



文章编号:1006-3080(2014)06-0681-03

玉米秸秆水解液的黑曲霉发酵生产高浓度柠檬酸

孟 佼, 周平平, 张 建, 鲍 杰

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:柠檬酸是在饮料、制药、化妆品等领域有广泛应用的重要有机酸。利用玉米秸秆等木质纤维素原料生产柠檬酸可以显著降低其生产成本。目前,木质纤维素柠檬酸发酵的技术指标偏低,不具备工业应用价值。本文以黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 为发酵菌株,以干法稀酸预处理和生物脱毒后获得的玉米秸秆酶水解液为原料,在优化条件下柠檬酸发酵质量浓度达到 97.45 g/L,相对于葡萄糖的得率达到了 87.27%,是迄今为止所有报道的最高指标,已经接近以淀粉为原料的柠檬酸发酵指标。这一结果为以木质纤维素为原料生产柠檬酸的技术产业化提供了重要的依据。

关键词:柠檬酸;黑曲霉;玉米秸秆;木质纤维素

中图分类号:TQ051.13

文献标志码:A

High Titer Citric Acid Fermentation from Corn Stover Hydrolysate by *Aspergillus niger*

MENG Jiao, ZHOU Ping-ping, ZHANG Jian, BAO Jie

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Citric acid is one of the most versatile industrial organic acids in beverages, pharmaceutical, cosmetics, agriculture and biomedicine. Citric acid production using corn stover biomass as feedstock could provide an important way for cost reduction. The technical level of the reported citric acid production from lignocellulose biomass is far from the practical industry application. In this study, *Aspergillus niger* SIIM M288 was used to produce high titer citric acid using the corn stover hydrolysate as the substrate. Under the optimized condition, the citric acid titer and yield were achieved at 97.45 g/L and 87.27%, respectively, by *Aspergillus niger* SIIM M288 using corn stover hydrolysate. The results reached the highest level up to now. The results provided a possibility for economically citric acid production using the alternative lignocellulose feedstock.

Key words: citric acid; *Aspergillus niger*; corn stover; lignocellulose

收稿日期:2014-09-14

基金项目:国家“973”计划(2011CB707406);国家“863”项目(2012AA022301, 2014AA021901);国家自然科学基金(21306048, 31300070);中央高校基本科研业务费专项资金(WF1214025, 1314036)

作者简介:孟 佼(1988-),女,上海人,硕士生,主要从事木质纤维素生物转化方向的研究。

通信联系人:鲍 杰, E-mail: jbao@ecust.edu.cn

柠檬酸是在饮料、制药、化妆品等领域广泛应用的重要有机酸。目前,工业生产柠檬酸主要以粮食淀粉为原料,利用黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵而得^[1]。利用资源丰富的农作物秸秆类纤维素为原料,通过生物加工路线生产柠檬酸是一个极为重要的研究热点和产业方向。目前国内外以木质纤维素原料生产柠檬酸尚处于实验室阶段,主要瓶颈之一就是无法实现高浓度的纤维素柠檬酸的积累^[2-5],纤维素对柠檬酸的得率偏低,因而不具备工业应用的价值。

本文以玉米秸秆(Corn Stover, CS)为原料,经过干法稀酸预处理和生物脱毒处理后,以 *A. niger* SIIM M288 为发酵菌株,可以实现柠檬酸的高浓度生产。在优化条件下,固含量 25% (文中以质量分数计)的玉米秸秆水解液可以发酵获得 97.45 g/L 柠檬酸,柠檬酸得率达到 87.27%,是目前所有报道的最高指标,接近以淀粉为原料的柠檬酸发酵指标。本文的结果为木质纤维素为原料生产柠檬酸的产业化提供了重要的可行性依据。

1 玉米秸秆预处理抑制物对 *A. niger* SIIM M288 的生长和柠檬酸发酵的影响

本研究以玉米秸秆水解液为筛选体系,获得了一株利用玉米秸秆水解液中的葡萄糖来发酵生产柠檬酸菌株 *A. niger* SIIM M288。来自于河南郸城的玉米秸秆经过干法稀酸预处理后^[6-9],在 25% 固含量下,利用 Youtell #6 纤维素酶(每克干固体中含 10 mg 酶蛋白)水解得到实验所需水解液。直接进行酶水解的玉米秸秆水解液(freshly pretreated CS hydrolysate)中含有 90~110 g/L 葡萄糖,8~12 g/L 木糖,10.30 g/L 乙酸,0.58 g/L 羟甲基糠醛和 1.10 g/L 糠醛。当 *A. niger* SIIM M288 接种于此玉米秸秆未脱毒水解液后,葡萄糖基本不消耗,柠檬酸也基本没有产生。这是因为玉米秸秆经预处理后产生的乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等抑制物对 *A. niger* SIIM M288 的生长和代谢有强烈的抑制作用。

为了降低抑制物对柠檬酸发酵的影响,使用前期工作筛选到的树脂枝孢霉煤油真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 对预处理后的玉米秸秆进行生物脱毒^[9],脱毒后玉米秸秆水解液(detoxified CS hydrolysate)中含有 90~110 g/L 葡萄糖,8~12 g/L 木糖,3.50 g/L 乙酸,0.05 g/L 羟甲基糠醛,没有检测到糠醛。可以看出,生物脱毒后水解液中抑

制物的质量浓度显著降低,乙酸降低约 70%,羟甲基糠醛降低 90% 以上,毒性最大的糠醛全部消失。图 1 是 *A. niger* SIIM M288 在玉米秸秆水解液中的柠檬酸发酵曲线。由图 1 可知,固含量为 25% 的脱毒玉米秸秆水解液中柠檬酸的产量和得率分别提高至 58.04 g/L 和 67.39%,*A. niger* SIIM M288 利用脱毒的玉米秸秆水解液,实现柠檬酸的积累。

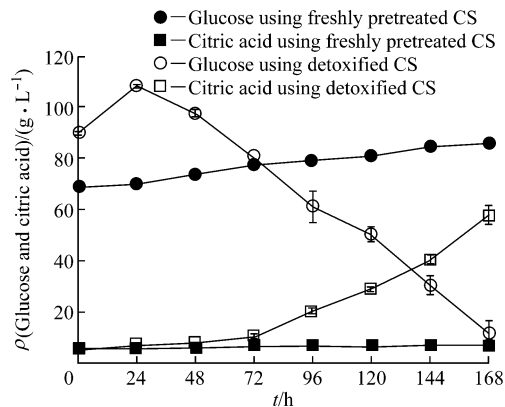


图 1 *A. niger* SIIM M288 在未脱毒与脱毒玉米秸秆水解液中的柠檬酸发酵

Fig. 1 Citric acid fermentation of *A. niger* SIIM M288 using the freshly pretreated and detoxified CS hydrolysate as carbon feedstock

2 玉米秸秆水解液的 *A. niger* SIIM M288 柠檬酸发酵优化

为了推进玉米秸秆水解液的柠檬酸发酵过程的工业化,对柠檬酸发酵参数进行优化设计,结果见图 2。*A. niger* SIIM M288 发酵生产柠檬酸的最适条件为 33 °C,初始 pH 为 6.0,加入 1.0 g/L NH₄Cl,不添加额外的 KH₂PO₄ 和其他微量元素(Zn²⁺,

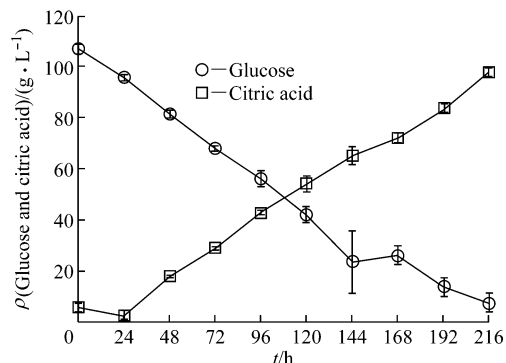


图 2 *A. niger* SIIM M288 在玉米秸秆水解液中的柠檬酸发酵优化

Fig. 2 Optimization of citric acid fermentation of *A. niger* SIIM M288 using CS hydrolysate

Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}), 发酵 168 h 后柠檬酸最终质量浓度为 97.45 g/L, 对葡萄糖的得率为 87.27%, 是目前为止最高的产量。这一结果基本达到了产品质量浓度为 100 g/L 的有机酸发酵常规指标, 并且接近以粮食淀粉为底物的柠檬酸发酵指标^[10], 为以木质纤维素原料为底物生产柠檬酸提供了重要依据。

参考文献:

[1] Levente K, Christian P K. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: Do we understand this well working black box[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2003, **61**(3): 189-196.

[2] 张建安, 张小勇, 韩润林, 等. 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): 5-8.

[3] Gurpreet S D, Satinder K B, Mausam V, et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*[J]. Biochemical Engineering, 2011, **54**(2): 83-92.

[4] Gurpreet S D, Satinder K B, Mausam V. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation [J]. International Journal Food Science Technology,

2012, **47**(3): 542-548.

[5] Goud K H, Srilakshmi A, Kumar A P, et al. Citric acid production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation using fruit wastes [J]. Bio Technology: An Indian Journal, 2012, **6**(3): 93-96.

[6] Zhang Jian, Wang Xinsheng, Chu Deqiang, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production [J]. Bioresource Technology, 2011, **102**(6): 4480-4488.

[7] He Yanqing, Fang Zhenhong, Zhang Jian, et al. De-ashing treatment of corn stover improves the efficiencies of enzymatic hydrolysis and consequent ethanol fermentation [J]. Bioresource Technology, 2014, **169**: 552-558.

[8] He Yanqing, Zhang Jian, Bao Jie. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation [J]. Bioresource Technology, 2014, **158**: 360-364.

[9] Zhang Jian, Zhu Zhinan, Wang Xiaofeng, et al. Biotoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation [J]. Biotechnology for Biofuels, 2010, **3**: 26-41.

[10] 金其荣, 张继民, 徐勤, 等. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.

下期发表论文摘要预报

醇胺药剂与石英界面作用的分子动力学模拟

刘 臻, 孙 泽, 于建国

(华东理工大学国家盐湖资源综合利用工程技术研究中心, 上海 200237)

摘要:采用分子动力学方法模拟研究了醇胺浮选药剂十二胺、十二醇及其混合物与石英的界面作用, 得到吸附稳定后的团簇形貌及水分子排布, 发现十二胺可在石英表面形成稳定的柱状半胶束, 而十二醇则不与石英表面发生作用, 悬浮在水相之中。对混合药剂而言, 十二醇可以通过疏水性碳链间作用黏聚在十二胺半胶束上方, 但不改变胶束化过程, 该现象可调节矿物的 zeta 电位, 提高浮选效率。研究同时发现两种药剂均不能吸附在表面羟基化的石英上, 故在低 pH 条件下, 它们均不能有效浮选石英。