

学校编码: 10384

分类号

密级

学 号: 20620111151509

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

利用代谢进化及固定化戊糖乳杆菌

催化粗甘油制备乳酸的研究

Metabolic evolution and immobilized cells of *Lactobacillus*
pentosus for lactic acid production from raw glycerol

严正平

指导教师姓名: 方柏山 教授

王世珍 助理教授

专业名称: 生物 化 工

论文提交日期: 2014 年 月

论文答辩日期: 2014 年 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

乳酸是三大有机酸之一，用途极其广泛。近年来，随着乳酸及其衍生物应用领域不断扩大，乳酸的需求量也持续增长。但以葡萄糖、淀粉等为原料的传统乳酸发酵工业，受限于原料成本的增长，发展空间有限。如果以生物柴油产业的副产物粗甘油为底物，可望大大降低乳酸发酵的生产成本。

本研究以实验室筛选的一株戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus* R3-8)为出发菌株，以工业粗甘油为底物，高效发酵生产乳酸，为实现其工业化生产打下基础。

本文研究内容分为三个部分：菌株的代谢进化、提高菌株生长水平以及利用纤维床生物反应器固定化菌体进行发酵。主要研究方案和结果如下：

一、培养基中添加高浓度的粗甘油和乳酸代谢进化出发菌株 *Lactobacillus pentosus* R3-8。通过分别测定含高浓度粗甘油或乳酸培养基中不同进化代数菌株的生长曲线，发现代谢进化可以使菌株耐受 130 g/L 的粗甘油或 20 g/L 的乳酸。

二、通过在培养基中添加不同种类、不同浓度的金属离子，提高菌株的生长水平，从而促进乳酸的发酵水平。研究表明培养基中加入浓度 10 mg/L 以上的 Mn^{2+} 对菌体生长和发酵水平均有促进作用。此外，相比 NaOH 溶液，氨水更适合用于发酵过程中调节发酵液 pH。经过 96 h 的分批发酵，乳酸可达 46.4 g/L，甘油的转化率达到 0.996 g/g，生产强度为 0.48 g/L/h。经 220 h 的补料分批发酵，乳酸浓度可到 83.8 g/L 的，乳酸对甘油的转化率和生产强度分别为 0.978 g/g 和 0.43 g/L/h。

三、利用纤维床生物反应器将戊糖乳杆菌细胞固定化，并进行了分批发酵、补料分批发酵和连续重复分批发酵的考察。结果发现：

(1) 与游离细胞发酵相比，利用固定化细胞可以显著短缩分批发酵的时间，提高乳酸的生产强度，通过固定化细胞分批发酵，乳酸产量可达 50.7 g/L，最大产率可达 1.83 g/L/h，甘油转化率为 0.947 g/g；

(2) 通过固定化补料分批发酵，得到最高乳酸浓度 88.5 g/L，产率为 0.50 g/L/h，相比游离细胞发酵，乳酸产量和产率分别提高了 5.6% 和 16.3%。

(3) 固定化细胞重复分批发酵表明所使用的固定化发酵系统稳定性很好，同时可以节省每个批次近 24 h 的育种时间，以及接种的操作步骤，提高发酵的

效率。

利用纤维床固定化戊糖乳杆菌生物转化是一种提高乳酸发酵水平的有效方法，且这种固定化细胞发酵系统具有进一步放大和发展的空间，有工业化应用的潜力。

关键词： 乳酸 粗甘油 戊糖乳杆菌 代谢进化 固定化

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Lactic acid is one of the three important organic acids, which has been widely used in many fields. In recent years, with the applications of lactic acid and its derivatives continuously expanding, there is exponential growth in demand for lactic acid. However, the raw material costs is the bottle neck of the development of traditional lactic acid fermentation industry based on glucose and starch. The cost can be significantly reduced when using raw glycerol.

In this paper, industrial raw glycerol was used for the production of lactic acid by *Lactobacillus pentosus* R3-8.

This paper is divided into three parts: the metabolic evolution of strain, the improvement of cells growth and lactic acid fermentation by immobilized cells in fibrous bed bioreactor. Results are as follows:

1. Application of metabolic evolution to enhance cells growth and lactic acid production of *Lactobacillus pentosus* by adding high concentration raw glycerol and lactic acid to the fermentation media. Growth curves indicated that the strain could tolerate up to 130 g/L of raw glycerol or 20 g/L of lactic acid.

2. The addition of different kinds of metal ions with different concentrations to the media was studied to enhance cells growth and lactic acid production of strain. Growth curves and batch cultures indicated that the addition of 10 mg/L Mn^{2+} promoted both cells growth and lactic acid production. The lactic acid concentration, yield and productivity of batch culture were 46.4 g/L, 0.996 g/g and 0.48 g/L/h, respectively. The results of batch cultures and fed-batch cultures indicated that aqueous ammonia was more suitable for the pH adjustment during the lactic acid fermentation, and the lactic acid concentration, yield and productivity of fed-batch culture were 83.8 g/L, 0.978 g/g and 0.43 g/L/h, respectively.

3. Batch cultures, fed-batch cultures and repeated-batch cultures were studied by immobilized cells of *Lactobacillus pentosus* in fibrous bed bioreactor. Results are as follows:

(1) Compared with free cells fermentation, the fermentation time was significantly shortened in immobilized cells fermentation. The lactic acid concentration, yield and productivity of batch culture were 50.7 g/L, 0.947 g/g in immobilized cells fermentation, respectively. And the maximum productivity of lactic acid was up to 1.83 g/L/h.

(2) 88.5 g/L lactic acid was obtained in fed-batch cultures by immobilized cells, while the productivity was 0.50 g/L/h, and compared with free cells fermentation, the concentration and productivity of lactic acid in immobilized cells fermentation were increased by 5.6% and 16.3%, respectively.

(3) The fibrous bed bioreactor system performed well in the repeated-batch fermentation, showing the endurance and stability of for long-term operation.

This work suggested the great potential of the fibrous bed bioreactor system in the economical production of lactic acid at industrial scale.

Keywords: lactic acid; raw glycerol; *Lactobacillus pentosus*; metabolic evolution; immobilization

摘 要	I
Abstract	III
第一章 文献综述	1
1.1 乳酸研究概况	1
1.1.1 乳酸的结构与性质	1
1.1.2 乳酸的应用	2
1.1.3 乳酸的生产方法	4
1.1.4 乳酸的生产概况及需求	6
1.2 乳酸发酵的研究现状	7
1.2.1 乳酸发酵菌种	7
1.2.2 乳酸发酵机理	8
1.2.3 乳酸发酵的研究方向及进展	9
1.3 生物柴油与其副产物粗甘油	13
1.3.1 生物柴油简介	13
1.3.2 粗甘油的利用	14
1.4 微生物转化粗甘油的研究现状	15
1.4.1 微生物转化粗甘油生产二羟基丙酮	15
1.4.2 微生物转化粗甘油生产 1,3-丙二醇	15
1.4.3 微生物转化粗甘油制氢	16
1.4.4 微生物转化粗甘油生产乳酸	16
1.5 代谢进化	17
1.6 课题来源和研究意义	17
第二章 戊糖乳杆菌的代谢进化研究	19
2.1 材料与方法	19
2.1.1 菌种	19
2.1.2 主要试剂	19
2.1.3 主要仪器设备	20
2.1.4 培养基	20

2.1.5 实验方法	21
2.1.6 分析方法	21
2.1.7 发酵参数	23
2.2 结果与讨论	23
2.2.1 基于粗甘油浓度变化的代谢进化研究	23
2.2.2 甘油驯化菌株的底物、产物耐受性考察	24
2.2.3 基于乳酸浓度变化的代谢进化研究	28
2.2.4 乳酸驯化菌株的底物、产物耐受性考察	29
2.2.5 分批发酵考察	33
2.3 本章小结	35
第三章 菌体生长水平的提高及其对乳酸发酵的影响	37
3.1 材料与方法	37
3.1.1 菌种	37
3.1.2 主要试剂	37
3.1.3 主要仪器设备	37
3.1.4 培养基	37
3.1.5 实验方法	39
3.1.6 分析方法	39
3.1.7 发酵参数	39
3.2 结果与讨论	39
3.2.1 不同种类、浓度的金属离子对菌体生长的影响研究	39
3.2.2 pH 调节液对菌体生长及发酵水平的影响	45
3.3 本章小结	48
第四章 利用纤维床生物反应器固定化菌体发酵乳酸的研究	49
4.1 材料与方法	49
4.1.1 菌种	49
4.1.2 主要试剂	49
4.1.3 主要仪器设备	49
4.1.4 培养基	49
4.1.5 实验方法	50
4.1.6 分析方法	50
4.1.7 发酵参数	51

4.2 结果与讨论	51
4.2.1 纤维床生物反应器的构建	51
4.2.2 细胞固定化过程	53
4.2.3 分批发酵	54
4.2.4 补料分批发酵	55
4.2.5 连续重复分批发酵	57
4.3 本章小结	58
第五章 总结与展望	60
5.1 总结	60
5.2 展望	61
参考文献	62
硕士在读期间发表论文	68
致 谢	69

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction of lactic acid.....	1
1.1.1 Structure and properties of lactic acid	1
1.1.2 Application of lactic acid.....	2
1.1.3 Lactic acid production methods.....	4
1.1.4 Production profile and needs of lactic acid	6
1.2 Advances in lactic acid fermentation.....	7
1.2.1 Strains	7
1.2.2 Metabolic pathways of lactic acid	8
1.2.3 Advances in lactic acid fermentation.....	9
1.3 Biodiesel and raw glycerol.....	13
1.3.1 Introduction of biodiesel.....	13
1.3.2 Application of raw glycerol.....	14
1.4 Advances in microbial conversion of raw glycerol.....	15
1.4.1 Dihydroxyacetone produced from raw glycerol.....	15
1.4.2 1,3-propanediol produced from raw glycerol.....	15
1.4.3 Hydrogen produced from raw glycerol	16
1.4.4 Lactic acid produced from raw glycerol.....	16
1.5 Metabolic evolution	17
1.6 Contents and purpose of the thesis	17
Chapter 2 Studies on metabolic evolution of <i>Lactobacillus pentosus</i>	19
2.1 Materials and methods.....	19
2.1.1 Microorganism.....	19
2.1.2 Experimental reagents	19
2.1.3 Experimental instruments	20
2.1.4 Culture media	20
2.1.5 Experimental methods	21

2.1.6 Analytical methods	21
2.1.7 Fermentation parameters	23
2.2 Results and Discussion	23
2.2.1 Research of metabolic evolution based on different concentrations of raw glycerol	23
2.2.2 Studies on substrate and product tolerance of strains domesticated by raw glycerol	24
2.2.3 Research of metabolic evolution based on different concentrations of lactic acid	28
2.2.4 Studies on substrate and product tolerance of strains domesticated by lactic acid	29
2.2.5 Batch culture.....	33
2.3 Summary	35
Chapter 3 Studies on cells growth and lactic acid fermentation.....	37
3.1 Materials and Methods	37
3.1.1 Microorganism.....	37
3.1.2 Experimental reagents	37
3.1.3 Experimental instruments	37
3.1.4 Culture media	37
3.1.5 Experimental methods	39
3.1.6 Analytical methods	39
3.1.7 Fermentation parameters	39
3.2 Results and Discussion	39
3.2.1 Effects of metal ions on cells growth	39
3.2.2 Effect of pH control strategy on cells growth and lactic acid fermentation	45
3.3 Summary	48
Chapter 4 Production of lactic acid with immobilized cells in fibrous bed bioreactor.....	49
4.1 Materials and Methods	49
4.1.1 Microorganism.....	49
4.1.2 Experimental reagents	49
4.1.3 Experimental instruments	49
4.1.4 Culture media	49

4.1.5 Experimental methods	50
4.1.6 Analytical methods	50
4.1.7 Fermentation parameters	51
4.2 Results and Discussion	51
4.2.1 Construction of fibrous bed bioreactor	51
4.2.2 Process of cell immobilization	53
4.2.3 Batch culture	54
4.2.4 Fed-batch culture	55
4.2.5 Repeated-batch culture	57
4.3 Summary	58
Chapter 5 Conclusions and prospects	60
5.1 Conclusions	60
5.2 Prospects	61
Reference	62
Publications	68
Acknowledgments	69

第一章 文献综述

1.1 乳酸研究概况

1.1.1 乳酸的结构与性质

乳酸，英文名 Lactic Acid，学名为 α -羟基丙酸(α -hydroxypropionic acid)，分子式为 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ ，1780 年由瑞典科学家席勒(Scheele)首次从废乳中发现^[1]，是一种天然存在的有机酸，广泛存在于人体、动植物和微生物中^[2]。

乳酸的相对分子量是 90.08，能与水以互溶，且不结晶，60%以上浓度的乳酸具有很强的吸湿性。纯净无水的乳酸是白色晶体，熔点是 $16.89\text{ }^\circ\text{C}$ ，沸点是 $122\text{ }^\circ\text{C}$ ， $25\text{ }^\circ\text{C}$ 时相对密度约为 1.206 ^[3]。乳酸通常为无色透明或浅黄色糖浆状的粘稠液体，几乎无臭或微带有脂肪酸味，能与水、乙醚、乙醇、甘油、丙二醇、丙酮混溶，几乎不溶于氯仿、二硫化碳、石油醚和苯。根据需求和用途的不同，乳酸成品可分为工业级、食品级和药典级。

乳酸分子中有一个手性碳原子，因此具有旋光性。根据旋光性不同，乳酸有两种旋光异构体，即 *L*-和 *D*-乳酸，其分子结构如图 1-1 所示^[4]。*L*-乳酸为右旋性，*D*-乳酸为左旋性，*DL*-乳酸则为外消旋。

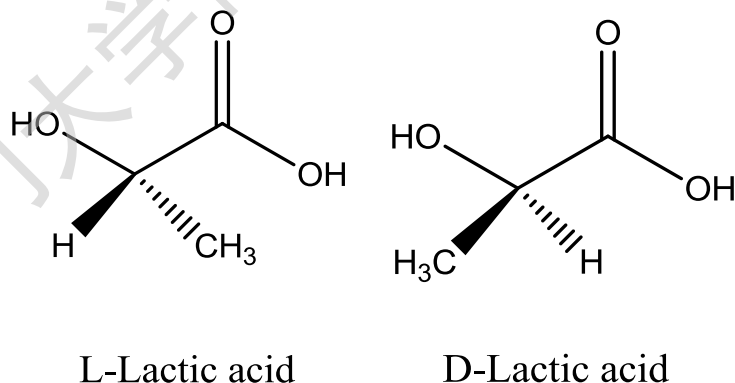


图 1-1 乳酸的旋光异构体

Fig. 1-1 Optical monomers of lactic acid

由于人体内只含有代谢 *L*-乳酸所需的 *L*-乳酸脱氢酶，故 *L*-乳酸能在人体内能正常代谢分解，而高浓度的 *D*-乳酸对人体是有害的。因此世界卫生组织限制人体每天摄入的 *D*-乳酸量应该在 100 mg/kg 以下，且 *D*-和 *DL*-乳酸不应加入到三个月以下婴儿的食品中^[5]。

1.1.2 乳酸的应用

乳酸是一种古老而重要的有机酸，被公认为三大有机酸之一，它的用途极其广泛。乳酸及其盐类和衍生物可用于食品、医药、化妆品工业、农业等多个领域。

1.1.2.1 食品工业

目前约 60% 乳酸用于食品工业。由于乳酸酸性柔和且稳定，有助于改善食品风味，在食品工业上乳酸被广泛用作酸味剂、风味剂、防腐剂和还原剂^[6]。在美国和西欧，乳酸有取代柠檬酸的趋势，作为广泛用于软饮料生产的酸味剂。目前，在啤酒行业，已改用乳酸调节麦芽汁的 pH，这既有利于酵母发酵、提高啤酒质量，又能增加啤酒风味、延长保质期。世界上大约有四分之一的乳酸被用来生产硬脂酰乳酸盐，大量运用于面包加工，不但能使面包质地松软、细腻，而且还可延长面包保质期^[7]。

1.1.2.2 医药行业

乳酸可直接配制成药物，一定浓度的乳酸还可作为消毒剂^[8]，其盐类如 *L*-乳酸铁、*L*-乳酸钠、*L*-乳酸钙还是补充金属元素的良好药品。乳酸亲水性强，能溶解蛋白质、角质和许多难溶药物，且对病变组织相当敏感，既可以增加药物吸收量，又能减少副作用。此外，乳酸及其酯类是价格较为低廉的常用手性起始物，目前已用于合成具有光学活性的医药和农药^[9]，其中乳酸乙酯还可作为压制药片的润滑剂。

1.1.2.3 可降解材料

大量使用和消耗以石油为原料合成的塑料聚合物有悖于目前所倡导的节能减排、低碳生活与可持续发展，尤其是塑料废弃物已成为威胁全球环境的主要因素之一，为解决白色污染对环境造成的污染问题，许多国家已开始大力研究、生产和使用可降解塑料^[10]。经过大量的研究发现，以乳酸为原料合成的聚乳酸（PLA）具有很好的生物可降解性^[11]，这种高分子材料不但具有良好的热塑性和化学惰性，还有良好的生物相容性，被广泛用于制造人造皮肤、人造骨骼、手术缝合线、手术骨钉或包装材料、纺织面料、农用地膜、日用塑料制品、地毯、家用装饰品等物品^[12]。

乳酸充分脱水后可形成聚乳酸^[13]。聚乳酸也称为聚丙交酯，大多经由两步法生产，首先使乳酸生成环状二聚体丙交酯，然后再开环缩聚成聚乳酸，其

反应过程如图 1-2 所示^[14]。丙交酯($C_6H_8O_4$)是合成聚乳酸的中间体, 分为 *D*-、*L*-和 *DL*-丙交酯, 而且其构型决定了聚乳酸的性能^[15,16]。高纯度的 *L*-聚乳酸[poly(*l*-lactide)]和 *D*-聚乳酸[poly(*d*-lactide)]被认为有一个均衡的晶体熔点(equilibrium crystalline melting point), 晶体熔点约为 207 °C。而当 *L*-聚乳酸与 *D*-聚乳酸混合形成共混聚合物时, 该共混聚合物的熔解温度高达 230 °C, 且机械性能更佳^[17,18]。

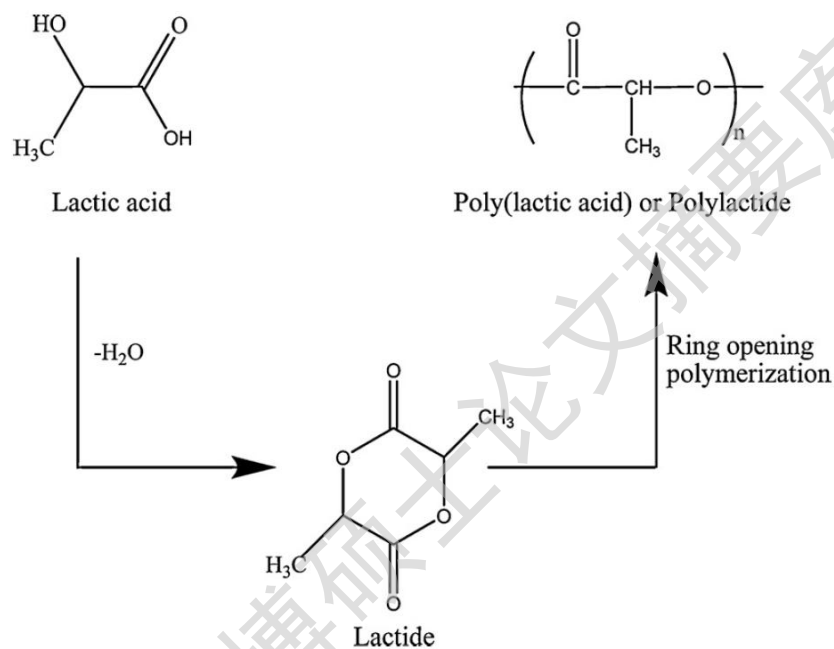


图 1-2 聚乳酸生成过程

Fig. 1-2 Reaction schemes to produce PLA

1.1.2.4 其它应用

乳酸是一种重要的平台化合物 (platform chemicals), 由于其含有一个羟基和一个羧基, 可以参与许多衍生的化学反应, 例如氧化反应、还原反应、缩合反应和酯化反应等, 故将会有越来越大量的乳酸被应用于生产可生物降解聚合物、有机环保溶剂及含氧化合物 (oxygenated chemicals) 等乳酸基化合物 (Lactic acid-based products)。如图 1-3 所示, 这些潜在的乳酸基化合物有广阔的市场和巨大经济价值, 2006 年全球市场销量就达到 980 万吨, 销售额高达 219 亿美元^[19]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库