

发酵法生产柠檬酸的研究进展

王 博 (吉林省石油化工设计研究院, 吉林 长春 130000)

摘 要: 柠檬酸 (citric acid) 是一种因其广泛的应用领域和衍生物产品需求的日益增大, 产量及重要性也在不断的增加, 如何高效、低成本的生产柠檬酸显得尤为重要。针对柠檬酸的发酵菌株、发酵原料、发酵方式以及分离提纯方式特点对产品的影响进行了综述, 并对柠檬酸生产研究的新技术和发展趋势进行了展望。

关键词: 柠檬酸; 批式发酵; 分离纯化; 高产量

0 引言

柠檬酸又名枸橼酸, 化学名称为 2- 羟基丙烷 -1,2,3- 三羧酸 ($C_6H_8O_7$)。柠檬酸常带有一分子结晶水 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 是自然界中广泛存在的三羧酸类化合物, 是一种较强的有机酸。柠檬酸作为一种天然成分, 是动植物体内生理代谢的中间产物, 物理特性为无色透明或半透明的晶体或 (微) 粒状粉末、无臭, 同时具有羟基和羧基, 极易溶于水, 微溶于乙醚, 不溶于四氯化碳、苯、甲苯等其他有机溶剂^[1-3]。

近年来, 在许多新型产业领域得应用中逐渐出现了柠檬酸的身影, 如药物运输与组织工程, 纳米医学等领域^[4-6], 其需求市场逐年增长, 平均以每年 5% 的速度增长。柠檬酸产量是仅次于酒精的世界第二大发酵产品^[7], 所以提高柠檬酸的产量, 即使增幅较小也会产生巨大的社会及经济效益, 所以开发一种高效合成柠檬酸方法的十分重要。本篇以工业化生产的视角, 从发酵菌株、发酵原料、发酵方式、纯化技术及新技术应用等方面分析柠檬酸生产过程中的关键因素, 并对柠檬酸生产研究的发展方向进行了展望。

1 发酵菌株

微生物发酵法是柠檬酸工业化生产的最主要方法, 全球约 99% 的产品是由发酵法生产的。用于柠檬酸的微生物发酵菌种分为酵母与黑曲霉两种。解脂耶氏酵母可以利用不同种类碳源如烷烃类及葡萄糖等积累大量柠檬酸, 已被应用于生产中; 但酵母发酵过程中同时积累大量副产物异柠檬酸 (5%~10%), 造成后续柠檬酸分离纯化困难, 限制了规模化应用^[8-9]。目前对于发酵菌株的主要研究为通过基因工程制备重组工程菌。在 2007 年, Förster 使用重组解脂耶氏酵母 H222-S4 (p671CL1), 在诱导型 XPR2 启动子与多拷贝 ICL1 条件下, 提高蔗糖酶表达量, 柠檬酸产率 $0.33g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, 同时降低副产物的比率 (小于 5%)^[10]。在 2013 年, Liu 通过敲除 ATP- 柠檬酸裂解酶 (ACL)

基因并过量表达异柠檬酸裂解酶 (ICL), 副产物异柠檬酸产量下降^[11]。基因工程在改造菌种时可在一定程度上减少副产物积累, 但重组工程菌的稳定性与柠檬酸的安全性有待于进一步考察。

黑曲霉是食品级安全的丝状真菌, 黑曲霉具有发酵效率高、酶系丰富、副产物少等优势, 能够很好的调控糖酵解的通量, 以及柠檬酸从线粒体和细胞质的分泌, 仍然是柠檬酸发酵发展的重要方向, 也是提高柠檬酸生产率的重要途径。目前黑曲霉种子仍然沿用传统二级培养方式, 首先要培养成熟的黑曲霉种子, 孢子接种培养成熟的菌丝球, 然后转接发酵培养。孢子的制备采用固态培养方式, 一批成熟的孢子需经平板筛选, 斜面培养、茄子瓶培养、麸曲桶等逐级扩大培养过程, 制备过程繁琐且周期长 (制备周期 30d 以上); 二级种子培养周期较长, 孢子萌发需要 12h 以上, 消耗大量辅助时间与生产成本^[12]; 同时由于固态培养方式固有的缺陷, 缺乏精确评价种子 (孢子) 活力的方法, 实施监控全过程孢子活力比较困难, 传统培养模式下孢子活力具有多样性, 会影响后续发酵过程波动。因此, 改进黑曲霉种子培养工艺、缩短生长周期来降低生产成本, 是尚待解决的一个重要问题。目前已有学者通过射线等方式对菌株进行诱变处理, 如在 2019 年, 孙士健以菌株 zs-10 为出发株, 经过 γ 射线及亚硝基胍复合诱变, 得到菌株 zs-10-5, 这种菌株高产且遗传稳定性高。此菌株在发酵生产柠檬酸的过程中, 比出发菌株发酵产酸量提高 10%, 周期缩短至 3h, 转化率提高了 5%^[13]。

2 发酵原料

2.1 不同种类发酵原料

柠檬酸产生菌株可以利用多种碳源进行发酵培养, 淀粉质原料仍然是柠檬酸工业化生产的重要选择, 如玉米淀粉、稻米粉、木薯淀粉、小麦淀粉等。淀粉质原料不能被菌株直接利用进行发酵, 需要先通过液

化糖化成为小分子单糖后,才能作为柠檬酸发酵的原料^[14-16]。柠檬酸发酵过程中,基于发酵菌种黑曲霉自身的糖化能力,将液化处理的淀粉质原料进行同步糖化发酵;由于同步糖化发酵的工艺特点,发酵过程中葡萄糖供给速率不足往往成为制约发酵效率提升的关键;而葡萄糖生成速率则受到液化效果与自身糖化酶活力的影响,往往成为发酵产酸提升的瓶颈。因此,淀粉质原料的液化糖化阶段会显著影响整个柠檬酸发酵过程。黑曲霉自身分泌的液化型淀粉酶系效率有限,水解效率无法满足柠檬酸合成代谢需求;淀粉质原料需经 α -淀粉酶水解液化,切割大分子链形成短链糊精与寡糖,降低原料黏度,为糖化过程创造条件。在现有柠檬酸原料液化工艺中主要使用商品 α -淀粉酶,依据制造商提供的通用化条件处理原料,未考虑对特定底物催化效率与稳定性。尤其是当前淀粉质原料发酵仍然采用传统的碘试法检测液化终点又存在精确度低和波动性大的局限,以DE值作为液化评价指标,然而DE值无法真实反映糊精混合物的糖分组成和分子量分布,不足以作为判断液化效果的依据。此外,黑曲霉糖化酶属外切型淀粉酶,对不同结构底物效率不同,对于长链糊精催化效率更高;进一步地,Hiromi^[17]研究发现对低聚糖的 K_m 值为0.02~0.14mM,对麦芽糖的 K_m 值为0.18~1.4mM因此,建立一种与柠檬酸发酵菌种自身糖化相关联的原料液化评价标准,精细化调控淀粉质原料液化组分,有利于改善液化效果,进而改善后续发酵过程中葡萄糖供给速率。

2.2 氮源

在柠檬酸发酵生产中,无机氮源和有机氮源均会对柠檬酸发酵产生影响。在2019年,叶向库等的研究中,对以脱胚玉米液化低温挤出物为基底的柠檬酸发酵过程中,向其中分别添加无机氮源和有机氮源,研究其对发酵的影响。结果显示尿素能维持黑曲霉菌丝球良好状态,添加质量浓度1g/L后柠檬酸发酵良好,经72h发酵后产酸达到9.82g/100g。结果表明,添加有机氮源时玉米渣发酵后柠檬酸产率要优于添加无机氮源硫酸铵对柠檬酸发酵的促进效果^[18]。

3 发酵方式

发酵法生产柠檬酸,从培养方法可以分为浅盘发酵、固态发酵与液态深层发酵三种方式。浅盘发酵方式已淘汰,固态发酵方式自动化程度较低,废料成分复杂,造成产品分离提取困难,很难实现规模化运营。液态深层发酵方式具有劳动强度小、生产效率高、占

用空间小、自动化程度高等优势,是柠檬酸工业化生产的最主要方式,约超过80%的柠檬酸产品是通过此发酵方式获得的。

深层发酵分为分批发酵和连续发酵。分批发酵模式是柠檬酸最主要的发酵模式,但存在一些缺陷如能效低、辅助时间长、设备利用率偏低等,这些缺陷制约了柠檬酸产能的扩大。相比较而言,连续发酵模式与半连续发酵更具有优势。柠檬酸合成属于部分生长偶联型,不适合采用连续过程发酵,但经过许多学者的研究,应用于柠檬酸的此种发酵方式有了一定的进展:Arzumanov等^[19]开发了一种Yarrowia lipolytica VKM Y-2373发酵柠檬酸工艺,发酵过程比较稳定;Rywińska等采用Yarrowia lipolytica Wratistavia AWG7发酵生产柠檬酸,也实现了酵母细胞能够较长时间维持细胞活力^[20]。因为黑曲霉特殊的菌丝体结构在连续培养过程中,会造成溶解氧运输受到限制,导致细胞代谢与柠檬酸合成异常,因此半连续或连续发酵柠檬酸研究目前仍然集中在酵母菌,很少有黑曲霉的相关研究,仅在一些研究中固定化黑曲霉细胞,控制菌丝球大小,但此方法很难维持培养液菌丝球保持较高的细胞活性,限制了此方法的广泛应用。因此,如何有效控制连续培养过程中菌丝球形态,保持细胞活力是实现黑曲霉连续发酵的一个重要课题。

4 分离纯化技术

当前柠檬酸生产工艺的主要区别在提取技术上。提取技术主要有氢钙法、色谱法、萃取法,目前主要采用的提取工艺为氢钙法。固体柠檬酸钙在酸解罐内与硫酸进行酸解反应,酸解反应生成物(硫酸钙)经真空带式过滤器过滤除去,柠檬酸清液转入下道精制工序。此方法虽然有一定量的硫酸钙产出,消耗了资源,但硫酸钙经洗涤后作为综合利用原材料,比如经过环保公司专有研发技术处理,可作为土壤中和剂应用于周边盐碱性土地改良,产生一定经济效益。

5 新技术应用

目前国内柠檬酸生产企业对柠檬酸生产工艺有许多新技术应用,如将近红外光谱技术应用到液化清液检测中,实时获得含氢基团的吸收信息,在对总糖总氮检测的同时创新性地引入统计过程监控的思想,分别对检测参数、光谱等进行监控,实现液化清液生产的事前预警;在原料处理方面,开发原料连续投料技术、淀粉渣残糖回收技术、高浓度液化技术等;针对固废及废气,开发高品质柠檬酸石膏制备技术和

VOCs 废气处理技术。

6 总结与展望

柠檬酸作为一种天然无毒无害的有机酸,在医药、化妆品、食品等领域具有市场开发潜力。采用连续发酵法生产柠檬酸,高产量、高产率、高生产强度的发酵过程技术是未来主要的研究方向。针对柠檬酸传统生产工艺存在问题,可以聚焦于以下研究,例如如何制备适合高浓度发酵的菌种;柠檬酸发酵原料精细化调控;利用近红外快速检测技术解决生物发酵生产过程检测数据滞后和非线性的难点问题,进一步提高发酵效率,降低发酵消耗;柠檬酸废水资源化利用课题等,以期在发酵法生产柠檬酸及衍生物方面取得突破。

参考文献:

- [1] BETIKU E, ADESINA O A. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 55: 350-354.
- [2] 徐艳. 黑曲霉利用玉米粉生产柠檬酸的培养基优化研究 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(16): 42-46.
- [3] DHILLON G S, BRAR S K, KAUR S, et al. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 41: 78-84.
- [4] 王宝石, 陈坚, 孙福新, 等. 发酵法生产柠檬酸的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(9): 251-256.
- [5] 张鸿飞, 秦邴, 蒋水星, 等. 玉米液化清液发酵生产柠檬酸工艺研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(2): 155-161, 202.
- [6] Rywinska A, Rymowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors [J]. *J. Ind. Microbiol. Biot*, 2010, 37(5): 431-435.
- [7] Frster A, Aurich A, Mauersberger S, et al. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Appl. Microbiol. Biot*, 2007, 75(6): 1409-1417.
- [8] Liu X Y, Chi Z, Liu G L, et al. Both 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 [J]. *Mar. Biotechnol*, 2013, 15(1): 26-36.
- [9] Xin B, Xia Y, Zhang Y, et al. A feasible method for growing fungal pellets in a column reactor inoculated with mycelium fragments and their application for dye bioaccumulation from aqueous solution [J]. *Bioresource Technol*, 2012, 105: 100-105.
- [10] 孙士健, 王丽娟. 复合诱变筛选高产柠檬酸黑曲霉及其发酵研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(17): 194-200.
- [11] Carlos R. Soccol L P S V, Cristine Rodrigues, Pandey A A. New perspectives for citric acid production and application [J]. *Food. Technol. Biotechnol*, 2006, 44(2): 141-149.
- [12] M. Hossain J D B, and I. S. Maddox The effect of the sugar source on citric acid production [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1984, (19): 393-397.
- [13] Dawson M W, Maddox I S, Boag I F, et al. Application of fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger*: The effects of dilution rate and dissolved oxygen tension [J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1988, 32(2): 220-226.
- [14] Hiromi K, Ohnishi M, Tanaka A. Subsite structure and ligand binding mechanism of glucoamylase [J]. *Mol. Cell. Biochem*, 1983, 51(1): 79-95.
- [15] 叶向库, 申德超. 不同氮源对脱胚玉米挤出物发酵生产柠檬酸的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(16): 233-236.
- [16] Arzumanov T, Shishkanova N, Finogenova T. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeated-batch culture on ethanol [J]. *Appl. Microbiol. Biot*, 2000, 53(5): 525-529.
- [17] Rywinska A, Rymowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors [J]. *J. Ind. Microbiol. Biot*, 2010, 37(5): 431-435.
- [18] 王宝石. 黑曲霉发酵生产柠檬酸的关键节点解析及对策 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.6.
- [19] 郝超. 基于 NIR 的柠檬酸发酵液化 [D]. 无锡: 江南大学, 2020.6.
- [20] 徐艳. 黑曲霉利用红薯粉生产柠檬酸的发酵条件研究 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(4): 127-130.