

农用废弃物固态发酵生产衣康酸工艺研究*

俞志敏, 吴克, 金杰, 陈向明

(合肥学院生物与环境工程系, 城市固废处理与资源化利用安徽省工程技术研究中心, 安徽 合肥, 230022)

摘要 以土曲霉 *AS₃2811* 为发酵菌种, 农用废弃物麸皮 7.5 g, 玉米芯 6.0 g 为出发培养基, 在自然 pH 值条件下采用单因素试验研究碳源、氮源、无机盐对衣康酸产酸效果的影响。结果显示, 该菌可以利用实验所选择的碳源生产衣康酸, 葡萄糖为碳源时得率最高; 氮源实验结果表明, NH_4NO_3 是最适的产酸氮源。在单因素试验的基础上进行了五因素四水平的正交试验以优化产酸工艺。衣康酸生产的优化条件为: 250 mL 三角瓶中加入玉米芯 7.5 g、麸皮 6.0 g、葡萄糖 4 g、营养液 25 mL (NH_4NO_3 , 4 g/L; KH_2PO_4 , 0.1 g/L; MgSO_4 , 6 g/L; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 4 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g/L), 接种量为 1 mL (1×10^7 孢子/mL)、温度 36℃、湿度为 65% 条件下自然发酵 72 h, 衣康酸产率可达 63.5%。

关键词 土曲霉, 衣康酸, 固态发酵, 有机酸

衣康酸又名亚甲基丁二酸、亚甲基琥珀酸或分解乌头酸, 是用途很广的有机酸, 也是重要的有机合成原料, 广泛地应用于化学合成领域^[1~3]。衣康酸的生产方法有化学合成法和发酵法^[4], 发酵法又分为表面发酵、深层发酵和固定化连续发酵。麸皮、玉米芯属于农用废弃物, 含有丰富的营养物质, 利用其发酵生产衣康酸价格低廉, 来源充足, 有着广阔的市场前景。本文以土曲霉 *AS₃2811* 为发酵菌种, 以麸皮、玉米芯为出发培养基进行固态发酵, 通过单因素和正交实验优化了固态发酵产酸条件, 并研究了衣康酸固态发酵的动力学特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

土曲霉 (*Aspergillus terreus*) *AS₃2811*, 购于中国典型物保藏中心。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 斜面培养基(g/L)

NaNO_3 2.0; K_2HPO_4 1.0; KCl 0.5; MgSO_4 0.5; FeSO_4 0.01; 蔗糖 30; 琼脂 20; 麸皮 3.0。

1.1.2.2 发酵出发培养基

麸皮 7.5 g; 玉米芯 6.0 g; 葡萄糖 3.0 g; 营养液 25 mL (NH_4NO_3 3.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g/

L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L; KH_2PO_4 0.05 g/L; NaCl 0.2 g/L)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 种子的培养

斜面菌种经 35℃ 培养 4~5 d, 取 1 环接种于种子培养基(斜面)上培养 4~5 d。

1.2.1.2 产酸培养

在无菌操作台上, 取斜面 6~7 支, 每支用 5~10 mL 无菌水洗孢子放入装有 1/3 玻璃珠三角瓶中振荡 15 min 后, 血小计计数 10^7 左右孢子接种发酵培养基中, 放入 36℃ 培养箱中培养。

1.2.1.3 实验工艺

将原始菌种转管到斜面培养基中培养 5~7 d, 用 10 mL 无菌水洗出孢子放入灭菌三角瓶中, 用玻璃珠打散孢子并采用血小计计数, 将稀释好的菌种接入已经灭菌的发酵培养基中 36℃ 发酵培养, 每天用 200 mL 蒸馏水浸提过滤, 取浸提液 10 mL 以碘量法^[5]测定衣康酸的绝对产量和产率(产率以干物质量为基准, 质量分数)。以 DNS 法^[6]测定还原糖的浓度。

2 结果与分析

2.1 培养基的组成对土曲霉产酸的影响

2.1.1 碳源对衣康酸发酵的影响

碳源是影响微生物生长及产酸的主要因素之一, 表 1 为更换不同碳源的发酵产酸结果。表明该菌株可以利用多种碳源产酸, 其中以葡萄糖效果最好。

第一作者: 硕士, 副教授(吴克教授为通讯作者)。

* 安徽省教育厅自然科学重点研究项目(kj2008A126); 安徽省科技厅科技攻关计划项目(07010202077)

收稿日期: 2008-09-09

表 1 不同碳源下衣康酸的绝对产量

碳源	蔗糖	麦芽糖	葡萄糖	淀粉	葡萄糖加米糠	玉米粉
衣康酸绝对产量/g	3.64	3.77	4.29	2.47	5.07	2.86

耐高糖高酸的衣康酸菌种被公认为优良品种,最早的菌种遇高糖浓度产酸能力急剧下降,1980 年代以后耐糖产酸能力才有较大提高。由图 1 可知,以葡萄糖为碳源的发酵培养基中,其产酸能力随着糖含量升高而增加,但到一定量时其产率有所下降,当葡萄糖含量达到 4 g 时为最好。可见过高的糖含量不仅会造成原料的浪费,而且还会使产品提取率下降。

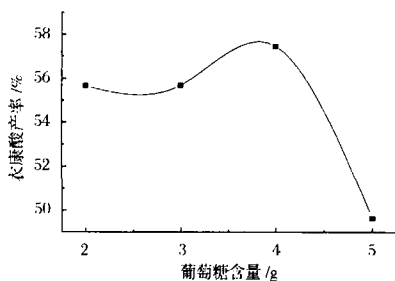


图 1 不同葡萄糖含量下衣康酸的产率

2.1.2 氮源对衣康酸的影响

衣康酸发酵以无机氮为主,麸皮、玉米芯作为辅助氮源也起着非常重要的作用,其他条件不变仅更换发酵培养基中的无机氮源,结果如表 2 所示。 NH_4NO_3 作为无机氮源对衣康酸发酵结果比较理想,以 NH_4NO_3 作为无机氮源,由图 2 可得,4 g/L 的 NH_4NO_3 产酸效果最好。

表 2 不同氮源对衣康酸的影响

不同氮源	NaNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
衣康酸绝对产量/g	4.03	4.81	7.67	5.72

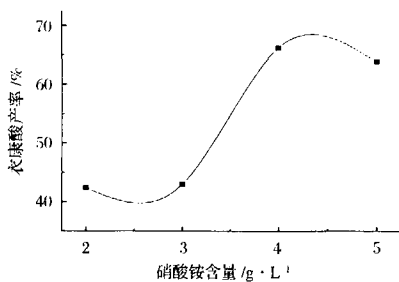


图 2 不同硝酸铵含量对衣康酸产率的影响

2.1.3 无机盐及金属离子对衣康酸发酵的影响

微生物生长、繁殖和产物的形成过程中需要各种金属离子和微量元素。实验中重点考查了 K^+ (KH_2PO_4)、 Mg^{2+} ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、 Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 对衣康酸发酵的影响。由图 3 可知,磷酸

盐对衣康酸发酵有促进作用,但过量的磷酸盐对土曲霉产衣康酸确有抑制作用,磷酸盐在 0.1 g/L 时效果最好。 MgSO_4 含量达到 6 g/L 时可达到较高的产酸率,再提高 Mg^{2+} 浓度对提高产酸作用不大。 Zn^{2+} 对土曲霉孢子的萌发有促进作用并有利于菌丝的快速生长,但对产酸的促进作用不是太大,浓度在 0.015 g/L 以下对产量有提高,大于 0.02 g/L 后对产量有抑制作用。

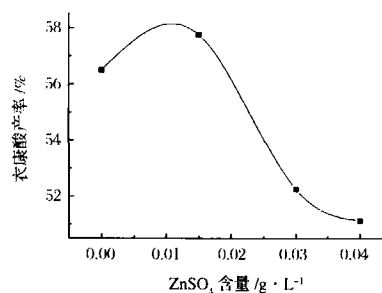
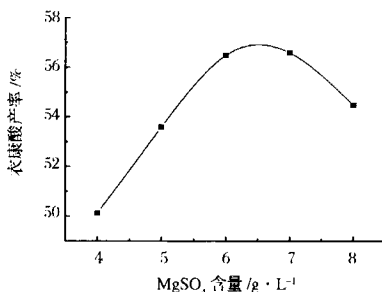
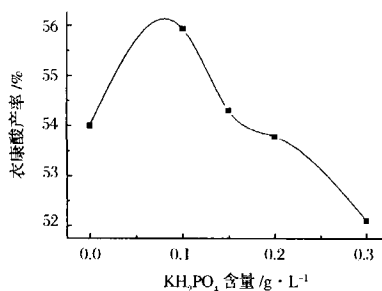


图 3 无机盐对产衣康酸产率的影响

2.1.4 通过正交实验优化发酵培养基

在单因素试验的基础上进行 5 因子 4 水平的正交试验,结果如表 3 和表 4 所示。从试验结果分析可知,几种因素对产酸的影响大小顺序为: $\text{A} > \text{D} > \text{E} > \text{C} > \text{B}$,各因素的优水平为 $\text{A}_3, \text{B}_2, \text{C}_4, \text{D}_3, \text{E}_2$,即: NH_4NO_3 4g/L; KH_2PO_4 0.1g/L; MgSO_4 6g/L; 葡

葡萄糖 4 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L 时发酵衣康酸在 36℃ 下产酸最高。

表 3 正交实验的因素水平表

水平	(A) NH_4NO_3 /g · L ⁻¹	(B) KH_2PO_4 /g · L ⁻¹	(C) MgSO_4 /g · L ⁻¹	(D) 葡萄糖 /g · L ⁻¹	(E) ZnSO_4 /g · L ⁻¹
1	2	0	4	2	0
2	3	0.1	5	3	0.015
3	4	0.15	6	4	0.03
4	5	0.2	7	5	0.04

表 4 正交实验结果

试验号	因 子					衣康酸 产率/%
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	43.608
2	1	2	2	2	2	48.32
3	1	3	3	3	3	47
4	1	4	4	4	4	48.32
5	2	1	2	3	4	48.9
6	2	2	1	4	3	43
7	2	3	4	1	2	31.3
8	2	4	3	2	1	49.5
9	3	1	3	4	2	48.2
10	3	2	4	3	1	68
11	3	3	1	2	4	74.6
12	3	4	2	1	3	60.4
13	4	1	4	2	3	62.8
14	4	2	3	1	4	63.4
15	4	3	2	4	1	60.32
16	4	4	1	3	2	65.2
K_1	42.4	54.0	50.125	55.65	56.525	
K_2	43.0	55.925	53.6	55.08	57.75	
K_3	66.0	54.3	56.5	57.45	51.125	
K_4	63.9	53.775	56.6	49.63	52.25	
R	23.6	2.15	6.475	7.82	6.625	

2.2 土曲霉固态发酵产衣康酸发酵过程曲线

为考察土曲霉固态发酵产衣康酸的动力学特征，在优化的条件下进行发酵产酸试验，结果如图 4。

实验表明，衣康酸的积累在 72~84 h 最多，产率可达到 63.5%。24~48 h 菌体生长迅速，24 h 后还原糖浓度开始下降，说明菌体大量生长迅速，用去还原糖后大量积累衣康酸。随之产酸量增多 pH 值随之下降，到 96 h 后衣康酸积累开始下降^[7]。

3 结论

本实验通过固态发酵，在自然 pH 值、36℃ 下，以麸皮、玉米芯为出发培养基，发现土曲霉 T8138 菌株是生产衣康酸的优良菌株，适合多种原料的衣康酸生产。实验表明，以麸皮、玉米芯为出发培养基的固态

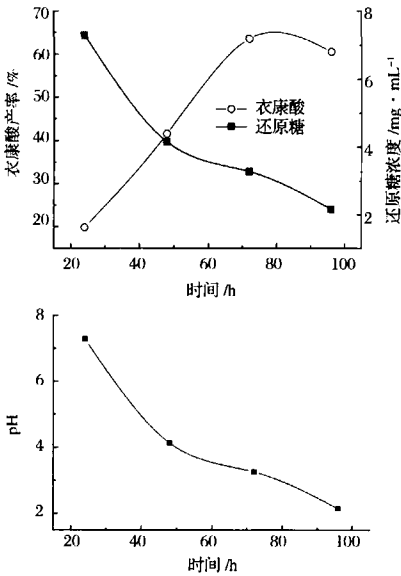


图 4 土曲霉产衣康酸发酵过程曲线

发酵生产衣康酸切实可行，麸皮、玉米芯含有丰富的营养物质，属于农用废弃物，利用其发酵生产衣康酸价格低廉，来源充足。葡萄糖、硝酸铵是土曲霉发酵的最适碳源和最适氮源。 MgSO_4 、 KH_2PO_4 等无机盐对发酵产酸有促进作用。

土曲霉 AS₃2811 固态发酵产酸优化条件为：250 mL 三角瓶中加入玉米芯 7.5 g，麸皮 6.0 g，营养盐 25 mL (NH_4NO_3 4 g/L、 KH_2PO_4 0.1 g/L、 MgSO_4 6 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L)，葡萄糖 4 g，接种量 1 mL(10^7 孢子/mL)于干培养基中，湿度为 65%，培养温度为 36℃，pH 自然发酵 72 h 后，衣康酸产量 $63.5\% \pm 3.5\%$ 。

参 考 文 献

- 1 Iqbal M, Saeed A. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40:178~182
- 2 Wu YM, Zhang BQ, Wu T, et al. Properties of the for-polymer of N-vinylpyrrolidone with itaconic acid, acrylamide and 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid as fluid-loss reducer for drilling fluid at high temperatures [J]. Colloid Polym Sci, 2001, 279: 836~842
- 3 Irina F Catta Preta, Solange K, Sakata G Garcia, et al. Thermal behavior of polyacrylonitrile polymers synthesized under different conditions and comonomer compositions [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007, 87 (3): 657~659
- 4 Wilke T, Vorlop KD. Biotechnological production of itac-

- onic acid[J]. Appl. Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 89~295
- 5 Yahiro K, Takahama T, Jai S R, et al. Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus* [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19 (7): 619~621
- 6 Miller LG. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. [J]. Anal Chem, 1959, 31: 426~428
- 7 刘淑芳, 蔡昭铃. 衣康酸发酵及动力学模型[J]. 过程工程学报, 2000(1): 58~63

Solid State Fermentation Condition for Itaconic Acid Production from Agricultural Waste

Yu Zhimin, Wu Ke, Jin Jie, Chen Xiangming

1(Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei)

2(Engineering Technology Research Center of Resource and Environmental Technology, Anhui Province, Hefei 230022, China)

ABSTRACT *Aspergillus terreus* AS₃2811 was used for production of itaconic acid from agricultural wastes like bran 7.5 g and corncob 6.0 g as the starting medium. Effects of single factors like carbon source, nitrogen source and inorganic salt on the production of itaconic acid with starting medium at natural pH were studied. Results showed that a variety of carbon sources could be used by the strain for acid production. Glucose was the best one among tested carbon sources. As nitrogen source, NH_4NO_3 was the best candidate for itaconic acid production. On the basis of single factor result, the orthogonal test with five factors — 4 levels was made for optimizing the itaconic acid production condition. The results showed the order of all the factors affecting acid production was $\text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 > \text{ZnSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4$. The optimal composition of the medium was as follow: in 250 mL flask bran 7.5 g, corncob 6.0 g, glucose 4.0 g, 25mL nutrient solution (NH_4NO_3 , 4 g/L; KH_2PO_4 , 0.1 g/L; MgSO_4 , 6 g/L; glucose, 4 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g/L), 1 mL inoculum of 1×10^7 spores, moisture 65%. After incubated at 36 °C for 72 h, the acid production was 63.5% (w/w dried medium).

Key words *Aspergillus terreus*, itaconic acid, solid-state fermentation, organic acids

行业动态

朝日啤酒将购青岛啤酒近 20%股份

2009年1月29日,日本朝日啤酒宣布,已经同意以6.665亿美元从Anheuser-Busch InBev手中收购青岛啤酒股份有限公司19.99%的股份,并计划到3月底前完成上述交易,日本朝日啤酒公司将成为青岛啤酒第二大股东。目前“青岛啤酒集团”仍是青岛啤酒的最大股东,拥有31%的股份;Anheuser-Busch InBev转让股份后,将变更为第3大股东,持有青岛啤酒的7.01%的股份。朝日啤酒以前曾和青岛啤酒有过合作,此次将从Anheuser-Busch InBev公司获取其所持有的大部分股份强化与青岛啤酒的合作,并考虑派遣董事进驻青岛啤酒。

天冠水溶蛋白项目取得突破性进展

2009年1月16日,天冠集团水溶性蛋白3000t生产线连续运行24h,整个生产工艺打通,共生产水溶蛋白10.17t,这标志着水溶性蛋白项目向规模化生产的道路上又迈进了一步。

水溶性小麦蛋白是小麦面筋(谷朊粉)的深加工产品。由于谷朊粉在食品领域用途有限,市场竞争激烈,为拓宽产品用途,提高产品价值,避免价格战,2006年上海天之冠可再生资源公司成功研制出水溶性小麦蛋白,该项目具有良好的市场前景,用湿面筋生产出来的水溶蛋白,其产品附加值远远高于谷朊粉,进一步提高了产品的市场竞争力。

在天冠集团科研人员的共同努力下,通过不断地钻研并尝试技术改造,经过数月奋战,终于生产出了第一批产品,为下一步连续化大生产奠定了基础,正常生产后,将成为企业新的经济增长点。水溶性蛋白项目获得突破,也是在当前国际金融危机加之原料小麦价格持续上涨的形势下,企业积极应对的一个策略。(天冠集团李瑞 周海鑫 陈铁供稿)