

# 氨水中和 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M 发酵生成 L-乳酸铵的研究\*

闫智慧<sup>1</sup> 白冬梅<sup>2</sup> 高静<sup>1,2\*\*</sup> 卫强<sup>2</sup> 赵学明<sup>2</sup>

(河北工业大学化工学院 天津 300130)<sup>1</sup> (天津大学化工学院 天津 300072)<sup>2</sup>

**摘要:** 实验确定了 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M 接种的最佳种龄为 24 h。以氨水取代传统的中和剂碳酸钙中和发酵生成的乳酸、调控发酵液的 pH，考察了不同 pH 值对菌体生长和产酸的影响，确定了菌种生长和产酸的较适 pH 值为 6.5。考察了底物流加速度对菌种生长和产酸的影响，对间歇和流加发酵时菌体的生长量和产酸量进行了动力学关联。在较适 pH 值 6.5 和较佳流加速度 25 mL/h 条件下，乳酸的产量可达到 136.8 g/L，产率为 1.71 g/(L·h)。

**关键词:** 乳酸铵，氨水，中和剂，流加发酵，乳酸

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0030-04

## Study on Fermentation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M with Ammonia as a Neutralizer

YAN Zhi-Hui<sup>1</sup> BAI Dong-Mei<sup>2</sup> GAO Jing<sup>1,2\*\*</sup> WEI Qiang<sup>2</sup> ZHAO Xue-Ming<sup>2</sup>

(School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130)<sup>1</sup>

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)<sup>2</sup>

**Abstract:** The optimal inoculum's age of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M is 24h. Fermentation processes of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M with ammonia as a Neutralizer were developed. Effects of pH on the production of biomass and lactic acid in batch culture were studied at first, and the microorganism can gain the highest biomass density and lactic acid production at pH 6.5. The appropriate fed-batch speed of glucose (600 g/L) is 25 mL/h at pH 6.5. Kinetics functions between lactic acid production and biomass density are presented for batch fermentation and fed-batch fermentation at pH 6.5 respectively. The production and productivity of lactic acid can reach 136.8 g/L and 1.71 g/(L·h) at the preferable condition of pH 6.5 and 25 mL/h fed-batch speed.

**Key words:** Ammonium lactate, Ammonia, Neutralizer, Fed-batch fermentation, Lactic acid

发酵生产乳酸的传统工艺是采用不同的碳酸钙加入量来消除发酵中由于乳酸生成造成的酸抑制<sup>[1]</sup>，调节发酵液 pH 值使菌种在适合的 pH 值下发酵得到较高的乳酸产量。碳酸钙作为中和剂，发酵液主要成分是粗乳酸钙。粗乳酸钙需经浓硫酸酸解得到粗乳酸和副产物硫酸钙，硫酸钙很难得到进一步利用，大量的硫酸钙堆积会造成环境污染<sup>[2]</sup>。

本实验以氨水为中和剂来控制发酵液 pH 值，直接得到的产物是乳酸铵。乳酸铵在

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.20036010)

Project Granted by Chinese National Natural Science Found (No.20036010)

国家教育部博士基金资助项目 (No.2000005622)

\*\* 联系人 Tel: 022-26564293, E-mail: jgao@hebut.edu.cn

收稿日期: 2003-08-22, 修回日期: 2003-11-21

制药领域可用于生产治疗皮肤病的药物,还可用于动物饲料的添加剂。乳酸铵溶液可经阳离子交换树脂转型得到纯净的乳酸溶液<sup>[1]</sup>。用乳酸铵和乙醇直接酯化可以生成“绿色溶剂”乳酸乙酯,乳酸乙酯最具发展前景的用途是利用其无毒、溶解性好、不易挥发等特点,取代目前正在使用的许多对环境有害的溶剂,如:卤代类、醚类以及破坏臭氧层的氟氯碳溶剂等<sup>[3]</sup>。乳酸乙酯在传统的消费领域中多用于香精、香料、食品及酿酒行业,是良好的食品添加剂;此外,乳酸乙酯在制药工业中可用做压制药片的润滑剂,如药物心得静的中间体等<sup>[4]</sup>。

实验首先对 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M (以下简称:LB菌)种子的生长活力进行了考察,然后以氨水中和发酵生成的乳酸来调控发酵液的 pH,确定了菌种生长和产酸的较适 pH 值,并建立了较佳间歇和流加发酵条件下菌体生长和产酸量的动力学关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

L-乳酸生产菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* BME5-18M, 本实验室筛选保藏。

### 1.2 培养基

种子斜面保藏培养基: MRS 培养基。

种子活化和发酵培养基成分: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.0 g,  $KH_2PO_4$  2.0 g,  $MgSO_4$  0.2 g, 无水乙酸钠 1.0 g, 柠檬酸三铵 2.0 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g, NaCl 0.01 g, 定容至 1 L。吐温 80 (Tween 80) 1 mL/L。种子活化和发酵培养基除上述成分外,分别加入 1% (w/w)  $CaCO_3$  或流加 5 mol/L 的氨水做中和剂,再加入适量浓度的葡萄糖作底物。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 绘制种子的生长曲线:** 首先对斜面保藏的菌种用装液量为 100 mL/250 mL 三角瓶进行种子活化。将斜面保藏菌种,接入底物浓度为 50 g/L 的种子活化培养基,37℃ 恒温培养 24 h。然后取三角瓶中的发酵液做下次活化的种子,以接种量为 5% (v/v) 接入种子活化培养基。

活化 3 次后,对种子的生长情况进行测定:从 0 h 开始每 4 h 取样测其 OD 值,绘出种子的生长曲线,确定种子生长旺盛时的培养时间,把活力最高时的菌种作为发酵的接入菌种。

**1.3.2 实验设计思路:** (1) 在搅拌速度为 100 r/min、温度为 37℃ 的发酵罐 (5 L) 进行发酵培养,设定底物浓度为 150 g/L,流加氨水控制 pH 值,设定 pH 值分别为: 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5,分析产酸和菌种的生长情况,确定 LB 菌较适的发酵 pH 值。(2) 确定较适的 pH 值后,考察在较适 pH 值、设定底物浓度为 150 g/L 间歇发酵时,菌种生长和产酸的动力学。(3) 考察在较适 pH 值下,不同底物流加速度对菌体生长和产酸的影响,确定较佳的底物流加速度。(4) 考察在较适 pH 值、较佳的底物流加速度下,菌种生长和产酸的动力学。

### 1.4 分析方法

取适量发酵液,一部分在 13,500 r/min 下离心 20 min。上清液用 HPLC 法测定发酵

液中残糖和乳酸的浓度<sup>[5]</sup>。另一部分用分光光度计测 OD 值, 利用 OD 值和菌体干重的线性对应关系: 每 1 单位的 OD 值对应菌体干重为 0.31 g/L, 来确定菌体量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 种子的生长曲线

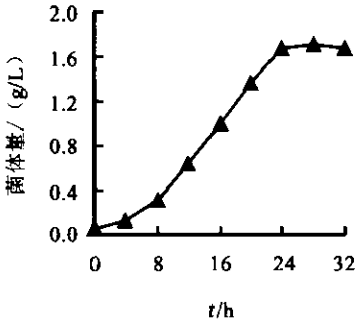


图1 种子的生长曲线

种子培养的目的是为了获得代谢旺盛、数量较多的菌体量。从图 1 可以看出, 随着培养时间的增加, 菌体量成对数函数增长。在 24 h 时菌体量达到最高, 细胞处于生长旺盛时期, 所以采用培养 24 h 的菌体作为发酵的接入菌种。

### 2.2 不同 pH 值对产酸的影响

pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 时, 菌体生长情况与乳酸产量如表 1 所示。由实验可知 LB 菌较适的生长和产酸 pH 值为 6.5 左右。此时, 乳酸的得率、平均产率和最终产量最高, 分别为 85.0%、1.14 g / (L·h) 和 127.5 g/L。

表 1 pH 值对细菌生长和产酸的影响

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
细胞干重最大值 (g/L)	0.81 (28 h) <sup>1</sup>	1.15 (40 h)	1.50 (72 h)	1.56 (80 h)	1.54 (84 h)	1.48 (88 h)
乳酸终产量 (g/L)	49.9	93.8	120.4	127.5	124.6	118.5
乳酸得率 (YLA/tol) (%) <sup>2</sup>	33.2	62.5	80.3	85.0	83.1	79.0
乳酸平均产率 (g / (L·h)) <sup>3</sup>	0.45	0.83	1.08	1.14	1.11	1.06

注: 1 括号中的时间表示菌体量达到最大值时的发酵时间, 2 乳酸得率的计算方法是: 乳酸的产量/消耗的葡萄糖量, 3 乳酸平均产率的计算方法是: 乳酸的最终产量/发酵时间

从表 1 可以看出不同 pH 值对细菌生长和产酸的关系: 从 pH5.0 到 pH6.5 LB 菌的最大菌体量和最终产酸量逐渐增加, 这主要是由于 pH 值较低时菌体的生长受到抑制, 进而影响乳酸的产出量; pH 大于 6.5 时, 最大菌体量和最终产酸量有所减少, 这说明较高的 pH 同样不适合 LB 菌的生长和产酸。

### 2.3 pH 值 6.5 时, 间歇发酵的产酸动力学

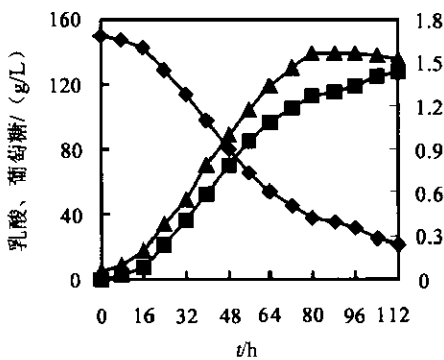


图2 pH 值 6.5 的产酸动力学

■ 乳酸, ◆ 葡萄糖, ▲ 菌体量

由实验数据所作图 2 看出: 接种后的 16 h 内, 菌体生长处于延迟期, 随后进入指数生长期。从实验数据可明显地看出 LB 菌是一种生长关联型细菌, 乳酸的产量随着菌体量的增多而增加。在 pH 值 6.5 间歇发酵时, 乳酸的最高产量达到 127.5 g / L, 产率为 1.14 g / (L·h), 得率为 85%。

乳酸产量和菌体量的动力学关联式为:

$$y = 6.4465x^3 - 8.6302x^2 + 78.14x - 6.138$$

$$(R^2 = 0.9911)$$

## 2.4 pH值为6.5流加发酵的产酸动力学

**2.4.1 底物流加速度对菌体生长和产酸的影响:** 流加底物的浓度为 600 g/L, 在 pH6.5 时考察在不同的流加速度下 (mL/h): 15、25、35、45、55 菌体生长和产酸情况。由图 3 的可知较佳的流加速度为 25 mL/h, 在此流加速度下菌体的生长情况最好, 菌体量可以达到, 2.15 g/L, 并获得较高的乳酸产量 136.8 g/L 和产率为 1.71 g/(L·h)。

**2.4.2 pH值6.5、流加速度25 mL/h条件下菌体的产酸动力学:** 由实验数据所作图 4 可以看出, 接入菌种约 16 h 后菌体量增加迅速, 乳酸产量随着菌体量的增加而增加。发酵 80 h 结束时乳酸的终产量是 136.8 g/L, 产酸速率为 1.71 g/(L·h), 菌体量为 2.15 g/L。达到相同乳酸浓度的发酵时间缩短了约 40 h。

乳酸产量与菌体量的动力学关联式为:

$$y = 60.565x^3 - 164.89x^2 + 137.55x - 13.187 \quad (R^2 = 0.9199)$$

## 3 结论

实验确定了: (1) LB 菌接种的最佳种龄为 24 h; (2) 以氨水为中和剂调控发酵液的 pH, 菌体生长和产酸的较适 pH 值为 6.5; (3) pH 值为 6.5 间歇发酵时, 菌体量和产酸量的动力学关系式; (4) pH 值 6.5、流加底物浓度为 600 g/L 时, 较佳的流加速度是 25 mL/h; (5) pH 值为 6.5、较佳的流加速度 25 mL/h 条件下, 菌体量和产酸量的动力学关系式。

已有报导产酸量较高的菌种 *Lb. casei* NRRL B-441, 乳酸产量和产率分别为 120 g/L 和 1.5 g/(L·h)<sup>[6]</sup>, LB 菌在较佳产酸条件下, 乳酸产量和产率分别可达 136.8 g/L 和 1.71 g/(L·h), 具有一定的开发前景。本实验为优化发酵工艺和进一步扩大实验奠定了一定基础。

## 参考文献

- [1] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 337~389.
- [2] 白冬梅, 赵学明, 李鑫钢. 现代化工, 2002, 22 (6): 9~13.
- [3] 高静, 赵学明. 由乳酸铵直接合成乳酸乙酯. 中国专利: CN1290686A, 2002-04-03.
- [4] Rathin D. Esterification of fermentation-derived acids via pervaporation. US Patent: 005723639, 1998-03-03.
- [5] 白冬梅, 班睿, 赵学明, 等. 色谱, 2000, 18 (6): 527~528.
- [6] Javanainen P, Linko Y Y. Biotechnol Tech, 1995, 9: 543~548.

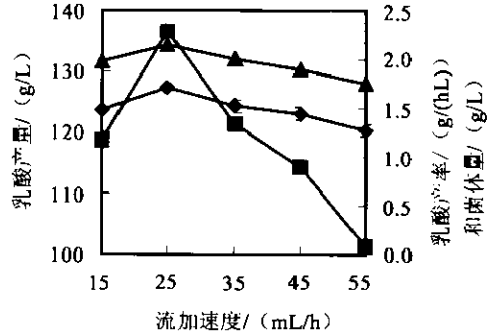


图3 流加速度影响

■ 乳酸产量, ▲ 菌体量, ◆ 乳酸产率

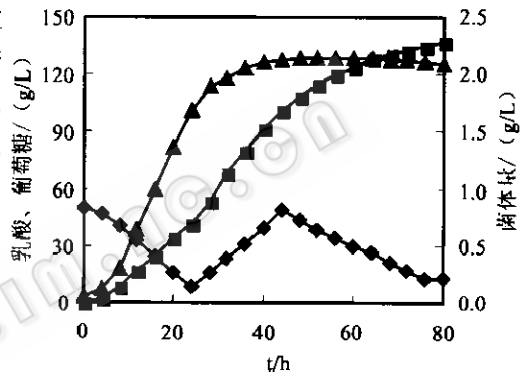


图4 25mL/h的流加发酵动力学

■ 乳酸, ◆ 葡萄糖, ▲ 菌体量