固定化米根霉生产L-乳酸的研究

白 姝　董晓燕　孙 彦

(天津大学生物工程研究中心,天津 300072)

摘要 开发了利用聚氨酯泡沫为载体固定化米根霉生产L-乳酸的新工艺。确定了固定化细胞发酵条件:葡萄糖浓度为50g/l,载体立方体边长为4~8mm,载体量为20cm^3/70ml培养基,固定化细胞制备培养时间为24h。利用固定化细胞发酵产酸速率是游离菌的3倍以上,对糖转化率达77.70%,与理论转化率相近。该固定化细胞应用在反复间歇发酵中可稳定10批次以上。

关键词 L-乳酸,米根霉,聚氨酯泡沫,固定化

L-乳酸广泛应用于食品、医药、农业和化工工业等[1]。聚L-乳酸可用于制造生物降解塑料,生产绿色包装材料和农用薄膜[2],还可用于制备抗癌药物、缓释胶囊制剂、生物植片和手术缝合线等[3]。迄今为止,根霉发酵工业化生产L-乳酸工艺均采用通风搅拌罐式间歇发酵法[4,5]。固定化细胞技术在L-乳酸生产领域的应用研究近年来在国内外已全面展开,但对于好氧发酵的米根霉细胞的固定化仅有少量报道,其方法为海藻酸钙和聚丙烯酰胺凝胶的包埋法[6,7]、生物转盘吸附固定化法[8]等。作为包埋固定化法由于软凝胶载体强度低、寿命短、制备困难,尚难实现工业应用。

天津市阳光计划资助项目

1995-09-18 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

为了解决上述问题，我们在国内外首次开展了以聚氨酯泡沫为载体固定化米根霉发酵生产 L-乳酸新工艺的研究。本工艺的特点是，不需要预先培养菌体再进行固定化，而是直接将载体颗粒放入待灭菌的培养基中，与培养基共同灭菌，再接种和培养，在菌体生长过程中自然粘附到载体颗粒上形成固定化细胞。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

米根霉(*Rhizopus oryzae*)BTC115 由本研究中心保藏。

斜面培养基：PDA 培养基。

产孢子培养基(g/l)：葡萄糖 60，马铃薯 600，$CaCO_3$10，pH6.8。

种子培养基(g/l)：葡萄糖 30～100，$CaCO_3$10～40，适量营养盐，pH6.8。

发酵培养基(g/l)：葡萄糖 30～150，$CaCO_3$10～50，适量营养盐，pH6.8。

1.2 固定化方法

将斜面菌种转接于产孢子平板培养基，置于 34℃恒温培养 4d；聚氨酯泡沫剪切成 2.5～11mm 边长的立方体块，经冲洗干净放入装有 70ml 种子培养基的 250ml 锥形瓶中，在 1×10^5Pa 下灭菌 10min，然后接种孢子悬液，于 34℃进行摇瓶培养(振幅 20mm，210r/min)。24h 后，菌丝体全部束缚在聚氨酯泡沫颗粒上，弃掉原种子培养液，用无菌水反复冲洗三次，将固定化细胞转接入新鲜发酵培养基中进行发酵。

1.3 分析方法

菌体重量测定：游离菌经充分洗涤后，采用细胞干重法测定。而固定化细胞量测定方法如下：将接种前的载体洗净、干燥至恒重，记录为 W_0；固定化细胞经蒸馏水反复冲洗后，置于 90～100℃干燥箱中干燥至恒重，称量得 W'，计算得固定化细胞重量 $W=W'-W_0$。

L-乳酸测定：采用碱式滴定法和 VARIAN5060 型高效液相色谱仪测定。

葡萄糖测定：采用裴林试剂热滴定定糖法。

2 结果与讨论

2.1 固定化细胞的培养制备过程

采用种子培养基，进行固定化细胞摇瓶培养，定时取样测定固定化细胞重量、L-乳酸浓度和葡萄糖浓度，绘制时间过程曲线。在培养液中无游离细胞存在。

从图 1 可见，培养初期的 12h 为固定化细胞的生长延迟期，这与相同条件下游离菌生长的延迟期相比拖后约 4h。16h 左右，固定化细胞的生长进入对数生长期。0～12h 内不产乳酸，20h 以后 L-乳酸浓度增长迅速，至 24h 后产酸量增长缓慢，28h 即达最高值。固定化细胞量从 8h 起至 20h 已经有一定量的积累，而在 20～24h 期间内生长迅速，至 24h 达最大值。由此可见，当固定化菌体生长一段时期后乳酸才开始产生，并且达最大值的时间也略后于菌体生长，说明 L-乳酸的生成与固定化细胞的生长部分相关。16～28h 期间葡萄糖消耗迅速。综合分析图 1 结果，在以后的研究中选择了固定化细胞的培养(制备)时间为 24h。

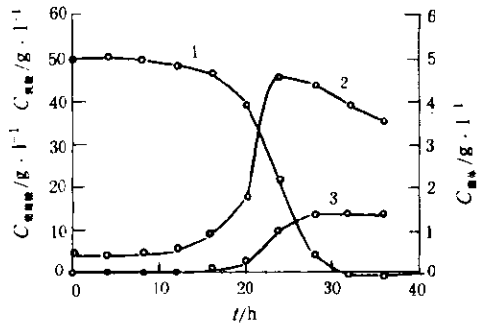

图 1　固定化细胞培养过程曲线

1. 葡萄糖浓度，2. 菌体浓度，3. L-乳酸浓度

2.2 固定化细胞发酵生产 L-乳酸的影响因素

2.2.1 载体颗粒大小的影响：在 70ml 发酵培养基中(初糖浓度 50g/l)分别加入体积相同而载体颗粒大小不同的立方块进行发酵。结果表明(表 1)，载体颗粒大小对产酸影响不大。载体边长在 4～8mm 范围内较适宜。

2.2.2 载体用量的影响：在 250ml 锥形瓶中分

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

别加入 70ml 发酵培养基和边长 6mm 的载体，各瓶中载体添加量不同，发酵 8h 后的结果见表 2。

表 1　载体颗粒大小对产 L-乳酸的影响

载体边长 (mm)	2.5	4.0	6.0	8.0	11.0
产 L-乳酸 (g/l)	36.2	37.0	36.7	37.1	34.8
对糖转化率 (%)	72.4	74.0	73.4	74.2	69.6

表 2　载体用量对产 L-乳酸的影响

载体体积 (cm^3)	10.0	13.0	20.0	27.0
产 L-乳酸 (g/l)	28.2	33.9	37.3	37.5
对糖转化率 (%)	56.4	67.8	74.6	75.0
固定化菌体浓度 (g 干细胞/l)	8.9	11.7	14.7	14.3

从表 2 可以看出，当载体用量高于 $20cm^3$ 时，产酸较高，考虑到当载体用量在 $27cm^3$ 时产酸无明显增大，而固定化菌浓度反而下降，说明载体量过多未能提高固定化细胞的能力。因此，载体量为 $20cm^3$/70ml 培养基较为适宜。

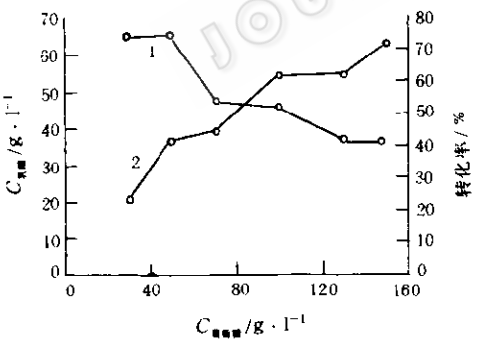

图 2　初始葡萄糖浓度对产 L-乳酸的影响

1. 对糖转化率，　2. L-乳酸浓度

2.2.3　初始葡萄糖浓度的影响：在发酵培养基中加入不同浓度的葡萄糖进行固定化细胞发酵，结果见图 2。随着葡萄糖浓度的增大，产酸量也增大，但其增长速率小于葡萄糖浓度的增大，即 L-乳酸对糖的转化率随糖浓度增大而下降。此结果说明高浓度的葡萄糖对固定化细胞的 L-乳酸发酵有底物抑制效应，并且随着葡萄糖浓度的增加抑制效应越加显著，只有当葡萄糖浓度在 30～50g/l 范围内对糖转化率最高，接近理论转化率(75%)。考虑到后提取工序，以选用葡萄糖初始浓度 50g/l 为宜。

2.3　L-乳酸发酵过程

2.3.1　间歇发酵：采用上述确定的最佳固定化条件，将培养 24h 后所制得的固定化细胞转接入摇瓶发酵培养基进行 L-乳酸发酵，同时做游离菌发酵对照实验。从图 3 可以看出，游离菌与固定化细胞在发酵过程中的葡萄糖消耗与 L-乳酸的生成均是同步进行的。游离菌发酵至 28h 葡萄糖才消耗殆尽，此时 L-乳酸含量也达到高峰，为 38.1g/l，对糖转化率达 76.7%，在 28～36h 期间 L-乳酸浓度无明显变化。而固定化细胞发酵中，葡萄糖消耗速度和 L-乳酸生成速度明显高于游离菌，8hL-乳酸浓度已迅速达最大值，为 37.3g/l，此时葡萄糖仅残存 2g/l，对糖转化率达 77.7%，8h 后，L-乳酸浓度无明显变化。由此可见，固定化细胞的发酵周期比游离菌缩短 3 倍以上。由于在游离菌和固定化细胞液中都有足够量的中和剂，因此在整个发酵过程中 pH 均无明显变化。

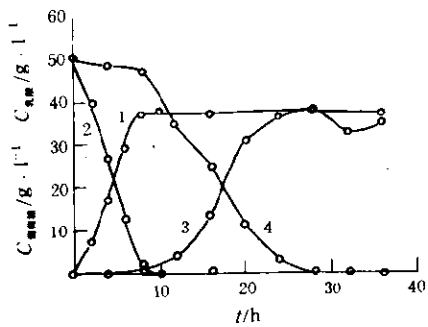

图 3　L-乳酸发酵过程

1. 固定化细胞产酸曲线，2. 固定化细胞耗糖曲线，3. 游离菌产酸曲线，4. 游离菌耗糖曲线

2.3.2　反复间歇发酵：采用 2.3.1 同样培养条件，将每批发酵结束后的固定化细胞用无菌水冲洗三次，再转接入新鲜发酵培养基中进行反复间歇发酵，每批发酵周期为 8h，重复 10 批次的结果见表 3。在反复间歇 10 批次发酵过程中 L-乳酸的浓度和对糖转化率始

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

终保持在一个相当高且稳定的水平，并且在整个反应过程中，生长着的细胞连续地吸附到聚氨酯泡沫颗粒上，在发酵醪中始终没有游离菌体出现。

表 3 反复间歇发酵结果

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
产 L-乳酸(g/l)	33.5	37.0	33.8	35.7	38.8	34.5	32.5	34.5	35.3	32.0
对糖转化率(%)	70.7	76.6	75.9	73.5	77.6	75.5	74.5	72.5	73.6	71.5

3 讨论

利用聚氨酯泡沫固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的速率远高于利用游离菌的发酵结果，并且固定化方法简单易行，所制得的固定化细胞稳定性强，可连续反复使用 10 批次以上，有利于提高设备利用率和生产能力。另一方面，聚氨酯泡沫来源广泛、价格低廉、机械强度大、使用寿命长。因此，该固定化法容易扩大生产规模，应用于工业生产。

参 考 文 献

[1] Vickroy T B. Comprehensive Biotechnolgy, 1984, 3: 761～777.

[2] Ohara H. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, 37: 544～588.

[3] Hang Y D, Hamamci H, Woodams E E. Biotechnol Lett, 1989, 11(2): 903～906.

[4] Ward G E. Industrial and Engineering Chemistry, 1988, 30: 1233～1235.

[5] 蒋明珠，吴芷萍，许孟琴，等. 微生物学报，1991，31: 41～47.

[6] Goncalves L M D, Barreto M T. O. Xavier A M B R, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 38: 305.

[7] 河合敏一. 公開特許公報, 1985, 昭60—6191.

[8] 林建平，郑重鸣，徐志南，等. 第六届全国化工学术论文集. 北京：化学工业出版社，1995，36～39.

L-LACTIC ACID PRODUCTION WITH IMMOBILIZED *RHIZOPUSORYZAE*

Bai Shu Dong Xiaoyan Sun Yan

(*Research Center for Biotechnology, Tianjin University, Tianjin* 300072)

Abstract A new method for immobilizing *Rhizopus oryzae* with polyurethane foam cubes was developed for L-lactic acid production. A 24-h inoculation of *R. oryzae* spores got together with the foam cubes was sufficient for the mycelium growth and immobilization. The fermentation conditions with the immobilized mycelium were determined. Initial glucose concentration of 50g/l in fermentation medium, polyurethane foam of (4～8mm)^3/cube and the immobilized mycelium loading of 20cm^3/70ml medium gave favorable L-lactic acid production. The production rate of L-lactic acid with the immobilized R. oryzae was over three times greater than that with free cells. The yield of L-lactic acid based on glucose consumption reached 77.7%. This value was approximately the same as the theoretical yield, 75%. The immobilized cells could be steadily used in repetitve fermentations for more than 10 batches.

Key words L-lactic acid, *Rhizopus oryzae*, Polyurethane foam, Immobilization

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn