



以木薯为原料直接发酵柠檬酸工艺研究及工业化放大

高金宝¹, 刘桂芳², 贾士儒¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津市工业微生物研究所, 天津 300462)

摘要: 以黑曲霉 T-0218 为发酵菌种, 进行了以木薯为原料生产柠檬酸的发酵条件研究及工业化放大试验. 确定了最佳的发酵工艺: 发酵培养基中碳源质量浓度 ≤ 200 g/L, 接种菌丝球数量 $\geq 10\ 000$ mL⁻¹, 种龄 16~24 h. 在最佳的发酵工艺条件下, 放大试验取得了满意的结果, 其生产指标: 产酸 141 g/L, 周期 60.3 h, 转化率 100.4%, 发酵指数 2.34 g · (L⁻¹ · h⁻¹).

关键词: 黑曲霉; 木薯; 柠檬酸; 发酵

中图分类号: TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 02-0043-04

Study on Producing Citric Acid by Using Cassava and Industrial Scale-Up

GAO Jin-bao¹, LIU Gui-fang², JIA Shi-ru¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Research Institute of Industrial Microbiology, Tianjin 300462, China)

Abstract: The citric acid production by strain *Aspergillus niger* T-0218 by using cassava and industrial scale-up were investigated. The best conditions was obtained under the following fermentation conditions: concentration of fermentation medium was less than 200 g/L, the number of mycelium pellets were more than 10 000/ml and age of seed was 16 hours to 24 hours. Under the best conditions, good results were obtained in the industrial scale-up experiments, they are following: CAM 141 g/L; period 60.3 h; yield 100.4%; productivity 2.34 g · (L⁻¹ · h⁻¹).

Keywords: *Aspergillus niger*; cassava; citric acid; fermentation

当前, 我国的柠檬酸发酵技术已走在世界前列, 但企业之间的竞争也日趋白热化. 在柠檬酸生产中, 原料成本占总成本的 50%以上. 我国地域广阔, 不同地区的农作物各具优势, 应根据本地区的农作物情况选择适合的发酵原料来降低生产成本, 提高柠檬酸生产企业的竞争力. 木薯是热带、亚热带作物之一, 具有适应性强、种植地域广泛的特点, 种植区域主要分布在我国广西、广东、云南、海南和福建等省^[1]. 因此, 这些地区的柠檬酸生产企业可以利用当地的原料优势, 以木薯为原料生产柠檬酸. 为此, 本研究以天津市微生物研究所保藏的黑曲霉 T-0218 为发酵菌种, 进行了以木薯为原料直接发酵柠檬酸的研究, 并放大至 75 m³ 发酵罐.

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) T-0128, 天津市工业微生物研究所保藏.

1.2 培养基

1.2.1 斜面土豆培养基^[2]

取新鲜土豆去皮, 切成约 1 cm³ 的小块, 称 200 g, 加自来水煮沸 20 min, 双层纱布过滤, 取滤清液, 并加入 20 g 葡萄糖, 定容至 1 000 mL, 加入 20 g 琼脂, 加热溶化后灌装到已灭菌的试管中. 灭菌条件 121 °C, 30 min, 制成斜面备用.

收稿日期: 2007-09-24; 修回日期: 2007-10-08

作者简介: 高金宝 (1976—), 男, 吉林人, 工程师, 硕士研究生.

1.2.2 麸曲孢子培养基

选择干燥、无霉变、无异物的大片麸皮,每500 mL 三角瓶装 16 g,按麸皮与水的质量比为 1:1.2 的比例加入自来水.麸皮和水充分混合后,0.1 MPa 灭菌 1 h,冷却至 35 °C 后使用斜面孢子接种.接种后的麸曲瓶置于温度为 35 °C,湿度为 70% 以上的环境中,培养 7~10 d,孢子着生密集,培养基松散为培养结束.

1.3 摇瓶发酵

将 190 g 木薯粉加水调浆定容 1 000 mL 后,加淀粉酶液化 (α -Amylase, 10 U/g 木薯粉).液化后升温到 100 °C 灭酶,快速冷却.氮源根据每瓶用量,直接称入三角瓶,250 mL 三角瓶装液量 40 mL,摇瓶封口采用三层平纹棉布,灭菌条件:121 °C, 0.1 MPa, 30 min. 每只三角瓶接种斜面孢子或麸曲孢子 1 环,摇床转数 300 r/min,温度 35 °C,周期 72 h.

1.4 75 m³ 发酵罐发酵

种子罐:将 840 kg 木薯粉和 35 kg 的蛋白粉加水调浆后泵入 8 m³ 种子罐中,定容体积为 7 m³,加入淀粉酶液化、灭菌、冷却至 35 °C 后接入 20 瓶麸曲孢子.种子培养条件:温度 35 °C,通风量 2.1 m³/min,罐压 0.1 MPa,种龄 20 h.

发酵罐:将 12 000 kg 木薯粉和 245 kg 的蛋白粉加水调浆后泵入发酵罐中,加入淀粉酶液化、灭菌、冷却至 35 °C 后接入种子,接种后体积为 70 m³.发酵条件:温度 35 °C,通风量 10.5 m³/min,罐压 0.1 MPa.

1.5 分析方法

产酸率:采用 0.142 9 mol/L NaOH 溶液滴定.

总糖和还原糖:采用菲林法测定^[3].

2 结果与讨论

2.1 接种量对发酵的影响

柠檬酸发酵的接种量多少直接决定了进入培养系统(包括一级接种和二级接种)的孢子数量,柠檬酸发酵所用的黑曲霉菌种,是从孢子头上散落下来的分生孢子在液体中通过吸水、膨胀、发芽、缠绕形成菌丝球进行发酵,理论上讲,一个分生孢子可以形成一个菌丝球,菌丝球的极限数量应与接种的孢子数量相等.但实践证明,由于孢子在发酵液中萌发时相互缠绕、附着等物理作用,多数是几个乃至一团孢子形成一个菌丝球,它不同于单细胞微生物的分裂生殖,因此种子培养也有自身特点^[4].在种子罐培养过程

中,仅是菌丝发育生长的过程,只增加生物量而不增加菌丝球数量.

由图 1 可以看出,孢子数量与形成的菌球的数量基本上成正比的关系.孢子的数量为菌球数量的 10 倍左右.但是,孢子数量与菌球数量的倍数关系并不是一成不变的.培养环境的变化等因素都会影响孢子的萌发率,进而影响菌球数量.

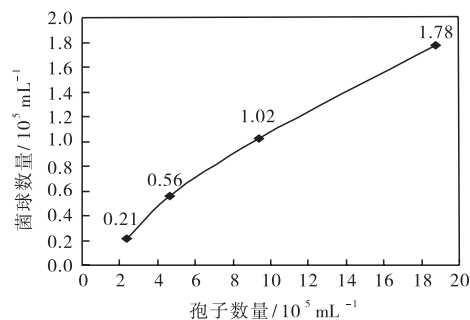


图 1 孢子数量与菌球数量的关系

Fig. 1 Relation between numbers of spores and numbers of mycelium pellets

由图 2 可以看出:接种量的大小在一定的范围内对产酸的影响不大,但是对发酵指数影响很大.在菌球数量小于 10 000 mL⁻¹ 时,发酵指数明显下降.所以,生产中要保证发酵液中菌球的数量,即接入足够的麸曲孢子.

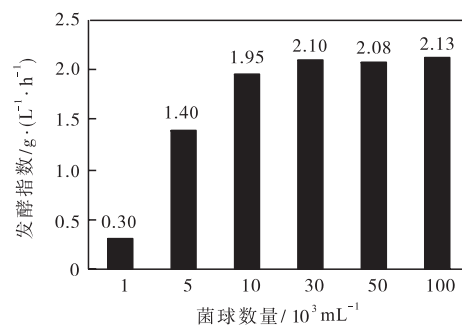


图 2 菌球数与发酵指数的关系

Fig. 2 Relation between numbers of mycelium pellets and productivity

2.2 营养条件对发酵的影响

不同的装液量和氮源含量对产酸的影响如表 1 所示.对比装液量为 80 mL 与 40 mL 的产酸结果,前者的明显低于后者,说明提高溶氧能力有利于提高产酸.从前 4 组数据看,氮源含量的多少并不影响产酸.但从后 3 组数据看,溶氧条件好时,氮源含量的多少决定了产酸量的高低.因此,在确保发酵营养条件下,应首先满足溶氧要求,这样,能够确保最佳的发酵结果.

表1 营养条件对发酵的影响

Tab.1 Effect of medium on fermentation

序号	总糖 /g·L ⁻¹	装液量 /mL	氮源含量 /g·L ⁻¹	平均产酸 /g·L ⁻¹	周期 /h
1	160	80	2.5	106	72
2	160	80	3.0	106	72
3	160	80	3.5	110	72
4	160	80	4.0	108	72
5	160	40	3.0	131	72
6	160	40	3.5	150	72
7	160	40	4.0	160	72

2.3 种龄对发酵的影响

使用 30 L 发酵罐,研究了种龄对产酸的影响,其结果见表 2.从表 2 可以看出,种龄应控制在 16~20 h,超过或低于这个范围,都会造成发酵周期加长,转化率降低.虽然种龄长会使发酵初始 pH 降低一些,有利于发酵前期泡沫的控制.但是,为合理安排种子罐和发酵罐的投料时间,尽可能的使种龄不要超过 24 h.

表2 种龄对产酸的影响

Tab.2 Effect of seed age on citric acid production

种龄 /h	总糖 /g·L ⁻¹	产酸 /g·L ⁻¹	转化率 /%	周期 /h	残还原糖 /g·L ⁻¹
14	148	142	95.9	62	3.0
16	148	145	97.9	58	3.2
20	149	145	97.3	57	2.5
24	148	143	96.6	59	5.0
26	150	140	93.3	63	7.5
30	147	139	94.5	65	8.0

2.4 木薯粉浓度对发酵的影响

木薯粉浓度对发酵的影响见表 3.从表 3 可以看出,当木薯粉质量浓度达到 200 g/L 时,发酵指数明显降低,这是由于发酵液已很黏稠,并且成熟醪过滤速度慢,影响柠檬酸的提取收率.另外,也提高了发酵罐通风量的要求.所以,木薯粉直接发酵的质量浓度应该控制在 200 g/L 以内.

表3 木薯粉浓度对发酵的影响

Tab.3 Effect of cassava powder concentration on fermentation

木薯粉 /g·L ⁻¹	初总糖 /g·L ⁻¹	产酸 /g·L ⁻¹	周期 /h	发酵指数 /g(L ⁻¹ ·h ⁻¹)	转化率 /%
190	147.1	146.9	67	2.19	99.9
200	153.0	152.0	67	2.27	99.4
210	162.1	158.8	79	2.00	98.0
220	170.4	166.8	88	1.90	97.9
230	185.1	178.0	96	1.85	96.2

2.5 75 m³发酵罐放大试验

75 m³ 发酵罐放大研究中,使用了两种结构类型的发酵罐:气升式结构和全搅拌结构.首先在内套筒喷环结构的气升式发酵罐上,进行了两组不同总糖浓度的发酵试验,第一组总糖控制在 135.2 g/L,第二组总糖控制在 113.0 g/L,发酵结果见表 4.

表4 75 m³气升式发酵罐的发酵结果Tab.4 75 m³ airlift fermentor fermentation results

组号	总糖 /g·L ⁻¹	产酸 /g·L ⁻¹	转化率 /%	周期 /h	发酵指数 /g·(L ⁻¹ ·h ⁻¹)
1	140.0	112.0	80.0	79	1.42
	135.0	102.0	75.6	69	1.48
	130.0	123.0	94.6	69	1.78
	135.0	114.0	84.4	63	1.81
	136.0	128.0	94.1	70	1.83
平均	135.2	115.8	85.7	70	1.66
2	102.5	113.0	110.2	60	1.88
	112.5	114.0	101.3	62	1.84
	122.5	117.0	95.5	63	1.86
	110.0	111.0	100.9	70	1.59
	117.5	121.0	103.0	65	1.86
平均	113.0	115.2	102.2	64	1.81

对比第一组与第二组的数据,在两组平均产酸相同的情况下,第一组的发酵周期长,转化率低,这是因为该组的发酵液总糖高,发酵液中固形物多,黏度大,造成溶氧效果不好.在第二组总糖低的情况下,溶氧效果要好一些,以致有较好的转化率,这也验证了摇瓶装液量实验的结果,溶氧水平是影响发酵结果至关重要的因素之一.但是,两组的发酵指数结果都不理想,这说明内套筒喷环结构的气升式发酵罐的结构满足不了溶氧的要求.因此,第二阶段,在同样体积的全搅拌式发酵罐上,进行了 3 批次的对照实验,结果如表 5.

表5 75 m³全搅拌式发酵罐的发酵结果Tab.5 75 m³ stirring type fermentor fermentation results

序号	总糖 /g·L ⁻¹	产酸率 /g·L ⁻¹	转化率 /%	周期 /h	发酵指数 /g·(L ⁻¹ ·h ⁻¹)
1	132.5	136	103.0	58	2.34
2	152.0	144	94.7	64	2.25
3	138.0	143	103.6	59	2.42
三罐平均	140.8	141	100.4	60.3	2.34

由表 5 可见,在全搅拌发酵罐上,3 批次发酵的平均产酸为 141 g/L,发酵指数达 2.34 g·(L⁻¹·h⁻¹),

发酵水平明显上升,说明全搅拌发酵罐能满足发酵的溶氧要求,完全重复出了小试、中试的实验结果。

3 结 论

当接种菌球数量不低于 10 000 mL⁻¹, 种龄为 16~24 h, 根据中试试验确定的发酵配方和工艺参数, 在 75 m³ 全搅拌发酵罐上, 发酵周期 60.3 h, 产酸 141 g/L, 转化率 100.4%, 发酵指数 2.34 g · (L⁻¹ · h⁻¹)。

参 考 文 献:

[1] 蒋升湧. 木薯产业发展趋势与对策措施 [J]. 市场论坛, 2005 (11): 30—34.
 [2] 杜连祥. 工业微生物学实验技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992: 168—192.
 [3] 金其荣, 张继民. 有机酸发酵工艺学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995: 302—308.
 [4] 于云岭, 刘桂芳. 选育柠檬酸优良产生菌的研究报告 [J]. 微生物学报, 1976, 16 (2): 166—170.

(上接第 26 页)

表 3 槲皮素和芦丁的热分解动力学参数

Tab. 3 Kinetic parameters for the thermal decomposition data of quercetin and rutin

样品	$E/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\ln A/\text{s}^{-1}$	r	动力学补偿效应表达式	
槲皮素	93.63	25.80	0.984 5	$\ln A=0.286E-3.86$	$r=0.984 8$
芦丁	107.86	39.57	0.974 2	$\ln A=0.375E-3.54$	$r=0.984 3$

3 结 论

(1) 槲皮素的热重曲线有一个明显的失重平台, 失重率为 33.32%, 与之相对应的微商热重曲线上有一个明显的失重峰, 峰顶温度为 349 °C. 芦丁的热重曲线有三个失重平台, 失重率分别为 7.74%, 29.71% 和 16.29%, 最后还有一缓慢的失重阶段, 失重率为 14.55%, 与之对应的微商热重曲线有三个失重峰, 其中在 278 °C 处出现尖锐失重峰, 主要原因为热分解失重。

(2) 用 Archar 微分法和 Madhusudanan-Krishnan-Ninan (MKN) 积分法求得的槲皮素和芦丁的动力学方程均为 $da/dt=A \exp(-E/RT)^{3/2} (1-\alpha)^{4/3} [1/(1-\alpha)^{1/3}-1]^{-1}$, 其分解机理符合三维扩散机理. 二者的表观化学能分别为 93.63 和 107.86 kJ · mol⁻¹, ln A 分别是 25.80 和 39.57 s⁻¹. 热分解反应动力学补偿效应表达式分别为 $\ln A=0.286E-3.86$, $\ln A=0.375E-3.54$.

参 考 文 献:

[1] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 173—177.

[2] 陈箐筠, 干 信. 槐米中槲皮素的提取及其对中枢神经系统作用的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2007, 24 (3): 11—13.
 [3] 黄河胜, 马传庚, 陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (10): 589—592.
 [4] Madarász J, Bombicz P, Jármí K, et al. Thermal, FTIR and XRD study on some 1 : 1 molecular compounds of theophylline [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2002, 69: 281—290.
 [5] 林锦明, 张汉明, 赵长文. 差示扫描量热法鉴别珍珠粉与珍珠层粉及其混合物含量的测定 [J]. 第二军医大学学报, 1994, 15 (3): 275—277.
 [6] 韩 森, 朱小梅. 喹诺酮类药物诺氟沙星的热稳定性研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16 (14): 1104—1106.
 [7] 徐 芬, 孙立贤, 谭志诚, 等. 阿司匹林的热解机理及动力学研究 [J]. 物理化学学报, 2004, 20 (1): 50—54.
 [8] Opfermann J. Kinetic analysis using multivariate nonlinear regression [J]. Thermal Analysis and Calorimetry, 2000, 60: 641—658.
 [9] Zhang J J, Ge L G, Zhang X L, et al. Thermal decomposition kinetics of the Zn (II) complex with norfloxacin in static air atmosphere [J]. Therm Anal Cal, 1999, 58: 269—277.