

文章编号:1009-038X(2001)05-0459-07

L-乳酸高产突变株——米根霉 NAF-032

乔长晟¹, 汤凤霞¹, 贾士儒², 李航¹

(1. 宁夏农学院 食品科学系, 宁夏 银川 750105; 2. 天津轻工业学院食品工程系, 天津 300000)

摘要: 运用正交试验理论, 对 L-乳酸高产突变株 NAF-032 的优化摇瓶发酵条件作了初步研究, 确定了优化的发酵培养基和发酵条件。优化发酵培养基为(g/L): 葡萄糖 140, 氯化铵 1, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08; 优化培养条件为: 34℃, 摇床转速 200 r/min, 装液量 50 mL (250 mL 容积三角瓶), 一次性添加 CaCO_3 80 g/L 调节 pH 值。米根霉 NAF-032 的摇瓶发酵 L-乳酸积累量可达 94.28 g/L。

关键词: L-乳酸; 米根霉; 优化; 培养基

中图分类号: TQ 921.3

文献标识码: A

Optimal Shake-Flask Fermentation Conditions of *Rhizopus oryzae* NAF-032

QIAO Chang-shen¹, TANG Fen-xia¹, JIA Shi-ru², LI Hang²

(1. Department of Food Science, Ningxia College of Agriculture, Yinchuan 750105, China; 2. Department of Food Engineering, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin 300000, China)

Abstract: The optimal production medium and fermentation conditions of a mutant strain of NAF-032 with a high and stable yield of L-lactic acid were studied by means of an orthogonal design. From the shake-flask experiments, the optimal fermentation medium consisted of the following composition(g/L): glucose 140, NH_4Cl 1, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08. The optimal fermentation conditions were: 34℃, 200 r/min, 50 mL in 250 mL total volume, CaCO_3 80 g/L. CaCO_3 was added to the broth to control the pH value. The yield of NAF-032 in the shake-flask experiments can be up to 94.28 g/L in the optimal fermentation.

Key words: L-lactic acid; *Rhizopus oryzae*; optimization; production medium

乳酸是一种常见的羧基酸, 广泛存在于人体、动物体、植物和微生物中, 乳酸按其旋光性可分为 D(-)-乳酸, L(+)-乳酸和 DL-乳酸 3 种^[1-4]。人体只能代谢利用 L-乳酸, 因此, 世界卫生组织提倡 L-乳酸作为食品添加剂和内服药, 以取代目前普遍使用的 DL-乳酸^[5-8]。此外, L-乳酸, L-乳酸盐及其聚合物还广泛应用于医药、农业和化学工业。尤

其近几年, 人们利用 L-乳酸聚合生成的聚 L-乳酸制造生物可降解塑料、绿色包装材料及农用薄膜, 以解决日益严重的环境污染问题, 引起广泛关注, 应用前景广阔^[9-14]。

作者利用单因素试验、正交试验和模糊转换等设计方法对经紫外诱变选育出的 L-乳酸菌米根霉 NAF-032 的优化培养基和培养条件进行了研究。

收稿日期: 2001-07-29; 修订日期: 2001-09-01。

作者简介: 乔长晟(1969-), 男, 吉林长春人, 工学学士, 讲师。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 米根霉 NAF-032.

1.1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基. 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1 L, 煮沸 30 min, 双层纱布过滤取清液. 加水补充至 1 L, 再加琼脂 20 g.

基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖 100, 尿素 2.0, KH_2PO_4 0.3, NaH_2PO_4 0.08, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08, CaCO_3 50(单独灭菌).

1.2 方法

1.2.1 培养基的灭菌方法 以上培养基均采用 121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 湿热灭菌. 其中葡萄糖采用: 0.05 MPa, 30 min; 尿素采用: 0.075 MPa, 3 min; 碳酸钙灭菌后加入, 其灭菌条件是: 150 $^{\circ}\text{C}$ 干热灭菌 2 h.

1.2.2 培养方法

斜面培养: 34 $^{\circ}\text{C}$, 培养 5~7 d.

摇瓶发酵培养: 取一新鲜的斜面活化菌种, 加入 20 mL 生理盐水, 用接种环打下孢子, 制成孢子悬浮液, 取 1 mL 孢子悬浮液接种于装有 60 mL 发酵培养基的 250 mL 容积三角瓶中, 添加 CaCO_3 以调节 pH 值, 34 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 摇床培养 60 h.

1.2.3 分析方法

1) L-乳酸的测定

定性测定采用纸层析法. 展开剂: 正丁醇 + 甲酸 + 水(体积比 5:3:1). 显色剂: 0.2% 溴钾酚紫 + 0.05% 甲基红 + 0.5% NaOH(体积比 1:1:0.15).

定量测定采用 EDTA 定钙法.

2) 发酵液中残糖的测定

残糖以葡萄糖计. 将发酵液离心(3500 r/min, 10 min), 取上清液, 采用 DNS 显色法测定葡萄糖的浓度.

1.2.4 玉米淀粉预处理 将玉米淀粉配制成质量分数为 35% 的淀粉乳, 加入大于 100 $\mu\text{g/g}$ 的钙离子以保证 α -淀粉酶的稳定性, 调整 pH 至 6.0~7.0, 加入液化型 α -淀粉酶(7~8 U/g 干淀粉), 80 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 左右, 至碘液检查呈红棕色, 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶活 10 min, 得到液化液, 再加入发酵培养基的其他成分.

2 结果与讨论

2.1 优化摇瓶发酵培养基

2.1.1 碳源的影响

1) 不同碳源对 L-乳酸发酵的影响

在发酵培养基中, 按相同的碳氮比分别添加 140 g/L 的玉米淀粉, 155 g/L 的葡萄糖, 155 g/L 的蔗糖, 200 g/L 的玉米粉(除葡萄糖外的其它碳源先经 α -淀粉酶液化), 进行摇瓶发酵, 测定乳酸产生量, 结果见图 1.

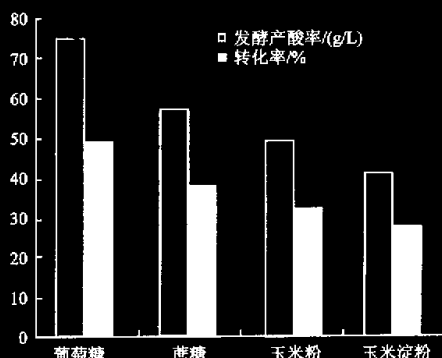


图 1 不同碳源对 L-乳酸发酵的影响

Fig.1 Effect of various carbon sources on fermentation

由图 1 可知, 米根霉 NAF-032 可以利用淀粉产生乳酸, 虽然选择的是相同的碳氮比, 但利用不同碳源时, 在同体积发酵液中的底物相对浓度不同, 且米根霉对不同碳源的利用率不同, 造成了产酸量的差异. 当以葡萄糖为碳源时产酸和转化率均最高, 其它几种碳源的产酸量和转化率相对较低, 都不具有利用价值, 因而本试验选用葡萄糖作为碳源.

淀粉中葡萄糖的质量浓度(g/L) = 淀粉的质量浓度(g/L) $\times$ 1.11 $\times$ 粉糖实际转化率(%)

1 份重的淀粉完全水解后, 由于水的参与, 生成 1.11 份重的葡萄糖, 1.11 是粉糖理论转化率.

玉米粉中葡萄糖的质量浓度(g/L) = 玉米粉的质量浓度(g/L) $\times$ 70.05% $\times$ 1.11 $\times$ 粉糖实际转化率(%)

经测定, 玉米面中含淀粉 70.05%.

2) 不同碳源质量浓度对 L-乳酸发酵的影响

选择了不同的葡萄糖质量浓度进行发酵, 分别在基础培养基中添加 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 140.0, 160.0 g/L 葡萄糖, 检测其对于米根霉 NAF-032 对 L-乳酸发酵的影响, 结果见图 2. 可知, L-乳酸发酵产率随碳源质量浓度升高而升高. 当葡萄糖质量浓度为 100 g/L, 转化率最高, 原料利用充分, 但产酸量偏低; 当葡萄糖质量浓度至 160 g/L 时, 产酸量最高, 但转化率有所下降. 综合考虑, 试验选用 160 g/L 的葡萄糖质量浓度.

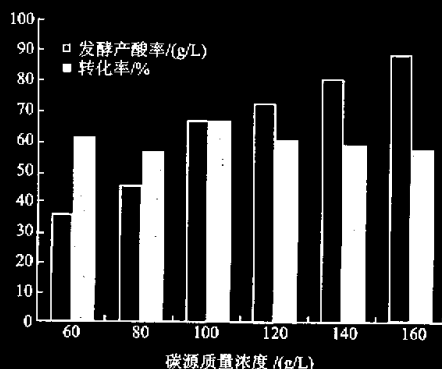


图2 不同碳源质量浓度对 L-乳酸发酵的影响

Fig.2 Effect of various glucose concentration on fermentation

2.1.2 氮源的影响

1) 不同氮源种类对产 L-乳酸的影响

以发酵培养基为基础,根据一定的碳氮比添加不同种类氮源,分别为氯化铵 1.6 g/L、硫酸铵 2.0 g/L、尿素 0.9 g/L、蛋白胨 2.8 g/L,而后进行发酵,研究其对于米根霉 NAF-032 对 L-乳酸发酵的影响,结果见图 3。

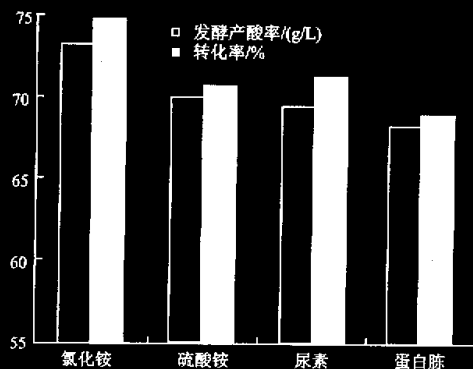


图3 不同氮源种类对产 L-乳酸的影响

Fig.3 Effect of various nitrogen sources on fermentation

由图 3 可知,米根霉可利用有机氮源又可利用无机氮源产 L-乳酸,但对各种氮源的利用率有所不同,比较发酵结果后发酵产酸率和转化率可知,氯化铵作为氮源优于其它的几种氮源,更有利于米根霉的生长和产酸。因此,试验最终选用氯化铵作为培养基中的氮源。

2) 不同氮源质量浓度对 L-乳酸发酵的影响

以发酵培养基为基础,根据试验结论将葡萄糖质量浓度调整为 160 g/L,分别添加 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g/L 的氯化铵,进行发酵,观察氯化铵质量浓度对 L-乳酸的发酵的影响,结果见图 4。

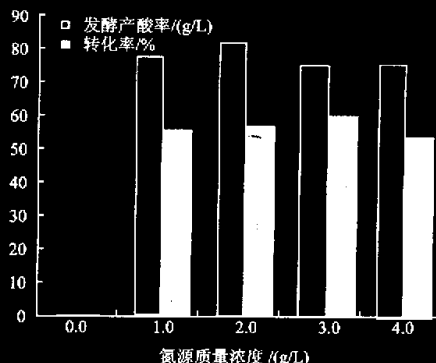


图4 不同氮源质量浓度对产 L-乳酸的影响

Fig.4 Effect of various nitrogen sources concentration on fermentation

由图 4 可知,当氯化铵质量浓度为 2.0 g/L 时产酸率和转化率均最高,因此确定培养基中氯化铵的最适质量浓度为 2.0 g/L。氮源质量浓度对菌体生长影响明显,不添加氮源或氮源质量浓度低于 2.0 g/L 时,菌体生长缓慢,从而影响产酸量;当添加量高于 2.0 g/L 时,则菌体生长旺盛,耗糖多而产酸少,转化率有所下降。

2.2 发酵培养条件

2.2.1 发酵培养基最适 pH 值 菌体在合适的 pH 下可以获得最佳培养效果,而米根霉在生长过程中会产生一部分乳酸而使培养基 pH 下降,本试验中以碳酸钙作为 pH 调节剂。由于实验中产酸最高达到 90 g/L,而碳酸钙中和乳酸反应摩尔比为 1/2,为达到好的调节效果,故碳酸钙最低添加量定为 50 g/L。分别选择 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0 g/L 添加碳酸钙,进行发酵,观察对 L-乳酸发酵的影响,结果见图 5。

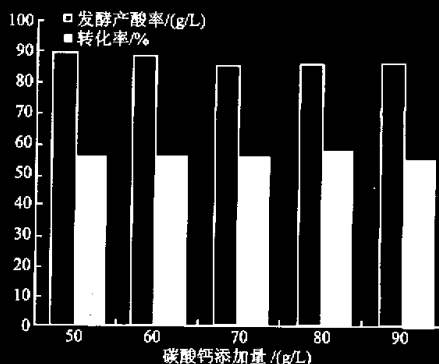


图5 碳酸钙添加量对产 L-乳酸的影响

Fig.5 Effect of various CaCO_3 concentration on fermentation

如图 5 所示, 碳酸钙添加量在 50 g/L 时就能够很好地调节 pH 值, 增大添加量并不能有效地提高乳酸产量, 因此选择 50 g/L 的碳酸钙添加量较为合适.

2.2.2 不同通风量对 L-乳酸的影响 采用基础发酵培养基, 在 250 mL 容积的三角瓶中分别装 30, 40, 50, 60, 70 mL 培养基, 旋转式摇床发酵培养, 测定产酸率和转化率. 结果见图 6.

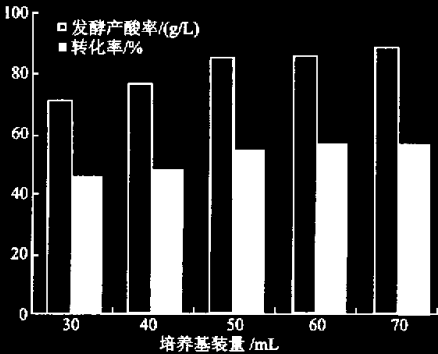


图 6 不同通风量对 L-乳酸发酵的影响

Fig.6 Effect of various volume on fermentation

由图 6 可知, 在一定范围内, 培养基装液量提

高时, 产酸率也随之升高, 故在本试验中选择 250 mL 容积的三角瓶 70 mL 培养基的装液量.

2.3 正交试验设计优化发酵培养基和培养条件

前面研究了各种培养基组分和培养条件单因素对于米根霉 NAF-032 对 L-乳酸发酵的影响, 但是, 单因素试验不能很好地反映出各组分及条件间的相互作用关系. 因此试验中运用正交试验设计原理, 进一步确定摇瓶发酵最佳培养基和最适培养条件.

选用七因素二水平正交设计试验, 确定各因素对 L-乳酸发酵的综合影响, 根据前面的各组试验结果确定各因素所选水平, 见表 1, 正交试验结果见表 2、表 4, 方差分析见表 3、表 5.

以产酸率和转化率分别作检验指标做正交检验, 结果如表 2、表 4 所示. 分别作方差分析, 查 F 分布表可得: $F_{0.90}(1, 3) = 5.54$, $F_{0.90}(1, 2) = 8.53$, 则在这两项指标下的显著性因素分别为表 3, 表 5 中 * 号所示各项. 两指标下的正交试验结果并不完全吻合, 而生产中应综合考虑产酸率和转化率的影响, 因此, 对产酸率取权重为 0.6, 转化率取权重为 0.4, 对两指标下的平方和进行模糊转换, 得到一组新的平方和, 作方差分析可得表 6.

表 5 中 * 号所示各项. 两指标下的正交试验结果并不完全吻合, 而生产中应综合考虑产酸率和转化率的影响, 因此, 对产酸率取权重为 0.6, 转化率取权重为 0.4, 对两指标下的平方和进行模糊转换, 得到一组新的平方和, 作方差分析可得表 6.

表 1 $L_9(2^7)$ 正交试验设计表

Tab.1 Orthogonal design plan

水平	因 子						
	葡萄糖 质量浓度 A/(g/L)	氯化铵 质量浓度 B/(g/L)	(A×B)	通风量 C/mL	碳酸钙 质量浓度 D/(g/L)	发酵时间 E/h	空白
1	140	1.0		50	60	60	
2	160	2.0		70	80	70	

表 2 $L_9(2^7)$ 正交试验结果 I

Tab.2 The first results of orthogonal experiment

	A	B	A×B	C	D	E	空白	产酸率/(g/L)
1	1	1	1	1	1	1	1	79.2
2	1	1	1	2	2	2	2	88.4
3	1	2	2	1	1	2	2	75.79
4	1	2	2	2	2	1	1	91.8
5	2	1	2	1	2	1	2	98.28
6	2	1	2	2	1	2	1	76.42
7	2	2	1	1	2	2	1	80.05
8	2	2	1	2	1	1	2	69.66
M_1	335.19	342.3	317.31	333.32	300.07	338.94	327.47	82.45
M_2	324.41	317.3	342.29	326.28	359.53	332.13	338.77	
m_1	83.8	85.57	79.33	83.33	75.02	84.74	81.87	
m_2	81.1	79.33	85.57	81.57	89.88	83.03	84.69	
R_j	10.78	25	24.98	7.04	59.46	6.81	11.3	
s_j	29.05	78.12	78	6.2	441.93	5.8	15.96	

表 3 方差分析 I

Tab.3 The first result of analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	29.05	1	29.05	3.12	
B	78.12	1	78.12	8.38	*
A × B	78	1	78	8.37	*
C	6.2	1			
D	441.93	1	441.93	47.42	*
E	5.8	1			
误差	15.96	1			
误差 [△]	27.96	3	9.32		

表 4 正交试验结果 II

Tab.4 The second results of orthogonal experiment

	A	B	A × B	C	D	E	空白	转化率/%
1	1	1	1	1	1	1	1	69.52
2	1	1	1	2	2	2	2	64.3
3	1	2	2	1	1	2	2	53.98
4	1	2	2	2	2	1	1	66.58
5	2	1	2	1	2	1	2	61.4
6	2	1	2	2	1	2	1	49.32
7	2	2	1	1	2	2	1	52.45
8	2	2	1	2	1	1	2	52.53
M ₁	254.38	244.54	238.8	237.35	225.35	250.03	237.87	58.76
M ₂	215.7	225.04	231.28	232.73	244.73	220.05	232.21	
m ₁	63.595	61.135	59.7	59.3375	56.3375	62.5075	59.4675	
m ₂	53.925	56.26	57.82	58.1825	61.1825	55.0125	58.0525	
R _j	38.68	19.5	7.52	4.62	19.38	29.98	5.66	
s _j	187.02	47.53	7.07	2.67	46.95	112.35	4	

表 5 方差分析 II

Tab.5 The second result of analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	187.02	1	187.02	56.08	*
B	47.53	1	47.53	14.25	*
A × B	7.07	1	7.07	2.12	
C	2.67	1			
D	46.95	1	46.95	14.08	*
E	112.35	1	112.35	33.69	*
误差	4	1	4		
误差 [△]	6.67	2	3.335		

表 6 方差分析 II

Tab.6 The third result of analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	92.24	1	92.24	11.55	*
B	69.88	1	69.88	8.75	*
A × B	49.63	1	49.63	6.21	
C	4.79	1			
D	283.94	1	283.94	35.56	*
E	48.42	1	48.42	6.06	
误差	11.18	1			
误差 [△]	15.97	2	7.985		

由表 6 可知,综合考虑产酸率和转化率的影响,具有显著性的因素为 A, B 和 D . 各因素对发酵的影响由大到小为: $D > A > B > A \times B > E > C$, 结合两指标下正交试验结果,可得到最佳培养基和最适培养条件为 (g/L): 葡萄糖 140, 氯化铵 1, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08. 最佳培养条件为: 34°C , 摇床转速 200 r/min, 装液量 50 mL (250 mL 容积三角瓶), 一次性添加 CaCO_3 80 g/L, 用于调节 pH 值.

2.4 对优化培养基和培养条件的验证试验

通过以上的一系列试验确定了最优培养基和最适培养条件,这一结果还需要进一步验证,试验采取了前面正交试验确定的培养基和培养条件,进行验证,结果如图 7 所示.

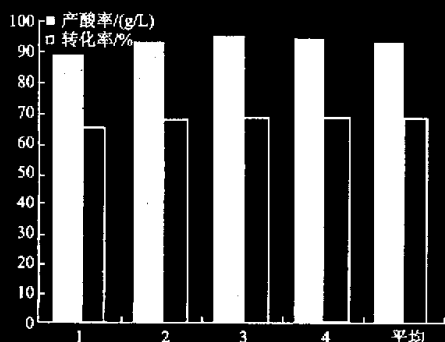


图 7 验证试验结果

Fig. 7 Fermentation confirmation experiment

由图 7 可知,以最优培养基和最适培养条件做验证试验,可得到与正交试验设计结果吻合的较高的产酸率和转化率,由此可以验证所确定的培养基和培养条件是较为合适的.

2.5 米根霉 NAF-032 的 L-乳酸发酵培养过程

采用上述确定的最佳培养基和最适培养条件,进行摇瓶发酵试验,定时取样测定产酸和残糖量,统计可得如图 8 所示的摇瓶发酵进程.

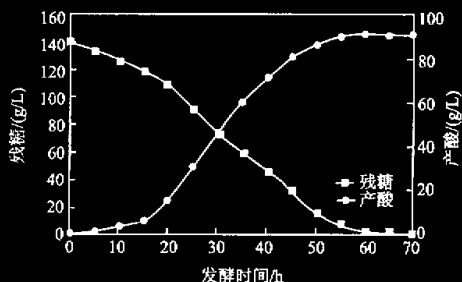


图 8 摇瓶发酵进程

Fig. 8 Fermentation process of NAF-032 in flasks

由图 8 可知,摇瓶发酵可分为 3 个阶段:第一阶段为细胞生长延迟期,约 15 h 内细胞生长较慢,产酸量基本为 0,延迟期的长短与菌种的遗传性、菌龄以及接种前后所处的环境条件等因素有关,生产实践中为了缩短延迟期,通常采取的措施有:增加接种量,采用最适菌龄以及选用繁殖快的菌种等措施;第二阶段为细胞生长期,细胞迅速生长,产酸量逐渐增大,同时发酵液中糖质量浓度迅速下降;第三阶段为细胞生长稳定期,当发酵 45 h 后,产酸量的增长速度下降,至 60 h 左右达到稳定值.由此可见,乳酸的生成与米根霉细胞的生长密切相关.

2.6 生物素的影响

通过对米根霉发酵产 L-乳酸的代谢途径分析,初步认为在发酵过程中通过控制生物素的添加量,将使 L-乳酸的产量有一定的提高.但因为在国内外的有关资料中都没有找到与发酵产 L-乳酸的生物素添加量有关的信息,所以暂时选择大剂量的添加,以确定生物素是否对发酵有影响.生物素的添加量为 1 mg/L,试验结果见图 9.

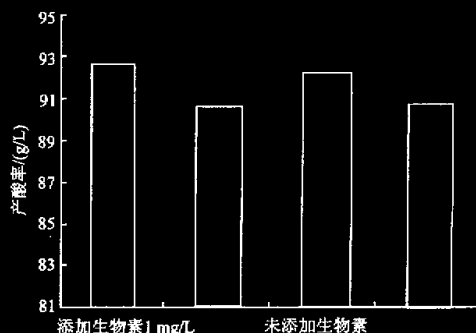


图 9 生物素对发酵产酸的影响

Fig. 9 Effect of various biotin concentration of fermentation

由图 9 可知,大剂量添加生物素对发酵产酸并没有产生预期的效果,和未添加生物素的对比试验的结果相似,初步判断生物素的添加对产酸没有影响.考虑到资料的限制和试验时间不足,有关生物素影响的试验将在以后作进一步细化.

3 结 论

1) 确定了摇瓶发酵最佳培养基为 (g/L): 葡萄糖 140, 氯化铵 1, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08. 最佳培养条件为: 34°C , 摇床转速 200 r/min, 装液量 50 mL (250 mL 容积三角瓶), 一次性添加 CaCO_3 80 g/L (单独灭菌), 用于调节

pH值。

2) 在最适发酵条件下,米根霉 NAF-032 的摇瓶发酵 L-乳酸积累量可达 94.28 g/L。

3) 米根霉 NAF-032 在最适发酵条件下,发酵 60 h,碳源耗尽,产酸 94.28 g/L,对糖的转化率为 67.96%。

参考文献:

- [1] 金其荣,张继民,徐勤.有机酸发酵工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1989.339~406.
- [2] RATHIN DATTA. Hydroxycarboxylic acids[J]. *Encyclopedia of Chemical technology*, 1995, 13:1042~1062.
- [3] 齐宏秀.乳酸的应用及生产情况[J].辽宁化工,1996(1):20~21.
- [4] 曹本昌,徐建林,匡群.L-乳酸研究综述[J].食品与发酵工业,1993(3):56~61.
- [5] PEIMIN YIN, NAOKI NISHINA, YUUKO KOSAKAI, *et al.* Enhance production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift Bioreactor[J]. *J Ferment bioeng*, 1997, 84:249~253.
- [6] DAVID P MOBLEY. *Plastics from Microbes*, Hanser/Gardner Publications[M]. New York: Cincinnati Munich Vienna, 1994. 93~137.
- [7] YU R C, HANG Y D. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*[J]. *Biotechnol Lett*, 1989, 11(8):597~600.
- [8] SUNTORNSUK W, HANG Y D. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for production of L(+)-lactic acid and glucoamylase [J]. *Lett Appl Micro*, 1994, 19:249~252.
- [9] 曹本昌,徐建林,匡群.根霉发酵 L-乳酸[J].食品与发酵工业,1991(1):37~40.
- [10] 蒋明住,吴芷萍,许孟琴等. L-乳酸发酵的研究[J].微生物学报,1991,31:41~47.
- [11] 杨虹,林宇野,史美榕. L-乳酸生产菌的选育[J].福州大学学报(自然科学版),1994,22(2):103~106.
- [12] 杨虹,林宇野,史美榕. L-乳酸生产菌的选育[J].微生物学通报,1994,21(6):339~342.
- [13] 杨虹,林宇野,史美榕.固定化根霉乳酸发酵的研究[J].福州大学学报(自然科学版),1994,22(6):121~125.
- [14] HANG Y D, HAMAMCI H, WOODAMS E E. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels[J]. *Biotechnol Lett*, 1989(11):119~120.

(责任编辑:杨萌 秦和平)