

环保与安全

用乳酸细菌从有机废弃物生产乳酸

王旭明 汪群慧 马鸿志 孙丽欣 任南琪

(哈尔滨工业大学环境科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:探讨了有机废物乳酸发酵的影响因素,包括菌种、营养物质、产物抑制、氧气和发酵方式,概述了利用含碳水化合物的有机废弃物和厨房垃圾生产乳酸的现状,并对未来的研究方向提出了展望。指出在厌氧条件下应用同型发酵乳酸细菌,采用原位产物分离技术和细胞再循环发酵通常会提高乳酸的产量;采取多菌种的联合发酵并优化提取工艺,将有助于实现有机废物工业化生产乳酸。

关键词:乳酸细菌;发酵;有机废弃物;厨房垃圾

中图分类号:TQ921.3

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2003)11-0050-04

Production of lactic acid from organic wastes using lactic acid bacteria

WANG Xu-ming, WANG Qun-hui, MA Hong-zhi, SUN Li-xin, REN Nan-qi

(Department of Environmental Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The fermentative production of lactic acid (LA) with organic wastes is one of the effective solutions in wastes recycling. Several factors affecting the fermentative LA production with lactic acid bacteria (LAB) were discussed, including microorganism, nutrient substrate, end-product inhibition, and oxygen. Furthermore, the status quo of the production of lactic acid with starchy and cellulosic and kitchen wastes was summarized and the tendencies of future research and development were indicated. Meanwhile it was pointed out that with homofermentative LAB, recirculation of cells and in situ production removal (IS-PR) technology under anaerobic condition, LA yield could be increased and co-inoculation of various LAB with the optimizing LA separation technique could help to the industrialization of LA production with organic wastes.

Key words: lactic acid bacteria; fermentation; organic waste; kitchen waste

乳酸是一种需求量仅次于柠檬酸的重要有机酸,广泛应用于食品、医药、皮革、纺织等工业领域。由乳酸单体聚合得到的聚乳酸,以良好的可生物降解性、生物相容性及优良的使用特性而被公认为是取代传统塑料的理想材料,现已商业性用作医学工程材料如接骨棒(钉)、免拆线的外科手术缝合线和药物缓释剂等^[1]。

目前,全世界乳酸年产量约为 10 万 t,其中约 90% 是用乳酸细菌发酵生产的,其余 10% 采用化学合成法^[2]。发酵法生产乳酸的优点在于,通过选择适宜的菌种和发酵底物并控制一定的发酵条件,可

得到特定的旋光异构体,而用化学合成法只能得到外消旋体。利用含丰富碳水化合物的有机废弃物发酵生产乳酸,不但可以解决废弃物的资源化问题,还能降低乳酸的生产成本,因此具有广阔的开发前景,也逐渐成为国内外的研究热点^[3-4]。

1 乳酸细菌与乳酸的工业生产**1.1 乳酸细菌**

乳酸细菌并非细菌分类学上的名词,而是对一类能利用可发酵性糖产生大量乳酸的细菌的通称。目前在自然界中已发现的这类细菌在分类学上至少

收稿日期:2003-06-03;修回日期:2003-08-13

基金项目:国家自然科学基金委员会与中国节能投资公司联合研究基金(50278024)、哈尔滨工业大学跨学科交叉性研究基金(HIT.MD.2001.32)

作者简介:王旭明(1971-),男,博士生;汪群慧(1959-),女,教授,博导,主要从事固体废物资源化生物技术及环境电化学的研究,通讯联系人,0451-86418414, wangqh59@hit.edu.cn。

划分有 23 个属,包括:乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、气球菌属(*Aerococcus*)、奇异菌属(*Atopobium*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)、芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)中的少数种、环丝菌属(*Brochothrix*)、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)、孪生菌属(*Gemella*)、糖球菌属(*Saccharococcus*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、酒球菌属(*Oenococcus*)、乳球形菌属(*Lactosphaera*)、营养缺陷菌属(*Abiotrophia*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)^[2,5]。

大多数乳酸细菌兼性厌氧,接触酶阴性,不运动,具有高度的耐酸性,可以在 pH ≤ 5 的酸性环境中生存。由于它们合成氨基酸和维生素,尤其是 B 族维生素的能力差,所以其营养要求比较苛刻。这类细菌常常存在于营养丰富的环境中,如植物、牛奶、人和动物体内。

1.2 乳酸发酵的影响因素

1.2.1 菌种

根据乳酸细菌代谢葡萄糖的方式,可将乳酸发酵分为 3 种类型,即同型乳酸发酵、异型乳酸发酵和双歧发酵途径。其中同型发酵的末端产物只有乳酸一种,理论上乳酸的转化率可达 100%;而另外 2 种发酵类型的乳酸转化率只有 50%。因此应选择同型乳酸发酵的菌种用于乳酸的生产。

在工业生产上,以乳杆菌的应用最多,这是因为它具有生长速率快、乳酸产率高、耐酸能力强等优点,其中以德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)的发酵产率最高,因此应用也最多。此外链球菌属(*Streptococcus*)中的某些种以及凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)等也具有较高的乳酸转化率^[6]。除了乳酸细菌之外,霉菌中的米根霉(*Rhizopus oryzae*)也是一种工业上常用的乳酸生产菌^[7-8]。其优点是只产 L-乳酸,营养要求简单。但因其为好氧菌须通气搅拌,所以耗能大,而且糖转化率偏低^[9]。

1.2.2 营养物质

乳酸细菌能利用的碳源主要是葡萄糖等单糖和一些寡糖。不同种类的乳酸细菌对不同碳源的利用能力也不同,通常以葡萄糖为碳源时可以得到更高的乳酸产量,而木糖、半乳糖、阿拉伯糖、乳糖、麦芽

糖等的乳酸转化率较低。但 McCaskey 等^[10]用 1 株乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)发酵甘露糖时,可以得到比葡萄糖作底物时更高浓度的乳酸。德氏乳杆菌(*Lb. delbrueckii*)在有葡萄糖和果糖作底物时,产乳酸的效率会高于只有葡萄糖一种底物的发酵,而鼠李糖乳杆菌(*Lb. rhamnosus*)的情况正好与之相反^[2]。以上结果表明要根据不同的菌种选择适宜的碳源,不能一概而论。

乳酸细菌需要氨基酸和维生素作为氮源和生长因子,因此发酵工业上为了获得更高的乳酸产量,必须加入这类底物。很多研究表明,酵母提取物的效果最好^[11],但因价格方面的原因限制了酵母提取物在乳酸发酵工业上的应用。Tejayadi 等^[12]应用保加利亚乳杆菌(*Lb. bulgaricus*)发酵乳清生产乳酸,当使用 10 g/L 的酵母提取物作氮源时,酵母提取物成本就占了生产成本的 38%。

1.2.3 产物抑制作用

乳酸的产生会使环境的 pH 值降低,对乳酸细菌的活性和乳酸的产生都有严重的抑制作用。Hofvendahl 等^[6]发现乳酸乳球菌(*Lc. lactics*)发酵全麦面粉 24 h 后,pH 值由最初的 5.85 降至 3.2,只得到 3.3 g/L 的 L-乳酸;当控制 pH 值在 6.0 时,可得到 96 g/L 的 L-乳酸。此外还发现,随着 pH 值的降低,乳球菌会产生 3% ~ 6% 的 D-乳酸,影响产品的光学纯度,这是 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶的最适 pH 值不同造成的。

为了减轻产物抑制作用,提高乳酸产量,发酵工业中人们常在发酵液中加入 CaCO₃ 等作中和剂,在发酵结束后用钙盐结晶得到乳酸钙,再将乳酸钙用硫酸酸化,从而分离出乳酸。但这一传统工艺的流程长,消耗化工原料多,且产品收率低。通过中和的方法控制 pH 值,虽然能在一定程度上减轻产物抑制,但乳酸盐的产生对发酵仍有抑制作用^[13]。近年来,原位分离技术(in situ production removal, ISPR)受到了广泛关注,它能在线移去发酵产物乳酸,有助于消除产物抑制作用,简化提取工艺,提高产品收率。目前国内外研究较多的原位分离技术有:溶剂萃取法^[14]、离子交换法^[15]、电渗析法等^[16]。

1.2.4 氧气

大多数乳酸细菌为兼性厌氧菌,通常厌氧或减少氧分压有利其生长。Bobillo 等^[17]比较了厌氧和通气条件下,植物乳杆菌(*Lb. plantarum*)的乳酸产

量,证实了通气会使乳酸的产量降低。这可能是因为在有氧存在时,细菌合成丙酮酸脱氢酶系,使丙酮酸部分转化为 CO_2 和乙酰辅酶 A(即乙酰 CoA),从而使乳酸的产量降低^[18]。Roecken^[19]的研究证实了通气量的增加会提高副产物乙酸的产量,但对乳酸的产量却没有影响。

1.2.5 发酵方式

目前最常采用的发酵方式是分批发酵,而采用半连续发酵和连续发酵的还较少。研究表明,分批发酵通常能得到更高的乳酸浓度和产量,而连续发酵通常能得到更高的乳酸体积产率^[20],这可能是由于连续发酵方式中基质的稀释比例高造成的。连续发酵方式可以提高生产效率和设备利用率,减少产物抑制作用。乳酸的转化途径较为简单,应用细胞固定化和细胞再循环技术较为方便。但约有半数的研究表明,应用固定化细胞的乳酸产量低于游离细胞发酵,而应用细胞再循环发酵通常能得到更高的乳酸产量^[2]。

2 利用淀粉、纤维素类有机废物生产乳酸

目前用于乳酸发酵的原料,多为玉米、小麦、大米、马铃薯等农作物的淀粉。从资源有效利用和降低生产成本方面考虑,利用含丰富淀粉及纤维素类的废弃物进行乳酸发酵无疑更具有优势。当前国际上常常采用的有机废物原料主要是农业废弃物(玉米渣、土豆渣、麦糠、麸皮、农作物的秸秆以及废弃的甜菜叶、茎等)。美国最大的聚合物生产企业 Cargill Dow 公司最近已研制成功将玉米渣作为起始原料,商品化生产聚乳酸的技术。Chatterjee 等^[21]利用纤维二糖乳杆菌(*Lb. cellobiosus*)从制作马铃薯沙拉后的残渣中制取乳酸,48 h 后 50% 的淀粉被转化成乳酸。路福平等^[22]应用凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)发酵麸皮水解液,可使乳酸产量最高达 67.8 g/L,其中 L-乳酸占 96% 以上。Garde 等^[3]用戊糖乳杆菌(*Lb. pentosus*)和短乳杆菌(*Lb. brevis*)联合发酵麦秸水解物,可使水解物中 95% 的半纤维素转化为乳酸。无锡轻工业大学金其荣等利用甘蔗渣、玉米粗粉为原料发酵生产乳酸,大幅度降低了乳酸的生产成本。此外还有用于酪工厂的下脚料、面包废弃物以及贝类加工后的废弃物进行乳酸发酵的报道。

利用淀粉及纤维素类物质进行发酵生产乳酸需

要 2 个步骤,首先用酶或酸使原料水解为单糖或双糖,然后才能利用乳酸细菌发酵生产乳酸。目前淀粉酶的生产技术较为成熟,而对产纤维素酶高效菌株的获取是研究的热点之一。应用于纤维素酶生产的菌种主要有木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)的菌种,其中最重要的是里氏木霉(*Tr. reesei*)和黑曲霉(*A. niger*)等。现在研究较多的生产工艺是同时糖化与发酵(simultaneous saccharification and fermentation, SSF),该工艺能明显降低葡萄糖的生成对酶的抑制作用。产物乳酸对纤维素酶也有抑制作用,但抑制强度远低于葡萄糖的生成对酶促反应的抑制作用,这是 SSF 工艺能成功应用于纤维素原料生产乳酸的原因之一^[13]。

由于有些乳酸细菌能产生淀粉酶,所以应用这类细菌发酵淀粉质废弃物,不必进行糖化,可以直接发酵,有利于工艺的简化。已报道能水解淀粉的乳酸细菌包括:植物乳杆菌(*Lb. plantarum*)、明串珠菌(*Leuconostoc* sp.)、嗜酸乳杆菌(*Lb. acidophilus*)、纤维二糖乳杆菌(*Lb. cellobiosus*)、发酵乳杆菌(*Lb. fermentum*)、解淀粉乳杆菌(*Lb. amylolyticus*)、木薯象牙海岸乳杆菌(*Lb. manihotivorans*)、食淀粉乳杆菌(*Lb. amylovorus*)和嗜淀粉乳杆菌(*Lb. amylophilus*)^[23]。其中研究较多的有食淀粉乳杆菌和嗜淀粉乳杆菌,后者利用淀粉只产生 L-乳酸,而前者产生 DL-乳酸,它们不但能水解直链淀粉和支链淀粉,还能水解动物糖原。此外,植物乳杆菌也具有水解糖原的特性。

3 利用厨房垃圾生产乳酸

厨房垃圾是居民在生活消费过程中形成的一种生活废物。随着社会经济的发展和人们生活水平的提高,厨房垃圾的发生量越来越大,仅上海市每天的产生量就达 1 300 余 t^[24]。厨房垃圾中有机成分占 95% 以上,含水分的质分数大于 80%,不适于焚烧处理,且易腐败发臭,其大量排放已严重影响了人们的身体健康和市容环境,因此急需处理厨房垃圾的新技术。

厨房垃圾的处理技术有堆肥、超临界水氧化、真空油炸、制取菌体蛋白饲料等^[24-26]。最近的研究表明,可通过发酵厨房垃圾生产乳酸,进而合成聚乳酸这种可降解性塑料,为厨房垃圾的资源化和降低乳酸的生产成本开辟了一条新的途径^[27]。厨房垃

圾含有约 45% 的碳水化合物, 20% 的蛋白和脂肪, 以及 35% 的蔬菜、水果等, 具有营养丰富, 适合乳酸细菌生长的特点。Sakai 等^[28]发现厨房垃圾的乳酸发酵, 在调整 pH 值为 7 的情况下, 37℃ 发酵 3~5 天, 可得到 27~45 g/L 的乳酸。汪群慧等^[29]研究发现, 通过控制适宜的环境条件, 可使厨房垃圾的发酵产物中乳酸占 95% 左右, 并用分离、提纯得到的乳酸, 成功聚合成了聚乳酸类生物降解塑料。

4 研究展望

利用有机废弃物生产乳酸, 可以降低成本, 实现废物的资源化, 无论从资源的有效利用还是环境保护方面都具有重要的意义。应从以下几个方面进行深入研究:

(1) 筛选高效乳酸细菌, 通过遗传改造以及不同菌种的有机组合提高乳酸产率。性状优良的菌种是发酵工业的关键, 对于乳酸发酵应选择营养要求简单、耐酸能力强的菌种。通过遗传工程技术改造现有菌种, 提高产乳酸的能力。已有研究表明, 发生突变的 1 株德氏乳杆菌产乳酸能力高于野生型的菌种^[30]。有机废弃物成分复杂, 单一菌种的发酵难以充分利用其中的有用成分, 多菌种的联合发酵将有助于提高原料的转化率。

(2) 优化提取工艺。乳酸的提取一直是乳酸生产的关键环节之一, 尤其以有机废弃物为原料时, 其中的复杂组分会使发酵产物的杂质增多, 这更增加了乳酸提取的难度。

(3) 扩大原料来源。目前应用农业废弃物生产乳酸的研究较多; 而厨房垃圾、有机污泥等作为发酵原料只有日本做了一些工作, 在我国尚属空白。这些有机垃圾造成的污染严重, 传统的处理方法如填埋、堆肥等不能充分利用其中的有用成分, 因此用于生产乳酸及生物降解塑料等高附加值的产品具有广阔的前景。

参考文献

- [1] 唐赛珍, 陶欣. [J]. 现代化工, 2002, 22(1): 2-8.
- [2] Hofvendahl K, Hagerdal-Hahn B. [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(2): 87-107.
- [3] Garde A, Jonsson G, Schmidt A S, et al. [J]. Bioresource Technology, 2002, 81(3): 217-223.
- [4] Sreenath H K, Moldes A B, Koegel R G, et al. [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(3): 179-184.
- [5] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 1-5.
- [6] Hofvendahl K, Hagerdal-Hahn B. [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20(4): 301-307.
- [7] 白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 等. [J]. 现代化工, 2002, 22(6): 9-13.
- [8] Yin P, Yahiro K, Ishigaki T, et al. [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(1): 96-100.
- [9] 陈育如, 夏黎明, 岑沛霖. [J]. 高校化学工程学报, 2000, 14(5): 437-444.
- [10] McCaskey T A, Zhou S D, Britts N, et al. [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1994, 45/46: 555-563.
- [11] Kotzamanidis C h, Roukas T, Skaracis G. [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18(5): 441-448.
- [12] Tejayadi S, Cheryan M. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43(2): 242-248.
- [13] Iyer P V, Lee Y Y. [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(5): 371-373.
- [14] Jarvinen M, Myllykoski L, Keiski R, et al. [J]. Bioseparation, 2000, 9(3): 163-166.
- [15] Sosa A V, Ochoa J, Perotti N I. [J]. Bioseparation, 2000, 9(5): 283-289.
- [16] Mathieu B. [J]. Desalination, 2002, 144(1-3): 157-162.
- [17] Bobillo M, Marshall V M. [J]. Food Microbiol, 1991, 8(2): 153-160.
- [18] de Vos W M. [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70(3): 223-242.
- [19] Roecken W. [J]. Adv Food Sci, 1996, 18(2): 212-216.
- [20] Zayed G, Winter J. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44(3/4): 362-366.
- [21] Chatterjee M, Chakrabarty S I, Chattopadhyay B D, et al. [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(9): 873-874.
- [22] 路福平, 戚薇, 王进华, 等. [J]. 天津轻工业学院学报, 1998, (2): 10-14.
- [23] Vishnu C, Seenayya G, Reddy G. [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18(5): 429-433.
- [24] 赵山才, 柴晓利. 生活垃圾资源化原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 358-368.
- [25] 孙晓红, 汪群慧, 孟令辉, 等. [J]. 现代化工, 2003, 23(5): 48-52.
- [26] Ghanem I I I, Gu Guowei, Zhu Jinfu. [J]. Renewable Energy, 2001, 23(3/4): 673-684.
- [27] Wang Q H, Narita J, Xie W M, et al. [J]. Bioresource Technology, 2002, 84(3): 213-220.
- [28] Sakai K, Murata Y, Yamazumi H, et al. [J]. Food Sci Technol Res, 2000, 6(2): 140-145.
- [29] Wang Q, Yamabe K, Narita J, et al. [J]. Process Biochemistry, 2001, 37(4): 351-357.
- [30] Demirci A, Pometto A L III. [J]. J Ind Microbiol, 1992, 11(1): 23-28. ■