

一株仅产L-乳酸的乳酸乳球菌发酵培养基的优化

周 颖, 高晓峰, 周 晶, 霍贵成*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 为了研究一株分离自新疆牧民家庭自制酸马奶中的乳酸乳球菌KLDS 4.0325产L-乳酸的能力, 以L-/D-乳酸试剂盒验证该菌种在发酵过程中所产L-乳酸的光学纯度为100%。利用Plackett-Burman设计法对影响该菌株发酵的培养基主要组分进行筛选, 确定影响L-乳酸产量的主要因素为蔗糖、酵母粉、K₂HPO₄。在此基础上, 采用响应面法优化发酵培养基的组成, 结果表明: 当蔗糖添加量为102.9 g/L、酵母粉添加量为2.5 g/L、K₂HPO₄添加量为7.9 g/L时, L-乳酸产量最大, 可达86.6 g/L, 在最优发酵条件下获得的实测值与模型预测值(86.3 g/L)吻合, 说明所建立的模型是切实可行的。

关键词: L-乳酸; 光学纯度; 乳酸乳球菌KLDS 4.0325; 响应面法

Optimization of Fermentation Medium of *Lactococcus lactis* for Only L-Lactate Production

ZHOU Ying, GAO Xiaofeng, ZHOU Jing, HUO Guicheng*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: *Lactococcus lactis* KLDS 4.0325, a strain isolated from home-made koumiss in Xinjiang, China, was studied for L-lactic acid production. The optical purity of the produced lactic acid was estimated to be 100% L-lactic acid using L/D-lactic acid enzymatic test kit. The Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of medium components on lactate production. On the basis of statistical regression analysis, yeast extract, sucrose and K₂HPO₄ were found to be the most important factors. Subsequently, response surface methodology was employed to determine the maximum lactate production at the optimum concentrations of key factors. The lactate production was found to correlate to the three parameters. The optimal levels of medium components were determined as 2.5 g/L yeast extract, 102.9 g/L sucrose and 7.9 g/L K₂HPO₄. The predicted yield of lactate using the optimized medium was 86.3 g/L, and the actual experimental result was 86.6 g/L.

Key words: L-lactate; optical purity; *Lactococcus lactis* KLDS 4.0325; response surface methodology

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 09-0084-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201509016

乳酸(2-羟基丙酸)是一种天然有机酸, 由于其在食品、化妆品、医药及化工产业有重要的应用而得到广泛关注^[1]。与消旋的DL-乳酸相比, 高光学纯度的乳酸同分异构体(L-乳酸和D-乳酸)具有更高的工业价值^[2]。由于人和动物体内只有代谢L-乳酸的酶, 摄入过量D-乳酸会引起代谢紊乱甚至中毒^[3]。与此同时, 工业生产的乳酸70%用于食品行业, 主要用于酸奶和奶酪的生产以及食品防腐^[4]。综上所述, 光学纯度较高的L-乳酸具有更广阔的应用前景。

全世界绝大部分乳酸的生产是通过发酵合成的^[2]。乳酸生物合成的关键是同型发酵细菌, 它们通常产生L-乳酸和D-乳酸的混合物^[5]。而本实验研究的乳酸乳球菌KLDS 4.0325属于同型发酵, 仅分泌L-乳酸且产量较高, 因此具有相当的工业化生产L-乳酸的潜力^[6]。

乳酸乳球菌KLDS 4.0325是由东北农业大学乳品科学

教育部重点实验室从中国新疆牧民家庭自制的酸马奶中分离得到的一株乳酸乳球菌, 经相关基因(GenBank登录号: 552063405)分析研究显示, 该菌种中只含有编码L-乳酸脱氢酶的基因序列, 而不含有编码D-乳酸脱氢酶的基因序列。目前, 关于乳酸乳球菌生产乳酸的研究较少, 而关于只产L-乳酸的乳酸乳球菌的研究更少。本研究希望验证该菌种能够仅合成L-乳酸而不合成D-乳酸, 并通过响应面法优化L-乳酸发酵培养基, 从而为工业化生产提供一株可供选择的仅产L-乳酸的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

乳酸乳球菌KLDS 4.0325由东北农业大学乳品科

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA100902; 2012AA022108)

作者简介: 周颖(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: zhouyingpp@yeah.net

*通信作者: 霍贵成(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: gchuo58@126.com

学教育部重点实验室乳品工业微生物菌种保藏中心 (KLDS-DICC) 提供。

1.1.2 试剂

L-乳酸标准样品 美国Sigma公司; *L*-/*D*-乳酸检测试剂盒 爱尔兰Megazyme公司; 酵母粉 英国Oxoid公司; 蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏 北京奥博星生物技术公司。

1.1.3 培养基

种子培养基 (M17培养基): 大豆蛋白胨5.0 g、蛋白胨2.5 g、酪蛋白胨2.5 g、酵母浸粉2.5 g、牛肉膏5.0 g、乳糖5.0 g、抗坏血酸钠0.5 g、 β -甘油磷酸钠19.0 g、 $MgSO_4$ 0.25 g, 充分溶解后用蒸馏水定容至1 L。121 °C灭菌15 min (固体培养基在此基础上加琼脂15 g)。

基础发酵培养基: 蛋白胨20 g、葡萄糖100 g、 K_2HPO_4 10 g、 $MgSO_4$ 0.5 g, 充分溶解后定容至1 L, 调节初始pH 7.0, 115 °C灭菌20 min; $CaCO_3$ 于121 °C单独灭菌15 min, 在无氧条件下加入到培养基中, 添加量为60 g/L。

1.2 仪器与设备

HPX-87H色谱柱 美国Bio-Rad公司; Waters 2695 Separations Module HPLC System 美国Waters公司; HVE-50电热蒸汽自动灭菌锅 日本Hirayama公司; CJ-2D超净工作台 天津泰斯特仪器有限公司; GL-21M高速冷冻离心机 上海市离心机械研究所; Delta320 pH计 瑞士梅特勒-托利多有限公司; ZHWY-100B恒温培养振荡器、SPX-150B生化培养箱 上海佳胜实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 *L*-乳酸纯度测定

利用*L*-/*D*-乳酸检测试剂盒测定乳酸的光学纯度。*L*-乳酸的光学纯度按下式计算。

$$\text{光学纯度}/\% = \frac{L\text{-乳酸含量}/(\text{g/L})}{L\text{-乳酸含量}/(\text{g/L}) + D\text{-乳酸含量}/(\text{g/L})} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 乳酸含量分析及乳酸标准曲线绘制

取5 mL发酵液, 12 000 r/min离心10 min, 除去菌体及多余的 $CaCO_3$ 。取上清液, 加入质量分数72%的浓硫酸调节pH值为2.0左右。取100 μ L稀释10倍, 以0.22 μ m微孔滤器进行过滤即为待测液。

待测液采用Waters高效液相色谱仪分析: 色谱柱为HPX-87H色谱柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm, 9 μ m); 检测器为Waters2414示差检测器, 流动相为5 mmol/L的 H_2SO_4 溶液; 流动相流速为0.5 mL/min; 柱温65 °C; 进样量为20 μ L。

取250 mg乳酸标准品充分溶解, 定容于25 mL容量瓶中, 分别吸取2、4、6、8 mL定容于4个10 mL容量瓶中, 制得质量浓度梯度为2、4、6、8、10 mg/mL的乳酸标准溶液。标准曲线方程为 $Y=194\ 137X-4\ 177.3$ ($R^2=0.999\ 1$)。

1.3.3 菌种移种时间的确定

将菌种活化后以2%的接种量接种于5 mL M17培养基中, 30 °C培养14 h, 每隔1 h取样一次测定 $OD_{600\text{ nm}}$, 用来表示菌体浓度, 每组3个平行。

1.3.4 单因素试验

所有发酵实验的培养基初始pH值均为7.0, 接种量为10%, 发酵温度为30 °C, 转速为120 r/min, 发酵时间为24 h。

以基础发酵培养基为基础, 分别选择100 g/L的麦芽糖、半乳糖、木糖、乳糖、果糖、蔗糖、甘露醇、蔗糖作为唯一碳源进行试验, 从而确定最佳碳源。

在最佳碳源的基础上, 进一步考察20 g/L的不同氮源对*L*-乳酸产量的影响, 确定最佳氮源。在最佳氮源的基础上进行复合氮源优化试验, 共设计8个复配组, 分别为1组: 2 g/L酵母粉与18 g/L胰蛋白胨; 2组: 5 g/L酵母粉与15 g/L胰蛋白胨; 3组: 10 g/L酵母粉与10 g/L胰蛋白胨; 4组: 15 g/L酵母粉与5 g/L胰蛋白胨; 5组: 2 g/L酵母粉与18 g/L蛋白胨; 6组: 5 g/L酵母粉与15 g/L蛋白胨; 7组: 10 g/L酵母粉与10 g/L蛋白胨; 8组: 15 g/L酵母粉与5 g/L蛋白胨。考察不同氮源复配对*L*-乳酸产量的影响。

1.3.5 Plackett-Burman试验

根据上述单因素试验结果, 蔗糖和酵母粉以及蛋白胨被选出用于Plackett-Burman设计试验, 在参考了相关文献[7-8]后, 又选取了 $MgSO_4$ 质量浓度、 K_2HPO_4 质量浓度、NaCl质量浓度、 CH_3COONa 质量浓度一同作为考察对象。通过Design Expert软件进行Plackett-Burman设计 (表1), 以*L*-乳酸产量为响应值, 通过比较各因素的显著性水平, 筛选出对*L*-乳酸产量影响较显著的因素。

表1 Plackett-Burman试验因素与水平设计
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiments

编号	因素	低水平 (-1)	高水平 (+1)
A	蔗糖质量浓度/(g/L)	53	105
B	酵母粉质量浓度/(g/L)	1.2	2.4
C	蛋白胨质量浓度/(g/L)	12	24
D	$MgSO_4$ 质量浓度/(g/L)	1.7	3.4
E	K_2HPO_4 质量浓度/(g/L)	4.0	8.0
F	NaCl质量浓度/(g/L)	0.1	0.3
G	CH_3COONa 质量浓度/(g/L)	0.7	1.4

1.3.6 最陡爬坡试验

根据Plackett-Burman试验及分析结果设计爬坡试验, 即对显著因素进行质量浓度的梯度设计。在培养基的优化过程中, 可以根据前期实验拟合出的方程来确定各变量的最速上升路径和变化步长, 若系数为正, 则该因素水平为递增, 反之递减; 以系数最大的变量为基准确定基本步长, 以其他变量与基准变量系数的比值来确定其他变量的步长, 确定了上升或下降方向及变化步长后便可以选取中心点进行试验设计^[9]。

1.3.7 响应面分析法优化培养基组分

根据以上试验结果选取3个主要因素进行响应面分析法中的中心组合试验设计, 试验因素及水平见表2。并用Design-Expert软件对数据进行回归分析。通过数据拟合相应模型, 得到二次多项式, 并最终确定最佳发酵培养基。

表2 中心组合试验因素及水平设计
Table 2 Factors and levels used in central composite design

编号	因素	水平		
		-1	0	+1
A	蔗糖质量浓度/(g/L)	80	100	120
B	酵母粉质量浓度/(g/L)	2.0	2.5	3.0
E	K ₂ HPO ₄ 质量浓度/(g/L)	6.0	7.5	9.0

2 结果与分析

2.1 乳酸光学纯度测定结果

通过试剂盒检测, 乳酸乳球菌KLDS 4.0325可产生光学纯度100%的L-乳酸, 这也是该菌株优于其他乳酸生产菌株的原因之一。*Lactobacillus paracasei* LA104生产L-乳酸的光学纯度为97.3%^[10], *Bacillus subtilis* MUR1生产L-乳酸的光学纯度为99.5%^[11]。

2.2 菌种的移种时间

在乳酸发酵过程中选择合适的移种时间至关重要, 过老或年轻的种子都会对发酵产生不利影响^[12]。一般来讲, 菌体处于对数生长中后期为移种的最佳时期。此时的种子繁殖能力强且菌体浓度高, 接入发酵培养基后能很快进入对数生长期, 有利于发酵的进行。由图1可知, 菌种的对数生长期为2~5 h, 因此确定移种时间为5 h。

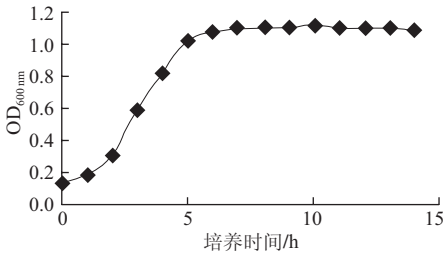


图1 乳酸乳球菌KLDS 4.0325的生长曲线
Fig.1 Cell growth curve of KLDS 4.0325

2.3 单因素试验结果

2.3.1 不同碳源对L-乳酸产量的影响

以基础发酵培养基为基础, 碳源分别替换成不同的糖类, 其他条件不变, 比较不同碳源对L-乳酸产量的影响。由图2可知, 蔗糖作为碳源时L-乳酸产量最大为25.2 g/L, 这也说明乳酸乳球菌KLDS 4.0325具有利用工业废料糖蜜的潜质。而以乳糖和木糖作为碳源时, L-乳酸产量极少。

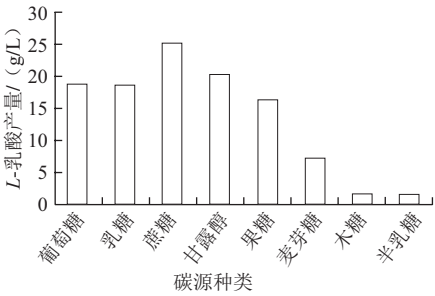


图2 不同碳源对L-乳酸产量的影响
Fig.2 Effect of different carbon sources on L-lactic acid content

2.3.2 不同氮源对L-乳酸产量的影响

在最佳碳源的基础上, 氮源分别替换成酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、乳清, 其他条件不变, 进行发酵培养。由图3可知, 酵母粉作为氮源时L-乳酸的产量明显高于其他氮源, 这可能与酵母粉中富含丰富的氨基酸、维生素等生长因子有关, 这一结果与Kadam^[13]、王玉华^[14]、秦浩^[15]、吴再强^[16]等的研究结果一致。

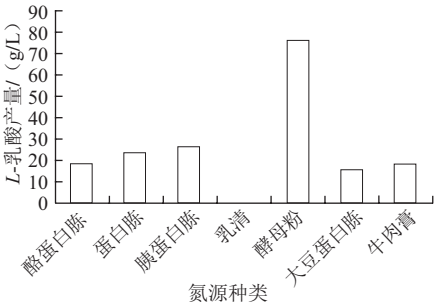


图3 不同氮源对L-乳酸产量的影响
Fig.3 Effect of nitrogen source on L-lactic acid content

2.3.3 复合氮源优化结果

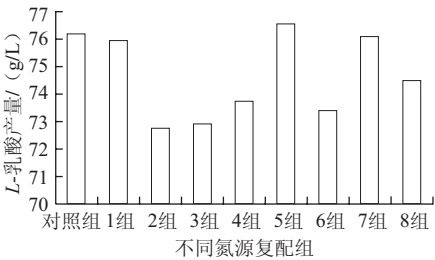


图4 不同氮源组合对L-乳酸产量的影响
Fig.4 Effect of mixed nitrogen sources on L-lactic acid content

虽然使用酵母粉单独做氮源时L-乳酸产量最高, 但是相对其他氮源来说, 酵母粉价格昂贵, 这将严重阻碍乳酸的大规模工业化生产^[17]。为了减少成本, 将酵母粉与两种价格相对低廉的氮源混合发酵, 保持总氮含量为20 g/L, 由图4可知, 第5组, 即2 g/L酵母粉与18 g/L蛋白胨的复配效果最好。这可能是由于酵母粉为菌株提供生

长因子等微量营养物质,因此较少的酵母粉即可达到此目的。与其他乳酸菌^[18-20]相比,乳酸乳球菌KLDS 4.0325对酵母粉的需求量相对较少。

2.4 Plackett-Burman试验结果

在单因素试验结果的基础上,采用Plackett-Burman试验,分析7个因素对L-乳酸产量的影响。试验设计及结果见表3。当 $P=\text{Prob}>F$ 小于0.05时,该因素对L-乳酸产量有显著影响,并且F值越大则表示该因素对L-乳酸产量影响越大。由表4可知,因素A、B、E对L-乳酸产量有显著影响,且可信度在95%置信区间内,其中因素A(蔗糖添加量)对L-乳酸产量影响最大,其次为因素E(K_2HPO_4 添加量)、因素B(酵母粉添加量),而其他因素对L-乳酸产量没有显著影响。选择以上3个有显著影响的因素进行最陡爬坡试验,进行进一步优化。

表3 Plackett-Burman试验结果
Table 3 Results of Plackett-Burman experimental design

试验号	A	B	C	D	E	F	G	L-乳酸产量/(g/L)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	68.6
2	-1	1	1	-1	1	1	1	48.5
3	1	-1	1	1	-1	1	1	62.5
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	50.9
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	42.8
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	34.0
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	65.7
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	60.3
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	67.1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	42.6
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	61.7
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	39.0

表4 Plackett-Burman试验结果回归分析
Table 4 Regression analysis of Plackett-Burman results

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 572.54	7	224.65	23.00	0.004 4	*
A	1 367.47	1	1 367.47	140.00	0.000 3	*
B	86.94	1	86.94	8.90	0.040 6	*
C	3.74	1	3.74	0.38	0.569 5	
D	0.80	1	0.80	0.082	0.788 8	
E	89.11	1	89.11	9.12	0.039 1	*
F	8.84	1	8.84	0.91	0.395 3	
G	15.64	1	15.64	1.60	0.274 4	

注:*, $P < 0.05$, 表示差异显著。表7同。

2.5 最陡爬坡试验结果

表5 最陡爬坡试验结果
Table 5 Results of steepest ascent design

试验号	A蔗糖质量浓度/(g/L)	B酵母粉质量浓度/(g/L)	E K_2HPO_4 质量浓度/(g/L)	L-乳酸产量/(g/L)
1	40	1.0	3.0	35.5
2	60	1.5	4.5	54.1
3	80	2.0	6.0	76.6
4	100	2.5	7.5	87.6
5	120	3.0	9.0	80.6
6	140	3.5	10.5	81.7
7	160	4.0	12.0	79.7

根据Plackett-Burman试验的结果,选择合适的步长进行最陡爬坡试验,为中心组合试验提供合适的中心试验点。由表5可知,第4组对应的L-乳酸产量最大。因此,选择第4组作为中心组合试验的中心点。

2.6 中心组合试验设计及结果分析

以L-乳酸产量为响应值(设为Y),采用因素 $n=3$,试验次数 $N=20$ 的中心组合设计进行优化试验。各因素、水平及试验结果见表6。通过对数据进行二次多元回归拟合,得到二次多项式方程:

$$Y = -358.71 + 42.46A + 102.18B + 226.95E - 3.25AB - 3AE + 230BE - 1.91A^2 - 2516.59B^2 - 160.20E^2 \quad (2)$$

表6 响应面试验设计方案及结果
Table 6 Response surface central composite design layout and experimental results

试验号	A	B	E	Y L-乳酸产量/(g/L)
1	-1	-1	-1	64.8
2	1	-1	-1	72.2
3	-1	1	-1	61.6
4	1	1	-1	65.1
5	-1	-1	1	67.2
6	1	-1	1	68.4
7	-1	1	1	68.3
8	1	1	1	70.8
9	-1.682	0	0	60.1
10	1.682	0	0	71.2
11	0	-1.682	0	70.7
12	0	1.682	0	68.2
13	0	0	-1.682	71.7
14	0	0	1.682	82.4
15	0	0	0	86.3
16	0	0	0	85.3
17	0	0	0	87.9
18	0	0	0	86.5
19	0	0	0	82.1
20	0	0	0	86.4

表7 回归模型方差分析
Table 7 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 549.12	9	172.12	28.26	0.000 1	*
A	81.04	1	81.04	13.31	0.004 5	*
B	8.87	1	8.87	1.46	0.255 4	
E	61.56	1	61.56	10.11	0.009 8	*
AB	0.84	1	0.84	0.14	0.717 3	
AE	6.48	1	6.48	1.06	0.323 6	
BE	23.81	1	23.81	3.91	0.076 3	
A ²	840.08	1	840.08	137.92	0.000 1	*
B ²	570.44	1	570.44	93.65	0.000 1	*
E ²	187.23	1	187.23	30.74	0.000 2	*
残差	60.91	10	6.09			
失拟项	41.47	5	8.29	2.13	0.212 6	
纯误差	19.44	5	3.89			
合计	1 610.03	19				

通过Design Expert 8.0软件对试验数据进行分析,由

表7可知, 本实验所选模型 $P=0.000\ 1<0.05$, 说明方程拟合度较好; 失拟项 $P=0.212\ 6>0.05$, 说明失拟项不显著; 复相关系数 $R^2=0.962\ 2$, 表明预测值和实测值相关性高; 调整性决定系数 $R_{Adj}^2=0.928\ 1$, $R_{Pre}^2=0.784\ 3$, 二者之间相差较小, 表明模型可信度高, 能很好地描述实验结果。

由表7可知, 模型一次项 A 、 E 处于显著水平, B 项不显著; 交互项 BE 、 AB 、 AE 项均不显著。

2.7 模型验证及分析

对二次方程求导, 当蔗糖、酵母粉、 K_2HPO_4 的添加量分别为102.9、2.5、7.9 g/L时, 对应的 L -乳酸产量最高为86.3 g/L。为了验证方程的准确性, 在上述条件下进行3次发酵实验, 测得 L -乳酸产量分别为86.6、87.2、85.9 g/L, 平均值为86.6 g/L, 与方程预测值86.3 g/L的相对误差为0.3%, 说明该方程具有参考价值, 能够为生产提供一定的实践依据。实验结果表明, 发酵培养基优化后的 L -乳酸产量是基础培养基的3.4倍, 产酸速率可达3.61 g/(L·h)。相对于乳酸杆菌发酵产乳酸, 乳酸乳球菌KLDS 4.0325具有仅产 L -乳酸的特性, 且产酸速率高于乳杆菌^[13]。

目前为止, 国内关于乳酸乳球菌生产乳酸的报道较少, 国外有*Lactococcus lactis* IO-1^[21]、*L. lactis* ATCC 19435^[5]、*L. lactis* ssp. *cremoris* ASCC 930119^[22]、*L. lactis* IFO 12007^[23]等菌株生产 L -乳酸的研究报道。Ramchandran等^[22]研究了利用*L. lactis* ssp. *cremoris* ASCC 930119通过浸没式发酵生产乳酸, 产量可达60 g/L。*L. lactis* IO-1^[24]摇瓶发酵乳酸产量为13.81 g/L, 产酸速率为1.73 g/(L·h), 与乳酸乳球菌KLDS 4.0325产酸量86.6 g/L、产酸速率3.61 g/(L·h)有较大的差距。Shi Zhouming等^[5]研究了以菊芋粉为碳源, 固定*L. lactis* ATCC 19435在纤维素膜反应器上进行分批补料发酵, 产酸量可达142 g/L, 产酸速率约为2.06 g/(L·h), 该研究采用了先进的发酵技术, 乳酸产量高于本实验的菌株, 而产酸速率却低于乳酸乳球菌KLDS 4.0325。Ramchandran等^[22]研究了*L. lactis* ssp. *cremoris* ASCC930119利用乳清粉发酵生产乳酸, 最大产酸量可达60 g/L, 明显低于本实验菌株。

3 结论

本研究采用一株 L -乳酸光学纯度达100%的乳酸乳球菌KLDS 4.0325生产 L -乳酸, 并优化其发酵培养基。对实验结果进行回归分析, 得到的回归方程具有较高的拟合度, 说明实验结果可靠。优化后培养基成分为: 蔗糖质量浓度102.9 g/L、酵母粉质量浓度2.5 g/L、 K_2HPO_4 质量浓度7.9 g/L、蛋白胨质量浓度18 g/L、 $MgSO_4$ 质量浓度2.5 g/L、NaCl质量浓度0.2 g/L、 CH_3COONa 质量浓度1 g/L。优化后 L -乳酸产量是优化前的3.4倍。实验结果表明, 该菌株营养需求简单, 产酸量可观, 发酵周期短。以蔗糖为最佳碳源说明其具有利用工业废料糖蜜的潜

力, 从而降低 L -乳酸生产成本。酵母粉对其生产 L -乳酸起到至关重要的作用, 但极少量的酵母粉即可满足其需要。因此该菌株具有相当的工业生产 L -乳酸的潜力。

参考文献:

- [1] MOON S K, WEE Y J, CHOI G W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L -lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 114(2): 155-159.
- [2] ABDEL-RAHMAN M A, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 156(4): 286-301.
- [3] 于雷, 雷霆, 裴晓林, 等. 应用基因组改组选育耐糖 L -乳酸高产菌株[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 369-373.
- [4] MARTINEZ F A C, BALCIUNAS E M, SALGADO J M, et al. Lactic acid properties, applications and production: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 30(1): 70-83.
- [5] SHI Zhouming, WEI Peilian, ZHU Xiangcheng, et al. Efficient production of L -lactic acid from hydrolysate of *Jerusalem artichoke* with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(5): 263-268.
- [6] PETROV K, URSHEV Z, PETROVA P. L (+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84[J]. Food Microbiology, 2008, 25(4): 550-557.
- [7] 王秀丽, 任晓冬, 陈萍萍, 等. 统计学分析方法应用于乳酸乳球菌培养基的优化[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2010, 48(2): 323-328.
- [8] ZHANG Guiying, MILLS D A, BLOCK D E. Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of lactococci, enterococci, and streptococci[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 1080-1087.
- [9] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 894-903.
- [10] NGUYEN C M, KIM J S, HWANG H J, et al. Production of L -lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulatum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 552-559.
- [11] GAO Ting, HO K P. L -Lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1 in continuous culture[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 646-651.
- [12] 于雷. 基因组改组技术对鼠李糖乳杆菌的分子育种及其 L -乳酸的发酵[D]. 长春: 吉林大学, 2007: 76-77.
- [13] KADAM S R, PATIL S S, BASTAWDE K B, et al. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(1): 120-126.
- [14] 王玉华, 陈萍, 朴春红, 等. 基因组改组鼠李糖乳杆菌生产 L -乳酸发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 316-319.
- [15] 秦浩. 高产 L -乳酸菌株的选育及其发酵条件的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 25-26.
- [16] 吴再强, 邹慧斌, 季更生, 等. 一株干酪乳杆菌ZW-63A产高光学纯 L -乳酸的发酵优化研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 226-231.
- [17] 高江婧. 产 L -乳酸菌的选育和发酵条件的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 23-24.
- [18] 裴晓林. 应用基因组改组技术选育 L -乳酸高产菌株及其发酵工艺研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007: 57-58.
- [19] 张为巍, 李元媛, 周铭锋, 等. 产 L -乳酸的鼠李糖乳杆菌发酵培养基的优化[J]. 广州化工, 2012, 40(7): 79-82.
- [20] 吴晖, 李明阳, 刘冬梅, 等. 鼠李糖乳杆菌发酵生产 L -乳酸培养基的优化[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 81-84.
- [21] LAOPAIBOON P, THANI A, LEELAVATCHARAMAS V, et al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(3): 1036-1043.
- [22] RAMCHANDRAN L, SANCIOLO P, VASILJEVIC T, et al. Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process[J]. Journal of Membrane Science, 2012, 403/404: 179-187.
- [23] UENO T, OZAWA Y, ISHIKAWA M, et al. Lactic acid production using two food processing wastes, canned pineapple syrup and grape invertase, as substrate and enzyme[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(7): 573-577.
- [24] SIRISANSANEYAKUL S, LUANGPIPAT T, VANICHSRIRATANA W, et al. Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(5): 381-391.