

朱莉莉, 李林强, 张宝善, 等. 橡子粉发酵柠檬酸[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 445-452.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.027

## 橡子粉发酵柠檬酸

朱莉莉<sup>1</sup>, 李林强<sup>1</sup>, 张宝善<sup>2</sup>, 裴亚利<sup>1</sup>, 周琦<sup>1</sup>, 付军伟<sup>1</sup>, 颜统晶<sup>1</sup>

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119; 2. 陕西省果蔬深加工工程技术研究中心, 陕西 西安 710119)

**摘要:** 橡子含较多单宁等涩味物质, 导致其淀粉利用率低。本研究通过测定脱单宁、酶解及发酵过程中的关键指标, 探究 70% 乙醇对单宁脱除效果的影响。采用数码生物显微镜及酸碱滴定法比较 4 种常见黑曲霉在发酵液中的形态及发酵产酸量。结果表明, 70% 乙醇脱单宁处理会显著促进橡子粉的液化和糖化作用, 发酵液中黑曲霉的生物量和产酸量显著提高 ( $P < 0.05$ ); 黑曲霉 SIIM M288 在 33 °C 下的柠檬酸产量为 37.30 g/L, 显著高于其他 3 菌株 ( $P < 0.05$ ), 该菌在发酵液中以菌丝球形态分布, 菌丝无色透明、短而粗、分支少、稀疏着生。说明, 脱单宁处理会促进橡子粉的柠檬酸发酵, 黑曲霉 SIIM M288 为橡子粉发酵柠檬酸的优势菌种, 最佳发酵温度为 33 °C。

**关键词:** 橡子粉; 脱单宁; 柠檬酸; 发酵; 黑曲霉

**中图分类号:** S789.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0445-08

## Citric acid fermentation of acorn powder

ZHU Li-li<sup>1</sup>, LI Lin-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Bao-shan<sup>2</sup>, PEI Ya-li<sup>1</sup>, ZHOU Qi<sup>1</sup>, FU Jun-wei<sup>1</sup>, YAN Tong-jing<sup>1</sup>

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China; 2. Research Center of Fruit and Vegetable Deep-Processing Technology, Xi'an 710119, China)

**Abstract:** Acorn contains plenty of astringent substances such as tannins, resulting in low starch utilization. In this study, the effects of 70% ethanol solution on the removal of tannins were investigated by measuring the key indicators in the process of de-tanninization, enzymatic hydrolysis and fermentation. Digital biomicroscopy and acid-base titration were used to compare the morphology of the four common *Aspergillus niger* in fermentation broth and the amount of acid production. The results showed that liquefaction and saccharification of acorn powder were significantly promoted in the treatment of 70% ethanol solution, and the biomass and acid production of the *Aspergillus niger* in fermentation broth were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The citric acid yield of *Aspergillus niger* SIIM M288 at 33 °C was 37.30 g/L, which was significantly higher than that of the other three strains ( $P < 0.05$ ). In addition, the strain was distributed in the form of mycelial pellets in fermentation broth, and its mycelia were colorless and transparent, short and thick, with few branches and sparsely born. In conclusion, the removal of tannin promotes the citric acid fermentation of acorn powder. *Aspergillus niger* SIIM M288 is the dominant strain

for the citric acid fermentation of acorn powder, and its optimum fermentation temperature is 33 °C.

**Key words:** acorn powder; detannin; citric acid; fermentation; *Aspergillus niger*

收稿日期: 2018-07-11

基金项目: 陕西师范大学中央高校基本科研业务费创新团队项目 (GK201601007); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2016KTCL02-33); 陕西省农业科技创新与攻关项目 (2015NY009)

作者简介: 朱莉莉 (1995-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。 (E-mail) Zhulili@snnu.edu.cn

通讯作者: 李林强, (E-mail) lilinq@snnu.edu.cn

橡子是壳斗科栎属植物的种子<sup>[1]</sup>。中国有丰富的橡子资源, 其种植面积达  $2.5 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>, 橡子年产量约  $1.0 \times 10^7$  t, 主要分布在云南、陕西、湖南和蒙

古等地,其中陕西省橡子年产量约占全国的1/3,主要集中在秦巴山区<sup>[2-3]</sup>。橡子富含淀粉,经检测脱壳的橡子仁含淀粉达50.00%~70.00%、可溶性糖2.00%~8.00%、蛋白质1.17%~8.72%、单宁0.26%~17.74%、油脂1.04%~6.86%、粗纤维1.13%~5.89%、灰分1.30%~3.40%<sup>[4]</sup>。橡子虽然含有丰富的淀粉、蛋白质等营养物质,但其加工利用率却很低,原因是橡子中含有较多的单宁等抗营养因子,并有很强的涩味,导致直接食用或加工受到限制<sup>[5]</sup>。因橡子淀粉含量高,有些食品加工者将橡子提取的粗淀粉加工成凉粉、面条,也有被用作饲料的,但并不普及,利用率很低,绝大多数成熟后从树上坠落于地面腐烂,造成资源的大量浪费。

柠檬酸作为一种最常用的添加剂,广泛应用于食品、医药、化妆品、化工等领域<sup>[6-8]</sup>,其产量和消费量仅次于酒精,为世界上第二大发酵产品,且全球市场需求量以平均每年5%的速度增长<sup>[9]</sup>。工业上主要采用发酵法制备柠檬酸,常用的微生物有酵母和黑曲霉。酵母发酵过程中会产生较多的异柠檬酸,造成后续柠檬酸分离纯化困难;而黑曲霉具有酶系丰富,发酵效率高、副产物少等优势,因此柠檬酸工业上多采用黑曲霉为发酵菌种<sup>[10-11]</sup>。工业上用于柠檬酸发酵的糖质原料中,相比精制糖,淀粉质原料因其经济性更具有竞争力。随着柠檬酸需求量的增加,市场竞争压力增大,寻找新型廉价的柠檬酸发酵原料是目前国际上普遍关注和研究的课题之一。

本研究以橡子为发酵原料,结合柠檬酸工业化生产工艺,主要研究橡子粉单宁脱除、橡子淀粉液化、糖化、菌种筛选及发酵条件等关键技术参数和工艺过程。这对提高橡子资源利用率和改进柠檬酸发酵技术有很好的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 主要试剂  $\alpha$ -淀粉酶、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)由北京奥博星生物技术有限责任公司生产,糖化酶由江苏常州凯乔生物化学有限公司生产,无水乙醇、酒石酸钾钠、正丁醇、醋酸、溴酚蓝等均为分析纯。

1.1.2 发酵菌种 黑曲霉 SIIM M288(*Aspergillus niger* SIIM M288)购自上海市工业微生物研究所,黑曲霉 CICC 2716(*Aspergillus niger* CICC 2716)和黑曲霉

CICC 2160(*Aspergillus niger* CICC 2160)来自中国工业微生物菌种保藏管理中心,黑曲霉 QL-1(*Aspergillus niger* QL-1)由齐鲁大学微生物实验室保存。

1.1.3 主要仪器 可见分光光度计(722型)购自上海光谱仪器有限公司,台式恒温振荡器购自上海跃进医疗器械有限公司,扫描电子显微镜(S-3400N)购自日本日立公司,数码生物显微镜[ME21(MS-HOT)]购自奥林巴斯公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 橡子粉的制备及预处理 成熟橡子采自秦岭南麓,自然晒干,去壳后粉碎备用。参照文献[12]选择70%乙醇水溶液进行脱单宁处理,按粉质量和乙醇液体积比1:5加入,磁力搅拌作用下进行单宁脱除,脱单宁后的橡子粉在1000 r/min转速下离心10 min,除去上清液,自然晾干后备用。

1.2.2 菌种活化与孢子悬液的制备 将保藏菌种接种到PDA斜面培养基,在霉菌培养箱28℃活化5 d,然后转接于PDA平板固体培养基中,相同温度条件下培养6~7 d,用适量无菌水将孢子洗下,振荡,制成均匀的孢子悬液,孢子数达每1 ml  $9.60 \times 10^7 \sim 1.33 \times 10^8$ 个。

1.2.3 橡子粉的糊化和液化 对不同脱单宁时间(0 min、30 min、60 min、90 min、120 min)的橡子淀粉进行糊化及液化。橡子粉与水按质量比1:5进行混合,在95℃加热糊化30 min,冷却至60℃,用氢氧化钙调节pH至6.0~6.5,按37 U/g加入 $\alpha$ -淀粉酶,酶解淀粉,用碘化钾试剂检测液化液的颜色,测定液化终了时的糖含量。

1.2.4 橡子粉的糖化 将橡子粉液化液用6 mol/L盐酸调节pH至4.2~4.5,调整温度至60℃,按250 U/g加入糖化酶,在搅动状态下保温糖化10 h,间隔一定时间测定糖化液的糖含量。

1.2.5 柠檬酸发酵 取橡子酶解液于250 ml三角瓶中,105℃下维持10 min进行杀菌,冷却后,接入1 ml孢子悬液,置于恒温振荡器中进行发酵培养,培养温度33℃,摇床转速200 r/min,连续培养72 h,每隔12 h取样测定还原糖及柠檬酸含量。

1.2.6 橡子粉糖化对柠檬酸发酵的影响 取经过60 min脱单宁的橡子粉,糊化后,1份用 $\alpha$ -淀粉酶进行液化处理,另1份先经 $\alpha$ -淀粉酶水解,再用糖化酶进行糖化处理,将分别得到的液化液和糖化液接种1 ml孢子数达 $9.60 \times 10^7 \sim 1.33 \times 10^8$ 个的黑曲霉 SI-

IM M288 菌悬液,其他发酵条件同方法 1.2.5,进行橡子粉糖化对柠檬酸发酵影响的研究。

1.3 测定方法

1.3.1 单宁测定 采用酒石酸亚铁法<sup>[13]</sup>,并稍作修改。标准曲线的制作:吸取 0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml 和 1.0 ml 单宁酸标准溶液(1 mg/ml)于 10 ml 容量瓶中,用蒸馏水补至 1.0 ml,加 2.0 ml 酒石酸亚铁溶液,用 pH7.5 磷酸盐缓冲液定容,于 540 nm 处测吸光值,以单宁酸质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标制作标准曲线,并得回归方程( $Y=10.467 0x+0.012 1, R^2=0.997$ )。

1.3.2 还原糖及总糖含量测定 参照文献[14]。准确吸取 0.25 ml、0.50 ml、0.75 ml、1.00 ml、1.25 ml 和 1.50 ml 葡萄糖标准溶液(1 mg/ml)于试管中,用蒸馏水补至 1.50 ml,加入 1.50 ml DNS 试剂和 1.50 ml 蒸馏水,沸水浴 5 min,冷水冷却,定容至 25.00 ml,于 550 nm 处测吸光值,以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标制作标准曲线,并得回归方程: $Y=9.191 9x+0.003 4, R^2=0.992$ 。

还原糖和总糖含量测定参照文献[15],并稍作修改。取 10.0 ml 发酵液,5 000 r/min 离心 10 min,取出上清液,DNS 比色法测定还原糖含量。准确量取 0.5 ml 上清液,加入 0.4 ml 浓硫酸,沸水浴 5 min,在冰水中迅速冷却,用 40% NaOH 中和,调节 pH 至 7.0~9.0,定容至 100.0 ml,采用 DNS 比色法测定总糖含量。

1.3.3 柠檬酸测定和鉴定 采用酸碱滴定法,用 0.142 9 mol/L 氢氧化钠溶液进行滴定<sup>[16]</sup>,柠檬酸含量以发酵液中总酸计算。用纸层析色谱法进行柠檬酸的鉴定<sup>[17]</sup>。展开剂:正丁醇:醋酸:水=12:3:5(体积比);显色剂:400 mg 溴酚蓝溶于 1 L 体积分数为 95%的乙醇,用 NaOH 调节 pH 值至 7.5。

1.3.4 生物量测定 生物量的测定参照文献[18]。

1.3.5 橡子淀粉的超微结构观察 将不同脱单宁时

间的橡子粉用扫描电子显微镜观测并拍摄颗粒形态。

1.3.6 发酵液菌丝形态显微镜观察 挑取橡子发酵液中的黑曲霉,用生物显微镜在放大倍数为 400 倍下直接进行形态观察。

1.4 数据分析

试验数据运用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,结果以平均值±标准差( $\bar{x}\pm SD$ )的形式表示,采用 LSD 法检验组间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 脱单宁对橡子粉液化的影响

用乙醇水溶液脱除橡子单宁,处理时间不同,单宁脱除量不同。脱单宁时间对橡子粉成分及液化影响结果见表 1。随脱单宁时间的延长,单宁含量下降,同时蛋白质含量也在下降。脱除时间为 60 min,与对照相比,单宁含量降低了 56.31%;脱单宁时间为 120 min,单宁含量下降了 67.23%,蛋白质含量由 29.31 mg/g 降为 24.31 mg/g。说明 70%乙醇对橡子粉中单宁有良好的脱除效果,但同时橡子粉中蛋白质会有一定损失。

从表 1 可以看出,随单宁脱除量的增加, $\alpha$ -淀粉酶完全液化橡子淀粉的时间缩短,液化液中的总糖和还原糖也有所变化,说明单宁对橡子淀粉的酶法液化有一定抑制作用。当脱除时间为 60 min 时,橡子粉中的单宁含量下降为 5.64 mg/g,淀粉液化完全的时间缩短为 40 min,总糖含量提高至 99.02 g/L,还原糖含量上升为 63.77 g/L,其总糖含量显著高于原料( $P<0.05$ ),但和脱除时间为 120 min 的相比,总糖含量无明显差异( $P>0.05$ ),还原糖含量显著高于原料和脱单宁时间为 120 min 橡子粉( $P<0.05$ )。说明橡子粉在液化时,较高的单宁含量会影响淀粉液化和还原糖的生成,当单宁含量减低至一定值时,不再成为液化的限制因素。因此,橡子粉发酵柠檬酸时脱单宁不必脱除彻底。

表 1 脱单宁时间对橡子淀粉液化的影响

Table 1 Effect of detannin time on liquefaction of acorn starch

脱除时间(min)	单宁含量(mg/g)	蛋白质含量(mg/g)	液化时间(min)	总糖含量(g/L)	还原糖含量(g/L)
0	12.91±0.25	29.31±0.74	57	63.21±1.75	42.42±2.12
30	7.62±0.17	27.55±0.43	48	75.84±2.01	47.32±5.99
60	5.64±0.15	26.43±0.55	40	99.02±2.14	63.77±2.83
90	4.86±0.21	25.24±0.91	38	98.12±3.16	59.28±1.19
120	4.23±0.10	24.31±0.86	35	97.50±2.88	55.57±1.87



## 2.2 脱单宁对橡子粉糖化的影响

在经不同时间脱单宁的橡子粉液化液中加入糖化酶,进行糖化处理,观察单宁对橡子粉糖化的影响,结果见图 1。随糖化时间的延长,还原糖含量不断增加,6 h 后趋于稳定;当糖化时间相同时,经过不同时间脱单宁处理的橡子粉,糖化时还原糖含量也不尽相同,脱单宁时间超过 60 min,还原糖含量明显高于未处理和处理 30 min 的( $P<0.05$ )。同时糖化 6 h,脱单宁时间 120 min 的还原糖含量为 92.42 g/L,显著低于脱单宁时间 60 min 和 90 min 的( $P<0.05$ ),其原因可能与脱单宁时淀粉中蛋白质变化有关<sup>[12]</sup>。

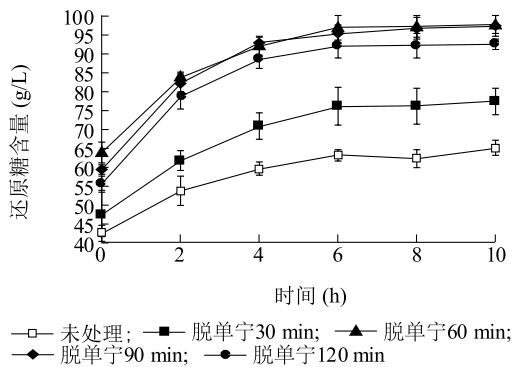


图 1 糖化过程中的还原糖含量

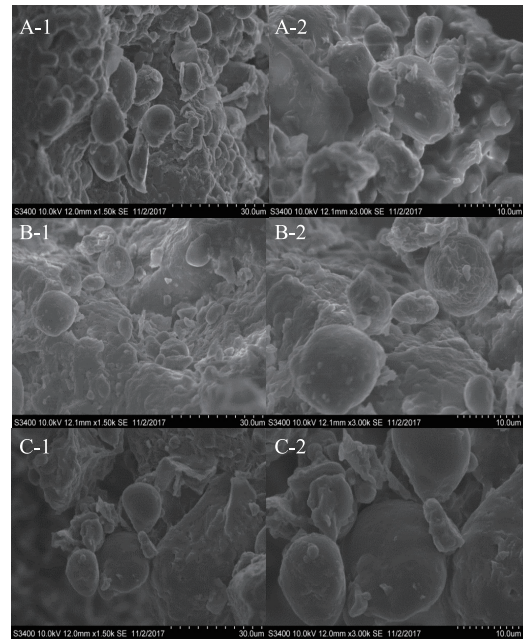
Fig.1 Reducing sugar concentrations during saccharification

## 2.3 脱单宁对橡子淀粉颗粒的影响

单宁会抑制橡子粉的酶解,但当其不再是限制因素时,随脱除时间的继续延长,反而酶解效率有所降低,这可能与橡子淀粉及蛋白质的变化有关。不同脱除时间橡子粉的形貌见图 2,橡子淀粉颗粒主要是球形或卵形,这与 Stevenson 等<sup>[19]</sup>的报道一致,而其颗粒直径与报道的 3~17  $\mu\text{m}$  有一定差异,这可能与橡子品种有关。橡子淀粉被包裹在胶状物质中并通过其相互连接,该物质可能是蛋白质;经过脱单宁处理的橡子淀粉与胶状物质粘连程度不大,颗粒间的连接较疏松甚至分离,这在一定程度上使橡子粉更易被酶水解。

## 2.4 脱单宁对黑曲霉生长的影响

单宁会与蛋白质及其他氮源结合,螯合金属离子,影响橡子粉发酵液中黑曲霉生长。在不同脱除时间的橡子粉液化液中接入黑曲霉孢子悬浮液,培养 72 h 后的生物量见图 3,脱除时间为 60 min 的生物量是 18.63 g/L,显著高于原料和脱除时间 30



A: 橡子粉(对照);B:脱单宁 60 min 的橡子粉;C:脱单宁 120 min 的橡子粉。1:放大倍数1 500;2:放大倍数3 000。

图 2 不同脱单宁时间的橡子淀粉扫描电镜图

Fig.2 Scanning electron micrographs of acorn starch in different detannin time

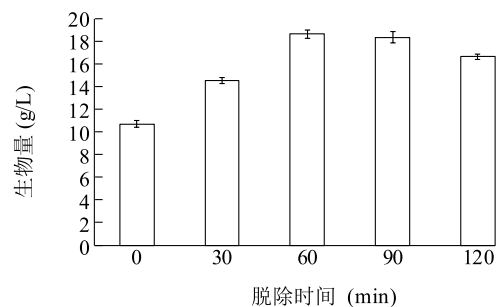


图 3 单宁脱除时间对黑曲霉 SIIM M288 生长的影响

Fig.3 Effects of detannin time on the growth of *Aspergillus niger* SIIM M288

min、120 min 的( $P<0.05$ ),Chao 等<sup>[20]</sup>报道,当单宁质量浓度低于 1 g/L 时,单宁对菌体生长就会失去抑制作用。

## 2.5 脱单宁对柠檬酸发酵的影响

图 4 结果显示,在 0~12 h,黑曲霉孢子处于休眠调整和萌发并形成营养菌丝期,柠檬酸几乎没有积累。发酵液还原糖质量浓度在 0~24 h 有上升趋势,说明黑曲霉分泌的糖化酶将发酵液中一些高分子糖水解为还原糖;在 24~60 h 还原糖急剧下降,

柠檬酸大量积累;当发酵时间超过 60 h,柠檬酸质量浓度趋于稳定,可能由于此时发酵液中还原糖质量浓度过低。脱单宁时间 60 min 的柠檬酸产量是 37.85 g/L,显著高于原料和脱单宁时间 30 min 的 ( $P<0.05$ ),说明单宁会抑制柠檬酸积累。

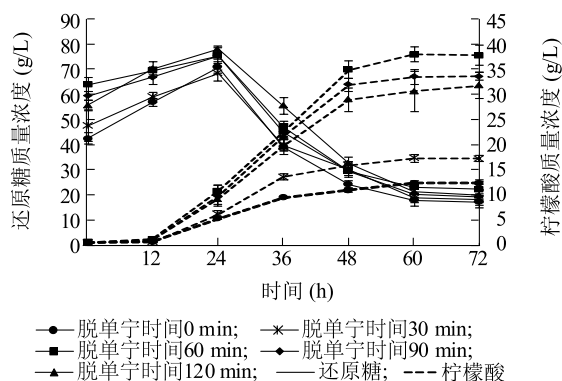


图4 不同脱单宁时间的橡子粉液化液的柠檬酸发酵

Fig.4 Citric acid fermentation of liquefaction from acorn powder in different detannin time

## 2.6 橡子粉发酵产物

在柠檬酸发酵过程中,由于乌头酸酶、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶的活性受到抑制,使得柠檬酸开始积累<sup>[21]</sup>。发酵液中除大量柠檬酸外,还有草酸、乌头酸等杂酸。用纸层析色谱对发酵液中的有机酸进行鉴别,结果见图5。黑曲霉 SIIM M288 发酵橡子粉液化液,产物主要为柠檬酸,其次还检出少量草酸,其他酸未检测到。

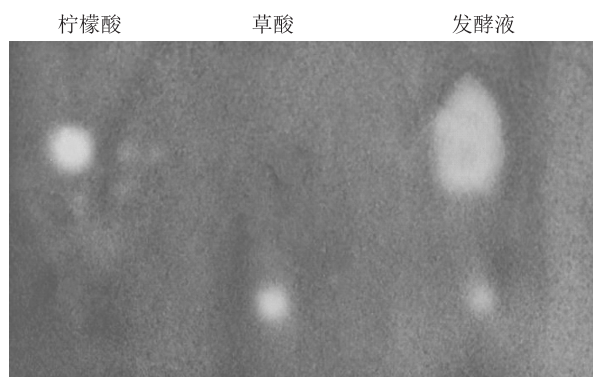


图5 橡子粉发酵液的纸层析色谱

Fig.5 Paper chromatography of acorn powder fermentation broth

## 2.7 橡子粉糖化对柠檬酸发酵的影响

由于黑曲霉可以分泌糖化酶,将发酵液中高分

子糖水解为可发酵性糖,因此可以利用黑曲霉进行同步糖化发酵。试验结果发现,黑曲霉 SIIM M288 发酵橡子粉液化液的柠檬酸产量为 37.85 g/L,而发酵糖化液的柠檬酸产量为 39.62 g/L,这可能因为黑曲霉分泌的糖化酶不足或酶活性低。虽然橡子粉糖化液的柠檬酸产量略高于液化液,但糖化会大大增加时间及设备成本,因此在实际生产中不进行糖化处理,直接将黑曲霉接种于液化液中进行发酵。

## 2.8 橡子粉发酵柠檬酸菌种的选择

黑曲霉菌种对橡子粉发酵有很大影响,不同菌株,其生长条件各异,产酸量也不尽相同。试验选用柠檬酸生产常用的 4 株菌,分别接种于橡子粉液化液中进行摇瓶培养,筛选最佳菌株。菌株在发酵液中的形态见图6,产酸量见图7。

由图6可见,黑曲霉 SIIM M288 在发酵液中以菌丝球形态分布,菌落呈不规则皱褶,中央隆起,菌丝无色透明,短而粗、分支少、稀疏着生,这种形态的菌有利于产酸,且有研究报道,菌丝球直径越小,对产酸越有利<sup>[8,22]</sup>;CICC 2716 在发酵液中产生大量菌丝,分支较多,而 CICC 2160 和 QL-1 的菌丝远比 CICC 2716 致密,这对产酸极其不利,过密的菌丝会限制溶氧及营养与细胞之间的传输速率。黑曲霉 CICC 2716 发酵的产酸量显著高于 CICC 2160 和 QL-1,同时显著低于 SIIM M288 ( $P<0.05$ )。结果表明菌丝稀疏、分支少、短而粗有利于产酸,而菌丝致密,对产酸极其不利。从图7可知,黑曲霉 SIIM M288 在 33 °C 产酸量达 37.30 g/L,显著高于其他菌株 ( $P<0.05$ )。说明用橡子粉发酵柠檬酸时黑曲霉 SIIM M288 是优势菌种。

## 2.9 黑曲霉 SIIM M288 发酵柠檬酸的温度

发酵温度是影响柠檬酸产生的关键因素之一,将黑曲霉 SIIM M288 接种于脱单宁时间为 60 min 的橡子粉液化液中,结果见图8。黑曲霉 SIIM M288 在 33 °C 的产酸量为 37.30 g/L,显著高于其他发酵温度 ( $P<0.05$ )。说明黑曲霉 SIIM M288 对发酵温度比较敏感,过高或过低均会较大程度地抑制柠檬酸的积累。

## 3 讨论

### 3.1 脱单宁对橡子粉液化、糖化及发酵的影响

橡子单宁含量丰富,其与蛋白质结合,抑制黑曲霉分泌糖化酶和其他与代谢有关的酶的生物活



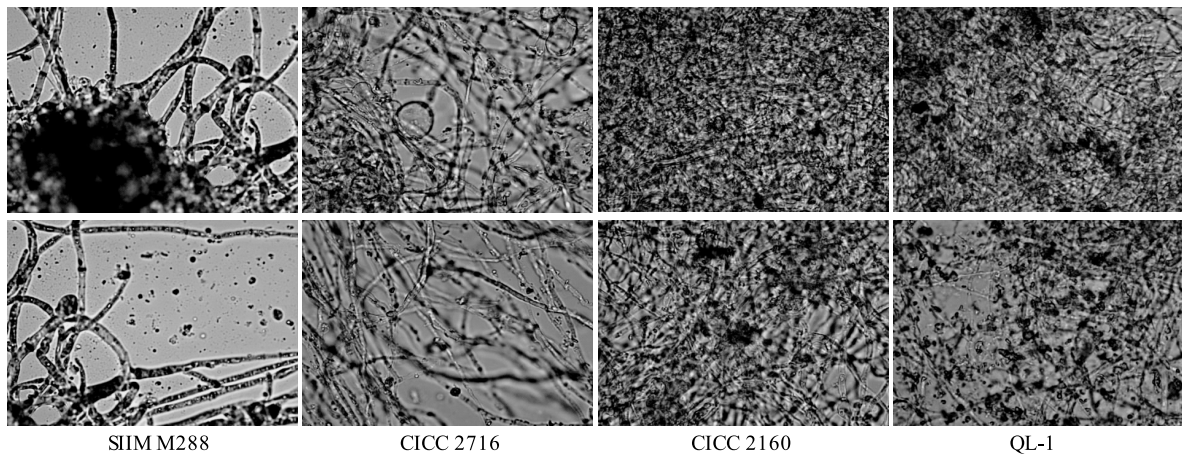


图 6 不同菌种在橡子粉液化液中的形态

Fig.6 Morphology of different strains in liquefaction from acorn powder

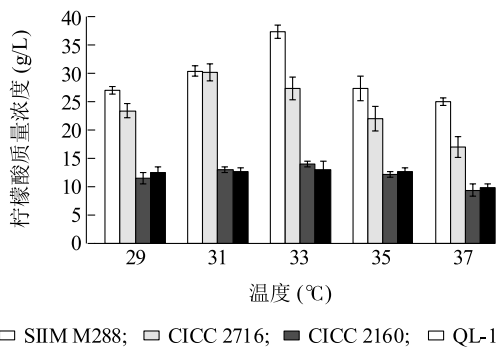


图 7 菌种对橡子粉液化液柠檬酸发酵的影响

Fig.7 Effect of strains on citric acid fermentation of liquefaction from acorn powder

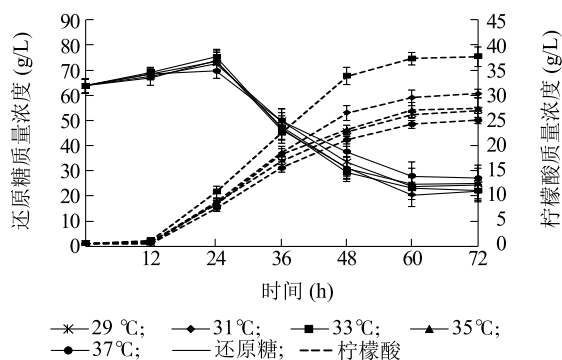


图 8 不同温度对黑曲霉 SIIM M288 柠檬酸发酵的影响

Fig.8 Effect of different temperatures on citric acid fermentation of *Aspergillus niger* SIIM M288

性<sup>[23]</sup>。本研究结果表明,单宁会抑制橡子粉的酶解及黑曲霉产酸能力。当单宁不再是限制因素时,发酵液中其他营养物质的变化对橡子粉的酶解及发酵

产酸量均有一定影响,这是由于处理时间过长会影响淀粉的平均分子质量,蛋白质的变化会影响淀粉凝胶的酶解能力<sup>[12, 24]</sup>;因为氮源与蛋白质、核酸、维生素等的合成密切相关,因此氮源不足会影响菌体生长,降低柠檬酸积累<sup>[25]</sup>。

### 3.2 糖化对橡子粉柠檬酸发酵的影响

在柠檬酸工业化生产中,原料采用精制糖能够获得较高产量,但生产成本低,相比而言,淀粉质原料更具有竞争力,但淀粉不能被直接利用,需经液化、糖化等工艺,才能获得可发酵性糖<sup>[26-27]</sup>。利用黑曲霉进行柠檬酸发酵,基于其自身的糖化能力,可以将液化处理的淀粉质原料进行同步糖化发酵<sup>[10-11]</sup>。本研究结果表明,橡子粉液化液中低分子量的糊精及寡糖,可以被黑曲霉分泌的糖化酶水解成可发酵性糖,因此可以边糖化边发酵。淀粉质原料同步糖化发酵的柠檬酸产量与淀粉质原料糖化后再发酵的柠檬酸产量无明显差异,还节省了时间及设备成本,因此在实际生产中可对淀粉质原料不进行糖化处理。

### 3.3 柠檬酸产量及发酵中杂酸的产生

本研究结果表明,黑曲霉发酵柠檬酸的产酸量与菌种有密切联系,菌丝稀疏、分支少、短而粗有利于产酸,而过密的菌丝会限制溶氧以及营养与细胞之间的传输速率,对产酸极其不利,与 Papagianni 等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。产酸量还受发酵液中营养成分及发酵条件的影响,因此需要对发酵液成分进行优化,同时还需控制温度、溶氧及初始 pH 值等培养条件,以期获得最高的柠檬酸产量<sup>[25, 29-30]</sup>,本研

究结果也表明温度会显著影响黑曲霉产酸。因此利用橡子粉进行柠檬酸发酵,后期还应对发酵液成分进行优化,补充对产酸有利的营养因素,还需要进一步研究温度、溶氧及初始 pH 值等培养条件对产酸的影响,以达到柠檬酸产量最大化,提高橡子资源利用率。

柠檬酸是三羧酸循环的中间代谢产物,在柠檬酸积累过程中,会产生一些杂酸。刘辰<sup>[16]</sup>报道诱变株 *A.niger* Wml-016 只产生草酸 1 个杂酸,与本研究结果一致。徐凯<sup>[31]</sup>报道含量最高的杂酸为草酸,还有一些其他杂酸,且随着温度的升高,杂酸含量有所上升,但上升幅度不大。代真真<sup>[32]</sup>通过 HPLC 检测出发酵液中有草酸、顺乌头酸及反乌头酸等杂酸,但杂酸的含量非常小。杂酸的存在一方面降低了转化率,另一方面对柠檬酸的提取工艺不利,因此在生产中应通过菌种的筛选或驯化及调控发酵条件来控制杂酸的产生。

过多单宁对橡子粉的酶解及发酵产酸均有抑制作用,当单宁不再是限制因素时,发酵液中的营养物质在一定程度上影响发酵产酸。由于黑曲霉在生长时会分泌糖化酶,可以同步糖化发酵柠檬酸。黑曲霉 SHIM M288 是橡子粉柠檬酸发酵的优势菌种,其在发酵液中以菌丝球形态分布,菌丝无色透明、短而粗、分支少、稀疏着生,发酵最佳温度为 33 ℃,在发酵液中有少量草酸的产生。

## 参考文献:

- [1] 黄利群,陈四发,刘艳萍. 橡子研究概况[J]. 氨基酸和生物资源,1998(1):51-55.
- [2] 郭万达. 橡子淀粉提取及其主要理化特性分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [3] 张志健,李新生,江 海. 橡子淀粉加工技术比较研究[J]. 食品科技,2009(6):142-145.
- [4] 谢碧霞,谢 涛. 我国橡实资源的开发利用[J]. 中南林业科技大学学报,2002,22(3):37-41.
- [5] 何瑞国,汪康民,王玉莲,等. 野生经济植物资源橡籽仁可利用价值的研究[J]. 应用生态学报,2000,11(2):196-198.
- [6] 孙 荣,王 燕,杨平平. 柠檬酸发酵现状及展望[J]. 中国调味品,2011,36(1):90-92.
- [7] ATES S, DINGIL N, BAYRAKTAR E, et al. Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil [J]. Process Biochemistry, 2002, 38(3): 433-436.
- [8] WANG J. Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses [J]. Bioresource Technology, 1998, 65: 243-245.
- [9] IKRAMULHAQ, KHURSHID S, ALI S, et al. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17(1):35-37.
- [10] SOCCOL C R, VANDENBERGHE L P S, RODRIGUES C, et al. New perspectives for citric acid production and application [J]. Food Technology & Biotechnology, 2006, 44(2):141-149.
- [11] THOMPSON J C, HE B B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks [J]. Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society, 2006, 71(9):1607-1609.
- [12] PAN P, TANG Y, SUN D F, et al. Effect of ultrasonic-assisted pretreatment on hydrolysis and fermentation of acorn starch [J]. Bioresources, 2014, 9(2):2705-2716.
- [13] PENG L, WANG X, SHI X, et al. Characterization of the constituents and antioxidative activity of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4):1475-1482.
- [14] 严敏嘉,李小芳,赵甜甜,等. 红曲固态发酵过程中糖类物质的动态变化分析[J]. 食品研究与开发,2018(3):79-83.
- [15] 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,2017.
- [16] 刘 辰. 木薯原料生产柠檬酸工艺的研究[D]. 无锡:江南大学,2005.
- [17] 任晓莉,赵 林,杨宝强,等. UV 和 NTG 复合诱变柠檬酸生产菌种黑曲霉[J]. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2010, 43(6):553-556.
- [18] 赵祥瑞,乔 君,马钦元,等. 柠檬酸高浓度发酵过程中糖化酶活性对柠檬酸发酵的影响[J]. 食品与发酵工业,2015, 41(10):29-33.
- [19] STEVENSON D G, JANE J L, INGLET T G E. Physicochemical properties of pin oak (*Quercus palustris* Muenchh.) acorn starch [J]. Starch-starke, 2010, 58(11):553-560.
- [20] CHAO B, LIU R, ZHANG X, et al. Tannin extraction pretreatment and very high gravity fermentation of acorn starch for bioethanol production [J]. Bioresource Technology, 2017, 241:900-907.
- [21] KARAFFA L, KUBICEK C P. *Aspergillus niger* citric acid accumulation; do we understand this well working black box [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2003, 61(3):189-96.
- [22] WANG B, CHEN J, LI H, et al. Pellet-dispersion strategy to simplify the seed cultivation of *Aspergillus niger* and optimize citric acid production [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2017, 40(1):45-53.
- [23] SCALBERT A. Antimicrobial properties of tannins [J]. Phytochemistry, 1991, 30(12):3875-3883.
- [24] MOHAMED A A, RAYAS-DUARTE P. The effect of mixing and wheat protein/gluten on the gelatinization of wheat starch [J]. Food Chemistry, 2003, 81(4):533-545.
- [25] 周建新,彭雪霁,姚明兰,等. 黑曲霉液态发酵陈化稻米生产柠檬酸的研究[J]. 食品科学,2008, 29(9):370-372.
- [26] JOHN R P, ANISHA G S, NAMPOOTHIRI K M, et al. Direct lac-

- tic acid fermentation; focus on simultaneous saccharification and lactic acid production [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2):145-152.
- [27] HUANG X, CHEN M, LU X, et al. Direct production of itaconic acid from liquefied corn starch by genetically engineered *Aspergillus terreus* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1):108-118.
- [28] PAPAGIANNI M, MATTEY M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology [J]. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5(1):3-15.
- [29] 陈雪梅, 游佳清, 李建成, 等. 溶解氧对黑曲霉发酵生产柠檬酸的影响[J]. *食品与发酵科技*, 2009, 45(5):42-44.
- [30] 于云岭, 刘桂芳, 张 岩, 等. 利用稻米发酵生产柠檬酸工艺的研究[J]. *天津轻工业学院学报*, 2000(4):31-35.
- [31] 徐 凯. 耐高温柠檬酸生产菌株的选育及发酵条件研究[D]. 无锡:江南大学, 2015.
- [32] 代真真. 黑曲霉柠檬酸发酵过程研究及其优化[D]. 上海:华东理工大学, 2011.

(责任编辑:陈海霞)