

# L-乳酸调控乳酸产生菌产物光学纯度的分析

孟武<sup>1</sup>, 李十中<sup>2</sup>, 封文涛<sup>1</sup>, 张晗星<sup>2</sup>, 王瑞明<sup>1</sup>

1 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250353

2 清华大学核能与新能源研究院, 北京 100084

**摘要:** 发酵初期在米根霉菌发酵培养基中添加 L-乳酸可以调控发酵产物乳酸的光学纯度。随着 L-乳酸添加量的增加, 所产 L-乳酸的光学纯度随之增加, 当 L-乳酸的添加量  $\geq 1.5$  g/L 时, D-乳酸不再产生。同时, L-乳酸的产量、生物量、糖转化率也随之降低。该调控方法对乳酸菌调控产 L-乳酸光学纯度影响不大, 对大肠杆菌发酵调控产 D-乳酸光学纯度没有效果。

**关键词:** L-乳酸, D-乳酸, 光学纯度, 米根霉, 乳酸菌, 大肠杆菌, 调控

## Effects of cultivation conditions on the optical purity of L(+)-lactic acid

Wu Meng<sup>1</sup>, Shizhong Li<sup>2</sup>, Wentao Feng<sup>1</sup>, Hanxing Zhang<sup>2</sup>, and Ruiming Wang<sup>1</sup>

1 College of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China

2 Institute of New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** The effect of cultivation conditions on the optical purity of L(+)-lactic acid produced by *Rhizopus oryzae* HZS6 was investigated. The isomeric composition of lactic acid was influenced by the supplementation of L(+)-lactic acid to fermentation medium. L(+)-isomer increased with the dosage, no D(-)-lactic acid was observed when the concentration of supplemented L(+)-lactic acid in matrix was 1.5 g/L. However, the L(+)-lactic acid yield, biomass and glucose conversion rate decreased with the dosage. With the same method, the supplementation of L(+)-lactic to substrate had no influence on isomeric composition of lactic acid by *Lactobacillus* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** L(+)-lactic acid, D(+)-lactic acid, optical purity, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, regulation

乳酸是自然界中最小的手性分子, 其结构中含有 1 个不对称碳原子, 因此具有旋光性, 按构型可分为 D-乳酸和 L-乳酸<sup>[1]</sup>。L-乳酸为哺乳动物代谢的中间产物, 由于人体只能代谢 L-乳酸<sup>[2]</sup>, 因此在用于食品及医药工业时必然要用 L-乳酸代替 D, L-乳

酸。而 L-乳酸最具应用潜力的是生产聚乳酸(PLA), 制造生物可降解塑料<sup>[3]</sup>。近年来, 人们对 D-乳酸、L-乳酸及其衍生物的理化性能和生理活性有了深入的了解, 在手性药物、手性溶剂、生物农药及功能性材料等领域拓宽了乳酸对映体的应用范围, 市场

**Received:** June 30, 2009; **Accepted:** September 17, 2009

**Supported by:** Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2006BAD07A00).

**Corresponding author:** Ruiming Wang. Tel: +86-531-89631191; Fax: +86-531-89631191; E-mail: ruiming3k@163.com

“十一五”国家科技支撑计划(No. 2006BAD07A00)资助。

对高光学纯度的乳酸需求也不断增加。

微生物发酵法是目前乳酸生产的主要方法。虽然发酵法乳酸生产技术在日益进步,但乳酸的生产及提高其纯度成本仍需进一步降低,才能够扩大乳酸的应用前景。主要集中在菌种水平的提高和发酵工艺技术的改进。米根霉是生产 L-乳酸的理想菌种,国内外对于米根霉的选育工作做了大量的报道。Yu 等<sup>[4]</sup>对米根霉直接发酵生产 L-乳酸进行了研究,每千克粗淀粉原料可生成 350 g 以上的 L-乳酸。

以目前的研究水平,很难通过改变培养条件来获得 100% 光学纯度的乳酸。已有报道,通过对温度、pH 值、糖浓度和氮含量等因素初始发酵条件的研究<sup>[5-6]</sup>,观察产乳酸菌株的产量以及产物光学纯度的影响。本实验通过在发酵前期添加 L-乳酸进行发酵调控实验,研究对乳酸纯度的影响,从而以较低成本来提高所产 L-乳酸的光学纯度。分别考察了发酵初期通过添加 L-乳酸对米根霉菌、乳酸菌、大肠杆菌产物光学纯度的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

米根霉(*R. oryzae*) HZS6, 系清华大学核能与新能源院李十中实验室保存。发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、德氏乳酸杆菌(*Lactobacillus delbruckii*)为山东大学生命科学院孔健教授提供,乳酸高产基因工程菌大肠杆菌 *E. coli* W3110(*pflb*, *adhE*)为山东大学生命科学院祁庆生教授提供。

### 1.2 培养基及发酵培养方法

方法参照文献<sup>[7-9]</sup>。添加 L-乳酸调控实验,在发酵初期向培养基分别加入: 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、5.0、10 g/L 梯度浓度的 L-乳酸或 D-乳酸,定时取样分析产物光学纯度、生物量变化情况。

### 1.3 分析方法

HPLC 色谱柱 Bio-Rad HPX 87H 用于对产物进行分离,测定残余葡萄糖的浓度。HPLC 色谱柱 Astec CLC-D, Dikma, USA 分离并测定 L-乳酸和 D-乳酸的浓度。细胞生长量的测定: 取一定体积的发酵液过滤后用稀硫酸、蒸馏水清洗滤出物 2 遍,然

后将得到的固体物质在 95°C 烘箱里烘干至恒重,所得烘干物质的质量即为细胞生长量。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加 L-乳酸对米根霉产物光学纯度的影响

乳酸发酵产物纯度受碳源浓度和 pH 的影响。在不控制 pH 的条件下进行乳酸发酵,乳酸合成在 24 h 达最高 23.9 g/L, 随后下降, 所得 L-乳酸的光学纯度只能达到 81.4%, D-乳酸产量高, 结果如图 1。当 pH 控制在 6 时, L-乳酸的纯度不受葡萄糖初始浓度影响, 光学纯度为 98.5%(表 1)。当 pH 为 5.5 时, 随着糖初始浓度由 50 g/L 到 150 g/L 的变化, L-乳酸的光学纯度由 91.8% 增加到 95.7%。L-乳酸的光学纯度随着 pH 值的降低而降低的原因是由于发酵产生了 D-乳酸。

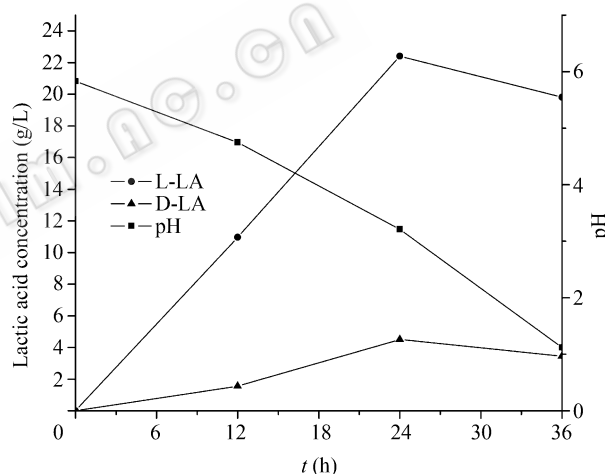


图 1 自然 pH 米根霉 HZS6 发酵 36 h 时 L-乳酸浓度 (●), D-乳酸浓度 (▲), pH (■) 变化量

Fig. 1 Effect of natural pH (■) on L(+)-lactic acid (●) and D(-)-lactic acid production (▲) by *R. oryzae* HZS6 in 36 h.

在发酵初期向培养基中加入梯度浓度的 L-乳酸: 0.1、0.5、1.0、1.5、2.5、5.0 和 10 g/L, HPX 87H 色谱柱检测分析产物和碳源底物消耗变化量, 结果见图 2, 手性色谱柱分别检测产物 L-乳酸和 D-乳酸含量变化量(图 3)。随着 L-乳酸添加量由 0.1 g/L 增加到 10.0 g/L, 米根霉 HZS6 产 L-乳酸光学纯度由 98.6% 提高到 100%。D-乳酸的合成受添加 L-乳酸的抑制, 当培养基中 L-乳酸的添加量提高到 1.5 g/L 时, 发酵产物没有检测到 D-乳酸。同时, 随着添加 L-乳

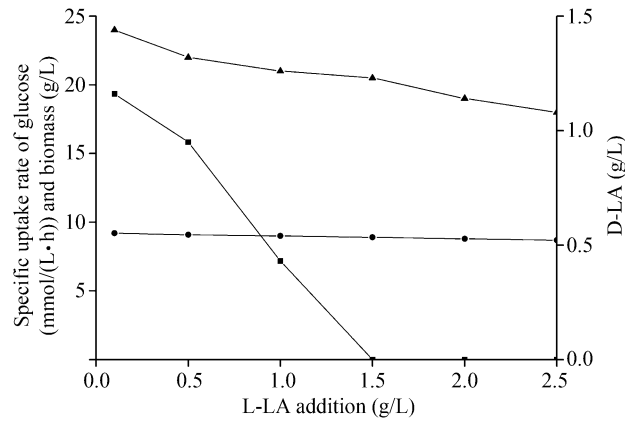


图 2 不同 L-乳酸调控添加量对米根霉 HZS6 D-乳酸产量(■)、菌体细胞生长(●)和葡萄糖利用率(▲)的影响  
Fig. 2 Effect of addition of L(+)-lactic acid on the cell growth (●), D(-)-lactic acid production (■) and glucose specific uptake rate (▲) by *R. oryzae* HZS6.

酸量的增加, 细胞生长受到显著抑制, 生物量减少 8%。L-乳酸的添加, 虽然可以提高产物光学纯度, 但总产酸量、底物碳源转化率都有不同程度的下降(表 1)。综合考虑发酵时间以及 L-乳酸添加量、产物量, 比较得出, L-乳酸调控米根霉发酵产物, 最佳添加量为 1.5 g/L, 可以得到 100% L-乳酸。添加 L-乳酸调控产物乳酸光学纯度, 针对米根霉菌的发酵生产是有效可行的。

## 2.2 添加 L-乳酸对乳酸菌产物光学纯度的影响

考察添加 L-乳酸对两种乳酸菌产物光学纯度的影响, 分别向发酵乳杆菌、德氏乳酸杆菌发酵培养基添加梯度浓度: 0、1.2、2.4、7.2、9.6、12.0 g/L。分别对 D, L-乳酸产量、菌体生长量、糖转化率进行检测和分析。表 2 为发酵乳杆菌发酵结果, 正常发

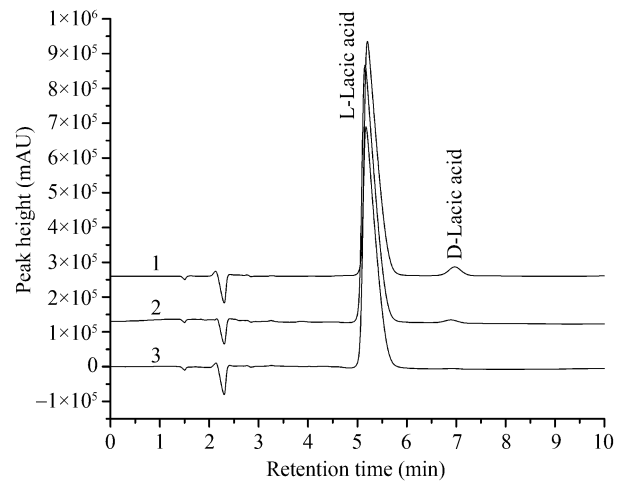


图 3 HPLC 检测得出添加不同量 L-乳酸对米根霉 HZS6 产酸光学纯度的影响  
Fig. 3 HPLC profiles the effect of addition of L(+)-lactic acid on the production and the isome purity by *R. oryzae* HZS6 at the end of fermentation. Samples were cultured in different addition concentration of L(+)-lactic acid. line1: 0 g/L; line 2: 1 g/L; line 3: 1.5 g/L.

酵条件下 L-乳酸占总酸量的 95%, 经梯度浓度 L-乳酸诱导, L-乳酸没有明显的增加。分析产物表明, 添加纯 L-乳酸对提高发酵乳杆菌产 L-乳酸光学纯度没有明显效果, 反而降低了产乳酸总量, 如图 4 所示, 发酵初期添加 L-乳酸对菌体生长有一定抑制作用, 延长了发酵时间, 同时也降低了 L-乳酸产量。L-乳酸诱导调控德氏乳酸杆菌发酵结果, 基本同发酵乳杆菌, 见表 3。正常发酵条件下 L-乳酸占总酸量的 96%, 经梯度浓度 L-乳酸诱导, L-乳酸的光学纯度没有变化。分析产物表明, 添加纯 L-乳酸对提高德氏乳杆菌的产 L-乳酸光学纯度没有明显效果, 随着 L-乳

表 1 L-乳酸调控对米根霉 HZS6 产 L-乳酸光学纯度影响

Table 1 Effect of addition of L(+)-lactic acid on the optical purity L(+)-lactic acid produced by *Rhizopus oryzae* HZS6

Cultivation conditions								
Initial glucose concentration (g/L)	pH	T <sup>c</sup> (°C)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (g/L)	L-LA addition (g/L)	Yield <sup>a</sup> of L-LA (%)	Time <sup>b</sup> (h)	Max LA (g/L)	L-LA (%)
100.0	6.0	37	2.0	0	82.6	116	82.7	98.5
				0.1	82.5	116	82.5	98.6
				0.5	82.2	120	82.2	98.9
				1.0	81.7	120	81.7	99.5
				1.5	81.3	124	81.3	100
				2.5	76.4	132	76.4	100
				5.0	72.9	136	72.9	100
				10.0	66.8	140	66.8	100

<sup>a</sup> Based on initial glucose concentration in media. <sup>b</sup> Time in hours from inoculation to the maximal LA concentration arrived. <sup>c</sup> T: temperature.

表 2 L-乳酸调控对发酵乳杆菌产 L-乳酸光学纯度影响

Table 2 Effect of addition of L(+)-lactic acid on the optical purity L(+)-lactic acid produced by *L. fermentum*

Cultivation conditions							
Initial glucose concentration (g/L)	pH	T <sup>c</sup> (°C)	L-LA addition (g/L)	Yield <sup>a</sup> of L-LA (g/L)	Yield of D-LA (g/L)	Time <sup>b</sup> (h)	L-LA (%)
88.0	7.0	34	0	78.1	3.9	142	95.2
			1.2	76.4	3.4	144	95.7
			2.4	77.5	3.9	144	95.2
			7.2	77.3	4.0	168	95.1
			9.6	78.4	3.9	143	95.3
			12.0	75.8	4.3	143	95.0

<sup>a</sup> Based on initial glucose concentration in media. <sup>b</sup> Time in hours from inoculation to the maximal LA concentration arrived. <sup>c</sup> T: temperature.

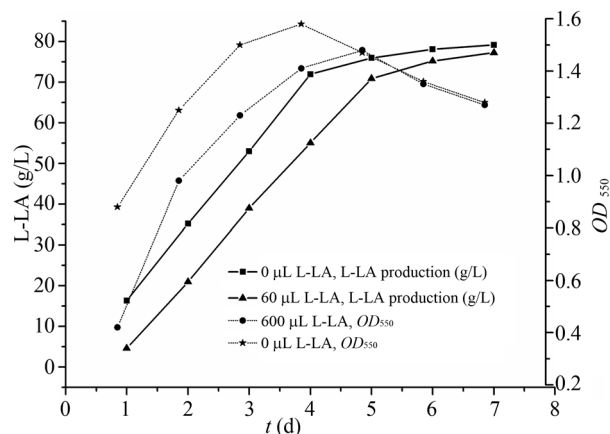


图 4 添加与不添加 L-乳酸对发酵乳杆菌乳酸产量和菌体量影响

Fig. 4 Effect of addition or no addition of L(+)-lactic acid on the cell growth and L(+)-lactic acid production by *L. fermentum*.

酸发酵初期添加量的提高, 发酵时间明显延长, 且 L-乳酸产物量有较明显降低, D-乳酸含量有增加趋势。

### 2.3 大肠杆菌测定结果与分析

基因工程菌株大肠杆菌 W3110 (*Δpflb*, *ΔadhE*), 以葡萄糖为碳源的 M9 培养基合成 D-乳酸的主要发酵产物, 同时伴随少量 L-乳酸的生成, 与以上 L-乳酸调控同理, 以 D-乳酸调控提高发酵合成 D-

乳酸光学纯度。检测大肠杆菌的发酵产物 D, L-乳酸产量、菌体生长量、糖转化率, 结果见表 4。添加纯 D-乳酸对提高大肠杆菌的产 D-乳酸光学纯度没有明显效果, 反而降低了产乳酸总量, 不能抑制 L-乳酸产生, 同时对 D-乳酸产量有明显的抑制作用, 光学纯度随 D-乳酸的初始浓度的提高而下降。

### 3 讨论

对比发酵初期添加 L-乳酸调控三类产乳酸菌产物纯度实验得出, 该调控方法对不同菌效果不同。L-乳酸调控对提高米根霉产物 L-乳酸光学纯度有明显效果, 能抑制 D-乳酸的产量。在葡萄糖初始浓度 100.0 g/L、pH 6.0、温度 37°C 和  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度 2.0 g/L 的条件下, L-乳酸的最佳添加量为 1.5 g/L, 米根霉发酵可以得到 L-乳酸的产量为 81.3 g/L, 纯度为 100%。L-乳酸对调控发酵乳杆菌 (*L. fermentum*)、德氏乳酸杆菌 (*L. delbrueckii*) 产 L-乳酸光学纯度没有明显效果。D-乳酸调控对提高大肠杆菌 W3110 产 D-乳酸光学纯度没有效果。发酵初期添加 L-乳酸对 4 种产乳酸菌菌体生长都有抑制作

表 3 L-乳酸调控对德氏乳酸杆菌产 L-乳酸光学纯度影响

Table 3 Effect of addition of L(+)-lactic acid on the optical purity L(+)-lactic acid produced by *L. delbrueckii*

Cultivation conditions							
Initial glucose concentration (g/L)	pH	T <sup>c</sup> (°C)	L-LA addition (g/L)	Yield <sup>a</sup> of L-LA (g/L)	Yield of D-LA (g/L)	Time <sup>b</sup> (h)	L-LA (%)
88.0	7.0	34	0	79	3.4	144	95.9
			2.4	76.3	3.3	168	95.9
			6.0	77.3	4.4	168	94.6
			9.6	75.8	4.3	168	94.6
			12.0	74.6	4.6	146	95.0

<sup>a</sup> Based on initial glucose concentration in media. <sup>b</sup> Time in hours from inoculation to the maximal LA concentration arrived. <sup>c</sup> T: temperature

表 4 D-乳酸调控对大肠杆菌产 D-乳酸光学纯度影响

Table 4 Effect of addition of D(+)-lactic acid on the optical purity D(+)-lactic acid produced by *E. coli* W3110

Cultivation conditions							
Initial glucose concentration (g/L)	pH	T <sup>c</sup> (°C)	D-LA addition (g/L)	Yield of L-LA (g/L)	Yield <sup>a</sup> of D-LA (g/L)	Time <sup>b</sup> (h)	D-LA (%)
50.0	7.0	37	0	1.25	12	145	90.6
			0.12	1.25	10.7	145	89.2
			0.6	1.25	9.2	145	88.0
			1.2	1.24	6.6	145	84.2
			1.8	1.24	6.8	145	85.0
			2.4	1.22	4.4	145	78.3
			6.0	0.9	1.3	145	59.1

<sup>a</sup> Based on initial glucose concentration in media. <sup>b</sup> Time in hours from inoculation to the maximal LA concentration arrived. <sup>c</sup> T, temperature

用,降低了乳酸总产量。但总体评价,L-乳酸调控方法提高米根霉发酵乳酸产物光学纯度是具有成本效益的。

L-乳酸和 D-乳酸分别是由 L-乳酸脱氢酶(L-LDH)和 D-乳酸脱氢酶(D-LDH)合成的<sup>[10]</sup>。这两种酶各有最适 pH 来合成不同的异构体。发酵最初,只有 L-乳酸生成,因为所有的酶活都是在碳源浓度最高时最大,在碳源减少时迅速变小,随着发酵过程中碳源的减少和 pH 值的降低,D-乳酸开始被诱导合成。实验结果表明,发酵初期添加少量 L-乳酸可以提高产物 L-乳酸光学纯度,但具体机理尚不清楚。推测发酵初期存在的少量 L-乳酸可以抑制 D-乳酸脱氢酶活性,D-乳酸脱氢酶活性降低而不能形成 D-乳酸。从诱导调控效果看,来自于不同菌株中 D-乳酸脱氢酶受 L-乳酸的抑制效果不同,发酵乳杆菌、德氏乳酸杆菌受 L-乳酸的调控效果不明显,分析可能是 D-乳酸脱氢酶活性功能有所不同,其作用机理还需要对各个酶的结构功能做进一步研究。细菌乳酸发酵理论转化率 100%,而根霉发酵为混合酸发酵,对糖的转化率理论值为 75%,且根霉在发酵生产乳酸时需要进行通气搅拌,动力消耗比较大,费用比较高。细菌发酵乳酸可以在兼性厌氧条件下进行静置发酵,减少通气的能量消耗、降低成本。在发酵工艺方面,根霉发酵生产乳酸主要采用的工艺是气升式反应器和固定化方法,而细菌乳酸发酵可以和产物提取相耦合,采用原位分离技术在发酵过程中进行产物提取,减少工艺流程。由此国内外都展开了对细菌发酵生产 L-乳酸的研究,以发挥细菌发酵生产 L-乳酸的优势,弥补根霉发酵 L-乳酸所存在的缺陷和不足。因此,提高细菌产乳酸量的同时提高其产乳酸的纯度具有重要的意义,可以做进

一步深入的研究。

## REFERENCES

- [1] Gordon GL, Doelle HW. Production of racemic lactic acid in *Periococcus cerevisiae* cultures by two lactate dehydrogenases. *J Bacteriol*, 1975, **121**, 600–607.
- [2] Xu Z, WangQH, Jiang ZH, *et al*. Advance on the production and application of L-lactic acid. *Chem Adhesion*, 2004, **4**: 214–217.  
徐忠,汪群慧,姜兆华,等. L-乳酸的制备及其应用的研究进展. *化学与粘合*, 2004, **4**: 214–217.
- [3] Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, *et al*. The technology and economy potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev*, 1995, **16**, 221–231.
- [4] Yu RC, Hang YD. Kinetic of direct fermentation of agricultural commodities to L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol Lett*, 1989, **11** (8): 597–600.
- [5] Antonio Gonzalez-Vara R, Pinelli D, Rossi M, *et al*. Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 2004 in continuous fermentation. *Ferment Bioeng*, 1996, **81**: 548–552.
- [6] Yun JS, Wee YJ, Ryu HW, *et al*. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **33**: 416–423.
- [7] Bai DM, Jia MZ, Zhao XM, *et al*. L(+)-lactic acid production by pellet form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermenter. *Chem Eng Sci*, 2003, **58**: 785–791.
- [8] Zhang XH, Kong J, Yu WJ, *et al*. Studies on the physiological characteristics of *Lactobacillus fermentum* YB5. 2008, **8**: 33–38.  
张秀红,孔健,于文娟,等. 发酵乳酸杆菌(*Lactobacillus fermentum*)YB5 生理特征的研究. *中国食品学报*, 2008, **8**: 33–38.
- [9] Zhou SD, Causey TB, Hasona KT, *et al*. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **69**: 399–407.
- [10] Skory CD. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2343–2348.