

玉米秸秆原料的黑曲霉发酵生产柠檬酸

摘要

柠檬酸是在饮料、制药、化妆品、农业等领域中有着广泛应用的重要有机酸。目前，工业上主要利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*)，以淀粉类粮食为底物发酵生产柠檬酸。这一传统发酵工艺需要消耗大量的粮食作为黑曲霉生长和发酵的碳源。农作物秸秆等木质纤维素是最丰富的可再生碳水化合物资源，利用储量丰富、价格低廉的的秸秆发酵柠檬酸，可显著降低柠檬酸生产成本。但是,黑曲霉在预处理后木质纤维素体系中无法实现高浓度的柠檬酸积累。本文以玉米秸秆为原料进行柠檬酸发酵为出发点，进行了如下研究：

首先，对于三株候选柠檬酸生产菌株黑曲霉 (*A. niger*) SIIM M203、M288、M228 进行了柠檬酸生产能力的鉴定，发现这三株菌都具备生产柠檬酸的能力。然后，对比了这三株菌在玉米秸秆水解液中的发酵能力。结果表明，黑曲霉 SIIM M288 在木质纤维素水解液中生产柠檬酸的能力最强。

其次，测定了黑曲霉 SIIM M288 对木质纤维素中主要抑制物的耐受性。玉米秸秆中的主要抑制物对黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸都有抑制，糠醛等还抑制了菌体的生长。所以，黑曲霉 SIIM M288 必须以脱毒秸秆为底物进行柠檬酸发酵。

最后，对黑曲霉 SIIM M288 在 25%脱毒玉米秸秆水解液中的发酵条件进行了优化。最优的发酵条件为：33℃、初始 pH 为 6.0、NH₄Cl 为 1.0g/L、不添加 Mn²⁺的情况下。在此条件下，获得了 98.27 g/L 柠檬酸，转化率为 77.20 %。

本文通过菌种筛选和条件优化，实现了在玉米秸秆水解液中积累柠檬酸，为玉米秸秆为原料工业化生产柠檬酸提供了借鉴。

关键词：柠檬酸；黑曲霉；玉米秸秆；木质纤维素

Citric Acid Production from Corn Stover by *Aspergillus niger*

Abstract

Citric acid is an important organic acid with broad applications in beverage, pharmacy, cosmetics, agriculture and other areas. Currently, the industrial citric acid fermentation was achieved by *Aspergillus niger*, using starchy food as the substrate. Large amount of food crops is consumed as the carbon source for growth and fermentation in traditional citric acid production. Lignocellulose, such as corn stover, is the most abundant renewable carbohydrate resource. Therefore, the use of the abundant and cheap corn stover can significantly reduce the citric acid production cost. When *A. niger* is used in the relatively poor lignocellulosic environment, citric acid is not able to accumulate to a high concentration.

In this thesis, firstly, three candidate strains *A. niger* SIIM M203, M288, M228 were identified and screened for citric acid fermentation using corn stover feedstock. Then, the ability of the three citric acid fermenting strains in corn stover hydrolysate was compared. The results showed that the strain *A. niger* SIIM M288 is the best one for producing highest citrate acid titer than the other two strains.

Secondly, the tolerance of the strain *A. niger* SIIM M288 against inhibitors in corn stover hydrolysate was detected. All the inhibitors negatively affected the citric acid fermentation performance of *A. niger* SIIM M288. Furfural even inhibited its growth. The result indicates that the pretreated corn stover can only be used after the inhibitors are removed completely (detoxification).

Finally, the fermentation conditions for the strain M288 in the detoxicated corn stover hydrolysate prepared at 25% (w/w) solids loading were optimized. The optimized condition were 33 °C, initial pH 6.0, 1.0 g/L NH₄Cl concentration, with no Mn²⁺ addition. 98.27 g/L of citrate titer and 77.20 % of the conversion yield were obtained under the optimized condition.

This study may be helpful for the large scale production of citric acid from corn stover in the future.

Key word: citrate; *Aspergillus niger*; corn stover; lignocellulose

目录

前言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 柠檬酸概述	2
1.1.1 柠檬酸性质及应用	2
1.1.2 柠檬酸发酵微生物及其原理	2
1.1.3 柠檬酸生产现状	5
1.2 木质纤维素概述	5
1.2.1 木质纤维素结构	5
1.2.2 纤维素酶组成	6
1.2.3 预处理	7
1.2.4 抑制物及脱毒方式	7
1.3 木质纤维素柠檬酸的生产工艺	8
1.3.1 生产木质纤维素柠檬酸的步骤以及瓶颈	8
1.3.2 优化柠檬酸生产的技术及工艺	9
1.4 选题依据和研究思路	13
第 2 章 材料与amp;方法	14
2.1 菌体、试剂及仪器设备	14
2.1.1 菌株	14
2.1.2 试剂	14
2.1.3 培养基	15
2.1.4 实验仪器	15
2.2 实验方法	16
2.2.1 菌种保藏	16
2.2.2 菌种活化	16
2.2.3 玉米秸秆预处理	16
2.2.4 脱毒步骤	18
2.2.5 水解液制备	18
2.2.6 接种方法	18
2.2.7 发酵条件	18
2.2.8 样品处理	19
2.3 分析方法	19

2.3.1 葡萄糖、木糖、柠檬酸、糠醛和羟甲基糠醛浓度测定	19
2.3.2 菌体干重的测定	19
2.3.3 柠檬酸产量和转化率的计算	19
第 3 章 结果与讨论	20
3.1 鉴定候选菌株的产酸能力	20
3.1.1 M203 的鉴定结果	20
3.1.2 M288 的鉴定结果	22
3.1.3 M228 的鉴定结果	23
3.1.4 鉴定小结	25
3.2 柠檬酸生产菌株的筛选	27
3.3 抑制物对发酵的影响	31
3.3.1 呋喃类抑制物	31
3.3.2 弱酸类抑制物	34
3.3.3 酚类抑制物	37
3.3.4 M288 对玉米秸秆中主要抑制的耐受性小结	37
3.4 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵条件的优化	38
3.4.1 温度梯度对 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响	38
3.4.2 初始 pH 梯度对 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响	39
3.4.3 NH_4Cl 梯度对 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响	41
3.4.4 MnCl_2 梯度对 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响	42
3.4.5 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中最优条件下的发酵情况	44
第 4 章 结论与展望	45
4.1 结论	45
4.2 展望	45
参考文献	47
致谢	51

前言

柠檬酸是生物体主要代谢产物之一。广泛应用于食品、医药、化工等领域。目前，商业上主要利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*)，以淀粉类粮食为底物发酵生产柠檬酸，转化率一般都高于 70%，较好的黑曲霉可以实现 95% 以上的转化率。但是传统柠檬酸发酵，需要消耗大量的粮食为底物。所以，为了节省粮食，降低成本，考虑以农业残留或者工业废弃物为原料，来发酵生产柠檬酸。木质纤维素富含可利用的纤维素和半纤维素成分，是柠檬酸生产底物的首要选择。

传统柠檬酸发酵技术已经相当成熟，黑曲霉在淀粉环境中可以获得相当可观的产量。但是当黑曲霉在相对恶劣的木质纤维素环境中无法实现高浓度的柠檬酸积累。所以，目前需要探索实现柠檬酸在木质纤维素中高产的生产工艺。

目前，提高柠檬酸在木质纤维素中产量的方法主要有：1) 筛选合适的候选菌株或者诱变原始发酵菌株，获得更高产的生产菌株。但是若将该技术运用于工业化生产，诱变菌株的下游处理可能会带来环境问题。2) 对原料进行处理，优化原料中的组分，提高柠檬酸的产量。但是目前为止，以木质纤维素为底物的柠檬酸生产，最终产量都不高。无法实现工业化的生产。3) 对发酵条件进行优化，柠檬酸发酵对环境的变化极为敏感，优化其发酵条件可能显著提高柠檬酸产量。4) 同步糖化与发酵，黑曲霉在以淀粉类原料为底物时，可以实现同步糖化与发酵。能够简化工艺，降低成本。

第 1 章 文献综述

1.1 柠檬酸概述

1.1.1 柠檬酸性质及应用

柠檬酸，3-羟基-3-羧基戊二酸，室温下，为白色晶体粉末，无味，常含一分子结晶水或无结晶水，易溶于水。它是生物体内三羧酸循环(TCA)的主要中间产物之一，所以在几乎所有的生物体中有着重要的代谢意义^[1]。

柠檬酸在食品、医药、化妆品、化工等领域具有广泛的应用。例如：由于柠檬酸的口感为爽快的酸味，所以，普遍用作于各种饮料、点心的酸性调味剂，或者食用油的抗氧化剂。此外，柠檬酸具有防止或者消除皮肤色素沉着的作用，所以，柠檬酸可用于制药和化妆品行业。还有，柠檬酸溶液及其盐溶液可以作为纺织品的助洗剂，可以沉淀纺织品上金属离子，同时，作为纯棉纺织物的无甲醛防皱整理剂。故，柠檬酸的生产对具有重要的意义^[2]。

1.1.2 柠檬酸发酵微生物及其原理

从霉菌到酵母，以及少量的细菌，几乎都可以用来生产柠檬酸。生产柠檬酸的主要菌体有：黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、宇佐美曲霉 (*Asp.usamii*)、解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 等等。

商业上，主要用黑曲霉 (*A.niger*) 是生产柠檬酸。黑曲霉菌落在固体培养基上由白色绒毛逐渐变至黑棕色。黑曲霉可利用蔗糖、葡萄糖、木糖、甘油等多种碳源，以及淀粉质原料 (玉米粉、薯干粉等)、糖蜜、葡萄糖母液等原料。其转化率基本都在 70% 以上，是最具竞争力的柠檬酸生产菌株。黑曲霉最适生长 pH 值为 5.0-7.0，生长最适温度为 33-36℃；最适产酸 pH 值为 1.8-2.5，产酸最适温度在 28-36℃。黑曲霉以具有多种活力较强的水解酶系^[3]，如：淀粉酶等等。所以，可以不添加额外的淀粉酶，来实现柠檬酸的发酵。深层发酵中，一般认为柠檬酸生产要求菌体形态为颗粒状。这与生长条件和基因型有关。通气强度、培养基 pH、生长速率、营养因子和接种的方式和浓度有关。但是，也有少部分菌体在生产柠檬酸时的形态不为颗粒状^[4-6]。

此外，酵母类的菌种也是柠檬酸生产的主力军。酵母类菌种的优势在于可以利用烷烃类底物发酵柠檬酸。转化率可达 56%，高于黑曲霉对烷烃的发酵能力。此外，酵母类的菌种容易进行分子改造。在具有重组菊粉酶基因的解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica* SWJ-1b) 中，敲除部分柠檬酸裂解酶基因 (*ACLI*)，增加异柠檬酸裂解酶基因 (*ICLI*) 的拷贝数，以获得产柠檬酸能力更强的菌株。在获得的转化株 30 中，*ACLI* 的转录水平和柠檬酸裂解酶酶活都降低了，*ICLI* 的转录水平和异柠檬酸酶活都提高了，脂肪和异柠檬酸含量都明显降低，并且柠檬酸产量也明显提高。在 2L 发酵体系中，以 10% 菊粉为底物，利用转化株 30 发酵柠檬酸，获得了 84.0g/L 柠檬酸，1.8 g/L 异柠檬酸，转化株 30 对菊粉的总糖利用率达到了 89.6 %^[7]。但是酵母类菌株发酵产物中，常常伴有异柠檬

酸的产生，不利于下游的柠檬酸纯化。

柠檬酸发酵方式分为 3 种：1) 利用青霉属和曲霉真菌的固态表面发酵；2) 利用曲霉真菌深层发酵；3) 固态培养、连续培养、和多级发酵。目前，商业上主要以淀粉为底物通过黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 发酵生产柠檬酸^[8]。黑曲霉发酵柠檬酸的过程主要包括：1) 利用培养基中的碳源；2) 经 EMP 途径后，积累柠檬酸；3) 柠檬酸由线粒体分泌至胞质；4) 柠檬酸由胞内分泌至培养基中。其具体过程总结如下：

1) 碳源利用的生化途径

葡萄糖的摄入主要依赖细胞膜上的两个葡萄糖的运输蛋白，但他们对葡萄糖的亲合度有差异。低亲合性的运输蛋白主要在高浓度的糖浓度下才启动。主要运输方式是被动扩散。黑曲霉发酵柠檬酸的最佳碳源为蔗糖。由于黑曲霉的细胞外有转化酶，因此可以催化蔗糖分解。而果糖的吸收往往是发酵的限速步骤。不过，柠檬酸的碳源不仅来自葡萄糖，还有甘油和赤藓糖醇，这分别是三糖和己糖的穿梭所致。

2) 生成柠檬酸的生化途径

黑曲霉 (*A. niger*) 是柠檬酸发酵的主要生产菌株。其代谢机理为：如图 1.1 所示，一分子葡萄糖经由 EMP 途径生成两分子丙酮酸，然后一份子丙酮酸氧化脱羧生成乙酰 CoA，另一分子固定 CO₂ 生成草酰乙酸，然后草酰乙酸与乙酰 CoA 生成柠檬酸。黑曲霉的初始 pH 一般为菌体的最适生长 pH 为 5.0-7.0。随着菌体的生长和氮源的消耗，培养基内的 pH 会迅速下降。当 pH 低至 2.0-2.5 的时候，乌头酸酶（红圈处）的活性降低，柠檬酸合成酶活性增加，从而柠檬酸得以积累^[9]。

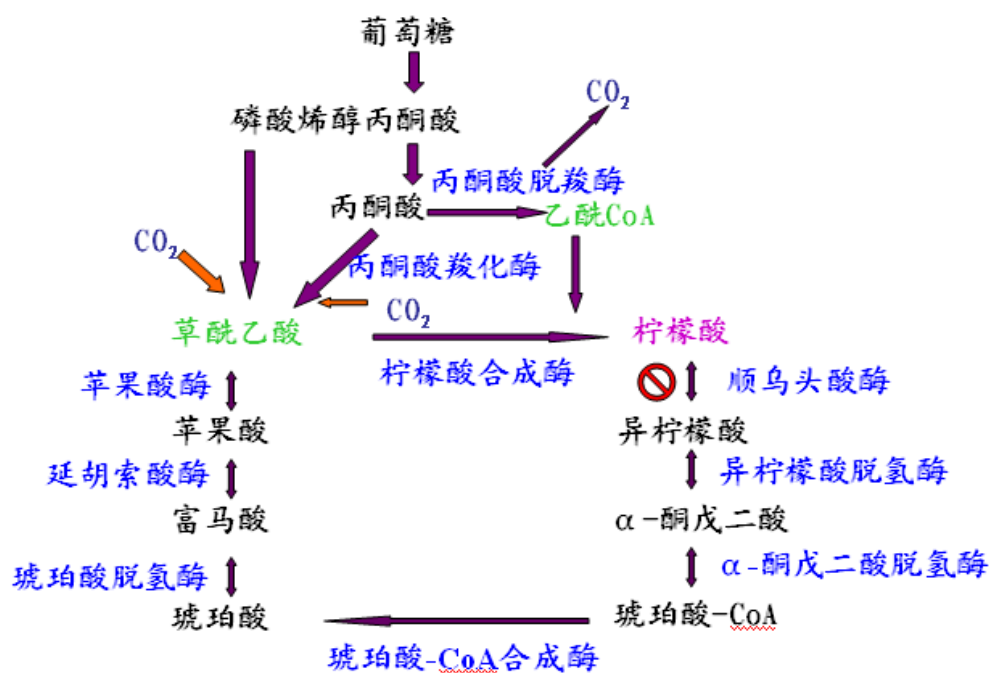


图 1.1 黑曲霉中柠檬酸生成途径

Fig. 1.1 Pathway of citrate fermentation in *A. niger*

3) 柠檬酸由线粒体分泌到细胞质的过程

柠檬酸由线粒体分泌到胞质中主要依靠线粒体膜上的三羧酸载体 (TCT)。EMP 途径生成的两分子丙酮酸, 其一直接进入了线粒体, 脱羧成乙酰 CoA; 另一个丙酮酸在胞质中羧化为草酰乙酸, 在还原为苹果酸, 经 TCT 载体进入线粒体内, 再氧化为草酰乙酸, 与进入线粒体内丙酮酸生成的乙酰 CoA 反应生成柠檬酸。而生成的柠檬酸又经 TCT 载体运出线粒体, 来到胞质中。实验证明, 当胞质和线粒体内的总苹果酸积累 6-12mM 时, 柠檬酸开始积累。此外, TCT 载体对胞内线粒体内的柠檬酸的亲和性大于对胞质中的苹果酸, 且 TCT 对二者的亲和性是顺乌头酸酶对柠檬酸亲和性的 10 倍以上。所以, 当胞质内苹果酸充足, 且胞内柠檬酸达到 1-5mM 时, TCT 便开始转运柠檬酸。不过, 当柠檬酸开始积累时, 黑曲霉体内的 TCA 循环并没有被抑制。

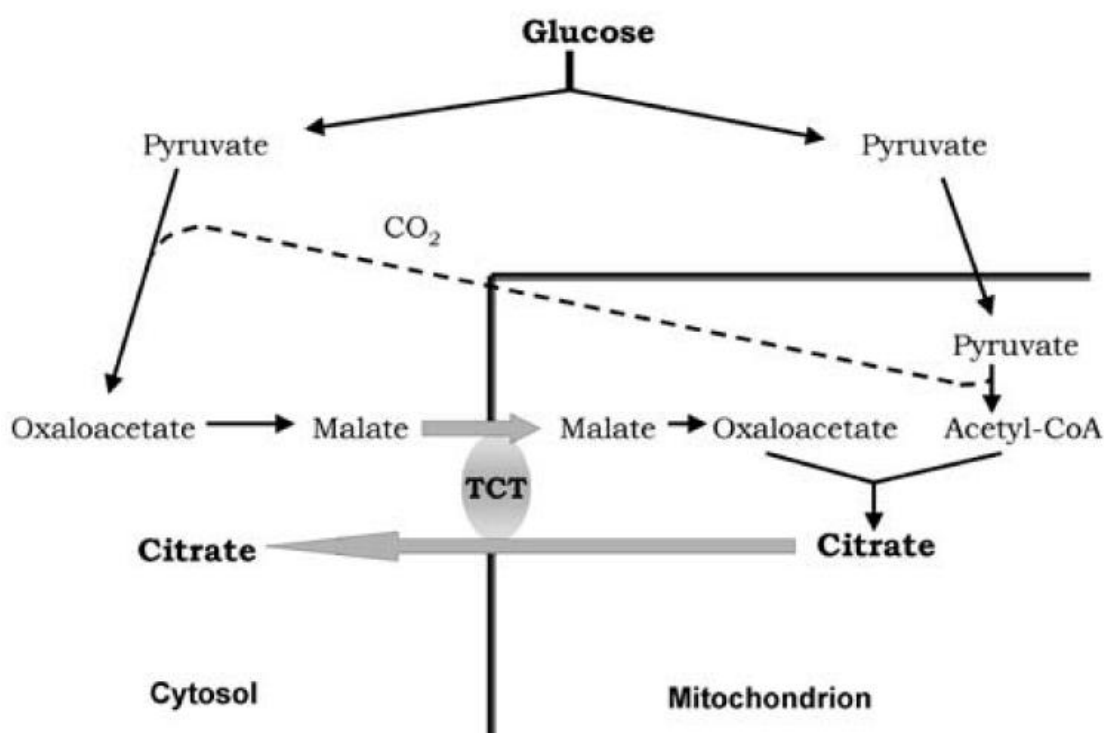


图 1.2 草酰乙酸的代谢分隔和柠檬酸积累过程中的作用(来自 *A. niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box. Appl Microbiol Biotechnol. 2003, 61(3):189-196)

Fig.1.2 Metabolic compartmentation of oxaloacetate formation and its role in citric acid accumulation (from *A. niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box. Appl Microbiol Biotechnol. 2003, 61(3):189-196)

4) 柠檬酸释放至培养基中的过程

Mn^{2+} 不足是柠檬酸转运至培养基中的关键。因为只要在 Mn^{2+} 不足时才能让柠檬酸转运至胞外, 同时由于细胞膜上的柠檬酸通透酶只能转运柠檬酸- Mn^{2+} 螯合物, 所以只有 Mn^{2+} 不足时, 柠檬酸才不会运输至细胞中。但其具体机制, 有待进一步探索研究^[9]。

1.1.3 柠檬酸生产现状

上世纪 70-80 年代,我国筛选了利用淀粉、薯干、玉米、蜜糖等原料的黑曲霉菌株,并且已经获得比较可观的发酵结果。黑曲霉 (*A. niger*) Co827 以麸曲培养孢子,甘薯干粉为底物,50m³ 发酵罐获得 14.96%的产酸率,103.5%的转化率,发酵周期 77.33 小时。黑曲霉 Co827 的诱变菌株黑曲霉 Co8-60-7 以淀粉原料为底物,经 6m³ 发酵罐连续 4 批发酵试验,平均产酸率 19.44%,平均转化率 93.72%,平均发酵周期 120h。黑曲霉 313 由野生黑曲霉 13-1 经反复理化方法处理得到,以糖蜜为底物,50m³ 发酵罐发酵 3 批,获得平均柠檬酸含量为 13.4%,转化率为 87.1%,发酵周期为 103 小时^[10]。

由于黑曲霉发酵需要消耗大量的糖,作为菌体生长和发酵的碳源。所以,利用传统的生产原料发酵柠檬酸,必然会消耗大量的粮食。为了节省资源,实现“不与人争粮”,合理利用农工业残留,所以,目前开发一种新的原料来代替传统的粮食原料是柠檬酸工业化生产改革的首要任务。

1.2 木质纤维素概述

1.2.1 木质纤维素结构

木质纤维素(生物质)是具有巨大潜能的可再生碳水化合物资源。它含量丰富、价格低廉和节能环保。农业残留是木质纤维素的重要来源。这样的来源包括:如来自谷物纤维、谷物甘草、甘蔗渣、米粒壳、木质庄稼、和森林残基等的树叶、树干和花梗。在工业和农业的过程中也有多种木质纤维素的浪费。如:柑橘果树果皮的浪费、锯末、纸糊、工业浪费、市政固体浪费和纸作坊的软泥、长期生长的草(switch 草和其他牛马饲料的原料)^[11]。

木质纤维素原料包括玉米秸秆、麦秸、稻草、棉杆、玉米芯及其残渣、木屑、能源植物或者林业废弃物、废纸,纸板,建筑和拆迁木材废料和庭院废物等^[12]。在玉米秸秆中,可发酵性的纤维素和半纤维素约占干重的一半以上。而且我国的秸秆资源丰富,年产量约为 7 亿吨,但是由于缺乏合理的利用模式,通常秸秆都是被焚烧掉的,从而造成了巨大的环境污染以及交通安全隐患。因此,利用含量丰富、价格低廉的的秸秆发酵柠檬酸,可显著降低柠檬酸生产成本,也减少了焚烧秸秆带来的环境和交通问题。

木质纤维素主要由三部分组成:纤维素、半纤维素和木质素。

纤维素是由 β -(1 \rightarrow 4)糖苷键链接而成的葡萄糖链。纤维二糖是纤维素的最小重复单位,并最终转化为葡萄糖。由 X 衍射结果显示,纤维素主要有结晶区、微纤维结构和无定形区组成。纤维素中一部分排列比较有规则的部分呈现较清晰的 X 衍射图,我们称之为结晶区。结晶区内的纤维素分子上的羟基与相邻分子上的含氧基团形成牢固的氢键,组成了结晶区。结晶的结构使纤维素表现出刚性,以及高度的水不溶性。纤维素中另一部分排列不整齐的,大致与纤维素主轴平行的部分称之为无定形区。介于二者之间的是微纤维结构。因此高效利用纤维素,必须破坏纤维素的结晶结构,使之结构松散,才能进行下一步的酶解反应。

除了纤维素,木质纤维素中可发酵的糖链还有半纤维素。半纤维素是异质的聚合物,半纤维素在结构和组成上变化很大。主要由戊糖(D-木聚糖、D-阿拉伯糖),己糖(D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖)和糖酸组成^[13]。各种糖所占比例随原料不同而变化,一般主要成分为木糖。在硬木材中,半纤维素主要包含木聚糖,然而在软木中目前主要是葡甘露聚糖。半纤维素的水解需要不同种类的酶。半纤维素结构排列松散,无晶体结构,比较容易被稀酸水解成单糖。

此外,木质纤维素的主要成分还有木质素。木质素是苯基丙烷结构单元由 C=C 键连接而成的复合的芳香聚合物。它氧含量低,碳含量较高。但是,木质素不仅可水解为单糖,而且其结构将纤维素包裹起来,会明显阻止纤维素的水解^[14]。

1.2.2 纤维素酶组成

利用纤维素酶水解木质纤维素是利用木质纤维素的必要条件。纤维素酶是一种复合酶,主要由外切 β -葡聚糖酶、内切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶等组成,还有很高活力的木聚糖酶活力。纤维素酶是由独立折叠、结构和功能分离的单位组成,叫做结构域或者模块化。一个典型的纤维素酶结构为由 C 端的碳水化合物结合结构域(CBD)通过一个短的多聚连接区域连接到 N 端的催化结构域。所有的纤维素酶的目标都是 β -1,4 糖苷键。通常描述纤维素酶的行为模式在于聚合物是外切或者是内切,有两个纤维素酶水解纤维素的效应模型。可分为:1)从链的末端切 β -1,4 糖苷键,以此为基础,归为外切作用的酶。外切酶往往有一个隧道形封闭活性中心,并保留一个单独的葡聚糖链,并防止再坚持纤维素的晶体。另一方面,葡聚糖内切酶通常被认为只从内部切 β -1,4 糖苷键似乎有裂形开放的活性中心。葡聚糖内切酶在纤维素的非结晶区域有活性,那么他们的活性通过可溶的纤维素底物进行测定,如:羧甲基纤维素酶测定(CMCase);2)葡聚糖外切酶被描述为对纤维素结晶区域有活性的酶,然而,葡聚糖内切酶是典型的对纤维素晶体更可溶的非结晶区域有活性的酶。葡聚糖外切酶和葡聚糖内切酶之间有高度的协调作用,正是这种协调作用导致了纤维素晶体的有效水解^[11,15,16]。

自然界中,从细菌到真菌,几乎都有可以降解纤维素的微生物。其降解纤维素的方式主要包括:1)由外部向内破坏;2)由内向外侵蚀。

降解纤维素的主要菌种是霉菌。一般霉菌随着菌丝的不断生长,由内向外来降解纤维素。细菌则是黏附在纤维素上,由纤维素外围开始生长,接触细菌的纤维素则被降解。这些纤维素降解菌都具有合成胞外纤维素酶的能力。利用分泌的纤维素酶对纤维素进行降解。甚至有少量的微生物合成纤维素酶簇可以水解纤维素结晶区。目前最主要的纤维素降解菌是木霉属 *Trichoderma* 的真菌,如 *T. reesei*, *T. iride*, *T. koningii* 和 *T. pseudokoningii*^[17,18]。

木质纤维素产品的优点:1)从多种原材料中生产 2)无毒 3)容易引进现存的基础结构。然而,可持续发展和经济可行性的生物燃料途径是受限制的。目前生产一些木质纤维素产品主要的瓶颈:首先,木质纤维素的工业生物转化需要应用高温和酸性或者碱性等预处理条件来降解木质素,降低结晶度,增加毛孔容量,使纤维素和半纤维素溶解

为可水解的多聚糖。这个过程花费昂贵而且效率很低。其次，预处理会生成抑制物，包括甲酸、乙酸等有机酸类化合物，糠醛、羟甲基糠醛等呋喃类化合物，香兰素、对羟基苯甲醛等酚类化合物等。这些抑制物会抑制后续的水解过程，以及对后续的发酵菌体产生生长和生产上的有抑制作用。所以，需要通过脱毒的方式来降解这些抑制物。再次，还缺少能在木质纤维素水解过程中高温和/或低 pH 条件下有效工作而且价格便宜的生物催化剂。此外，从纤维素和半纤维素衍生出糖的发酵过程也需要成本。

1.2.3 预处理

在木质纤维素的生物转化过程中的额外的限速步骤是纤维素的结晶顽固性和有限的纤维素酶的数量。然而，在所有能鉴别的可分泌的纤维素酶的菌株中，分泌的一种或多种糖苷水解酶（葡聚糖内/外切酶、 β -葡聚糖酶）酶活都很低。尝试提高木质纤维素生物转化为柠檬酸的可行性，酶必须有高吸附能力，高热稳定性和低终产物抑制作用。

然而，即使获得了高稳定性、高活性的纤维素酶，但是由于木质纤维素的结构（半纤维素和木质素通过共价键连接成网状结构，纤维素镶嵌在其网状结构中，形成了牢固的结构），所以，无法直接对木质纤维素进行水解。必须对木质纤维素先进行预处理，才能利用纤维素和半纤维素中的单糖^[19]。

预处理的目的是破坏木质纤维素的晶体结构，提高纤维素可及性。其本质是降解了木质素，降低了纤维素的结晶度。预处理方法包括稀酸预处理，蒸汽爆破，氨纤维爆破、液氨膨爆、亚硫酸盐预处理、碱法预处理、机械磨碎预处理、生物预处理等^[14]。

本文中利用的预处理方法为稀酸预处理法。这一方法是将稀酸和木质纤维素物料均匀混合，在 140-190℃ 的预处理反应器中反应几秒至几分钟。这一方法的不仅瓦解了木质素的结构，而且有效地分解了半纤维素，使纤维素水解为葡萄糖的效率大大地提高。但是半纤维素的降解会生成糠醛等抑制物，这些抑制物会对菌体的生长和生产，以及后续的水解有不同程度的影响^[19,20]。

1.2.4 抑制物及脱毒方式

抑制物主要分为三类：1) 呋喃类化合物，如糠醛（Furfural）、羟甲基糠醛（HMF）等；2) 有机酸类化合物，如甲酸、乙酸等；3) 酚类化合物，如：香草醛、丁香醛等。这三类化合物对菌体的生长和生产都有不同程度的影响^[21]。

呋喃类化合物对菌体的影响主要取决于菌体的遗传和代谢背景以及抑制物在培养基中的浓度。如：糠醛对 *Amorphothecaresinae* ZN1 而言是优先于葡萄糖的底物，但是对于大肠杆菌和酿酒酵母而言却是抑制其生长的抑制物。不过对于大部分菌体而言，呋喃类抑制物对其生长和生产都表现为抑制作用。如：糠醛和羟甲基糠醛通过对酿酒酵母的生长的抑制，增加了延滞期，使得乙醇的产量降低^[22]。羟甲基糠醛和苹果酸脱氢酶（MDH）的抑制效果类似，对大肠杆菌 DC1515 (pflA::Cam ldhA::Tn10 ptsG::Kan in wild type W1485) 生产丁二酸途径中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）有抑制作用，且抑制作用明显大于 MDH^[23]。

有机酸类化合物主要的抑制机理可能是导致胞内 pH 酸化所致。H⁺可能通过扩散进

入细胞膜,导致胞内的 pH 降低。也有可能当胞外酸浓度过高时,腺苷三磷酸酶(ATPase)无法泵出足够的质子来维持胞内的 pH,导致胞内 pH 降低。当乙酸和甲酸浓度分别由 0g/L 依次增加至 6g/L 时,对重组酿酒酵母 6508-127 的生长和乙醇产量以及葡萄糖的利用率的抑制作用都依次增加。乙酸降低了木糖的利用率,甲酸则完全抑制了木糖的利用^[22]。

酚类化合物主要包括甲酸、乙酸和乙酰丙酸等。用漆酶特定地去除酚类化合物时,预处理后木质纤维素的抑制作用大大地降低。而且,用稀酸预处理后的木质纤维素水解液中的抑制作用要远大于只含有弱酸、糠醛和羟甲基糠醛的发酵培养基。所以,酚类化合物时木质纤维素水解液中最主要的抑制物。用特定的方法去除低分子量的酚类化合物是降低抑制作用的有效方法,如:用漆酶处理^[23]。

脱毒方式很多,如:水洗、过碱化处理、减压蒸馏、离子吸附、活性炭脱色等等。但是这些方法却有很多的弊端。如:需要消耗大量的淡水、产生废水、木质纤维素颗粒和可发酵的糖的损失,以及抑制物脱毒不完全。如:水洗,是脱毒的常用方法之一,会损失大量的预处理后的木质纤维素颗粒,进而导致发酵产量的降低。而且,这样也会导致下游处理时产生大量的废水,浪费了大量的水资源。所以,需要一种更加有效的脱毒方式,克服以上脱毒方法带来的问题,同时增加脱毒的效率^[24]。

生物脱毒是一种可以克服以上问题的脱毒方式。主要依赖微生物来降解预处理后的木质纤维素中的抑制物。其优点为:不损失纤维素颗粒、明显降低了水用量、保证高估含量的物料可用于发酵。然而,目前的生物脱毒方式仅用于液体的水解液系统。本文中利用的是 *Amorphotheca resinae* ZN1 来降解玉米秸秆中的抑制物^[25]。

1.3 木质纤维素柠檬酸的生产工艺

1.3.1 生产木质纤维素柠檬酸的步骤以及瓶颈

利用粮食发酵柠檬酸会消耗大量的粮食,原料成本较高。而利用玉米秸秆等木质纤维素物料具有廉价、含量丰富、可再生等特点。工业上将木质纤维素转化为柠檬酸的生物转化过程需要许多步骤,首先,要在高温和酸性或者碱性条件下预处理玉米秸秆。其次,由于预处理后会生成抑制物,这些抑制物会抑制后续的水解过程,以及对后续的发醇菌体产生生长和生产上的抑制。再次,添加水解酶(糖化),使纤维素和半纤维素降解为单糖。最后,添加能够发醇的微生物至糖化液中。

但是利用木质纤维素为原料的柠檬酸发醇还处于研究的初级阶段,相关报道也较少。木质纤维素柠檬酸产量与以淀粉、木薯为底物的产量存在一定的差距,尤其是深层木质纤维素深层发醇柠檬酸的结果。张建安等人以麦草纤维素酶解液为原料,利用黑曲霉(*Aspergillus niger* Van Tieghem)发醇柠檬酸,发醇周期为 104h,获得柠檬酸 10.52g/L,糖转化率为 60.80%^[26]。Gurpreet Singh Dhillon 等利用黑曲霉 NRRL567 (*Aspergillus niger* NRRL567)在苹果渣超滤沉淀物-1 (APS-1、悬浮颗粒 45±5 g/l)、苹果渣超滤沉淀物-2 (APS-2、悬浮颗粒 80 g/l)、乳清 (LS)、市政污泥 (MSS)、淀粉工业水 (SIW) 中,

筛选了最适合用于深层发酵的底物为 APS-1, 经 3%乙醇诱导后, 获得柠檬酸产量为 $18.2 \pm 0.4 \text{ g/L}$ ^[27,28]。固态发酵方面, K.Hariveeran Goud 等人从被水果废弃污染的土壤中筛选获得的黑曲霉菌株, 并利用该菌株以甘蔗渣为底物, 固态发酵获得 24.9 g 柠檬酸/kg 甘蔗渣^[29]。农业残留香蕉皮也可作为原料, 用于生产柠檬酸。发酵 72h, 获得了最高的柠檬酸产量约 180g/Kg d.wt ^[30]。综上所述, 或许由于未筛选得到合适的生产菌株, 或许因为没有利用适合的底物, 或者由于没有合适的工艺, 木质纤维素柠檬酸产量明显低于已工业化的淀粉类柠檬酸的发酵产量。

此外, 目前生物提炼的多样性既耗费时间, 成本又高。利用以途径为基础的全细胞, 将糖化和发酵的过程结合起来, 叫做加固的生物过程 (CBP) 或者糖化共发酵 (SSF), 发酵和水解的成本也可以降低^[11]。

1.3.2 优化柠檬酸生产的技术及工艺

1) 筛选或者诱变黑曲霉

可以生产柠檬酸的黑曲霉种类繁多。由于发酵方式和使用原料的不同, 采用的菌种也不同。适合用于糖蜜发酵的菌种则有黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 川柠 19-1、19-53、 γ -144 等等, 而使用于薯干粉和木薯粉发酵的菌种则有黑曲霉 (*Aspergillus niger*) N-558、D353、5016 等。黑曲霉适合用于糖蜜和淀粉类物质的发酵, 而烷烃类物质则更适合酵母发酵^[10]。所以, 不同的原料, 适合发酵的菌种不同。要筛选出合适的菌株用于发酵, 才能获得可观的柠檬酸产量。

此外, 严格的菌种诱变筛选、物化条件的优化可以实现柠檬酸发酵产量的提升。黑曲霉菌种诱变的手段主要有单独的诱变剂诱变和复合诱变等。主要的诱变因子包括亚硝基胍 (NTC) 和硫酸二乙酯 (DES) 等诱变剂、和 γ -射线和紫外线等射线、以及一些激光和离子注入等^[31]。黑曲霉菌株 (*A. niger* LPB BC) 经紫外诱变筛选出产酸能力更强的突变菌株, *A. niger* LPB B6。原始菌株获得的最高柠檬酸产量为 445.4 g CA/kg CP 。经紫外诱变后, 获得 *A. niger* LPB B3 和在发酵第 6 天获得了 537.6 g CA/kg CP , *A. niger* LPB B6 在发酵第 4 天获得了 616.5 g CA/kg CP 。与原始菌株相比分别提高了 19.5% 和 37%^[32]。*A. niger* GCB-75 为原始菌株, 经紫外诱导和 MNNG (N-N-甲基-N-硝基-亚硝基胍) 化学诱变后, 得到一株较好的柠檬酸生产菌株 GCM-45, 柠檬酸产量由 31.1 g/L 提高 $96.1 \pm 1.5 \text{ g/L}$ ^[33]。

本文中利用的黑曲霉 SIIM M288 (即黑曲霉 *A. niger* Co827) 也是一株经诱变后筛选获得的菌株。上海工业微生物研究所从土壤中经酸性平板分离获得的野生黑曲霉 628 作为出发菌株, 经多次 Co- γ 射线和硫酸二乙酯等复合诱变, 获得了高产柠檬酸菌株 Co827 (即黑曲霉 *A. niger* SIIM M288)。该菌株可直接利用薯干粉发酵, 产酸达 12-13%, 平均转化率为 95%, 发酵周期 54-64 h, 发酵指数 $1.8-2.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ h})$ 。朱亨政等利用 Co- γ 射线反复处理黑曲霉 Co827, 获得变异株黑曲霉 Co8-60-7。经过连续 5 批 6m^3 发酵罐中间试验, Co8-60-7 平均产酸为 19.05 %, 转化率为 95 %, 发酵周期 117.8 h, 生产产酸稳定在 18 % 以上, 发酵周期 79h, 转化率 97.2 %^[31]。

2) 适当优化培养基或者原料的组分

黑曲霉的生长和发酵对环境的要求都比较苛刻,碳源、氮源、离子浓度、粘度、通氧量都得控制在一定范围内,过多过少都会影响柠檬酸的发酵。比如:黑曲霉(*A. niger* NRRL567)无法在淀粉工业水中产量较低,就是因为淀粉工业水中的金属离子含量较高,影响柠檬酸的积累。但是,往往在这些原料中添加一些物质,即可使黑曲霉利用原料中的营养成分。在固态发酵时,培养基中加入螯合剂,或者亚铁氰化钾,或者肌醇六磷酸可以降低高浓度的金属离子对菌体的副作用,使产量明显增加。另外,加入一些碳源,可以促进黑曲霉对原料底物的利用。以橘子皮为原料的培养基中,加入 14% 甘蔗蜜,以及分别加入 EDTA 和亚铁氰化钾后,使柠檬酸产量由 350 g CA/kg OP 左右增加至 517 g CA/kg OP 和 515 g CA/kg OP^[34]。

木质纤维素具有牢固的网状结构。只有通过预处理将木质纤维素牢固的网状结构破坏,才能使纤维素酶与纤维素进行反应。此外,稀酸预处理后,由于半纤维素的降解会产生大量的抑制物,而这些抑制物会影响菌种的生长和发酵。所以,发酵前,必须将木质纤维素物料进行预处理和脱毒,破坏牢固的网状结构和除去抑制物,才能更好地利用木质纤维素。

以下为培养基的组分对黑曲霉生产柠檬酸影响因素:

a) 碳源

当糖浓度低于 50 g/L 时,柠檬酸不能积累。高柠檬酸浓度对磷酸果糖激酶有明显抑制作用,但高浓度的糖、以及 NH_4^+ 、AMP 可以解除这种抑制^[35]。

黑曲霉具有胞外的菌丝的转化酶,所以蔗糖比葡萄糖更适合作为碳源^[36]。最适浓度一般为 14-22%,其高浓度可抑制 α -酮戊二酸脱氢酶。

黑曲霉的可利用碳源很多,麦芽糖、蔗糖、葡萄糖和甘露糖都可作为发酵高浓度柠檬酸的碳源,甘露糖和蔗糖这两双糖相对葡萄糖和果糖更适宜作为发酵的碳源。除了葡萄糖的最适浓度为 7.5% (w/v),其余糖合适的浓度为 10% (w/v)。而且,当培养基内的糖浓度低于 2.5% (w/v) 时,柠檬酸不再积累。在以木糖、山梨醇、淀粉、乙醇、阿拉伯糖、丙酮酸为碳源的培养基内,菌体生长出现明显的延滞。而且黑曲霉不可利用乙酸和半乳糖为碳源为碳源,因为当 pH 低于 4.5 时,乙酸具有毒性^[37]。半乳糖还影响了葡萄糖一直 α -同戊二酸脱氢酶。所以,单独用乳清作为碳源并不可行^[38,39]。

工业上常用的碳源是从淀粉水解液中的葡萄糖浆。此外,国外一些实验室也已成功利用啤酒厂废液(BSL)和苹果渣超滤沉淀物(APS)等工业残留来生产柠檬酸^[40]。此外,以酸处理过的甘蔗和甜菜糖浆为原料,可以实现 74.32 g/L 和 75.14% 的柠檬酸,以及 32.99 g/L 和 34.17% 蛋白^[22]。乳清中的主要碳源为半乳糖,以此为碳源的代谢产物会一直柠檬酸的积累,而且降低葡萄糖的利用率。此外,半乳糖还影响了葡萄糖一直 α -同戊二酸脱氢酶。所以,单独用乳清作为碳源并不可行。利用黑曲霉(*A. niger* ATCC9642),在添加 15% (w/v) 的蔗糖,实现面发酵柠檬酸。表面发酵 20 天,得到 83.7 mg/L 柠檬酸,糖耗 137.8 g/L^[38]。

b) 氮源和磷酸盐的限制

常用的氮源为铵离子，特别是硫酸铵和硝酸铵，铵离子的添加也是使培养基 pH 下降的原因。限制磷酸盐是柠檬酸积累的必要条件，过多的磷酸盐会导致二级反应和菌体的过度生长。

c) 微量元素

黑曲霉的生长需要微量元素，而限制微量元素对发酵而言又是非常必要的。 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 的最适浓度分别为 0.3 和 1.3 ppm。当 Mn^{2+} 缺少以及氮源和磷酸盐的限制，才会影响黑曲霉的合成代谢。在缺失的情况下，蛋白降解会细胞内的高浓度的铵离子解除对磷酸果糖激酶抑制，进而进行糖酵解。 Mn^{2+} 对细胞壁的合成、孢子合成、二级代谢产物的生成有重要作用^[28]。 Cu^{2+} 不仅对菌体生长极为重要，而且也影响真菌的孢子形成。但是， Cu^{2+} 浓度过高也会对菌体生长产生毒性，影响菌体代谢和柠檬酸生产。当添加 30ppm 的硫酸铜时，比生产速率 Q_p 是其他浓度的几倍，为 $0.012 \text{ g / g cells/h}$ ^[41,42]。

d) 诱导物

甲醇或乙醇等低级醇的少量添加（约 1-5% (v/v) 左右）可以增加柠檬酸的产量。甲醇不可作为碳源，被黑曲霉所利用。目前推测甲醇可能抑制 α -酮戊二酸脱氢酶酶活，增加柠檬酸穿过细胞膜能力，使胞内柠檬酸更多地分泌到胞外。另外，有实验证明，乙醇对柠檬酸产量提高的原因主要在于对培养基内碳源的增加^[43-45]。

3) 发酵条件的优化

由于黑曲霉对培养基内组分的浓度、培养条件与环境都有细腻的要求，只有严格控制各项指标都在最佳范围内，才能获得高产的柠檬酸。所以，对发酵条件进行一定的优化是十分必要的。

以下为发酵条件对黑曲霉生产柠檬酸影响因素：

a) 温度

虽然黑曲霉发酵柠檬酸的温度一般在 28-37℃ 内，但是在一定条件下，温度的微小变化也会导致产量的明显变化。

b) pH

发酵过程中要求 pH 存在两个阶段。发酵开始要求 $pH > 5$ ，以保证孢子的生长。生长中的孢子吸收了铵离子，释放了 H^+ ，讲了了 pH，促进了柠檬酸的发酵。第二阶段维持 $pH \leq 2$ ，以抑制其他费目的性的酸的污染，也使后期回收更方便。

黑曲霉有两条呼吸链：主呼吸链和侧呼吸链。当侧呼吸链氧化 NADH 时，细胞膜上的 ATP 酶消耗 ATP。而低 pH 值可以启动 ATP 的合成，否则会引起代谢不平衡和停止酸化。低 pH 值也抑制了葡萄糖酸和草酰乙酸等副产物的形成^[46]。

c) 通气

适量的氧气可以提高产量。当柠檬酸开始发酵时，主呼吸链的活性降低，侧呼吸链的活性增加。侧呼吸量的作用是去除过量的还原当量。因为从糖转化为柠檬酸的过程中会产生 1 分子的 ATP 和 3 分子的 NADH。细胞不需要这么多的 ATP，因此，就将住呼

吸链转化为侧呼吸链来氧化 NADH，同时也不产生 ATP^[47]。

在通气超过 3% 的 CO₂ 时，提高 CO₂ 的同时，生物质和柠檬酸浓度将减少，底物消耗也降低，从而降低产量。形态上，提高 CO₂，与菌体形态也随着发生变化。时间越长，这种效果越发明显。可能是对在柠檬酸合成途径中的关键酶的特异性产生了作用^[47]。但通气过多，CO₂ 分压太低，而 CO₂ 是丙酮酸羧化酶的重要底物。相反，过多的 CO₂ 会对柠檬酸产量和菌体有危害。如果在发酵过程中通入短期的 O₂ 也能改变柠檬酸的产量。

4) 同步糖化与发酵

分步糖化与发酵，即将先添加糖化酶，水解物料，获得具有单糖的水解液。然后，再加入菌种，利用水解液中的单糖，进行发酵。张建安等人将麦草经碱-氧-蒽醌燕煮后，再添加维素酶酶解后制得纤维素酶解液作为原料，利用黑曲霉 (*A. niger Van Tieghem*) 发酵柠檬酸，发酵周期为 104h，获得柠檬酸 10.52g/L，糖转化率为 60.80 %^[26]。

同步糖化与发酵，即在将糖化酶、菌体和物料同时加入至反应器中，糖化酶催化糖链水解的同时，菌体利用释放出的单糖进行发酵。此外，在淀粉原料中，黑曲霉还能实现不添加额外的淀粉酶，依靠黑曲霉胞外的水解酶水解淀粉，然后在利用水解后的单糖进行发酵。石忆湘等经紫外和亚硝基胍多次诱变，筛选得到变异株 *A. Niger 95*。此菌株利用淀粉为底物时，即可不加额外的酶，糖化淀粉，同时生产柠檬酸^[48]。发酵过程分为三分阶段：1) 0-40 小时的第一阶段，此时还原糖含量快速增加，柠檬酸有不积累到开始缓慢积累；2) 40-110 小时，还原糖迅速消耗，柠檬酸迅速积累；3) 110 小时以后，还原糖缓慢消耗，柠檬酸生产速率明显降低。

很多不同的微生物可以产胞外的纤维素酶，特别是霉菌。纤维素酶包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、和 β-葡萄糖苷酶。此外，木聚糖酶对于降解半纤维素中的木聚糖起到了关键作用。黑曲霉可以分泌大量的纤维素酶，并且可以有效地水解木质纤维素生物质。纤维素的糖化要求内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的协同作用。葡聚糖内切酶水解纤维素内部暴露的还原和非还原端的位点。葡聚糖外切酶作用于还原和非还原末端，释放纤维二糖和纤维寡糖。β-葡萄糖苷酶再水解纤维二糖，释放可发酵的糖。黑曲霉具有高产 β-葡萄糖苷酶的能力，这是水解纤维素底物的至关重要。此外，添加了 CuSO₄ 和藜芦醇后黑曲霉 NRRL-567 的 FPase 和 BGL 酶活分别提高至 133.68±5.44 IU/g 干底物和 60.09 ±3.43 IU/g 干底物。添加乳糖后，CMCase 提高到 172.31±14.21 IU/g 干底物。添加藜芦醇后，木聚糖酶也在 72 小时后提高到 1412.58±27.9 IU/g 干底物。所以，黑曲霉是具备同步糖化的条件的^[48]。在特定条件下，或许可以不添加纤维素酶，实现同步糖化和发酵。

但是由于糖化最适条件和发酵最适条件很难完全吻合，所以，同步糖化和发酵的条件需要进行进一步的探索。如果二者的条件实在相差太大，可以先进行预糖化。即将物料和水解酶预先加入反应器中反应，待糖化至一定阶段后，再加入菌体，利用糖化后的单糖，进行发酵。陈小真以 30% 玉米粉为原料，加入 α-淀粉酶 50℃ 糖化 60 分钟后，再利用黑曲霉 NF-2，进行柠檬酸发酵，发酵产酸可达 17 % 柠檬酸^[49]。

1.4 选题依据和研究思路

柠檬酸是生物体主要代谢产物之一。广泛应用于食品、医药、化工等领域。目前，商业上主要利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*)，以淀粉类粮食为底物发酵生产柠檬酸，转化率一般都高于 70%，较好的黑曲霉可以实现 95 % 以上的转化率。但是传统柠檬酸发酵，需要消耗大量的粮食为底物。所以，为了节省粮食，降低成本，考虑以农业残留或者工业废弃物为原料，来发酵生产柠檬酸。木质纤维素富含可利用的纤维素和半纤维素成分，是柠檬酸生产底物的首要选择。

但是利用木质纤维素为原料的柠檬酸发酵还处于研究的初级阶段。发酵获得的柠檬酸产量都较低，这成为木质纤维素柠檬酸工业化生产的主要瓶颈。张建安等人以麦草纤维素酶解液为原料，利用黑曲霉 (*A. niger Van Tieghem*) 发酵柠檬酸，发酵周期为 104h，获得柠檬酸 10.52g/L，糖转化率为 60.80 %^[26]。Gurpreet Singh Dhillon 等利用黑曲霉 (*A. niger* NRRL567) 在苹果渣超滤沉淀物-1 (APS-1、悬浮颗粒 45 ± 5 g/L)、苹果渣超滤沉淀物-2 (APS-2、悬浮颗粒 80 g/L)、乳清 (LS)、市政污泥 (MSS)、淀粉工业水 (SIW) 中，筛选了最适合用于深层发酵的底物为 APS-1，经 3% 乙醇诱导后，获得柠檬酸产量为 18.2 ± 0.4 g/L。

本文以玉米秸秆为原料，通过菌株筛选和对原料组分以及发酵条件的优化，实现玉米秸秆水解液中高浓度的柠檬酸积累。研究的主要内容包括：

首先，要筛选出适合在玉米秸秆原料中适合生长和发酵的菌株，如果无法筛选出合适的菌株，可以通过诱变等方式，获得更合适的候选菌株。

其次，对原料进行处理，对其中的组分进行优化。去除对菌体生长和发酵不利的因素，添加利于发酵的因素。

最后，对菌株在玉米秸秆水解液中的发酵条件进行优化。

第2章 材料与方法

2.1 菌体、试剂及仪器设备

2.1.1 菌株

本文作用菌种黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M203, 即黑曲霉 *Aspergillus niger* D353; 黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288, 即黑曲霉 *Aspergillus niger* Co827; 黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M228, 即黑曲霉 *Aspergillus niger* 3008-30, 均购自上海工业微生物研究所。

2.1.2 试剂

见表 2.1

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
一水葡萄糖	工业级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
NH ₄ Cl ₂	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
KH ₂ PO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MgSO ₄ ·7H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
CuSO ₄ ·5H ₂ O	CP	国药集团化学试剂有限公司
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	CP	国药集团化学试剂有限公司
FeSO ₄ ·7H ₂ O	AR	国药集团化学试剂有限公司
MnCl ₂	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
NaOH	AR	Shanghai Titanchem.co.,Ltd.
琼脂粉	AR	北京普博欣生物科技有限公司
葡萄糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
木糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
四环素	T3383-25g	Sigma 公司
糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠醛	AR	上海德默医药科技有限公司
糠醇	CP	上海金山亭新化工试剂厂
5-羟甲基糠醇		上海德默医药科技有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	美国 Johnson Matthey
香草醛	AR	阿拉丁试剂有限公司

2.1.3 培养基

1) PDA 斜面和平板

将土豆去皮, 称取 200g 土豆, 将其切块, 加水煮烂 (约 30 分钟左右, 能被玻璃棒戳破即可)。冷却后用 8 层纱布过滤, 去离子水定容至 1000ml, 加入 20g 葡萄糖和 1.5-2.0% 琼脂。加热融化琼脂, 分装指培养基中。115℃ 灭菌 20 分钟, 冷却。

2) 种子培养基

一水葡萄糖 70 g/L; KH_2PO_4 2.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.236mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.45 mg/L; MnCl_2 3.6 mg/L。

3) 合成培养基

一水葡萄糖 100 g/L; KH_2PO_4 2.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.236mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.45 mg/L; MnCl_2 3.6 mg/L。

4) 水解液发酵培养基

固含量为 25% 的脱毒玉米秸秆, 经 10 天脱毒后, 制得的水解液中添加 NH_4Cl 2.5; KH_2PO_4 2.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.236mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.45 mg/L; MnCl_2 3.6 mg/L。

2.1.4 实验仪器

本文所述的实验仪器如表 2.2 所示。

表 2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	型号	生产厂家
落地恒温振荡摇床	HZ-2111K-B	太仓华利达
小型气浴摇床	SHZ-82	太仓华利达
水浴恒温摇床	HZ-9212S	太仓华利达
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
水槽	ZC	宁波天恒
恒温振荡器	HZ-9211K	太仓华利达
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
大型超高速离心机	J-26	Beckman 公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司
循环水真空泵	SHZ-D(III)	上海大研仪器有限公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
蒸汽发生器	DZfz.5C1	上海蒸源机电
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
电子天平	BS423S	北京赛多利斯

超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司

2.2 实验方法

2.2.1 菌种保藏

将斜面上的孢子，用无菌水洗下。与 60 % 甘油等体积混合，取 2ml 加入冻存管，进行保藏。液氮速冻，然后保存入-80℃冰箱待用。

2.2.2 菌种活化

取 200 μ l 保藏的孢子液，涂布与 PDA 平板上，倒置培养 3-4 天。待平板上长出黑色的孢子，再用接种针，将平板上的孢子划线至 PDA 斜面，棉花封口，培养 5-7 天，黑曲霉 *A. niger* SIIM M203 和黑曲霉 *A. niger* SIIM M288 的培养温度为 28℃，黑曲霉 *A. niger* SIIM M228 的培养温度为 37℃。

2.2.3 玉米秸秆预处理及评价测定方法

2.2.3.1 预处理条件

将玉米秸秆物料装入洗衣袋中，放入洗衣机内机洗（洗衣机设置：棉麻，43min）。然后用自来水手动漂洗，再装入洗衣袋中，放入洗衣机内脱水。然后将其铺在阴凉处晾干，晾干后用粉碎机粉碎，再放入烘箱中烘干。

固液比 (w/w) 为 2:1，加入 5% (w/w) 的稀硫酸，搅拌均匀后，填入预处理反应器中进行预处理，温度为 190℃、压力为 1.2 MPa，维持 3 分钟。

2.2.3.2 两步酸解法测定纤维素和半纤维素的含量

1) 测定样品中的含水量

先称量干的空平板的质量，在平板上加入一定质量的木质纤维素原料，并称量物料和平板的总质量，放于 105℃烘箱内烘至质量不变为止（一般 12 小时），再称量平板和干物料的总质量

固含量 $S_c = (\text{干物料和平板的总质量} - \text{空平板的质量}) / (\text{湿物料和平板的总质量} - \text{空平板的质量}) * 100\%$

含水量 $W_c = (\text{湿物料和平板的总质量} - \text{干物料和平板的总质量}) / (\text{湿物料和平板的总质量} - \text{空平板的质量}) * 100\%$

2) 测定样品中的不溶性固体含量

称取一定质量的木质纤维素原料（一般为 5 g）于 250 ml 摇瓶中，加入 50 g 去离子水，于 30℃、180 rpm 溶解 2-3 小时。再进行抽滤（其滤纸已烘干，称取其质量）。然后，

将布市漏斗内的滤纸和固体一同置于平板上(实现称量烘干后的平板质量),放入 105℃ 烘箱内烘 12 小时。然后取出放入干燥器中冷却至常温,再称重。

不溶性固体含量为 $WIS = (\text{烘干的滤纸和不溶性固体} - \text{干平板质量} - \text{干滤纸质量}) / \text{原料质量} * 100\%$

3) 测定样品中纤维素和半纤维素的含量

(1) 称取 100 mg 样品中的不溶性物料于有塞子的试管中,加入 1 ml 72% 浓硫酸,再 30℃ 恒温水浴槽内反应 60 分钟,过程中不时用玻璃棒搅拌。

(2) 加入 28 ml 去离子水,盖紧封盖后,并用纱布绑紧塞子后,混匀后,然后置于灭菌锅中,121℃ 反应 60 分钟。

(3) 取出试管并混匀反应液,取 5ml 反应液于试管中,加入碳酸钙粉末进行中和,至不产生 CO₂ 气泡为止。

(4) 取样,10,000 rpm 离心 5 分钟后,取上清液,稀释过滤后利用 HPLC 分析组分,测定葡萄糖和木糖的浓度,并用葡萄糖和木糖的标准曲线的进行校正。

4) 计算

纤维素含量 $Cellulose = [(n * C_g * 0.029 * k_1 / 1.111) / 0.1] * (WIS / Sc) * 100\%$ (2-1)

其中, Cellulose 为木质纤维素原料中纤维素的含量, %;

C_g 为经 HPLC 测得的葡萄糖浓度, g/L;

n 为 HPLC 测定时的稀释倍数;

Sc 为预处理物料的固含量, %;

WIS 为水不溶性固含量, %;

k_1 为葡萄糖校正系数;

0.029 为 HPLC 测定时单糖的体积。

半纤维素含量 $Hemi = [(n * C_x * 0.029 * k_2 / 1.136) / 0.1] * (WIS / Sc) * 100\%$ (2-2)

其中, Hemi 为木质纤维素原料中半纤维素的含量, %;

C_x 为经 HPLC 测得的葡萄糖浓度, g/L;

n 为 HPLC 测定时的稀释倍数;

Sc 为预处理物料的固含量, %;

WIS 为水不溶性固含量, %;

K_2 为葡萄糖校正系数;

0.029 为 HPLC 测定时单糖的体积。

2.2.3.3 木质纤维素生物质的酶水解评价

1) 测定木质纤维素原料中的固含量,方法同上 2.2.3.2

2) 测定木质纤维素中纤维素含量,方法同上 2.2.3.2

3) 计算样品的用量

称取干重为 0.5 g 木质纤维素样品于 100 ml 摇瓶中

实际要称重的木质纤维素样品的重量 = 0.5g / 固含量 (%)

4) 各溶液的添加量

(1) 酶用量

规定加入的酶量 20 FPU/gDM (样品干重)。

配置纤维素酶母液, 已知纤维素滤纸酶活为 135FPU/g, 配置成 13.5FPU/mL 的纤维素酶母液, 那么纤维素酶母液的加入量=20 FPU/ gDM*0.5g (木质纤维素干重) /13.5 FPU/mL=0.74 mL

(2) 去离子水用量

去离子水的用量 (mL)=20 mL - 实际要称重的木质纤维素样品的体积 mL - 0.74mL (加入的纤维素酶母液体积) - 10 mL (柠檬酸缓冲液体积) - 0.08 mL (四环素体积)

(3) 对于 20ml 的反应体系, 每个摇瓶中添加 10ml 的柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.8), 80 μ l 四环素溶液 (10 mg/mL)。

(4) 对于酶空白实验, 纤维素酶体积用去离子水代替, 使总体积仍然为 20 mL。

5) 酶解反应条件: 硅胶塞赛紧摇瓶, 50°C 水浴摇床中, 150 rpm, 振荡 72 小时。

6) 取样, 用 HPLC 测定其葡萄糖浓度。

7) 计算

酶水解效率=[水解液中葡萄糖浓度 (g/L) *水解液体积 (L) /纤维素转化为葡萄糖的系数]/[样品干重 (g) *纤维素含量 (%)]

其中, 纤维素转化为葡萄糖的系数为 1.111

水解液体积为 0.02L

2.2.4 脱毒步骤

将静置培养 3 天的脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 斜面接入盛有 200 g 稀酸预处理后且 pH 调整至 6.0 的玉米秸秆的生物脱毒反应器中, 维持 25°C、60%的湿度进行脱毒共培养 3 天; 将上述脱毒共培养的 200 g 秸秆接入盛有 2000 g 稀酸预处理后且 pH 调整至 4.8-5.5 的玉米秸秆的生物脱毒反应器中, 维持 25°C、60%的湿度进行脱毒共培养 10-12 天; 脱毒后将物料保存于-20°C 冰箱中待用。

2.2.5 水解液制备

固体含量为 25%, 酶量为 15 FPU/ g DM, 温度为 50°C, pH 为 4.8, 糖化 48 小时后, 经离心 (13000 rpm, 10 分钟) 后过滤获得水解液。

2.2.6 接种方法

孢子发酵: 用无菌的培养基或者无菌水洗下斜面上的孢子, 用血球计数器计算孢子数量, 每 50ml 培养基中接入 1ml 孢子液 (孢子浓度约 1.0×10^7 - 1.0×10^8 个/ml)。

菌体发酵: 用无菌的培养基或者无菌水洗下斜面上的孢子, 用血球计数器计算孢子数量, 每 50ml 种子培养基中接入 1ml 孢子液 (孢子浓度约 1.0×10^7 - 1.0×10^8 个/ml)。28°C, 200rpm, 培养 36 小时。再以 10% (v/v) 的转接量接入发酵培养基。

2.2.7 发酵条件

250 ml 的三角瓶作为反应器, 装液量为 50 ml / 250 ml, 转速为 200rpm。合成培养

基内的最适发酵温度为 28℃，水解液培养基内的最适发酵温度为 33℃。

2.2.8 样品处理

发酵过程中每隔 24 小时去一次样，样品处理后，对样品进行高效液相色谱 HPLC (Bio-radHPX-87H 色谱柱) 测定。

2.3 分析方法

2.3.1 葡萄糖、木糖、柠檬酸、糠醛和羟甲基糠醛浓度测定

发酵过程中取得样品经 13,000 rpm，离心 5 分钟后，取上清。经稀释后，用 0.22 μm 的滤膜过滤样品。然后用高效液相色谱进行浓度的测定。所使用的 HPLC 型号为 LC-20AD，检测器为 RID-10A 示差检测器，层析柱为 Bio-Rad AminexHPX-87H。色谱的测定条件为：柱温 65 oC，流动相为 5 mM H₂SO₄，流动相的流速 0.6 mL/min。在一定条件下，可以根据色谱报告上出峰的时间来定性，根据出峰的峰面积来定量。根据各标准溶液在色谱报告上的出峰面积制得该物质的标准曲线，进而获得浓度和峰面积的线性关系。待测样品在该位置测得的峰面积即可根据该公式，计算得到该物质的浓度。

2.3.2 菌体干重的测定

在 60℃烘箱中烘培养皿和 0.22 μm 的滤膜 12 小时，并测定其重量。将摇瓶中的菌体抽滤，再在 60℃烘箱中烘 12 小时。再测定其重量。二者之差，即为菌体的干重。

2.3.3 柠檬酸产量和转化率的计算

柠檬酸产量 (g/L) = 发酵过程中最高浓度的柠檬酸 (g/L) - 初始的柠檬酸浓度 (g/L)

柠檬酸的转化率 (%) = [柠檬酸产量 (g/L) / 初始的总糖 (g/L)] * 100%

其中，初始的总糖 (g/L)：合成培养基——葡萄糖 (g/L) 总量

秸秆水解液——葡萄糖 (g/L) + 木糖 (g/L) 总量

第 3 章 结果与讨论

3.1 鉴定候选菌株的产酸能力

从上海工业微生物研究所购买了三株黑曲霉菌株，分别是黑曲霉 SIIM M203、SIIM M288、SIIM M228。首先鉴定这三株菌株是否具备生产柠檬酸的能力。将菌株的孢子液接种于葡萄糖合成培养基和 15% 脱毒秸秆水解液内，察看是否能够积累柠檬酸。

除了培养基内分泌出高浓度的柠檬酸之外，还可以通过菌体的形态来判断该菌株是否产生了大量的柠檬酸。在深层发酵时，高产柠檬酸菌株能形成大量的细小菌球体，直径约为 0.1-0.5 mm。此外，高产柠檬酸菌株对高浓度的糖和高浓度的金属离子的耐受性都很强。从细胞层面讲，菌丝体内含有低水平的甘油三酯和磷酸酯，蛋白和核酸水平低，但是在生长和繁殖期内氨基酸水平较高。不产 ATP 的侧呼吸链活性很强^[10]。

本实验将孢子直接接种于发酵培养基（合成培养基、15% 脱毒玉米秸秆水解液）内进行发酵。

3.1.1 黑曲霉 SIIM M203 的鉴定结果

M203 在合成培养基中可以迅速（24h）生长为菌球。但菌球直径明显大于 1.0mm，远远大于最适产酸直径 0.1-0.5 mm^[10]。此外，在合成培养基中可以明显看出，黑曲霉 SIIM M203 在低温（28℃-30℃）合成培养基中可能产黄色色素。但是在水解液中，黑曲霉 SIIM M203 却生长为纤维状，比较稠密。在秸秆水解液中，发酵后期可以看到孢子的再度产生。

合成培养基中，葡萄糖的消耗速率随着温度的增加而增加，柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升。28℃与 37℃获得柠檬酸产量基本相近，但是在 28℃下，转化率更高。在 28℃下，207 小时，黑曲霉 SIIM M203 孢子产生的最高浓度的柠檬酸为 54.93g/L，转化率大约为 40.51%。而且其他温度的柠檬酸产量也在 50 g/L 左右，转化率约为 40% 左右。而且，在黑曲霉 SIIM M203 孢子在秸秆水解液中也表现出良好的适应性，与合成培养基相比，并未出现孢子生长和柠檬酸积累上的延滞期。而且并未表现出对温度的敏感性。总体的糖耗速率比较一致，先消耗葡萄糖在消耗木糖。柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升。可能由于使用的水解液固含量较低，所以，总糖浓度较低，所获得柠檬酸产量也较低。在秸秆水解液中的最适温度为 37℃，最高柠檬酸的浓度仅为 18.96 g/L，转化率为 27.28%。虽然在合成培养基中获得柠檬酸产量较高，但是可能由于合成培养基内的初糖浓度较高，菌体的糖耗速率略低，产酸效率不高，这与菌体偏大的直径也是相应的。

由此可见，黑曲霉 SIIM M203 孢子在 15% 脱毒玉米秸秆水解中还是具有柠檬酸积累能力的，但是产酸效率不高。

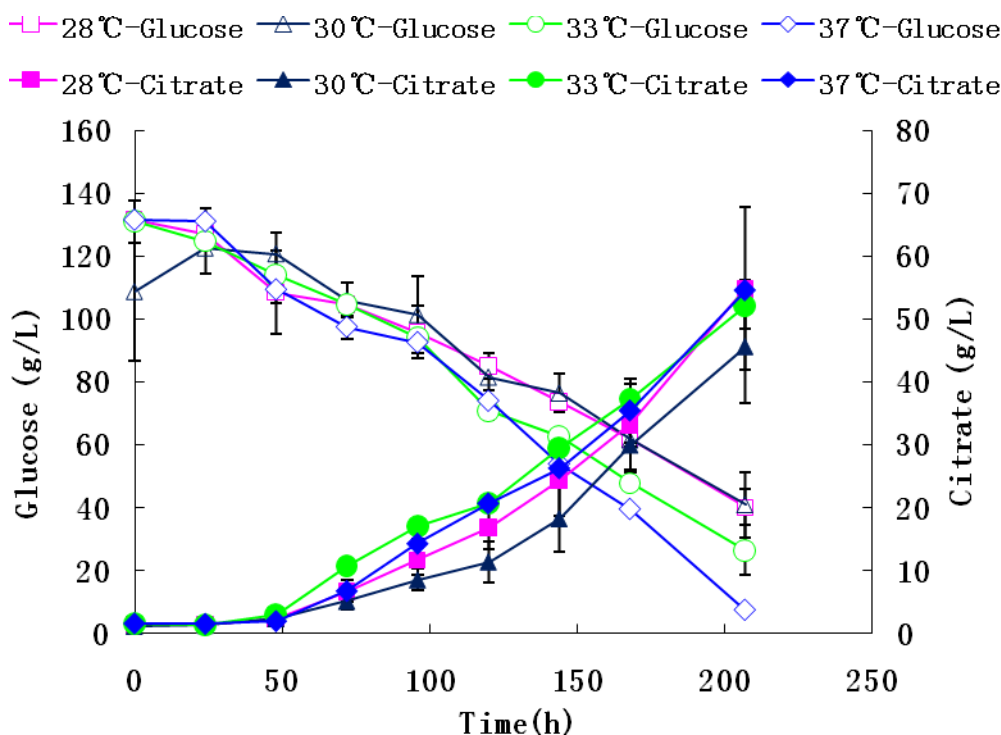


图 3.1 黑曲霉 SIIM M203 孢子在合成培养基中的发酵情况

Fig.3.1 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M203 spores in synthetic medium

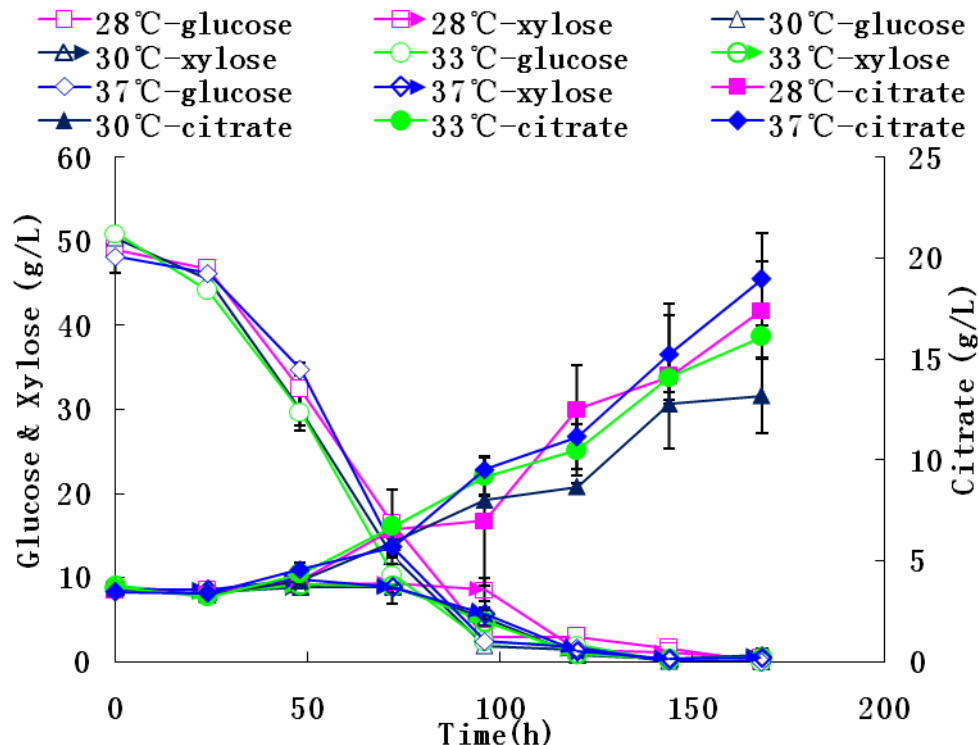


图 3.2 黑曲霉 SIIM M203 菌体在秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.2 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M203 spore in corn stover hydrolysate

3.1.2 黑曲霉 SIIM M288 的鉴定结果

黑曲霉 SIIM M288 (即黑曲霉 *A. niger* Co827) 是一株经诱变后筛选获得的菌株。上海工业微生物研究所从土壤中经酸性平板分离获得的野生黑曲霉 628 作为出发菌株, 经多次 Co- γ 射线和硫酸二乙脂等复合诱变, 获得了高产柠檬酸菌株 Co827 (即黑曲霉 *A. niger* SIIM M288)。M288 在合成培养基中的生长略慢于黑曲霉 SIIM M203, 34h 时, 孢子基本都生长为菌体。直径略小于黑曲霉 SIIM M203, 但也明显大于最适产酸直径 0.2-0.5 mm, 约 1.0mm 左右, 且始终保持菌球状。M288 的生长表现了对温度的敏感性, 在 28、30 $^{\circ}$ C 温度下, 在秸秆水解液中生长形态缩成一团; 但是在 33、37 $^{\circ}$ C 则生长为纤维状。合成培养基和秸秆水解中的发酵后期都再度出现了孢子。

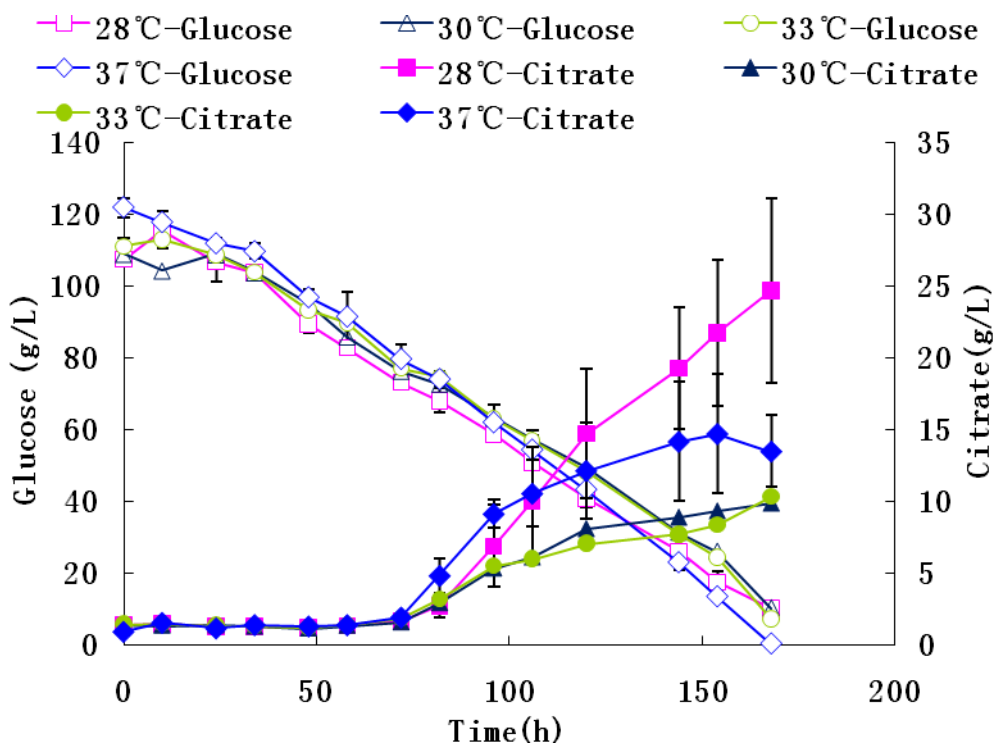


图 3.3 黑曲霉 SIIM M288 孢子在合成培养基中的发酵情况

Fig.3.3 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M288 spores in synthetic medium

在合成培养基中, 黑曲霉 SIIM M288 孢子生长后的菌体颗粒直径小于黑曲霉 SIIM M203, 糖耗速率也快于黑曲霉 SIIM M203, 但是在合成培养基中的产酸能力却不如黑曲霉 SIIM M203。在合成培养基中, M288 的糖耗速率几乎是一致的, 柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升。28 $^{\circ}$ C 时的柠檬酸产量最高, 为 24.70 g/L, 转化率为 21.61 %。30 $^{\circ}$ C 和 33 $^{\circ}$ C 时仅有微量的柠檬酸积累。而且在秸秆水解液中也表现出了对温度的敏感性, 且与在合成培养基内相反, M288 的产酸情况与其生长形态是相对应的。在 28、30 $^{\circ}$ C 温度下, 生长形态缩成一团时, 不产柠檬酸, 而在 33、37 $^{\circ}$ C 下生长为纤维状时的产量也较高, 达到 15 g/L 左右的柠檬酸, 转化率达到 20-22 % 左右。所以, M288 对温度的敏感行要高于 M203,。但是, 水解液的糖浓度或许也是影响产量过低的因素之一, 柠檬酸

的积累浓度并不高。

所以，黑曲霉 SIIM M288 孢子在 15 % 脱毒玉米秸秆水解中还是具有柠檬酸积累能力的，但是产酸效率也不高。

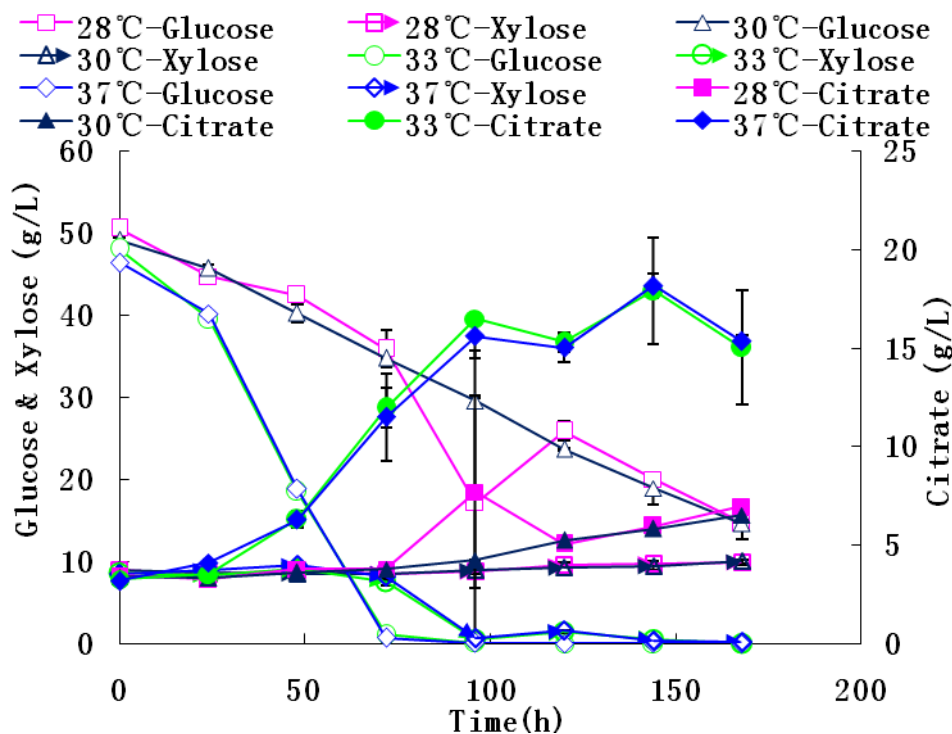


图 3.4 黑曲霉 SIIM M288 孢子在秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.4 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M288 spore in corn stover hydrolysate

3.1.3 黑曲霉 SIIM M228 的鉴定结果

黑曲霉 SIIM M228 为 M203 的诱变菌株^[50]。以黑曲霉 SIIM M203 (即黑曲霉 *Aspergillus niger* D353) 为出发菌, 经 ⁶⁰Co γ -射线辐射诱变, 筛选获得。无论在合成培养基中还是在秸秆水解液中, 黑曲霉 SIIM M228 的生长并未表现出对温度的敏感性。在合成培养基中生长为颗粒状, 乳白色, 直径较小, 明显小于黑曲霉 SIIM M203 和黑曲霉 SIIM M288, 目测其直径接近于最适产酸直径 0.2-0.5 mm, 而且培养基的样色与菌球的颜色基本一致。在秸秆水解液中的生长形态依然为菌球状, 目测直径与合成培养基中相近。

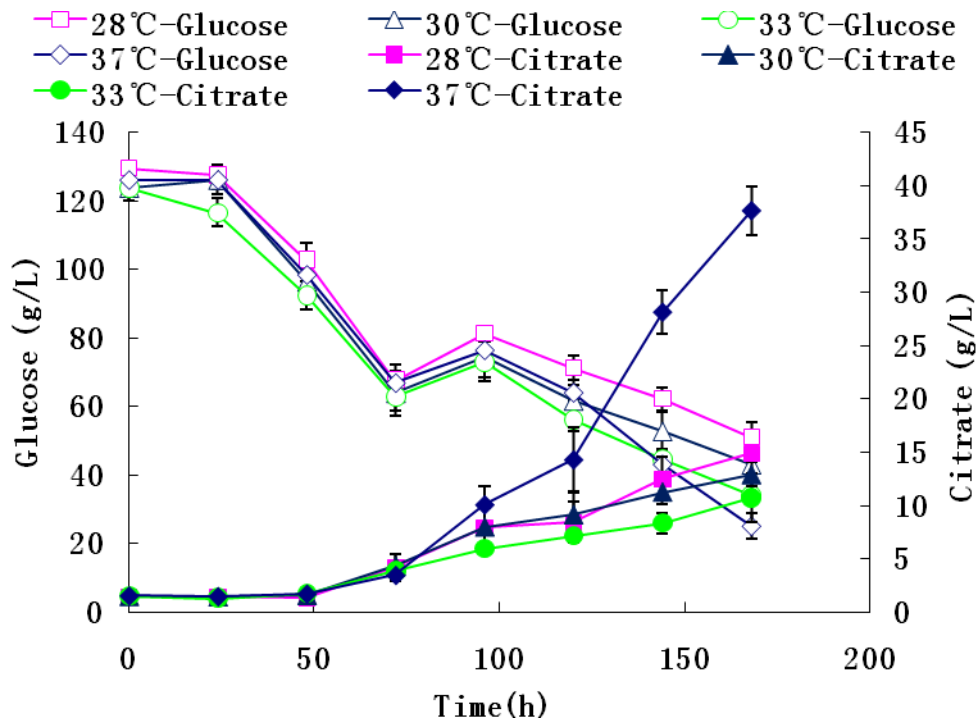


图 3.5 黑曲霉 SIIM M228 孢子在秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.5 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M228 spores in synthetic medium

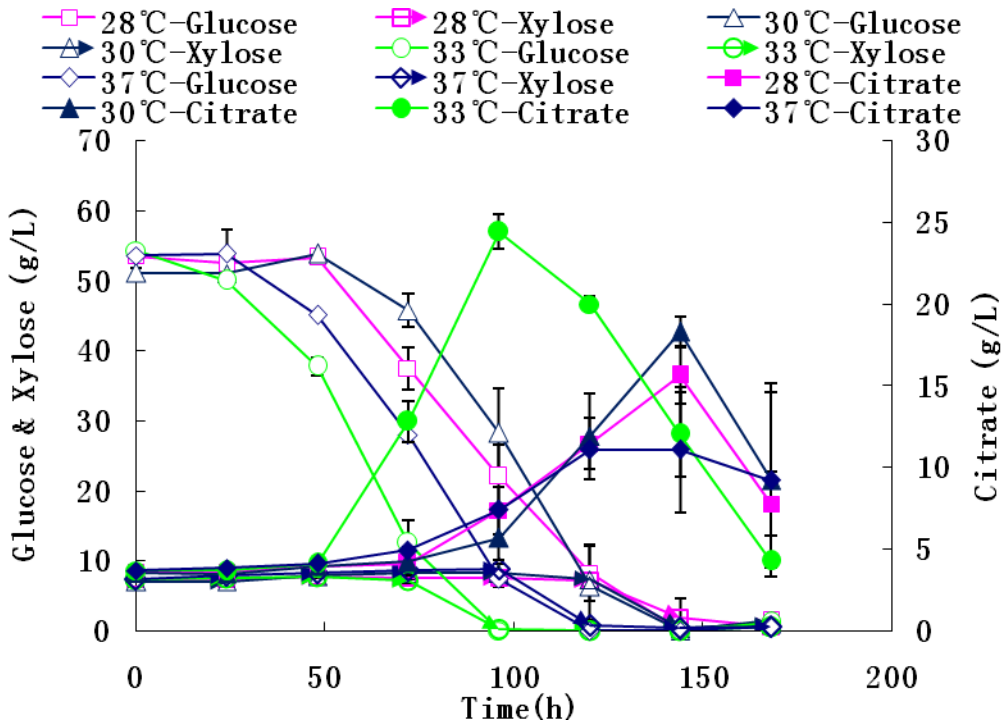


图 3.6 黑曲霉 SIIM M228 菌体在秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.6 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M228 spore in corn stover hydrolysate

黑曲霉 SIIM M228 孢子无论在合成培养基还是秸秆水解液中,都体现了温度的敏感性。一开始,糖耗速率都比较一致,但到发酵后期,37℃的糖耗明显快于其他温度。而柠檬酸的生成上也是如此,虽然也是柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升,但是37℃的柠檬酸产量明显高于其他温度。在合成培养基中,37℃有明显的发酵优势,产生37.63 g/L 柠檬酸,28.69%的转化率,其他温度的转化率仅在10%左右。在秸秆水解液中,33℃时,糖耗速率明显快于其他温度,而且柠檬酸生产速率和最高柠檬酸产量也明显高于其他温度。其适温度为33℃,96小时,就获得最高浓度的柠檬酸24.43 g/L,33.57%的转化率。而其他温度在144小时才获得最高浓度的柠檬酸,且浓度都在15 g/L左右。

所以,黑曲霉 SIIM M228 孢子在15%脱毒玉米秸秆水解中具有柠檬酸积累能力的,但是产酸效率高于黑曲霉 SIIM M203 和黑曲霉 SIIM M288。

3.1.4 鉴定小结

以下为黑曲霉 SIIM M203、M288、M228 在不同培养基下的最佳发酵情况

表 3.1 黑曲霉 SIIM M203 孢子和菌体在不同培养基中发酵的最适情况

Table 3.1 The optimum fermentation conditions of the *A. niger* SIIM M203,M288,M228 Spores and fungus on different culture medium

菌种	培养基	菌体生长	产酸能力
M203	SM	菌球, 偏大	28℃, 54.93g/L, 40.51%
	CS	纤维状	37℃, 18.96g/L, 27.28%
M288	SM	菌球, 偏大	28℃, 24.70g/L, 21.61%
	CS	纤维状	37℃, 15.36g/L, 22.25%
M228	SM	菌球	37℃, 37.63g/L, 28.69%
	CS	菌球	33℃, 24.43g/L, 33.57%

三株菌的孢子无论在合成培养基中还是秸秆水解液中,都能积累一定的葡萄糖。说明这三株菌具备发酵柠檬酸的能力。但是当把孢子培养成菌体后,再接入发酵培养基,未必能够获得同样的结果。种子培养基的成分是70 g/L 葡萄糖的合成培养基,菌体经合成培养基后再进入水解液发酵,可能无法适应新的培养环境,所以会出现生长和发酵延滞,产量降低等现象。此外,菌体在一定环境下无法代谢与种子培养基中等量的氮源和离子成分,而氮源和离子成分超过一定量后,可能会影响 pH 或者阻碍柠檬酸积累。若经驯化可能获得更好的发酵结果。

由文献可知,当葡萄糖浓度低于50 g/L时,柠檬酸无法积累^[9]。而在此秸秆水解液中葡萄糖浓度略高于50 g/L,过低的初糖可能会影响发酵结果,所以,尝试更高固含量的玉米秸秆水解液为底物,提高初糖浓度,再确定合适的柠檬酸发酵菌株。

3.2 预处理效果评价

3.2.1 预处理后纤维素和半纤维素含量的测定

样品中固含量 (S_c)、含水量 (W_c)、不溶性固体的含量 (WIS) 分别为
 $S_c=45.63 \pm 0.22$ (%) $W_c=54.37 \pm 0.22$ (%) $WIS=32.90 \pm 0.14$ (%)

纤维素和半纤维素中葡萄糖和木糖的校正曲线如下:

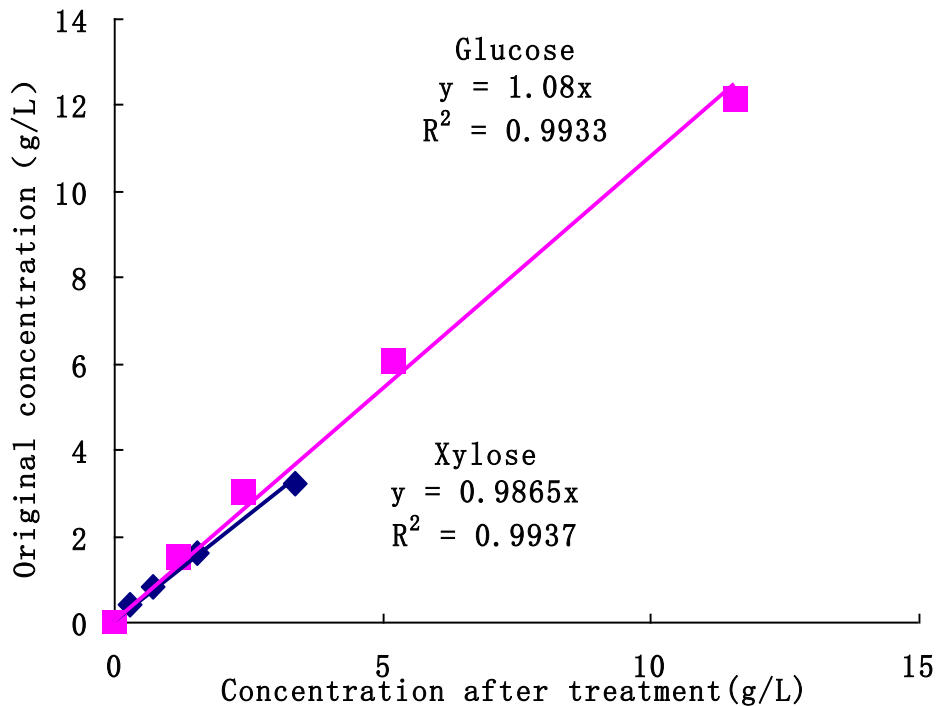


图 3.7 纤维素和半纤维素中葡萄糖和木糖的校正曲线

Fig3.7 The calibration curve of glucose and xylose in the cellulose and hemicellulose

所以, 葡萄糖的校正系数 $k_1=1.08$, 木糖的校正系数 $k_2=0.9865$ 。

HPLC 测定的葡萄糖浓度为 1.92 ± 0.14 g/L, 木糖浓度为 0.0098 ± 0.0066 g/L。

分别代入公式, 得 Cellulose= 35.52 ± 2.57 (%), Hemi= 1.94 ± 1.31 (%)

3.2.2 木质纤维素中酶水解评价

样品水解液中的葡萄糖浓度为 9.93 ± 0.73 g/L, 酶空白对照中葡萄糖浓度为 0.54 g/L, 并将纤维素含量 35.52 ± 2.57 (%) 代入公式, 葡萄糖得率为 95.26 ± 7.37 (%)

3.2.3 脱毒过程中抑制物代谢情况

将脱毒不同天数的原料, 制成 25% 固含量的玉米秸秆水解液后, 测定其中的抑制物含量。未脱毒时, 初始糠醛 (Furfural) 浓度为 0.68 g/L, 5-羟甲基糠醛 (HMF) 初始浓度为 0.62 g/L, 乙酸 (Acetic acid) 初始浓度为 10.30 g/L。糠醛和乙酸的浓度都是随时间而降低的。脱毒 7 天的时候, 糠醛几乎完全被代谢。而乙酸到脱毒的第 10 天依然有 5.00 g/L 左右。羟甲基糠醛代谢滞后于糠醛, 羟甲基糠醛的浓度随着脱毒时间先上升后减少。所

以，要糠醛完全殆尽，至少要脱毒 7 天。

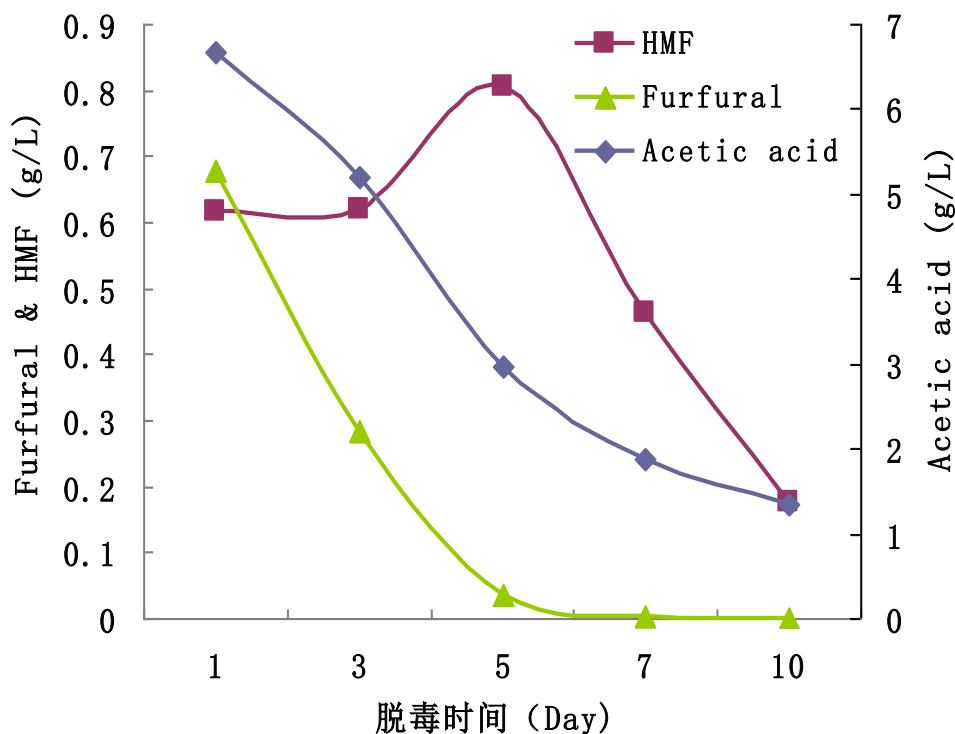


图 3.8 玉米秸秆中主要抑制物脱毒情况

Fig3.8 The main inhibitor detoxification in corn stover

3.3 柠檬酸生产菌株的筛选

由文献可知，当葡萄糖浓度低于 50 g/L 时，柠檬酸无法积累^[9]。15%脱毒秸秆水解液的糖浓度约 50-60 g/L，25%脱毒秸秆水解液的糖浓度约为 100 g/L 左右。将底物换成 25%未脱毒玉米秸秆水解液可以排除糖浓度对菌体发酵的影响，其发酵结果也可作为最终选择菌株的依据。

本实验将孢子在种子培养基内培养 36 小时后，再将菌体接种于玉米秸秆发酵培养基内进行发酵。

黑曲霉 SIIM M203 的菌体对温度的敏感性高于孢子，37℃时的糖耗明显快于其他温度。柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升，37℃的柠檬酸产量也明显高于其他温度。当水解液的糖浓度提高至 100 g/L 左右时，可以发酵柠檬酸，37℃达到 22.74 g/L 柠檬酸，转化率为 15.95%。而其他温度却徘徊在 12-13 g/L。此外，菌体的生长形态依然为纤维状，培养基较为粘稠，并不是文献所说的颗粒状。

所以，黑曲霉 SIIM M203 菌体在 25%脱毒玉米秸秆水解中依然具有柠檬酸积累能力的，但是产酸效率依然不高。

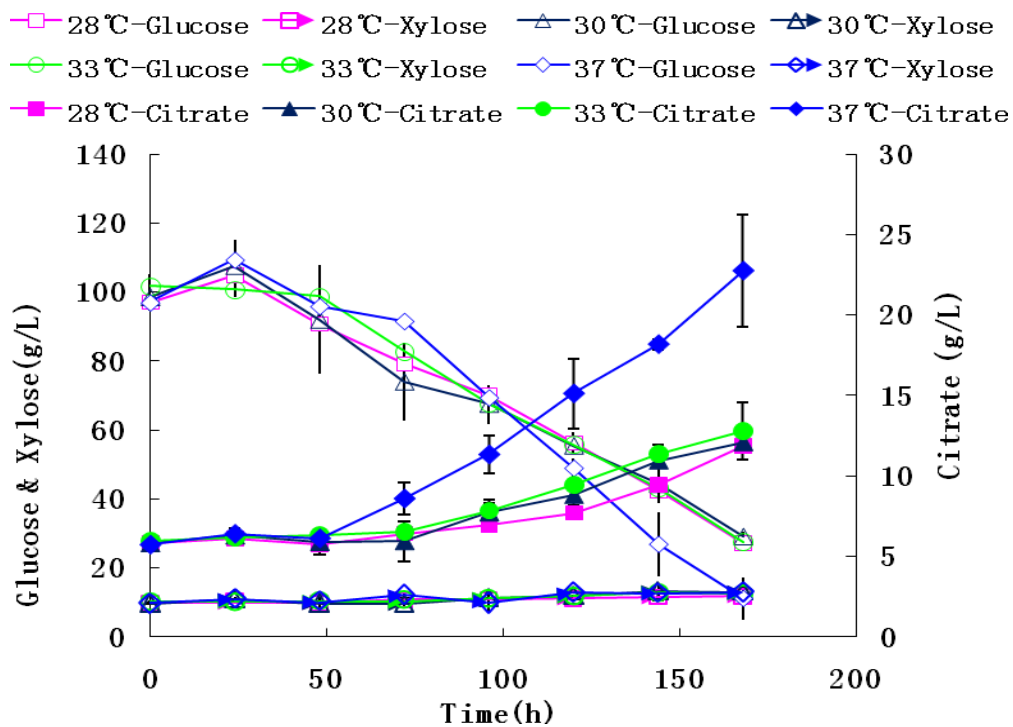


图 3.9 黑曲霉 SIIM M203 菌体在 25%固含量的玉米秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.9 The fermentation result of *A. niger* SIIM M203 fungus on corn stover hydrolysate with 25 % solid content

当葡萄糖浓度提升至 100 g/L 左右时，黑曲霉 SIIM M288 在秸秆水解液中的发酵发生了明显的变化。在葡萄糖浓度为 50 g/L 的秸秆水解液中，黑曲霉 SIIM M288 仅在 28°C 时，可以积累柠檬酸，达到 18.32 g/L 柠檬酸，转化率为 25.23 %。但是在 30-37°C 下，都不能积累柠檬酸。此外，在低糖浓度的水解液中，黑曲霉 SIIM M288 产酸时的形态为纤维状，不产酸时缩成一团。而在 25 % 脱毒秸秆水解液中，对温度敏感性降低。糖耗速率都比较一致，产酸速率变化也不大。在高浓度的秸秆水解液中，黑曲霉 SIIM M288 不仅可以在 28°C 下发酵柠檬酸，在 30-37°C 下依然可以积累柠檬酸，33°C 时产量最高，达到 58.04 g/L 柠檬酸，转化率为 53.23 %。而且在高糖浓度下的黑曲霉 SIIM M288 全部生长为菌球状，培养基粘度较低，菌球的直径也较小，明显小于其在合成培养基中的菌球直径，且与文献上描述的大部分黑曲霉的产酸形态比较接近。

由此可见，黑曲霉 SIIM M288 菌体在 25 % 脱毒玉米秸秆水解中依然具有柠檬酸积累能力的，达到 58.04 g/L 柠檬酸，转化率为 53.23 %，产酸能力高于黑曲霉 SIIM M203。

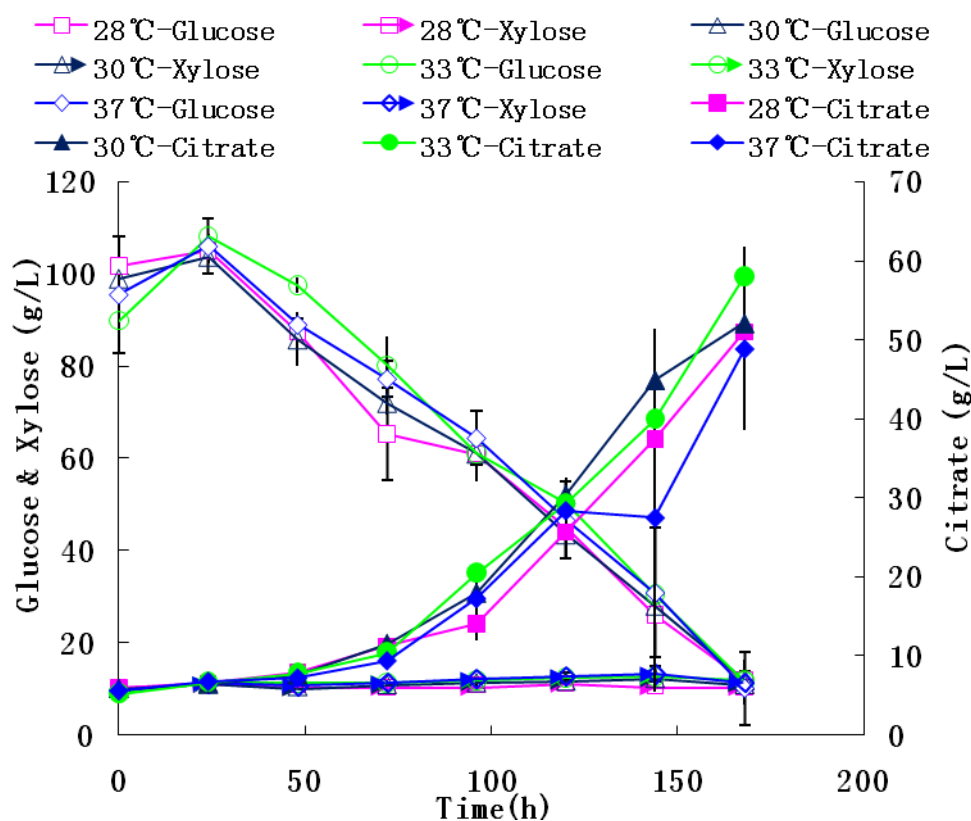


图 3.10 黑曲霉 SIIM M288 菌体在 25%固含量的玉米秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.10 The fermentation result of *A. niger* SIIM M288 fungus on corn stover hydrolysate with 25 % solid content

黑曲霉 SIIM M288 在高糖的秸秆水解液中温度的敏感性降低。柠檬酸的产量却随着温度的上升先降后升。但是总体的柠檬酸产量却与 15 % 未脱毒水解液中的结果大致相当。在低糖秸秆水解液，最高柠檬酸产量达到 27.36 g/L 柠檬酸，转化率为 28.09 %。而在高糖浓度的水解液中，28°C 时，柠檬酸产量最高，达到 31.62 g/L 柠檬酸，转化率为 22.94 %，二者比较接近。且黑曲霉 SIIM M288 的形态上也没有明显的变化，都为直径较小的菌球。

由此可见，黑曲霉 SIIM M288 菌体在 25 % 脱毒玉米秸秆水解中依然具有柠檬酸积累能力的，达到 31.62 g/L 柠檬酸，转化率为 22.94 %，但产酸能力低于黑曲霉 SIIMM288。

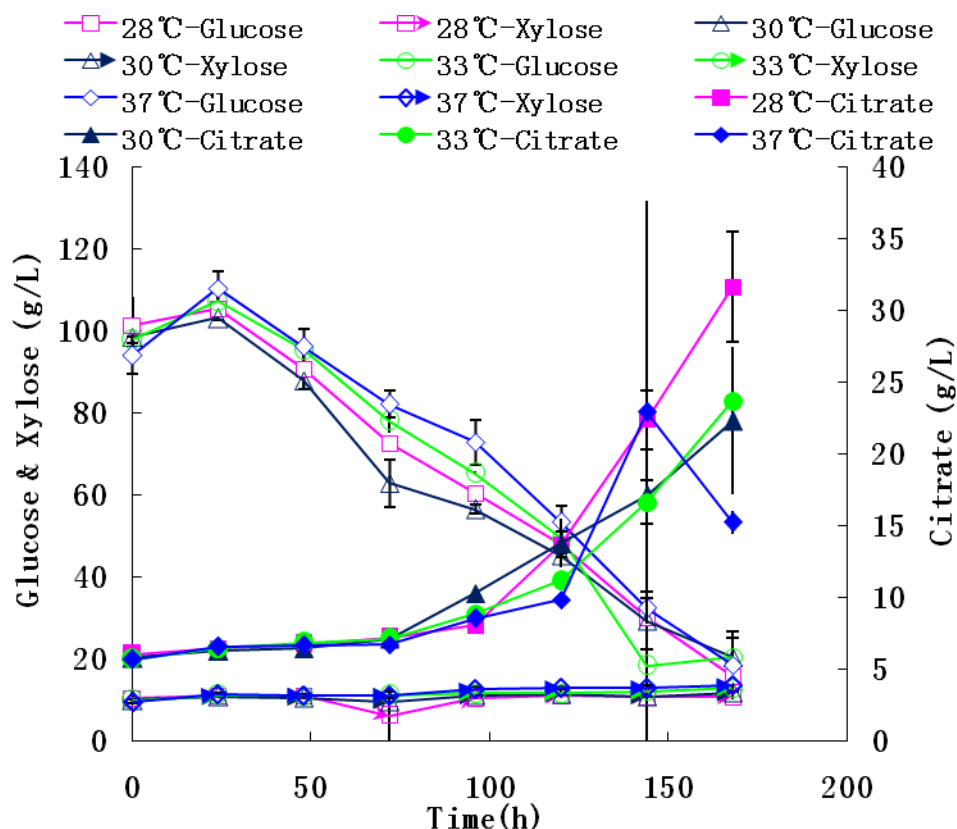


图 3.11 黑曲霉 SIIM M228 菌体在 25%固含量的玉米秸秆水解液中的发酵情况

Fig.3.11 The fermentation result of *A. niger* SIIM M228 fungus on corn stover hydrolysate with 25 % solid content

以下为黑曲霉 SIIM M203、M288、M228 在高固含量秸秆水解液中的最佳发酵情况

表 3.2 黑曲霉 SIIM M203、M288、M228 菌体在 25%固含量的秸秆水解液中的发酵情况

Table 3.2 The optimum fermentation conditions of the *A. niger* SIIM M203,M288,M228 fungus on corn stover hydrolysate with 25 % solid content

菌株	生长情况	发酵情况
M203	纤维状	28℃, 22.74g/L, 15.95%
M288	菌球, 较小	33℃, 58.04g/L, 53.23%
M228	菌球, 较小	28℃, 31.62g/L, 22.94%

综上所述, 由于糖浓度的提高, 黑曲霉 SIIM M203 和黑曲霉 SIIM M288 的发酵能力明显提升。初步筛选最适的柠檬酸生产菌株为黑曲霉 SIIM M288, 可达 58.04 g/L 柠檬酸, 转化率为 53.23 %。但是, 柠檬酸产量依然还有提升的空间, 而且还存在产酸速率较慢等问题。所以, 将利用黑曲霉 SIIM M288, 进一步优化秸秆水解液中的各成分和发酵条件, 以提升柠檬酸发酵生产能力。

3.4 抑制物对发酵的影响

要利用木质纤维素必须对其进行预处理，以破坏其牢固的结构。但是预处理之后，会产生抑制物。这些抑制物可能会对后续用于发酵的菌体的生长和生产产生抑制作用。但是这些抑制物对于有些菌体的抑制作用是很低的，甚至忽略不计。所以，必须测定筛选出的菌种对玉米秸秆水解中主要抑制物的耐受性，才能判断是否可以利用未脱毒的玉米秸秆为底物。如果黑曲霉黑曲霉 SIIM M288 可以耐受玉米秸秆中的抑制物，那么以玉米秸秆为底物利用黑曲霉黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸的工艺将大大简化，降低工艺成本。如果黑曲霉黑曲霉 SIIM M288 不能耐受玉米秸秆中的抑制物，或许可以通过驯化等其他的方法提高菌体的耐受性。或者直接使用脱毒玉米秸秆水解液。

3.4.1 呋喃类抑制物

糠醛通过依赖 NADH 脱氢酶的催化，还原为糠醇。糠醛会导致细胞复制的失活^[49]。糠醛对黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸的抑制作用显著。0.5 g/L 的糠醛几乎就抑制了柠檬酸的积累。而且随着糠醛的浓度的增加，抑制了菌体的生长以及对葡萄糖的利用。当糠醛浓度为 2.0g/L 时，菌体几乎不利用葡萄糖。在添加低浓度糠醛的培养基中，菌体呈颗粒状，直径较小，培养基较为粘稠。但随着糠醛浓度的增加，生长也几乎完全能抑制菌体，粘度降低。所以，糠醛极有可能使通过抑制菌体的生长，进而抑制其代谢，所以，影响了产酸。

5-羟甲基糠醛（HMF）的主要的转化产物是 5-羟甲基糠醇。其转化速率低于糠醛，可能是因为较低的膜通透性，导致生长上的延滞期更长^[51]。随着羟甲基糠醛的增加，对 M288 生产柠檬酸的抑制作用也随之增加，但是羟甲基糠醛对菌体的生长并没有明显的抑制。对葡萄糖的利用能力也随着羟甲基糠醛的增加而减弱，但是抑制作用明显低于糠醛。在添加羟甲基糠醛的培养基中，菌体呈颗粒状，直径较小，培养基较为粘稠。故，羟甲基糠醛主要通过抑制糖的消耗来抑制柠檬酸的生产。

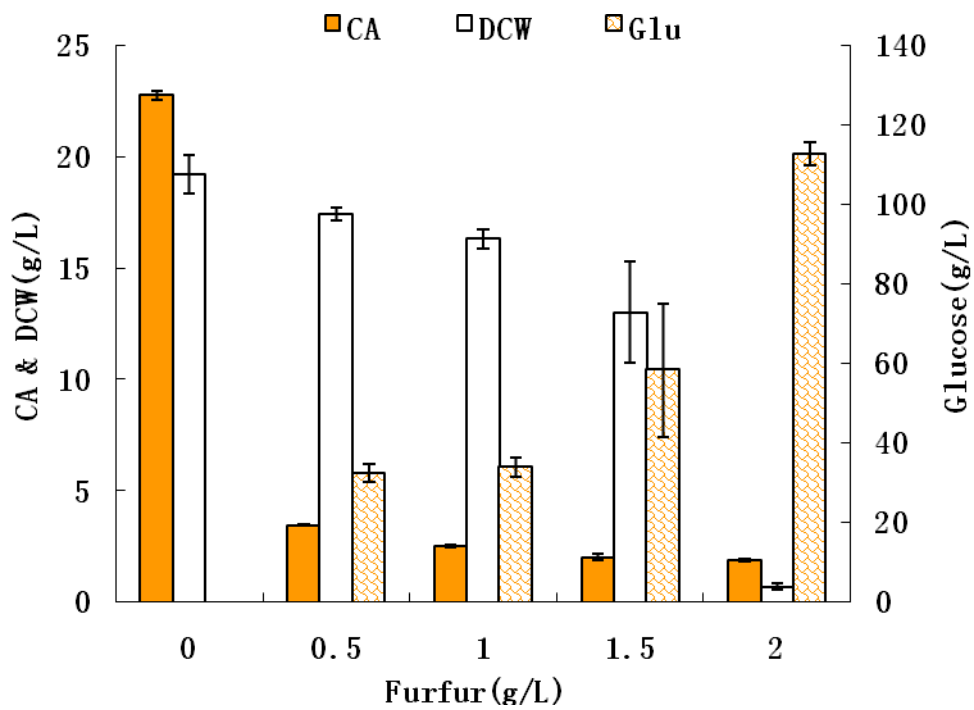


图 3.12 糠醛对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.12 Effect of furfural on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

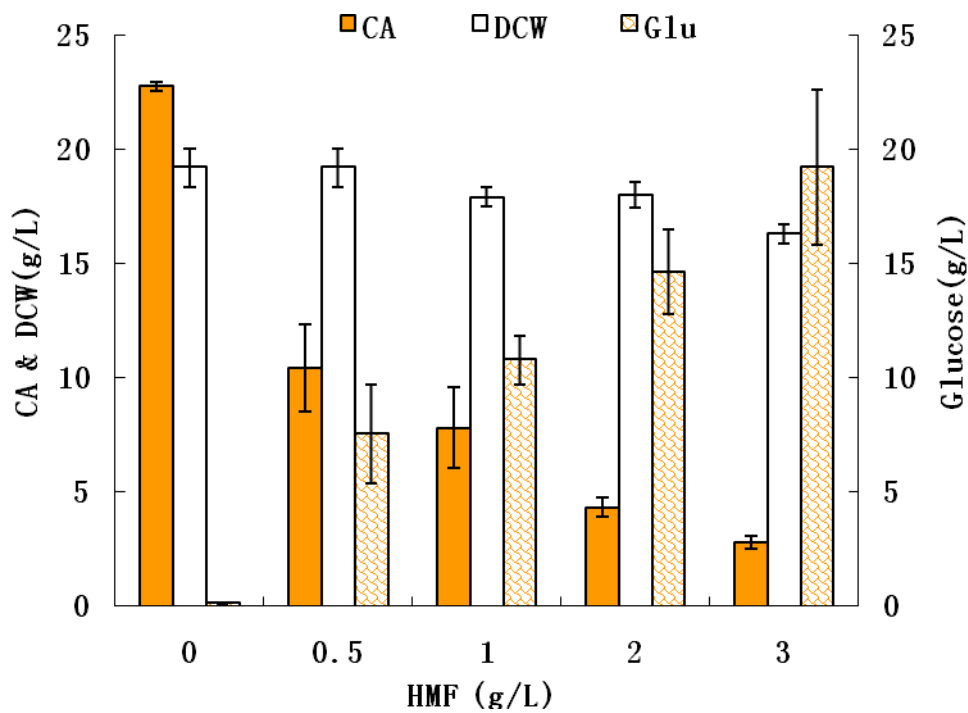


图 3.13 羟甲基糠醛对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.13 Effect of HMF on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

黑曲霉黑曲霉 SIIM M288 在脱毒秸秆水解液中，发酵获得 75-80 % 柠檬酸转化率。但是在合成培养基中的产量却很低，只有 20-30 g/L 的柠檬酸产量。所以，为了验证是否是脱毒水解液中的糠醇或者羟甲基糠醇起了产酸的作用，所以，检测了合成培养基中，添加糠醇或者羟甲基糠醇的发酵情况。

和糠醛一样，糠醇浓度增加后，柠檬酸的产量明显降低，葡萄糖的利用率也逐渐降低。当糠醇浓度至 2.0 g/L 时，菌体生长也明显降低了，但是没有糠醛的抑制效果明显。糠醇极有可能使通过抑制菌体的生长，抑制其代谢，最终影响了产酸。

当羟甲基糠醇添加后，同样也抑制了糖耗和产酸。但当羟甲基糠醇的浓度至 1.0 g/L，产酸和葡萄糖利用率高于添加其他浓度的羟甲基糠醇。羟甲基糠醇略微抑制了菌体的生长。故，和羟甲基糠醛一样，羟甲基糠醇主要通过抑制糖的消耗来抑制柠檬酸的生产。

因此，糠醇和羟甲基糠醇对黑曲霉 SIIM M288 的发酵还是有一定的抑制作用的。玉米秸秆水解液中的成分较为复杂，单独的糠醇和羟甲基糠醇并不是柠檬酸在秸秆水解液中产量增加的原因，或许是由于其他一些单独的因素导致，或者是由于几个物质的协同作用才提高了柠檬酸的产量，其具体原因有待进一步探索。

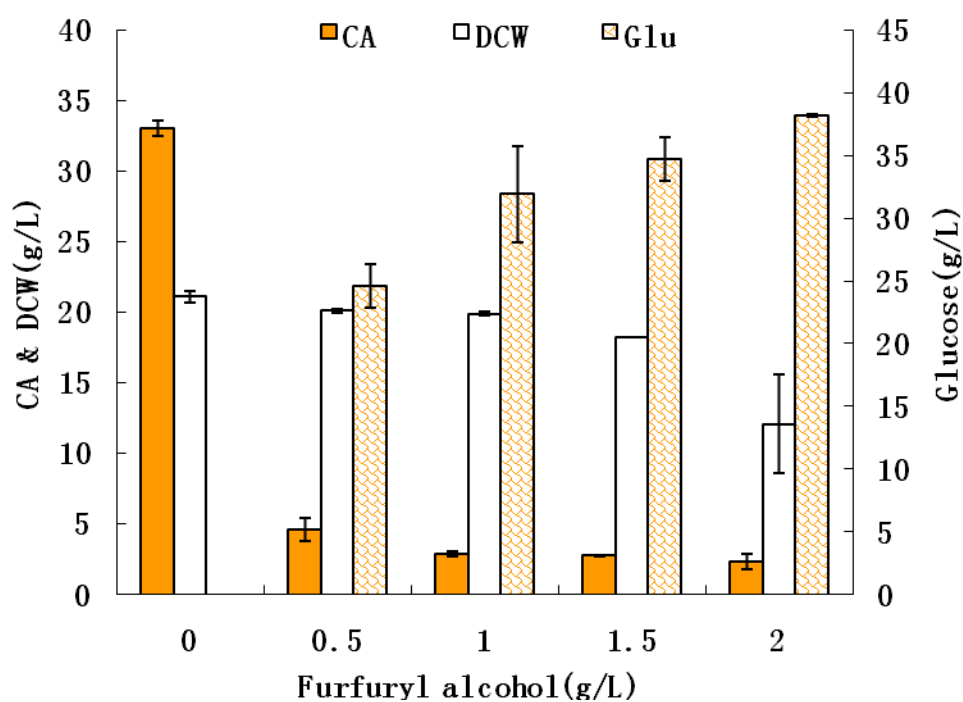


图 3.14 糠醇对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.14 Effect of furfural alcohol on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

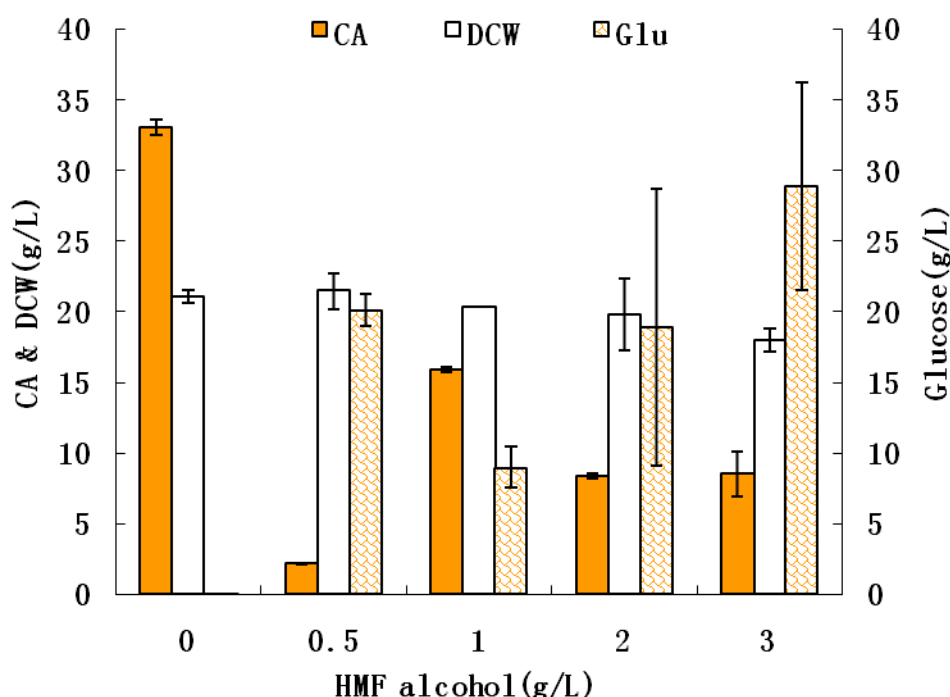


图 3.15 羟甲基糠醇对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.15 Effect of HMF alcohol on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

3.4.2 弱酸类抑制物

乙酸的添加降低了柠檬酸的浓度。但是在 1.8-7.2 g/L 的范围内，柠檬酸的产量并无显著差异。随着乙酸的浓度增加，糖耗速率略微降低。乙酸的添加对略微促进了菌体的生长。在添加乙酸的培养基中，菌体呈颗粒状，直径较小，金黄色，可能因为菌体生产了黄色色素。

当甲酸浓度 0-1.0 g/L 时，柠檬酸的生产几乎无差异，当甲酸浓度进一步增加时，柠檬酸浓度略微降低。在添加甲酸的培养基中，菌体的生长随着甲酸浓度的增加而增加。菌体也呈颗粒状，直径较小，金黄色。

而乙酰丙酸的添加对发酵并没有显著的作用，对菌体的生长有略微的促进作用。菌体的形态也为小颗粒，培养基颜色略呈暗黄，较为粘稠。

弱酸会抑制细胞的生长，因此用作食品防腐剂。不可解离的弱酸往往都是脂溶性的，而且会在细胞膜内扩散。弱酸对微生物的抑制作用主要由未解离的酸流入细胞质内。细胞质内，由于胞内中性的 pH 环境，导致酸解离，然后胞内 pH 值下降了。木质纤维素水解液中的未解离的酸的浓度依赖于 pH。在不存在弱酸的培养基中，较低的发醇 pH 会抑制细胞增殖和生存。因为跨膜的质子梯度的增加，会增加质子被动吸收的速率。维持胞内的中性 pH 对细胞的生存是至关重要的。细胞复制的活性随着胞内 pH 的降低而线性降低。

对于酿酒酵母，低浓度的弱酸（乙酸、甲酸、乙酰丙酸）可以刺激乙醇的生产。当

pH=5.5 时, 低浓度 (<100mmol/L) 的弱酸可以增加乙醇的产量, 但是当弱酸浓度进一步增加时, 产量却会降低。而且脂肪族羧酸也表现了同样的结论。当羧酸浓度高于 200mmol/L 时, 也会对生产产生抑制作用。乙酸、甲酸、乙酰丙酸三者对菌体的抑制作用也略有差异, 这种差异的可能是由于膜的通透性或者弱酸进入细胞后的阳离子形式引起的。

用于解释弱酸抑制作用的机理有两种: 解偶联机制和胞内阳离子积累机制。

根据解偶联机制, 由于弱酸的流入, 胞内 pH 降低。为了使胞内 pH 保持中性, 细胞膜上的腺苷酸三磷酸 (ATPase) 水解 ATP, 并且泵出质子。为了弥补消耗的 ATP, 只能降低生长, 增加胞内的乙醇的生产, 来获得更多的 ATP。但是当酸浓度过高时, 质子泵的被耗尽, ATP 也被耗尽, 质子动力消散, 细胞质酸化。

根据阳离子积累机制, 阳离子被细胞捕获, 未解离, 而且会扩散至达到平衡。未解离酸的平衡浓度是 pH 的函数, 胞内阳离子的积累范围是跨膜 pH 浓度梯度的函数。当胞外 pH 较低时, 酵母菌内阳离子的积累达到了较高浓度。乙酸的添加, 糖酵解途径中烯醇酶最为敏感。主要由胞内的酸化和酸的直接干扰导致的抑制作用^[51]。

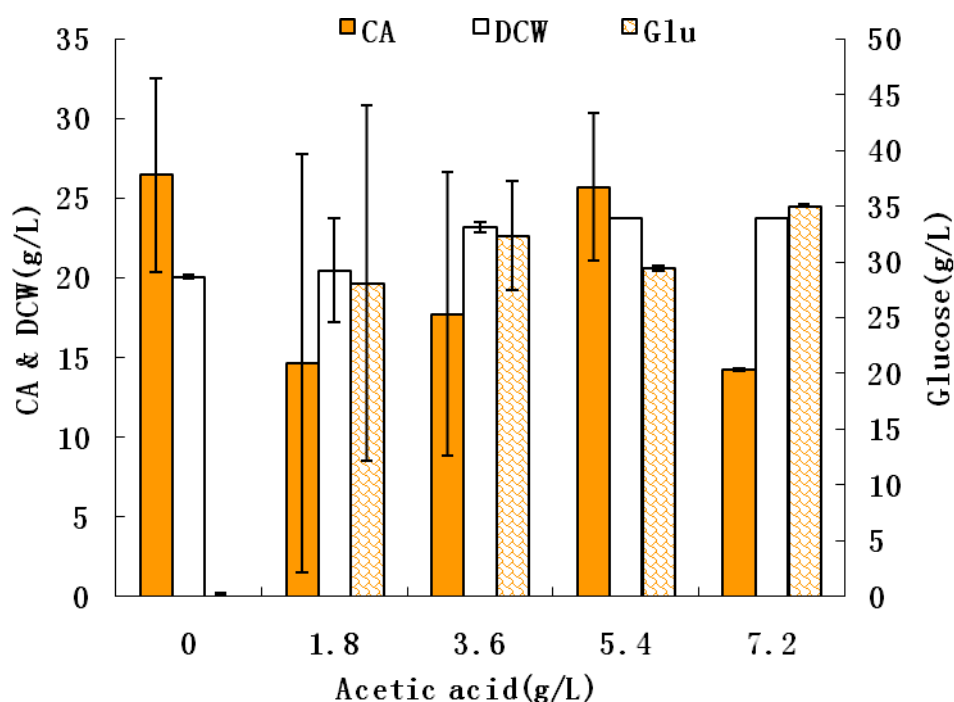


图 3.16 乙酸对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.16 Effect of acetate on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

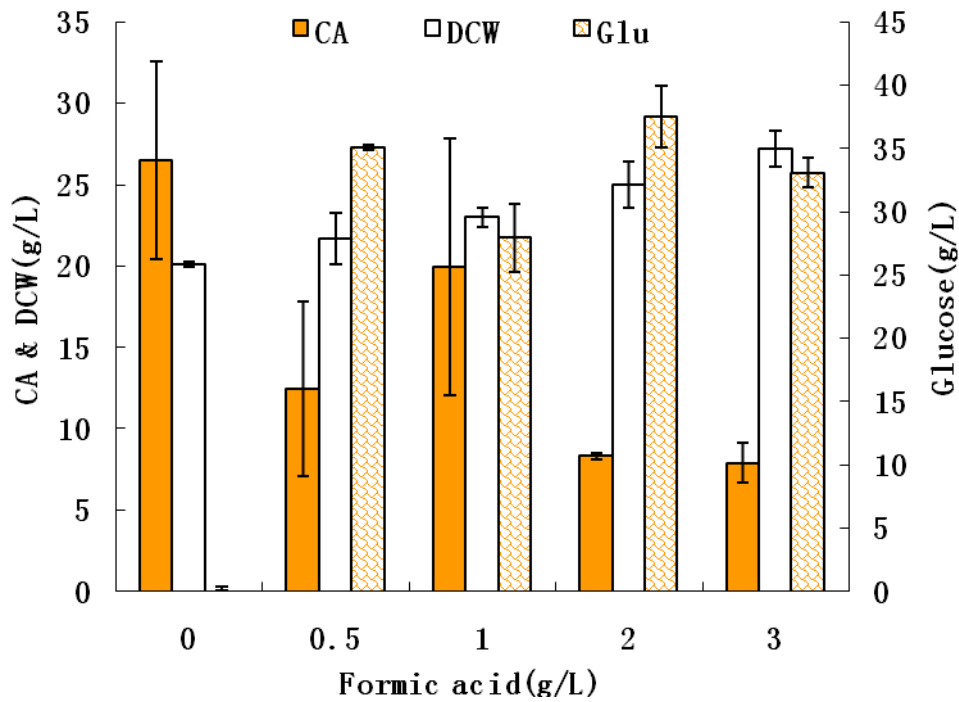


图 3.17 甲酸对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.17 Effect of formic acid on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

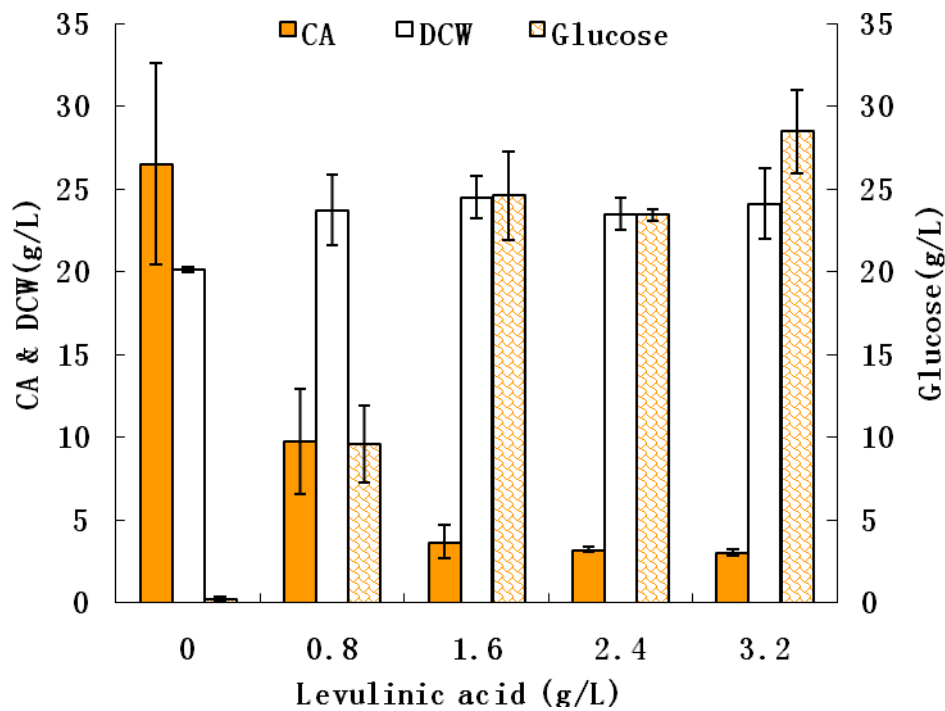


图 3.18 乙酰丙酸对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.18 Effect of on levulinic acid fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

3.4.3 酚类抑制物

随着香草醛的浓度增加，柠檬酸的生产也随之略微的降低。当香草醛的浓度至 1.2 g/L 时，抑制了菌体的生长以及葡萄糖的利用。在低于 1.2 g/L 香草醛的培养基中，菌体的形态依然为小颗粒，培养基较为粘稠。

酚类抑制物被认为是木质纤维素中抑制作用最强的抑制物，尤其是分子量较低的酚类抑制物。然而，由于缺乏准确的定量和定性的分析，酚类抑制物的抑制机理还不得而知。用比木质纤维素水解液中浓度更高的酚类抑制物浓度来研究其抑制模型。由结果可知，酚类化合物的水溶性有一定的限制性。而且在水解液和限制性培养基中，其水溶性是有差异的。往往微生物利用的抑制物浓度低于该物质在培养基内实际的浓度。

当氧化木质素的漆酶预处理柳木半纤维素水解液时，酚类化合物单体和酚酸被去除时，酚类化合物的抑制作用将降低。香草醛是云杉、松树、柳树等水解液中重要的酚类化合物。只有香草醛浓度达到 1.0 g/L 时，才会对酿酒酵母的发酵有抑制作用。不仅香草醛，丁香醛，四羟基苯甲醛等都能被酿酒酵母所消化。

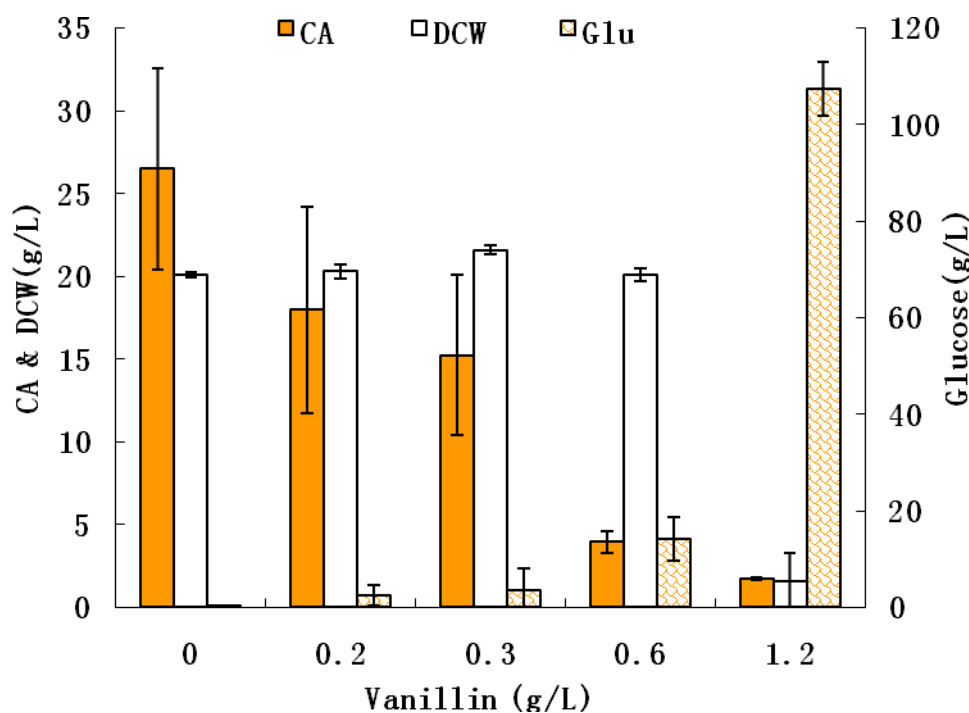


图 3.19 香草醛对黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的影响

Fig.3.19 Effect of vanillin on fermentation of citrate by *A. niger* SIIM M288

3.4.4 黑曲霉 SIIM M288 对玉米秸秆中主要抑制的耐受性小结

秸秆水解液中的单个抑制物对黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸在生产上几乎都有抑制。然而，在实际的秸秆水解中，其实有着众多抑制物。所以，就不能排除多个抑制物对发酵的协同影响。添加了 10 g/L 的乙酸和 3 g/L 的糠醛对于酿酒酵母生长都有抑制作用，但是二者同时添加入培养基内，对生长的抑制作用大于二者分别加入培养基内，对

于菌体生长抑制作用之和。所以，在秸秆水解液中对菌体的抑制作用或许高于以上实验的结果。

15% 未脱毒玉米秸秆水解液中，含有 0.55 g/L 糠醛，0.42 g/L 5-羟甲基糠醛等抑制物。而 25% 未脱毒玉米秸秆水解液中，含有 1.10 g/L 糠醛，0.58 g/L 5-羟甲基糠醛等抑制物。所以，菌体在未脱毒水解液中发酵必然对柠檬酸的积累起到负面作用。实验结果表明，15% 未脱毒水解液中糖含量一般为 50-60 g/L，虽然菌体在其中可以积累一定浓度的柠檬酸，但是浓度不高，而且生长略有延滞。25% 未脱毒水解液中糖含量一般为 70-80 g/L，虽然糖浓度提升了，但是其糠醛等抑制物的浓度也高，菌体根本无法生长。所以，只有选择脱毒后的玉米秸秆作为原料，黑曲霉 SIIM M288 才能进行柠檬酸发酵。

3.5 M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵条件的优化

由于黑曲霉对培养基内组分的浓度、培养条件与环境都有细腻的要求，温度、初始 pH、 NH_4^+ 浓度、以及 Mn^{2+} 浓度都是决定柠檬酸产量的关键因素。所以，对其进行一定的优化也是十分必要的。

虽然黑曲霉发酵柠檬酸的温度一般在 28-37℃ 内，但是在一定条件下，温度的微小变化也会导致产量的明显变化。在筛选菌种的试验中，M288 在 15% 脱毒秸秆水解液中就表现出了对温度的敏感性。只有在 33-37℃ 下才积累柠檬酸，28-30℃ 不积累柠檬酸。

发酵过程中要求 pH 存在两个阶段。发酵开始要求 $\text{pH} > 5$ ，以保证菌体的生长。生长中的孢子吸收了铵离子，释放了 H^+ ，pH 降低，促进了柠檬酸的发酵。第二阶段维持 $\text{pH} \leq 2$ ，以抑制其他费目的性的酸的污染，也使后期回收更方便。所以，初始 pH 和铵离子的浓度对柠檬酸的积累起了至关重要的作用。

Mn^{2+} 不足是柠檬酸转运至培养基中的关键。因为细胞膜上的柠檬酸通透酶只能转运柠檬酸- Mn^{2+} 螯合物^[9]，所以只有 Mn^{2+} 不足时，柠檬酸才会运输至细胞外。

3.5.1 温度梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响

如 3.3 候选菌株的筛选结果（图 3.10）所示，当温度范围为 28-37℃ 时，黑曲霉 SIIM M288 对温度的敏感性不大，最终的柠檬酸浓度相近。但是，33℃ 的发酵结果相对较高，达到 58.04 g/L 柠檬酸，转化率为 53.23 %。所以，最适的温度为 33℃。

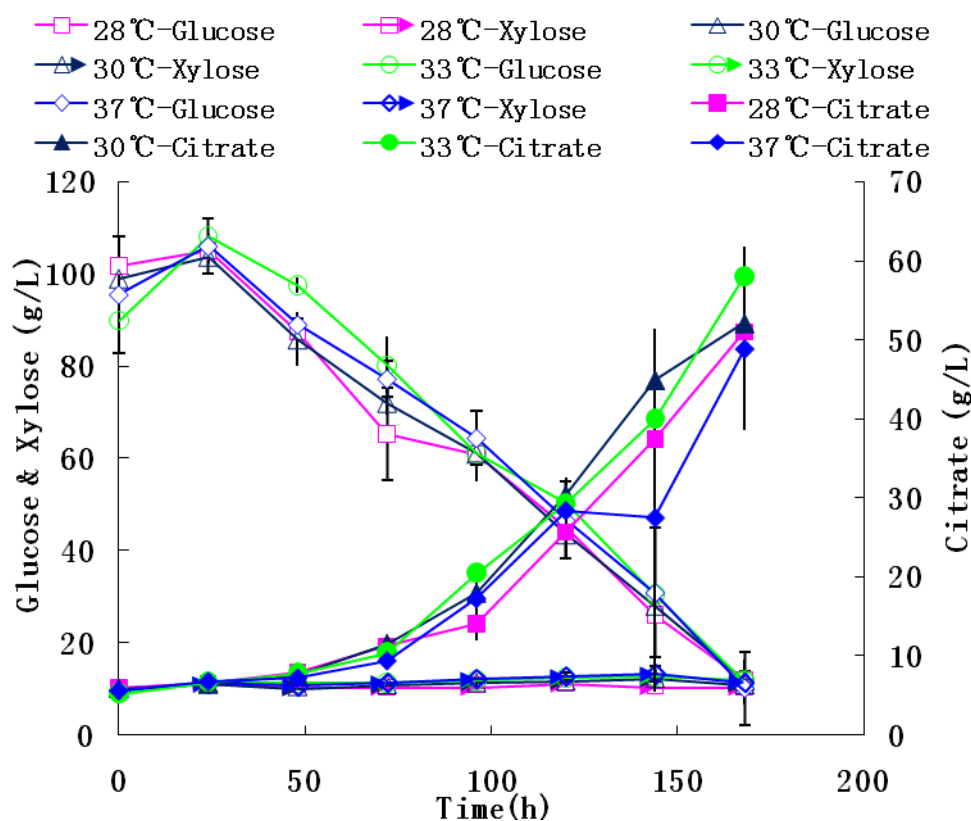


图 3.10 温度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液发酵柠檬酸的影响

Fig.3.10 Effect of temperature on citrate fermentation by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

3.5.2 初始 pH 梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响

由文献可知，黑曲霉的最适生长 pH 为 5.0-6.0，而柠檬酸积累的条件一般为 pH 低于 2.0-2.5^[15]。所以，选择初始 pH 浓度梯度为 2.0-6.0，探索合适的初始 pH。由图 3.20-3.21 可知，随着初始 pH 的增加，柠檬酸的产量和糖酸转化率先降后增。当初始 pH 较低时，菌体生长情况不佳，初始 pH 越低，更接近柠檬酸积累的 pH，所以 pH 越低，相对产量更高一些。当初始 pH 较高时，菌体首先在水解液中进一步生长，消耗 NH_4^+ ，随之 pH 降低，柠檬酸开始积累。当初始 pH=6.0 时，获得最高的柠檬酸产量 66.28 g/L，转化率为 62.21%。

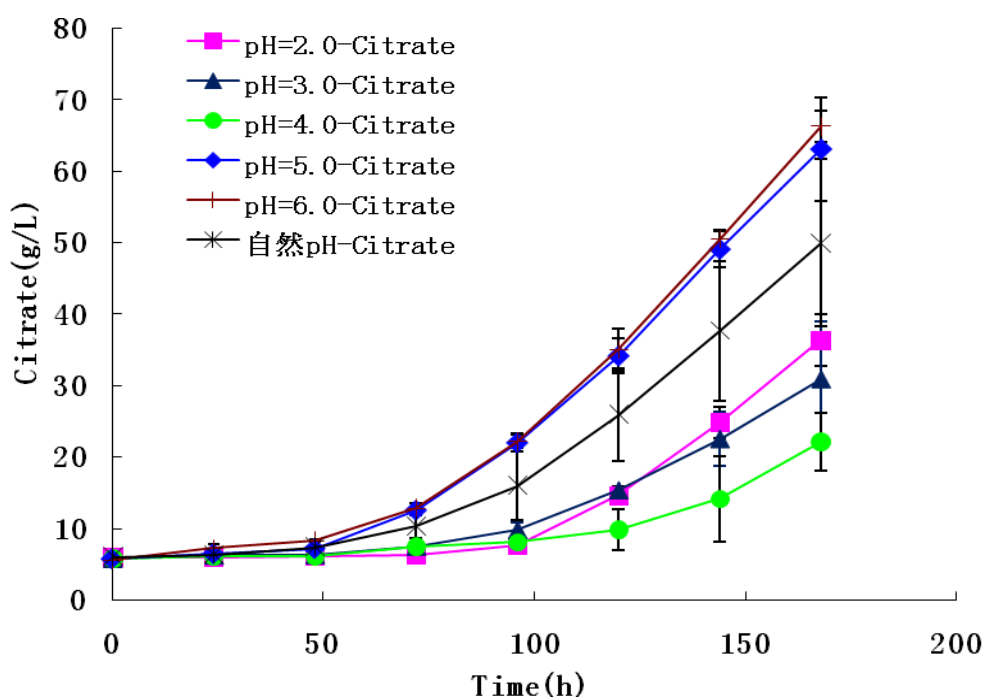


图 3.20 初始 pH 对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中柠檬酸积累的影响

Fig.3.20 Effect of initial pH on citrate accumulation by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

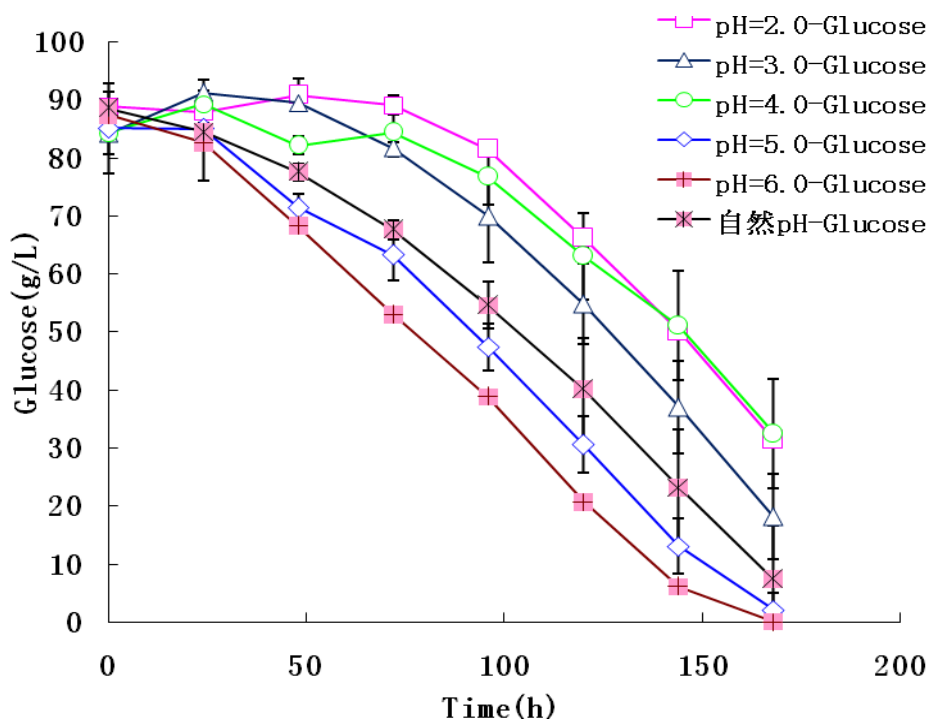


图 3.21 初始 pH 对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中葡萄糖消耗的影响

Fig.3.21 Effect of initial pH on glucose consumption by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

3.5.3 NH_4Cl 梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响

NH_4^+ 不仅作为黑曲霉生长的氮源，而且随着 NH_4^+ 的消耗，可以降低 pH，使菌体进入产酸阶段。此外，柠檬酸和 ATP 抑制磷酸果糖激酶，而 NH_4^+ 却能使之激活，有效解除磷酸果糖激酶对柠檬酸积累的敏感性。查阅书本可知，发酵培养基中铵盐浓度为 2.5 g/L，但是水解液中本身含有一定量的氮源。随着 NH_4^+ 浓度的增加，糖耗速率逐步增加，糖酸转化率却逐步降低。如图 3.22 所示，各图标分别代表了 0-4.0 g/L NH_4Cl 时，柠檬酸的变化曲线。当 NH_4Cl 浓度梯度为 1.0-4.0 g/L 时， NH_4Cl 浓度为 1.0 g/L 时，产生最高的柠檬酸 67.56 g/L，转化率达到 48.76 %。

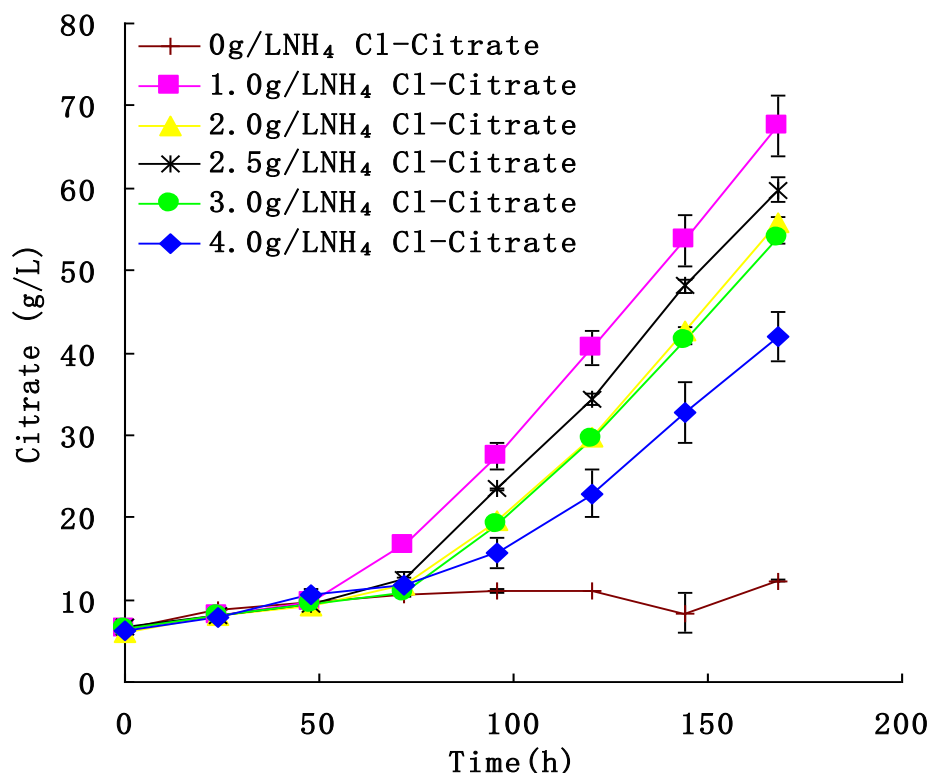
图 3.22 NH_4Cl 浓度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中柠檬酸积累的影响

Fig.3.22 Effect of NH_4Cl concentration on citrate accumulation by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

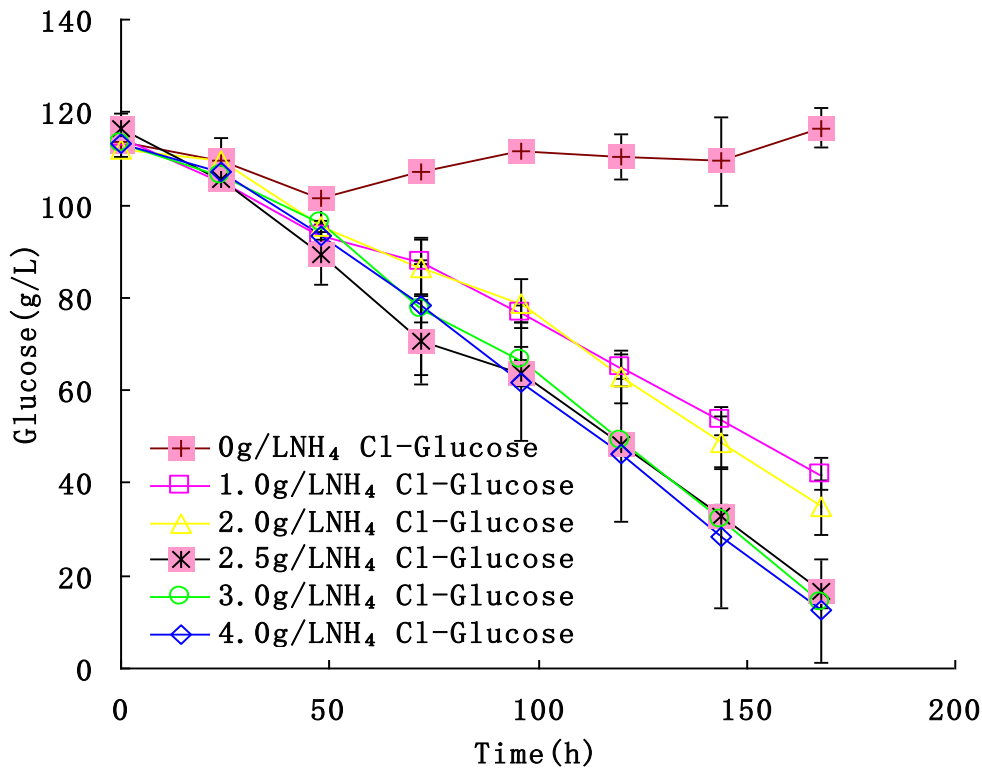


图 3.23 NH₄Cl 浓度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中葡萄糖消耗的影响

Fig.3.23 Effect of NH₄Cl concentration on glucose consumption by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

3.5.4 MnCl₂ 梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响

当 NH₄Cl 为 1.0 g/L 时, 测定了 MnCl₂ 浓度梯度对发酵的影响。Mn²⁺不足是柠檬酸转运至培养基中的关键。因为细胞膜上的柠檬酸通透酶只能转运柠檬酸-Mn²⁺螯合物^[9], 所以只有 Mn²⁺不足时, 柠檬酸才会运输至细胞外。由图 3.24 可知, 各图标分别代表了 0-4.5 mg/L MnCl₂ 时, 柠檬酸的变化曲线。当 MnCl₂ 浓度梯度为 0-4.5 mg/L 时, 柠檬酸的产量和转化率都几乎没有变化。可能由于水解液中含有适量的 Mn²⁺, 少量的添加 Mn²⁺, 并未影响柠檬酸的发酵。

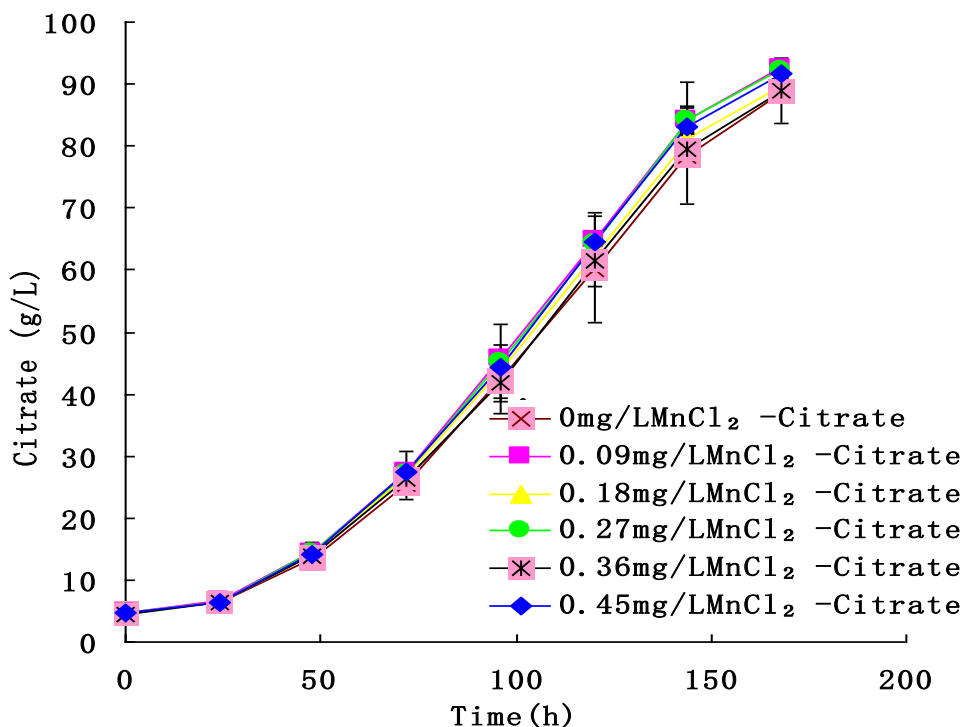


图 3.24 MnCl₂梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵影响

Fig.3.24 Effect of MnCl₂ concentration on citrate fermentation by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

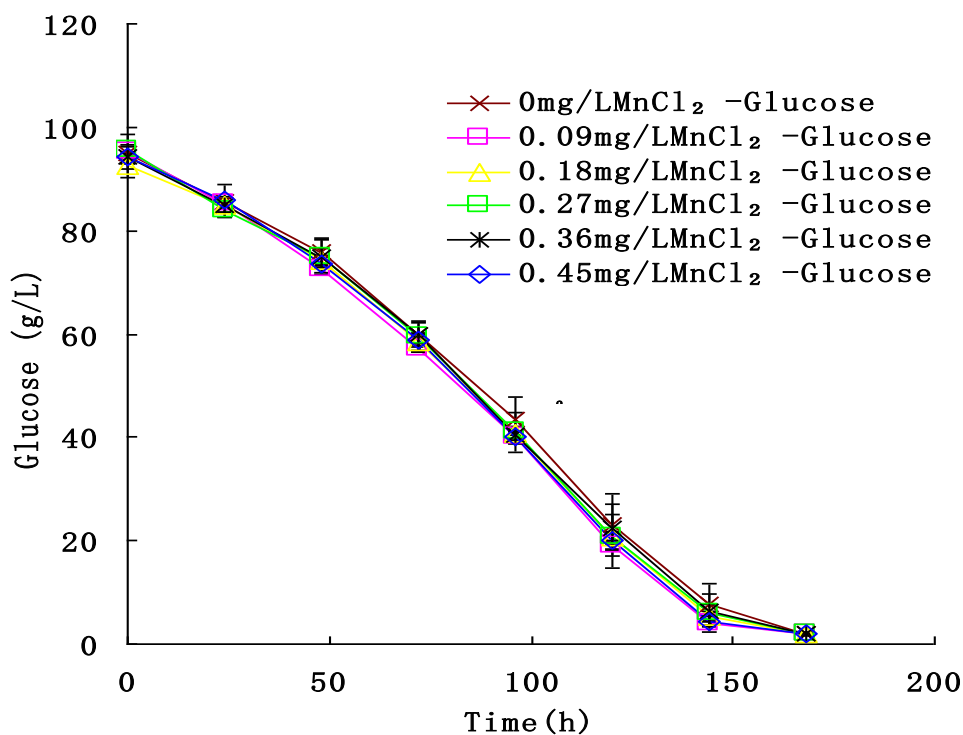


图 3.25 MnCl₂梯度对黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的葡萄糖消耗情况

Fig.3.25 Effect of MnCl₂ concentration on glucose consumption by *A. niger* SIIM M288 on detoxified corn stover hydrolysate

3.5.5 黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中最优条件下的发酵情况

综上所述，黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵最优条件为：33℃，初始 pH=6.0，NH₄Cl 为 1.0 g/L，不添加额外的 Mn²⁺的情况下。如图 3.25 所示，发酵 216 小时，产生最高的柠檬酸 98.27 g/L，转化率达到 77.20 %。菌体的形态为小颗粒状。虽然产量和转化率都有所提升，但是发酵效率仍然有待进一步提高。

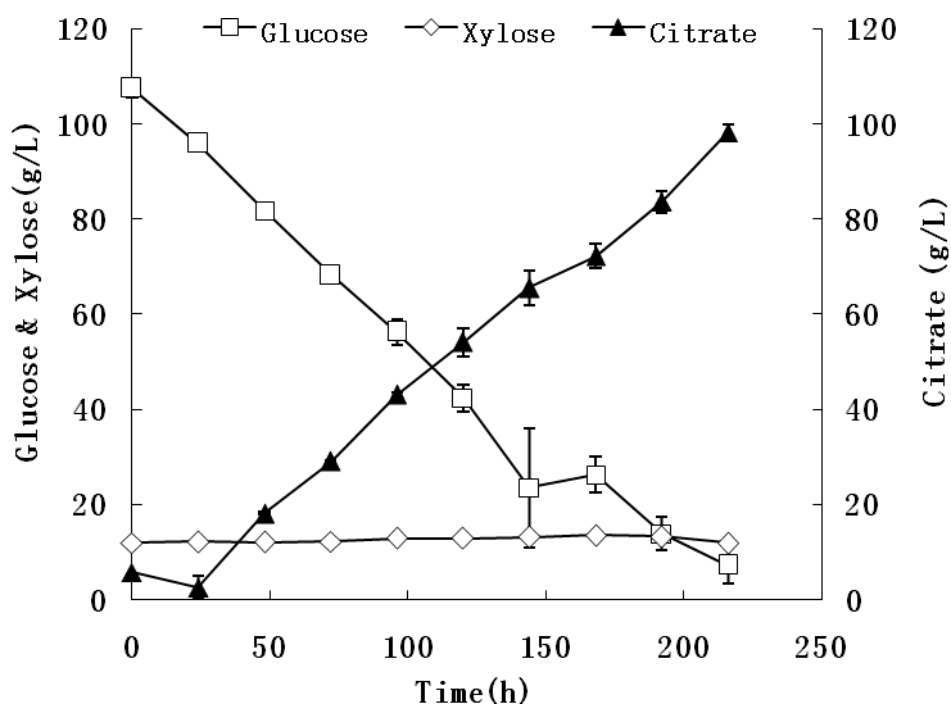


图 3.26 黑曲霉 SIIM M288 在脱毒玉米秸秆水解液中最优条件下的发酵情况

Fig.3.26 The fermentation result of the *A. niger* SIIM M288 on the detoxified corn stover hydrolydate under the optimum condition

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

4.1.1 黑曲霉是柠檬酸生产菌株。其中，初糖浓度、 NH_4^+ 浓度、孢子还是菌体的形式接种、以及菌体生长形态对发酵都有显著地影响。初糖浓度或 NH_4^+ 浓度过低，ATP 和柠檬酸会抑制 EMP 途径中的磷酸果糖激酶。一定浓度的初糖和 NH_4^+ 可以解除这种抑制。另外，从实验结果可知，直接用孢子发酵可以获得更好的柠檬酸产量，黑曲霉发酵产柠檬酸的最佳形态为颗粒状，直径约为 0.2-0.5mm。

4.1.2 秸秆水解液中的主要抑制物对黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸在生产上几乎都有抑制。所以，选择脱毒后的玉米秸秆作为原料，才能对其进行发酵。

4.1.3 黑曲霉 SIIM M288 是一株高产纤维素柠檬酸的菌株。在脱毒的 25%的玉米秸秆水解液中，216 小时可以产生 98.27g/L 柠檬酸，转化率达到 77.20%。菌体的形态为小颗粒状。其最优发酵条件为 33℃，初始 pH=6.0， NH_4Cl 为 1.0g/L，不添加额外的 Mn^{2+} 的情况下。但是，生产率并不高，所以，该工艺需要进一步的优化和改进才能获得更高的产率。

4.1.4 玉米秸秆水解液中存在一定量的金属离子。 Mn^{2+} 是黑曲霉生长必需的元素。在不添加 Mn^{2+} 的情况下，依然可以获得同等量的柠檬酸产量。

4.2 展望

4.2.1 在不添加黑曲霉生长必需的元素 Mn^{2+} 的情况下，依然可以获得同等量的柠檬酸产量。在添加更少量的 NH_4Cl 时，柠檬酸的最终浓度居然提高了。可见，玉米秸秆水解液中存在一定量的金属离子，也可有可能存在一定 NH_4^+ 的。所以，可以对其他离子浓度做一些优化，或许可以更简化培养基。

4.2.2 在黑曲霉发酵柠檬酸的过程中，如添加一定的诱导剂可以促进柠檬酸产量的提升。如：添加一定量的甲醇后，甲醇可增加柠檬酸的通透性，使胞内的柠檬酸更多地分泌到胞外。如果添加一定的乙醇，可作为黑曲霉额外的碳源，增加柠檬酸的最终产量。所以，如果在脱毒玉米秸秆水解液中，添加诱导剂的话，或许可以使柠檬酸产量进一步提升。

4.2.3 由筛菌的结果可知，孢子比菌体有更强的适应性。所以，可以考虑用孢子直接发酵，或许可以获得更优的发酵工艺。或者用孢子在未脱毒的玉米秸秆中发酵，或许可以将工艺中脱毒的步骤省略。

4.2.4 黑曲霉本身有胞外的水解酶，可以利用蔗糖。所以，可以利用黑曲霉的胞外水解酶，将发酵工艺进一步优化，实现同步糖化发酵。但是，黑曲霉发酵时的培养基粘度、温度、pH 等条件和水解的最适条件未必吻合，所以，其工艺有待进一步探索和优化。

4.2.5 黑曲霉 SIIM M288 在脱毒的玉米秸秆水解液中获得 98.27g/L 的柠檬酸，而在

相应的合成培养基中却只能生成大约 30g/L 的柠檬酸。可见，在脱毒的玉米秸秆水解液中必然存在着促进黑曲霉 SIIM M288 生产柠檬酸的因素。从实验结果可知，秸秆水解液中主要的抑制物对黑曲霉 SIIM M288 存在明显的抑制作用，所以，该因素或许是抑制物以外的因素。

参考文献

- [1] 张诗雪. 柠檬酸的生产应用与发展. 医药中间体及其化工原料. 2004, 4: 13-18
- [2] 孙荣, 王燕, 杨平平. 柠檬酸发酵现状及展望. 中国调味品. 2011, 36(1): 90-93
- [3] 熊俊君, 杜涛. 产柠檬酸用黑曲霉的选育. 农产品加工业. 2010, 7: 27-30
- [4] 刘志伟, 张晨. 柠檬酸发酵与控制. 嘉应大学学报自然科学. 1998, 6: 55-60
- [5] Bel n Max, Jos  Manuel Salgado, Noelia Rodr  guez, Sandra Cort  s, Attilio Converti, Jos  Manuel Dom  nguez. Biotechnological Production of Citric Acid. Brazilian Journal of Microbiology. 2010, 41: 862-875
- [6] 钦传光. 柠檬酸生产中黑曲霉菌体的利用研究. 粮食与饲料工业. 1997, 10: 22-23
- [7] Xiao Yan Liu, Zhe Chi, Guang Lei Liu, Catherine Madzak, Zhen Ming Chi. Both Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in Decrease in ACL1 Gene Expression and Increase in ICL1 Gene Expression in Marine-Derived Yeast *Yarrowia lipolytica* Expressing INU1 Gene Enhance Citric Acid Production from Inulin. Marine Biotechnology. 2013, 15: 26-36
- [8] A.R. Angumeenal, D. Venkappayya. An overview of citric acid production. Food Science and Technology. 2013, 50: 367-370
- [9] Levente Karaffa, Christian P. Kubicek. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box. Applied Microbiology Biotechnology. 2003, 61(3): 189-196
- [10] 金其荣. 有机酸发酵工艺学. 中国轻工业出版社. 1989
- [11] Miranda Maki, Kam Tin Leung, Wensheng Qin. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. International Journal of Biological Sciences. 2009, 5(5): 500-516
- [12] Xi Chen, Zihui Li, Xiaoxi Zhang, Fengxian Hu, Dewey D. Y. Ryu, Jie Bao. Screening of Oleaginous Yeast Strains Tolerant to Lignocellulose Degradation Compounds. Applied Biochemistry Biotechnology. 2009, 159(3): 591-604
- [13] J. P  rez, J. Mu  noz-Dorado, T. de la Rubia, J. Mart  nez. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. International Microbiology. 2002, 5(2): 53-63
- [14] 池玉杰, 鲍甫成. 木质素生物降解与生物制浆的研究现状分析. 林业科学. 2004, 40(3): 167-174
- [15] 谢占玲, 吴润. 纤维素酶的研究进展. 草业科学. 2004, (4): 72-76
- [16] 王巧兰, 郭刚, 林范学. 纤维素酶研究综述. 湖北农业科学. 2004, (3): 14-19
- [17] Arnold L. Demain, Michael Newcomb, J. H. David Wu. Cellulase, Clostridia, and Ethanol.

Microbiology And Molecular Biology Reviews. 2005, 69(1): 124-154

[18] Y.H. Percival Zhang, Michael E. Himmel, Jonathan R. Mielenz. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006, (24): 452-481

[19] Alireza Esteghlalian, Andrew G. Hashimoto, John J. Fenske, Michael H. Penner. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*. 1997, 59(2):129-136

[20] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 李志义. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展. *石油与天然气化工*. 2007, 36(6): 452-462

[21] 李洪兴, 张笑然, 沈煜, 董永胜, 鲍晓明. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施. *生物工程学报*. 2009, 25(9): 1321-1328

[22] 林贝, 赵心清, 葛旭萌, 白凤武. 玉米秸秆酸解副产物对重组酿酒酵母发酵的影响. *中国生物工程杂志*. 2007, 27(7): 61-67

[23] 王丹, 王洪辉, 王竞, 汪楠, 张杰, 邢建民. 糠醛和 5-羟甲基糠醛对大肠杆菌产丁二酸的影响. *生物工程学报*. 2013, 29(10): 1463-1472

[24] Eva Palmqvist, Barbel Hahn-Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1):17-24

[25] Jian Zhang, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, Nan Wang, Wei Wang, Jie Bao. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26

[26] 张建安, 张小勇, 韩润林, 刘德华, 李佐虎. 用黑曲霉发酵纤维素酶解液生产柠檬酸的研究. *微生物学杂志*. 2001, 21(3): 5-8

[27] Gurpreet Singh Dhillon, Satinder Kaur Brar, Mausam Verma, Rajeshwar Dayal Tyagi. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 2011, 54: 83-92

[28] Gurpreet Singh Dhillon, Satinder Kaur Brar, Mausam Verma. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, 47: 542-548

[29] K.Hariveeran Goud, A.Srilakshmi, A.Praveen Kumar, G.Narasimha. Citric acid production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation using fruit wastes. *Biotechnology*, 2012, 6(3): 93-96

[30] Alagarsamy Karthikeyan, Nallusamy Sivakumar. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5552-5556

- [31] 黄旭初, 金湘, 毛培宏. 柠檬酸发酵菌黑曲霉的菌种改良述评. 生物技术. 2005, 15(3): 93-95
- [32] Cristine Rodrigues, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Juliana Teodoro, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol. Improvement on Citric Acid Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC Mutant Using Citric Pulp. Applied Biochemistry Biotechnology. 2009, 158(1):72-87
- [33] Haq Ikramul, Sikander Ali, M.A. Qadeer, Javed Iqbal. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. Bioresource Technology. 2004, 93: 125-13
- [34] Hossam S. Hamdy. Citric acid production by *Aspergillus niger* grown on orange peel medium fortified with cane molasses. Annals of Microbiology. 2013, 63: 267-278
- [35] Maja Capuder, Tina Šolar, Mojca Benčina, Matic Legiša. Highly active, citrate inhibition resistant form of *Aspergillus niger* 6-phosphofructo-1-kinase encoded by a modified *pfkA* gene. Journal of Biotechnology. 2009, 144(1): 51-57
- [36] Gurpreet Singh Dhillon, Surinder Kaur, Satinder Kaur Brar, Mausam Verma. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. Industrial Crops and Products. 2012,38: 6-13
- [37] Ding Bang Xu, Cynthia P. Madrid, Max Rfih, Christian P. Kubicek. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology Biotechnology. 1989, 30:553-558
- [38] Murad A. El Holi, Khalaf S. Al Delaimy. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology. 2003, 2 (10): 356-359
- [39] Seal Aasar. Submerged Fermentation of Cheese Whey and Molasses for Citric acid Production by *Aspergillus niger*. International Journal of Agriculture and Biology. 2006, 8(4): 463-467
- [40] Gurpreet Singh Dhillon, Satinder Kaur Brar, Mausam Verma. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. International Journal of Food Science and Technology. 2012, 47: 542-548
- [41] Sikander Ali, IkramUL Haq. Role of different additives and metallic micro minerals on the enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* MNNG-115 using different carbohydrate materials. Journal Basic Microbiology. 2005, 45(1): 3-11
- [42] Mirminachi F., Zhang A., Roehr M. Citric Acid Fermentation and Heavy Metal Ions I. Effects of Iron, Manganese and Copper. Acta Biotechnologica. 2002, 22(34): 363-373
- [43] P. Navaratnam, V. Arasaratnam, K. Balasubramaniam. Channelling of glucose by methanol for citric acid production from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 1998, 14(4): 559-563

- [44] Andrew J. Moyer. Effect of Alcohols on the Mycological Production of Citric Acid in Surface and Submerged Culture I. Nature of the Alcohol Effect. *Journal of Applied Microbiology*. 1952, 1: 1-7
- [45] K. Samuel John, Mir Naiman Ali, G. Umakumar, Hajera Tabassum. Studies on Inductive effect of Methanol on Production of Citric acid from Waste Cellulosic Substrates using locally isolated *Aspergillus niger* and MTCC *Aspergillus niger* strains. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2012,4 (2): 431-441
- [46] 李晶, 冯金荣, 郭睿, 杨雪雪, 万里. 黑曲霉柠檬酸积累代谢机制研究进展. *湖北农业科学*. 2013, 52(7): 1489-1493
- [47] M. McIntyre, B. McNeil. Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20: 135-142
- [48] 石忆湘, 刘祖同. 黑曲霉发酵玉米淀粉生产柠檬酸. *清华大学学报(自然科学版)*. 1998, 38(6): 52-55
- [49] 陈小真, 陈惠萍, 郭杰炎. 玉米粉原料的柠檬酸发酵初步研究. *工业微生物*. 2000, 30(1): 47-51
- [50] 朱亨政, 杨芸芬, 朱宝娣, 王桂香. 高浓度薯干柠檬酸发酵新菌株黑曲霉 No.3008 的选育. *食品与发酵工业*. 1984, 6: 1-6
- [51] Eva Palmqvist, Barbel Hahn Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 25-33

致谢

本论文从设计、选题、到实施以及论文撰写都是在导师鲍杰教授的精心指导和帮助下完成的，鲍老师对科研工作的严谨和对教学工作的负责，对我产生了深刻的影响。在实验过程中鲍杰老师时刻关心我的实验进展，并且给予我很多启迪和建议，而且在论文撰写时给与了我极大的帮助和指导。在此，我将致以我最真挚的感谢和最崇高的敬意，在今后的日子里我一定会恪守导师的谆谆教诲，在学习和工作的道路上勤耕不辍。

感谢张建老师和高秋强老师的指导和帮助。

感谢同级同学肖雁秋、冉红、安瑞鑫、吴倩、张龙平和张宏森、王娟、易霞、王霞、罗之臣、何燕青、顾翰琦等师兄姐妹们，正是你们和我一起走过了这段艰难的实验过程，一起分析解决难题，一起分享成功的喜悦。

在此我还要特别感谢我父母的支持与鼓励。

再次感谢所有关心和帮助过我的老师、朋友，谢谢你们！