

柠檬酸发酵工艺的探讨

王连阳 林 莺 方柏山

(化工与生化工程系)

摘要 本文用正交设计试验方法探讨柠檬酸连续浅盘发酵的条件。试验菌种是黑曲霉变异株。主要原料为甘蔗废糖蜜。对于柠檬酸的浓度和生产能力而言,其最优方案为:连续流加时间168h,添加液流速25ml/h;添加液糖度22BX;添加液中甲醇含量3g/100ml。其中,甲醇是影响最显著的因素。连续浅盘培养比静态浅盘培养,其柠檬酸生产能力提高一倍。连续流出的醪液再循环是可行的。

关键词 黑曲霉,连续浅盘发酵,柠檬酸

0 前言

柠檬酸是目前可以用微生物代谢生产的重要有机酸。其用途非常广泛,主要是用于食品工业,其次是医药、纺织、建材等工业部门;在各种重要器材的清洗、除锈和日用化工等方面也有重要用途。

自1923年美国PFIZER公司,建立第一个以黑曲霉浅盘法生产柠檬酸的工厂以来,由于菌种选育和生产工艺的不断改进,生产率不断提高。1952年,美国MILES公司采用较为先进的深层发酵法生产柠檬酸,从此,柠檬酸的产量逐年增加,但仍供不应求。近年,世界上柠檬酸年产量已超过45万t。在生产工艺上,深层发酵法有更大的优点,但由糖质原料生产柠檬酸,历史悠久的浅盘法在许多国家中仍占有相当的比重^[1]。近几年来曾有采用固定化黑曲霉分生孢子生产柠檬酸的研究报导^[2,3]但都是停留在实验室阶段,未见工业试验报导。我国柠檬酸工业起步较晚,但近年来有了长足的发展,1988年产量达5万t。我国南方盛产甘蔗的省份,还沿用黑曲霉浅盘发酵由甘蔗糖蜜生产柠檬酸。

浅盘法生产工艺和设备简单,能耗低,投资较少,容易操作,但生产率低,劳动强度大。为此有必要探讨浅盘连续培养的新工艺及其最优条件,以期改进浅盘法的操作和提高生产能力。

本文1992-01-05收到。

1 材料和方法

1.1 菌种

黑曲霉变异株.

1.2 原料

蔗糖糖蜜由泉州糖厂供给,其它各种化学药品均为分析纯或化学纯.

1.3 培养基与培养条件

(1) 斜面培养基(%) NaNO_3 0.3; K_2HPO_4 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; KCl 0.05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001; 蔗糖 3; pH6-7. 培养条件:斜面培养在 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 下,6—7 天.

(2) 发酵培养基 发酵基础培养基(%):糖蜜 5(*Brix*); 尿素 0.02; H_3PO_4 0.01; pH 自然. 培养温度: $31 \pm 1^\circ\text{C}$. 发酵添加液(%): 尿素 0.01; 糖蜜和甲醇(变量); pH5.0.

(3) 糖蜜预处理 称取一定量的糖蜜,加等重量的自来水稀释,煮沸 1h,静置过夜,取上清液再稀释到所需要的糖度,则可用于配制上述培养基.

1.4 分析方法

(1) 糖的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸测定总还原糖.(2) 柠檬酸测定 采用容量滴定法.(3) pH 测定 采用 25 型酸度计和精密 pH 纸.

1.5 实验方法

本实验主要采用聚氯乙烯制成的带有挡板的浅盘($35 \times 20 \times 8$ 立方 cm)作为发酵装备. 每盘装液量为 1850ml,发酵液深度维持在 2.5cm 处. 第一天先加入基础培养基地(占总液量的 $\frac{1}{4}$),并接种黑曲霉孢子,在 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 1 天,让孢子发芽和生长. 24h 后,再加入添加液(占总液量的 $\frac{3}{4}$),在相同温度下,让其生长繁殖并代谢生成柠檬酸. 培养至第四天,连续流加添加液,控制一定流速并从流出液中定时取样分析.

本实验主要是应用正文设计法,安排多因素的试验方案. 为了摸索连续浅盘培养的最优条件,首先确定培养基基本组分,初始 pH,培养温度和接种量等为固定条件. 考察的主要指标是生产能力(G);参考指标为醪液中酸浓度(y_1)和酸得率($Y_{p/s}$). 选用四因素三水平的正交表 $[L_9(3^4)]$ 组织实验,其因素和水平的变化列在表 1.

表 1 正交表 $[L_9(3^4)]$ 因素及其水平

区号	考察因素	试验条件(水平)		
		1	2	3
A	连续流加时间(天)	7	9	11
B	添加液流速(ml/h)	25	30	35
C	添加液糖度(BX)	16	19	22
D	添加液中甲醇量(g/100ml)	0	1	3

实验结果

2.1 连续表面培养最优条件的探讨

实验结果及计算值列于表 2, 其中 $\sum k_1$ 、 $\sum k_2$ 和 $\sum k_3$ 分别表示每一因素在同一水平下相应各指标的总和, R 表示每一因素的指标值总和最大值的平均值与最小值的平均值之差(称为极差)。从表 2 显然看出, 对于主要指标——生产能力和次要指标——酸浓度的最优方案为: 连续流加时间 7 天; 添加液流速 25ml/h; 添加液糖度 22BX; 添加液中甲醇含量 3g/100ml。其中甲醇含量是显著因素(详见表 2)。

表 2 正交设计方案的试验值和计算结果

试验方案	因 素													
	A	B	C	D	生产能力					酸浓度		酸得率		
					$G(10^{-4} \cdot g/cm^2h)$					$y_i(g/l)$		$y_{p/s}(g/g)$		
1	1	1	1	1	7.71					30.17		0.362		
2	1	2	2	3	8.60					33.37		0.294		
3	1	3	3	2	6.39					30.64		0.142		
4	3	1	3	3	8.68					31.0		0.227		
5	3	2	1	2	4.73					14.11		0.204		
6	3	3	2	1	6.74					17.56		0.249		
7	2	1	2	2	3.94					15.72		0.166		
8	2	2	3	1	5.45					19.78		0.151		
9	2	3	1	3	6.31					19.39		0.278		

G	$\sum k_1$	22.70	20.33	18.75	19.90	y_i	$\sum k_1$	94.18	76.96	63.67	67.51	$y_{p/s}$	$\sum k_1$	0.80	0.76	0.84	0.76
	$\sum k_2$	15.70	18.78	19.28	15.06		$\sum k_2$	54.89	67.26	66.65	60.47		$\sum k_2$	0.60	0.65	0.71	0.51
	$\sum k_3$	20.15	19.44	20.52	23.59		$\sum k_3$	62.74	67.59	81.49	83.83		$\sum k_3$	0.68	0.27	0.52	0.80
	R	2.34	0.52	0.59	2.84		R	13.09	3.23	5.94	7.78		R	0.07	0.04	0.11	0.10
	最优	A ₁	B ₁	C ₃	D ₃		最优	A ₁	B ₁	C ₃	D ₃		最优	A ₁	B ₁	C ₁	D ₃

酸得率: 对于消耗的总还原糖而言所得到的酸量。

为了方便比较, 把 9 个方案实验结果的柠檬酸生产能力, 酸浓度和酸得率的试验值描绘于图 1、图 2、图 3, 以供参考。

2.2 静态表面培养

为方便比较, 在相同的浅盘中进行静态表面培养, 培养方法与条件如上所述。表 3 列出静态表面培养的实验结果和连续表面培养的试验值。从表 3 可见, 连续浅盘表面培养比静态表面培养所获得的柠檬酸生产能力提高近 1 倍, 产酸浓度没有明显变化, 而酸得率略为降低。

表 3 连续浅盘培养与静态浅盘培养结果比较

项目	指 标		
	G 生产能力 ($10^{-4} \cdot \text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	y_i 酸浓度 (g/l)	y_p/s 酸得率 (g/g)
连续	8.68	31.1	0.23
静态	4.54	31.8	0.27

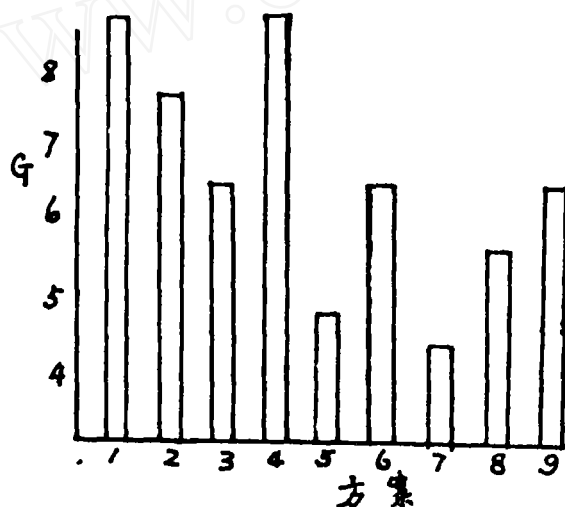


图 1 不同试验方案的柠檬酸生产能力

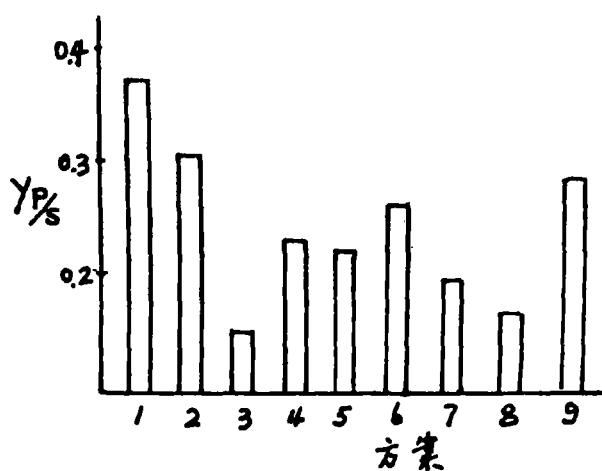


图 2 不同试验方案的酸得率

2.3 甲醇添加量的考察

甲醇是显著因素. 为进一步探讨甲醇不同添加量对黑曲霉生长代谢和产生柠檬酸的影响, 采用静态培养法, 以单因子变化组织实验. 实验在 500ml 的玻璃烧杯中进行, 第一天, 先放入 50ml 基础培养基, 接入黑曲霉分生孢子, 第二天再加入含一定量的甲醇的添加液, 培养条件同上. 实验结果(表 4)可见, 添加液培养基每 100ml 含 3g 甲醇, 所得到的酸生产能力最高, 对消耗的总还原糖而言, 酸得率也略高于其它.

表 4 甲醇添加量对产酸的影响

甲醇(g/100ml)	试验值		
	酸浓度(g/l)	生产能力($10^{-4} \cdot \text{g/cm}^2\text{h}$)	酸得率(g/g)
0	47.34	10.3	0.41
1	56.64	12.4	0.43
2	52.05	11.4	0.43
3	62.37	13.6	0.48
4	55.57	12.1	0.43

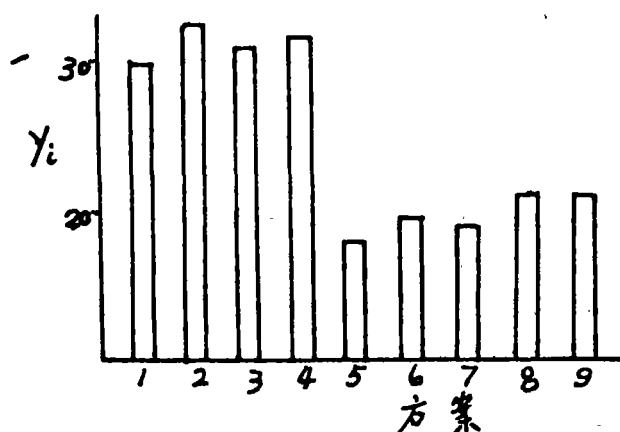


图 3 不同试验方案的酸浓度

2.4 发酵液再循环试验

为充分利用残糖, 待浅盘培养(条件同上)至第四天, 采用定量泵将连续流出的发酵醪(不含菌体)重新连续泵回浅盘发酵, 并定时补入一定量的新鲜料液, 以弥补其蒸发量. 每隔一定时间, 取一瞬时样品进行有关项目的分析. 系统中的 pH、酸浓度和残糖浓度随着时间的变化如图 4 所示. 当发酵进行至 168h, 酸浓度达到最高 54.0g/l, 残糖浓度达最低 17.5g/l. 此后, 酸浓度、糖浓度和 pH 均暂时处于相对稳定. 在相应条件下的静态表面培养, 当发酵进行到 168h 所得酸浓度仅为 40.2g/l, 而残糖浓度为 11g/l.

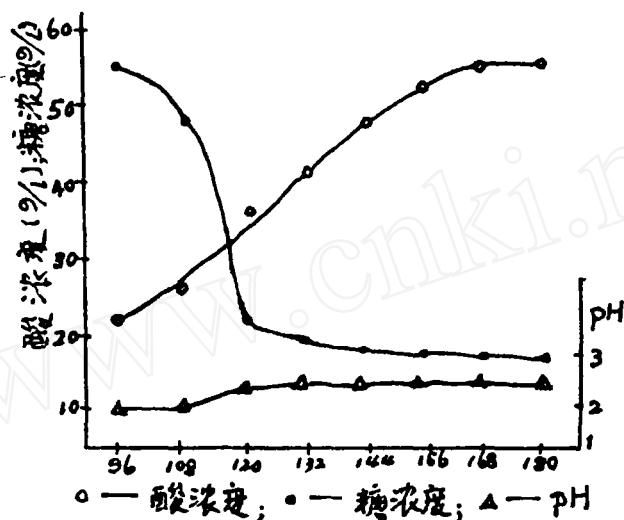


图4 循环流动发酵动力学

3 讨论

1) 从连续浅盘表面培养的各种操作条件的实验值看,方案4所获得的酸生产能力最高,而方案2产酸的浓度最高,方案1的酸得率最高。在进一步扩大实验中,可以针对不同情况和要求,采用相应的方案。

2) 连续浅盘培养的结果优于静态浅盘培养。这是由于培养基料液连续流入浅盘发酵液中,加强了传质,保持发酵盘中糖等营养物的浓度相对稳定,有利于黑曲霉生长和代谢产生柠檬酸;同样地,也有利于产物分泌到醪液中。在静态培养的发酵醪液中,糖等营养成分越来越低,菌丝较早形成孢子,不利于黑曲霉代谢产酸。

3) 添加适量甲醇,能刺激黑曲霉产酸能力^[3,4]。可能因培养液中有一定量甲醇的存在,能避免黑曲霉产酸期过量生长菌丝,延缓或抑制孢子形成^[5],从而有利于产酸。甲醇还可能提高菌体对环境中微量金属离子的耐受性和影响菌体细胞的通透性^[6]。因此适量甲醇不仅使产酸能力有所提高,而且有利于产物扩散到醪液中。

4) 单程连续浅盘培养操作,虽然生产能力较高,但酸得率略低,醪液含残糖总量较多,营养物质浪费较大。为此,进行发酵醪液再循环的试验,以期提高生产率又提高糖的利用率。从全回流的试验结果看,可以肯定,流出的醪液再循环利用是可行的。如果在残糖浓度未降至最低之前,开始连续流加新鲜料液并控制部分醪液流至后处理工序,部分泵回浅盘继续利用,可望减慢菌丝衰老和延长产酸周期,从而提高生产能力和酸得率。但因实验室条件限制,此种设想未能如期实现。

5) 从所探讨的结果来看,采用连续浅盘表面培养法生产柠檬酸的新工艺是有可能实现的,但流程中须增加的一些设备,并且流出的醪液残糖较高,在工业上的应用,还有待于进一步扩大试验,以权衡其利弊。

参 考 文 献

- [1] Tapobratapanda and Subirkundn, *Process Biochemistry*, 9, 5(1987), 291.
- [2] Tsay, S. S. and To, K. Y., *Biotech, Bioeng.*, 24, (1987), 297.
- [3] Hiroyuki Horitsu, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 22(1985), 8.
- [4] Islam, M. S., Begum, R. and Choudhury, N., *Enzyme Microb Technol* 8, (1986), 469.
- [5] Farouk Ali Hamissa and Ahmed Radwan, *J. Gen, Appl Microbiol.*, 23(1977), 325.
- [6] 张世伟, 应用微生物, 6(1985), 6.

* 本文采用碱滴定法测定发酵液中的总酸。从文献报导和生产实践得出, 在本实验条件下, 黑曲霉代谢产生的杂酸很少, 故以测定总酸量来衡量柠檬酸的含量, 相对比较而言其实验结果是可行的。

Study on the Technology of Citric Acid Fermentation

Wang Lianyang Lin Ying Fang Baishan

(Department of Chemical and Biochemical Engineering)

Abstract With *Aspergillus niger* mutant strain as bacterial strain and cane molasses as essential raw material, the conditions of citric acid continuous tray fermentation was studied by the testing method of orthogonal design. As for citric acid, concentration and productivity the optimal plan consisted of a continuous feeding time of 168 hrs, an add-on liquid flow rate of 25 ml/h, an add-on sugar concentration of 22 Bx, and a methanol content in add-on liquid of 3g/100ml which is the factor of most marked influence. As compared with standing tray fermentation, continuous tray fermentation brought broth a twofold citric acid productivity. The recycling of its exit liquid was also feasible.

Key words *Aspergillus niger*, continuous tray fermentation, citric acid