

无载体固定化米根霉重复间歇发酵生产 L-乳酸

姜绍通, 郑志, 朱羽, 吴学凤, 潘丽军, 罗水忠, 杜威

合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

摘要: 通过研究影响米根霉菌丝体形态的培养基因素, 初步构建了无载体固定化米根霉重复间歇发酵生产 L-乳酸的工艺条件。研究表明, 首批次发酵培养基采用 120 g/L 葡萄糖, 3 g/L 硝酸铵, K^+ 和 Na^+ 浓度比为 1:1, 发酵 72 h 后, 米根霉菌体形态为均匀的菌丝体小球, 直径为 1.0 mm~2.0 mm, 此时 L-乳酸产量可达 100.8 g/L, 葡萄糖转化率为 84%。在此基础上, 利用米根霉菌丝体小球重复间歇发酵 16 批次, 每批次发酵 24 h, 此时葡萄糖转化率均高于 75%, L-乳酸产量保持在 60.0 g/L 以上, 米根霉菌丝体小球形态保持稳定。

关键词: L-乳酸, 米根霉, 形态, 无载体固定化, 重复间歇发酵

Repeated Intermittent L-lactic Acid Fermentation Technology by Self-immobilized *Rhizopus oryzae*

Shaotong Jiang, Zhi Zheng, Yu Zhu, Xuefeng Wu, Lijun Pan, Shuizhong Luo, and Wei Du

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

Abstract: In order to carry out the process of the repeated intermittent L-lactic acid fermentation by self-immobilized *Rhizopus oryzae*, we investigated the effect of medium compositions on the morphology of *Rhizopus oryzae*. In submerged culture, fungi can be grown as broths of freely suspended mycelia and pellets or clumps, the pellets can be immobilized by themselves. The optimum medium composition for the first patch of fermentation was: 120 g/L glucose, 3 g/L NH_4NO_3 , 0.14 g/L KH_2PO_4 , 0.16 g/L NaH_2PO_4 (the concentration ratio of K^+ and Na^+ was 1:1). After 72 h fermentation, the physical form of *Rhizopus oryzae* was mostly uniform pellet with the diameter of 1.0~2.0 mm, the concentration of L-lactic acid was 100.8 g/L, and the conversion rate of glucose was 84%. During 16 batches of repeated fermentation, the L-lactic acid level was above 60.0 g/L and the conversion rate of glucose was 75%. The fermentation time of every batch was 24 h.

Keywords: L-lactic acid, *Rhizopus oryzae*, morphology, self-immobilization, repeated intermittent fermentation

利用米根霉发酵生产 L-乳酸, 具有发酵产物光学纯度高、营养要求简单、产物容易提纯等优点^[1]。采用固定化米根霉发酵生产 L-乳酸, 与游离发酵相比, 可大大缩短生产周期, 并且解决了发酵过程中

出现的结团现象, 传质效果好, 重复使用多次后依然保持较高的活性^[2-4]。与各种载体固定化细胞技术相比, 这种无载体固定化细胞技术具有非常突出的优点, 主要体现在: (1)细胞的固定化方法非常简单,

Received: March 4, 2008; Accepted: June 5, 2008

Supported by: the National High Technology Development Program of China (No. 2007AA10Z361), the Doctor Foundation (No. 20040359008).

Corresponding author: Shaotong Jiang. Tel: +86-551-2901507; E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展计划(No. 2007AA10Z361), 教育部高等学校博士点基金项目(No. 20040359008)资助。

一般在摇瓶培养阶段就可以快速形成絮凝颗粒, 培养液澄清透明, 絮凝细胞颗粒可以在生物反应器中逐级扩大培养, 不产生细胞固定化过程的附加成本。(2)不使用细胞生长和代谢产物生物合成所需营养物质以外的其它任何化学物质, 细胞的生理和生态环境不受外来物质的干扰和影响, 有利于目标代谢产物的顺利合成。(3)自絮凝细胞颗粒内部结构呈松散型, 传质阻力很小, 而且其颗粒内部表面不断自我更新, 颗粒整体活性非常好。(4)在生物反应器中一定的生理、生态、物理、化学和流体力学条件下, 小颗粒的絮凝和大颗粒的解离可以呈动态平衡, 不存在载体固定化细胞的强度问题^[5]。无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸工艺可以在产酸发酵的同时获得适合的菌体形态实现固定化工艺, 无需附加固定化载体, 成本低廉, 具有操作简便、生产强度高、对菌体损伤小、生产稳定性好等优点^[6-7]。无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸具有很广阔应用前景。本研究拟通过发酵工艺调控, 以控制形成一定粒径的米根霉菌丝球, 并以此实现米根霉无载体固定化发酵生产 L-乳酸。研究的结果为最终实现提高 L-乳酸发酵原料利用率, 缩短发酵周期, 提高发酵强度, 降低发酵成本提供理论依据和技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种

米根霉 As3.819(合肥工业大学生物与食品工程学院实验室保藏菌种), 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, 用无菌蒸馏水洗下孢子制成悬液。

1.1.2 培养基

(1)菌种保藏斜面培养基: PDA 培养基。

(2)种子培养基(g/L): KH_2PO_4 0.15, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.66, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, 葡萄糖 80, CaCO_3 10, 尿素 1(单独灭菌)。

(3)发酵培养基(g/L): 葡萄糖 120, 硝酸铵 3, KH_2PO_4 0.15, NaH_2PO_4 0.134, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, CaCO_3 60。

(4)重复间歇补料培养基(g/L): 葡萄糖 80, 硝酸铵 3, KH_2PO_4 0.075, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, CaCO_3 40。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

(1)液体种子增殖培养: 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶, 115°C 灭菌 15 min, 接种 1 mL 孢子悬液 (5×10^6 个/mL), 180 r/min 摇床上 32°C 振荡培养 8~36 h。

(2)摇瓶发酵: 发酵培养基装液量 50 mL/250mL 三角瓶, 115°C 灭菌 15 min, 在 200 r/min 摇床上 32°C 条件下培养 72 h。

1.2.2 分析方法

乳酸含量的测定按高效液相色谱校正的 EDTA 定钙法进行^[8]; 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法); 生物量测定: 菌体干重法^[9]。

2 结果

2.1 米根霉发酵生产 L-乳酸的菌体形态研究

2.1.1 不同碳源对菌体形态的影响

以不同碳源发酵 L-乳酸, 观察米根霉菌体形态, 记录得表 1。

由表 1 可得, 葡萄糖清液为碳源时, 米根霉菌丝体形态最适合, 选择葡萄糖清液为碳源。

2.1.2 不同氮源对菌体形态的影响

以葡萄糖清液为碳源, 分别以硝酸铵、硫酸铵、尿素为氮源发酵 L-乳酸, 观察菌体形态, 记录得表 2。

由表 2 可得, 硝酸铵为氮源时, 米根霉菌丝体形态最适合, 选择硝酸铵为氮源。

表 1 不同碳源对菌体形态的影响

Table 1 Effect of the carbon source on morphology

Substrate	Mycelial morphology
Liquefied potato starch	Abnormal pellets (few)
Liquefied potato starch and glucose (1:1)	Fluffy loose mycelium, few pellets
Glucose	Uniform small pellets

表 2 不同氮源对菌体形态的影响

Table 2 Effect of the nitrogen source on morphology

Nitrogen	Mycelial morphology
Ammonium nitrogen	Uniform small pellets
Ammonium sulfate	Fluffy loose mycelium
Urea	Abnormal pellets (few), cotton-like large lump

2.1.3 不同 K^+ 、 Na^+ 浓度比对菌体形态的影响

以葡萄糖清液为碳源, 硝酸铵为氮源, 展开不同 K^+ 、 Na^+ 浓度比的试验, 观察菌体形态及测定乳酸产量, 结果见表 3。

由表 3 可知, K^+ 、 Na^+ 浓度比为 1:1 即 0.14 g/L KH_2PO_4 , 0.16 g/L NaH_2PO_4 时米根霉菌体形态为均匀的菌丝体小球, 直径为 1.0~2.0 mm; 同时 L-乳酸产量最高, 为 100.8 g/L, 葡萄糖转化率为 84%。

2.2 无载体固定化米根霉工艺的实现

以对米根霉发酵生产 L-乳酸的菌体形态研究为基础, 通过米根霉菌体在发酵过程中形成大小为 1~2 mm 的菌丝体小球从而实现其无载体固定化。摇瓶发酵中实现无载体固定化的主要条件为: 碳源为 120 g/L 葡萄糖清液, 氮源为硝酸铵 3 g/L, 无机盐中 K^+ 和 Na^+ 浓度比为 1:1。无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的米根霉菌丝体小球形态见图 1。

表 3 不同 K^+ Na^+ 浓度比对菌体形态的影响
Table 3 Effect of the concentration ratio of K^+ and Na^+ on fermentation and morphology

K^+/Na^+	L-Lactic acid (g/L)	Mycelial morphology
K^+	97.2	Cotton-like large lump
9:1	97.2	Cotton-like large lump
4:1	98.1	Fluffy loose mycelium, (few)
3:1	99.6	Mycelium (few), abnormal pellets (many)
3:2	96.0	Abnormal pellets
1:1	100.8	Uniform small pellets 1-2mm Φ
2:3	97.2	Uniform pellets 3-5mm Φ
1:3	94.8	Uniform small pellets partly
1:4	93.6	Abnormal small pellets in a line
1:9	89.4	Abnormal small pellets in a line, Cotton-like large lump partly
Na^+	79.2	Cotton-like large lump

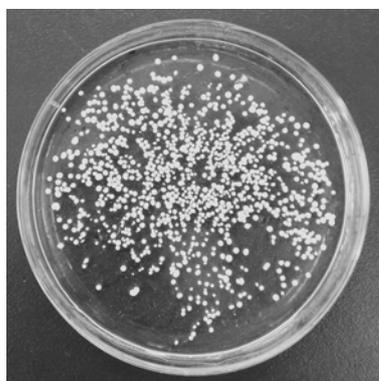


图 1 菌丝球形态

Fig. 1 Morphology of mycelia pellet-form

无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的米根霉菌丝体为均匀的小球形态, L-乳酸产量高, 无包埋 $CaCO_3$ 现象, 工艺稳定。

2.3 无载体固定化米根霉间歇发酵 L-乳酸的稳定性实验

每批次发酵 24 h 后取出 5/6 发酵液, 保留沉淀在瓶底的米根霉菌丝体小球, 添加新鲜培养基至原来体积, 重复发酵。检测每批次 L-乳酸产量, 计算葡萄糖转化率, 结果见图 2。

由图 2 可知, 无载体固定化米根霉细胞即菌丝体小球, 具有较好的稳定性, 重复发酵 16 批次 L-乳酸产量依旧较高, 葡萄糖转化率稳定在 75% 以上, 最高可达到 84.38%。

观察不同重复批次发酵过程中的米根霉形态, 结果见图 3、图 4。

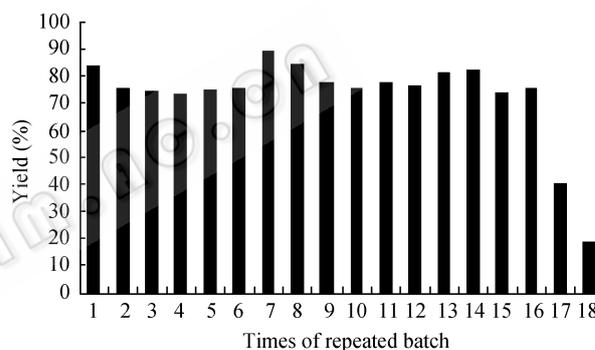


图 2 无载体固定化米根霉半连续发酵的稳定性

Fig. 2 Stability of repeated intermittent fermentation by self-immobilized *Rhizopus oryzae*

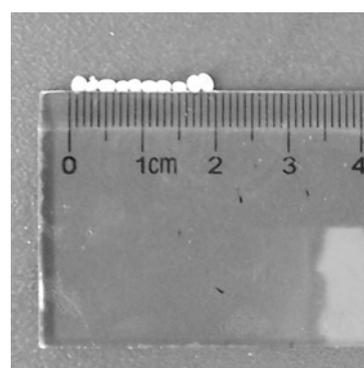


图 3 第 4 批发酵过程中菌球形态

Fig. 3 Pellet in the 4th repeated batch fermentation

图 3、图 4 中可以看出, 第 4 批次时米根霉的菌丝体小球形态直径在 2.0 mm 左右, 第 16 批次时其直径略大于 2.0 mm, 无载体固定化米根霉在发酵生

产中的形态保持的比较好。在发酵第 16 批次以后,米根霉菌丝体小球开始涨大,漂浮直至破裂,逐渐丧失活力, L-乳酸产量下降明显。发酵到第 18 批次时,米根霉菌丝体小球大部分已破裂, L-乳酸发酵不能正常进行。重复发酵 16 批次为无载体固定化米根霉重复间歇生产 L-乳酸的合适次数。

2.4 无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的动力学研究

2.4.1 首批次发酵动力学

测定发酵液中的米根霉生物量、葡萄糖浓度和 L-乳酸浓度,即研究菌体生长、糖代谢和产酸的动力学,结果见图 5。

由图 5 可以得出,发酵初期的 8 h,乳酸与菌丝体含量很少,即菌体生长与生产缓慢;24 h 至 60 h,菌体迅速生长同时乳酸产量也随之迅速增加,这段时间是米根霉生长与生产旺盛期;60 h 后,乳酸含量增加缓慢,菌丝体含量变化不大,发酵进入稳定期。72 h,乳酸产量达最高值。

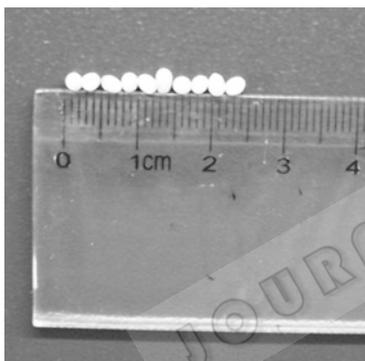


图 4 第 16 批发酵过程中菌体球形态
Fig. 4 Pellet in the 16th repeated batch fermentation

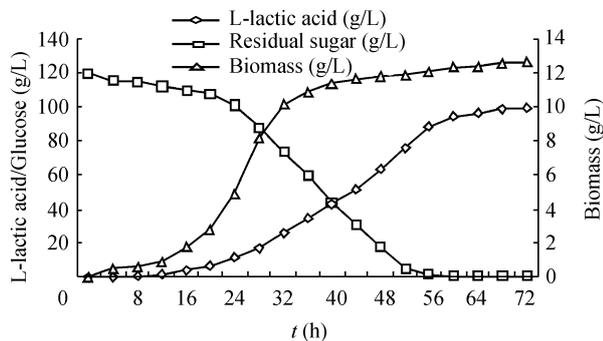


图 5 首批次发酵动力学曲线
Fig. 5 The curve of the first fermentation kinetics

2.4.2 重复批次发酵动力学

测定第 2 和第 5 批次发酵液中的葡萄糖浓度和

L-乳酸浓度,即研究糖代谢和产酸的动力学,结果见图 6 和图 7。

从图 6 和图 7 可以看出,糖耗和产酸基本趋于线性,没有延滞期。如此重复使用无载体固定化颗粒进行间歇发酵,重复实验 16 次,其糖耗和产酸均与第 2 次基本相同,可见固定化细胞具有较好的重复使用效果。

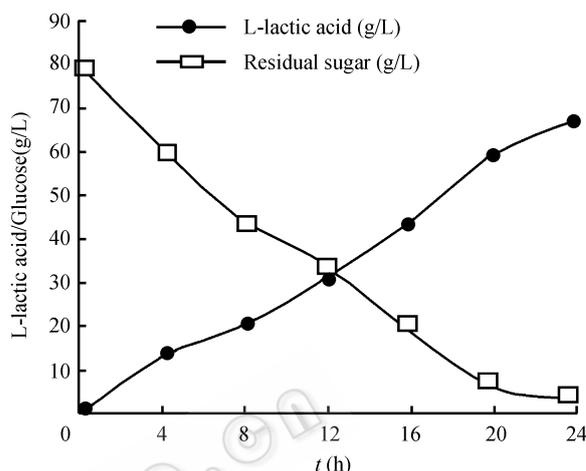


图 6 第 2 批发酵动力学曲线
Fig. 6 Curve of the second fermentation kinetics

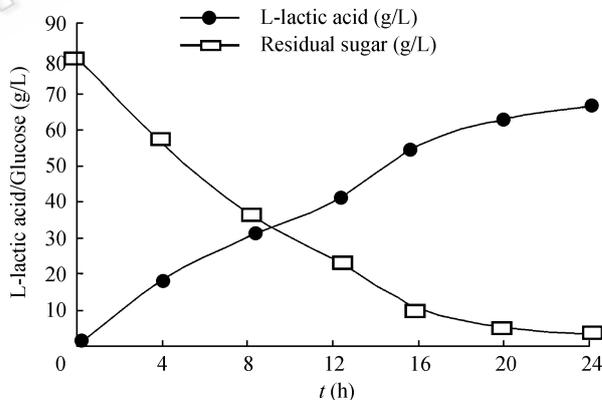


图 7 第 5 批发酵动力学曲线
Fig. 7 Curve of the 5th fermentation kinetics

3 讨论

利用米根霉发酵生产 L-乳酸,具有发酵产物光学纯度高、营养要求简单、产物容易提纯等优点,但是现在工业化生产都是采用固定化技术进行发酵^[2-4],这为后期的分离处理带来了一定的工作量,在我们的以前的研究中发现,米根霉菌体在生长过程中自身可以絮凝成球状,国内很多报道指出,米根霉不

需要任何载体, 利用自身的絮凝性可以自身固定, 本研究提出的无载体固定化正是基于这一点。米根霉深层发酵生产 L-乳酸过程中, 菌体形态复杂, 多以丝状、片状、球体、团状、絮状、结块等形态生长。菌体形态影响 L-乳酸发酵过程中的传热、溶氧、传质等重要参数, 良好的菌体形态是发酵成功的基础。更重要的是, 研究和选择合适的菌体形态是无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸工艺实现的基础和关键。本研究发现米根霉菌体形态为 2.0 mm 左右的菌丝体球的产酸能力最强(表 1~3)。

微生物的发酵, 其生长与生产有一定的规律。研究无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的菌体生长、糖代谢和产酸的动力学对工艺具有解释和预测功能。首批次无载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸过程中菌体的生长阶段有部分 L-乳酸形成, 大部分 L-乳酸在菌体稳定期产生; 重复间歇发酵批次米根霉细胞已增殖完毕, 碳源绝大部分用于 L-乳酸的发酵(图 1~7)。

REFERENCES

- [1] Bai DM, Zhao XM, Li XG, *et al.* Advances in fermentation of green platform biochemical L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Mod Chem Ind*, 2002, **22**(6): 9-13.
白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 等. 米根霉发酵生产 L(+)-乳酸研究进展. *现代化工*, 2002, **22**(6): 9-12.
- [2] Tamada M, Begum AA, Sadi S. Production of L(+)-Lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by γ ray induced polymerization. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **74**(6): 379-383.
- [3] Chen YR, Xia LM, Cen PL. L-lactic acid fermentation by immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized-bed. *Acta Microbiol Sin*, 2000, **40**(4): 415-419.
陈育如, 夏黎明, 岑沛霖. 利用固定化米根霉在三相流化床中发酵生成 L-乳酸. *微生物学报*, 2000, **40**(4): 415-419.
- [4] Dong XY, Bai S, Sun Y. L-lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol Lett*, 1996, **18**(2): 225-228.
- [5] Bai FW. Application of self-immobilization cell technology for biochemical engineering. *Prog Biotechnol*, 2000, **20**(2): 32-34.
白凤武. 无载体固定化细胞的研究进展. *生物工程进展*, 2000, **20**(2): 32-34.
- [6] Du JX, Cao NJ, Gong CS. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermentor. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, **70-72**: 323-329.
- [7] Bai DM, Zhao XM, Li XG, *et al.* Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochem Eng J*, 2004, **18**: 41-48.
- [8] Zheng Z, Jiang ST, Pan LJ. Study on method for determination of lactic acid in fermented broth. *Food Sci*, 2003, **26**(3): 102-105.
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. *食品科学*, 2003, **26**(3): 102-105.
- [9] Jia SR. *Experimental Techniques of Biotechnology and Engineering*. Beijing: China Light Industry Press, 2002.
贾士儒. *生物工艺与工程实验技术*. 北京: 轻工业出版社, 2002.