

网络出版时间:2015-03-12 14:17 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.04.011
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150312.1417.011.html>

米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸研究

韩玉婕,呼世斌,贾 婵,张春慧,王效国

(西北农林科技大学 资源环境学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】研究利用米根霉(*Rhizopus oryzae*)As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的最佳条件,为小麦淀粉废水资源化利用提供参考。【方法】以米根霉 As3.866 为供试菌种,以小麦淀粉废水为发酵培养基直接发酵生产 L(+)-乳酸,通过摇瓶发酵培养,依次研究米根霉种龄、接种量、装液量、转速、温度、pH、中和剂种类、CaCO₃ 添加量及添加时间对 L(+)-乳酸质量浓度以及米根霉菌丝体生物量和生长状况的影响,确定最佳发酵条件,并在此基础上考察发酵后废水中 COD 的去除效果。【结果】得到利用米根霉直接发酵小麦淀粉废水的最佳发酵条件:米根霉种龄为 18 h,接种量为 10%,装液量为 20%,温度为 26 ℃,pH 为 5.5,转速为 170 r/min,发酵 8 h 后添加 10 g/L 的 CaCO₃,发酵周期为 52 h。【结论】获得了利用米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的最佳发酵条件,在该条件下,L(+)-乳酸质量浓度可达 15.28 g/L,废水中 COD 的去除率达 85%。

【关键词】 L(+)-乳酸;米根霉;小麦淀粉废水;发酵条件

【中图分类号】 X792

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)04-0149-08

Direct fermentation of wheat starch wastewater to produce L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*

HAN Yu-jie, HU Shi-bin, JIA Chan, ZHANG Chun-hui, WANG Xiao-guo

(College of Natural Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This research studied the optimal fermentation conditions for direct fermentation of wheat starch wastewater to produce L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. This would provide reference for utilization of wheat starch wastewater resource. 【Method】 *Rhizopus oryzae* As3.866 was selected to produce L(+)-lactic acid using starch wastewater as fermentation medium. By liquid flask fermentation, effects of seed age, seed culturing amount, working volume, agitation speed, temperature, pH value, neutralizing agent, as well as amount and time of CaCO₃ addition on concentration and biomass of L(+)-lactic acid were studied. Then the optimum fermentation conditions were determined and COD removal efficiency in wastewater was evaluated. 【Result】 The optimum fermentation conditions of flask fermentation were: seed age of *R. oryzae* 18 h, seed culturing amount 10%, working volume 20%, pH 5.5, agitation speed 170 r/min, addition of 10 g/L CaCO₃ after 8 h, and fermentation period 52 hours. 【Conclusion】 Under the obtained optimum fermentation conditions, the concentration of L(+)-lactic acid produced by *R. arrhizus* As3.866 was 15.28 g/L and removal efficiency of COD reached 85%.

Key words: L(+)-lactic acid; *Rhizopus oryzae*; wheat starch wastewater; ferment conditions

〔收稿日期〕 2013-12-13

〔基金项目〕 国家“863”计划项目(2012AA101404)

〔作者简介〕 韩玉婕(1988—),女(蒙古族),内蒙古通辽人,在读硕士,主要从事废水处理与资源清洁利用研究。
E-mail: bluesky880203@163.com

〔通信作者〕 呼世斌(1955—),男,陕西延安人,教授,博士生导师,主要从事废水处理与资源清洁利用研究。
E-mail: 1326801980@qq.com

淀粉加工过程中会产生大量高浓度酸性有机废水,对环境污染严重,但该类废水中含有大量残余淀粉、蛋白质、糖类、脂肪、纤维素、灰分等有机物质^[1],这就为此类废水的资源化利用提供了可能。目前,淀粉废水的资源化利用主要包括发展生态农业^[2]、回收蛋白^[3]以及生产新能源 3 方面,其中用淀粉废水生产新能源包括产沼气^[4]、生物制氢^[5-6]、发酵产乳酸^[7-8]等。乳酸是一种重要的多用途有机酸,广泛应用于食品、医药、制药、饲料、农药、日用化工、皮革和纺织等行业^[9],近年来其最主要的用途之一是以 L(+)-乳酸为原料合成高性能生物降解材料——聚乳酸(PLA)^[10]。我国以发酵法生产 L(+)-乳酸选取的原料主要为玉米、马铃薯、木薯、甘薯、大米淀粉^[11]。近年来,结合环境保护,国内外开展了以有机废弃物为原料生产乳酸的研究,常用的有机废弃物有食品加工废弃物、餐厨垃圾^[12]、木头、秸秆水解液^[13]等。但在此过程中淀粉质原料的高温糊化、液化、糖化单元耗能巨大,且纤维质原料的水解需消耗大量硫酸和昂贵纤维素酶,增加了生产成本和工序,同时会造成环境污染。如能利用米根霉的糖化能力直接发酵小麦淀粉废水生产乳酸,省去淀粉液化和糖化的处理过程,则可节省能源,且工序简单、成本低廉,在降低环境污染的同时,实现淀粉废水的资源化利用,但目前此方面的研究尚鲜见报道^[7-8]。本研究以小麦淀粉废水作为微生物生长的碳源,辅以其其他氮源生产乳酸,研究利用米根霉 As3.866 直接发

酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的工艺,探索最佳发酵条件,旨在为利用小麦淀粉废水直接发酵生产 L(+)-乳酸的中试及工业化生产进行前期技术探索,为小麦淀粉废水的资源化利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

米根霉 As3.866,购于上海通派生物科技有限公司。

1.2 培养基

1.2.1 综合马铃薯培养基 取 200 g/L 马铃薯汁 1 L,分别加入葡萄糖 20 g、 KH_2PO_4 1.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g、硫胺素 8 mg、琼脂 20 g。115 ℃ 灭菌 20 min。其中,硫胺素按量配制成母液,灭菌后,经孔径 0.45 μm 的滤器过滤后加入培养基中。

1.2.2 种子培养基 可溶性淀粉 10 g/L,葡萄糖 60 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 0.35 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.26 g/L, ZnSO_4 0.12 g/L, 115 ℃ 灭菌 20 min。

1.2.3 发酵培养基 以添加 0.5 g/L 硫酸铵的小麦淀粉废水原水为发酵培养基, 115 ℃ 灭菌 20 min。小麦淀粉废水取自陕西眉县营头镇某淀粉生产车间各段工艺所产生的废水,其 pH 值在 3.78~4.94,其他水质特征如表 1 所示。

表 1 小麦淀粉废水的特征

Table 1 Characteristics of wheat starch wastewater

参数 Parameter	测定值/(mg·L ⁻¹) Measured value	参数 Parameter	测定值/(g·L ⁻¹) Measured value
化学需氧量 COD	9 500~11 000	淀粉 Starch	18.6~24.2
5 日生化需氧量 BOD ₅	3 500~3 800	粗蛋白 Crude protein	2.7~3.1
悬浮物 SS	2 000~2 500	还原糖 Reducing sugar	0.9~1.1
氨态氮 NH ₃ -N	92~106	可溶性总糖 Total soluble sugars	1.1~1.3
总磷 TP	36~42		

1.3 培养方法

斜面培养:将米根霉 As3.866 菌种接种于综合马铃薯培养基上,25~28 ℃ 培养 5~7 d,置于 4 ℃ 冰箱保藏,每隔 1 月传代 1 次。

种子培养:取已制备好的米根霉孢子悬液(孢子密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) 1 mL 接种于装有 40 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶中,30 ℃ 下摇床(150 r/min)培养 24 h,得到小菌球。

1.4 米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸发酵条件的优化

研究不同米根霉种龄、接种量、装液量和转速、

温度、pH、中和剂种类、 CaCO_3 添加量及添加时间 9 个因素对 L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量和菌丝体生长状况的影响,确定最佳发酵条件,其中每个因素是在确定前面优化因素水平的基础上进行的。

1.4.1 米根霉种龄的确定 在接种量为 5%(体积分数,下同)、装液量为 10%(体积分数,下同)、转速为 150 r/min、温度为 26 ℃、pH 为 4.0、发酵 12 h 后加入 10 g/L CaCO_3 (单独灭菌,下同)的条件下,恒温培养 42 h,测定米根霉种龄分别为 14,16,18,20,22,24 h 时 L(+)-乳酸质量浓度的变化。

1.4.2 接种量的确定 在米根霉种龄为18 h、装液量为10%、转速为150 r/min、温度为26 ℃、pH为4.0、发酵12 h后加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定接种量分别为2%,5%,10%,15%,20%时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化,观测米根霉菌丝体的生长状况。

1.4.3 装液量的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、转速为150 r/min、温度为26 ℃、pH为4.0、发酵12 h后加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定装液量分别为10%,20%,30%,40%,50%时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化,观测米根霉菌丝体的生长状况。

1.4.4 摇床转速的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、温度为26 ℃、pH为4.0、发酵12 h后加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定摇床转速分别为130,150,170,190,210 r/min时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化,观测米根霉菌丝体的生长状况。

1.4.5 培养温度的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、转速为170 r/min、pH为4.0、发酵12 h后加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定培养温度分别为22,26,30,34 ℃时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化。

1.4.6 pH的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、转速为170 r/min、温度为26 ℃、发酵12 h后加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定pH分别为3.5,4.5,5.5,6.5时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化。

1.4.7 中和剂的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、转速为170 r/min、温度为26 ℃、pH为5.5、发酵12 h后加入中和剂条件下,恒温培养42 h,测定中和剂分别为CaCO₃,NH₃·H₂O,NaOH,NaHCO₃时L(+)-乳酸质量浓度的变化,观测米根霉菌丝体的生长状况。

1.4.8 CaCO₃添加量的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、转速为170 r/min、温度为26 ℃、pH为5.5、发酵12 h后加入CaCO₃的条件下,恒温培养42 h(期间不调节pH),测定CaCO₃添加量分别为5,10,20,30,40 g/L时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化。试验以未添加CaCO₃处理为对照组(CK)。

1.4.9 CaCO₃添加时间的确定 在米根霉种龄为18 h、接种量为10%、装液量为20%、转速为170 r/min、温度为26 ℃、pH为5.5、加入10 g/L CaCO₃的条件下,恒温培养42 h,测定CaCO₃添加时间分别为0,4,8,12,16,20 h时L(+)-乳酸质量浓度及米根霉菌丝体生物量的变化,观测米根霉菌丝体的生长状况。

1.5 米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产L(+)-乳酸后COD去除效果的考察

在最佳发酵条件下,利用米根霉直接发酵淀粉质量浓度为24.2 g/L、COD浓度为10 532 mg/L的小麦淀粉废水,发酵72 h,每隔4 h取样1次,测定L(+)-乳酸质量浓度和COD值,考察米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产L(+)-乳酸后废水中COD的去除情况。

1.6 测定指标与方法

1.6.1 米根霉菌丝体生物量 用体积分数10%的盐酸充分洗涤菌体,除去残留的碳酸钙,再用蒸馏水洗涤数次,于80 ℃烘干至质量恒定后称量,计算米根霉菌丝体生物量^[14]。

1.6.2 L(+)-乳酸质量浓度 发酵液经稀释后,采用高效液相色谱(HPLC)法测定乳酸质量浓度。采用Waters515高效液相色谱仪进行测定,色谱柱为迪马公司的C₁₈反相柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为0.01 mol/L的磷酸氢二铵溶液(磷酸调pH至2.7)流速1.0 mL/min,检测波长210 nm,进样量20 μL,柱温为室温,信噪比为3^[15]。

1.6.3 COD及COD去除率 COD的测定采用国家标准方法^[16]进行。

COD去除率=[发酵前小麦淀粉废水中的COD值-发酵后小麦淀粉废水中的COD值]/发酵前小麦淀粉废水中的COD值×100%。

2 结果与分析

2.1 米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产L(+)-乳酸的发酵条件优化

2.1.1 米根霉种龄 种子培养的目的是使生物量增大,如果种龄过短,则菌体密度低,会使发酵前期增长;种龄过长,菌体老化,酶活力降低,也会使发酵周期延长。将已制备好的米根霉孢子悬液(密度为1×10⁵ mL⁻¹)1 mL接种于种子培养基,摇床转速150 r/min,30 ℃下培养40 h,每隔2 h取样测定发酵液pH及米根霉菌丝体生物量,结果见图1。

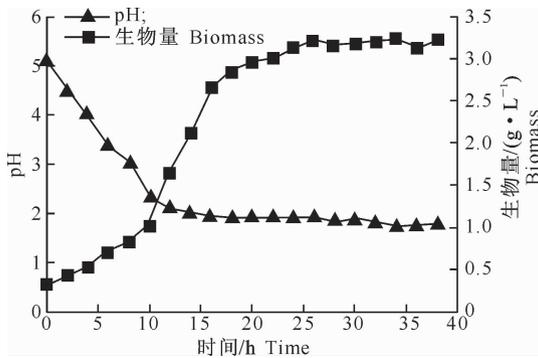


图 1 米根霉 As3.866 种子生长曲线

Fig.1 Growth curve of *R. oryzae* As3.866 seed

由图 1 可以看出,在米根霉 As3.866 孢子增殖过程中,pH 值随培养时间的延长而降低,培养 0~14 h,pH 值迅速由 5.12 下降为 2.02,14 h 后 pH 逐步稳定;米根霉菌丝体的生物量逐渐增加,培养 0~14 h 为菌体生长延滞期,生物量增加不明显,10~24 h 为对数生长期,米根霉菌丝体生物量迅速增加,24 h 后米根霉菌丝体生物量趋于稳定,菌体进入稳定期。一般而言,处于分裂旺盛的对数生长中后期的菌种繁殖能力强,接入发酵培养基后能很快进入对数生长期,有利于缩短发酵周期和提高产酸率。所以本研究选择对数生长中后期 14,16,18,20,22,24 h 的种子进行摇瓶发酵试验,发酵 42 h 后测定 L(+)-乳酸质量浓度,研究不同种龄对 L(+)-乳酸质量浓度的影响,结果见图 2。由图 2 可以看

表 2 接种量对米根霉 As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生长的影响

Table 2 Effects of seed culturing amount on L(+)-lactic acid concentration and mycelial growth of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* As3.866

接种量/% Seed culture	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	米根霉菌丝体生长状况 Mycelial growth state of <i>R. oryzae</i>
2	4.26±0.14	2.92±0.11	絮状团块 Floc
5	8.26±0.11	2.98±0.08	菌球,少量絮状团块 Pellets,few of floc
10	12.24±0.11	2.61±0.12	菌球 Pellets
15	10.16±0.12	2.88±0.14	菌球 Pellets
20	6.16±0.17	3.42±0.13	絮状团块 Floc

由表 2 可以看出,米根霉 As3.866 接种量对 L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量和生长状况影响较大,其中 L(+)-乳酸质量浓度随着接种量的增加而呈现出先升高后降低的趋势;米根霉菌丝体生物量随着接种量的增加没有明显的变化规律,米根霉菌丝体生长状况随着接种量的增加有所不同。当接种量为 2% 时,随着发酵的进行,接入的米根霉菌球不能维持球状,并不断团聚新形成的菌丝体而相互缠绕形成絮状团块;当接种量为 5% 时,形成直径为 0.3~1.5 mm 的菌球,但含有少量絮状

出,随着种龄的增加,L(+)-乳酸质量浓度逐渐增加,至种龄为 18 h 时达到最大值,之后随着种龄的继续增加,L(+)-乳酸质量浓度下降,故后续试验中,米根霉 As3.866 种龄选定为 18 h,即采用培养 18 h 的米根霉种子液接种最好。

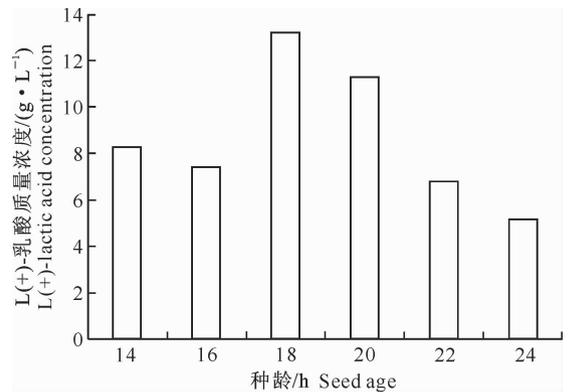


图 2 种龄对米根霉 As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度的影响

Fig.2 Effects of seed age on L(+)-lactic acid concentration during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* As3.866

2.1.2 接种量 为了考察接种量对发酵的影响,取培养 18 h 的米根霉种子液,按不同接种量(2%,5%,10%,15%,20%)接入发酵培养基中,发酵 42 h 后测定发酵液中的 L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量,观察米根霉菌丝体的生长状况,结果如表 2 所示。

团块;当接种量为 10% 时,形成直径为 1~2 mm 的菌球,此时,L(+)-乳酸质量浓度最大,为 12.24 g/L;当接种量为 15% 时,虽然可以形成均一菌球,但 L(+)-乳酸质量浓度略有降低;当接种量为 20% 时,形成大块絮状团块,L(+)-乳酸质量浓度也明显降低。接种量过低或过高,接入的米根霉菌球均会形成大块絮状团块,米根霉菌丝体的生物量较高,但不利于 L(+)-乳酸的生成。米根霉直接发酵小麦淀粉生产 L(+)-乳酸的最佳接种量为 10%。

2.1.3 装液量 发酵过程中的溶氧情况对米根霉

菌丝体生长和 L(+)-乳酸的积累影响较大。在生产 L(+)-乳酸的前期,菌丝体生长以好氧为主,后期产酸阶段以厌氧为主。摇瓶发酵过程中装液量影响着培养基内的溶解氧含量,从而影响着米根霉的生长和 L(+)-乳酸的积累。一定范围内,装液量越低,溶解氧含量越高,L(+)-乳酸积累越多,但如果

表 3 装液量对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生长的影响

Table 3 Effects of working volume on L(+)-lactic acid concentration and mycelial growth of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* *As3.866*

装液量/% Working volume	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	米根霉菌丝体生长状况 Mycelial growth state of <i>R. oryzae</i>
10	7.42±0.12	3.34±0.12	菌丝 Filamentous
20	13.73±0.09	3.64±0.06	菌球 Pellets
30	10.41±0.15	3.62±0.09	菌球 Pellets
40	8.47±0.12	3.78±0.11	菌球、菌丝 Pellets, filamentous
50	9.12±0.27	2.98±0.12	菌球、菌丝 Pellets, filamentous

表 3 显示,当装液量为 10% 时,米根霉菌丝体生物量为 3.34 g/L, L(+)-乳酸质量浓度较低,为 7.42 g/L,菌丝体以菌丝的形态存在;当装液量为 20%~50% 时, L(+)-乳酸质量浓度变化明显,为 8.47~13.73 g/L,米根霉菌丝体生物量变化不明显,为 2.98~3.78 g/L,菌丝体大部分以菌球形式存在,其中当装液量为 20% 时,获得的 L(+)-乳酸质量浓度最大,为 13.73 g/L,菌丝体大部分以菌球

装液量过低,菌丝体以菌丝的形态存在,并不利于 L(+)-乳酸的积累,如果装液量过高,氧的传输受阻, L(+)-乳酸质量浓度也会随之降低。装液量对 L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量的影响如表 3 所示。

形式存在。由以上分析可知,米根霉直接发酵小麦淀粉生产 L(+)-乳酸的最佳装液量为 20%。

2.1.4 摇床转速 三角瓶中的发酵液在摇床上震荡培养,可使气液混合和分散,使得空气中的氧有效溶解。但转速不仅通过影响溶氧对发酵产生影响,同时也是影响米根霉成球效果的重要因素。转速对 L(+)-乳酸质量浓度和生物量的影响如表 4 所示。

表 4 摇床转速对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生长的影响

Table 4 Effects of agitation speed on L(+)-lactic acid concentration and mycelial growth of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* *As3.866*

转速/(r·min ⁻¹) Agitation speed	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	米根霉菌丝体生长状况 Mycelial growth state of <i>R. oryzae</i>
130	6.42±0.11	2.42±0.03	菌丝、絮状团块 Filamentous, floc
150	11.21±0.09	3.14±0.06	菌球、菌丝 Pellets, filamentous
170	14.23±0.14	3.78±0.09	菌球 Pellets
190	9.26±0.17	3.62±0.11	絮状团块 Floc
210	8.37±0.17	3.48±0.12	絮状团块、菌块 Floc, clump

表 4 显示,当转速为 130 r/min 时,米根霉菌丝体为菌丝或絮状团块, L(+)-乳酸质量浓度较低,为 6.42 g/L;当转速为 150 r/min 时,米根霉菌丝体为菌球,且含有少量菌丝, L(+)-乳酸质量浓度为 11.21 g/L;当转速为 170 r/min 时, L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均达最大;之后随着转速的继续增加, L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均降低,且菌丝体不能维持球形。米根霉直接发酵小麦淀粉生产 L(+)-乳酸的最佳转速为 170 r/min。

2.1.5 温度 一般而言,微生物的最适生长温度和微生物代谢合成产物的最适温度并不一致,本研究所用米根霉的最适生长温度为 25~28 ℃,故选定

22, 26, 30 和 34 ℃,研究温度对米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的影响,结果如表 5 所示。由表 5 可知, L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生物量受温度影响明显,当温度为 26 ℃ 时, L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均达到最大值,故最佳温度为 26 ℃。

2.1.6 pH 环境 pH 值对微生物的生命活动影响很大, pH 值的变化会影响酶活性以及菌体对基质的利用速率和细胞结构,从而影响菌体的生长及产物的形成。小麦淀粉废水发酵生产 L(+)-乳酸是产酸过程, pH 值会逐步降低,这对细胞的生长和乳酸的累积都有很强的抑制作用。试验中,每隔 4 h 添加 1 次 4 mol/L 的氢氧化钠溶液,控制发酵液的

pH 分别为 3.5, 4.5, 5.5 和 6.5, 以 L(+)-乳酸质量浓度、米根霉菌丝体生物量为考察指标, 研究小麦淀粉

粉废水发酵生产 L(+)-乳酸的最适 pH, 结果见表 6。

表 5 温度对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生物量的影响
Table 5 Effects of temperature on L(+)-lactic acid concentration and mycelial biomass of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater *R. oryzae* *As3.866*

温度/℃ Temperature	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	温度/℃ Temperature	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>
22	8.12±0.06	2.36±0.02	30	11.14±0.13	3.02±0.04
26	14.16±0.11	3.33±0.06	34	7.27±0.08	2.21±0.03

表 6 pH 对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生物量的影响

Table 6 Effects of pH on L(+)-lactic acid concentration and mycelial biomass of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* *As3.866*

pH	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	pH	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>
3.5	5.48±0.12	2.12±0.09	5.5	12.16±0.08	2.23±0.11
4.5	8.88±0.11	2.83±0.04	6.5	8.14±0.09	2.68±0.07

表 6 显示, 当 pH 为 3.5~6.5 时, 随着 pH 的升高, L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均先升高后降低, 当 pH 为 5.5 时, L(+)-乳酸质量浓度达最大, 米根霉菌丝体生物量也较高, 故米根霉直接发酵小麦淀粉生产 L(+)-乳酸的最适 pH 为 5.5。

2.1.7 中和剂 添加不同种类的中和剂可以为乳酸发酵微生物生长提供所需的最佳 pH 及获得利于产酸的菌体形态和获得更大的乳酸积累^[17]。不同中和剂对米根霉菌丝体生长状况的影响如图 3 所示, 对 L(+)-乳酸质量浓度的影响如表 7 所示。

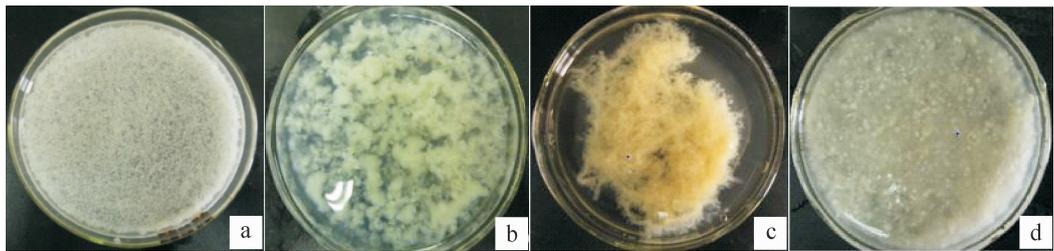


图 3 中和剂对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸过程中菌丝体生长的影响
a. CaCO₃; b. NH₃·H₂O; c. NaOH; d. NaHCO₃

Fig. 3 Effects of neutralizing agent on mycelial growth of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* *As3.866*

表 7 中和剂对米根霉 *As3.866* 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度的影响

Table 7 Effects of neutralizing agent on L(+)-lactic acid concentration during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* *As3.866*

中和剂种类 Neutralizing agent	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	中和剂种类 Neutralizing agent	L(+)-乳酸质量浓度/(g·L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration
CaCO ₃	14.48±0.11	NaOH	8.35±0.07
NH ₃ ·H ₂ O	7.32±0.12	NaHCO ₃	13.64±0.06

图 3 和表 7 显示, 以 CaCO₃ 为中和剂时, 米根霉菌丝体形态为菌球, L(+)-乳酸质量浓度最高, 达 13.48 g/L; 以 NH₃·H₂O 为中和剂时, 米根霉菌丝体形态为稍微蓬松的菌丝絮状体, 夹杂短杆状菌体, L(+)-乳酸质量浓度最低, 为 7.32 g/L; 以 NaOH 为中和剂时, 米根霉菌丝体形态为棉絮状, 相互缠绕

在一起, 发酵液的黏度增加, L(+)-乳酸质量浓度也较低; 以 NaHCO₃ 为中和剂时, 米根霉菌丝体形态为菌球, 但菌球分布不均一, 且夹杂分散的菌丝体, L(+)-乳酸质量浓度较高。由以上结果可知, 米根霉直接发酵小麦淀粉生产 L(+)-乳酸的最佳中和剂为 CaCO₃。

2.1.8 CaCO₃ 添加量 本研究分别将 5,10,20,30,40 g/L 的 CaCO₃ 粉末添加至发酵培养基中,以未添加 CaCO₃ 处理为对照组(CK),且在发酵过程

中未调节 pH 值,发酵 42 h 后测定 L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量,结果见表 8。

表 8 CaCO₃ 添加量对米根霉 As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和菌丝体生物量的影响

Table 8 Effects of CaCO₃ addition amount on L(+)-lactic acid concentration and mycelial biomass of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* As3.866

CaCO ₃ 添加量/ (g · L ⁻¹) Amount of CaCO ₃ addition	L(+)-乳酸质量 浓度/(g · L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体 生物量/(g · L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	CaCO ₃ 添加量/ (g · L ⁻¹) Amount of CaCO ₃ addition	L(+)-乳酸质量 浓度/(g · L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体 生物量/(g · L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>
0(CK)	5.98±0.10	2.45±0.09	20	9.43±0.08	4.02±0.13
5	8.02±0.12	3.48±0.17	30	8.86±0.13	3.12±0.09
10	14.65±0.11	4.01±0.14	40	6.47±0.11	2.84±0.15

由表 8 可知,与 CK 相比,当 CaCO₃ 添加量为 10 g/L 时,L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均达最大。当 CaCO₃ 添加量大于 10 g/L 时,L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生物量均略有下降。因此,米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产

L(+)-乳酸时 CaCO₃ 的最佳添加量为 10 g/L。

2.1.9 CaCO₃ 添加时间 分别选择发酵开始后的 0,4,8,12,16,20 h 添加 10 g/L 的 CaCO₃,研究 CaCO₃ 添加时间对米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的影响,结果如表 9 所示。

表 9 CaCO₃ 添加时间对米根霉 As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸质量浓度和米根霉菌丝体生长的影响

Table 9 Effects of CaCO₃ addition time on L(+)-lactic acid concentration and mycelial growth of *R. oryzae* during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* As3.866

CaCO ₃ 添加时间/h CaCO ₃ addition time	L(+)-乳酸质量浓度/(g · L ⁻¹) L(+)-lactic acid concentration	米根霉菌丝体生物量/(g · L ⁻¹) Mycelial biomass of <i>R. oryzae</i>	米根霉菌丝体生长状况 Growth state of <i>R. oryzae</i>
0	10.18±0.11	3.45±0.08	絮状 Floc
4	11.62±0.14	3.48±0.16	菌球 Pellets
8	15.85±0.12	3.92±0.14	菌球 Pellets
12	8.12±0.08	3.82±0.07	絮状、菌块 Floc,clump
16	8.26±0.13	3.02±0.12	絮状、菌块 Floc,clump
20	7.47±0.18	3.84±0.15	菌块 Clump

表 9 显示,在发酵开始后的第 8 h 添加 CaCO₃,L(+)-乳酸质量浓度最高,达 15.85 g/L;在发酵开始后的第 12,16,20 h 添加 CaCO₃,米根霉菌丝体生长进入对数期,菌丝体生长迅速,菌丝容易包裹新添加的 CaCO₃,形成菌块,不利于后期产酸,故 L(+)-乳酸质量浓度降低。由以上分析可知,发酵开始后的第 8 h 加入 CaCO₃ 能够得到较好的发酵效果。这与 Wu 等^[18]利用半连续发酵法生产 L(+)-乳酸时的最佳 CaCO₃ 添加时间一致。

的增幅减小。发酵至 72 h 时,废水中的 COD 值降为 1 532 mg/L,去除率达 85%。

2.2 米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸后对 COD 的去除效果

图 4 显示,在最初的 16 h 内,L(+)-乳酸质量浓度无明显增加,之后 L(+)-乳酸质量浓度迅速增加,至 52 h 时达 15.28 g/L,然后趋于稳定,因此,米根霉直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的发酵周期为 52 h。在 0~52 h 时,随着发酵产酸的进行,小麦淀粉废水中的碳源物质被米根霉的生长所利用,COD 的去除率随之增加,52 h 后 COD 去除率

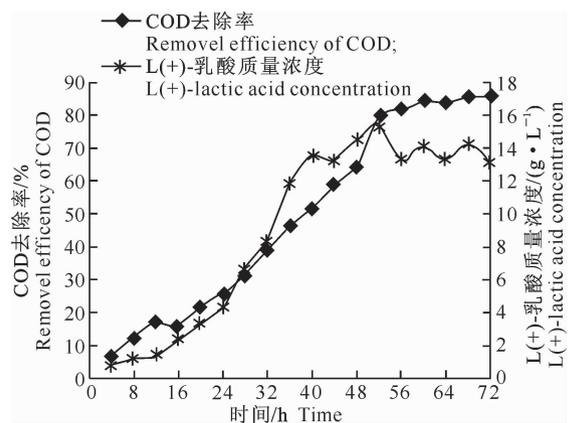


图 4 米根霉 As3.866 直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸的质量浓度和废水中 COD 去除率的变化
Fig. 4 Variations of removal efficient of COD and L(+)-lactic acid concentration during direct fermentation of wheat starch wastewater by *R. oryzae* As3.866

3 结 论

利用米根霉 AS3.866 可直接发酵小麦淀粉废水生产 L(+)-乳酸,其最佳发酵条件为:米根霉种龄为 18 h,接种量为 10%,装液量为 20%,转速为 170 r/min,温度为 26 ℃,pH 为 5.5,发酵 8 h 后添加 10 g/L 的 CaCO₃,发酵周期为 52 h,在该条件下 L(+)-乳酸质量浓度可达 15.28 g/L,废水中 COD 的去除率可达 85%。

[参考文献]

[1] 何国庆,朱 辉,陈忠明,等.小麦淀粉工业废水水质特征及酶法预处理条件研究[J].浙江农业学报,1997,9(5):235-239.
He G Q, Zhu H, Chen Z M, et al. The features of the wastewater from wheat starch industry and its pretreatment process with amylase [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1997, 9(5): 235-239. (in Chinese)

[2] 张美华.淀粉废水底泥复合肥的水稻增产机理研究[J].西南农业大学学报,2000,22(5):432-434.
Zhang M H. A study on the mechanism for yield improvement in rice by starch wastewater sludge compound fertilizer [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(5): 432-434. (in Chinese)

[3] 邓述波,胡筱敏,罗 茜.微生物絮凝剂处理淀粉废水的研究[J].工业水处理,1999,19(5):8-10.
Deng S B, Hu X M, Luo Q. Micro biological flocculation agent processing starch waste water research [J]. Industrial Water Treatment, 1999, 19(5): 8-10. (in Chinese)

[4] Kaparaju P, Serrano M, Angelidaki I. Optimization of biogas production from wheat straw stillage in UASB reactor [J]. Applied Energy, 2010, 87: 3779-3783.

[5] Lin Y H, Juan M L, Hsien H J. Effects of temperature and initial pH on biohydrogen production from food-processing wastewater using anaerobic mixed cultures [J]. Biodegradation, 2011, 22: 551-563.

[6] Sen B, Suttarb R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch-processing wastewater using enriched mixed cultures [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37: 15588-15597.

[7] Huang L P, Jin B, Paul L. Direct fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus* [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2005, 27: 229-238.

[8] Jin B, Huang L P. *Rhizopus arrhizus*: A producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25:

1983-1987.

[9] 王博彦,金其荣.发酵有机酸生产与应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,2000:356-358.
Wang B Y, Jin Q R. Production and application of fermentation acid [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2000: 356-358. (in Chinese)

[10] Jem K, Johan F, Siccó D. Microbial lactic acid, its polymer poly (lactic acid), and their industrial applications [J]. Plastics from Bacteria Microbiology Monographs, 2010, 14: 323-346.

[11] Thongchul N, Navankasattusas S, Yang S T. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33: 407-416.

[12] Jin B, Yin P H, Ma Y. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams [J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32: 678-686.

[13] Wee Y J, Yun J S, Park D H. Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of enterococcus faecalis [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 71-74.

[14] 董 涛,黄丽萍,陈景文.葡萄糖和氯化钠对米根霉利用鱼粉淀粉废水生成乳酸的影响[J].应用与环境生物学报,2007, 13(4): 579-582.
Dong T, Huang L P, Chen J W. Effect of glucose and sodium chloride on lactic acid production integrated with fishmeal wastewater treatment by *rhizopus oryzae* [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2007, 13(4): 579-582. (in Chinese)

[15] 郑 志.米根霉发酵产 L-乳酸的代谢调控研究[D].合肥:合肥工业大学,2006.
Zheng Z. *Rhizopus oryzae* fermentation to produce L-lactic acid metabolism regulation research [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2006. (in Chinese)

[16] 国家环保总局.《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:环境科学出版社,2002.
State Environmental Protection Administration, Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods of Encoding. Water and wastewater monitoring and analysis method [M]. 4th edition. Beijing: Environmental Science Press, 2002. (in Chinese)

[17] Yen H W, Chen T J. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26: 437-441.

[18] Wu X F, Jiang S T. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38: 565-571.