文章编号:1009-038X(2003)06-0055-04

细菌发酵生产 L-乳酸培养基的优化

乐晓洁， 王昌禄， 顾晓波， 刘勇军
(天津科技大学 食品科学与生物工程学院,天津 300222)

摘 要: 运用响应面分析法(中心组合设计)对干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)LB1-11 生产 L-乳酸的培养基 C/N 进行了研究,同时研究了有机氮源(蛋白胨、玉米浆和酵母膏)和无机氮源(NH_4Cl 和 $(NH_4)_2HPO_4$)对 L-乳酸产量的影响,并进行了葡萄糖、蛋白胨、NH_4Cl 和 $(NH_4)_2HPO_4$ 四因素的响应面分析实验. 结果表明,适宜的培养基 C/N(质量比)为 12∶1～13∶1,培养基组成:葡萄糖 120.13 g/L,蛋白胨 19.342 g/L,NH_4Cl 4 g/L,$(NH_4)_2HPO_4$ 2.010 g/L,L-乳酸产量可达到 103 g/L. 优化后的培养基适合于对干酪乳杆菌进行代谢网络分析.

关键词: 干酪乳杆菌; 响应面分析; L-乳酸
中图分类号: TQ 920 **文献标识码**: A

Optimization of the Fermentation Medium for Production of L-(+)-Lactic Acid

LE Xiao- jie， WANG Chang-lu， GU Xiao-bo， LIU Yong-jun
(Department of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: A detailed response surface methodology for L-(+)-lactic acid production by *lactobacillus casei* was carried out to optimize the C/N ratio of the fermentation medium using the experimental design. The first study tested two factors(organic nitrogen sources and inorganic nitrogen sources)and one medium point was performed. The second factorial design was based on surface response with four factors (glucose concentration, peptone concentration, NH_4Cl concentration, $(NH_4)_2HPO_4$ concentration). The statistical analysis of the data obtained from the factorial study showed that a C/N ratio of 12～13 and the glucose concentration of 120.13 g/L, peptone concentration of 19.342 g/L, NH_4Cl concentration of 4 g/L, and $(NH_4)_2HPO_4$ concentration of 2.010 g/L were the optimal condition, with L-(+)-lactic acid concentration as high as 103 g/L obtained.

Key words: *Lactobacillus casei*; surface response analysis; L-(+)-lactic acid

乳酸是世界公认三大有机酸之一,L-乳酸是乳酸同分异构体的一种,其旋光性为右旋. L-乳酸被 WHO 认为是安全的食品添加剂,可以在食品工业中广泛应用,同时亦可用于制药、制革、纺织、环保

收稿日期:2003-05-16; 修回日期:2003-07-02.
作者简介: 乐晓洁(1979-),女,浙江舟山人,食品科学与工程硕士研究生.
万方数据

和农业. 现已发现,L-乳酸是可完全生物降解塑料聚乳酸(polylactic acid, PLA)的前驱物质. PLA 以其良好的可生物降解性及其他优良的使用特性(如透明性、高强度、耐热性等)而被公认为是理想的取代传统塑料的可生物降解塑料之一[3~4].

乳酸菌大部分是兼性厌氧或微需氧菌,通过 EMP 途径从葡萄糖生成丙酮酸,在有氧条件下,大部分丙酮酸会转化为乙酰 CoA,再经 TCA 循环和电子传递链彻底氧化成 CO_2 和 H_2O;而在缺氧或无氧的条件下(丙酮酸不能进一步氧化),生成乳酸、乙醇等. 在多数为同型乳酸发酵的乳酸菌细胞内,最终酸性末端产物大部分是乳酸,还含有少量的丙酸、乙酸、丁酸和甲酸[6,7]. 但是由于细胞本身所具有的反馈抑制作用,不能过量积累乳酸,要使细胞在发酵过程中过量积累终产物,最有效的方法是根据菌种的代谢特性人为地改变菌种的代谢及代谢调节特性,使代谢流按照预定的方向流动. 而对菌种的代谢网络特性进行分析的前提是要优化出适合代谢分析的培养基组成,而培养基中碳源和氮源对菌种产酸及生长是最重要的,碳源能提供菌体生长繁殖所需要的营养和能源,是构成乳酸碳架的来源,要积累大量的乳酸就要有足够的碳源,对于菌体生长所必须的氮源等则要控制其用量[5,10].

1 材料与方法

1.1 菌株

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)LB1-11,由天津科技大学食品生物技术研究室保藏.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 50,酵母膏 10,蛋白胨 10,CH_3COONa 0.5,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2,$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01,NaCl 0.01,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2. 初始 pH 为 6.5~6.8,0.1 MPa 下灭菌 20 min.

1.2.2 发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 120,蛋白胨 15,CH_3COONa 0.5,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2,$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01,NaCl 0.01,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2. 初始 pH 为 6.5~6.8,0.1 MPa 下灭菌 20 min.

1.3 分析方法

1.3.1 乳酸和葡萄糖的测定 采用生物传感分析仪(SBA-40C,山东省科学院生物研究所研制)测量.

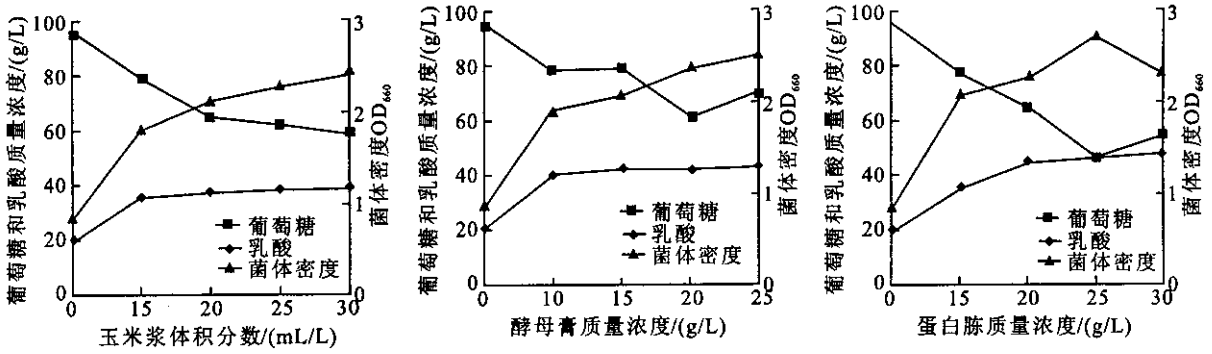
1.3.2 菌体浓度的测定 见文献[13].

2 结果与讨论

2.1 有机氮源对乳酸发酵的影响

考察 3 种有机氮源——酵母膏、玉米浆和蛋白胨的浓度对乳酸发酵的影响,结果见图 1.

从图 1 中可以看出,随着 3 种有机氮源浓度的增加,乳酸产量均呈增长趋势. 在葡萄糖消耗相同的情况下,蛋白胨所产的乳酸量高于玉米浆和酵母膏. 当蛋白胨的质量浓度为 20 g/L 时,耗糖量和菌体密度均高于质量浓度为 25 g/L 时,产酸量却不及后者,说明提高蛋白胨的质量浓度能促进丙酮酸向乳酸的转化. 由于在系统代谢分析过程中往往以组分明确的培养基或简单培养基取代复合培养基[1],但乳酸菌是化能异养菌,无法自身合成许多利于菌体生长的有机化合物[2],故在 3 种有机氮源中选择一种组分较简单且能满足其生长需要的作为惟一有机氮源,因此选择蛋白胨.



(a) 玉米浆体积分数对菌株发酵生产乳酸的影响 (b) 酵母膏质量浓度对菌株发酵生产乳酸的影响 (c) 蛋白胨质量浓度对菌株发酵生产乳酸的影响

图 1 有机氮源浓度对菌株 LB1-11 发酵生产乳酸的影响

Fig. 1 Effect of organic nitrogen sources and concentrations on the production of lactic acid

2.2 蛋白胨质量浓度对乳酸发酵的影响

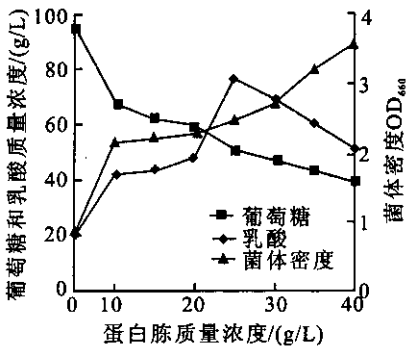
对于乳酸种菌而言,其营养成分主要是可溶性蛋白、磷酸盐和铵盐[8],所以选择 2 种无机氮源作为基础氮源,蛋白胨质量浓度分别为 0,10,15,20,25,

万方数据

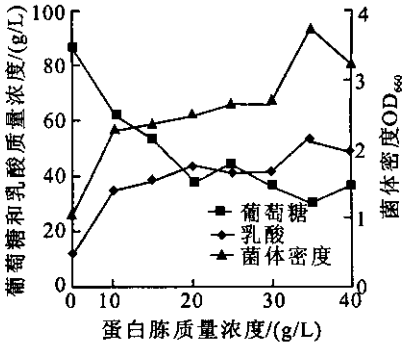
30,35,40 g/L,结果见图 2. 当初始葡萄糖质量浓度为 120 g/L 时,由图 2(a)可知,蛋白胨质量浓度为 25 g/L,乳酸产量达到 76 g/L,但其耗糖量和菌体生长速率却低于蛋白胨质量浓度为 40 g/L 时,这说明蛋白胨质量浓度要达到 25 g/L 以上,才能满足菌体的生长. 但当其质量浓度过高,即 C/N(质量比)减小时,菌体密度的增大是以乳酸产量的下降为代价的. 由图 2(b)可知,蛋白胨质量浓度为 15 g/L 时,其乳酸产量最高,计算可知其培养基 C/N(质量比)为 12∶1～13∶1,与图 2(a)结果基本一致.

2.3　无机氮源及其质量浓度对乳酸发酵的影响

目前还没有报道 *L. casei* 能利用无机氮源产酸,而且实验证实 *L. casei* 无法以 $(NH_4)_2SO_4$,NH_4Cl,$(NH_4)_2HPO_4$ 为惟一氮源生长. 设计了以 15 g/L蛋白胨为基础,分别添加初始质量浓度为 2,4,6,8 g/L的 $(NH_4)_2SO_4$、NH_4Cl 和 $(NH_4)_2HPO_4$,结果见图 3.



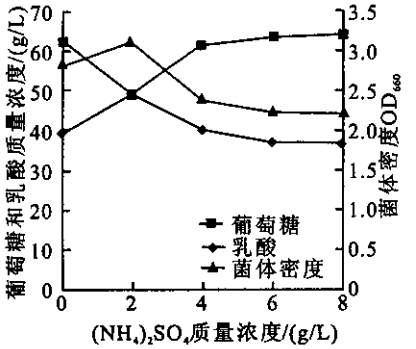
(a)$(NH_4)_2HPO_4$



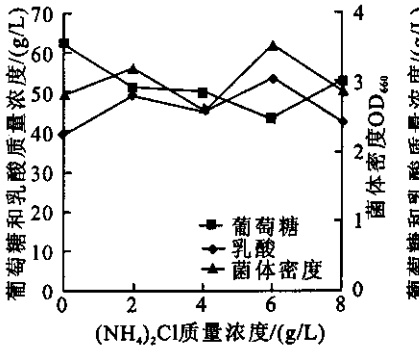
(b)NH_4Cl

图 2　蛋白胨质量浓度对菌株 LB1-11 发酵生产乳酸的影响

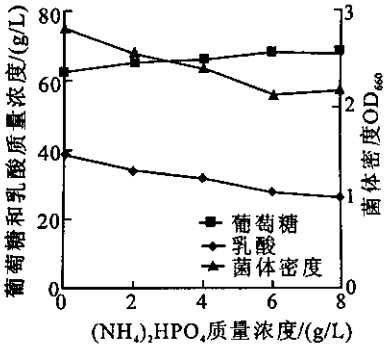
Fig. 2　Effect of peptone concentration on the production of lactic acid by by *L. casei*. (this experiment was performed with 2 g/L $(NH_4)_2HPO_4$)



(a)$(NH_4)_2SO_4$



(b)NH_4Cl



(c)$(NH_4)_2HPO_4$

图 3　无机氮源质量浓度对菌株 LB1-11 发酵生产乳酸的影响

Fig. 3　Effect of inorganic nitrogen sources and concentrations on the production of lactic acid by *L. casei*. (this experiment was performed with 15 g/L peptone as a basal nitrogen source)

由图 3 可知,当蛋白胨质量浓度为 15 g/L 时,图 3(a)和图 3(b)的产量较一致,但图 3(b)的耗糖量明显高于图 3(a). 由计算可知,培养基的碳氮质量比为 12∶1～13∶1,这与 2.2 中的试验结果基本吻合. 但图 3(c)的产酸量却很少,并且低于以蛋白胨为惟一氮源的产酸量,这说明 $(NH_4)_2HPO_4$ 不适合作为无机氮源. 但是有报道显示,HPO_4^{2-} 可能在代谢途径中从丙酮酸到乳酸的这一步起到了关键作用,因此也作为因素之一.

2.4　培养基 C/N 对乳酸发酵的影响

以上的结果表明,若要提高乳酸的发酵水平,需将培养基的 C/N 控制在适宜的水平,因此用响应面分析法以发酵培养基为基础,葡萄糖、蛋白胨、NH_4Cl 和 $(NH_4)_2HPO_4$ 用量根据预备试验确定上下水平后,按三元二次中心组合设计原理设计了四因素实验,实验设计及结果见表 1～3 和图 4.

表 1　发酵培养基因素水平设计

Tab. 1　The design of factors of fermentation medium

因素	编码值	未编码值
葡萄糖(X_1)	−0.33158	113.421
蛋白胨(X_2)	−0.18213	19.089
NH_4Cl(X_3)	−1.19381	1.612
$(NH_4)_2HPO_4$(X_4)	0.89456	1.947

万方数据

表 2 响应面分析实验数据及结果

Tab. 2 The data and results of RSA

序 号	编码值				L-乳酸产量/(g/L)
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	0	0	0	1.7654	78
2	−1	−1	−1	0.5675	72
3	1	−1	−1	0.5675	57
4	−1	1	−1	0.5675	59
5	1	1	−1	0.5675	68
6	−1	−1	1	0.5675	65
7	1	−1	1	0.5675	54
8	−1	1	1	0.5675	46
9	1	1	1	−1.0509	74
10	1.4697	0	0	−1.0509	70
11	−1.4697	0	0	−1.0509	42
12	0	1.4697	0	−1.0509	55
13	0	−1.4697	0	−1.0509	41
14	0	0	1.4697	−1.0509	66
15	0	0	−1.4697	−1.0509	74
16	0	0	0	0	81

表 3 回归方程各项的方差分析

Tab. 3 The variance analysis of regression equation

	自由度	均方	F 值	$P > F$
一次项	4	136.5378	4.854676	0.326534
二次项	4	243.9291	8.673036	0.248731
交互项	6	136.2929	4.84597	0.334392
误差	1	28.125		
总误差	9			

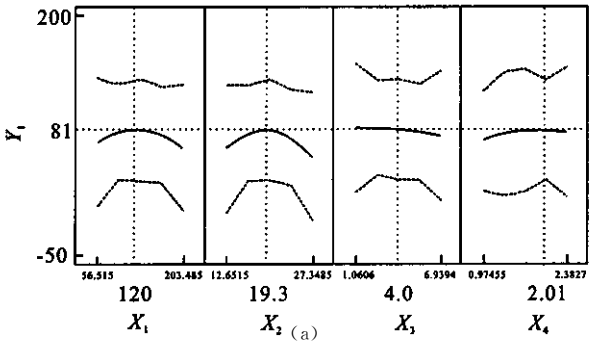
由表 3 和回归方程各项的方差分析表明，方程的二次项的影响是显著的，一次项和交互项的影响一般，说明响应值的变化相对复杂，各个具体的试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系. 回归方程的决定系数 $R^2 = 0.821\ 8$ 且 F 检验极显著，说明所拟合的回归方程合适，对实验拟合情况较好.

从表 3、图 4 可以看出各因素及其交互作用对响应值的影响. 由图 4 的响应面分析立体图可以看出，葡萄糖(X_1)和蛋白胨(X_2)对产酸的影响是比较显著的，NH_4Cl(X_3)比$(NH_4)_2HPO_4$(X_4)在所选择的质量浓度范围内对产酸的影响是不显著的，但各因素间仍存在着一定的交互作用. 根据响应值典型分析求得了葡萄糖(X_1)、蛋白胨(X_2)、NH_4Cl(X_3)和$(NH_4)_2HPO_4$(X_4)的最佳质量浓度组合分别为：120.13，19.342，4.00，2.010 g/L，其相对应的响应值 y 为 103.106 g/L.

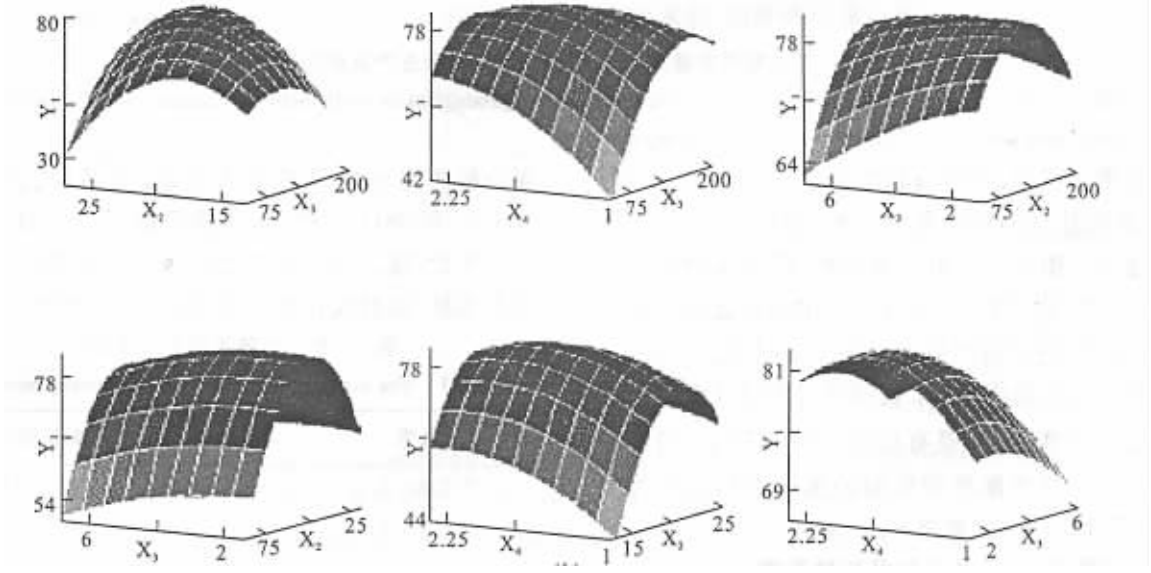
回归方程为

$$y_1 = 81 + 4.23x_1 + 1.59x_2 - 2.33x_3 + 4.29x_4 - 7.755x_1^2 + 7.88x_1x_2 + 2.86x_1x_3 - 5.04x_1x_4 - 1.45x_2^2 + 0.375\ x_2x_3 - 3.02x_2x_4 - 1.27x_3^2 + 0.37x_3x_4 - 3.4x_4^2$$

由于以上最佳组合未包含在所设计的 RSA 的 16 个试验中，为了进一步确认计算结果，按最佳条件做 2 次重复验证试验，接种量为 10%，最终 L-乳酸产量为 102 g/L 和 103 g/L，进一步证实了分析的可靠性.



(a)



(b)

图 4 响应面分析图

Fig. 4 The stereogram of RSA

万方数据

(下转第 63 页)

有意义.

参考文献:

[1] 杨晓泉,张水华,高建华,等.小茴香甲醇提取物的抗氧化性质的研究[J].中国粮油学报,1998,13(3):37.

[2] Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, *et al*. The characterization of antioxidants[J]. **Food Chem Toxic**, 1995, 33: 601.

[3] 万素英,赵亚军,李琳,等,食品抗氧化剂[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

[4] Inatani R N, H Fuwa. Toxicity of dibutyl hydroxytoluene in food[J]. **Agri Biol Chem**, 1983, 47 (3): 521.

[5] Chinain M. Harmfulness of synthelic pigment for health[J]. **Applied and Environmental Microboilogy**. 1980, 40(6): 1093.

[6] 凌关庭.天然食品添加剂手册[M].北京:化学工业出版社,2001.

[7] Chen Q, shi H, HO, *et al*. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybeanlipoxygenase activity[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1992, 69(6), 999.

[8] Cuvelier ME, Bereset C, Rechard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia of finalis*)[J]. **J Agric Food Chem**, 1994, 42: 665.

[9] Fukuda Y, Ossawa T, Namiki M, *et al*. Studies on antioxidative substances in sesame seed[J]. **Agri Biol Chem**, 1985, 49: 301.

[10] Duh P D, Ye h D B, Yen G C. Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1992, 69: 814.

[11] Yen G C, Duh P D. Autioxidative properties of methanolicextracts from peanut hulls[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1993, 70: 383.

[12] 翁新楚,任国谱,段杉,等.天然抗氧化剂的筛选[J].中国粮油学报,1998,13(4):47.

[13] 宋万志,崔建芳.木莲属土厚朴的研究[J].药学学报,1989,24(4):26.

[14] 刘玉鹏,段杉,董新伟.紫草抗氧化成分的提取及活性测定.中国粮油学报,1998,3:34.

[15] Mitsuru. Watanabe. Catechins as antioxidants from buckwheat(Fagopyrum esculentum Moench) groats[J]. **J Agric Food Chem**, 1998, 46: 841.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 58 页)

3　结　论

通过对不同氮源的研究,并用响应面分析法,回归方程寻优获得适宜的细菌培养基 C/N(质量比)为 12∶1～13∶1,同时确定了优化后的适合于进行乳酸杆菌代谢网络分析的培养基组成:葡萄糖 120.13 g/L,蛋白胨 19.342 g/L,NH_4Cl 4 g/L,$(NH_4)_2HPO_4$ 2.010 g/L. 优化后的培养基适合于对干酪乳杆菌进行代谢网络分析.

参考文献:

[1] 张惠展.途径工程——第三代基因工程[M].北京:中国轻工业出版社,2002.

[2] 杨洁彬,郭兴华,李芳,等.乳酸菌——生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社,1999.

[3] 刘伟雄.乳酸和聚乳酸的最新进展[J].食品与发酵工业,2001,27(3):61－64.

[4] 潘军华,潘中明,曾嵋娟,等.乳酸发酵短杆菌中碳架流向赖氨酸的导向与分析[J].食品与生物技术,2002,21(1):38－42.

[5] Michiel Kleerebezem, Pascal Hols. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in Lactocouus lactis by metabolic engineering [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000, 26(4): 840－848.

[6] Kari Kyla-Nikkila, Mervi Hujanen, Matti Leisola. Metabolic engineering of lactobacillus helveticus CNRZ32 for production of pure L-(t)-lactic Acid[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(9): 3835－3841.

[7] Stephane Groupry, Thomas Crognennec. Emmannel gentrl metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analusis[J]. **FEMS Microbiology letters**, 2000, 182: 207－211.

[8] John J, Fitzpatrick, Malte Ahrens, *et al*. Effect of managa nese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate[J]. **Process Biochencistry**, 2001, 36: 671－675.

[9] K V Venkatesh. Metabolic flux analysis of lactic acid fermentation : effects of pH and lactate in concentration[J]. **Process Biochencistry**, 1997, 32(8): 651－655.

[10] Arvid Garde, Gunnar Jonsson, Anette S Schmidt. Lactic acid production from wheat straw hemi cellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brecis*[J]. **Bioresource Technology**, 2002, 81: 217－223.

[11] Pinar Calik, Tuncer H Ozdamar. Carbon sources affect metabolic capacities of *Bacillus* for the production of industrial enzyme: theoretical analuses for serine and neutral proteases and α-amylase[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001, 8: 61－81.

万方数据

(责任编辑:李春丽)