

米根霉发酵甘薯淀粉制备 L- 乳酸研究

潘丽军, 李兴江, 潘利华, 郑志, 余赞

(合肥工业大学生物与食品工程学院 教育部农产品生物化工重点实验室, 安徽 合肥 230069)

摘要: 以米根霉 AS3.819 的诱变株为菌种, 甘薯淀粉为碳源, 在摇瓶发酵工艺的基础上, 利用 10L 发酵罐对该菌株产 L- 乳酸进行研究, 探索出 10L 罐最适发酵条件为: 装液量 40%, 搅拌转速 400~650r/min, 通气流量 0.5~0.6L/(L·min), 溶氧 $\geq 88\%$, 温度 32℃, pH5.0~5.5, 消泡剂添加量 0.1% 左右。罐发酵结果得到 L- 乳酸累积浓度为 99.54g/L, 对原淀粉的转化率达 77%, 最高生物量 7.2g/L, 发酵周期 70h。

关键词: 米根霉; L- 乳酸; 发酵; 甘薯淀粉; 溶氧

Production of L-Lactic Acid from Sweet Potato Starch Fermented with *Rhizopus oryzae*

PAN Li-jun, LI Xing-jiang, PAN Li-hua, ZHENG Zhi, YU Yun

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China;
Key Laboratory of Bio-process, (Hefei University of Technology) Ministry of Education, Hefei 230069, China)

Abstract: A 10L jar fermentation technology for production of L-lactic acid from sweet potato starch incubated with a mutant of *Rhizopus oryzae* AS 3.819 was developed. The optimal culture conditions were as follows: 10L jar contained 4L liquid culture medium with rotational speed from 400 to 650r/min, aeration rate from 0.5 to 0.6L/(L·min), dissolved oxygen (DO) above 88%, fermentation temperature 32℃, pH from 5.0 to 5.5 and the dose of defoamer 0.1%. Results indicated that the average yield of L-lactic acid, the conversion rate of crude starch to L-lactic acid and top biomass fermentation time were 99.54g/L, 77%, 7.2g/L and 70h, respectively.

Key words: *Rhizopus oryzae*; L-lactic acid; sweet potato starch; DO

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0105-04

乳酸有 L- 型和 D- 型两种旋光异构体。它广泛应用于食品、医药、化工、农业等领域, 也是制备聚乳酸的直接前体^[1,2]。利用米根霉发酵生产乳酸, 有发酵产物光学纯度高、营养需求简单、产物容易提纯等优点^[3,4]。我国甘薯种植面积大、产量高, 应用甘薯淀粉制备 L- 乳酸对其精深加工意义重大。本试验在摇瓶发酵基础上, 进行了 10L 罐发酵研究, 探索出 10L 罐最适发酵条件, 为利用甘薯淀粉工业化生产 L- 乳酸做了前期的技术准备。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 米根霉 AS 3.819 经紫外线诱变筛选后得到的突变株。

甘薯淀粉 市售食用级甘薯淀粉。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基、PDA 培养基。

1.2.2 种子培养基(g/L) 葡萄糖 50, 液化甘薯淀粉 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4, KH_2PO_4 0.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.44, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, FeSO_4 0.01。

1.2.3 发酵培养基(g/L) 液化甘薯淀粉 130, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4, KH_2PO_4 0.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.44, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, CaCO_3 10(单独灭菌)。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面种子培养

将试管活化的菌种接入茄子瓶, $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 40~48h。

1.3.2 种子培养

按 100ml 种子培养基/500ml 三角瓶的装液量, 接入孢子约 10^6 个/ml, $220 \pm 5\text{r/min}$, $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 保温培

收稿日期: 2004-03-01

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(01041302); 安徽省“十五”攻关重点项目(01703003)

作者简介: 潘丽军(1955-), 女, 教授, 研究方向为食品科学及现代加工技术。

养 16h。

1.3.3 发酵系统及基本培养条件

发酵罐体积 10L, 4L 发酵液/罐, 接种量 5%, 转速 400~650r/min, 通气流量 0.5~0.6L/(L·min), 32℃ 发酵 70h。

1.4 分析方法

1.4.1 乳酸含量的测定 按高效液相色谱校正的 EDTA 定钙法进行^[5]。

1.4.2 还原糖的测定 采用斐林氏滴定法^[6]。

1.4.3 溶氧的测定 METTLER 溶氧电极在线检测。

1.4.4 生物量的测定 发酵液过滤得残渣, 用 0.01mol/L 的 HCl 充分洗涤以除去菌体包裹的 CaCO₃, 再用蒸馏水洗涤, 得残留菌体, 80℃ 干燥至恒重称量。

2 结果与分析

2.1 接种量的确定

接种量影响发酵延滞期, 采用 1%、5%、10% 的接种量进行实验, 结果表明接种量为 1% 时的延滞期比后两者延长约 10h, 而 5% 接种量和 10% 接种量的发酵情况基本同步, 所以采用 5% 的接种量。

2.2 装液量的影响

对 10L 发酵罐采用不同装液量(发酵液体积: 发酵罐体积)的实验结果见图 1。

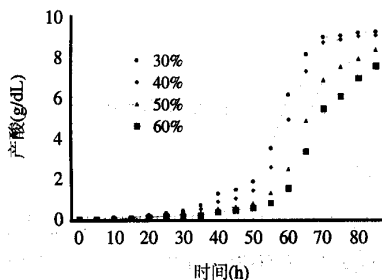


图1 装液量对发酵影响

Fig.1 Effects of liquid volume on fermentation

上图表明 30%、40% 的装液量较 50%、60% 的装液量产酸浓度高。实验中发现罐内装液较多时, 对溶氧及搅拌效率产生不利影响, 为提高罐利用率, 选用 4L 发酵液/10L 发酵罐。

2.3 溶氧对发酵的影响

2.3.1 临界溶氧的变化

微生物发酵中, 气态氧转变为溶解氧的过程与液体吸收气体的过程相同, 可用双膜理论的传质公式表示, 且当耗氧与供氧达到平衡状态时, 满足公式^[7]:

$$N = K_L a (C^* - C_L) = Q_m \cdot X = r \quad \cdots \cdots (1)$$

N — 氧的传递速率;

C* — 溶液中饱和溶氧浓度;

C_L — 溶液中在线溶氧浓度;

K_La — 液相体积氧传递系数;

Q_m — 最大呼吸强度;

X — 菌体浓度;

r — 摄氧率。

临界溶氧值是通过停止供氧后观察溶氧变化曲线获得, 菌体在不同阶段所需要的临界溶氧不同。选择转速 400r/min 和通气量 0.5L/(L·min), 在不同发酵期间进行实验, 得图 2 中临界溶氧曲线。

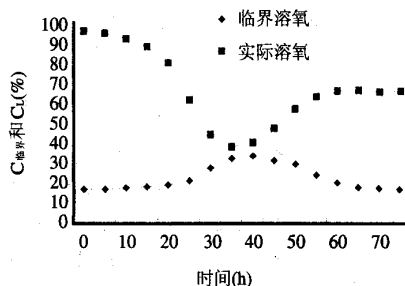


图2 临界溶氧和实际溶氧的变化曲线

Fig.2 Curves for critical DO and actual DO

临界溶氧的变化表明, 在 0~30h 内 C_{临界} 较低, 约为 18%, 这可能由于菌体生长处于延滞期, 菌体呼吸强度相对较弱, 而在菌体生长最旺盛的 30~50h 内, 临界溶氧 C_{临界} 偏大, 而且在产酸最旺盛的 50~60h 阶段内又开始变小, 表明菌体生长阶段临界溶氧值大于产物合成阶段的临界溶氧值。在发酵过程中无论是菌体处于生长阶段还是产物合成阶段都要保证实际溶氧浓度大于临界溶氧浓度。

2.3.2 发酵中的在线溶氧变化及其对产酸的影响

选择转速 400r/min 和通气流速 0.5L/(L·min) 不变, 获得整个发酵过程中的液体在线溶氧浓度变化曲线如图 2。结果表明, 在菌体生长处于最旺盛阶段 30~50h 内, 溶氧浓度最低, 公式(1)也表明, 当呼吸强度变大, 菌体增多, K_La 不变的情况下, 会出现 C_L 的降低; 在 55~72h 内, 由于液体内碳、氮源已被大量消耗, 造成菌体呼吸强度减弱, 因而液体中在线溶氧 C_L 出现回升; 尽管在 55~72h 的发酵阶段呼吸强度减弱, 但由于此时菌体量远远大于 0~30h 阶段的菌体量, 所以这个阶段的摄氧率也较大, 使得溶氧偏低于发酵初期。

图 2 同时表明, 在菌体生长旺盛的 30~50h 内, 液体溶氧 C_L 接近与临界溶氧 C_{临界}, 而发酵过程中必须保证 C_L 大于 C_{临界}, 因此, 通过控制转速和通气流速来调节 K_La, 从而间接调节溶氧。选择 400r/min 恒定转速、0.5L/(L·min) 恒定通气流量, 针对发酵的不同阶段, 前

期(15h)、中期(40h)、后期(60h)进行溶氧影响考查, 结果见图 3 和图 4。

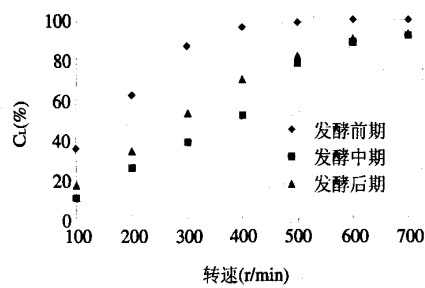


图3 不同阶段恒定通气时转速对溶氧影响

Fig.3 Effects of rotational speed on DO at different phases with constant aeration rate

图 3 表明, 在 0.5L/(L · min)的通气流量下, 发酵的不同阶段溶氧随转速的改变情况不同, 尽管溶氧都随着转速的增大而增大, 但发酵前期溶氧增长显著, 而在菌体生长旺盛的发酵中期则溶氧增长偏低, 如果不改变通气流量的话, 在 700r/min 转速下, 发酵中、后期的溶氧也才达到约 90%。

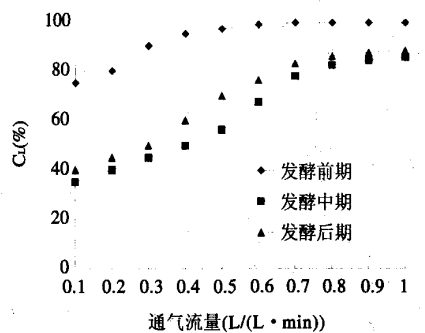


图4 不同阶段恒定转速时通气对溶氧影响

Fig.4 Effects of aeration rate on DO at different phases with constant rotational speed

图 4 表明随着通气流量的增加, 发酵前期的溶氧增长显著, 而在发酵中、后期溶氧增长偏低, 其通气流量要分别超过 0.8L/(L · min)和 0.7L/(L · min), 才能保证溶氧超过 80%。

结合图 3 和图 4 可知, 在发酵前期控制较小的转速和流量就可以达到所需的临界溶氧, 但实验发现保持较高的溶氧可以缩短发酵前期的延滞期。在菌体生长旺盛阶段, 如果采用过大的通气流速, 则容易产生太多的泡沫(消泡剂用量不宜太大), 所以通过控制适量通气流量并同时增加转速来实现溶氧控制的目的。实验情况如图 5 所示。

由图 5 可知, 发酵前期维持 0.6L/(L · min)左右的通气流量和 400r/min 的转速就可以保证 95% 以上的溶氧,

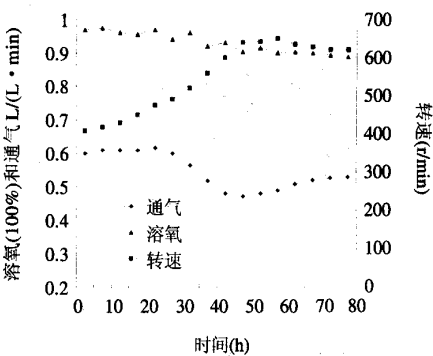


图5 发酵过程、转速、通气和溶氧曲线图

Fig.5 Curves of rotational speed, aeration rate and DO of the fermentation process

在后期由于通气过大会造成过多的泡沫, 因而通气降低至约 0.48L/(L · min), 转速相应增加至 640r/min 可提高溶氧。采用上述条件与恒定通气、转速的发酵实验结果如图 6 所示。

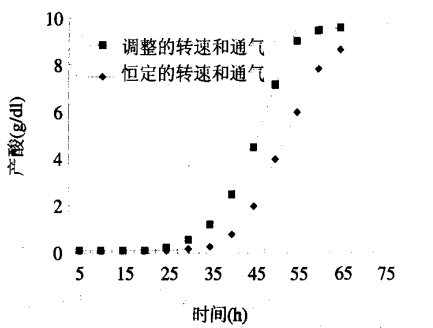


图6 调整转速与通气前后产酸比较

Fig.6 Effects of adjusting parameters on fermentation

图 6 表明, 调整后的发酵结果明显优于恒定转速、通气流量的发酵结果。调整前的产酸偏低, 可能由于在 30~50h 内的溶氧偏低造成发酵滞后, 周期延长。

2.4 菌球对发酵的影响

由实验(数据省略)可知, 适量的孢子浓度($10^7 \sim 10^8$ 个/ml)、搅拌转速(> 400r/min)和溶氧(> 80%)有利于小菌球的形成, 同时发现大量小菌球的形成对产酸有显著影响, 结果见图 7。

图 7 表明, 由于球状菌对氧的吸收效果较好, 它比丝状菌的产酸提高约 10%。

2.5 pH 值的控制。

在罐体发酵过程中通过流加 CaCO_3 来控制溶液的 pH, 发现如果 CaCO_3 添加过量或 pH 过低都不利于发酵, 实验中如果 pH 低于 4.5 则明显产生抑制, 如果 CaCO_3 添加过量, 则容易与菌丝体产生包裹现象。过量的碳酸钙混于液体中, 降低了液体的流动性, 不利于菌体

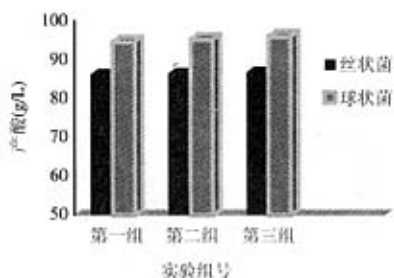


图7 菌体形态对产酸影响

Fig.7 Effect of microorganism morphology on the fermentation

对氧的吸收,也不利于菌球体的形成,因而在开始阶段控制 pH5.0,在菌体扩增的过程中,缓慢地使 pH 过渡到约 5.5,使得整个发酵过程基本接近中性,实验结果与一次性添加过量碳酸钙进行对比,发现产酸有所提高,见图 8。

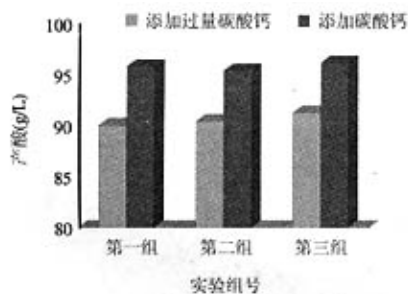


图8 pH控制方式对产酸影响

Fig.8 Effect of pH control models on the fermentation

2.6 消泡剂的控制

在发酵进行到菌体生长旺盛阶段,容易生成泡沫,即使控制转速和通气流量,仍会有部分泡沫,就需要消泡剂,如果添加过量消泡剂,则容易使得发酵液粘稠,不利于菌体呼吸,并且给后续分离带来困难,适量的消泡剂起到了消泡的效果,并有利于菌球体的形成。所以在发酵初期添加约 0.01% 的消泡剂,促进菌球的形成,在发酵进行到第 30h,菌体生长旺盛阶段,再流加约 0.1% 的消泡剂起消泡作用。表 1 说明,在菌球数量增多的同时产酸和生物量同时获得提高。

表1 消泡剂对发酵影响

Table 1 Effect of defoamer on the fermentation

控制方式	不加消泡剂	添加消泡剂
菌球当量直径(mm)	0.32	0.20
菌球体(个/ml)	450	1050
产酸(g/dl)	92.30	99.54
最高生物量(g/L)	7.0	7.2

3 结 论

本试验用甘薯淀粉作原料,以米根霉发酵生产 L-乳酸。在摇瓶优化培养的基础上,着重进行了 10L 罐发酵放大试验研究,探索出 10L 罐最适培养条件为: 4L 发酵液/罐,搅拌转速在发酵前期控制在 400r/min 左右,在发酵后期控制在 650r/min 左右,通气流量在发酵前期控制约 0.6L/(L·min),发酵后期控制约 0.5L/(L·min),溶氧控制在 88~95%,发酵温度 32℃,利用流加碳酸钙来控制 pH 值 5.0~5.5,消泡剂的添加采用在在发酵初期加 0.01% 和第 30 h 开始逐步流加 0.1%。在此发酵条件下,该菌株的罐发酵 L-乳酸累积浓度可达 99.54g/L,对原淀粉的转化率为 77%,最高生物量达 0.72g/dl。本研究为甘薯淀粉米根霉发酵生产 L-乳酸的后续中试放大了提供了重要的技术支持。

参考文献:

- [1] 曹本昌,徐建林,匡群. L-乳酸研究综述[J]. 食品与发酵工业, 1993, 19(3): 56-61.
- [2] 刘雄伟. 乳酸和聚乳酸的最新进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 27(3): 61-65.
- [3] 王博彦,金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, 349-354.
- [4] 虞东胜,周晓燕,王健,等. 米根霉发酵生产 L-乳酸[J]. 工业微生物, 2000, 30(3): 4-7.
- [5] 郑志,姜绍通,潘丽军,等. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, 26(3): 102-105.
- [6] 天津轻工学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. 16-17.
- [7] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999. 110-125.

会 讯

第三届国际小麦质量会议(Third International Wheat Quality Conference)IWQC-III 将于 2005 年 5 月 22~26 日在美国堪萨斯州曼哈顿市召开。具体通知请登陆 www.gmpc.ksu.edu/iwqc-iii 查询。

(美国堪萨斯州立大学丁玉敬教授提供)