

# 广东甘蔗糖蜜深层发酵柠檬酸的研究

生物系生化微生物专业柠檬酸试验组

广东柠檬酸发酵一直采用表面培养法(又称浅盘法),产量低,平均需要十三、四吨糖蜜才能生产一吨柠檬酸(世界先进水平为三吨糖蜜生产一吨柠檬酸)。近年来由于柠檬酸在轻工、食品、医药、化工及国防上的广泛应用,需要量不断增加。为了改变我省柠檬酸生产的落后局面,满足社会生产的需要,彻底克服从国外进口的现象,我们在毛主席关于“教育要革命”和党的“十大”精神的号召下,一九七三年九月参加了广州食品社夺取柠檬酸高产的战斗。两个多月来我们与工人师傅、技术人员一起,从调查研究入手,针对生产中存在的问题,同时进行了菌种孢子、糖蜜原料的处理,添加生酸促进剂和提取工艺改革等试验。实验证明:(一)菌种:黑曲霉(川樟19-1)的孢子经热处理筛选后,菌体生长粗壮,生酸力增强;(二)广东各地区糖蜜对产酸影响有一定差别,平行试验比较,以广州糖厂所产糖蜜产酸高;(三)发酵后49小时添加200—400r/ml黄血盐,可使柠檬酸转化率提高5—10%;(四)发酵培养基中加入0.1%基础碳酸钙有利于孢子萌发,提高产酸。摇瓶、深层和浅盘发酵试验结果都证明:发酵后48—96小时添加0.6—1.0%碳酸钙能使残糖显著降低,柠檬酸产率比对照提高30%以上,添加碳酸钙后的发酵液用直接中和法(菌丝体与柠檬酸一起加钙盐一起中和沉淀)通过上述处理可获得5吨左右的糖蜜生产一吨柠檬酸的好收率。

## 材料与 方法

- 1.菌种:黑曲霉属(川樟19-1)。
- 2.摇瓶培养基成份:12%糖蜜糖浓度,0.2%硝酸铵。
- 3.摇瓶试验条件:250ml三角瓶装液量50ml转速224r.p.m,30°C±1°C,8天,接种量6000—20000孢子/ml。
- 4.残糖定量测定:费林定糖法。
- 5.总酸测定:滴定法,以消耗0.1NNaOH的毫升数表示。
- 6.残余黄血盐测定:参阅上海工业微生物研究所编《工业微生物》1973年增

\* 1974.1.4 接稿

刊, p37。

7. 生酸转化率计算:  $\text{转化率}\% = \frac{\text{生成柠檬酸克数}}{\text{供应糖份克数}} \times 100$

## 结果与讨论

### 一、温度处理孢子试验

(一) 最适处理时间: 我们采用70°C、60°C、50°C分别以1、3、5分钟的时间进行处理。孢子处理后接入摇瓶, 用250ml锥形瓶装50ml培养基, 培养基成份为12% 糖蜜糖浓度, 0.2% 硝酸铵。发酵8天进行测定, 结果见表1。

表1 不同温度、不同时间处理川柠19—1黑曲霉孢子对柠檬酸产量及糖耗的影响

温度	测定项目	1分钟	3分钟	5分钟
70°C	总酸	6.6	8.1	7.2
	残糖	5.1	3.8	3.1
60°C	总酸	5.5	7.8	7.5
	残糖	4.8	2.7	2.8
50°C	总酸	6.5	7.8	5.8
	残糖	4.9	4.5	5.5

从表1看来, 几个不同温度的处理时间, 都以3分钟较为合适, 产酸高、糖耗快。

(二) 最适处理温度: 根据上述试验结果, 我们以3分钟做为处理时间, 但考虑到60°C以上死亡率太大, 因而采取50°C、45°C、40°C进行试验, 结果见表2。

表2 在3分钟时间, 不同温度处理川柠19—1黑曲霉孢子对柠檬酸产量及糖耗的影响

批号	测定项目	50°C	45°C	40°C
10	总酸	6.3	7.6	8.1
	残糖	4.3	4.3	3.4
12	总酸	7.5	12.2	11.9
	残糖	3.6	4.8	5.9
17	总酸	10.8	11.4	11.4

从表2看来, 以45°C 3分钟的处理条件较合适, 产酸高、糖耗快。

最后我们采取以45°C 3分钟为处理条件, 与未经处理的孢子同一接种量

(6000~20000个孢子/ml)进行比较,结果经温度处理的孢子生酸及糖转化率均比未经处理的提高10%。

## 二、糖蜜处理试验

(一)处理方法:采用广州糖厂糖蜜,垂度72°Bx, PH4.5,含糖51%。

①强硷法:糖蜜稀释至54°Bx,加石灰乳调 PH4.5,加热80—85°C半小时,静置澄清4—6小时,除去沉淀。

②交换沉淀法:糖蜜稀释至55°Bx,用浓硫酸调 PH2,加石灰乳调 PH4.5,加热80—85°C半小时,除去沉淀。

③交换沉淀法加黄血盐:糖蜜先用交换沉淀法处理,再按糖蜜铁含量计算加入黄血盐(黄血盐与铁离子完全反应所需量)加热80—85°C半小时,静置4—6小时,除去沉淀。

④酸化法:糖蜜与水按1:1稀释,加入浓硫酸4.4%(按原糖蜜计),加热90—95°C半小时,静置12小时,除去沉淀。

(二)试验结果:用上述处理法取得澄清滤液,稀释至糖浓度12%左右,加入0.2%硝酸铵,用250ml锥形瓶装50ml培养基。菌种用川柠19—1,接种量6000~20000个孢子/ml。摇床以回转式224r.p.m. 30°C.培养8天进行测定。

①不同方法处理广州糖厂糖蜜。试验结果见表3:

表3 不同方法处理广州糖厂糖蜜发酵结果

处 理 方 法	全糖%	残糖%	酸 度	轉化率%
强 硷 法	11.9	5.67	7.62	37.2
交 互 法	11.6	5.08	6.84	35.0
交 互 法 加 黄 血 鹽	10.4	6.40	6.76	40.2
黄 血 鹽	9.9	5.80	5.20	23.3
不 处 理	11.3	4.70	7.74	38.7
酸 化 法	10.9	5.80	7.30	36.3

从表3看来,广州糖厂糖蜜不经处理,发酵速度并不比处理的慢,转化率也比较高。从试验结果看来,经处理后虽然清除某些有害成份,但也可能同时去除一些促进生长物质,这是一个相当复杂的问题,仍需进一步分析。但初步认为广州糖厂糖蜜,可以不经处理直接进行发酵生产柠檬酸,但要考虑不同季节和甘蔗产区会发生影响。从实验结果又可看出,交互沉淀法加黄血盐的处理产酸率最高,但此法耗酸多,手续麻烦,仍有待进一步改进。

②不同糖厂糖蜜发酵试验。根据上述试验,广州糖厂糖蜜未经处理仍有良好发

酵效果，因此采用广东其他不同糖厂糖蜜进行试验，结果见表4：

表4 各糖厂糖蜜发酵结果

糖 蜜 来 源	全 糖	残 糖	酸 度	轉 化 率
广 州	12.4	4.68	9.32	32.5
石 岐	12.4	4.16	2.62	9.5
惠 阳	14.9	3.76	5.70	20.3
江 門	13.2	7.06	2.53	8.0
順 德	13.7	6.30	2.30	7.8

注：以上均为未处理糖蜜直接稀釋发酵6天

表4表明，广东各糖厂未经处理的糖蜜发酵试验产酸率有一定差别，广州糖厂糖蜜产酸率高，其次是惠阳糖厂。由于各厂制糖方法、甘蔗产区和季节不同，因此我们认为要因时制宜地采用不同处理方法。

### 三、黄血盐对菌体生长及生酸的影响

黄血盐是一有毒的无机盐，在柠檬酸发酵中加入适量黄血盐能刺激菌体生长促进生酸，过多则有明显抑制作用。

(一)黄血盐对菌体生长的影响。如表5所示：

表5 黄血盐对菌体生长的影响

搖瓶培养基中黄血盐添加量r/ml	0	200	400	600	800	1000
菌体干重g/100ml	1.25	1.2	1.02	0.96	0.74	0.6
生 長 情 况	菌絲多 細長 節長	菌絲較多 節短	菌 絲 粗 壯		菌絲粗 短有碎 断現象	菌絲少 碎断严重

多次实验证明，当加入800r/ml以上黄血盐时菌体生长即明显受抑制。此时菌丝结成块状无生酸能力，当此量大于1200r/ml时孢子则无法发芽。

(二)黄血盐与生酸的关系。

发酵过程的不同时期添加不同量黄血盐，对菌体生酸的影响是不同的。

①不同时间添加一定量黄血盐对生酸的影响。如表6所示。由表中看出，发酵开始后96小时添加黄血盐对生酸最有利，其次为24小时和48小时。多次试验表明在72小时添加黄血盐时，产酸率下降。

表6 不同发酵时间添加400r/ml黄血盐对生酸的影响

编号	1	2	3	4	5	6
添加时间(hr)	0	24	48	72	96	120
总酸	11.7	13	13	12	14	12.5
转化率%	51	58	55	45	60	44

注：总酸相同而转化率不同，是因发酵终了时体积不同之故

②添加不同量的黄血盐与产酸关系。结果如表7：

表7 添加不同量黄血盐对产酸的影响

编号	1	2	3	4
添加量(r/ml)	0	200	400	600
总酸	6.3	6.78	4.9	3.4
转化率(%)	53	69	53	39

由表7可见，添加黄血盐量在200—400r/ml之间，均有利于生酸。根据表6、表7所得结果进行了加量与加时的综合试验。结果如表8：

表8 黄血盐添加量和添加时间综合试验比较

黄血盐添加量 (r/ml)	编号						
	1	2	3	4	5	6	7
24小时	0	200	400				
48小时	0			200	400		
96小时	0					200	400
总酸	7.4	9.6	10.4	7.8	11.4	10.0	10.0
转化率(%)	31	44.8	49	35	51.6	53	50.6

从上表看出,在发酵前期(24~48小时)加入400r/ml较200r/ml黄血盐对生酸效果显著;中后期(96小时)则在此量内,二者差别不大。

③通过多次添加不同量的黄血盐的试验,我们观察到在添加一定量的黄血盐后,发酵液中的残余黄血盐(残黄)均保持在一定值(表9及10)。这一现象,我们认为黄血盐的重要作用不仅是除去糖蜜中有毒金属离子(如 $Fe^{++}$ )而促进菌体内柠檬酸的积累<sup>[1,2,3]</sup>,而且能被菌体所吸收,改变了菌体的生理性状,从而直接影响产酸。

表9 200公升发酵罐内残黄变化情况

发酵时间(hr)	0	23	40	55	60	75	81	83	97	103	105
加入 $K_4Fe(CN)_6$ 量(ml)	110	-	-	150	-	-	100	-	-	50	-
残黄 r/ml	74	53	52	75	61.2	58	64.8	55.7	40	-	52.5

注:加入的黄血盐为20%的水溶液

表10 5000公升发酵罐内残黄变化情况

发酵时间(hr)	0	30	70	93	122	125	129	137	141
加入量(ml)20%	3000	-	-	-	300	-	-	1150	-
残黄 (r/ml)	44	49	51	49	45	45	45	46.2	41

因此在发酵过程中添加黄血盐的量,不能只凭发酵液内残黄的多少来确定,必须根据发酵进展情况(包括菌丝生长情况及生酸的情况等)灵活掌握。

#### 四、 发酵期间添加碳酸钙的试验

(一)  $CaCO_3$ 添加量和添加时间的选择。在250ml摇瓶中于不同发酵时间(48hr, 96hr和144hr)分别加入0.4% 0.6% 0.8% 1.0%和1.2% 量的碳酸钙,从孢子萌发、菌丝形态、生酸情况(表11)及残糖量看,以发酵后48hr和96hr加入0.6—0.8%

表11 摇瓶试验加 $CaCO_3$ 量和时间的选择

添加时间(hr)	测定项目	添加量 %					对照
		0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	
48	总酸	8.66	9.86	8.04	8.5	7.3	8.24
	残糖%	2.4	1.9	2.0	2.0	5.0	4.9
96	总酸	8.59	9.79	9.7	9.36	8.6	注: $CaCO_3$ 中和的柠檬酸未计算在内
	残糖%	3.6	2.9	2.8	2.1	2.2	
144	总酸	8.7	8.5	8.37	6.61	7.2	
	残糖%	3.0	3.1	3.2	3.2	3.1	

的CaCO<sub>3</sub>效果最佳。进一步试验表明(表12)加钙组平均转化率为57.3%，比对照组转化率高出36%。

表12 CaCO<sub>3</sub>对产酸的作用

添加时间(hr)	测定项目	添加量 %			备注
		0	0.6	0.8	
48	总酸 转化率%	7.87	8.36	9.26	CaCO <sub>3</sub> 中和的 柠檬酸未计 算在内。
		42.50	55.20	63.60	
96	总酸 转化率%	7.10	8.19	7.99	
		41.70	56.90	53.00	

(二)深层发酵添加CaCO<sub>3</sub>对柠檬酸生产的作用。由于深层发酵和摇瓶试验的不同特点,在不影响柠檬酸纯度的前提下采用维持发酵液PH 3左右流加CaCO<sub>3</sub>(在发酵48—96小时之间)。从表13可看出,添加CaCO<sub>3</sub>的作用显著。平均转化率较不加者高30%。

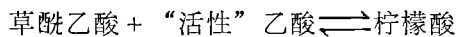
表13 200公升深层发酵添加CaCO<sub>3</sub>与不加情况对照表

测定项目 对照批数	平均转化率%	平均残糖 %	pH
添加CaCO <sub>3</sub> 共二批	54.3	1.6	用CaCO <sub>3</sub> 维持 pH 近 3
不加CaCO <sub>3</sub> 共八批	41.6	2.04	自然 pH

注:发酵培养基加0.1%基础CaCO<sub>3</sub>,待生酸后 pH 下降,然后以流加CaCO<sub>3</sub>乳液的方法维持发酵 pH 近 3,培养温度30°C±1,搅拌速度300rpm。

此外,浅盘发酵试验结果表明,发酵后96小时加入1%CaCO<sub>3</sub>(一次加完)使产酸转化率在60%以上。比原来转化率提高了一倍多。

(三)碳酸钙是一种强硷弱酸盐,具有一定的缓冲能力。当发酵进入生酸期后,随着柠檬酸的积累发酵液 pH 值不断下降,加入CaCO<sub>3</sub>后部分柠檬酸与Ca<sup>++</sup>结合;又因CO<sub>3</sub><sup>=</sup>+H<sup>+</sup>⇌HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>而使氢离子浓度减小,缓和了pH值的下降。由于终产物(柠檬酸)浓度降低,根据反馈抑制原理,这样就部分解除了终产物对产酸过程中某些酶系的反馈抑制,即相对提高了酶活力,从而有利于柠檬酸的合成。此外,由反应过程中逸出的CO<sub>2</sub>,根据柠檬酸合成理论[4.5],将通过丙酮酸羧化支路参与柠檬酸合成。生成的柠檬酸与Ca<sup>++</sup>结合又降低了酸浓度,使下列反应



趋向于柠檬酸合成。如此随着 $\text{CaCO}_3$ 的不断加入(流加),以上过程周而复始地循环导致了酸产量较大幅度地提高。

### 五、直接中和法提取柠檬酸的试验

考虑到发酵期间添加碳酸钙,可以提高柠檬酸的收率及间接中和法(即先把菌体滤去后的发酵液,再加碳酸钙中和)菌体中所含有柠檬酸无法回收,采取了直接中和法。经过五批试验,总酸收率平均达83.6%,比原来间接中和法收率提高15—20%,产品纯度符合药典规定,操作简便,可节省部分设备,但产品色泽稍差,硫酸根较多。其工艺流程简图如下:

(1)发酵液→(2)添加碳酸钙→(3)柠檬酸钙+菌体→(4)浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 酸解→(5)过滤→(6)柠檬酸液→(7)浓缩→(8)结晶。

└→弃去石膏+菌体

第(4)步以后均与间接中和法(原法)相同。

### 参 考 文 献

- [1] Martin. S. W, Waters, W. N. Pradution of citric acid by Submerged fermentation, Ind. Eng. Chem. 44, 2229, 1952.
- [2] C. A., 72 (11) 53755 t, 1970 .
- [3] 堀津浩章, Aspergillus Nigerの生育,呼吸及びクユン酸生成に対する Ferrocyanideの影響, 发酵协会志29, 41, 1971。
- [4] Bowstein, R. A, Gohnsn. M. G. The Mechanism of fermentation of Citrate and oxalate by Aspergillus Niger, J. Biol. chem., 198, 143, 1952.
- [5] Shu. P. Mechanism of Citric acid fermentation from glucose by Aspergillus Niger., Canada. J. Biochem. Biophys. .32,68,1954 .