

# 聚氨酯吸附固定米根霉发酵 *L*-乳酸的优化

陈育如<sup>1</sup>, 夏黎明<sup>2</sup>, 岑沛霖<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 210097, 南京; 2. 浙江大学生物化工研究所, 310027, 杭州)

[摘要] 研究了用聚氨酯载体吸附固定米根霉进行 *L*-乳酸发酵. 优化结果表明, 实验条件下, 载体粒径以  $3 \sim 3\text{ mm}$ , 尿素添加量以  $0.05\% \sim 0.1\%$ , 初始糖浓度以  $8\% \sim 10\%$ , 发酵温度  $33^\circ\text{C}$ , 通气量  $1.2\text{ vvm}$  为宜, 碳酸钙应及时添加. 葡萄糖的 *L*-乳酸产率可达  $82.4\%$ .

[关键词] 聚氨酯, 吸附固定, 米根霉 *L*-乳酸

[中图分类号] Q936; [文献标识码] A; [文章编号] 1672-1292(2002)01-0052-04

与用细菌发酵生产的 D 型或 DL-乳酸不同, 米根霉(*Rhizopus oryzae*) 发酵产物为 *L*-乳酸, *L*-乳酸可被人体所吸收利用. 近年来, 越来越多的学者对 *L*-乳酸发酵进行了研究<sup>[1, 2]</sup>. 用米根霉生产乳酸一般是在搅拌罐中用游离菌丝进行的, 由于米根霉菌丝比较发达, 在通常的搅拌罐中容易结成大菌丝团和缠住搅拌轴, 影响传质进行和增加动力消耗. 为此, 实验选用多孔的聚氨酯塑料作为固定化载体, 利用米根霉菌丝的缠绕性质自行附着在多孔载体上实现菌丝的吸附固定, 并对固定化材料粒度、葡萄糖浓度、氮源等条件进行了优化.

## 1 材料、设备与方法

### 1.1 菌种与培养基

米根霉(*Rhizopus oryzae*), 由美国普度大学(Purdue University)赠送, PDA 斜面保存.

米根霉菌丝培养基组分: 葡萄糖  $13\%$ ; 尿素  $0.5\%$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.02\%$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0.02\%$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0.05\%$ . 米根霉发酵培养基组分: 葡萄糖和尿素的加量随实验条件,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.02\%$ ;  $\text{MgSO}_4$   $0.02\%$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0.05\%$ .

### 1.2 材料与设备

聚氨酯载体, 俗称海绵泡沫塑料, 市购, 水洗后剪成所需粒度, 灭菌备用. THZ-22 型恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂), 1.8 L 鼓泡塔反应器(定制加工), 糖的分析采用 DNS 法<sup>[3]</sup>和高压液相色谱(美国 waters 公司), 分离柱为 Shodex packed column for HPLC (SHOKO.CO.LTD). HP8452A 全波长紫外可见分光光度计(美国 HP 公司)用于比色测定<sup>[4]</sup>.

### 1.3 测定方法

还原糖分析, 采用 DNS 法测定.

乳酸含量测定采用 EDTA 定钙法<sup>[5]</sup>.

### 1.4 米根霉固定化方法

在 500 mL 摇瓶中加入米根霉增殖培养基 100 mL, 放入称量好的聚氨酯载体, 灭菌. 将斜面上的孢子用无菌水洗下, 加至冷却后的灭菌增殖培养基中, 于  $30^\circ\text{C}$ ,  $150\text{ r/min}$  下在恒温振荡器中培养 30~36 h. 将菌丝接种至鼓泡塔反应器中, 菌丝装填量为  $100\text{ cm}^3$ .

收稿日期: 2001-05-20.

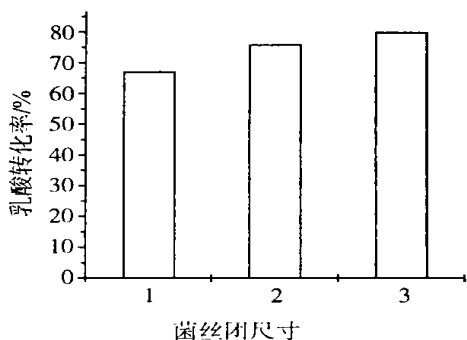
基金项目: 江苏省高校自然科学研究指导性计划项目和(01KJD180003), 南京师范大学引进人才基金(2001SWXXGQB911)资助.

作者简介: 陈育如, 1965-, 南京师范大学生命科学学院副教授, 主要从事微生物学的教学与研究.

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌丝团尺寸与培养基中氮源对乳酸发酵的影响

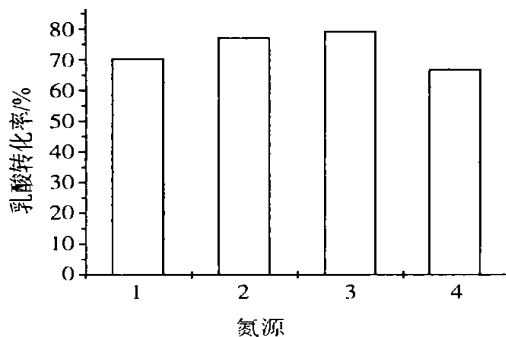
菌丝团尺寸的影响: 实验表明, 菌丝团的大小受初始聚氨酯尺寸和发酵培养基中氮源的影响. 初始聚氨酯尺寸越大, 增殖培养后菌丝团颗粒越大; 实验中观察到, 发酵培养基中氮源多, 菌丝生长快. 从图 1 可见, 实验条件下菌丝团粒径减少, 乳酸转化率提高. 这是因为大菌丝团对传质不利; 但菌丝团也不是越小越好, 小菌丝团容易从反应器底部的筛板中漏出和堵在通气孔中. 因此菌丝球粒径以 3 3 3 mm 为宜. 用聚氨酯固定化菌丝时, 菌丝团的大小在一定范围内可由发酵液中含氮量控制.



(1) 5 5 5mm; (2) 3 3 3mm; (3) 1 1 2.5mm

糖浓度: 10%; 尿素: 0.1%; 温度: 32 ; 通气量 1vvm

图 1 菌丝团尺寸对乳酸发酵的影响



(1) 0%; (2) 0.05%; (3) 0.1%; (4) 0.2%

糖浓度: 10%; 菌丝团粒径: 3 3 3mm; 温度: 32 ; 通气量 1vvm

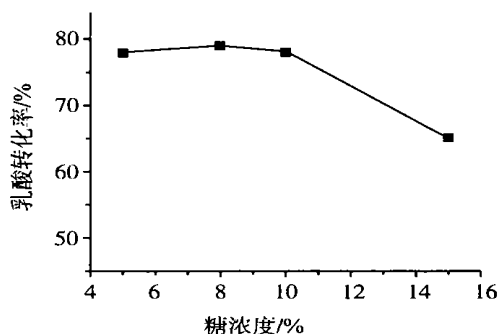
图 2 发酵培养基中氮源对乳酸发酵的影响

氮源的影响: 氮源是菌丝生长所必须的, 特别是在菌丝培养阶段. 碳源和氮源充足, 菌丝生长旺盛, 菌丝量大, 对乳酸发酵有利. 但菌丝太多, 会使固定化菌丝团的直径过大, 从而影响传质和床内介质流化状况.

当培养基中尿素添加量为 0.2% 时, 培养过程中可见菌丝团有明显的增大. 当氮源减少或降至零时, 菌丝的生长就变慢甚至停止. 因此可以通过调节氮源的量来控制菌丝生长量. 适当控制氮源可以使菌丝维持在良好的状态. 从图 2 可见, 尿素添加量以 0.05% ~ 0.1% 为宜.

### 2.2 糖浓度和反应器装液量的影响

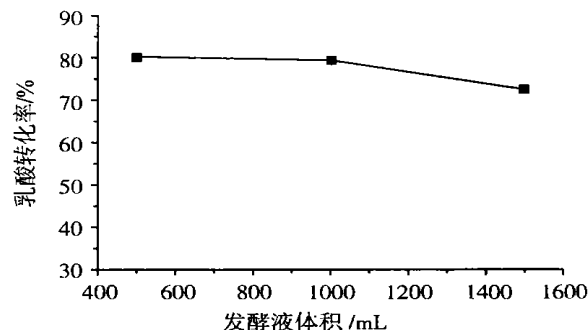
糖浓度的影响: 在一般情况下, 糖浓度越高, 发酵终液中乳酸浓度越高, 这有利于产物的提取. 但乳酸钙的溶解度较小(33 时在水中的溶解度只有 5.9g)<sup>[5]</sup>, 高浓度的糖转化得到的乳酸钙在室温下易析出结晶, 因此初始糖浓度以 8% ~ 10% 较为适宜.



菌丝团粒径: 3 3 3mm; 温度: 32 ;

通气量 1vvm; 糖浓度: 10%

图 3 糖浓度对乳酸发酵的影响



菌丝团粒径: 3 3 3mm; 温度: 32 ;

通气量 1vvm; 糖浓度: 10%

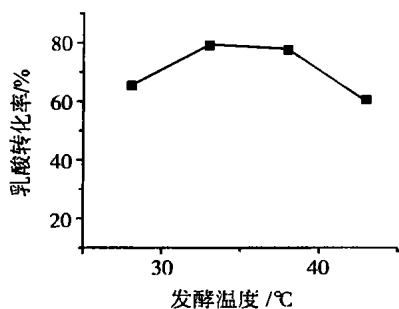
图 4 反应器装液量对乳酸发酵的影响

装液量的影响: 对鼓泡塔反应器而言, 装液量的多少可改变其高径比, 装液量增加, 高径比增大, 通入的空气在逸散前通过发酵液的路径增长, 空气利用率提高, 但气阻增大。

### 2.3 发酵温度与通气量的影响

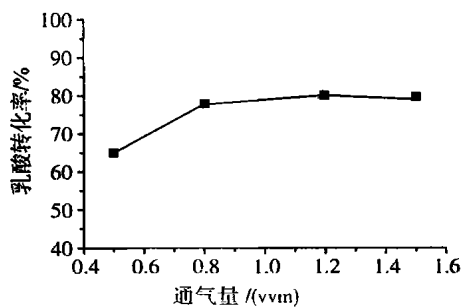
温度的影响: 温度升高有利于菌丝的生长, 发酵速度加快, 产酸量增加。但温度过高造成菌丝老化加剧, 不利于提高操作批次。因此发酵温度以 33 为宜。

反应器通气量的影响: 因为米根霉发酵乳酸是在供氧充足的状态下进行, 因此加大通气量可使发酵液的溶氧增加, 对乳酸发酵有利。但通气量过高将增加动力消耗, 产生泡沫; 通气量也不能过小, 过小将使发酵液中溶氧不足将导致米根霉进行乙醇发酵, 造成乳酸产量的减少。由于通气量过少时菌丝的流化状态不好, 菌丝团间易产生粘连, 粘连增大的菌丝造成传质效率下降和流化状态的劣化。从图 6 可见, 通气量从 0.8 vvm 增至 1.5 vvm 时, 乳酸转化率相差不大, 通气量以 1.2 vvm 为最佳。



菌丝团粒径: 3 3 3mm; 通气量 1vvm; 糖浓度: 10%

图5 发酵温度对乳酸发酵的影响



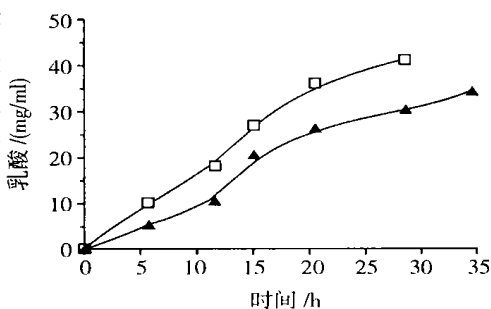
菌丝团粒径: 3 3 3mm; 温度: 33 ; 糖浓度: 10%

图6 通气量对乳酸发酵的影响

### 2.4 碳酸钙添加时间的影响

乳酸发酵存在产物抑制, 加入碳酸钙中和乳酸是消除乳酸产物抑制的有效方法<sup>[5]</sup>。但碳酸钙一次的添加量和添加时间对发酵状况有较大的影响(见图7)。实验发现, 在游离菌丝发酵时, 如果碳酸钙先于菌丝长成前加入, 米根霉菌丝将不结团而呈絮状, 菌丝的乳酸转化能力低。这可能是发酵液中的碳酸钙在搅动时对菌丝造成损伤, 影响了其活力。

图7是定时加入较多的碳酸钙和及时补加时对乳酸发酵产量和速率的影响。由图7可见, 定时加入较多碳酸钙的乳酸产量不如相同时间的及时补加碳酸钙方法所得的乳酸产量高, 这是因为前者在刚加入碳酸钙时因为碳酸钙较多对乳酸发酵有一定影响, 而在后期因碳酸钙已消耗完, 生成的乳酸的产物抑制作用降低了发酵效率, 此时的乳酸增长曲线比较平坦。及时补加方法可弥补这个缺点, 因此碳酸钙的加入以中和发酵液中产生的乳酸再稍过量为度(这时, 发酵液因碳酸钙的加入变得较为混浊), 待发酵液变清时要及时补加, 以维持较高的发酵速度。



碳酸钙及时补加: 碳酸钙定时添加

图7 碳酸钙添加时间对乳酸发酵的影响

(5%葡萄糖, 1.2vvm, 33 )

碳酸钙的加料方式: 定时方式, 如发酵周期为 35 h, 一般每

隔 5 h 加一次。加量为将整个周期所需碳酸钙计算总量除以添加次数。及时添加方式, 是根据发酵液变清(碳酸钙消耗完毕)后再添加, 其次数要比定时添加的多 3 倍左右, 每次的加量减为定时加量的 1/3。

## 3 结论

聚氨酯是一种良好的米根霉固定化载体, 由于聚氨酯载体重量轻, 相对用量很少, 固定化过程中亦

不需要借助于其他固定药剂, 与海藻酸钙固定法相比, 固定化成本低. 控制聚氨酯泡沫塑料的原始尺寸和培养基中的氮含量可有效地控制菌丝团的大小, 得到均一的固定化菌丝球. 在鼓泡塔反应器中, 固定化菌丝尺寸、葡萄糖浓度、培养基中氮源量、培养基装液量、通气量、发酵温度、碳酸钙添加时间等一系列因素均对乳酸发酵有影响. 实验条件下, 优化结果为: 固定化菌丝尺寸 3 3 3 mm; 尿素添加量 0.05% ~ 0.1%; 初始糖浓度 8% ~ 10%; 发酵温度 33 ; 通气量 1.2 vvm; 碳酸钙应及时添加. 优化条件下葡萄糖的乳酸产率可达 82.4%.

## [参考文献]

- [1] 李学梅, 林建平, 岑沛霖. 固定化半根霉电渗析发酵生产 *L*-乳酸的研究[J]. 食品科学. 1996, 17(9): 12~ 16.
- [2] Kosakai, Yuuko Park, Yong Soo Okabe, Mitsuyasu, Enhancement of *L*-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 55(3): 461~ 470.
- [3] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1986, 9~ 11.
- [4] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1980, 98~ 101.
- [5] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1995, 403~ 404.

## Condition Optimization of *L*-Lactic Acid Fermentation with Immobilized *Rhizopus Oryzae* by Polyurethane

Chen Yuru<sup>1</sup>, Xia Liming<sup>2</sup>, Cen Peilin<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, PRC;

2. College of Biochemical Engineering, Zhejiang University, 310027, Hangzhou, PRC)

**Abstract:** *L*-lactic acid fermentation is studied by using immobilized *rhizopus oryzae*. To determine the optimal operating conditions including the immobilized beads size, the experiments on aeration rate and fermentation temperature etc as well as, a series of repeated-batch fermentation in a bubble column bioreactor are performed. The optimal operating conditions are: immobilized beads size: 3 3 3 mm, aeration rate: 1.2 vvm; temperature: 33 . The productivity of *L*-lactic acid converted from glucose can be up to 82.4% .

**Key words:** *rhizopus oryzae*, polyurethane, *L*-lactic acid, immobilized cells

[责任编辑: 孙德泉]