

甘蔗糖蜜发酵生产 L-乳酸工艺条件研究^{*}

Fermentation Condition Studies on the Production of L-lactic Acid from Sugarcane Molasses

黄靖华¹, 孙 靛^{1,2}, 吴军华³, 孙菲菲², 李检秀², 黄艳燕², 郭 铃², 黄日波^{1,2,*}

HUANG Jing-hua¹, SUN Liang^{1,2}, WU Jun-hua³, SUN Fei-fei², LI Jian-xiu², HUANG Yan-yan², GUO Ling², HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Science; 3. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 以甘蔗糖蜜作为原料, 利用经诱变筛选得到的鼠李糖乳杆菌 SCT-10-10-60 发酵生产 L-乳酸。通过设置单因素实验, 研究不同初始糖蜜浓度(50%、40%、30%、20%)、不同发酵温度(30℃、37℃、42℃、47℃)、不同 pH 调节剂碳酸钙加入量(4%、6%、8%、10%)和氮源替代(尿素替代酵母粉)对 L-乳酸产量的影响。结果表明, 在初始糖蜜浓度 20% (*m/V*)、温度 37℃、碳酸钙浓度 4% (*m/V*)、鼠李糖乳杆菌 SCT-10-10-60 接种量 6% (*V/V*) 的发酵条件下, 发酵 40h L-乳酸的产量最高可以达到 106g/L。尿素不能作为菌株生长所需要的氮源。

关键词: L-乳酸 甘蔗糖蜜 鼠李糖乳杆菌

中图分类号: TQ921 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0273-05

Abstract: The fermentation conditions of producing L-lactic acid with sugarcane molasses as feedstock were investigated using mutated *Lactobacillus rhamnosus* SCT-10-10-60. By the single factor experiments, optimal fermentation conditions were investigated. Experimental results showed that under conditions of 20% molasses concentration (*m/V*), 37℃ fermentation temperature, 4% (*m/V*) calcium carbonate addition, 6% (*V/V*) inoculum concentration, and other fermentation conditions, the maximum production of L-lactic acid can reach to 106g/L in 40 hours. Experimental results also show that urea can not substitute the yeast extracts as nitrogen sources for the growth of bacteria. In addition, fermentation broth can maintain liquid but not coagulate in the late state, which is conducive to the separation and purification of final products. Therefore, L-lactic acid production from cheap sugarcane molasses is prospective.

Key words: L-lactic acid, sugarcane molasses, *Lactobacillus rhamnosus*

甘蔗糖蜜是工业上蔗糖生产后期的废液, 含有丰富的糖分和其它可利用的化学物质^[1], 是一种重要的非粮生物质原料, 在化工、轻工、食品、医药和建材等行业有广泛应用。目前甘蔗糖蜜多被用于发酵生产各种产品, 如酒精、味精、柠檬酸、赖氨酸、焦糖色素等^[2,3]。在国内, 陆琦等^[4]利用甘蔗糖蜜发酵生产酒

精, 37℃发酵 40h 产生的醪液酒精含量可以达到 12.14% (*V/V*); 汤兴俊等^[5]利用甘蔗糖蜜可以生产出澄清度高、红色素指数 ≥ 5.5 、色率 ≥ 30000 EBC、耐酸性极好的优质焦糖色素; 杨芳等^[6]以甘蔗糖蜜为原料发酵生产 L-谷氨酸, 平均产量可以达到 125g/L, 糖酸转化率为 60.14%。在国外, Lee 等^[7]以甘蔗糖蜜为原料, 采用两步补料分批发酵法生产热凝胶, 产量可以达到 60g/L; Cazetta 等^[8]研究发现, 可以利用运动发酵单胞菌在还原糖浓度高达 300g/L 的甘蔗糖蜜培养基中发酵生产山梨醇。

乳酸是重要的工业材料, 被广泛应用于医药、食

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 黄靖华(1986-), 男, 硕士, 主要从事微生物技术研究。

* 国家科技支撑计划项目(2007BAD75B06), 广西科学基金(桂科攻 0782003-4), 广西科学院基本科研业务项目(10YJ25S W11)资助。

** 通讯作者: rbhuang@gxas.cn.

品、农药、日用品、皮革纺织等^[9,10]。目前,工业上大多数都以玉米、大米、马铃薯等淀粉质作为原料生产 L-乳酸^[11~13],由于这些原料都是粮食作物,所以生产受到限制。如果能利用甘蔗糖蜜作为原料,发酵生产 L-乳酸则具有优越性,目前相关工艺在国内外未见报道。

本研究立足于生产实际,以降低生产成本为原则,研究了以廉价的甘蔗糖蜜为原料发酵生产 L-乳酸的可能性。采用摇瓶发酵的方式,设置平行的重复实验并综合实验数据进行分析,以尽可能消除实验误差。实验对发酵的初始糖蜜浓度、培养温度、pH 值调节剂的加入量和氮源替代物做了研究,为实现利用甘蔗糖蜜发酵生产 L-乳酸提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

鼠李糖乳杆菌诱变菌株 SCT-10-10-60(本实验室诱变获得)。

1.2 甘蔗糖蜜

甘蔗糖蜜由广西凭祥市丰浩酒精有限公司提供。将糖蜜溶于蒸馏水,加入 1%的絮凝剂聚丙烯酰胺(PAM),过滤后加入浓盐酸调节至 pH 值 < 3,水解过夜后加热处理 1h,最后加入 20%NaOH 调节 pH 值至中性^[14]。将糖蜜加入发酵培养基时,按照比例稀释成不同浓度的糖蜜。

1.3 培养基

MRS 培养基:含还原糖 2%、酵母粉 0.5%、蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、MgSO₄·7H₂O 0.02%、MnSO₄ 0.005%、乙酸钠 0.5%、柠檬酸二铵 0.2%,自然 pH 值,121℃灭菌 20min。

发酵培养基:稀释后的甘蔗糖蜜、酵母粉 3%、中和剂 CaCO₃,总体积为 100ml, pH 值 6.5~7.0,121℃灭菌 20min。

1.4 方法

1.4.1 种子培养

将发酵菌株接种于 MRS 培养基,于 37℃二氧化碳碳厌氧培养箱静置培养,经传代培养 8~10h 后,作为发酵种子液。

1.4.2 单因素实验设计

以经处理后的甘蔗糖蜜作为唯一碳源,通过设计一系列的单因素实验,研究不同糖蜜浓度、不同温度、不同 CaCO₃浓度、不同接种量对发酵生产 L-乳酸的影响^[15]。

1.4.3 不同初始糖蜜浓度的发酵

以 1.3 所示发酵培养基为基础,分别以 50%、

40%、30%、20%的初始糖蜜浓度进行发酵。在接种量 6%、37℃、200r/min 条件下摇瓶发酵 40~64h,每隔 8h 取样,检测还原糖量、L-乳酸产量和细胞菌数。

1.4.4 不同温度下的发酵

分别在 30℃、37℃、42℃和 47℃,初始糖蜜浓度 20%、接种量 6%、200r/min 的条件下摇瓶发酵 40~56h,每隔 8h 取样,检测还原糖量、L-乳酸产量和细胞菌数。

1.4.5 不同碳酸钙加入量的发酵

分别在 4%、6%、8%和 10%4 个不同碳酸钙加入量,初始糖蜜浓度 20%、接种量 6%、37℃、200r/min 的条件下摇瓶发酵 40h,每隔 8h 取样,检测还原糖量、L-乳酸产量和细胞菌数。

1.4.6 不同氮源的发酵

分别配制浓度为 0%、0.1%、0.2%、0.4%的尿素(m/V)与 1.5%酵母粉(m/V)混合后作为培养基的氮源,以 3%酵母粉(m/V)作为对照,在初始糖蜜浓度 20%、接种量 6%、37℃、200r/min 的条件下摇瓶发酵 40~64h,每隔 8h 取样,检测还原糖量、L-乳酸产量和细胞菌数。

1.4.7 检测方法

L-乳酸的检测使用山东省科学院生物研究所生产的 SBA-40 生物传感分析仪进行,还原糖的检测使用 DNS 法,细胞计数使用血球计数板进行。

2 结果与分析

2.1 不同初始糖蜜浓度对发酵的影响

因为在发酵过程中,发酵液中的底物和产物均能抑制鼠李糖乳酸杆菌的发酵,所以如果发酵液中存在过高的底物浓度即还原糖的含量过高将会直接影响 L-乳酸的产量。通过对以不同初始糖蜜浓度发酵的产酸量以及产酸速度进行研究,确定最佳的糖蜜发酵浓度。

初始糖蜜浓度从高到低,发酵结束时还原糖量分别为(20.1±0.31)g/L、(0.9±0.02)g/L、(8.2±0.15)g/L和(0.9±0.02)g/L(图1);L-乳酸产量最大可分别达到(1±0.10)g/L、(19.6±0.92)g/L、(14.5±0.12)g/L和(10.6±0.26)g/L(图2);最大细胞菌数分别为 8.9×10⁷/ml、2.1×10⁹/ml、1.7×10⁹/ml和 2×10⁹/ml(图3)。

由实验结果可知,在一定范围内,发酵液的初始糖蜜浓度与 L-乳酸产量呈正相关,加大浓度可以提高 L-乳酸产量。在初始糖蜜浓度为 20%、30%和 40%时,随着浓度的升高,L-乳酸的产量也随之升高。但由于存在底物抑制现象,所以高浓度的糖蜜会导致

菌体生长速度减缓, 过高的糖浓度(如 50%)则会抑制菌体生长并导致无乳酸生成。如图 1、图 2、图 3 所示, 当糖蜜浓度为 20% 时, 菌体具有生长快、产酸快、发酵周期短的特点, 因此以 20% 的糖蜜浓度作为补料发酵以及后续实验的初始浓度。

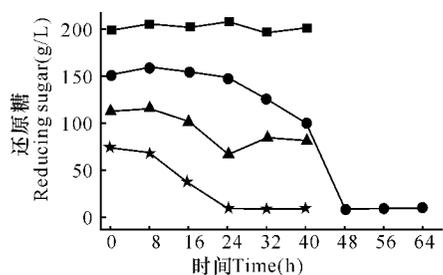


图 1 不同初始糖蜜浓度实验还原糖消耗

Fig. 1 Reducing sugar consumption of SCT-10-10-60 in different molasses concentrations

■: 50%, ●: 40%, ▲: 30%, —: 20%.

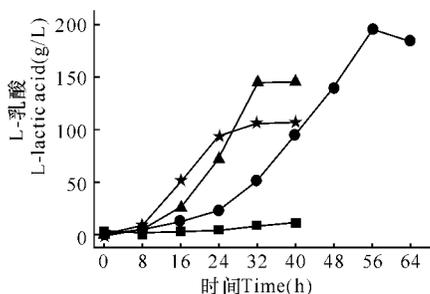


图 2 不同初始糖蜜浓度实验 L-乳酸产量

Fig. 2 L-lactic acid production of SCT-10-10-60 in different molasses concentrations

■: 50%, ●: 40%, ▲: 30%, —: 20%.

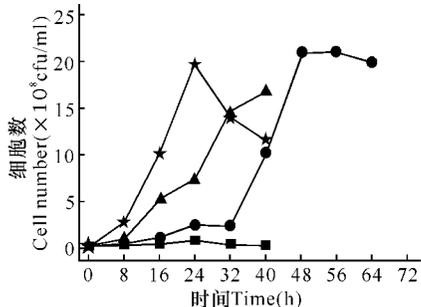


图 3 不同初始糖蜜浓度实验细胞菌数

Fig. 3 Cell number of SCT-10-10-60 in different molasses concentrations

■: 50%, ●: 40%, ▲: 30%, —: 20%.

2.2 不同温度对发酵的影响

发酵结束时, 从低温到高温的残糖量分别为 (1.1 ± 0.02) g/L, (0.9 ± 0.01) g/L, (0.9 ± 0.02) g/L 和 (1.2 ± 0.03) g/L (图 4); L-乳酸产量最大分别为 (7.6 ± 0.12) g/L, (8 ± 0.40) g/L, (7.4 ± 0.06) g/L 和 (6.8 ± 0.36) g/L (图 5); 最大细胞菌数分别为 2.1×10^9 /ml, 2.6×10^9 /ml, 2×10^9 /ml 和 1.5×10^9 /ml (图 6)。

由此可见, 温度过低时, 菌体生长缓慢、发酵周期长; 而温度过高时, 菌体生长过快、较快进入菌株生长的衰退期, 不利于 L-乳酸的积累。在 37℃ 时, L-乳酸的产量最高, 因此确定 37℃ 为后续实验的培养温度。

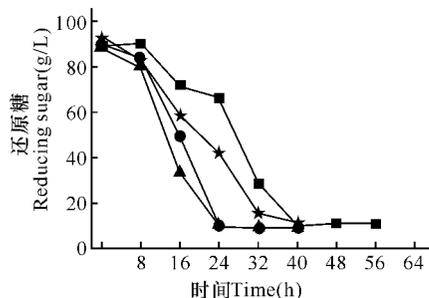


图 4 不同培养温度实验还原糖消耗

Fig. 4 Reducing sugar consumption of SCT-10-10-60 in different temperatures

■: 30°C, ●: 37°C, ▲: 42°C, —: 47°C.

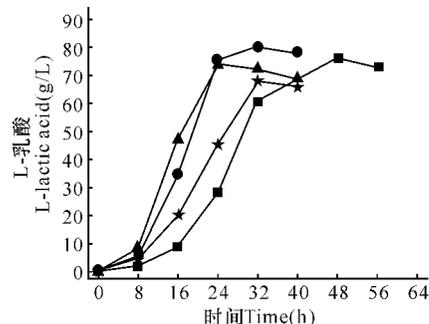


图 5 不同培养温度实验 L-乳酸产量

Fig. 5 L-lactic acid production of SCT-10-10-60 in different temperatures

■: 30°C, ●: 37°C, ▲: 42°C, —: 47°C.

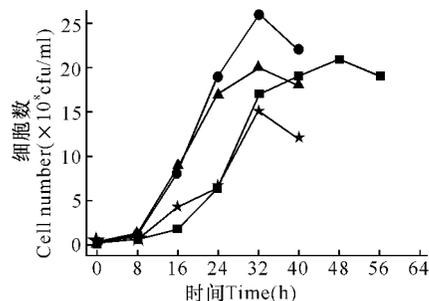


图 6 不同培养温度实验细胞菌数

Fig. 6 Cell number of SCT-10-10-60 in different temperatures

■: 30°C, ●: 37°C, ▲: 42°C, —: 47°C.

2.3 不同碳酸钙加入量对发酵的影响

随着 L-乳酸的不断积累, 发酵液的 pH 值降低。据相关文献报导, 当 pH 值 < 5 时, 发酵受到抑制^[16, 17]。因此本实验使用碳酸钙作为 pH 值调节剂。

从图 7、图 8、图 9 可以看出, 不同的碳酸钙加入量对菌株生长和产酸量的影响没有显著差别。发酵

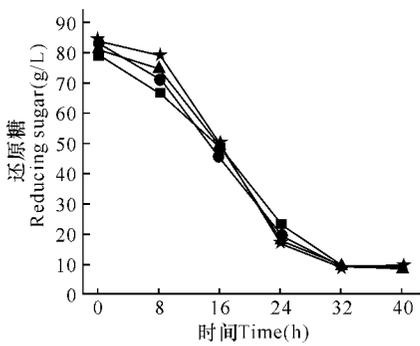


图 7 不同碳酸钙加入量实验还原糖消耗曲线

Fig. 7 Reducing sugar consumption of SCT-10-10-60 in different calcium carbonate additions

■: 4% 碳酸钙, ●: 6% 碳酸钙, ▲: 8% 碳酸钙, ◆: 10% 碳酸钙.

■: 4% calcium carbonate, ●: 6% calcium carbonate, ▲: 8% calcium carbonate, ◆: 10% calcium carbonate.

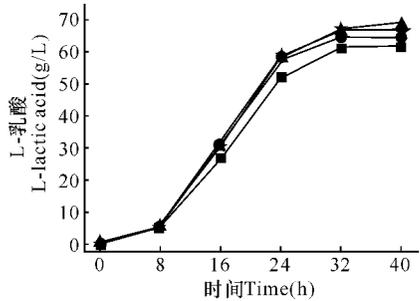


图 8 不同碳酸钙加入量实验 L-乳酸产量

Fig. 8 L-lactic acid production of SCT-10-10-60 in different calcium carbonate additions

■: 4% 碳酸钙, ●: 6% 碳酸钙, ▲: 8% 碳酸钙, ◆: 10% 碳酸钙.

■: 4% calcium carbonate, ●: 6% calcium carbonate, ▲: 8% calcium carbonate, ◆: 10% calcium carbonate.

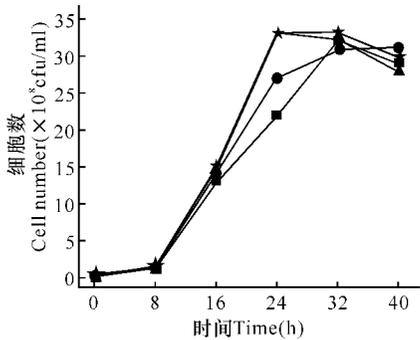


图 9 不同碳酸钙加入量实验细胞菌数

Fig. 9 Cell number of SCT-10-10-60 in different calcium carbonate additions

■: 4% 碳酸钙, ●: 6% 碳酸钙, ▲: 8% 碳酸钙, ◆: 10% 碳酸钙.

■: 4% calcium carbonate, ●: 6% calcium carbonate, ▲: 8% calcium carbonate, ◆: 10% calcium carbonate.

结束后,不同加入量的碳酸钙均有残余(4%加入量的碳酸钙仅有微量残余),发酵液中碳酸钙都达到饱和,充分中和了生成的 L-乳酸,而且不同碳酸钙加入量的发酵液 pH 值差别不大,说明不同加入量对发酵的影响程度相当。减少碳酸钙的加入量可以降低成本,

因此确定后续实验的加入量为 4%。

2.4 不同氮源对发酵的影响

由于酵母粉价格昂贵,所以本研究尝试使用廉价的尿素作为氮源。从图 10、图 11、图 12 可以看出,虽然尿素浓度不同,但是菌体的生长速度和产酸量差别不大, L-乳酸产量不高,发酵 64h 产量最大值仅有 $(3.6 \pm 0.06)g/L$ 。而以 3% 的酵母粉 (m/V) 为氮源的对照,在发酵 32h 后, L-乳酸产量即可达到 $(7.2 \pm 0.17)g/L$ 。这表明,尿素不能替代酵母粉作氮源。可能是因为酵母粉营养丰富,含有多种菌体生长因子,而尿素营养单一,不能满足微生物快速生长的需求,所以菌体生长缓慢,产酸量也不高。

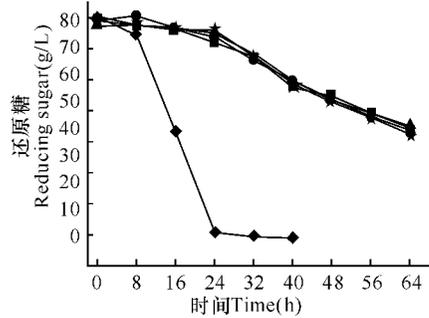


图 10 不同尿素浓度实验还原糖消耗曲线

Fig. 10 Reducing sugar consumption of SCT-10-10-60 in different urea concentrations

■: 1.5% 酵母粉, ●: 1.5% 酵母粉 + 0.1% 尿素, ▲: 1.5% 酵母粉 + 0.2% 尿素, ◆: 1.5% 酵母粉 + 0.4% 尿素, ◆: 3% 酵母粉.

■: 1.5% yeast extract, ●: 1.5% yeast extract + 0.1% urea, ▲: 1.5% yeast extract + 0.2% urea, ◆: 1.5% yeast extract + 0.4% urea, ◆: 3% yeast extract.

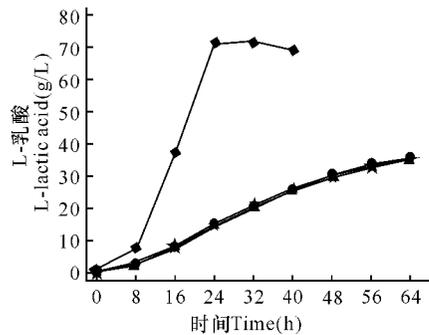


图 11 不同尿素浓度的 L-乳酸产量

Fig. 11 L-lactic acid production of SCT-10-10-60 in different urea concentrations

■: 1.5% 酵母粉, ●: 1.5% 酵母粉 + 0.1% 尿素, ▲: 1.5% 酵母粉 + 0.2% 尿素, ◆: 1.5% 酵母粉 + 0.4% 尿素, ◆: 3% 酵母粉.

■: 1.5% yeast extract, ●: 1.5% yeast extract + 0.1% urea, ▲: 1.5% yeast extract + 0.2% urea, ◆: 1.5% yeast extract + 0.4% urea, ◆: 3% yeast extract.

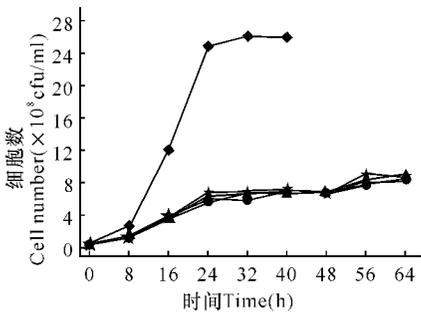


图 12 不同尿素浓度实验细胞菌数

Fig. 12 Cell number of SCT-10-10-60 in different urea concentrations

■: 1.5% 酵母粉, ●: 1.5% 酵母粉 + 0.1% 尿素, ▲: 1.5% 酵母粉 + 0.2% 尿素, ×: 1.5% 酵母粉 + 0.4% 尿素, ◆: 3% 酵母粉。

■: 1.5% yeast extract, ●: 1.5% yeast extract + 0.1% urea, ▲: 1.5% yeast extract + 0.2% urea, ×: 1.5% yeast extract + 0.4% urea, ◆: 3% yeast extract.

3 结束语

实验结果表明,鼠李糖乳杆菌突变菌株 SCT-10-10-60 具有较强的 L-乳酸生产能力。摇瓶发酵 40h 后 L-乳酸产量可达 106g/L,与利用米根霉和干酪乳杆菌发酵相比,产量更高而且培养条件相对简单^[18,19]。另外,当以甘蔗糖蜜为原材料时,发酵过程中发酵液能持续保持为液态,不仅可以增加培养基的溶氧效率,促进菌体生长,还为 L-乳酸的分离提纯提供了便利。虽然与利用葡萄糖等纯糖物质发酵相比 L-乳酸产量偏低,但是由于甘蔗糖蜜价格廉价,因此可以有效节约生产成本。因此以甘蔗糖蜜为主要原材料,利用鼠李糖乳杆菌突变菌株 SCT-10-10-60 发酵生产 L-乳酸具有潜在的工业应用价值。后续实验将进一步探索并完善补料发酵条件,以期获得一条高效、快速、低成本的新工艺,为工业发酵生产 L-乳酸提供新的理论依据。

参考文献:

[1] 蚊疫苗,郭剑雄,梁达奉,等. QB/T 2684-2005 甘蔗糖蜜[S]//中华人民共和国国家发展和改革委员会. 中华人民共和国轻工行业标准. 2005.

[2] 苏毅. 甘蔗糖蜜综合利用对策研究(上)[J]. 广西轻工业, 2000(04): 5-8, 15.

[3] van Vuuren H J J, Meyer I. Production of ethanol from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* [J]. Biotechnology Letters, 1982, 4(04): 253-256.

[4] 陆琦,张穗生,吴仁智,等. 三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产

酵母菌株的筛选[J]. 广西科学, 2010, 17(04): 98-102, 106.

[5] 汤兴俊,卢林海,黄晓丹,等. 甘蔗糖蜜生产焦糖色素的研究[J]. 广州食品工业科技, 2003(03): 4-6.

[6] 杨芳,陈宁,张克旭. 甘蔗糖蜜发酵生产谷氨酸的研究[J]. 现代食品科技, 2006(03): 52-54.

[7] Lee I Y, Seo W T, Kim G J, et al. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1996, 18(4): 255-259.

[8] Cazetta M L, Celligoi M A P C, Buzatob J B. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(02): 747-751.

[9] 齐宏秀. 乳酸的应用及生产概况 [J]. 辽宁化工, 1996(01): 20-21.

[10] Datta R, Tsai S P, Bonsignore P. Technological and economic potential of poly-lactic acid and lactic acid derivatives [J]. FEMS Microbiol Rev, 1995, 16(2-3): 221-231.

[11] 谢盛良. 以淀粉质农产品为原料生产 L-乳酸及聚乳酸 [J]. 农产品加工, 2006(10): 45.

[12] 丁涓,魏敏,张莉. 玉米浆发酵生产 L-乳酸的工艺优化 [J]. 食品科学, 2011(01): 127-130.

[13] John R P, Nampoothiri K M, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 524-534.

[14] 余炜,伍时华. L-亮氨酸发酵用糖蜜预处理方法研究 [J]. 广西工学院学报, 2005(03): 19-22.

[15] 叶勤. 发酵过程原理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[16] 李海军. 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 高效生产 L-乳酸工艺研究 [D]. 山东: 山东大学生命科学院, 2005.

[17] 李海军,林建群,林建强,等. 高糖和氮源对鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) L-乳酸发酵的影响 [J]. 工业微生物, 2006(04): 25-30.

[18] 秦菊霞. 蔗糖及甘蔗糖蜜发酵生产 L-乳酸的研究 [D]. 南宁: 广西大学轻工与食品工程学院, 2008.

[19] 黄谷亮. 干酪乳杆菌产 L-乳酸发酵条件的研究 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2007(04): 59-62.

(责任编辑: 陈小玲)