

固定化黑曲霉利用糖蜜发酵生产柠檬酸

王建龙 周 定 侯文华 徐 凌

(哈尔滨工业大学应用化学系, 哈尔滨 150006)

摘要 利用海藻酸钙凝胶包埋黑曲霉 W1-2 的孢子及菌丝体, 制成的固定化细胞经预培养后, 用于发酵糖蜜制取柠檬酸。确定了固定化细胞摇瓶发酵生产柠檬酸的最佳条件: 糖蜜浓度 12%, 初始 pH 值 4.0, 培养温度 30℃ 等。在此条件下发酵 12 天, 柠檬酸浓度达 39 g/L。对分批发酵生产柠檬酸进行了初步研究。

关键词 固定化; 黑曲霉; 糖蜜; 柠檬酸发酵

固定化微生物技术广泛应用于工业、医学、化学分析、环境保护、能源开发以及理论研究等各个方面^[1]。固定化技术为改善丝状真菌的培养及流体力学特性进行连续发酵已表现出明显的优越性。关于固定化细胞生产柠檬酸,近年来研究颇多^[2-5]。但大都是利用合成培养基,并以蔗糖为碳源。对于以糖蜜为原料,利用固定化细胞生产柠檬酸尚未见报道。为此,我们进行了研究,现报道如下。

材料与方法

(一) 实验材料

1. 菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) W1-2.

2. 培养基

斜面培养基(%): 蔗糖 3.0, NH_4NO_3 0.2, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, KCl 0.05, FeSO_4 0.001, 琼脂 2.0.

生产培养基(%): 蔗糖 5.0, NH_4NO_3 0.1—0.5, KH_2PO_4 0.2, FeSO_4 0.001.

发酵培养基: 糖蜜 8—18%.

3. 主要试剂: 蔗糖 (CP), 醋酐 (AR), 吡啶 (AR), 3, 5—二硝基水杨酸 (AR), 酒石酸钾钠 (AR), FeCl_3 (AR), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (AR), 柠檬酸 (AR), 海藻酸钠, CaCl_2 (AR), NH_4Cl (AR) 等。

(二) 分析方法

1. 总酸度测定: NaOH 滴定法。
2. 柠檬酸测定: 醋酐-吡啶比色法^[6]。
3. 还原糖测定: 斐林滴定法。
4. 杂酸检出: 纸上层析法。
5. 草酸检出: CaCl_2 沉淀法, TiCl_3 显色法。

(三) 实验方法

1. 细胞固定化方法: 参见文献 [7—9]。
2. 固定化细胞预培养: 将制备好的固定化细胞置于生长培养基中预培养 36 小时。
3. 糖蜜预处理: 参见文献 [10]。
4. 摇瓶发酵条件: 250ml 三角瓶中装 50ml 培养基, 加入 20 克固定化细胞, 于 30℃, 200r/min 下培养。

结果与讨论

(一) 摇瓶发酵条件的确定

1. 糖蜜浓度对产酸的影响: 调整糖蜜浓度为 8—18%, 考察了糖蜜浓度对产酸的影响。结果表明, 适宜的糖蜜浓度为 12%。

2. 初始 pH 值对产酸的影响: 调整初始 pH 值为 2.0—6.0, 研究了初始 pH 值对产酸的影响。结果表明: 最适 pH 为 4.0 左右。Tsay 报道^[3]固定化黑曲霉生产柠檬酸的最适 pH 值为 3.8—4.8, 我们的实验结果与其较一致。这种低 pH 值有利于柠檬酸的生成, 并且可阻遏草酸的生成。

3. 温度对产酸的影响: 温度高, 产酸速率高, 生产周期短, 但菌体呼吸强度增大, 大量的糖用于合成菌体和氧化成 CO_2 和 H_2O , 产酸率降低。温度过低, 产酸速率低, 发酵周期长, 对生产不利。试验表明: 固定化黑曲霉生产柠檬酸的最适温度为 30℃。

(二) 固定化黑曲霉摇瓶发酵生产柠檬酸

固定化黑曲霉摇瓶发酵生产柠檬酸的时间进程曲线如图 1 所示。

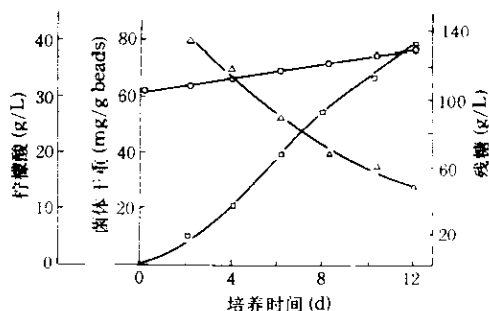


图 1 固定化黑曲霉摇瓶发酵生产柠檬酸

□ 柠檬酸 ○ 菌体干重 △ 残糖

随着发酵时间延长, 柠檬酸浓度逐渐增大。发酵 12 天后, 柠檬酸浓度达 39 g/L。Eikmeier 曾报道^[2]固定化黑曲霉 ATCC11414 摇瓶发酵生产柠檬酸, 培养 24 天后, 柠檬酸浓度为 21 g/L。Tsay 报道^[3]固定化黑曲霉 TMB2022 分生孢子表面培养生产柠檬酸, 发酵 14 天后,

柠檬酸浓度达 61.36g/L。造成这些差异的原因可能与所使用的菌种,培养基的组成以及培养方式,培养条件等有关。

固定化细胞菌丝体干重在发酵过程中略有增加,这说明微生物经固定化后,在载体中能够生长。发酵液中的残糖随菌体干重的增加及柠檬酸浓度的升高而下降。

(三) 固定化黑曲霉分批发酵生产柠檬酸

为了研究固定化细胞重复使用的可能性,进行了分批发酵试验。

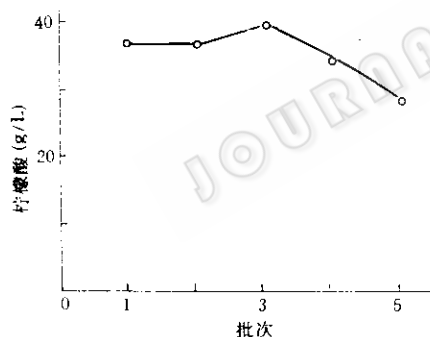


图 2 固定化细胞分批发酵生产柠檬酸

从图 2 可以看出:包埋固定在海藻酸钙凝胶内的黑曲霉可重复使用 5 批次(约 60 天),而柠檬酸生产能力没有明显的下降。Tsay 报道^[5]固定化黑曲霉表面培养生产柠檬酸,其产酸活性可保持 30 天左右。对于如何延长固定化细胞生产柠檬酸的使用寿命以及利用固定化细胞连续发酵生产柠檬酸等问题有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 福井三郎:パイオリアクタ, 讲谈社, 1985.
2. Eikmeier H et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**: 365, 1984.
3. Horitsu H et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**: 8, 1985.
4. Maddox I S et al.: *Biotechnol. Lett.*, **5**: 795, 1983.
5. Tsay S S et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**: 297, 1987.
6. Marrier J R et al.: *J. Dairy Sci.*, **41**: 1683, 1958.
7. Kierstan M et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 387, 1977.
8. Tokata I et al.: *J. Solid-phase Biochem.*, **2**: 225, 1977.
9. 严复等. 生物工程学报, 1 (1): 81, 1985.
10. Clark D S et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **8**: 465, 1966.

(1992-05-20 收稿)