

文章编号: 1000-5471(2007)03-0106-05

# 柑橘皮渣发酵生产柠檬酸工艺参数优化研究<sup>①</sup>

黄健, 张迎君, 武峥, 张超, 曾顺德, 周兴智

重庆市农业科学院 果树研究所, 重庆 江津 402260

**摘要:** 以黑曲霉为菌种, 柑橘皮渣为原料进行半固态发酵生产柠檬酸, 通过正交法对甘油、甲醇、金属离子、温度和时间等影响因子进行优化, 探索黑曲霉的产酸特性和柠檬酸发酵工艺. 结果表明, 甘油抑制了特异性线粒体酶中的 NADP<sup>+</sup>和异柠檬酸脱氢酶(ICDH), 导致顺乌头酸酶平衡, 促使构建柠檬酸骨架. 甲醇抑制了 2-酮戊二酸脱氧酶, 从而促进柠檬酸累积.

**关键词:** 黑曲霉; 柑橘皮渣; 正交法; 柠檬酸

**中图分类号:** S666.1

**文献标识码:** A

柠檬酸又名枸橼酸(3-羟基-3-羧基-1,5-戊二酸, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), 存在于自然界各种生物体内, 广泛应用于食品、医药、化学等工业方面. 传统的柠檬酸生产是以糖蜜、淀粉等为原料, 通过微生物发酵而获取<sup>[1]</sup>. 2002年我国柠檬酸年生产量为40多万吨, 而世界柠檬酸消费量(不含中国)已经升至近200万吨. 生产柠檬酸原料大多是利用玉米、甘薯等粮食作物, 如柳萍等以蔗糖和葡萄糖为生产柠檬酸的原料<sup>[2]</sup>, 因此寻找和扩大新的原料十分重要. 我国柑橘年产量已达一千多万吨, 鲜食和加工下脚料的皮渣数量约占产量的20%, 除了部分皮渣用作饲料外, 大多数柑橘皮渣却当作废料处理. 根据张建安以麦草纤维素酶解液为原料制备柠檬酸<sup>[3]</sup>和柑橘果皮含有丰富的营养成分<sup>[4]</sup>的报道, 进行了柑橘皮渣的单糖(2 207.5 mg/100 g)、双糖(749.0 mg/100 g)、全糖(2 956.5 mg/100 g)测定, 确定了柑橘皮渣是一种可更新的生物资源, 它不仅解决了柠檬酸合成的短缺原料问题, 而且减少环境污染, 提高经济效益. 为此, 本实验运用数学模式优化黑曲霉发酵柑橘皮渣生产柠檬酸的不同组合培养因子的探索研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株

黑曲霉(*Aspergillus niger*)2417, 购于中国微生物菌种保藏中心.

#### 1.1.2 原料

柑橘皮渣、纤维素酶.

#### 1.1.3 培养液

10%蔗糖, 0.2%硝酸铵, 0.1%磷酸氢二钾, 0.05%硫酸镁, 0.1%甘油, 自然pH.

① 收稿日期: 2006-11-23

作者简介: 黄健(1968-), 男, 四川内江人, 重庆市农科院农艺师, 主要从事果树采后贮藏加工.

通讯作者: 邓烈, 研究员.

## 1.1.4 刺激因子

甘油、甲醇、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 。

## 1.2 试验方法

## 1.2.1 试验方案

因素甘油 A、甲醇 B、金属离子 C、温度 D、时间 E,水平 5 个(表 1);选正交表  $L_{25}(5^5)$ (表 2)。

表 1 因素水平

水平	因素				
	A /%	B /%	C /ppm	D /°C	E /t
1	0	0	0	20	1
2	0.1	2	$Zn^{2+}$ 0.075	25	3
3	0.3	3	$Co^{2+}$ 0.1	28	5
4	0.5	4	$Ca^{2+}$ 2	31	7
5	0.7	5	$Cu^{2+}$ 10	36	10

表 2 正交试验及结果分析

试验号	A	B	C	D	E	$X_i / \%$		$T_i$
						1	2	
1	1	1	1	1	1	4.31	4.80	9.11
2	1	2	2	2	2	13.42	14.00	27.42
3	1	3	3	3	3	16.35	17.10	33.45
4	1	4	4	4	4	18.29	18.50	36.79
5	1	5	5	5	5	13.14	13.90	27.04
6	2	1	2	3	4	17.38	18.60	35.98
7	2	2	3	4	5	20.80	20.14	40.94
8	2	3	4	5	1	16.03	16.50	32.53
9	2	4	5	1	2	16.00	15.16	31.16
10	2	5	1	2	3	11.70	12.50	24.20
11	3	1	3	5	2	14.20	14.93	29.13
12	3	2	4	1	3	16.10	16.97	33.07
13	3	3	5	2	4	22.90	22.60	45.50
14	3	4	1	3	5	17.50	18.07	35.57
15	3	5	2	4	1	18.80	18.31	37.11
16	4	1	4	2	5	14.10	14.67	28.77
17	4	2	5	3	1	16.78	16.20	32.98
18	4	3	1	4	2	18.13	18.80	36.93
19	4	4	2	5	3	18.40	19.90	38.30
20	4	5	3	1	4	15.74	14.50	30.24
21	5	1	5	4	3	15.74	16.40	32.14
22	5	2	1	5	4	14.52	14.60	29.12
23	5	3	2	1	5	16.70	16.50	33.20
24	5	4	3	2	1	13.30	13.39	26.69
25	5	5	4	3	2	14.05	14.96	29.01
$T_1$	133.81	135.14	134.94	136.78	138.41	$\sum(X_i^2): 13\ 244.86$		
$T_2$	164.81	163.53	172.02	152.58	153.66	$\sum T_i: 796.38$		
$T_3$	180.38	181.62	160.44	166.99	161.17	$(\sum T_i)^2: 634\ 219.28$		
$T_4$	167.22	168.51	160.16	183.91	177.63	$(\sum T_i)^2/50: 12\ 684.39$		
$T_5$	150.16	147.59	168.82	156.12	165.52	$\sum SS_{A \sim E}: 551.40$		
$\sum T^2$	128 114.57	128 165.75	127 691.70	128 071.07	127 690.23	$SST: 560.47$		
/ 10	12 811.46	12 816.58	12 769.17	12 807.11	12 769.02	$SS_F = SS_T - SS_A - SS_B - SS_C - SS_D$		
$SS_A \sim SS_E$	127.07	132.19	84.78	122.72	84.64	$- SS_E = 9.07$		

### 1.2.2 孢子体制备

将斜面菌株用无菌水洗孢子于三角瓶中, 摇匀备用.

### 1.2.3 工艺流程

80 g 皮渣 —— 加水 160 mL 和纤维素酶 20 u/g —— 酶解 12 h —— 装 500 mL 三角瓶 —— 按表 1 加甘油、甲醇、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  —— 调 pH 值 5.5 —— 灭菌 —— 接种孢子体 3 ml ( $3 \times 10^8$  孢子/瓶) —— 培养.

### 1.2.4 分析测试

糖采用斐林(Somogyi)滴定法<sup>[5]</sup>测定; 柠檬酸采用硫脲法<sup>[6]</sup>和醋酐-吡啶比色法<sup>[7]</sup>测定.

$$\text{计算公式: } SS_T = \sum X_i^2 - \frac{\sum (X_i)^2}{2 \times 25} \quad SS_{A-E} = \frac{\sum T_{A-E}^2}{2 \times 5} - \frac{\sum (X_i)^2}{2 \times 25}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 甘油含量与柠檬酸构建关系

最初培养基中, 黑曲霉孢子发芽产生粗大的球形细胞异常生长, 继后变为纤细生长, 细胞生长和质子分泌使得 pH 下降至 1.7, 在 16 ~ 24 h 之间甘油积累高出初始的 1.5%, 这就起到了对 NADP<sup>+</sup> (特异线粒体酶) 与 ICDH (异柠檬酸脱氢酶) 抑制作用, 从而通过顺乌头酸酶构建柠檬酸. 24 h 后培养基中柠檬酸开始累积, 甘油不断消失.

柠檬酸积累和甘油消失最初都是很慢的, 当柠檬酸浓度达到临界值以后, 它可引起 NADP<sup>+</sup> 特异 ICDH 的反馈抑制, 最终同化来自培养基的甘油, 因此在培养基中甘油浓度的高峰与柠檬酸开始积累是一致的. 对这一观点, 在 Legisa M. 等<sup>[8]</sup>报道中阐明了“甘油是黑曲霉中柠檬酸积累的启动剂”. 本试验结果也表明添加不同数量甘油, NADP<sup>+</sup> 与 ICDH 对异柠檬酸浓度的活性具有抑制作用的特性. 添加 0.3% 的甘油的产酸最高(图 1 和表 3 中处理 A. T<sub>3</sub> 和 A<sub>3</sub>).

### 2.2 甲醇浓度对柠檬酸产量的影响

甲醇对黑霉菌发酵柑橘皮渣产柠檬酸具有促进作用, 发酵机理是培养基中的甲醇能减小金属离子的抑制效果和干扰调节细胞内避免产生柠檬酸的不利因子, 促进黑曲霉的半乳糖代谢和丙酮酸羧化酶的活性, 因而甲醇抑制 2

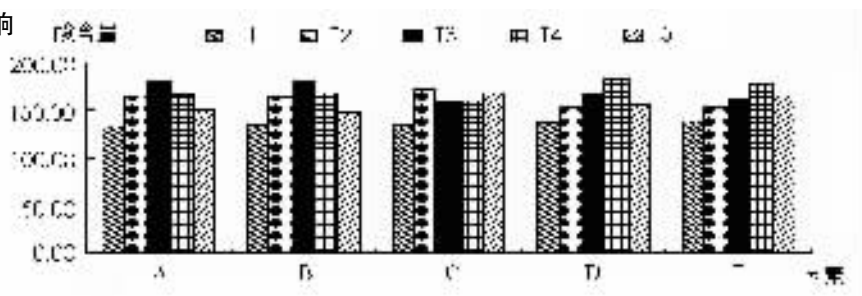


图 1 各因素及水平柠檬酸含量测定结果

一酮戊二酸脱氧酶是柠檬酸累积的关键<sup>[9]</sup>. 增加甲醇浓度可明显提高柠檬酸产量. 3% 甲醇浓度、培养温度为 31 °C、发酵 7 d 后, 菌株在皮渣上的产酸量达到最高, 当甲醇浓度为 5%, 培养温度和时间不变时, 则有抑制产酸效应(图 1 和表 3 中处理 B. T<sub>3</sub>、B. T<sub>5</sub>).

### 2.3 金属离子对生产柠檬酸的影响

特定的金属离子对于黑曲霉利用柑橘皮渣发酵生产柠檬酸有明显的差异和影响, 锌用量对不同种的黑曲霉产酸量有一定的影响, 较高量的锌对产酸量有所下降, 但却有利于细胞生长. 适当的钴、铜、钙用量, 柠檬酸产量稍有增加. 本试验结果表明, 培养基中没添加金属离子黑曲霉发酵果渣生产柠檬酸效果最差, 而加有金属离子锌的产酸最好(图 1 中 C. T<sub>2</sub>).

### 2.4 发酵温度对生产柠檬酸的影响

发酵温度对生产柠檬酸的产酸率有直接的影响. 温度过低, 产酸速率低, 发酵周期长, 对生产不利; 温

度过高,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  $\text{CO}_2$  与  $\text{H}_2\text{O}$ ,产酸率相对降低. 试验结果证明在黑曲霉发酵柑橘皮渣生产柠檬酸过程中,孢子生长和菌丝体发育的最适温度为  $33\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ ,而发酵产酸的最适温度为  $31\text{ }^\circ\text{C}$ (图1中 D.  $T_4$ ). 因此培养发酵温度分为两个阶段进行,更有利提高柠檬酸的产量.

## 2.5 发酵时间对生产柠檬酸的影响

在各组合处理中,随着发酵时间延长,柠檬酸浓度逐渐增大. 3 d 后产酸量迅速增加,7 d 后柠檬酸浓度的增长逐渐趋向稳定,糖消耗达  $80\%$ ,产酸达最高(图1处理 E.  $T_4$ ).

表3 试验结果方差分析

方差来源	变差平方和 SS	自由度 $f$	方差估计值 MS	F 值	$F_{0.05}(f_1, f_2)$	显著性	最佳水平
甘油用量 A	127.07	4	31.77	101.57	2.69 ~ 2.76	***	A <sub>3</sub>
甲醇用量 B	132.19	4	33.05	105.66	2.69 ~ 2.76	***	B <sub>3</sub>
金属离子 C	84.78	4	21.20	67.77	2.69 ~ 2.76	***	C <sub>2</sub>
发酵温度 D	122.72	4	30.68	98.09	2.69 ~ 2.76	***	D <sub>1</sub>
发酵时间 E	84.64	4	21.16	67.65	2.69 ~ 2.76	***	E <sub>1</sub>
试验误差 F	9.07	29	0.31				
总和 T	560.47	49					

注: \*表较显著; \*\*表方差分析显著; \*\*\*表特显著.

对各试验组合进行方差分析见表3,结果表明试验误差为9.07,各因素均具有显著性,组内的最佳水平分别为 A<sub>3</sub>、B<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>、D<sub>1</sub>、E<sub>1</sub>. 通过变差平方和 SS、方差估计值 MS、F 值证明:影响柠檬酸生产的各组间因素以甲醇、甘油和发酵温度因子最为明显(图2).

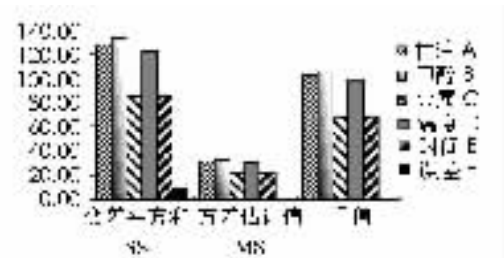


图2 各因素柠檬酸含量的方差分析结果

## 3 结论

实验证明,用黑曲霉发酵柑橘皮渣生产柠檬酸是切实可行的,并且柠檬酸的产量与发酵液中的启动剂含量、刺激剂、特定金属离子以及发酵温度、发酵时间都有着密切关系. 本文较系统地探索了利用微生物发酵柑橘皮渣提取柠檬酸工艺,该优化工艺操作简单、资源利用率高. 因此该研究对开发柑橘皮渣综合利用有着明显的经济实用价值.

## 参考文献:

- [1] 朱亨政. 柠檬酸发酵[J]. 食品与发酵工业, 1994, 6: 69.
- [2] 张建安, 张小退, 韩润林. 用黑曲霉发酵纤维素酶解液生产柠檬酸的研究[J]. 微生物学杂志, 2001, 21: 3.
- [3] 柳萍, 王建龙. 碳源对固定化黑曲霉生产柠檬酸影响的研究[J]. 食品与发酵工业, 1997, 2: 29.
- [4] 程湘东, 兰孝峰, 高呼. 柑橘果皮营养成分及其简易保存技术的研究[J]. 食品科学, 1993, (7): 52.
- [5] 日本食品工业学会《食品分析法》编辑委员会. 食品分析方法[M]. 郑州粮食学院《食品分析方法》翻译组译. 成都: 四川科学技术出版社, 1985: 120-123.
- [6] Marier J. R and Boulet M: Direct determination of citric acid in milk with an improved Pyridineacetic an hydride method [J]. Dairy Sci, 1958, (4): 1683.
- [7] 金其荣, 张继民, 徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989.

- [8] Legisa, M. glycerin led to the accumulation of citric acid in *Aspergillus*[J]. *Enzyme Microb. Technol.* 1986, 8(5): 258—259.
- [9] Maddox I S. The effect of methanol on production of citric acid from galactose in *Aspergillus*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 1986, 23 (3—4): 203—205.

## Study on Optimization of Technological Parameters of Citric Acid Fermentation in Citric Pomace

HUANG Jian, ZHANG Ying-jun, WU Zheng,  
ZHANG Chao, ZENG Shun-de, ZHOU Xing-zhi

*Fruit Research Institute, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Jiangjin, Chongqing 402260, China*

**Abstract:** In this study, citric acid was produced by semisolid fermentation of *Aspergillus niger* with citric pomace as the raw material. In an orthogonal test, the combination of the factors of glycerin, methanol, metal ions, temperature and time was optimized, and the acid-producing properties of *A. niger* and the technological parameters of citric acid fermentation were studied. The results showed that glycerin inhibited NADP<sup>+</sup> and isocitric dehydrogenase (ICDH), thus resulting in an aconitase balance and promoting the formation of the structure of citric acid. Methanol inhibited keloglutarate dehydrogekase, leading to the accumulation of citric acid.

**Key words:** *Aspergillus niger*; citrus pomace; orthogonal test; citric acid

责任编辑 欧 宾