

## L-乳酸发酵的研究

蒋明珠 吴芷萍 许孟琴 白照熙

谢红 孙文敬 张俊贤

(山西省生物研究所,太原)

本文报导了 L-乳酸产生菌筛选、发酵条件以及发酵产物鉴定的结果。从 56 株根霉中筛选出 10 株产 L-乳酸较高的菌株,其中根霉 R47 产 L-乳酸最高,产酸稳定。发酵条件试验结果表明,该菌最适发酵培养基组成(%): 葡萄糖 15, 尿素 0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0044,  $\text{CaCO}_3$  6.7; pH6.7。在摇瓶培养条件下, 35℃ 48 小时, 产 L-乳酸达 11.84 g/100 ml, 对糖的重量转化率达 78.9%。发酵液经离子交换等方法纯化, 得到无色或微黄色透明糖浆状液体。经纸层析、比旋光度测定、紫外光谱和红外光谱分析证明确系 L-乳酸。

**关键词** L-乳酸;根霉属;发酵

乳酸是食品工业重要的酸味剂和防腐剂,也是重要的化工原料之一。目前,国内外对乳酸的需求量日益增加。乳酸的构型分为三类: D-型、L-型和 DL-型。DL-乳酸的生产历史悠久,产量较大,一般采用德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrückii*) 发酵<sup>[1]</sup>。该菌为同型乳酸发酵,对糖的转化率达 90% 以上。L-乳酸的生产一般采用根霉 (*Rhizopus* sp.), 为异型乳酸发酵,可将大部分糖转化为乳酸,同时产生部份乙醇和二氧化碳。虽然 DL-乳酸发酵比 L-乳酸发酵对糖的利用率高,但 DL-乳酸作食品添加剂时其 D-型部份不被人体吸收,而 L-乳酸则可全部被人体吸收。因此,国外对 L-乳酸的研究和生产十分重视<sup>[2,3]</sup>。L-乳酸的生产在国外已工业化,但国内 L-乳酸发酵的研究未见正式报导。

本文报导 L-乳酸产生菌的筛选、发酵条件及产物鉴定的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株

从菜园、果园、花盆土壤中和各类谷物上分离根霉 44 株,中国科学院微生物研究所和本所保藏根霉 12 株,共 56 株。

### (二) 培养基

1. 斜面培养基: PDA 培养基。

2. 分离培养基: 馒头切片。

3. 纯化培养基: Martin 氏培养基。

4. 种子培养基(%): 葡萄糖 11.0, 尿素 0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0088,  $\text{CaCO}_3$  1.0, 自然 pH。

5. 发酵培养基(%): 葡萄糖 15, 尿素 0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0044,  $\text{CaCO}_3$  6.7, 自然 pH。 $\text{CaCO}_3$  分开灭菌。

### (三) 分析方法

1. pH: 用国产精密 pH 试纸测定。

2. 发酵液中 L-乳酸定性测定: 采用

本文于 1989 年 5 月 26 日收到。

本文中乳酸的紫外光谱及其锌盐的红外光谱由我所技术室杨坪荣、武秀珍二位同志测定,特此致谢。

纸层析法。展开剂为正丁醇: 甲酸: 水 (5:3:1, V/V), 上行法展开。展层后用 0.2% 溴甲酚绿:0.05% 甲基红: 0.5 mol/L NaOH (1:1:0.15, V/V) 溶液显色, 在蓝色背景上呈现出红色斑点。若发酵液呈现的斑点  $R_f$  值与 L-乳酸标准品的  $R_f$  值一致, 则可初步确定该菌产 L-乳酸。

3. 发酵液中 L-乳酸定量测定: 参照 Barker 和 Summerson 的方法<sup>[4]</sup>, 或采用测定发酵液中可溶性钙(发酵液中 L-乳酸以钙盐形式存在), 计算出 L-乳酸的含量。

## 结果和讨论

### (一) L-乳酸产生菌的分离与筛选

将馒头切片置于铺有二层湿滤纸的培养皿中, 把土样或谷物样品撒于馒头片上, 30℃ 培养 3—4 天。挑取以根霉的菌落, 进行适当稀释, 用 Martin 氏培养基涂抹分离纯化。将分离纯化菌株接入斜面培养基中, 30℃ 培养 7 天左右, 进行镜检。共分离根霉 (*Rhizopus* sp.) 44 株。

初筛时, 将分离和保藏根霉转接 1 次, 制备孢子悬液, 接入种子培养基中 (250 ml 三角瓶装 25 ml), 35℃ 振荡培养 18 小时左右。按 10% 的接种量接入发酵培养基中 (250 ml 三角瓶装量 30 ml), 35℃ 振荡培养 72 小时左右。用纸层析法定性, 凡产 L-乳酸的菌株, 进行复筛。复筛时, 将初筛时确定产 L-乳酸的发酵液进行定量测定, 产 L-乳酸较高的按初筛时的发酵方法再进行 3—5 次发酵。所筛的 56 株根霉有 45 株产 L-乳酸, L-乳酸对糖的转化率 (L-乳酸对发酵液中糖的重量转化率) 达 75% 以上的 10 株, 50—75% 的有 28 株, 50% 以下的有 7 株。试验说明 L-乳酸产生菌分布普遍。经反复摇瓶发酵比较试验, 根霉 R47 的 L-乳酸产量最高, 产酸稳定。

### (二) L-乳酸发酵条件试验

以下发酵均用根霉 R 47, 种子培养基 250 ml, 三角瓶装量 30 ml, 发酵培养基 250 ml 三角瓶装量 50 ml, 其它条件同菌种筛选方法。

1. 不同碳源对产 L-乳酸的影响: 以发酵培养基为基础, 按 15% 的量加入不同碳源, 进行发酵, 由表 1 可见, 根霉 R 47 均能利用淀粉、蔗糖和葡萄糖产 L-乳酸, 但以葡萄糖产酸量最高。试剂葡萄糖与工业葡萄糖产酸量差异不大。为降低原材料成本, 利用多种粗放碳源的试验正在进行中。

表 1 不同碳源对产 L-乳酸的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on L-lactic acid production

碳源 Carbon sources	发酵终 pH Final pH	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
可溶性淀粉 Soluble starch	5.8	6.39
蔗糖 Sucrose	6.2	7.05
试剂葡萄糖 Glucose C. P.	5.8	11.19
工业葡萄糖 Industrial glucose	7.0	10.95

2. 不同氮源对产 L-乳酸的影响: 以发酵培养基为基础, 加入不同氮源进行发酵, 结果见表 2。根霉 R 47 均能利用无机氮和有机氮产 L-乳酸。无机氮中以尿素较好, 有机氮中以蛋白胨较好。从经济角度考虑, 以尿素较适宜。

3. 不同磷酸盐对产 L-乳酸的影响: 以发酵培养基为基础, 按 0.02% 的浓度加入不同磷酸盐进行发酵, 结果见表 3。所试的 4 种磷酸盐均可作根霉 R 47 发酵 L-乳酸的磷源, 其中以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  较好。

4. 不同碳酸盐对产 L-乳酸的影响: 以发酵培养基为基础, 按 6.7% 的浓度加入

表 2 不同氮源对产 L-乳酸的影响  
Table 2 Effect of various nitrogen sources on L-lactic acid production

氮 源 Nitrogen sources	添加量(%) Supplement	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
尿素 Urea	0.2	11.92
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	10.33
NaNO <sub>3</sub>	0.6	8.60
蛋白胨 Peptone	0.1	11.22
酵母膏 Yeast extract	0.1	10.15
玉米浆 Corn-steep liquor	0.1	7.32

表 3 不同磷酸盐对产 L-乳酸的影响  
Table 3 Effect of various phosphates on L-lactic acid production

磷酸盐 Phosphates	发酵终 pH Final pH	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.4	11.18
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.4	10.24
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.2	10.77
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.4	10.46

表 4 不同碳酸盐对产 L-乳酸的影响  
Table 4 Effect of various carbonates on L-lactic acid production

碳酸盐 Carbonates	发酵终 pH Final pH	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
CaCO <sub>3</sub>	5.8	11.75
ZnCO <sub>3</sub>	6.2	1.14
BaCO <sub>3</sub>	6.4	1.77
MgCO <sub>3</sub>	7.0	1.68

表 5 金属离子对产 L-乳酸的影响  
Table 5 Effect of various metal ions on L-lactic acid production

金属盐 Metallic salts	浓度(%) Concentration	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0	10.55
	0.025	11.75
	0.05	10.91
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0	10.11
	0.0044	11.22
	0.0088	10.29

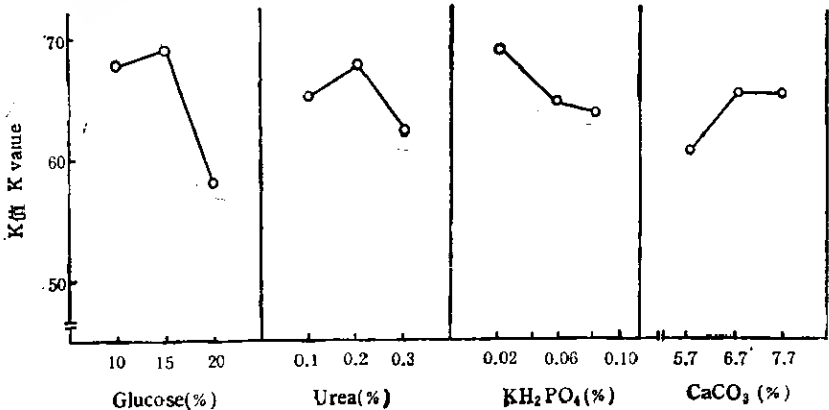


图1 不同浓度的葡萄糖、尿素、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及CaCO<sub>3</sub>按正交试验L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)综合考察对L-乳酸转化率的影响  
Fig. 1 Effect of different concentrations of glucose, urea, potassium dihydrogen phosphate and calcium carbonate on L-lactic acid conversion rate [with orthogonal experiment table L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)]  
基础无机盐组成 Basal composition of inorganic salts: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0044%.

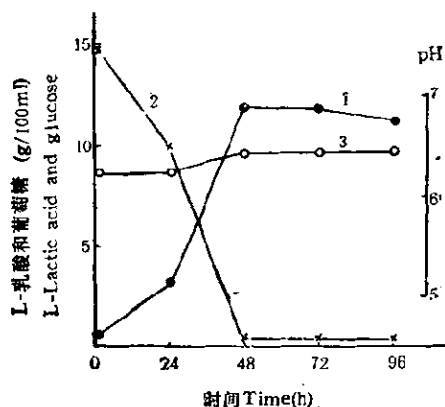


图2 根霉 R47 L-乳酸发酵过程

Fig. 2 Time course of L-lactic acid fermentation by *Rhizopus* sp. R47

1. L-乳酸 L-lactic acid; 2. 葡萄糖 Glucose;  
3. pH

不同碳酸盐,进行发酵,结果见表4。碳酸钙是根霉 R47 发酵 L-乳酸的适宜中和剂。

5. 金属离子对产 L-乳酸的影响: 以发酵培养基为基础,改变  $Mg^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  离子浓度,进行发酵,结果见表5。根霉 R47

表6 通气量对产 L-乳酸的影响

Table 6 Effect of air supply on L-lactic acid production

培养基装置 (ml) Vol. of medium added	发酵终 pH Final pH	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
20	6.4	9.85
30	6.7	10.13
50	6.7	11.44
70	7.0	11.24

发酵 L-乳酸时  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  以 0.025% 为宜,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  以 0.0044% 为宜。

6. 通气量对产 L-乳酸的影响: 在 250 ml 三角瓶中装入不同体积的发酵培养基,观察通气量对产 L-乳酸的影响,结果见表6。较适培养基装量为 50—70 ml,说明根霉 R47 进行 L-乳酸发酵对通气量要求不高。

7. 温度对产 L-乳酸的影响: 将根霉 R47 接入发酵培养基后,置于不同温度下

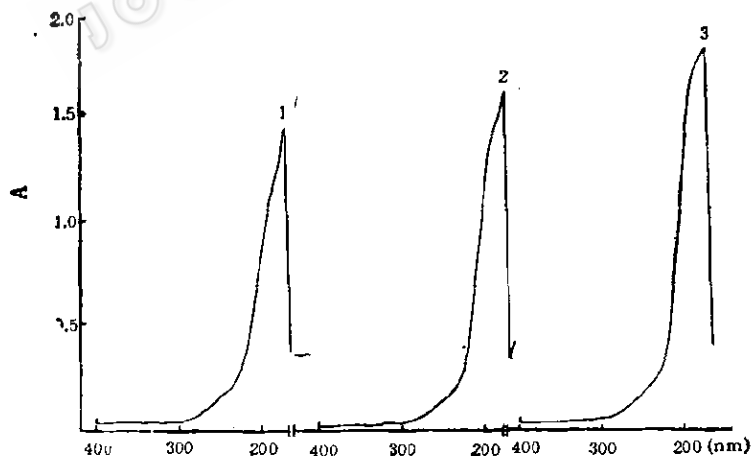


图3 乳酸紫外光谱

Fig. 3 UV spectrum of lactic acid

1. 提纯发酵产物 Purified fermentation product; 2. L-乳酸(标准样品) L-lactic acid (standard);  
3. DL-乳酸 DL-lactic acid

表7 温度对产 L-乳酸的影响

Table 7 Effect of temperature on L-lactic acid production

温度(℃) Temperature	发酵终 pH Final pH	产 L-乳酸 (g/100ml) L-lactic acid produced
20	6.2	9.26
30	6.2	10.85
35	6.2	11.44
38	7.0	11.31

培养,观察温度对产 L-乳酸的影响,结果见表7。由表7可见,发酵温度以35—38℃为宜,该菌对温度要求较高。

### (三) 发酵培养基正交试验

在发酵培养基碳源、氮源、磷酸盐和中和剂种类以及必要微量金属离子加量确定之后,我们选取正交表  $L_9(3^4)$ , 综合考察了葡萄糖、尿素、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$  各主要营养因素对产 L-乳酸的影响,结果如图1。在所试各因素水平范围内葡萄糖浓度对产酸影响最大,是诸因素中第一位的因素。根据正交试验结果与分析,最佳发酵培养基组成如下: 葡萄糖 15%, 尿素 0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02%,  $\text{CaCO}_3$  6.7%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0044%, pH 6.7。

### (四) L-乳酸发酵过程

采用上述最佳发酵培养基,在摇瓶培养条件下进行 L-乳酸发酵,定时取样测定发酵液中 L-乳酸、葡萄糖含量和 pH 值,结果见图2。根霉 R 47 在发酵 L-乳酸过程中,葡萄糖消耗迅速,48 小时内葡萄糖消耗殆尽。随着葡萄糖的消耗, L-乳酸含量迅速上升,48 小时达到高峰,此时产 L-乳酸 11.84 g/100 ml, 对糖重量转化率达 78.9%。48 小时至 96 小时, L-乳酸含量无明显变化。由于在发酵液中有足够量中和剂,在整个发酵过程中 pH 变化不大。

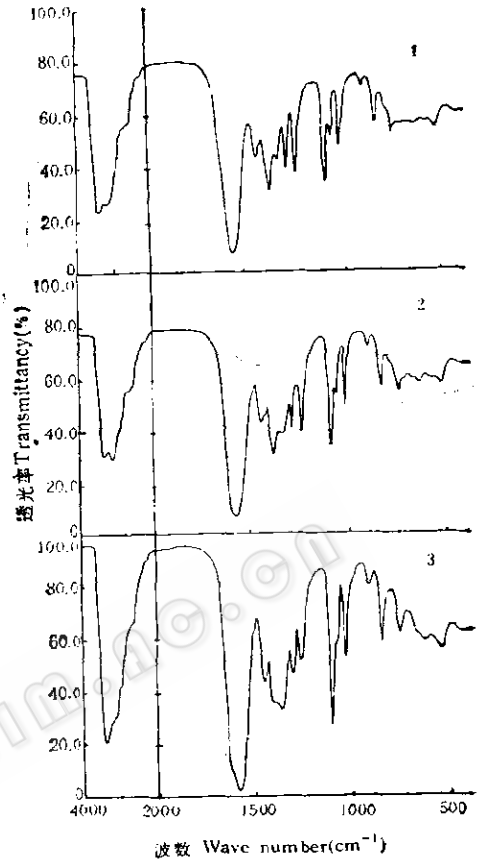


图4 乳酸锌红外光谱

Fig. 4 IR spectrum of zinc lactate

1. 提纯发酵产物的锌盐 Zinc salt of purified fermentation product;
2. L-乳酸标准品的锌盐 Zinc salt of standard L-lactic acid;
3. DL-乳酸的锌盐 Zinc salt of DL-lactic acid

### (五) L-乳酸的提取和鉴定

1. L-乳酸的提取: 将根霉 R 47 发酵液提温过滤, 取清液减压浓缩, 放置过夜使 L-乳酸钙析出, 滤掉母液, 得 L-乳酸钙白色结晶。按计算量加硫酸脱钙, 并加入活性炭脱色。所得酸解液过 732 阳树脂 ( $\text{H}^+$  型) 和 701 阴树脂 ( $\text{OH}^-$  型), 减压浓缩使 L-乳酸含量达 80% 以上。L-乳酸为澄明无色或微黄色糖浆状液体。

## 2. L-乳酸的鉴定:

(1) 纸层析: 取根霉 R 47 发酵液提纯样品、L-乳酸标准品(上海科学用品采购供应站试剂加工厂分装的法国产品), 分别点样于新华 1 号滤纸上, 展层显色后, 样品  $R_f$  值与 L-乳酸一致。

(2) 比旋光度测定: 将根霉 R 47 发酵液提纯样品作成锌盐, 用 Perkin-Elmer 公司 241 型旋光仪测定比旋光度, 提纯样品锌盐  $[\alpha]_D^{25} = -8.26$  ( $C = 2.5$  水), L-乳酸锌文献值

$$[\alpha]_D^{25} = -8.25 \text{ (} C = 4 \text{ 水)}^{[1]},$$

样品锌盐与文献值基本一致。

(3) 紫外光谱测定: 用 Hitach 公司 635 型液相色谱仪测定根霉 R 47 发酵液提纯样品、L-乳酸标准品和 DL-乳酸(北京化工厂产品)的紫外光谱, 样品图谱与 L-乳酸标准品相符(图 3)。

(4) 红外光谱测定: 将根霉 R 47 发酵液提纯样品、L-乳酸标准品和 DL-乳酸作成锌盐, 用 Shimadzu 公司 IR-435 型红外光谱仪测定, 样品锌盐与 L-乳酸标准品锌盐相符, 见图 4。

根据以上结果, 确定由根霉 R 47 发酵液提取出的糖浆状液体系 L-乳酸。

人体对各种构型的乳酸代谢不一, 因

而区分乳酸的构型十分必要。纸层析只能初步确定样品是否是乳酸, 而不能区分它的构型, 因为 D-型和 DL-型乳酸的  $R_f$  值一致。虽然物质的构型与旋光是两种不同的概念, 然而在鉴别乳酸构型时, 可以利用比旋光度的明显不同来推测它的构型。DL-乳酸及其锌盐比旋光度为 0, 而 L-乳酸的比旋光度为  $+2.6^{[6]}$ , 其锌盐则为  $-8.25$ 。据我们试验, 乳酸的紫外吸收光谱, L-型或 DL-型最大吸收峰均在 192 nm, 但峰型不同; L-型和 DL-型乳酸的锌盐红外光谱有明显区别(图 3), 而 L-型和 DL-型乳酸的钙盐无明显区别(图略)。因而, 鉴别乳酸构型时必须采用可靠的方法。

## 参 考 文 献

- [1] Aksu, Z. et al.: *Biotechnology Letters*, 8(3): 157—160, 1986.
- [2] Ward, G. E. et al.: *Industrial and Engineering Chemistry*, 30(11): 1233—1235, 1938.
- [3] Snell, R. L. et al.: U. S. Patent, 3, 125, 424, 1964.
- [4] Barker, S. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 135: 535—554, 1941.
- [5] Doelle, H. W. 著(郭杰炎等译): 细菌的新陈代谢, 科学出版社, 北京, p. 631, 1983.
- [6] 陈陶声等编著: 微生物工程, 化学出版社, 北京, p. 217, 1987.

## STUDIES ON THE FERMENTATION OF L-LACTIC ACID

Jiang Mingzhu   Wu Zhiping   Xu Mengqin   Bai Zhaoxi   Xie Hong

Sun Wenjing   Zhang Junxian

(Shanxi institute of biology, Taiyuan)

Ten strains with higher capacity of L-lactic acid production were screened from 56 strains belonging to the genus *Rhizopus*. Among these, strain R47 showed the highest yield of L-lactic acid, and the yield was stable. According to the experimental results of fermentation condition, the optimum medium for its fermentation consists of 15% glucose, 0.2% urea, 0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0044%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6.7%  $\text{CaCO}_3$ , and pH 6.7. In shake flask culture, L-lactic acid yields was 11.84g/100ml at 35°C for 48h,

and weight conversion rate of glucose was 78.9%.

The product isolated and purified from fermentative broth was a clear, colourless or light yellow syrup. It was identified as L-lactic acid by paper chromatography, specific rotation, ultraviolet absorption spectrum and infrared absorption spectrum.

### Key words

L-lactic acid; *Rhizopus*; Fermentation