



文章编号:1006-3080(2011)05-0521-03

## 一株高耐受性乳酸菌的分离及其在木质纤维素 发酵生产高浓度 L-乳酸中的应用

楚德强, 赵凯, 吴倩, 陶泰河, 鲍杰

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:**利用资源丰富的纤维质原料生产新一代可降解聚乳酸塑料的单体原料 L-乳酸,是目前一个极为重要的研究热点和产业方向。从高温纤维乙醇发酵介质中分离到一株高耐受性乳酸菌,经 16S rDNA 分子生物学鉴定为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),并命名为 *P. acidilactici* DQ2。此菌株具有极为优异的耐高温和耐受高浓度木质纤维素降解产物的特性,这一特性可能与母株的环境变异和体系中存在的调控物质有关。利用该乳酸菌以稀酸预处理后的玉米秸秆为原料进行同步糖化与乳酸发酵,发酵液中的乳酸质量浓度为 75 g/L,乳酸对纤维素得率达到 0.63 g/g,具备了纤维素乳酸产业化生产的潜力。

**关键词:**L-乳酸; *Pediococcus acidilactici* DQ2; 玉米秸秆; 同步糖化与发酵

**中图分类号:**Q93;TQ921.3

**文献标志码:**A

## Isolation of a Highly Tolerant Lactic Acid Bacterium and High-Titer L-Lactic Acid Fermentation Using Lignocellulosic Feedstock

CHU De-qiang, ZHAO Kai, WU Qian, DAO Thai-ha, BAO Jie

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of  
Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Production of L-lactic acid from abundant lignocellulosic resource has become an important trend for research and commercialization because poly-lactic acid (PLA) from L-lactic acid is regarded as the next generation biodegradable plastic. A highly tolerant lactic acid bacterium (LAB) was isolated from the cellulosic ethanol fermentation broth at elevated temperature and identified as *Pediococcus acidilactici* using 16S rDNA and phylogenetic analysis. *P. acidilactici* DQ2 is high thermotolerance and high resistance to the lignocellulose derived inhibitors. These characteristics probably are associated with environmental mutation and stimulating factors naturally present in the lignocellulosic hydrolysate system. The titer and yield of L-lactic acid in the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using the diluted acid pretreated corn stover (CS) were 75 g/L and 0.63 g/g cellulose, respectively, and showed a great potential for cellulosic lactic acid production for the future commercial application.

**Key words:** L-lactic acid; *Pediococcus acidilactici* DQ2; corn stover; simultaneous saccharification

收稿日期:2011-08-26

基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划(2011CB707406);国家自然科学基金(20976051);教育部博士点基金(20090074110013)

作者简介:楚德强(1982-),男,河南洛阳人,博士生,主要从事木质纤维素生物转化方向的研究。

通讯联系人:鲍杰,E-mail:jbao@ecust.edu.cn

fermentation (SSF)

以乳酸为单体聚合生成的聚乳酸具有优良的特性,是替代聚乙烯和聚丙烯等石化基塑料的新一代生物可降解塑料<sup>[1]</sup>。目前,95%的聚乳酸单体 L-乳酸是通过粮食淀粉的发酵生产的<sup>[2]</sup>。现在采用粮食原料深加工生产大宗化学品的技术路线已经受到了国家政策的遏制。因此,利用资源丰富的农作物秸秆类纤维质为原料,通过生物加工路线生产 L-乳酸是一个极为重要的研究热点和产业方向。目前国内外以木质纤维素为原料生产乳酸处于实验室阶段,技术指标远低于产业化要求,尚不具备进行工业应用的价值<sup>[3]</sup>。

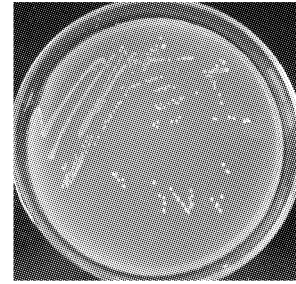
乳酸发酵生产成本的 70% 来自发酵原料<sup>[4]</sup>,因此以具有丰富来源的低成本纤维素原料生产乳酸具有重大的意义。然而,纤维素原料生产乳酸面临许多挑战,包括原料结构的抗降解性,纤维素预处理降解产生抑制物的毒害,纤维素酶的有效性和成本,高基质和高产物浓度的实现,特别是发酵微生物在纤维素原料中需要强的存活能力和高的耐受性<sup>[4-5]</sup>。

本文在玉米秸秆原料高温同步糖化发酵生产乙醇的过程中,分离到一株能够高效发酵的高温乳酸菌;用 16S rDNA 方法对乳酸菌进行了分子鉴定,并把其用于玉米秸秆为原料的乳酸发酵。结果表明新获得的乳酸菌具有极为优异的耐高温性能和耐受木质纤维素降解产物特性,以预处理的玉米秸秆为原料,同步糖化与乳酸发酵过程中乳酸在发酵液中的质量浓度为 75 g/L,乳酸对纤维素得率达到 0.63 g/g,已经具备纤维素乳酸产业化生产的潜力。

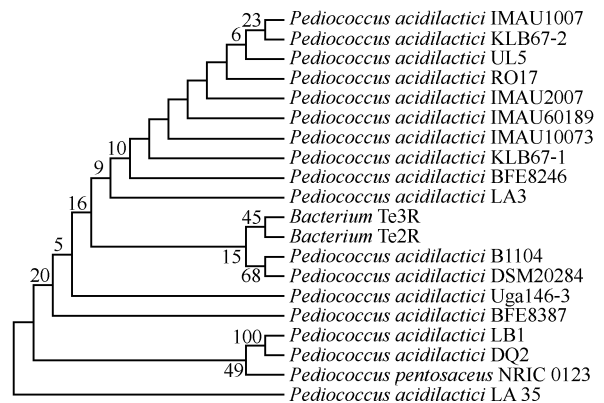
## 1 乳酸菌的分离与 16S rDNA 分子生物学鉴定

木质纤维素原料经预处理后降解产生的各类抑制物,对纤维素酶的活性和微生物代谢产生抑制作用。因此,本实验中采用生物脱毒的方式脱除这些抑制物<sup>[6]</sup>。用脱毒玉米秸秆进行乙醇发酵,并对乙醇发酵醪液进行了 YPD(葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母粉 10 g/L,琼脂粉 15 g/L)平板分离,分别在 25,37,42 °C 培养,均有微生物长出而且菌落形态单一。经过多代富集和纯化培养,获得单一的微生物菌落,见图 1(a)。根据菌株 16S rDNA 序列进行系统发育分析,用 MEGA 4 软件中的 Kimura 2-parameter 模型计算进化距离,用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树,见图 1(b)。根据菌落形态以

及与 NCBI(美国国立生物技术信息中心)核苷酸数据库中 *Pediococcus acidilactici* 序列有 99.9% 相似性,获得的菌株被鉴定为乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*,并命名为 *P. acidilactici* DQ2。



(a) Morphology of the isolated bacterium



(b) Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

图 1 从木质纤维素发酵体系中获得的乳酸菌的微生物形态和鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of the lactic acid bacterium from lignocellulose fermentation system

## 2 *P. acidilactici* DQ2 发酵玉米秸秆生产乳酸

以玉米秸秆(CS)为原料进行同步糖化发酵的原料稀酸预处理、生物脱毒、生物反应器的方法和应用见文献[6-8]。玉米秸秆发酵在配有螺带桨的 5 L 发酵罐中进行,发酵体系约 2.5 L,固体秸秆质量分数 25%,纤维素酶活 15 FPU/g(干重),pH 5.5,首先在 48~50 °C 预糖化 12 h,接种乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 发酵。MRS 培养基乳酸发酵在 3 L 发酵罐进行,培养基装量 1.5 L,pH 5.5,发酵温度均为 48 °C,实验结果见图 2。发酵 8 h 后初始积累的葡萄糖迅速消耗,乳酸开始大量生成;36 h 后纤维素糖化成为限制步骤,乳酸增加缓慢,浓度趋于稳

定,最终乳酸质量浓度为 75.3 g/L,乳酸基于秸秆中的纤维素得率为 0.63 g/g。相近糖浓度的 MRS 培养基<sup>[9]</sup>在发酵罐中发酵时,*P. acidilactici* DQ2 发酵进行非常缓慢,发酵 72 h 时还残留 72% 的初始葡萄糖,乳酸质量浓度仅为 20 g/L。*P. acidilactici* DQ2 在利用木质纤维素原料发酵时的表现明显优于用合成 MRS 培养基,它是一株典型的木质纤维素依赖型菌株。以玉米秸秆为原料同步糖化发酵产乳酸,未见类似高浓度和得率的报道<sup>[10]</sup>。乳酸菌有各种各样的来源,不同来源的微生物生理性能差异很大。一般来说,来源于某栖息地的微生物,就在对应的栖息地环境下生长能力会更强,这可能是因为微生物在对应条件下更容易利用基质和营养物质<sup>[11]</sup>,也可能是微生物的基因在环境诱导下发生适应性变化<sup>[12]</sup>。*P. acidilactici* DQ2 分离于生物脱毒的玉米秸秆,自然能够耐受这种环境,因而同步糖化发酵秸秆过程,微生物存活能力强,延滞期短,乳酸发酵迅速。纤维素原料如秸秆在生长过程不仅合成大量的碳水化合物,同时也积累了氮、钾以及镁、锰、钙等微量金属元素<sup>[13]</sup>,预处理后转化为复杂的营养基质,为乳酸菌的生长和发酵提供了多种营养补给和刺激因素。

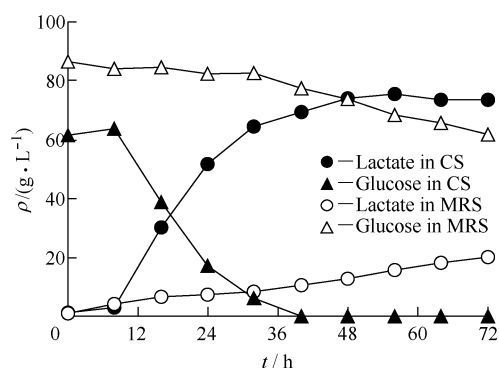


图2 *P. acidilactici* DQ2 在秸秆和 MRS 中的乳酸发酵  
Fig. 2 *P. acidilactici* DQ2 for lactate production using corn stover (CS) and MRS medium as substrates

### 3 结 论

本文从玉米秸秆乙醇发酵体系中分离到一株高耐受性乳酸菌,经 16S rDNA 和微生物形态鉴定为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),该菌株具有高温厌氧发酵、高耐受木质纤维素环境、耐受高产物浓度、对营养需求低等优势。在以玉米秸秆为原料的木质纤维素同步糖化与乳酸发酵过程中,乳酸质量浓度和收率分别达到 75 g/L 和 0.63 g/g,已经具备纤维素乳酸产业化生产的潜力。

### 参考文献:

- [1] Saara I, Minna H, Ann-Christine A, *et al.* From lactic acid to poly(lactic acid) (PLA): Characterization and analysis of PLA and its precursors [J]. *Biomacromolecules*, 2011, **12**(3): 523-532.
- [2] Jem K, Van der Pol J, de Vos S. Microbial lactic acid, its polymer poly(lactic acid), and their industrial applications [J]. *Microbiology Monographs*, 2010, **14**: 323-346.
- [3] Okano K, Tanaka T, Ogino C, *et al.* Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **85**(3): 413-423.
- [4] Yadav A K, Chaudhari A B, Kothari R M. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: An industrial view [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, **31**(1): 1-19.
- [5] Chundawat P S, Beckham G T, Himmel M E, *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals [J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, **2**(1): 121-145.
- [6] Zhang Jian, Zhu Zhihan, Wang Xiaofeng, *et al.* Biotoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, **3**: 26.
- [7] Zhang Jian, Wang Xiusheng, Chu Deqiang, *et al.* Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(6): 4480-4488.
- [8] Zhang Jian, Chu De Qiang, Huang Juan, *et al.* Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, **105**(4): 718-728.
- [9] DeMan J C, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1960, **23**(1): 130-135.
- [10] John R P, Anisha G S, Nampoothiri K M, *et al.* Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, **27**(2): 145-152.
- [11] Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, *et al.* Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, **144**(2): 270-279.
- [12] Siezen R J, Tezeneva V A, Castioni A, *et al.* Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches [J]. *Environmental Microbiology*, 2010, **12**(3): 758-773.
- [13] Perry A. Cellulosic ethanol from corn stover: Calculating and improving the bottom line [J]. *Agricultural Research Magazine*, 2008, **56**(9): 14-15.