

L-乳酸菌的选育及在酒糟基质中的培养

石孔泉¹,石贵阳^{1,2},张梁^{1,2},章克昌^{1,2}

(1 江南大学生物工程学院生物资源研究室 2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘要: 从市售酸乳、泡菜中筛选得到产L-乳酸细菌,通过NTG诱变选育和摇瓶发酵试验,选出两株利用葡萄糖较好的菌株m-58和m-16,以玉米浓醪酒糟清液为基质对2株乳酸细菌进一步驯化培养,得出m-58菌株,更能较好地发酵玉米酒糟清液,产生乳酸,m-58菌株在48h发酵含糖63g/L的玉米浓醪酒糟清液产生50g/L的L-乳酸,m-58菌株适合用于发酵玉米酒糟产乳酸。(孙悟)

关键词: 微生物; L-乳酸; 筛选; 玉米浓醪酒糟

中图分类号:Q93-33;TS261.1;TS262.2 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)02-0017-04

Screening of L-lactic acid-producing Strain and Its Prime Culture in the Substrate of Distiller's Grains

SHI Kong-quan¹, SHI Gui-yang^{1,2}, ZHANG Liang^{1,2} and ZHANG Ke-chang^{1,2}

(1. Institute of Biomass Resources, School of Biotechnology, Southern Yangtze University 2 The Key Lab of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract L-lactic acid-producing bacteria were screened from sour milk and marinated vegetables, and after times of NTG mutation screening and flask shaking fermentation tests, two strains including m-58 strain and m-16 strain were obtained, then after further domesticated cultivation of both the two strains in the clear solution of distiller's grains of very high gravity (VHG) ethanol fermentation from corn, m-58 strain was thought to be a good strain for its efficient utilization of the substrate of VHG ethanol fermentation from corn, which could produce 50 g/L L-lactic acid by fermenting 63 g/L corn high gravity mash distiller's grains within 48 h. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; L-lactic acid; screening; distiller's grains of corn thick mash

乳酸又名2-羟基丙酸,有L-乳酸和D-乳酸两种化学立体构型,由于动物体内只含有L-乳酸脱氢酶,D-乳酸在动物体内则不能够被分解,因而高光学纯度的L-乳酸生产研究受到科研工作者的极大关注。乳酸的生产有化学合成法和微生物发酵法,前者合成得到DL-乳酸,后者则可以得到高光学纯度的L-乳酸^[1]。因此目前国际上普遍都采用微生物发酵法来生产具有高光学纯度的L-乳酸。

L-乳酸是一种重要的中间体,广泛用于酿造、医药、皮革、卷烟、化工、食品、印染等多种领域,可以作为防腐剂、酸味剂、风味剂、灭菌剂等^[2],具有广泛的应用前景。在环境保护方面,由于L-乳酸的生物可降解性,由L-乳酸生产的聚L-乳酸,是一种理想的可降解塑料材料。

目前国际上高光学纯度L-乳酸总产量已经超过20万吨,专家预测该产品的全球市场将高达1000万吨,高光学纯度L-乳酸将是21世纪产量最大的有机酸产品^[3]。

酒精作为一种无污染的优质生物能源,有望取代日益减少的矿物燃料(石油、煤炭),使其在国际上得到广泛的研究,我国也对酒精生产进行了相当多的研究^[4]。目前,由于石油价格不断上涨,开发燃料酒精既有当前利益,也有长远利益。当前,阻碍我国燃料酒精工业规模发展的三大难点是原料、成本和污染^[5]。因此,研究开发酒精生产新资源以及高效、节能、节粮和无污染的酒精生产新工艺,是酒精生产中的一个关键。

利用玉米浓醪酒糟清液来生产L-乳酸,可以使玉米浓醪酒糟中的有效成分得到充分利用,转化为有价值

基金项目:国家科技部“十五”攻关项目(2001BA501A0)资助。

收稿日期:2005-10-26

作者简介:石孔泉(1980-),男,研究生,硕士。

*:石贵阳为通讯作者。

的工业产品,从总体上有效地节省酒精生产的成本,为很好地处理玉米浓醪酒糟起到重要的作用,同时是对章克昌教授提出的以浓醪酒精发酵、酒糟滤液回用、酒糟综合利用为突破口,全面综合考虑酒精发酵与酒精综合利用的生产工艺,以求得到能量投入最低、综合效益最高目的思想的一种实践。

1 材料与方

1.1 材料

市售的多种酸奶、泡菜等。

1.2 培养基

1.2.1 富集和分离培养基

富集培养基:牛奶 100 mL,葡萄糖 0.5%,酵母膏 0.5%;

MRS培养基:采用蛋白胨 1%,牛肉膏 1%,酵母膏 0.5%,磷酸氢二钾 0.2%,柠檬酸三铵 0.2%,乙酸钠 0.5%,葡萄糖 2%,吐温 80 0.1%,硫酸镁 0.058%,硫酸锰 0.025%,pH 6.2~6.4;

Elliker培养基:采用葡萄糖 0.5%,蔗糖 0.5%,乳糖 0.5%,胰蛋白胨 2%,酵母膏 0.5%,氯化钠 0.4%,明胶 0.25%,乙酸钠 0.15%,抗坏血酸 0.05%,pH 6.8。

1.2.2 诱变筛选培养基

葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 1%,乳酸钠 2%~6%,pH 6.5。

1.2.3 发酵培养基

葡萄糖 2%~8%,蛋白胨 2%,酵母膏 1%,pH 6.5。

1.2.4 玉米浓醪酒糟培养基

处理后不同糖含量的玉米浓醪酒糟清液,添加蛋白胨 2%,酵母膏 1%,磷酸氢二钠 0.1%,硫酸镁 0.02%,pH 6.5。

1.3 检测方法

1.3.1 L-乳酸的定性及定量测定

采用 astec HPLC 手性柱 (Advanced Separation Technologies Inc. USA) 测定乳酸的构型,流动相:5 mM CuSO₄ 溶液,流速:1.0 mL/min,检测波长 254 nm。

定量测定采用 SBA 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所)。

1.3.2 还原糖测定

采用 DNS 法测定^[9]。

1.3.3 pH 测定

采用 pHS-3TC 精密数显酸度计测定 (上海天达仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 菌种的初步筛选及选育

将筛选的样品置于牛奶培养基中,37℃培养 24 h

后,稀释 10⁻¹~10⁻⁷ 梯度,倾注 200 μL 的富集样品到含有碳酸钙的分离培养基平板上,37℃培养 2~3 d 后,挑取产生透明圈较大的菌落,在平板上划线分离,然后挑取单菌落到液体中培养后用 HPLC 鉴定产物构型 (L-乳酸),比较各个菌株的 L-乳酸产量,然后取产量较高的一株作为下一步实验用。菌种的初步筛选过程见图 1。

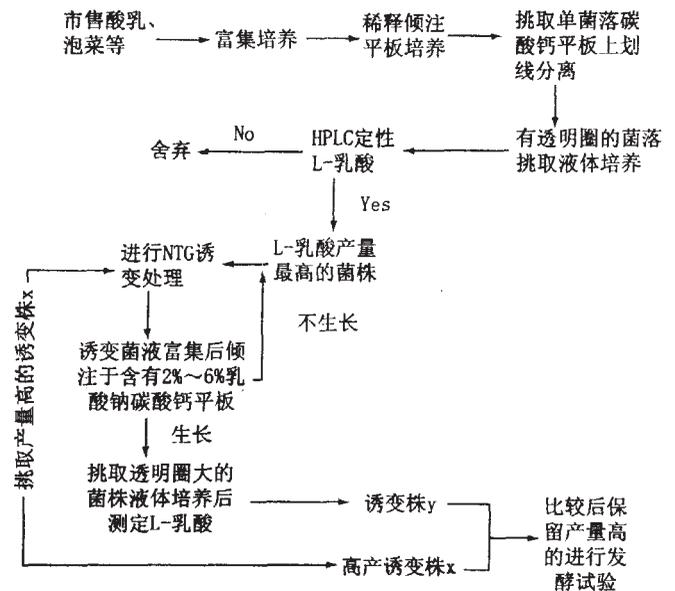


图 1 菌种的初步筛选过程

将初筛得到的 L-乳酸产生菌株在液体中相同条件下培养,选取乳酸产量最高的菌株进行亚硝基胍 (NTG) 诱变^[7],诱变处理后的菌悬液在液体培养基中富集培养 8 h 后倾注到诱变筛选培养基中培养 3~4 d 后,在各块平板上挑出透明圈大的几株到液体中培养 48 h,挑取乳酸产量较高的几株进行进一步的发酵试验。

1.4.2 以葡萄糖为基质的发酵产酸试验

对于诱变得到的菌株进行了初步的摇瓶发酵试验,以发酵培养基培养作为空白对照,分别添加一定浓度的 MgSO₄, MnSO₄, Na₂HPO₄ 和 K₂HPO₄ 进行单因素试验,在初始浓度 4% 的葡萄糖培养基中,34℃培养 24 h 和 36 h 时分别补加 2% 的葡萄糖,然后在 48 h 时测定乳酸产量。

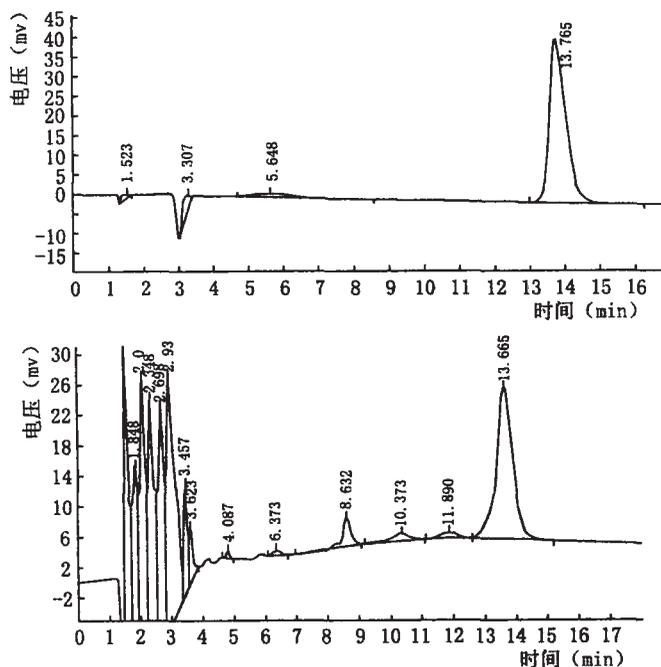
1.4.3 菌株在玉米浓醪酒糟清液中初步驯化发酵试验

将诱变得到的的高产菌株接种到玉米浓醪酒糟清液培养基中按以下过程进行驯化培养:菌株接种于 2% 还原糖的玉米浓醪酒糟清液培养基中,34℃培养 24 h 后移接至 4% 还原糖的玉米浓醪酒糟清液培养基中,然后再移接到 6% 还原糖的玉米浓醪酒糟清液培养基中,培养 24 h 后接种到 8% 的玉米浓醪酒糟清液培养基中。在玉米浓醪酒糟清液中培养 48 h 后测乳酸产量,选出适合在玉米浓醪酒糟清液中发酵乳酸的菌株。

2 结果与分析

2.1 L-乳酸菌株的构型鉴定

利用平板初步筛选得到的菌株经过手性柱的测定,得到产L-乳酸的菌株6株。图2是筛选得到的一株E75的L-乳酸的手性液相色谱图,由峰面积对比后初步得到L-乳酸的含量可达到94.8%,说明菌株E75是一株能产生高纯度L-乳酸的菌株。



13.765 min L-乳酸标样,13.665 min :
L-乳酸,10.373 min :D-乳酸

图2 菌株E75的L-乳酸手性液相色谱图

2.2 初筛得到的L-乳酸菌株的产酸量的比较

将筛选得到的菌株在发酵培养基中34℃培养48h后,测定还原糖含量及乳酸的产量,结果见表1。

表1 L-乳酸菌株初筛的产酸量比较

项目	菌株编号					
	E74	E75	E76	E77	E80	E81
残还原糖(g/L)	7.5	8.1	19.2	5.2	5.1	7.0
乳酸产量(g/L)	4.0	7.8	0.5	3.9	4.4	5.1

由表1可以看出,在6株L-乳酸菌株中,在相同的初始条件下,E75的乳酸产量最高,转化率也最高,因此确定以该菌株为出发菌株进行NTG诱变。

2.3 亚硝基胍诱变结果

按照NTG诱变流程,E75诱变菌株经过液体富集培养8h,然后分别在2%~6%乳酸钠的碳酸钙平板中倾注培养,挑出产生透明圈较大的单菌落接入摇瓶中液体培养48h后测定乳酸产量,选取产量较高的一株,继续进行再一轮诱变。经过3次诱变比较后,得到产酸较

好的几株,结果见表2。从表2可看出,m-16和m-58的产量相对较高,两者相差比较小,于是将两菌株都在发酵培养基中进行初步发酵试验。

表2 E75经NTG处理后得到的菌株的产酸量比较

菌株编号	m-1	m-2	m-3	m-16	m-58	E75
乳酸产量(g/L)	8.14	7.63	7.60	12.2	12.5	7.75

2.4 菌株在葡萄糖基质中的发酵试验

通过对MgSO₄,MnSO₄,Na₂HPO₄,K₂HPO₄等盐的单一因素试验初步考察了各种盐对菌株m-16和m-58乳酸发酵的影响,结果见表3。

表3 无机盐试验

菌株	MnSO ₄	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄	空白
	(0.025%)	(0.06%)	(0.05%)	(0.05%)	
m-58(g/L)	12.5	20.5	22.9	28.9	23.0
m-16(g/L)	23.3	21.6	25.5	23.9	25.2

从表3可看出,对于m-58的产酸,MnSO₄有比较明显的抑制作用,K₂HPO₄的添加与空白对照的基本一致,MgSO₄与空白相比,虽然产量比空白略少,但是考虑到MgSO₄浓度较高,且Mg²⁺对于一些乳酸细菌产生的乳酸脱氢酶有一定的促进作用,若降低浓度可能会有利于乳酸产生,Na₂HPO₄则表现出明显的促进作用。对于m-16菌株产酸没有表现出很好的促进作用,与空白的差别较小。采用在培养基中添加0.02%MgSO₄和0.1%Na₂HPO₄进行初步发酵试验。发酵试验采用在初糖浓度4%的培养基中分2次(24h和36h时)分别补加2%的葡萄糖方式,结果见表4。由表4可看出,菌株m-58发酵乳酸要稍高于m-16,且乳酸产量有明显的提高,得出MgSO₄和Na₂HPO₄对于该菌株的发酵有较好的促进作用。

表4 葡萄糖基质中菌株产酸的比较 (g/L)

菌株	成分	培养时间(h)	
		24	48
m-16	L-乳酸	40	58
	残糖	32	16
m-58	L-乳酸	46	64
	残糖	28	8

2.5 以玉米浓醪酒糟清液为基质的发酵试验结果

经在玉米浓醪酒糟清液中的逐步驯化后,m-16和m-58菌株都能在不同糖含量的玉米浓醪酒糟清液中良好生长,结果见表5。从表5可看出,m-16和m-58在63g/L初糖浓度下能良好发酵产生乳酸(48h)。但是当初糖浓度达到81g/L的时候,菌株的生长受到一定的抑制,m-58受抑制明显要小于m-16,因此得出以玉米浓醪酒糟清液为基质采用m-58产L-乳酸优于m-16。

表5 不同糖分的玉米浓醪酒糟清液培养产乳酸

项目	菌株	初糖含量 (g/L)		
		45	63	81
L-乳酸 (g/L)	m-16	39	50	33
	m-58	34	50	50

3 讨论

浓醪酒精发酵中存在的问题就是酒糟的处理,由于发酵过程中糖浓度的提高,使得发酵糟液中的糖含量也被提高,如何处理好酒糟,对于酒精发酵过程中成本的降低起着十分重要的作用。

从样品中筛选得 L-乳酸产生菌 6 株,通过对菌株的 NTG 诱变选育和初步的摇瓶发酵试验,挑选出两株能较好地利用葡萄糖的菌株 m-58 和 m-16。通过驯化培养后试验,得出 m-58 能较好发酵玉米酒糟清液产生乳酸,适合用于发酵玉米酒糟清液产乳酸。

由浓醪酒糟清液发酵生产的 L-乳酸可以用于生产聚 L-乳酸等,具有很大的应用前景。由于菌株处于筛选的初期阶段,对于产业化的应用过程,还需要就菌株发酵的工艺条件、发酵小试和中试放大试验等进行大量的

研究。酒糟等酒精发酵副产物的综合利用对于有效的降低酒精生产成本、提高原料的利用率都具有很重要的意义,也是酒精生产研究中的重要内容之一。

参考文献:

- [1] Jong-Sun Yun, Young-Jung Wee, Hwa-Won Ryu. Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003 (33):416-423.
- [2] 庞钦. 酒精浓醪发酵酒糟液生产乳酸的研究[D]. 无锡:江南大学, 2002.
- [3] 2005 年我国乳酸总需求量达 1.4 万吨[EB/OL]. <http://www.zei.gov.cn/gov/jjqs/15gh/zxgh/100801.htm>.
- [4] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1995.
- [5] 吴天祥, 杨海龙, 石贵阳, 章克昌. 酒精浓醪发酵联产乳酸化饲料新工艺[J]. *无锡轻工大学学报*, 2003 (7):1-6.
- [6] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [7] 诸葛健, 王正祥, 等. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994.

贵州省首批轻工行业特有工种职业技能鉴定在茅台举行

本刊讯:由轻工行业特有工种职业技能鉴定站(58003034)组织的贵州省首批轻工行业特有工种职业技能鉴定于 2006 年 1 月 7 日至 9 日在贵州茅台酒股份有限公司举行,中国酿酒工业协会派出专人现场督考。鉴定站成立了考评组,高士敏任组长,丁德杭、吕云怀任副组长,高士敏、唐小雨任主考,王庆祝、黄平、贾翹彦、姜莹任副主考。



职工技能理论考试考场之一

本次鉴定对 1950 名申报白酒酿造初级工、中级工、高级工、技师、高级技师的人员进行了理论考试和实际操作考核,并对高级技师报考人员进行了论文答辩。共设置考场 28 个,配置监考人员 60 余人。在鉴定考核之前,为了提高报考人员的理论知识水平和实际操作的能力,贵州茅台酒股份有限公司于 2005 年 12 月初至 2006 年元月 3 日分批分期对报考人员进行了系统培训和辅导。

经过严格的考试和考核,大部分考生取得了优异成绩,鉴定站顺利完成鉴定工作。(晓莹)

本次鉴定对 1950 名申报白酒酿造初级工、中级工、高级工、技师、高级技师的人员进行了理论考试和实际操作考核,并对高级技师报考人员进行了论文答辩。共设置考场 28 个,配置监考人员 60 余人。在鉴定考核之前,为了提高报考人员的理论知识水平和实际操作的能力,贵州茅台酒股份有限公司于 2005 年 12 月初至 2006 年元月 3 日分批分期对报考人员进行了系统培训和辅导。



阅卷登分流水作业

茅台将申报国家非物质文化遗产

本刊讯:据悉,贵州茅台传统酿造工艺已被贵州省列入省级非物质文化遗产名录,并将申报国家级非物质文化遗产。

贵州省人民政府于 2006 年元月初正式公布了贵州省首批 91 个省级非物质文化遗产代表作名录及其保护项目所在地,茅台酒传统酿造工艺被列入其中。

所谓非物质文化遗产,是指各民族人民世代相承的、与群众生活密切相关的各种传统文化表现形式。

国酒茅台拥有独特传统酿造工艺,其顺应自然节令规律的生产周期,以及在传承基础上创新发展的高温酿造、精心勾兑等工艺技术,在中国传统固态发酵蒸馏法中是绝无仅有的,体现了中华民族物质文明的结晶。(小砂)