

米根霉菌丝球半连续发酵产乳酸的工艺研究^{*}

姜绍通 吴学凤 潘丽军 赖清达 吴志叶

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

【摘要】 采用单因素试验和正交试验设计,以乳酸质量浓度及菌丝形态为考察指标,对米根霉首批发酵培养基及补料培养基进行优化,得到适于米根霉半连续发酵的培养基,建立了米根霉半连续发酵工艺,并进行米根霉半连续发酵产乳酸的稳定性试验。得到首批培养基参数为葡萄糖 120 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, NaH_2PO_4 0.16 g/L, KH_2PO_4 0.14 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L, CaCO_3 60 g/L; 补料培养基参数为葡萄糖 100 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.33 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L, CaCO_3 50 g/L, 摇瓶重复稳定发酵 30 批次, 罐发酵重复稳定发酵 20 批次, 葡萄糖转化率最高达到 86%。

关键词: 乳酸 米根霉 半连续发酵 菌丝球

中图分类号: TQ921⁺.3

文献标识码: A

Production of Lactic Acid by Pellets of *Rhizopus oryzae* in Semi-continuous Fermentation

Jiang Shaotong Wu Xuefeng Pan Lijun Lai Qingda Wu Zhiye

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

By using single-factor test and orthogonal test, the optimized seed medium and feeding medium were obtained, with the aim to study the stability of the production of lactic acid by *Rhizopus oryzae* though semi-continuous fermentation. The optimization culture medium was as follows: glucose 120 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, NaH_2PO_4 0.16 g/L, KH_2PO_4 0.14 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L, CaCO_3 60 g/L; the feeding medium was as follows: glucose 100 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.33 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L, CaCO_3 50 g/L. In flask culture 30 repeated stable fermentation were carried out, and 20 batches were carried out in a 5 L stirred tank fermentor. The highest lactic acid yield from glucose was up to 86%.

Key words L-lactic acid, *Rhizopus oryzae*, Semi-continuous fermentation, Pellets

引言

微生物发酵生产乳酸主要有乳酸菌发酵及根霉发酵两种方法,其中根霉发酵时对营养要求简单,菌丝体大,易于重复利用,易于分离,并且根霉发酵得到的乳酸为高光学纯度的 L-乳酸^[1~4],因此根霉发酵法已经成为乳酸发酵生产的研究热点。目前常用的根霉发酵生产工艺已经不能满足市场对乳酸日益增长的需求,乳酸的高效生产是亟待解决的问题。

重复利用菌体进行半连续发酵可以很大程度提高乳酸的生产效率,实现该工艺的关键是得到适于重复利用的大小合适、结构致密的菌丝体小球。一些研究者对培养基成分如碳源^[5~6]、氮源^[7]、 Na^+ 、 K^+ ^[8~9]等对米根霉发酵产酸及菌丝体形态的影响进行了研究。研究者大多把培养基的一种成分作为研究对象,比较系统全面的研究报道还很少,利用生成的菌丝球进行半连续发酵的研究也很少。

本文对米根霉半连续发酵产乳酸的首批发酵培

收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2009-02-26

^{*} 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2007AA10Z361)和安徽省农产品精深加工重点实验室项目(2009AKSY0102)

作者简介: 姜绍通,教授,主要从事农产品加工与利用研究, E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

培养基及补料培养基进行优化,在此基础上对半连续发酵的稳定性进行初步研究,以期为米根霉半连续发酵产乳酸的工业化提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

米根霉 As3.819(合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种)保存在 PDA 培养基上,每 2 个月转移一次斜面。孢子由 PDA 培养基产生,用无菌蒸馏水清洗孢子制成悬液(菌体浓度为 10^7 cfu/mL)。

1.2 试剂及主要仪器

葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、NaOH、乙二胺四乙酸二钠、琼脂,广东汕头市西陇化工厂。

721 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司; THZ-82A 气浴恒温振荡器,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;5 L 机械搅拌发酵罐,镇江东方生物工程公司。

1.3 培养基

1.3.1 摇瓶首批发酵培养基

葡萄糖 120 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, NaH_2PO_4 0.16 g/L, KH_2PO_4 0.14 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 g/L, $CaCO_3$ 60 g/L。

1.3.2 摇瓶半连续补料培养基

葡萄糖 80 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.33 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g/L, $CaCO_3$ 40 g/L。

1.3.3 罐发酵培养基

培养基与摇瓶首批及半连续补料发酵培养基相同。

1.4 试验方法

1.4.1 摇瓶首批发酵培养基优化试验

通过查阅资料及实验室研究资料^[8],对米根霉首批发酵产乳酸培养基中的主要成分进行考察,分别对葡萄糖、氮源种类及其质量浓度、 Na^+/K^+ 比、 $H_2PO_4^-$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度进行单因素试验,考察不同成分及其质量浓度对发酵产酸及菌丝体形态的影响。在此基础上选择影响较大的因素进行正交优化实验,以乳酸质量浓度和成球效果为考察指标,运用极差、方差法分析试验结果。培养方法为:250 mL 三角瓶,装液量 20%,接种孢子悬液(菌体浓度为 10^7 cfu/mL) 4%,摇床转速 200 r/min,32℃ 恒温培养 72 h。

1.4.2 摇瓶补料培养基优化试验

通过查阅资料及实验室研究资料,对半连续发

酵补料培养基各因素进行正交优化试验。以乳酸质量浓度为考察指标,运用极差及方差法分析试验结果。培养方法:首批发酵 72 h 结束,静置摇瓶 5 min,取出发酵上清液 45 mL,保留沉淀在瓶底的米根霉菌丝球,添加 45 mL 新鲜补料培养基,200 r/min 32℃ 恒温振荡培养 24 h,单批发酵结束;静置摇瓶 5 min,取出发酵上清液 45 mL,保留沉淀在瓶底的米根霉菌丝球,添加 45 mL 新鲜补料培养基,200 r/min 32℃ 恒温振荡培养 24 h,如此重复进行半连续发酵。检测每批次的葡萄糖转化率。

1.4.3 发酵罐半连续发酵稳定性试验

5 L 机械搅拌发酵罐,装液量 3.5 L,首批发酵转速 400 r/min、32℃,通气量 2.4 L/(L·min),发酵 60 h 结束,停止搅拌和通气,保持发酵罐内压力为 0.1 个大气压,静置发酵液 10 min 使米根霉菌丝球沉淀在罐底,通过罐内压力取出发酵上清液 3 L,添加 3 L 新鲜补料培养基,保持发酵转速 400 r/min、32℃ 恒温,通气量 2.4 L/(L·min),发酵 24 h 后重复取料、补料及发酵,如此重复进行半连续发酵。检测每批次的葡萄糖转化率。

1.5 检测方法

1.5.1 乳酸质量浓度

乳酸质量浓度采用 EDTA 定钙法^[8]测定,计算公式为

$$\rho_{LA} = \frac{2McV_x}{V_c} \quad (1)$$

式中 M ——乳酸的摩尔质量,取 90.08 g/mol

c ——EDTA 溶液的浓度,取 0.05 mol/L

V_x ——滴定终点所用 EDTA 溶液的体积, mL

V_c ——吸取发酵液的体积,常取 1 mL

1.5.2 葡萄糖转化率

葡萄糖转化率计算公式为

$$\eta = \frac{\rho_{LA}}{\rho_{Glu}} \times 100\% \quad (2)$$

式中 ρ_{Glu} ——初始葡萄糖质量浓度, g/L

2 结果与分析

2.1 摇瓶首批发酵培养基优化试验

2.1.1 葡萄糖质量浓度

从表 1 中可以看出,葡萄糖质量浓度对发酵具有显著影响,糖质量浓度较低时,菌丝体量较少且成丝状,随着糖质量浓度的逐渐增加,渗透压不断增大,对菌丝体的代谢、产物的合成及氧的传递造成很大影响,乳酸浓度增幅减缓,转化率降低。葡萄糖质

量浓度为 120 g/L 时,产乳酸量达 95.3 g/L,葡萄糖转化率最高,为 79.42%,此时菌体成球均匀,菌丝球直径为 1.0~2.0 mm。

2.1.2 N 源种类及其质量浓度

表 1 显示, NH_4NO_3 为 3 g/L 时菌体产乳酸量最高,为 90.25 g/L,通过观察菌体成球规律可知此时菌丝成球规则,菌丝球较大直径为 1.5~2.5 mm; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 4 g/L 时,产乳酸量最高为 93.85 g/L,菌体成球直径 0.5~2 mm。随着两种氮源质量浓度的增加,产乳酸量先增加,后逐渐减少。氮源质量浓度的过量,导致了大量菌丝体的生长,消耗较多的葡萄糖及其他无机盐类,影响乳酸的生成。

2.1.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度

Mg^{2+} 不仅影响米根霉菌体生长,也影响乳酸脱氢酶活性^[10] 从而影响乳酸的生产。由表 1 可知, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度过低或过高都不利于乳酸的产生,低质量浓度时,发酵液中菌丝体量较少,产酸少。当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度达 0.25 g/L 时,

菌丝体逐渐形成小球,此时产酸达 93.98 g/L。当质量浓度达 0.35 g/L 时,菌丝体逐渐形成为团状,并一定程度的包裹碳酸钙,影响乳酸的产生。

当 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0 g/L 时,没有菌体及乳酸的产生,可见 Zn 是微生物正常生长代谢不可缺少的元素,当 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.44 g/L 时菌丝体基本呈细小圆球状,分散均匀,此时产酸达到最高 95.45 g/L。由表 1 可知当 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.66 g/L 时,菌丝体呈絮状,乳酸质量浓度下降为 85.70 g/L。

2.1.4 Na^+/K^+ 比、 H_2PO_4^- 质量浓度

如表 1 所示, Na^+/K^+ 比为 1:1 时均为菌丝球形式,直径为 0.5~1.5 mm,且乳酸质量浓度最高为 86.13 g/L。磷酸盐是发酵生产中的一种限制性营养成分,对发酵有显著影响^[6]。由表 1 可知当 H_2PO_4^- 的质量浓度为 0.2 g/L 时,发酵液中的菌丝体成粒状絮凝,且有较多规则小菌球,成球最好,乳酸质量浓度高达 86.95 g/L。

表 1 培养基成分对乳酸质量浓度及菌体形态的影响

Tab.1 Effects of contents of the culture on lactic acid production and the morphology

葡萄糖质量浓度/g·L ⁻¹	80	100	120	140	
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	63.25	78.65	95.30	110.50	
菌体形态	菌丝	菌球、丝状絮凝	菌球、粒状絮凝	菌丝絮凝	
NH_4NO_3 质量浓度/g·L ⁻¹	1	2	3	4	5
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	81.90	85.05	90.25	79.65	73.10
菌体形态	少许菌丝	菌丝	菌球、粒状絮凝	粒状絮凝	丝状絮凝
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度/g·L ⁻¹	1	2	3	4	5
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	81.00	83.70	88.52	93.85	73.20
菌体形态	少许菌丝	菌丝	菌球、粒状絮凝	菌球	丝状絮凝
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/g·L ⁻¹	0	0.15	0.25	0.35	0.45
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	6.75	79.20	93.98	89.45	83.40
菌体形态	几乎无菌体	菌丝	菌球	粒状絮凝	丝状絮凝
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度/g·L ⁻¹	0	0.11	0.22	0.44	0.66
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	70.30	92.70	95.45	85.70
菌体形态	几乎无菌体	菌丝	菌球、粒状絮凝	菌球	丝状絮凝
Na^+/K^+ 比	4:1	2:1	1:1	1:2	1:4
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	76.30	78.91	86.13	81.67	81.30
菌体形态	菌块	粒状絮凝	菌球	丝状絮凝	菌块
H_2PO_4^- 质量浓度/g·L ⁻¹	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
$\rho_{\text{LA}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	83.70	86.95	83.75	81.00	76.50
菌体形态	粒状絮凝	菌球、粒状絮凝	丝状絮凝	菌丝	菌块

2.1.5 首批发酵培养基优化试验

首批发酵培养基正交优化试验安排与结果见表 2、3。

由表 3 知,因素的主次顺序依次为 B、C、D、A,通过因素与指标的关系得到因素水平为 $A_1B_2C_1D_2$ 。按照因素最佳组合水平进行验证试

验,乳酸质量浓度 97.2 g/L,高于正交试验的第 1 组乳酸质量浓度。

通过方差分析,用 F 检验可知 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对试验结果有高度显著影响。因此,确定培养基参数为葡萄糖质量浓度 120 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度 2 g/L, NaH_2PO_4 质量浓度 0.16 g/L, KH_2PO_4 质量

表 2 首批发酵培养基正交试验因素水平表

Tab.2 Factor and level of the optimized culture medium

水平	因素				空列 E
	C/N 比	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	H ₂ PO ₄ ⁻	
	A	质量浓度 B/g·L ⁻¹	质量浓度 C/g·L ⁻¹	质量浓度 D/g·L ⁻¹	
1	120/2	0.11	0.20	0.15	
2	120/3	0.22	0.25	0.20	
3	120/4	0.33	0.30	0.25	
4	120/5	0.44	0.35	0.30	

表 3 首批发酵培养基正交试验优化结果

Tab.3 Results of the optimized culture medium

试验 序号	A	B	C	D	E	乳酸 质量浓度 /g·L ⁻¹
1	1	1	1	1	1	96.75
2	1	2	2	2	2	94.51
3	1	3	3	3	3	89.67
4	1	4	4	4	4	76.15
5	2	1	2	3	4	90.38
6	2	2	1	4	3	93.18
7	2	3	4	1	2	78.19
8	2	4	3	2	1	83.56
9	3	1	3	4	2	87.16
10	3	2	4	3	1	89.46
11	3	3	1	2	4	88.05
12	3	4	2	1	3	78.75
13	4	1	4	2	3	89.97
14	4	2	3	1	4	90.46
15	4	3	2	4	1	85.16
16	4	4	1	3	2	79.49
<i>k</i> ₁	89.270	91.065	89.368	86.038	88.733	
<i>k</i> ₂	86.328	91.903	87.200	89.023	84.838	<i>T</i> =1 390.89
<i>k</i> ₃	85.855	85.268	87.713	87.250	87.893	
<i>k</i> ₄	86.270	79.488	83.443	85.413	86.260	
<i>R</i>	3.42	12.42	5.93	3.61	3.89	
<i>SS</i> _F	0.82	11.10	2.09	0.84	1.00	

注: $F_{0.05}(3,32) = 8.62$ 。

表 4 补料培养基正交试验因素水平

Tab.4 Factor and level of the optimized feeding medium

水平	因素				
	葡萄糖质量	(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量	KH ₂ PO ₄ 质量	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 质量	MgSO ₄ ·7H ₂ O 质量
	浓度 H/g·L ⁻¹	浓度 I/g·L ⁻¹	浓度 J/g·L ⁻¹	浓度 K/g·L ⁻¹	浓度 L/g·L ⁻¹
1	70	1	0.005	0.11	0.15
2	80	2	0.075	0.22	0.25
3	90	3	0.100	0.33	0.35
4	100	4	0.125	0.44	0.45

浓度 0.14 g/L, MgSO₄·7H₂O 质量浓度 0.2 g/L, ZnSO₄·7H₂O 质量浓度 0.22 g/L, CaCO₃ 质量浓度 60 g/L。

2.2 摇瓶补料发酵培养基的确定

米根霉菌体经第 1 批发酵增殖完毕,半连续发酵的培养基组成与首批发酵培养基有所不同。碳源绝大部分用于发酵转化为乳酸,氮源、无机盐只需维持细胞正常生理活动即可,而不必用于细胞生长。由此在文献[8]的基础上进行补料培养基正交优化试验,寻找最佳补料培养基。试验安排与结果见表 4~6。

由表 5 可知,因素的主次顺序依次为 H、K、I、L、J,通过因素与指标的关系得到因素水平为 H₂I₂J₃K₃L₁。按照最佳组合水平 H₂I₂J₃K₃L₁ 进行验证试验,乳酸的质量浓度为 67.38 g/L,葡萄糖的转化率为 84.23%。通过方差分析,用 F 检验可知因素 H、I、K、L 对试验结果均有高度显著的影响,因素 J 对试验结果有影响。因此,确定补料培养基参数为葡萄糖质量浓度 80 g/L, (NH₄)₂SO₄ 质量浓度 2 g/L, KH₂PO₄ 质量浓度 0.1 g/L, ZnSO₄·7H₂O 质量浓度 0.33 g/L, MgSO₄·7H₂O 质量浓度 0.15 g/L, CaCO₃ 质量浓度 40 g/L。

2.3 摇瓶发酵稳定性研究

由图 1 可知,米根霉重复发酵 30 批次,葡萄糖转化率稳定在 80% 左右,最高可达到 86%。重复批次发酵周期保持在 24 h 左右,稳定性良好。

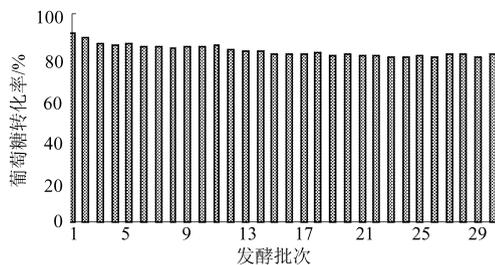


图 1 米根霉半连续发酵产乳酸稳定性

Fig.1 Stability of the production of lactic acid by *Rhizopus oryzae* through semi-continuous fermentation

表5 补料培养基正交试验优化结果
Tab.5 Results of the optimized feeding medium

试验序号	H	I	J	K	L	葡萄糖转化率/%			均值
						1	2	3	
1	1	1	1	1	1	75.62	76.16	75.95	75.91
2	1	2	2	2	2	81.23	80.23	78.63	80.03
3	1	3	3	3	3	80.25	79.65	79.10	79.67
4	1	4	4	4	4	65.23	63.25	65.01	64.50
5	2	1	2	3	4	79.24	80.24	81.54	80.34
6	2	2	1	4	3	81.20	81.45	80.52	81.06
7	2	3	4	1	2	83.12	83.45	82.13	82.90
8	2	4	3	2	1	79.54	80.21	81.24	80.33
9	3	1	3	4	2	67.58	68.54	68.19	68.10
10	3	2	4	3	1	78.16	80.19	78.01	78.79
11	3	3	1	2	4	73.15	73.16	73.95	73.42
12	3	4	2	1	3	69.89	71.09	70.23	70.40
13	4	1	4	2	3	75.36	76.12	76.12	75.87
14	4	2	3	1	4	80.53	78.96	79.64	79.71
15	4	3	2	4	1	75.85	75.65	74.19	75.23
16	4	4	1	3	2	78.31	77.13	76.30	77.25
k_1	75.026	75.055	76.908	77.231	77.564				
k_2	81.157	79.896	76.501	77.412	77.070				
k_3	72.678	77.804	76.953	79.010	76.748			$T=280\ 677.18$	
k_4	77.013	73.119	75.513	72.222	74.492				
R	8.478	6.777	1.440	6.788	3.073				

表6 补料培养基试验方差分析

Tab.6 Analysis of variance

来源	SS	自由度	MMS	F 值	显著性
H	464.669	3	154.890	224.574	**
I	320.960	3	106.987	155.119	**
J	16.112	3	5.371	7.787	*
K	311.586	3	103.862	150.589	**
L	66.582	3	22.194	32.179	**
误差	22.071	32	0.690		
总和	1 201.979 198	47	25.574		

注: $F_{0.01}(3, 32) = 26.5$, $F_{0.05}(3, 32) = 8.62$, $F_{0.1}(3, 32) = 5.17$, $F_{0.25}(3, 32) = 2.47$ 。

很多研究者对真菌菌丝成球特性进行了研究^[8,11~14],由发酵过程观察,首批发酵菌球比较疏松,随着批次补料的进行,菌球逐渐致密,菌体颜色不断加深由原来的白色慢慢变成如图2所示棕色,同时在发酵过程中有许多浅色菌丝体出现,伴随发酵的进行,这种新生的菌丝体一直存在(图2b),同时又有少量的老菌球破裂成片状,漂浮在发酵液上层,在补料过程中会随发酵上清液一起取出。初步分析半连续发酵之所以能够持续进行达30批且产率一直很高,一方面是由于真菌本身就是一种生长

周期较长的微生物,有的菌丝能够存活达一、二十天;另一方面,在补料进行的同时有一些新生的菌丝、菌丝球形成,使得发酵液中菌体不断增多,发酵得以持续;再次,菌球本身也是由菌丝缠绕形成的,在中空的菌丝球内外部也在存在着新旧菌丝的更替过程,一部分衰老的菌丝死亡自溶的同时又有新的菌丝产生,接替缠绕形成菌丝球生产乳酸的工作。

2.4 罐发酵稳定性研究

由图3可知,米根霉重复发酵20批次,葡萄糖转化率稳定在80%左右,最高可达到86%,稳定性良好。与摇瓶发酵不同的是,在半连续发酵过程中,尤其是在补料5批之后,发酵罐内破裂菌丝体逐渐

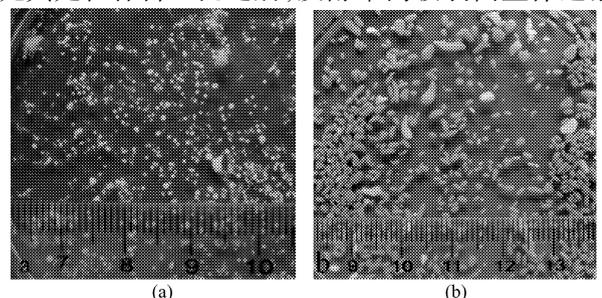


图2 米根霉半连续发酵产乳酸过程中菌丝球

Fig.2 Pellets of the *Rhizopus oryzae* in the semi-continuous fermentation

(a) 发酵第1批次菌丝球 (b) 发酵第30批次菌丝球

增多。对比摇瓶发酵与罐发酵条件的差别,初步分析是由于发酵罐内采用机械搅拌,其对菌体的剪切力较大,一些逐渐衰亡的菌丝球在较强的剪切力作

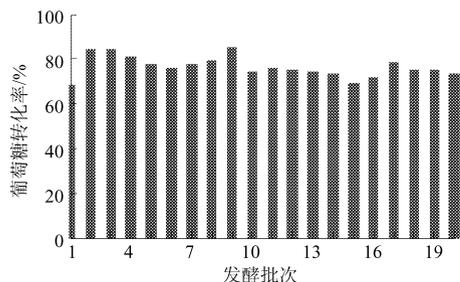


图 3 米根霉半连续发酵产乳酸稳定性(罐发酵)

Fig. 3 Stability of the production of lactic acid by *Rhizopus oryzae* through semi-continuous fermentation in a 5 L stirred tank fermentor

用下开始破裂形成片状。一些研究者采用气升发酵罐^[12],减少了搅拌剪切力对菌丝球形成的伤害。

3 结束语

米根霉半连续发酵生产乳酸具有发酵周期短,菌体重复使用稳定、发酵强度高优点,是一种比较理想的生产乳酸的方法。通过单因素试验结合正交试验,优化了米根霉半连续发酵生产乳酸的发酵培养基,实现了米根霉多批次、高浓度发酵生产乳酸。并对多批次发酵稳定性进行了验证,通过摇瓶发酵可知,菌体可以重复利用 30 批次以上,罐发酵菌体可以重复利用 20 批次以上,这说明米根霉半连续发酵产乳酸的扩大化生产是可以实现的。

参 考 文 献

- Zhan Y Z, Jin B, Kelly J M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 35(3): 251~263.
- Rojan P J, Nampoothiri K M, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 524~534.
- Liao W, Liu Y, Frear C. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus—*Rhizopus oryzae* [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(10): 3 415~3 423.
- Bai D M, Jia M Z, Zhao X M. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor[J]. Chemical Engineering Science, 2003, 58(3~6): 785~791.
- Bulut S, Elibil M, Ozer D, et al. Effect of different carbon sources on l(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21(1): 33~37.
- Adenise L, Woiciechowski, Soccol C R. Experimental design to enhance the production of L-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in mixed-acid fermentation[J]. Process Biochemistry, 1999, 34(9): 949~955.
- Zhang Z Y, Jin B, Kelly J M. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(2): 229~236.
- 朱羽. 无载体固定化米根霉发酵 L-乳酸研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
Zhu Yu. Production of L-lactic acid by self-immobilized *Rhizopus oryzae* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2007. (in Chinese)
- 郑志, 姜绍通, 罗水忠, 等. 不同通气条件下米根霉发酵产 L-乳酸的代谢调控[J]. 农业机械学报, 2008, 39(8): 79~83, 134.
Zheng Zhi, Jiang Shaotong, Luo Shuizhong, et al. Metabolic regulation on L-lactic acid production by different aeration conditions in *Rhizopus oryzae* fermentation system[J]. Transactions of Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(8): 79~83, 134. (in Chinese)
- 郑志. 米根霉发酵产 L-乳酸的代谢调控研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2006.
Zheng Zhi. Controlling metabolism in the fermentation L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2006. (in Chinese)
- Feng K C, Rou T M, Liu B L, et al. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(1): 22~25.
- Yin P, Yahico K, Ishigaki T, et al. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1998, 85(1): 96~100.
- Zhou Y, Dominguez J M, Cao N J, et al. Optimization of L(+)-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC52311[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999, 77~79: 401~407.
- Žnidaršič P, Komel R, Pavko A. Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(7): 589~593.
- Bai D M, Wei Q, Yan Z H, et al. Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(21): 1 833~1 835.