

# 固定化黑曲霉发酵玉米糖液生产柠檬酸的研究\*

周剑平<sup>1</sup> 龚伟中<sup>1,2</sup> 王治业<sup>1</sup> 杨晖<sup>1,3</sup> 麻和平<sup>1</sup>

(甘肃省科学院生物研究所 兰州 730000)<sup>1</sup> (中国科学院兰州化学物理研究所 兰州 730000)<sup>2</sup>  
(兰州大学生命科学学院 兰州 73000)<sup>3</sup>

**摘要:** 利用 PVA 复合凝胶包埋黑曲霉的孢子及菌丝体。固定后的细胞经过一系列预培养, 用于发酵玉米生产柠檬酸。试验确定的固定化细胞摇瓶发酵生产柠檬酸最适条件为: 玉米糖液浓度 10Bx, 培养温度 35℃, 摇瓶转速 250r/min。经此条件发酵 64h, 柠檬酸产率最高达到 96g/L, 通常稳定在 90g/L 左右。同时对柠檬酸连续批次发酵生产进行了初步研究, 固定化黑曲霉可连续使用 8 批次以上, 其柠檬酸产量稳定在 86~92 g/L 之间, 这为柠檬酸连续发酵提供了有利的保证, 并探讨了有关的工艺技术条件。

**关键词:** 固定化, 黑曲霉, 玉米, 柠檬酸发酵

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0029-04

## STUDIES ON CITRIC ACID PRODUCTION FROM CORN SACCHARIFYING LIQUID BY IMMOBILIZED *ASPERGILLUS NIGER*

ZHOU Jian-Ping<sup>1</sup> GONG Wei-Zhong<sup>1,2</sup> WANG Zhi-Ye<sup>1</sup> YANG Hui<sup>1,3</sup> MA He-Ping<sup>1</sup>

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000)<sup>1</sup>

(Institute of Chemistry and Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)<sup>2</sup>

(College of life science, Lanzhou University, Lanzhou 73000)<sup>3</sup>

**Abstract:** The immobilized cells of *Aspergillus niger* with complex PVA were used to produce citric acid by fermenting corn saccharifying liquid. The suitable conditions for fermentation in shaking flask were determined as follows: corn saccharifying liquid concentration 10Bx, temperature 35℃ and rotatory speed of shaking flask 250r/min. The citric acid yield reached 96g/L maximally and usually was 90g/L after 64h fermentation under the suitable conditions. The continuous fermentation of immobilized cell was studied primarily. The experimental result showed that immobilized *Aspergillus niger* can be used continuous for more than eight times and citric acid yield was 86~92g/L.

**Key words:** Immobilized cell, *Aspergillus niger*, Corn, Citric acid Fermentation

柠檬酸是一种重要的有机酸, 在食品、化工、医药、建筑、印染、皮革、洗涤剂等行业有广泛的用途<sup>[1,2]</sup>。近年来, 随着国内经济的持续发展, 市场对柠檬酸的需求也在增加。我国是柠檬酸生产大国, 总产量达 20 万 t/a, 其中 70% 出口国外。因此, 采用先进技术改进生产方法, 可以降低成本, 增加产量, 提高产品出口创汇能力。利用固定化细胞连续发酵柠檬酸, 是目前研究较多, 并初见成效的新技术<sup>[1,3,4]</sup>。我们以玉米为碳源, 对此技术进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (由甘肃临泽雪晶淀粉化工有限公司提供)。

\* 国家技术创新基金资助项目 (No. 00BK-376)

收稿日期: 2000-09-11, 修回日期: 2000-11-25

**1.1.2 培养基:** 斜面培养基: 麦芽汁培养基<sup>[5]</sup>。发酵培养基: 玉米糖液 8~10Bx (浓度以勃力克斯比重计表示, 简写 Bx), 加麸皮 0.5g/100mL。

## 1.2 分析方法

**1.2.1 总酸度的测定:** NaOH 滴定法<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 柠檬酸的测定:** 滴定法<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 还原糖测定:** 斐林滴定法<sup>[7]</sup>。

**1.2.4 pH:** 酸度计法。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞固定化方法:** 将 10% (w/v) 聚合度 1780 的聚乙烯醇 (PVA) 溶液加入 1% (w/v) 硼砂, 3% (w/v) 的甘油混合成复合凝胶。复合凝胶冷却到 30℃, 加入定量的菌丝体及孢子悬浮液, 混匀, -40℃ 成型, 制成 5.0mm × 5.0mm × 5.0mm 的固定化黑曲霉载体方块备用。

**1.3.2 固定化细胞预培养:** 将固定化黑曲霉载体浸泡在糖液浓度 3~4 Bx 发酵培养基中, 摇瓶培养 24~30h。至孢子开始萌发时, 停止培养。将培养基与载体分离, 载体待用。

**1.3.3 玉米粉预处理:** 玉米粉按 5u/g 比例加入耐高温淀粉酶, 再加约 4 倍重量水, 95℃ 温度下, 液化 30min, 冷却调整至所需浓度备用。

**1.3.4 摇瓶发酵条件:** 300mL 三角瓶中放入 50mL 培养基, 加入 10g 固定化黑曲霉, 34℃~35℃, 250r/min 转速下培养。

## 2 结果与讨论

### 2.1 玉米糖液浓度对柠檬酸产量的影响

以不同浓度的玉米糖液为底物 (8~16Bx), pH4.5~5.0, 温度 35℃, 250r/min 转速下, 发酵 64h, 观察玉米糖液浓度对柠檬酸产量的影响。试验结果如表 1 所示。

在糖液浓度为 8~14Bx 范围内对产酸影响不大, 发酵产酸率均达到 96%, 而超过 14Bx 时, 产酸时间明显延迟。因此, 本实验研究选定最适宜糖度为 10Bx。

### 2.2 温度对柠檬酸产量的影响

根据菌种提供单位对菌种特性介绍, 我们观察了温度对柠檬酸产量的影响。调整发酵温度 32℃~38℃, 实验在恒定摇瓶转速 250r/min, 初始 pH4.5~5.0, 糖度为 8~10Bx 条件下进行。测定结果如表 2 所示。

表 1 不同糖液浓度下柠檬酸产量对照表

|           | 糖度 (Bx) |    |    |    |     |     |     |     |     |  |
|-----------|---------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|           | 8       | 9  | 10 | 11 | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  |  |
| 发酵时间 (h)  | 64      | 64 | 64 | 64 | 64  | 64  | 64  | 80  | 80  |  |
| 柠檬酸 (g/L) | 76      | 89 | 96 | 98 | 110 | 126 | 130 | 130 | 136 |  |

表 2 不同温度对柠檬酸产量及残糖的影响

|           | 温度 (℃) |     |     |     |     |     |     |  |
|-----------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|           | 32     | 33  | 34  | 35  | 36  | 37  | 38  |  |
| 柠檬酸 (g/L) | 89     | 89  | 94  | 96  | 93  | 90  | 89  |  |
| 残糖 (g/L)  | 8.0    | 6.0 | 3.0 | 3.0 | 4.0 | 6.0 | 6.0 |  |

由表 2 可知, 温度过高或过低均影响柠檬酸产量及降糖能力, 最终确定其最适温度为 34℃~35℃ 之间。

### 2.3 摇瓶转速对柠檬酸发酵的影响

黑曲霉作为好氧菌其溶氧水平是决定其生产代谢的关键所在。摇瓶阶段, 影响溶

氧的主要因素便是转速。根据以上条件,我们确定在10Bx玉米糖液发酵培养基中,加入10g固定化黑曲霉细胞,控温35℃培养64h,测定其不同转速下产酸耗糖结果见表3。

由表3可知,摇瓶转速对发酵产酸具有极大的影响,是控制柠檬酸发酵最关键的参数之一。在低转速下(120~180r/min),显微观察菌球形成缓慢。结合转速与工艺控制的可能,再配合产酸与降糖速度,选定最适摇瓶转速在250r/min。

#### 2.4 固定化黑曲霉与游离细胞摇瓶发酵生产柠檬酸对照

根据传统柠檬酸发酵工艺均采用黑曲霉游离细胞发酵的特点,考虑采用固定化黑曲霉后有可能产生与传统工艺在代谢规律上的不同,就两种工艺柠檬酸生成及还原糖消耗作一对照试验(恒定摇瓶转速250r/min,初始pH4.5~5.0,糖度为10Bx),结果如图1。

由图1可知,经预培养后固定化黑曲霉与游离细胞在柠檬酸生成及还原糖消耗、pH变化上均无太大差异,即固定化黑曲霉发酵生产柠檬酸工艺过程基本符合游离细胞摇瓶发酵生产柠檬酸规律,其变化基本一致。这也表明黑曲霉细胞经固定化后基本不改变原游离细胞的代谢规律。

#### 2.5 固定化黑曲霉连续批次发酵生产柠檬酸

一般意义上固定化细胞技术已为连续发酵提供了可能。为证实这种可能,我们对预培养后的固定化黑曲霉细胞进行了连续批次发酵实验,并与游离细胞连续发酵实验进行对照。具体工艺条件为:摇瓶转速250r/min,初始pH4.5~5.0,糖度10Bx,温度35℃,批次发酵时间为72h。结果如图2所示。

由实验结果可知,固定化黑曲霉使用8批次,柠檬酸产量仍可达到86~92g/L;8批次后,产量才开始下降。而游离细胞分批次培养到第2批,产酸率就明显下降,至第3批时已难以维持。即固定化黑曲霉比游离黑曲霉细胞具有明显的批次重复发酵能力,这也与国内外固定化黑曲霉细胞柠檬酸发酵结论相吻合<sup>[1,8,3]</sup>。根据我们对各种细胞固定化的研究经验<sup>[9,10]</sup>,可能是因为黑曲霉孢子或菌丝体经固定化

表3 不同摇瓶转速对柠檬酸产量和耗糖的影响

|           | 摇瓶转速 (r/min) |     |     |     |     |     |     |
|-----------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | 120          | 150 | 180 | 210 | 250 | 270 | 300 |
| 柠檬酸 (g/L) | 40           | 50  | 60  | 82  | 96  | 96  | 97  |
| 残糖 (g/L)  | 6.0          | 6.0 | 5.6 | 4.0 | 2.6 | 2.0 | 1.8 |

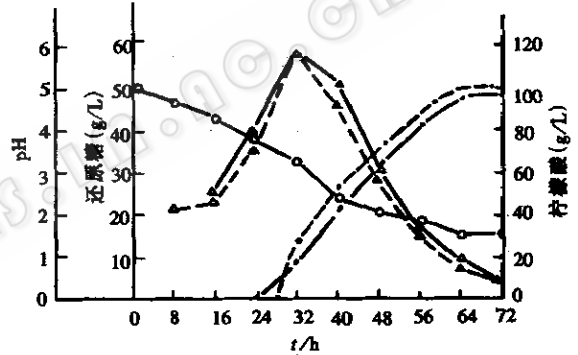


图1 固定化黑曲霉与游离细胞摇瓶发酵生产柠檬酸

—●— 柠檬酸, —△— 还原糖, —□— pH, — 固定化细胞, ... 游离细胞

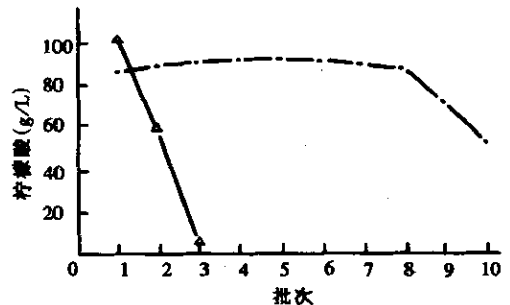


图2 固定化黑曲霉连续批次发酵生产柠檬酸

—△— 游离细胞发酵, —●— 固定化细胞发酵

后,其生长及孢子萌发环境的变化使其对环境的耐受性增加,进而使孢子重复萌发或者逐步萌发成为可能。

综合以上试验结果可知:用固定化黑曲霉细胞发酵玉米生产柠檬酸的最适温度是 $35^{\circ}\text{C}$ ,玉米糖液浓度 $10\text{Bx}$ 。在最适条件下柠檬酸产量可达到 $96\text{g/L}$ ,一般稳定在 $90\text{g/L}$ 。固定化黑曲霉可连续使用 $24\text{d}$ (约8批次)。黑曲霉细胞固定化后,产酸活力与降糖能力均与游离细胞水平相近。但在连续分批发酵中,固定化黑曲霉细胞显示出明显的优势,即:游离细胞连续使用2批次后,柠檬酸产量迅速下降,而固定化黑曲霉使用8批次后,柠檬酸产量仍可达到 $89\text{g/L}$ 的水平,这就为连续发酵生产柠檬酸的工艺提供了可能。所以只要将黑曲霉细胞固定后柠檬酸产量逐步提高并超过游离细胞最高水平,那么固定化黑曲霉菌体可连续使用 $20\text{d}$ 以上的结论将保证柠檬酸连续发酵的菌种活性时间,从而保证连续发酵的成功。

### 参考文献

- [1] 彭志英, 赵谋明, 刘通讯, 等. 食品工业生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 94~95.
- [2] 金其荣, 张继民, 徐勤, 等. 有机酸发酵工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.
- [3] 王建龙, 周定, 侯文华. 微生物学通报, 1993, 20(4): 215~217.
- [4] Eikmeier H, Rehm H J. Appl Microbiol Biotechnol, 1984, (20): 365~370.
- [5] 中国科学院微生物研究所. 菌种鉴定手册, 北京: 科学出版社, 1980: 93~94.
- [6] 中华人民共和国国家标准. GB/T8269-1998, 柠檬酸.
- [7] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981: 6~9.
- [8] Tsay SS, To K Y, et al. Biotechnol Bioeng. 1987, (29): 297~304.
- [9] 周剑平, 邓学敏, 丁雨辰, 等. 兰州大学学报(自然科学版), 1994, 30(增刊): 173~177.
- [10] 陈响声, 居乃斌. 固定化酶理论与应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1987, 109~367.