

3 结论

3.1 枸杞乙醇提取液中类胡萝卜素主要以胡萝卜素脂肪酸酯的形式存在；枸杞多糖主要以 LBP- I 的形式存在。

3.2 枸杞中的生物活性成分——类胡萝卜素、枸杞多糖、甜菜碱在乙醇溶液中最佳提取条件为 80℃、4h。枸杞中类胡萝卜素在乙醇溶液中的提取率低，枸杞多糖和甜菜碱在乙醇溶液中的提取率高。类胡萝卜素在乙醇溶液中的溶出与乙醇溶液的浓度呈正相关；枸杞多糖与之呈负相关；甜菜碱的溶出与之无关。

3.3 皂土处理和超滤均能使枸杞乙醇提取液达到良好的澄清效果，但同时也引起乙醇提取液中生物活性成分的损失。

3.4 在不同浓度的乙醇溶液中枸杞多糖和甜菜碱均有良好的贮藏稳定性；而类胡萝卜素的贮藏稳定性较差。

参考文献

- 1 何进等. 枸杞及枸杞多糖研究 (I). 食品科学. 1995, 2: 14~21.
- 2 包文芳, 高顺国等. 沈阳药学院学报. 1989, 6 (1): 12~15.
- 3 徐世忱, 宋秋江等. 吉林医药工业. 1990, 4: 1~4, 13.
- 4 王强, 陈绥清等. 中草药. 1991, 22 (2): 67~68.
- 5 Nelis H. J. C. F. et al. Anal. chem. 1983, 55: 270~275.
- 6 AOAC 分析方法手册 (下). 553~554.

固定化米根霉电渗析发酵生产 L-乳酸的研究

李学梅 林建平 李绍壮 刘茉娥 岑沛霖

浙江大学化工系 310027

摘 要 研究了海藻酸钙包埋法固定米根霉在三相流化床反应器中电渗析发酵生产 L-乳酸的工艺。实验结果表明, 采用电渗析可及时除去发酵过程中生成的 L-乳酸, 解除产物抑制。使发酵得以继续进行。间歇电渗析发酵产酸速率为 8~11g/(L 颗粒·h), 得率 0.69g/g。连续补料电渗析发酵产酸速率 13.0g/(L 颗粒·h), 得率 0.74g/g。

关键词 L-乳酸 米根霉 固定化发酵 电渗析发酵

Abstract The L-lactic acid production using *R. oryzae* immobilized by calcium alginate entrapment method in a three-phase fluidized-bed bioreactor was studied. To alleviate the production inhibitory effect, the electrodialysis fermentation which can continuously remove L-lactic acid produced from the fermentation broth was applied. As a result, the fermentation activity was maintained at a high level for a long period. In repeated-batch operation, the production rate was kept between 8~11g/(L-beads·h), and the yield was about 0.69g/g. The production rate was enhanced to 13g/(L-beads·h), and the yield was 0.74g/g when the continuous feeding operation was taken.

Keywords L-lactic acid *R. oryzae* Immobilized fermentation Electrodialysis fermentation

1 前言

乳酸是一种重要的有机酸, 广泛应用于食品和医药等领域, 按其旋光性可分为 D-乳酸

、L-乳酸和 DL-乳酸 3 种, 由于人体只能代谢 L-乳酸, 过量摄入 D-或 DL-乳酸将引起代谢紊乱并引起酸中毒, 世界卫生组织 (WHO) 规定人体每天摄入的 D-乳酸的量应限制在 100mg/kg 体重以下, 且禁止在三个月以下婴儿的食品中添加 D-或 DL-乳酸, 对 L-乳酸则不

加限制^[1]。因此,近年来对L-乳酸生产技术的研究引起了国内外专家的普遍重视。

L-乳酸多采用米根霉来进行发酵生产。由于发酵过程产生的乳酸存在着严重的产物抑制效应,传统方法采用加入 CaCO_3 中和产物,控制pH值,再用钙盐结晶-硫酸酸化法从发酵液中分离出L-乳酸,工艺流程长、消耗化工原料多、产品收率低。这也是大部分有机酸生产中存在的难题之一。近年来,国内外许多研究者进行了发酵与分离耦合技术生产有机酸的研究并取得了一定进展,其中涉及的分离技术有离子交换、溶剂萃取、电渗析等^[2~4]。发酵与分离耦合技术能在发酵的同时及时分离出发酵产物以消除抑制,提高发酵速率。电渗析法过程简单、消耗工业原料少、无污染、易于工业放大和实现自动化连续操作,是一种具有实际应用价值的新型膜分离方法。1986年Hongo等首次报导了采用德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)电渗析发酵生产DL-乳酸的工作,初步揭示了该法用于乳酸生产的可行性。但是,微生物菌体吸附在膜上,使膜电阻增大,电渗析的电流

效率下降。为解决这一问题,曾进行了两方面的探索:①将菌体固定化^[5];②用超滤或微滤膜组件过滤发酵液中的菌体^[6,7],二者都取得了良好的效果。本文将电渗析发酵法应用于米根霉发酵生产L-乳酸以改进L-乳酸的生产工艺。由于米根霉的菌丝发达,发酵好氧,拟采用海藻酸钙包埋法固定米根霉,在三相流化床生物反应器中进行发酵,这样既可防止菌丝堵塞电渗析器,造成膜污染,又可解决传统米根霉发酵中菌丝缠绕结团的问题。

2 实验材料和方法

2.1 菌种

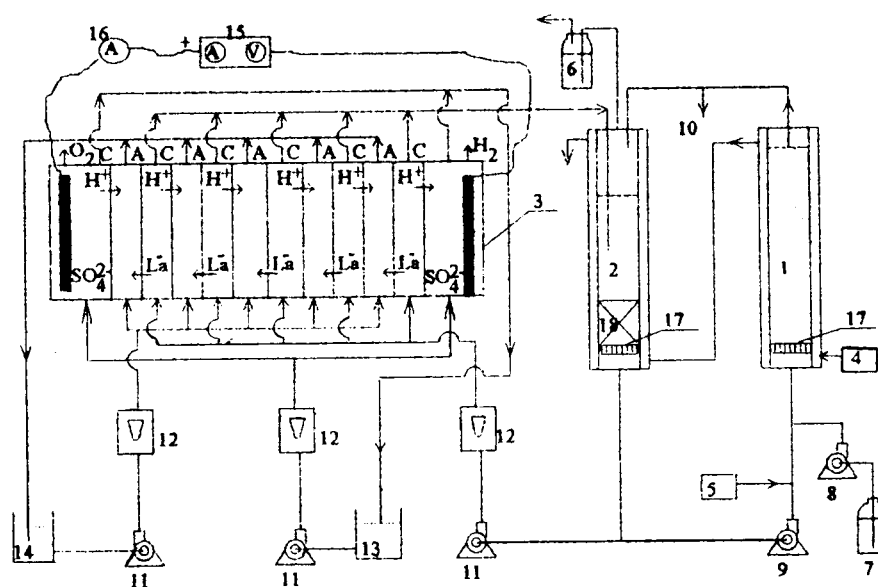
米根霉(*Rhizopus oryzae*) R-1

2.2 培养基

种子培养基: PDA 或米饭培养基^[8];

摇瓶增殖培养基: 口服葡萄糖 13%, 尿素 0.2%, KH_2PO_4 0.02%, 无水 MgSO_4 0.02%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%;

发酵培养基: 葡萄糖随研究条件变化, 尿素



1. 三相流化床生物反应器 2. 缓冲罐 3. 电渗析器 4. 恒温槽 5. 供气系统 6. 洗气瓶 7. 补料槽 8. 进料泵 9. 循环泵 10. 取样口 11. 磁性泵 12. 转子流量计 13. 极水槽 14. 浓水贮槽 15. 直流稳压电源 16. 电流表 17. 多孔挡板 18. 不锈钢填料 C: 阳离子交换膜 A: 阴离子交换膜

图1 电渗析发酵装置图

0.1%, KH_2PO_4 0.02%, 无水 MgSO_4 0.01%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%。

2.3 固定化方法

将灭过菌的 3% 海藻酸钠和从固体种子培养基上洗下的孢子悬液以 2:1 混合均匀, 逐滴滴入 2% CaCl_2 溶液中, 钙化 1h 左右, 用无菌水洗去 CaCl_2 及游离孢子, 加入培养基后进行摇瓶增殖。

2.4 实验设备与装置

电渗析发酵装置见图 1。三相流化床生物反应器 1 的直径为 7cm, 高为 35cm, 总体积为 1.3L, 下部置多孔挡板支撑固定化颗粒, 温度靠夹套内循环流动的恒温水调节, 空气由空压机 5 经过滤后从反应器底部进入反应器, 尾气从洗气瓶 6 排放, 反应器中的发酵液随气体一起进入缓冲罐, 缓冲罐中装有不锈钢填料截留游离菌丝, 发酵液在缓冲罐内静置后, 一部分由循环泵 9 打回反应器, 另一部分则流入电渗析器 3 的淡水室, 经电渗析分离出部分 L-乳酸后返回缓冲罐。

电渗析法是在离子交换基础上发展起来的一种高效膜分离技术。分离的基本依据是离子在电场作用下的定向移动和离子交换膜的选择透过性。离子交换膜可理解为薄膜状的离子交换树脂。阳膜上具有磺酸型基团, 在水溶液中能电离出阳离子, 膜本身带负电荷, 因此溶液中的阳离子可通过膜进行迁移, 阴离子则受到阻挡。同理, 阴膜上具有季铵型基团, 在水溶液中带正电荷, 只允许阴离子通过而阻挡阳离子。这就是离子交换膜的选择透过性。电渗析器的结构如图 1 所示。在阴、阳两个电极之间, 浓、淡水隔板和阴、阳离子交换膜交替排列构成淡水室和浓水室, 阴、阳极为钛涂钎板 (面积: $100 \times 200\text{mm}$), 与直流稳压电源相连, 浓、淡水隔板为直流式聚乙烯板 (厚度: 2.5mm), 阴、阳离子交换膜为聚乙烯异相膜 (有效面积: $100 \times 200\text{mm}$, 5 对)。在阴、阳极室内注入稀 H_2SO_4 ($\text{pH} 2 \sim 3$) 溶液, 淡水室内注入发酵液, 浓水室内注入蒸馏水。通直流电后, 淡水室发酵液中的乳酸根离子 (La^-) 受到阴膜固定基团

和阳极的吸引, 通过阴膜趋向阳极, 但它将受到阳膜的阻挡而被截留在浓水室。同理, 氢离子 (H^+) 也将通过阳膜而受到阴膜的阻挡在浓水室截留下来。于是, H^+ 与 La^- 在浓水室结合生成乳酸 (HLa), 即: 浓水室反应 $\text{H}^+ + \text{La}^- \rightarrow \text{HLa}$ 。极室中发生的电化学反应与普通电极反应相同。而发酵液中的葡萄糖、尿素等为非电解质或弱电解质, 在电场作用下不会发生迁移。这样, 电渗析起到了分离、浓缩乳酸的目的。

2.5 分析方法^[9]

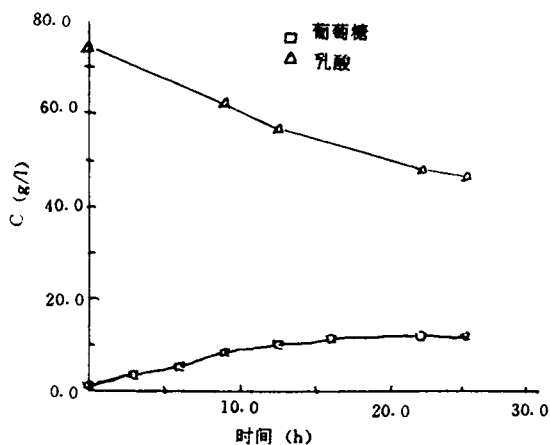
2.5.1 葡萄糖的测量: 斐林试剂法;

2.5.2 L-乳酸的测定: EDTA 定钙法和酸碱滴定法。

3 结果与讨论

3.1 固定化米根霉在三相流化床中为无 pH 控制的发酵过程

固定化颗粒经摇瓶增殖培养 1~4 天后接入三相流化床反应器, 由图 2 可见, 固定化颗粒的产酸速率随着发酵液中的乳酸浓度的增加



(33°C, 1vvm, 培养基 2.075L, 颗粒 0.20L)

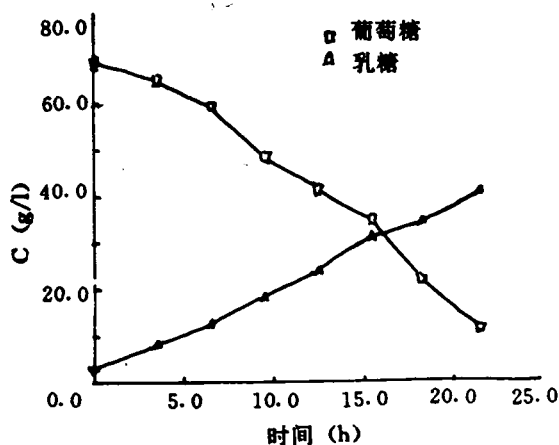
图 2 固定化米根霉在三相流化床中无 pH 控制的发酵过程

而逐渐降低。当乳酸浓度增至 10g/L 以上时, 尽管此时糖浓度还较高, 颗粒几乎停止产酸和耗糖, 发酵不能继续进行。可见游离酸对发酵过程有较强的产物抑制作用。因此, 在以下的

工作中我们分别采用 CaCO_3 中和发酵法和电渗析发酵法进行 L-乳酸的生产。

3.2 固定化米根霉的 CaCO_3 中和发酵

由图 3 可见, 在 CaCO_3 中和发酵过程中。在实验考察的糖浓度范围内, 产酸速率较高且基本保持不变。可见加 CaCO_3 中和发酵产生的乳酸能在一定程度上解除产物抑制。但固体 CaCO_3 的灭菌及添加会使操作及设备复杂化, 并加大分离难度。



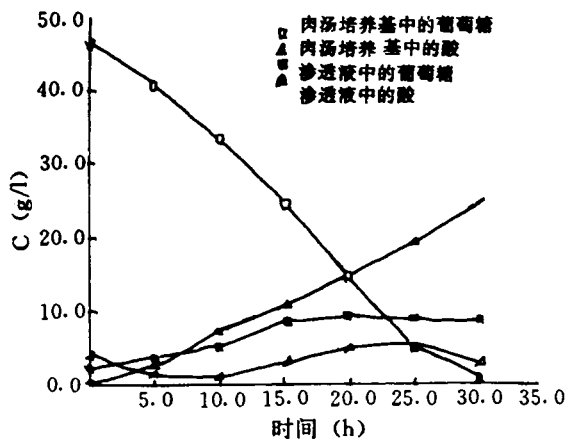
(33°C, 1vvm, 培养基 0.870L, 颗粒 0.20L)

图 3 固定化米根霉的 CaCO_3 中和发酵

3.3 固定化米根霉在三相流化床中电渗析间歇发酵过程

固定化颗粒接入三相流化床反应器, 待产酸至 5g/L 后, 用磁性泵将发酵液打入电渗析器的淡水室, 使其与淡水室内的无菌水混合均匀后加电压, 开始电渗析。发酵液经过电渗析器除去发酵生成的乳酸后回到反应器中。由图 4 可见采用电渗析发酵可及时地将发酵产生的乳酸分离, 使发酵液中乳酸保持在较低浓度 (6g/L 以下), 发酵得以继续进行, 直到葡萄糖消耗完。同时产品乳酸在浓水室中得到积累, 简化了提取工艺。但在乳酸得到分离的同时发酵液中的葡萄糖也因浓差扩散而部分进入浓水室中造成浪费。因此, 我们拟采用连续补料操作来减少糖的损失。

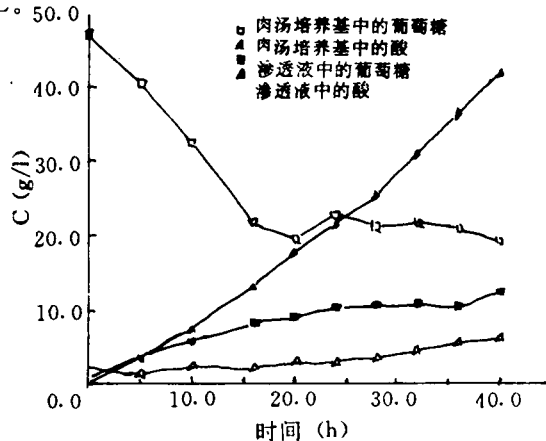
3.4 固定化米根霉在三相流化床中连续补料电渗析发酵过程



(33°C, 1vvm, 培养基 2.20L, 颗粒 0.26L, 回收液 2.13~2.27L)

图 4 固定化米根霉在三相流化床中间歇发酵过程

如图 5 所示, 在电渗析发酵中, 当糖降至 20g/L 后, 进行连续补料, 补料液中葡萄糖浓度高达 420.5g/L, 控制补料速度, 可以使发酵液中糖浓度不高于 20g/L, 这样, 使浓水室中糖浓度可保持在 20g/L 以下。补料后 24h 内耗糖 100g, 产酸 74.4g, 回收液中乳酸浓度达 41.8g/L。



(33°C, 1vvm, 培养基 2.20L, 颗粒 0.22L, 回收液 2.08~2.33L, 补料糖浓 420.5g/L, 流速 10ml/h)

图 5 固定化米根霉在三相流化床中连续补料电渗析发酵过程

3.5 CaCO_3 中和发酵与电渗析发酵的比较

由表 1 可见, 电渗析间歇发酵的产酸速度和得率与 CaCO_3 中和发酵相近, 说明用电渗析发酵进行 L-乳酸的生产是可行的。在 CaCO_3 中和发酵中, 由于乳酸钙易结晶, 限制了初糖

浓度和发酵液中产物浓度的提高,产物回收难度大。而电渗析发酵能在发酵的同时分离产物,易于实现高初糖浓度和连续补料操作,简化了提取工艺,从而具有一定的优越性。

表 1 CaCO_3 中和发酵与电渗析发酵比较

操作方式		最高产酸速率 g/L 颗粒 · h	得率 g/g
CaCO_3 中和发酵		9.65	65.7
电渗析发酵	1	9.48	69.7
	2	10.76	68.1
	3	8.04	69.0
连续补料电渗析发酵		13.00	74.4

4 结论

4.1 在米根霉发酵生产 L-乳酸过程中存在严重的产物抑制,如不控制 pH,发酵液中 L 乳酸浓度大于 10g/L 时,菌体几乎停止产酸。

4.2 采用电渗析发酵可解除产物抑制,其产酸速率为 8~11g/(L 颗粒 · h),得率约 0.69g/g。与传统的 CaCO_3 中和发酵相近。

4.3 与传统的 CaCO_3 中和发酵相比,电渗析发酵不需任何中和剂,可简化提取工艺。它还便于采用连续流加操作,且可采用高浓度的糖,

便于实现生产的自动化和减少废液。

4.4 采用海藻酸钙包埋的固定化发酵可有效地解决因游离菌丝造成的膜污染及发酵传质阻力增大的问题。

4.5 在回收液中发现一些其它阴离子和葡萄糖,这对底物的有效利用及回收产物的纯度产生不良影响,因此提高膜的选择性的研究将是很有意义的。

参考文献

- 1 Matley M. Critical Reviews in Biotechnology. 1992, 12 (1/2): 87~132.
- 2 Hatzinikolaou D G et al. The Canadian Journal of Chem Eng. 1992, 70: 543~552.
- 3 Srivastava A et al. Biotechnol Bioeng. 1992, 39: 607~613.
- 4 Hongo M et al. Applied & Environmental Microbiol. 1986, 52 (2): 314~319.
- 5 Nomura Y et al. Biotechnol Bioeng. 1987, 30: 788~793.
- 6 Nomura Y et al. J. Fermentation & Bioeng. 1991, 71 (6): 450~452.
- 7 Yao P-X et al. J. Gen. Appl. Microbiol. 1990, 36: 111~125.
- 8 Wang H L et al. J Food Sci. 1975, 40: 168~170.
- 9 天津轻工学院等. 工业发酵分析. 轻工业出版社, 1980.

添加赖氨酸和蛋氨酸对面包理化特性的影响

董海洲 山东农业大学 271018

陈 剑 泰安市外贸食品公司

摘 要 本试验探讨了添加不同量赖氨酸和蛋氨酸对面包理化特性的影响。结果表明:添加氨基酸处理的面包蛋白质含量、面粉吸水率、面团弹性和延伸性比对照处理均有明显增加,但碳水化合物含量下降;面包的理化特性有明显改善。

关键词 面粉 蛋白质 面团弹性 面团延伸性 面包

Abstract The effects of lysine and methionine fortification on the physical-chemical characteristics of bread were studied. Results showed that the protein content of bread, stretching and elasticity of dough and water absorption of flour which was fortified with lysine and Methionine were higher than those of the control, but carbohydrate content of bread showed some decrease. The physical-chemical characteristics of bread were significantly improved by fortification.

Key words Flour Protein Dough elasticity Dough stretching Bread

面包是一种营养丰富、组织膨松、易于消化吸收和深受消费者欢迎的方便食品。近些年