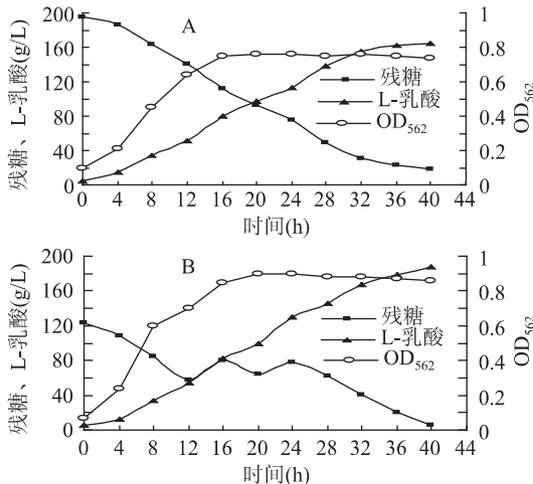


图8 补糖方式对乳酸发酵的影响

注: A 为发酵过程中不补糖; B 为发酵过程中分两次补糖。

萄糖没有被菌体利用转化成乳酸。这可能是由于菌体量太少,导致部分葡萄糖没有转化利用。图 8 (B) 显示通过两次补糖方式减弱了底物的抑制作用,发酵 20h 时菌体 OD 值为 0.9,最终乳酸产量为 188g/L,转化率为 94%。

3 结论

本文对一株产 L-乳酸干酪乳杆菌进行 DES 和 NTG 诱变,并使用高温高糖作为选育条件,结果得到一株产 L-乳酸发酵活力较强的菌株;并确定该菌株 7L 发酵罐的发酵条件:通过两次补糖使总糖浓度为 200g/L,前期 0~20h 通风量为 1L/min,20h 后停止通风,以 40g/L 的碳酸钙和 20% 的氢氧化钠为中和剂,最终 L-乳酸产量为 188g/L,同时糖转化率达到 94%。为干酪乳杆菌发酵生产 L-乳酸的工业化生产提供了参考依据。

参考文献

- [1] 曹本吕,徐建林,匡群.L-乳酸研究综述[J].食品与发酵工业,1993(3):56-61.
- [2] PeiminYin, Naoki Nishina, Yuuko Kosakai, et al. Enhanced production of L(+) -lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift Bioreactor [J]. J Ferment Bioeng, 1997 84: 249-253.
- [3] 许益清,张伟国.L-组氨酸产生菌株的选育[J].食品与发酵工业 2005 31(1):83-85.
- [4] 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,2003,75(2):26-29.
- [5] 金其荣.有机酸发酵工艺学[M].北京:轻工业出版社,1989:358-362.
- [6] 徐国谦,储炬,王永红,等.不同的中和剂对 L(+) -乳酸发酵的影响[J].工业微生物 2007 37(4):1-5.
- [7] 赵瑞香.嗜酸乳杆菌及其应用研究[M].北京:科学出版社 2007:43-45.
- [8] 李艳.发酵工程原理与技术[M].北京:高等教育出版社,2007:236-238.