

# 不同中和剂对米根霉发酵产 *L*- 乳酸的影响

姜绍通, 张巧兰, 吴学凤, 罗水忠, 潘丽军

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 在米根霉发酵产 *L*- 乳酸过程中, 采用  $\text{CaCO}_3$  作为中和剂会造成下游分离过程中膜堵塞和环保压力, 因此以  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和  $\text{NaOH}$  替代  $\text{CaCO}_3$  作中和剂, 对米根霉发酵产 *L*- 乳酸的工艺条件和发酵动力学进行研究。结果表明: 添加  $\text{CaCO}_3$  后 *L*- 乳酸产量平均提高 7.3 倍;  $\text{NaOH}$ 、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂的最佳浓度及质量分数分别为 10 mol/L、25%, 以该条件进行发酵 72 h 得菌丝体小球直径分别为 0.2~1.2 mm 和 1.2~2.2 mm, 残糖含量分别为 2.58 g/L 和 1.37 g/L, *L*- 乳酸产量分别为 74.34 g/L 和 80.61 g/L。

**关键词:** 米根霉; *L*- 乳酸; 中和剂; 发酵动力学

## Effect of Different Neutralizers on *L*-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae*

JIANG Shao-tong, ZHANG Qiao-lan\*, WU Xue-feng, LUO Shui-zhong, PAN Li-jun

(Key Laboratory for Agricultural Products Processing of Anhui Province, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Calcium carbonate added as the neutralizer during *Rhizopus oryzae* fermentation for *L*-lactic acid production would cause membrane fouling and environmental pressure during the downstream separation. As a consequence, ammonia and sodium hydroxide were separately used as a substitute for calcium carbonate in this study, and the fermentation conditions for *L*-lactic acid production and the fermentation kinetics were dealt with. Added calcium carbonate during *Rhizopus oryzae* fermentation resulted in an average 7.3-fold increase in *L*-lactic acid production. The optimal concentrations of added ammonia and sodium hydroxide were 10 mol/L and 25%, respectively. Mycelial pellets in diameter ranges between 0.2 mm and 1.2 mm and between 1.2 mm and 2.2 mm were formed after 72 h fermentation under these concentration conditions, and the residual sugar amounts were 2.58 g/L and 1.37 g/L and the *L*-lactic acid concentrations in the fermentation broths were 74.34 g/L and 80.61 g/L, respectively.

**Key words:** *Rhizopus oryzae*; *L*-lactic acid; neutralizer; fermentation kinetics

中图分类号: TQ921.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0114-04

*L*- 乳酸是一种重要的天然有机酸, 广泛应用于食品、医药、生物降解塑料等领域<sup>[1-3]</sup>。自然界中可产生 *L*- 乳酸的微生物有很多, 但米根霉因其营养要求简单, 产酸能力强且产品的光学纯度高而被普遍应用于工业生产<sup>[4-6]</sup>。在 *L*- 乳酸的发酵过程中, 发酵生成的 *L*- 乳酸可以作为一种解偶联剂, 使质子从培养基中进入细胞的质子泵。在这种情况下, 细胞的生长和 *L*- 乳酸的生成都会随着终产物 *L*- 乳酸的积累受到抑制。因此, 发酵过程中培养基的 pH 值和发酵产生的游离 *L*- 乳酸都会对米根霉菌体的生长和产物 *L*- 乳酸的生成带来影响<sup>[7-8]</sup>。在传统的 *L*- 乳酸发酵工艺中,  $\text{CaCO}_3$  是使用最为普遍的酸中和剂<sup>[8-9]</sup>。但使用  $\text{CaCO}_3$  作为中和剂时, 发酵罐中大量的  $\text{CaCO}_3$  容易使取料口堵塞; 在菌体生长过程中, 容易产

生米根霉菌体包埋现象; 在发酵中后期, 高浓度的乳酸钙使发酵液变得黏稠, 生成大量泡沫, 造成跑料, 易染菌<sup>[10]</sup>; 或发生固化现象, 使发酵难以继续。另外, 使用  $\text{CaCO}_3$  作为中和剂时, 发酵液的主要成分是粗乳酸钙, 在 *L*- 乳酸的下游分离提取过程中, 产生的大量硫酸钙不仅在过滤中会造成膜堵塞, 造成乳酸损失, 而且产生的大量硫酸钙废渣会造成严重的环保压力和废渣处理成本, 不利于 *L*- 乳酸大规模生产的可持续发展<sup>[11-12]</sup>。因此, 寻求新型中和剂代替传统的  $\text{CaCO}_3$  中和剂具有十分重要的现实意义, 受到乳酸生产商和研究者的高度关注。本实验通过以  $\text{NaOH}$  和  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  替代  $\text{CaCO}_3$  作为米根霉发酵产 *L*- 乳酸的中和剂, 以 *L*- 乳酸产量为指标, 对  $\text{Ca}^{2+}$  添加量、菌体形态、中和剂最适浓度和发酵动力学进行研究。

收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z361); 安徽省自然科学基金项目(090411015)

作者简介: 姜绍通(1954—), 男, 教授, 主要从事农产品生物化工研究。E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

米根霉 AS3.819 为合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种。

#### 1.1.2 培养基

菌种保藏斜面培养基：马铃薯葡萄糖培养基(PDA)；以 NaOH 作为中和剂发酵培养基(g/L)：葡萄糖 120、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.35、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.10、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15；以  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂发酵培养基(g/L)：葡萄糖 120、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.35、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.15、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 摇瓶发酵

250mL 三角瓶中装液量 50mL，121℃ 灭菌 15min，接种 1mL 孢子悬液( $5 \times 10^6$  个/mL)，200r/min 摇床上 32℃ 振荡培养 72h。

#### 1.2.2 7L 发酵罐发酵

7L 发酵罐中装液量 5L，通气量 6L/min，搅拌转速 300r/min，pH 值：分别流加 NaOH、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  溶液均保持 pH 值在 5.5 左右，32℃ 下培养 72h。

### 1.3 检测方法

*L*-乳酸产量测定：HPLC 法<sup>[13]</sup>；还原糖含量测定：3,5-二硝基水杨酸(DNS 法)；生物量测定：菌体干质量法<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 添加量的影响

$\text{Ca}^{2+}$  在菌丝体的生长和菌丝球的形成过程中起着非常重要的作用。分别以 NaOH、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂，在发酵培养基中加入不同量的  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{CaCl}_2$  进行摇瓶实验，结果如图 1~4 所示。

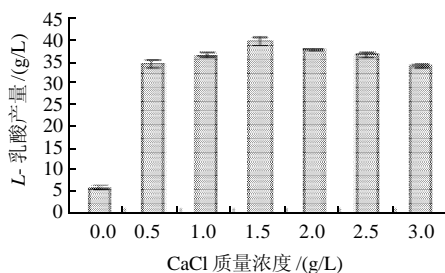


图1 NaOH 作中和剂  $\text{CaCl}_2$  质量浓度对 *L*-乳酸产量的影响  
Fig.1 Effect of  $\text{CaCl}_2$  concentration on *L*-lactic acid production with NaOH as the neutralizer

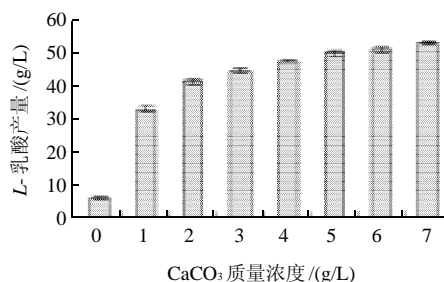


图2 NaOH 作中和剂  $\text{CaCO}_3$  质量浓度对 *L*-乳酸产量的影响  
Fig.2 Effect of  $\text{CaCO}_3$  concentration on *L*-lactic acid production with NaOH as the neutralizer

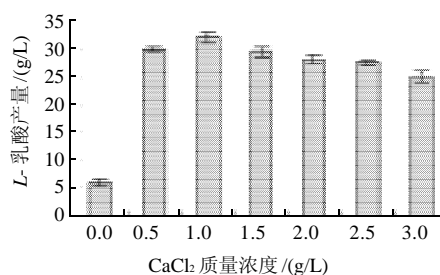


图3  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作中和剂  $\text{CaCl}_2$  质量浓度对 *L*-乳酸产量的影响  
Fig.3 Effect of  $\text{CaCl}_2$  concentration on *L*-lactic acid production with  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  as the neutralizer

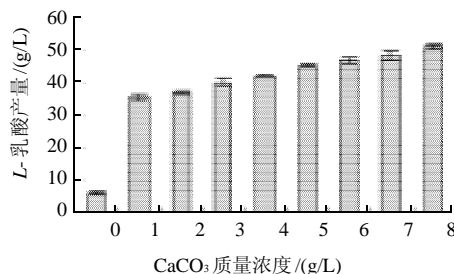


图4  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作中和剂  $\text{CaCO}_3$  质量浓度对 *L*-乳酸产量的影响  
Fig.4 Effect of  $\text{CaCO}_3$  concentration on *L*-lactic acid production with  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  as the neutralizer

由图 1、3 可知，添加  $\text{Ca}^{2+}$  后 *L*-乳酸产量显著提高。随着  $\text{CaCl}_2$  质量浓度增加，*L*-乳酸产量先上升后下降，可能是高质量浓度的  $\text{Cl}^-$  对菌体有毒害作用，因此不采用  $\text{CaCl}_2$ ；由图 2、4 可知，随着  $\text{CaCO}_3$  质量浓度增加，*L*-乳酸产量不断提高，参照最佳  $\text{CaCl}_2$  最佳质量浓度，选用 2g/L  $\text{CaCO}_3$ ，因  $\text{CaCO}_3$  易在发酵罐中沉淀，无法完全利用，可适当增加  $\text{CaCO}_3$  用量。如图 1、2 所示，以 NaOH 作为中和剂时，添加  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{CaCl}_2$  后 *L*-乳酸最大产量分别是未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的 8.8 倍和 6.6 倍。如图 3、4 所示，以  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂时，添加  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{CaCl}_2$  后 *L*-乳酸最大产量分别是未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的 8.5 倍和 5.3 倍。

## 2.2 中和剂质量浓度对 *L*-乳酸产量及 *L*-乳酸 / 葡萄糖总得率的影响

### 2.2.1 NaOH 浓度对 *L*-乳酸产量及 *L*-乳酸 / 葡萄糖总得率的影响

在 7L 发酵罐中对 NaOH 浓度进行优化, 且由于低产量 NaOH 溶液和高浓度 NaOH 溶液加入的量不同使最终 *L*-乳酸浓度产生差别, 因此将发酵完成时的发酵罐总体积内 *L*-乳酸的质量与初始葡萄糖质量进行对比得出 *L*-乳酸 / 葡萄糖总得率, 结果如图 5 所示。

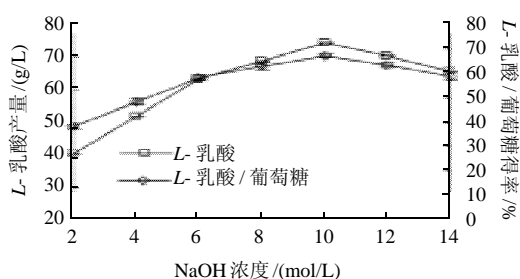


图 5 NaOH 浓度对 *L*-乳酸产量及 *L*-乳酸 / 葡萄糖得率的影响  
Fig.5 Effect of NaOH concentration on *L*-lactic acid production and the ratio of *L*-lactic acid production to initial glucose amount

由图 5 可知, 在 2~10mol/L 范围内, *L*-乳酸产量随着 NaOH 浓度增大而增多, *L*-乳酸 / 葡萄糖得率也不断增加; 而超过 10mol/L 时 *L*-乳酸产量下降, 可能是随着 NaOH 浓度的增加, 碱性增强, 流加时发酵罐内局部碱性很大, 对菌体的毒害作用增强, 导致部分菌体死亡, 有效菌体量减少, 从而使 *L*-乳酸产量相应减少, *L*-乳酸 / 葡萄糖得率也下降, 因此选择 10mol/L 为最佳浓度, 在此浓度下 *L*-乳酸产量为 74.34g/L。

### 2.2.2 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 质量分数对 *L*-乳酸产量及 *L*-乳酸 / 葡萄糖总得率的影响

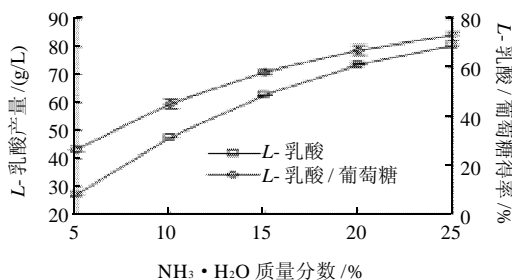


图 6  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  质量分数对 *L*-乳酸产量及 *L*-乳酸 / 葡萄糖得率的影响

Fig.6 Effect of  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  concentration on *L*-lactic acid production and the ratio of *L*-lactic acid production to initial glucose amount

在 7L 发酵罐中对  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  质量分数进行优化, 且由于低质量分数  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和高质量分数  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  加入的量不同使最终 *L*-乳酸产量产生差别, 因此将发酵完成时的发酵罐总体积内 *L*-乳酸的质量与初始葡萄糖质量进行对比得出 *L*-乳酸 / 葡萄糖总得率, 结果见图 6。

由图 6 可知, 随着  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  质量分数的增大, *L*-乳酸产量不断上升, *L*-乳酸 / 葡萄糖得率也不断增加, 分析原因可能是因为  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  不仅能中和发酵产生的 *L*-乳酸, 还可以作为氮源促进米根霉菌体的生长, *L*-乳酸的产生导致发酵罐内 pH 值下降,  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  流加进入发酵罐, 发酵液中  $\text{NH}_4^+$  浓度不断增加,  $\text{NH}_4^+$  一部分作为氮源供米根霉菌体生长所用, 一部分中和 *L*-乳酸产生 *L*-乳酸铵, 因此  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  可能是米根霉发酵产 *L*-乳酸比较理想的中和剂。由于市面所售  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  最高质量分数为 25%, 因此选择 25%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 此质量浓度下 *L*-乳酸产量为 80.61g/L。

### 2.3 不同中和剂的菌体形态

分别使用 10mol/L NaOH 和 25%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为米根霉发酵产 *L*-乳酸的中和剂, 在 7L 发酵罐中发酵 72 h, 发酵液澄清透明, 米根霉菌体形成菌丝体小球, 无任何碳酸钙包埋现象, 其中以  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂时, 米根霉的菌体形态较为合适, NaOH 作为中和剂时菌球偏小, 如表 1 所示。发酵初期的前 24 h, 米根霉菌体呈絮状, 24 h 后开始形成菌丝体小球, 到发酵终点时菌体丝小球直径分别为 0.2~1.2mm 和 1.2~2.2mm, 发酵终点米根霉菌丝体小球形态如图 7、8 所示。

表 1 中和剂对米根霉菌丝体生长的影响

| 中和剂                                    | 菌球直径 / mm | 菌球形成时间 / h | 生物量 / (g/L) |
|--|-----------|------------|-------------|
| NaOH                                   | 0.2~1.2   | 24         | 9.48        |
| $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1.2~2.2   | 30         | 9.69        |

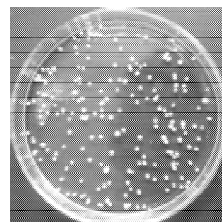
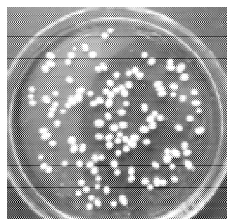


图 7 NaOH 作为中和剂时的菌球形态  
Fig.7 Mycelial pellets of *Rhizopus oryzae* with NaOH as the neutralizer

图8  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂时的菌球形态Fig.8 Mycelial pellets of *Rhizopus oryzae* with  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  as the neutralizer

## 2.4 不同中和剂的发酵动力学

2.4.1 以 10mol/L NaOH 作为中和剂时发酵动力学曲线  
测定发酵液中的米根霉生物量、葡萄糖质量浓度和 L-乳酸质量浓度, 得出以 10mol/L NaOH 作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂的动力学, 结果如图 9 所示。

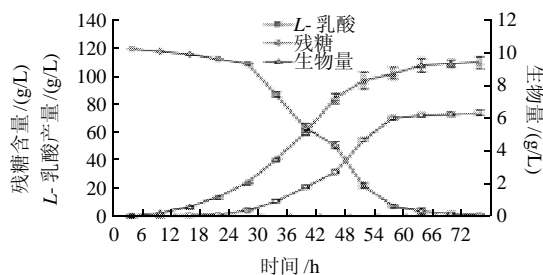
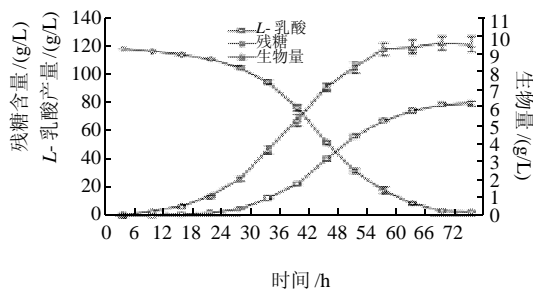


图9 以 NaOH 作为中和剂的发酵动力学曲线

Fig.9 Fermentation kinetic curve with NaOH as the neutralizer

由图 9 可知, 米根霉菌体的生长曲线和 L-乳酸的生成曲线都呈 S 形。发酵初期 0~24h, 以菌体的生长为主, 产酸很少, 葡萄糖消耗速度缓慢。24h 后进入产酸旺盛期, L-乳酸的合成与米根霉菌体的生长同步, L-乳酸产量增加的趋势与米根霉菌丝体增长的趋势基本一致, 葡萄糖的消耗速度加快。54h 后菌丝体含量变化不大, 耗糖速度和产酸均变缓慢, 发酵进入稳定期, 72h 发酵结束, L-乳酸的产量达到峰值。

2.4.2 以 25%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂时的发酵动力学曲线

图10 以  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为中和剂的发酵动力学曲线Fig.10 Fermentation kinetic curve with  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  as the neutralizer

测定发酵液中的米根霉生物量、葡萄糖质量浓度和 L-乳酸质量浓度, 研究以 25%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂的菌体生长、糖代谢和产酸动力学, 结果如图 10 所示。

由图 10 可知, 米根霉菌体的生长曲线和 L-乳酸的生成曲线都呈 S 形, 葡萄糖消耗曲线呈反 S 形。发酵初期 12h, 菌体生长缓慢, 菌丝体含量与 L-乳酸产量很少。24~60h 进入米根霉生长与 L-乳酸生产旺盛期, 菌体迅速生长, 葡萄糖的消耗速度加快, L-乳酸产量也随之迅速增加。60h 后进入稳定期, L-乳酸增加缓慢, 72h 发酵结束, L-乳酸产量达最高值。

## 3 结 论

本研究利用 NaOH 和  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  作为米根霉发酵产 L-乳酸的中和剂, 通过  $\text{Ca}^{2+}$  添加量、菌体形态、中和剂最佳浓度、动力学测定研究得出:  $\text{Ca}^{2+}$  在米根霉菌体生长过程中起非常重要的作用, 其中  $\text{CaCO}_3$  优于  $\text{CaCl}_2$ , 添加了  $\text{CaCO}_3$  后 L-乳酸产量平均提高 7.3 倍;  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、NaOH 作为米根霉发酵产 L-乳酸中和剂的最佳浓度及质量分数分别为 25% 和 10mol/L, 在最佳质量浓度下进行 7L 罐发酵 72h, 残糖量分别达到 2.58g/L 和 1.37g/L, L-乳酸产量分别达到 74.34g/L 和 80.61g/L。

## 参考文献:

- [1] RATHIN D. Hydroxycarboxylic acids[J]. Encyclopedia of Chemical Technology, 1995, 13: 1042-1062.
- [2] RATHIN D. The technology and economy potential of poly (lactic acid) and its ramification[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16: 221-231.
- [3] 白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 等. 米根霉发酵生产 L-(+)-乳酸研究进展[J]. 现代化工, 2002, 22(6): 9-12.
- [4] 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, 2007: 337-389.
- [5] 王蓉, 王远亮, 陈国平, 等. 米根霉发酵生产 L-(+)-乳酸研究进展[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2004(12): 95-97.
- [6] 赵宏宇, 赵靖, 郑春丽, 等. 米根霉乳酸发酵的研究进展[J]. 天津化工, 2007(1): 7-9.
- [7] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH 值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2002(6): 35-38.
- [8] 徐国谦, 储炬, 王永红, 等. 不同的中和剂对 L-(+)-乳酸发酵的影响[J]. 工业微生物学, 2007(4): 1-5.
- [9] 闫智慧, 白冬梅, 高静, 等. 氨水中和 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Lactis BME5-18M 发酵生成 L-乳酸的研究[J]. 微生物学通报, 2004 (4): 31-33.
- [10] 匡群, 孙梅, 施大林, 等. 耐氨米根霉发酵生产 L-乳酸的研究[J]. 生物技术, 2005(4): 65-67.
- [11] MIURA S, DWIARTI L, ARIMUR T, et al. Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004(1): 19-23.
- [12] LI Xingang, XU Shimin. Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19(1): 47-51.
- [13] 郑志, 姜绍通, 潘丽军, 等. 反相高效液相色谱法测定发酵液中乳酸的含量[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 89-91.
- [14] 贾士儒. 生物工艺与工程实验技术[M]. 中国北京: 轻工业出版社, 2002: 1-4.