

玉米粉直接发酵生产 *L*-乳酸钙*

陈碧娥^① 刘祖同^② 黄仲达^③

(^①华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011; ^②清华大学生物系, 北京 100084; ^③福州制药厂, 福州 350002)

摘要 以米根霉(*Rhizopus Oryzae*)突变株 R-188 为菌种, 直接用玉米粉为原料, 在 700 L 发酵罐连续进行四批 *L*-乳酸钙生产试验. 平均发酵单耗为每 kg *L*-乳酸钙耗玉米粉 1.03 kg, 平均产酸 0.952 mol · L⁻¹, 产酸速率为 1.18 g · L⁻¹ · h⁻¹. *L*-乳酸钙平均提取率为 81.8%.

关键词 根霉, 玉米粉, *L*-乳酸钙

分类号 TQ 921.3

乳酸钙具有促进骨质形成, 维持神经传导和肌肉收缩的功能, 医药上用于治疗缺钙症和过敏性疾患. 由于其在水中的溶解度较大, 易为人体吸收, 口感好, 无异味, 因此又是理想的钙质食品营养添加剂. 乳酸钙经酸解或离子交换树脂脱钙生成乳酸. 乳酸在食品、医药、化工上均有广泛的用途, 尤其是 *L*-乳酸, 经聚合作用生成聚 *L*-乳酸, 用于制造可生物降解的塑料. 目前国内乳酸钙的生产, 基本上采用微生物发酵法, 以乳酸菌为菌种, 用淀粉质原料(大米粉或玉米粉)糖化后, 发酵生成 *D* 型及 *DL* 型乳酸, 加碳酸钙中和, 进而合成乳酸钙^[1,2]. 本研究在实验室试验成功的基础上^[3], 以米根霉 R-188 为菌种, 省去糖化工序, 直接利用玉米粉为原料, 在 700 L 罐发酵生产 *L*-乳酸钙. 不仅成本低, 而且产酸速率高、提取率高, 成品质量好, 可用于工业大规模生产 *L*-乳酸钙.

1 材料与方 法

1.1 材料

(1) 菌种: 米根霉 R-188, 原菌种购自中国科学院微生物所, 经多次诱变选育. (2) 玉米粉, 市售玉米经粉碎后过 100 目筛用于摇瓶发酵, 过 60 目筛用于 700 L 罐发酵. (3) 轻质碳酸钙, 工业级. (4) 粉末状活性炭, 工业级.

1.2 培养基

(1) 斜面培养基: PDA 培养基.

(2) 摇瓶发酵培养基: 以玉米粉为主要成份, 每 100 mL 的培养基含 10~15 g 玉米粉及适量无机盐. 碳酸钙单独灭菌后, 一次性过量加入.

(3) 700 L 发酵罐培养基: 每 100 mL 培养基含 15 g 玉米粉, 适量无机盐. 碳酸钙单独灭菌

* 本文 1994-12-08 收到; 福建省重点科研课题基金资助项目

后一次性过量加入。

1.3 培养方法

(1) 斜面培养:30℃,培养3~4 d.

(2) 摇瓶发酵培养:每个500 mL三角瓶装100 mL液体培养基,灭菌后接种 $10^6 \sim 10^7$ 个斜面孢子.30℃振荡培养60~70 h.旋转式摇床,转速 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

(3) 700 L发酵罐培养:发酵培养基实罐消毒,茄瓶斜面孢子直接接种.发酵罐为通用式六箭叶搅拌二挡,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.发酵温度为 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.通气量为 $1:0.6 \sim 1:0.8$.

1.4 分析方法

(1) pH值:用PHS-25型酸度计测定.

(2) 发酵液中残糖的测定:用DNS比色法.

(3) 乳酸钙的测定:(a) 发酵液中乳酸钙含量,将发酵液过滤后用EDTA法测定^[4];(b) 成品乳酸钙采用WATERS高效液相色谱仪测定.

(4) 乳酸的测定:(a) 发酵液中乳酸钙含量乘以0.584折算为乳酸量;(b) L-乳酸含量的测定,将乳酸钙用树脂脱钙后,在WZZ-15数字式自动旋光仪上测定旋光度.

2 结果与讨论

2.1 不同浓度的玉米粉摇瓶发酵的结果

在发酵培养基其他组分相同的情况下,分别以每100 mL液体培养基加入10 g,12 g,15 g,玉米粉见图1中1,2,3.玉米粉不预先液化或糖化,灭菌后直接接种.30℃振荡培养.24 h后,定时测定发酵液中的残糖、乳酸钙的含量C及pH值.以每100 mL发酵液残糖降至0.1 g以下为发酵终点.发酵过程pH的变化及乳酸钙的积累过程见图1.

由图1可以看出,24 h前为孢子萌发及菌丝生长时期,因此几乎不积累乳酸.发酵24~48 h,为乳酸大量积累的时期.玉米粉为每100 mL含10 g,12 g时,虽然发酵周期较短,但产酸少,提高玉米粉的浓度能提高乳酸钙的产量.当每100 mL含15 g时,发酵周期72 h,乳酸钙的产量达到 $0.994 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,折算为乳酸的产量是 $0.494 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 其单耗为每1 kg玉米粉产酸596 g.同是米根霉摇瓶发酵,国外报道^[5]发酵周期96 h时,单耗为每1 kg玉米粉产乳酸354 g.

米根霉R-188直接发酵玉米粉生产乳酸及乳酸钙有工业应用价值,因此我们于1993年8月在福州制药厂进行700 L罐生产试验.

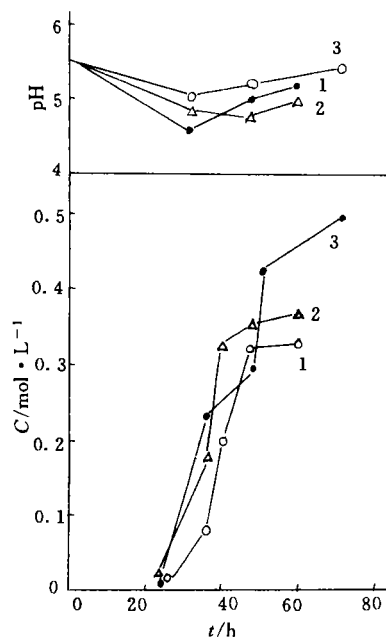


图1 不同浓度玉米粉摇瓶发酵的结果

2.2 700 L 发酵罐生产试验结果

2.2.1 发酵生产工艺流程 见图 2.

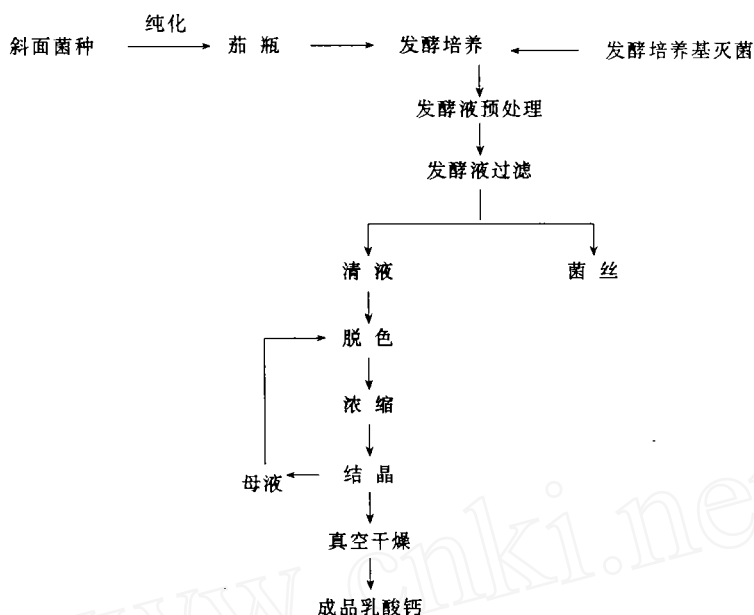


图2 玉米粉直接发酵生产乳酸钙流程

2.2.2 连续四批 700 L 罐生产试验结果 用上述工艺连续进行四批发酵,结果见表 1.表中,发酵初糖 S 为每 100 L 发酵培养基含总糖的 kg 数.发酵单耗 E ,表示每 kg 乳酸钙消耗的玉米粉的 kg 数.其他符号的含义: a -对糖利用率, P -实际产酸量, C -乳酸钙含量, M -产酸速率, t -发酵周期, n -提取率.

表 1 700 L 罐 4 批生产试验结果

批号	$S \times 10^{-2} / \text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$	$a / (\%)$	$P / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$C / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$m / \text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	E	t / h	$n / (\%)$
1	9.05	98.6	0.947	0.473	1.18	1.03	72.0	89.0
2	9.50	98.8	1.032	0.516	1.29	0.94	72.0	89.0
3	8.55	88.8	0.940	0.470	1.14	1.04	74.0	81.3
4	8.95	94.3	0.888	0.444	1.11	1.09	72.0	75.1
平均	9.13	95.1	0.952	0.476	1.18	1.03	72.5	81.8

4 批试验玉米粉中每 100 L 培养基均含玉米粉 15 kg,玉米粉中糖的质量分数为 0.63.第 2 批提取时套用第 1 批的母液,因此合在一起计算提取率.

玉米粉的培养基浓度很高.实罐消毒既要灭菌彻底,又要减少糖分的破坏.由于操作得较好,四批的初糖波动很小,而且整个试验过程都无出现染菌.

在 4 批发酵过程中,试验了接种量、 α -淀粉酶的添加量及液化时间、通风量、发酵液浓度控制等发酵条件.第 3 批由于发酵后期通气量偏低而造成糖耗慢、周期延长.其它各批虽然发酵条件不尽一致,但产酸均较高,尤其第 2 批产酸达 $1.032 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,高于摇瓶试验的产量.本

试验采用从孢子→发酵罐的一级发酵,大规模生产如采用孢子→种子罐→发酵罐的二级发酵,预计发酵周期可以缩短。

2.2.3 700 L 罐发酵过程 以第4批为例,消后总糖为每 100 mL 含量 8.95 g, pH 值为 5.55, 发酵 32 h 后,每 8 h 测定一次发酵液中乳酸钙、还原残糖的含量 S_M 和 pH 值,结果见图 3。

根霉 R-188 在发酵 32 h 后,乳酸的产量几乎成直线上升。由于加入过量 CaCO_3 作中和剂,发酵液 pH 波动不大。值得注意的是尽管总糖较高,但却一直维持在每 100 mL 发酵液含 0.5 g 的还原残糖左右。因此可以认为米根霉 R-188 酶解玉米粉和合成乳酸是同步进行的,酶解玉米粉生成的还原糖大部分用于乳酸的合成及生命活动的需要,仅残留少部分在发酵液中。

2.3 成品质量

2.3.1 成品乳酸钙按药典要求检验 经福建省药品检验所检验,乳酸钙的质量分数及其他无机盐的质量分数如表 2。符合中国药典 1990 版规定。

2.3.2 成品乳酸钙中 *L*-乳酸钙的含量 米根霉发酵产生的乳酸,大部分是 *L*-乳酸,少量是 *D*-乳酸。为测定 *L*-乳酸所占的比例,将成品乳酸钙经离子交换树脂除钙、除杂质后,得含量为 $0.753 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乳酸液,用旋光法测得 *L*-乳酸的质量分数为 0.804。旋光法测定 *L*-乳酸的质量分数,需要相当纯净的乳酸,如含有杂质则难以准确地测定。

2.3.3 成品乳酸钙中其他有机酸盐的含量 米根霉发酵的过程中,除产乳酸外,还产生其他有机酸,因此成品乳酸钙中含有其他有机酸盐。作者委托厦门市药品检验所用 HPLC 测定两批成品乳酸钙,检测总酸中乳酸的含量。第 1 批产品的质量分数分别为乳酸 0.97,草酸 0.01,未知物 0.02。第 4 批产品乳酸质量分数分别为 0.995,未知物 0.005。谱图见图 4。

3 结束语

利用米根霉 R-188 直接发酵玉米粉生产 *L*-乳酸钙,工艺简单,成本低,产量高,质量好,是大规模工业生产的理想途径。

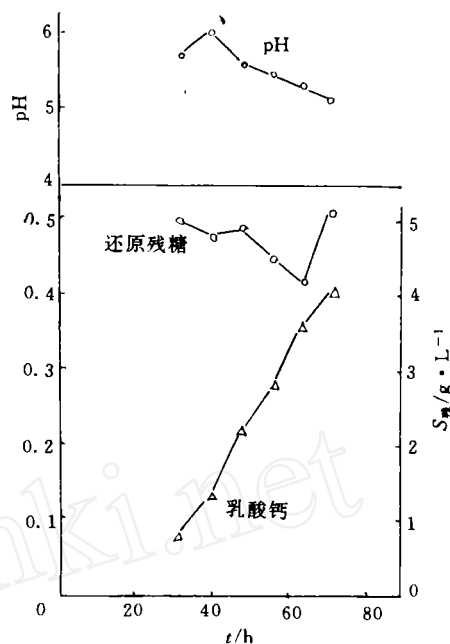


图 3 700 L 罐发酵过程

表 2 乳酸钙质量检验结果

项 目	结 果
鉴 别	呈正反应
酸 度	合 格
氯化物	<0.0005
硫酸盐	<0.00075
钡 盐	合 格
铁 盐	<0.00005
重金属	$<$ 合格
砷 盐	<0.000002
含 量	1.016

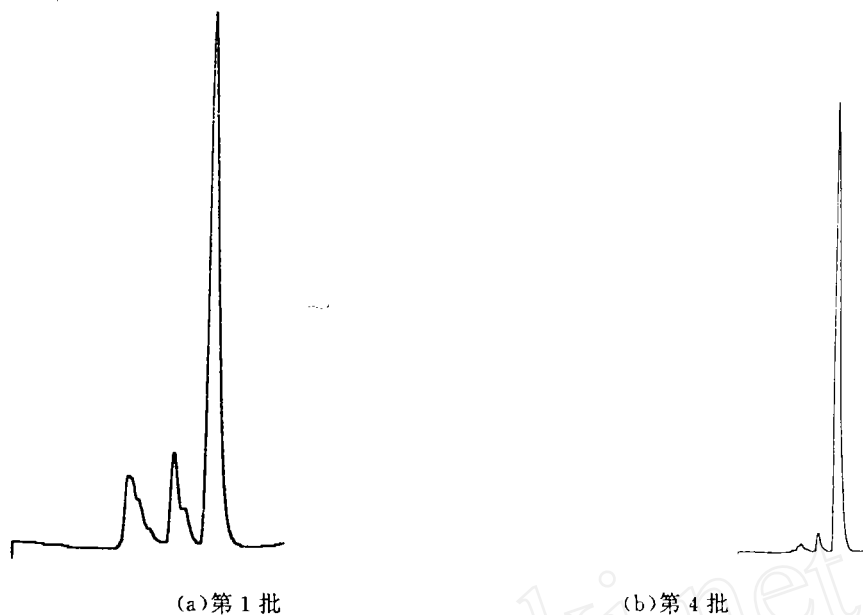


图 4 乳酸钙液相色谱图

参 考 文 献

- 1 金其荣,张继民,徐 勤. 有机酸发酵工艺学. 北京:轻工业出版社,1989. 358~402
- 2 杨 枫,高年发. 关于双酶水解大米粉(玉米粉)发酵法大批量生产药用及食用级乳酸钙的研究. 天津微生物,1988,(3):8~12
- 3 陈碧娥,刘祖同. 根霉 *L*-乳酸发酵的研究. 清华大学学报,1993,(6):91~96
- 4 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 第二部. 北京:化学工业出版社等,1985. 239~240
- 5 Hang Y D. Direct fermentation of corn to *L*(t)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnology Letters, 1989,11(4):299~300

Production of *L*-Calcium Lactate from Corn Powder by Direct Fermentation

Chen Bie^① Lu Zutong^② Huang Zhongda^③

(^①Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou; ^②Dept. of Chem. Biol. Sci. & Biotech., Qinghua Univ., 100084, Beijing; ^③Fuzhou Pharm. Fact., 350002, Fuzhou)

Abstract With R-188 the mutant of *Rhizopus oryzae* as strain and corn powder as raw material, four successive tests of calcium lactate production are carried out on a fermentation tank of 700 litre. The results show an average lactic acid yield of $0.95 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, a volumetric productivity of $1.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a corn consumption of 1.03 kg per kg of *L*-calcium lactate, and an average extraction rate of 81.8 %.

Keywords *Rhizopus*, corn powder, *L*-calcium lactate