

稻草粉混菌同步糖化发酵产柠檬酸的条件优化

刘 毅

(湖南机电职业技术学院 生物化工系,湖南 长沙 410151)

摘要:将糖化菌群与柠檬酸发酵菌混合接种于同一容器中,以经预处理的稻草粉为主要原料发酵柠檬酸,经单因素试验和正交试验,明确产柠檬酸的优化条件。结果表明:混菌同步糖化发酵产柠檬酸的优化条件为,接入柠檬酸发酵种子时间为3 d,黑曲霉发酵时间为5 d,柠檬酸发酵种子接种量10%(v/v),初始pH 5.5,此时柠檬酸的产量为85.1 g·L⁻¹。

关键词:稻草粉;混菌;同步糖化发酵;柠檬酸

中图分类号:Q939.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)09-0102-04

目前,柠檬酸生产主要以甘薯、木薯和玉米等淀粉质为原料利用黑曲霉直接深层发酵,虽然技术成熟,但要耗费大量粮食资源,而我国大量的稻草等富含纤维素的秸秆却未得到合理利用,并引起一系列环境问题。采用从环境中分离的木霉(T1)与曲霉(T3)混菌发酵制得的粗酶液降解经预处理的稻草粉得到稻草纤维素糖化液,用黑曲霉(*Aspergillus niger*)对糖化液进行柠檬酸摇瓶发酵,经条件优化,柠檬酸产量可到83 g·L⁻¹。但是,这种分步糖化发酵法在糖化阶段存在着明显的产物反馈抑制作用,导致纤维素酶用量较大,发酵成本偏高,而且限制了柠檬酸的产率。为此,该研究利用混合菌在同一反应容器中同时进行稻草粉糖化并发酵柠檬酸的条件,以简化发酵工艺过程,降低成本,提高柠檬酸产率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 稻草粉 采自湖南省沅江市农村水稻田(当年产),洗净后自然风干,粉碎过40目筛,经微波与碱联合处理后洗净干燥备用^[1]。

1.1.2 菌种 (1)斜面菌种:木霉[*Trichoderma viride*](T1),曲霉[*Aspergillus sp*](T3),黑曲霉(*Aspergillus niger*),湖南机电职业技术学院生物化工系微生物实验室保存。

(2)柠檬酸发酵麸曲种:在100 mL三角瓶中加入麦麸6 g、稻草粉4 g、(NH₄)₂SO₄ 0.1 g,混

匀后加10 mL水,拌匀、灭菌、冷却后接入斜面菌种。30℃培养7 d制成麸曲种。每瓶加入无菌水充分打匀制成浓度约含孢子2万个·mL⁻¹的孢子悬液备用。

(3)柠檬酸发酵种子:按葡萄糖3%(W/W),NaNO₃ 0.3%(W/W),KH₂PO₄ 0.1%(W/W),调节pH 6.0,于110℃灭菌20 min,制得种子液体培养基。300 mL摇瓶加入50 mL的种子培养液,纱布封口,灭菌,待温度下降至40℃以下,接入制好黑曲霉孢子悬液5 mL,在300 r·min⁻¹振荡培养箱35.5℃培养24 h,取培养液稀释后在显微镜下计数,黑曲霉菌丝球浓度约达100万个·mL⁻¹。合格的菌丝球应是致密形的,菌丝球直径不应超过0.1 mm,菌丝短且粗,分支少,瘤状,部分膨胀^[2]。此即为该试验发酵种子。

1.1.3 发酵培养基 100 g 固形物(稻草粉:麸皮=3:2), (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, 尿素 3.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, CaCl₂ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 为0.5 g, Tween80 为4.8 g, 加水至1 000 mL, pH 5.0。121℃灭菌25 min。

1.1.4 仪器 XSM生物显微镜、PHS-3C精密酸度计(上海虹普仪器仪表有限公司生产)、THZ-82恒温振荡水浴锅(常州澳华仪器有限公司生产)、HZQ-F100型全温度振荡培养箱(太仓市华美生化仪器厂生产)、BS124S电子天平(德国赛多利斯生产)、UV-1100紫外/可见分光光度计(上海益伦环境科技有限公司生产)、YXQ-LS-30SII型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司生产)和SW-CJ-1FD型净化工作台(上海博迅实业有限公司生产)。

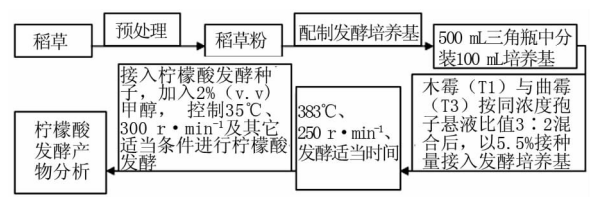
1.2 方法

1.2.1 稻草粉同步糖化发酵产柠檬酸的工艺流程

收稿日期:2012-08-07

基金项目:湖南省科技厅科技计划资助项目(2011FJ3131)

作者简介:刘毅(1964-),男,湖南省桃源县人,学士,副教授,从事生物化工技术教学与研究工作。E-mail: liuyi3968@163.com。



1.2.2 单因素试验 (1)接入柠檬酸发酵种子时间对产柠檬酸的影响:在工艺流程中,分别在接入木霉(T1)与曲霉(T3)混合孢子悬液的的第0、1、2、3、4天取下发酵瓶,加入2%(v/v)甲醇,按10%(v/v)接入柠檬酸发酵种子液,同时由38℃、250 r·min⁻¹摇床培养变为35℃、300 r·min⁻¹摇床培养,总培养时间为7 d,分别测柠檬酸产量和残糖含量。每组平行2次试验,结果取平均值。

(2)黑曲霉发酵时间对产柠檬酸的影响:于接入木霉(T1)与曲霉(T3)混合孢子悬液的的第3天取下发酵瓶,加入2%(v/v)甲醇,按10%(v/v)接入柠檬酸发酵种子液,同时由38℃、250 r·min⁻¹摇床培养变为35℃、300 r·min⁻¹摇床培养,分别在接入柠檬酸发酵种子的第2、3、4、5、6天测柠檬酸产量和残糖含量。每组平行2次试验,结果取平均值。

(3)柠檬酸发酵种子接种量对产柠檬酸的影响:于接入木霉(T1)与曲霉(T3)混合孢子悬液的的第3天取下发酵瓶,加入2%(v/v)甲醇,分别按2%、5%、10%、15%、20%(v/v)接入柠檬酸发酵种子液,同时由38℃、250 r·min⁻¹摇床培养变为35℃、300 r·min⁻¹摇床培养4 d,分别测柠檬酸产量和残糖含量。平行5次试验,结果取平均值。

(4)初始 pH 对产柠檬酸的影响:分别将发酵培养基 pH 调为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,将木霉(T1)与曲霉(T3)按同浓度孢子悬液比值3:2混合后,以5.5%接种量接入发酵培养基,38℃、250 r·min⁻¹振荡培养3 d后,加入2%(v/v)甲醇,按10%(v/v)接入柠檬酸发酵种子液,于35℃、300 r·min⁻¹振荡培养4 d,分别测柠檬酸产量和残糖含量,以柠檬酸的产量为响应值对发酵时间进行优化。每组平行2次试验,结果取平均值。

1.2.3 优化试验 根据单因素试验结果,按照4因素3水平L₉(3⁴)进行正交试验。考察柠檬酸发酵过程中各因素的影响水平大小,找出在该试验中的最优发酵条件。发酵正交试验的因素与水平设计见表1。

表 1 正交试验因素水平
Table 1 Factor levels of orthogonal experiment

| 水平 Level | 因素 Factor | | | |
|----------|--|--|--|---------------------|
| | A | B | C | D |
| | 接入柠檬酸发酵种子时间/d Inoculation time of citric acid fermented seed | 黑曲霉发酵时间/d <i>Aspergillus niger</i> fermentation time | 柠檬酸发酵种子接种量(v/v)/% Inoculation quantity of citric acid fermented seed | 初始 pH Initial pH |
| 1 | 2 | 4 | 5 | 4.5 |
| 2 | 3 | 5 | 10 | 5.0 |
| 3 | 4 | 6 | 15 | 5.5 |

1.2.4 分析方法 (1)滤纸酶(FPA)活力测定:将新华一号滤纸(1 cm×6 cm)(50 mg)卷成小卷,放进试管中,加入1.9 mL乙酸—乙酸钠缓冲液(pH 4.8),再加入0.1 mL酶液,轻轻摇匀,使滤纸完全浸泡在液体中,50℃保温1 h后按DNS法测定糖浓度。一个酶活力单位(1 U)定义为每分钟催化底物水解生成1 μmol葡萄糖所需的酶量。以100℃水浴灭活5 min的粗酶液为空白对照^[3-4]。(2)柠檬酸的测定:采用滴定法^[5]。(3)还原糖测定:采用斐林滴定法^[6]。(4)pH测定:采用酸度计法。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 接入柠檬酸发酵种子时间对产柠檬酸的

影响 由表2可知,接入柠檬酸发酵种子的最佳时间为接入混合糖化菌孢子后的第3天。第0~1天接入柠檬酸发酵种子,因混合糖化菌刚开始降解稻草产生还原糖,还原糖的浓度较低,不利于柠檬酸菌种的利用,造成柠檬酸产量较低;而在第4天及以后接入柠檬酸发酵种子,则因为混合糖化菌过度生长,消耗了部分还原糖,也导致柠檬酸产量下降。而在第3天接入柠檬酸发酵种子时,发酵液中已有适宜于柠檬酸菌种利用的还原糖浓度,柠檬酸菌种迅速消耗还原糖用于菌体生长并进入产酸阶段,并解除了糖化过程的产物反馈抑制,促使混合糖化菌更快地降解稻草,两个过程相互促进,有利于稻草糖化和柠檬酸的产生。从表2还可看出,残糖量均较低,说明这种方法有利于柠檬酸发酵种子对还原糖的利用。

表 2 接入柠檬酸发酵种子时间
对柠檬酸产量的影响

Table 2 Effect of inoculation time of citric acid fermented seed on citric acid yield

| 项目 Item | 接入柠檬酸发酵种子时间/d Inoculation time of citric acid fermented seed | | | | |
|--|--|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 柠檬酸产量/g·L ⁻¹ Citric acid yield | 59.5 | 65.2 | 73.8 | 78.3 | 70.6 |
| 残糖量/g·L ⁻¹ Residual sugar amount | 2.21 | 2.61 | 2.51 | 2.14 | 2.31 |

2.1.2 黑曲霉发酵时间对产柠檬酸的影响 由表 3 可知,接入柠檬酸发酵种子(黑曲霉)后的第 4 天,柠檬酸产量最高、残糖量最低。在此之前,混合糖化菌不断将大量的稻草纤维素原料降解为还原糖,同时黑曲霉利用还原糖首先用于菌体生长,然后才大量转入产柠檬酸阶段,总还原糖含量保持相对较高,柠檬酸产量较低;而在 4 天之后,黑曲霉菌丝球有衰退趋势,并开始消耗柠檬酸,导致柠檬酸产量下降、残糖量增大。与分步糖化发酵相比,达到柠檬酸产量最大的时间有所推后、而产量有所提高,原因是稻草纤维素经混合糖化菌降解需要一定时间,而黑曲霉对还原糖的同步利用降低了还原糖的浓度,解除了糖化过程的产物抑制作用,使最终糖化率和柠檬酸产率提高。

表 3 黑曲霉发酵时间对柠檬酸产量的影响

Table 3 Effect of *Aspergillus niger* fermentation time on citric acid yield

| 项目 Item | 黑曲霉发酵时间/d <i>Aspergillus niger</i> fermentation time | | | | |
|--|--|------|------|------|------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 柠檬酸产量/g·L ⁻¹ Citric acid yield | 19.5 | 45.2 | 78.3 | 73.2 | 70.6 |
| 残糖量/g·L ⁻¹ Residual sugar amount | 12.62 | 8.56 | 2.14 | 2.23 | 2.51 |

2.1.3 柠檬酸发酵种子接种量对产柠檬酸的影响 由表 4 可知,接种量 2%时柠檬酸产量最低、残糖量最高,说明发酵液中黑曲霉菌丝球数量不够,不足以发酵混合液中的还原糖;而在接种量达 10%及以上时,残糖量及柠檬酸产量均有明显减少的趋势,说明此时接种量已过大,过多的黑曲霉菌丝球将消耗更多的还原糖用于菌体的生长,并出现过早衰退的现象,使柠檬酸产量下降。此时

最佳接种量为 5%,柠檬酸产量可达 81.5 g·L⁻¹,还原糖也较低(2.37 g·L⁻¹),发酵效果最好。与分步糖化发酵相比,最佳接种量较小,分析认为原因是在同步糖化发酵情况下接入黑曲霉菌丝球时发酵液中还原糖的含量较分步糖化发酵时少,但能持续保持一定浓度较长时间,不需要更多的黑曲霉菌丝球就能在一段时间内较为稳定而迅速地将还原糖转化为柠檬酸,若接入黑曲霉菌种过多,将消耗较多的还原糖用于黑曲霉菌丝体的生长,从而不利于混合糖化菌的生长和对稻草的糖化作用,最终影响柠檬酸的产率。

表 4 柠檬酸发酵种子接种量
对柠檬酸产量的影响

Table 4 Effect of inoculation quantity of citric acid fermented seeds on citric acid yield

| 项目 Item | 柠檬酸发酵种子接种量(v/v)/% Inoculation quantity of citric acid fermented seed | | | | |
|--|--|------|------|------|------|
| | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| 柠檬酸产量/g·L ⁻¹ Citric acid yield | 59.8 | 81.5 | 78.3 | 72.6 | 65.7 |
| 残糖量/g·L ⁻¹ Residual sugar amount | 3.57 | 2.37 | 2.14 | 2.07 | 1.97 |

2.1.4 初始 pH 对产柠檬酸的影响 初始 pH 对产柠檬酸的影响如表 5。可见,当初始 pH 为 5.5 时,柠檬酸产率最高、残糖量最低。这与混合糖化菌产稻草纤维素酶的条件一致,也与稻草纤维素酶糖化稻草纤维素的条件及分步糖化发酵柠檬酸的条件接近。此时柠檬酸产率达 83.2 g·L⁻¹。初始 pH 在 5.0 及以下时,可能会抑制菌体的生长从而减少产酸阶段黑曲霉菌丝球的数量,使产酸率降低,并导致发酵中后期 pH 低于 2,不利于柠檬酸的累积。而 pH 达 6.0 及以上时,发酵液需要较长时间才能下降到适宜产酸的 pH 范围,菌丝球过多地生长消耗了可发酵性糖,使产酸时间延迟、产酸总量降低。

表 5 初始 pH 对柠檬酸产量的影响

Table 5 Effect of innitial pH on citric acid yield

| 项目 Item | 初始 pH Initial pH | | | | |
|--|------------------|------|------|------|------|
| | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 5.5 | 6.0 |
| 柠檬酸产量/g·L ⁻¹ Citric acid yield | 67.3 | 75.8 | 81.5 | 83.2 | 75.6 |
| 残糖量/g·L ⁻¹ Residual sugar amount | 4.86 | 3.20 | 2.37 | 2.23 | 3.27 |

表 6 正交试验方案与结果

Table 6 Design and results of orthogonal test

| 序号 No. | 因素 Factor | | | | 柠檬酸产量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Citric acid yield |
|--|-----------|-------|-------|----------------|--|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 65.6 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 73.8 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 62.5 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 83.2 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 79.8 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 65.2 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 70.8 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 80.3 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 69.7 |
| K_1 | 201.9 | 219.6 | 211.1 | 215.1 | |
| K_2 | 228.2 | 233.9 | 226.7 | 149.8 | |
| K_3 | 220.8 | 197.4 | 213.1 | 226.0 | |
| 极差 Range | 26.3 | 36.5 | 15.6 | 76.2 | |
| 因素:主 \rightarrow 次 Factor: major \rightarrow secondary | | | | DBAC | |
| 优方案 Optimal scheme | | | | $A_2B_2C_2D_3$ | |

2.2 正交试验结果分析

由表 6 可见,在该试验条件下,影响柠檬酸发酵的各因素的主次顺序为:初始 pH>黑曲霉发酵时间>接入柠檬酸发酵种子时间>柠檬酸发酵种子接种量。经极差分析得出稻草粉混菌同步糖化发酵产柠檬酸的优化条件组合为:接入柠檬酸发酵种子时间 3 d,黑曲霉发酵时间 5 d,柠檬酸发酵种子接种量 10%(v/v),初始 pH 5.5。

Condition Optimization of Citric Acid Production from Rice Straw Powder by Mixed Culture Simultaneous Saccharification and Fermentation

LIU Yi

(Biochemical Engineering Department of Hunan Mechanical and Electrical Polytechnic, Changsha, Hunan 410151)

Abstract: Saccharification fungi group was mixed with citric acid fermentation fungi inoculation in the same container, using pretreatment of straw powder as main raw materials to ferment citric acid by single factors experimental and orthogonal experiment. The result indicated that the mixed optimum conditions of simultaneous saccharification and fermentation of citric acid were: inoculation time of citric acid fermented seeds for 3 days, *Aspergillus niger* fermentation time for 5 days, inoculation quantity of citric acid fermented seeds for 10%(v/v), the initial pH for 5.5, thus, the citric acid production was $85.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: straw powder; mixed culture; simultaneous saccharification and fermentation; citric acid

按极差分析得出的优化条件组合进行验证试验,测得此条件下柠檬酸的产量为 $85.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,比正交表中已做的 9 个试验中的最优结果 $83.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 要高,表明极差分析得出的优化条件是真正的优方案。

3 结论

单因素试验表明,混菌同步糖化发酵产柠檬酸将糖化菌群与柠檬酸发酵菌接种在同一反应器中,稻草粉糖化产生的还原糖能迅速不断地被发酵成柠檬酸,解除了糖化过程的产物反馈抑制,促使混合糖化菌更快地降解稻草,两个过程相互促进,从而提高了糖化和发酵效率,使柠檬酸发酵产量有明显提高,而且缩短了发酵周期,降低了发酵所需接种量,使总体生产成本降低。

正交优化试验及验证试验表明,在该试验流程中混菌同步糖化发酵产柠檬酸的优化条件为接入柠檬酸发酵种子时间 3 d,黑曲霉发酵时间 5 d,柠檬酸发酵种子接种量 10%(v/v),初始 pH 5.5,此时柠檬酸的产量为 $85.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 朱圣东,吴元欣,喻子牛,等.微波预处理稻草糖化工艺研究[J].林产化学与工业,2005,25(1):112-114.
- [2] 朱亨政.柠檬酸发酵[J].食品与发酵工业,1994(6):69-74.
- [3] 刘洁,李宪臻,高培基.纤维素酶活力测定方法评述[J].工业微生物,1994,24(4):27-32.
- [4] Wyk V, Mohulatsi M. Biodegradation of wastepaper by cellulose from *Trichoderma viride*[J]. Bioresource Technology, 2003, 86(1): 21-23.
- [5] GB/T8269-1998,柠檬酸[S].
- [6] 张龙翔.生化实验方法和技术[M].北京:人民教育出版社,1981:6-9.