

文章编号: 1673-1689(2011)05-0723-05

柠檬酸发酵过程中液化条件的影响

代真真, 周勇, 刘玉伟, 满云, 张继学, 王永红*

(华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237)

摘要: 为了更为精确地调控柠檬酸的发酵过程, 作者对其原料玉米粉在不同的液化条件下的液化效果进行了研究。结果发现, 在 95 ℃、液固比 3.17: 1、搅拌转速 160 r/min 的条件下, 液化效率最高, 18 min 即可完成。加酶量、介质 pH、液化时间的长短影响液化后糖液的成分, 其中高加酶量、自然 pH 值条件、短时间液化均有利于糖液中溶磷、铁离子、锰离子保持在低浓度水平, 这对柠檬酸的高产非常重要。

关键词: 玉米粉; 耐高温 α -淀粉酶; 液化; 液化液成分

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Effects of Liquefying Conditions during Citric Acid Fermentation

DAI Zhen-zhen, ZHOU Yong, LIU Yu-wei, MAN Yun, ZHANG Ji-xue,
WANG Yong-hong*

(School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In order to regulate the fermentation process more precise, this study investigated the effects of different liquefying conditions on corn flour liquefying results. And the optimum conditions were achieved through single factor experiment and listed as follows: : 95 ℃, 3.17: 1 of water to corn flour ratio, the agitator speed 160rpm. With the optimum conditions, the liquefy process was finished just in 18 min. Furthermore, it was found that the enzyme amount, pH, liquefying time played important role on the the component of the liquefied corn.

Key words: corn flour, thermostable α -amylase, liquefying, component of liquefied corn

玉米粉是柠檬酸发酵工业中常用的一种良好碳源^[1], 在利用过程中要经过一定的液化处理, 使大分子的淀粉被降解为小分子的糊精、麦芽糖和葡萄糖等可被微生物利用的糖^[2-3]。液化作用是柠檬酸发酵前必须进行的重要生物化学反应^[4], 不同的液化条件不仅影响液化的效率, 还会影响液化后糖液的化学成分, 进而影响后期的发酵过程。研究液

化条件对液化结果的影响, 不仅可以优化的液化条件, 提高液化效率, 也可以了解液化条件对液化液成分的影响, 从而对发酵过程进行更为精细的调控。

通过控制温度、液固比、搅拌转速得到一个液化效率最高的液化条件, 然后从加酶量、介质 pH、液化时间方面考察其对液化液成分的影响, 从而找

收稿日期: 2010-10-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI63B01)。

* 通信作者: 王永红(1966-), 女, 湖南桂阳人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物过程工程和生物反应器工程方面的研究。Email: yhwang@ecust.edu.cn

到一个最利于发酵的液化条件。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 原料及试剂 玉米粉: 蚌埠丰原生化; 耐高温 α 淀粉酶(40 000 U/mL): 诺维信公司; 硫酸、氢氧化钠、硫酸铜等试剂: 分析纯。

1.1.2 主要仪器设备 DK-S22 型电热恒温水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司; RW20 n 悬臂式搅拌机: 广州仪科实验室技术有限公司; KDN-1000 凯氏定氮仪: 上海新嘉电子有限公司; PHS-3CW 酸度计: 上海理达仪器厂; 活细胞计数仪: ABER 仪器有限公司。

1.2 分析方法

1.2.1 斐林发测定总糖及还原糖^[5]

1) 斐林试剂空白的滴定: 取斐林试剂甲乙液各 5 mL 于 50 mL 的锥形瓶中, 加入 9.0~ 9.5 mL 0.1 g/dL 的葡萄糖标准溶液, 加热至沸后以 12~ 15 滴/min 的速度滴定至蓝色消失, 滴定消耗的葡萄糖毫升数即为试剂的空白。

2) 总糖的测定: 取试样 10 mL 于配有回流管的 150 mL 锥形瓶中, 加 50 mL 蒸馏水, 再加入 7.5 mL 浓硫酸, 加热至沸保持 5 min, 急速冷却。冷却后用浓 NaOH 溶液中和至 pH 7 左右, 定容至 500 mL。取斐林甲乙液各 5 mL 于 50 mL 锥形瓶中, 依次加入上述定溶液 2 mL 和适量 0.1 g/dL 葡萄糖标准溶液, 加热至沸, 以 12~ 15 滴/min 的速度滴定至蓝色消失, 记录所消耗的葡萄糖毫升数。加热后滴定消耗的葡萄糖标准溶液不能超过 1 mL, 滴定过程不得超过 1 min, 否则重新滴定。

总糖(%) = (空白 - 滴定消耗数) $\times$ 2.5

3) 还原糖测定: 取斐林甲乙液各 5 mL 于 50 mL 锥形瓶中, 加入一定稀释倍数的试样 1 mL 和适量的 0.1 g/dL 葡萄糖标准溶液, 加热至沸后以 4~ 5 s/滴的速度滴定至蓝色消失, 记下所消耗的毫升数。

还原糖(%) = (空白 - 滴定消耗数) $\times$ 0.1 $\times$ 稀释倍数

1.2.2 溶磷的测定 50 mL 比色管中加入一定稀释倍数的样品 1 mL, 加水至比色管 25 mL 刻度处混合均匀, 加入 4 mL 配制好的钼酸铵溶液混匀, 再加入 2 mL 抗坏血酸溶液混匀后沸水浴 10 min, 于 660 nm 处读得吸光值, 根据标准曲线计算样品中溶磷浓度。

1.2.3 金属离子测定 全谱直读等离子体发射光谱仪测定。

1.2.4 总氮测定 全自动凯氏定氮仪。

1.3 液化工艺流程

粉碎的玉米粉按照一定的液固比加入水后, 添加耐高温 α 淀粉酶, 置于一定温度的水浴锅中, 在一定的搅拌转速下开始液化, 直到碘试合格为止。为保证后期发酵正常进行, 液化液总糖质量浓度需高于 16 g/dL。

2 结果与 讨论

2.1 液化条件对液化效率的影响

液化温度影响淀粉酶活力, 液固比和搅拌转速则影响液化过程中底物与酶接触, 它们都是影响液化效率的关键因素。

2.1.1 搅拌转速对液化效率的影响 在液固比 3.17: 1, 加酶量 160 U/g 玉米粉, 90 $^{\circ}$ C 下进行搅拌转速实验, 结果见表 1。搅拌转速低不利于物料混合, 影响液化效果。搅拌转速过高, 剪切力增大, 同样影响液化效果, 使得液化时间增长, 因此选择 160 r/min 的搅拌转速。

表 1 搅拌转速对液化效果的影响

Tab. 1 Effect of agitation rate on liquefying result

搅拌 转速/ (r/min)	液化 时间/ min	液化后总糖 质量分数/ %	液化清液还原糖 质量分数/ %
60	42	搅拌转速过小, 液化过程中玉米粉容易结块, 需手动搅开后继续液化	
110	27		
160	27	16.3	5.8
240	32	16.5	6.3
440	34	16.9	7

2.1.2 液固比对液化效率的影响 在 90 $^{\circ}$ C, 加酶量 160 U/g 玉米粉, 搅拌转速 160 r/min 下进行液固比实验, 结果见表 2。液固比越高, 液化时间越短。随着液固比的增加, 总糖质量分数随之降低。当液固比为 3.5: 1 时, 总糖质量分数只有 15.5 g/dL, 为了保证发酵初始质量浓度在 16% 之上, 选择 3.17: 1 的液固比进行实验。

表 2 液固比对液化结果的影响

Tab. 2 Effect of water to corn flour ratio on liquefying result

液固比	液化 时间/ min	液化后总糖 质量分数/ %	液化清液还原糖 质量分数/ %
2.5: 1	41	20.75	8.5
3.17: 1	30	17	7.0
3.5: 1	27	15.5	6.1
4: 1	20	14	5.1

2.1.3 液化温度对液化效率的影响 在液固比 3:17:1, 加酶量 160 U/g 玉米粉, 搅拌转速 160 r/min 下进行温度实验, 结果见表 3。温度越高, 液化时间越短, 95 ℃下液化时间最短, 总糖质量分数也合格, 选择 95 ℃进行后续实验。

表 3 液化温度对液化结果的影响

Tab.3 Effect of temperature on liquefying result			
液化温度/℃	液化时间/min	液化后总糖质量分数/%	清液还原糖质量分数/%
70	600	17.5	7.7
80	300	17.25	7.4
85	110	17.1	7.2
90	30	17	7
95	18	16.5	5.9

综上可知, 保证糖质量分数 $\geq 16\%$, 在温度 95 ℃, 液固比 3:17:1, 搅拌转速为 160 r/min 时, 液化效率最高。此条件下进行液化实验(加酶量 160 U/g 玉米粉), 仅需 18 min 液化液即碘试合格, 大大缩短了液化时间, 这与文献[6-8]中报道的情况一致。

2.2 液化条件对液化液成分的影响

2.2.1 加酶量对液化液成分的影响 耐高温 α 淀粉酶是一种内切酶, 能在分子内部任意切断 α 1,4 糖苷键, 形成寡糖和糊精以及部分麦芽糖和葡萄糖。在该酶的作用下, 淀粉分子迅速增加, 粘度下降^[9]。当底物质量浓度减少, 产物质量分数增加时, 酶可能会部分失活, 最后导致反应速度迅速降低。因此淀粉酶的加量不仅会影响液化速度还会影响液化效果。本实验在 95 ℃、液固比 3:17:1, 搅拌转速 160 r/min 下进行, 结果见表 4。

表 4 加酶量对液化效果的影响

Tab.4 Effect of enzyme amount on liquefying result			
加酶量/(U/g 玉米粉)	液化时间/min	液化后总糖质量分数/%	液化清液还原糖质量分数/%
80	42	17	5.7
120	28	15.75	5.7
160	18	15.5	5.9
240	15	15	6.5

由表 4 可知, 在 4 种酶浓度下液化时间有一定差异。随着酶浓度的增加液化时间缩短, 当酶浓度超过到 160 U/g 玉米粉时, 液化时间已差别不大。同样, 随着加酶量的增加, 液化时间逐渐缩短, 液化液总糖有一定的下降, 但是还原糖质量分数却逐渐

增加, 说明酶量的增加有利于酶切反应生成更多的还原糖。结果见图 1~5。加酶量的不同对液化液中营养元素的溶出有一定的影响, 这和以前文献报道中不同预处理对元素溶出有一定影响类似^[10]。

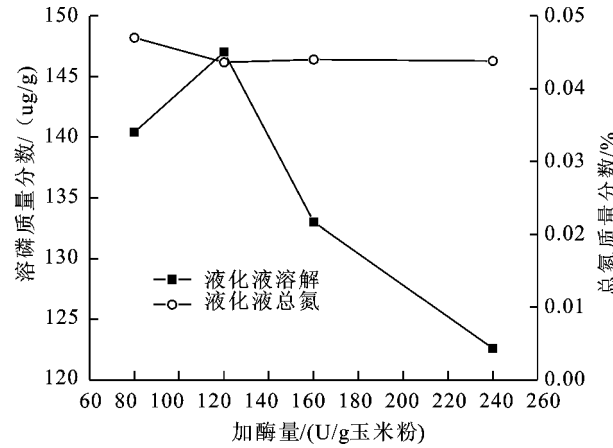


图 1 加酶量对于溶磷和总氮的影响

Fig.1 Effect of enzyme amount on the soluble phosphate and total nitrogen concentration

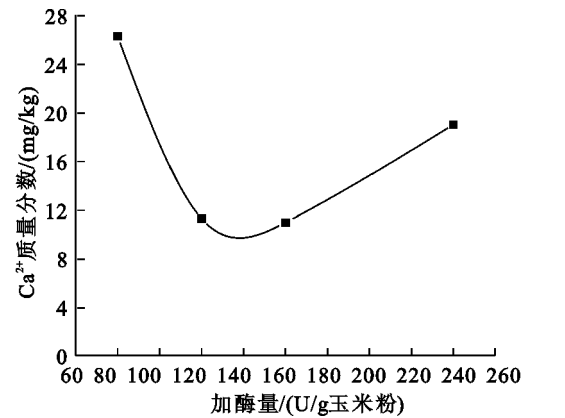


图 2 加酶量对液化清液中 Ca²⁺ 质量分数的影响

Fig.2 Effect of enzyme amount on the Ca²⁺ concentration

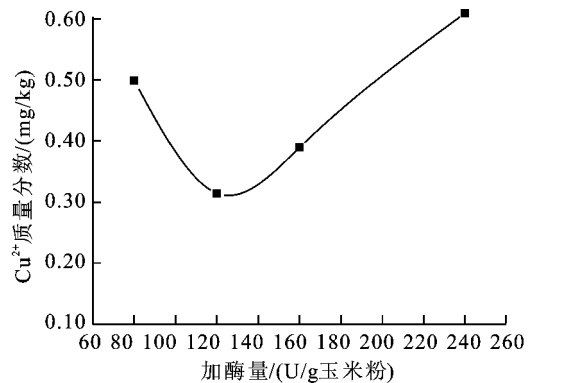


图 3 加酶量对液化清液中 Cu²⁺ 质量分数的影响

Fig.3 Effect of enzyme amount on the Cu²⁺ concentration

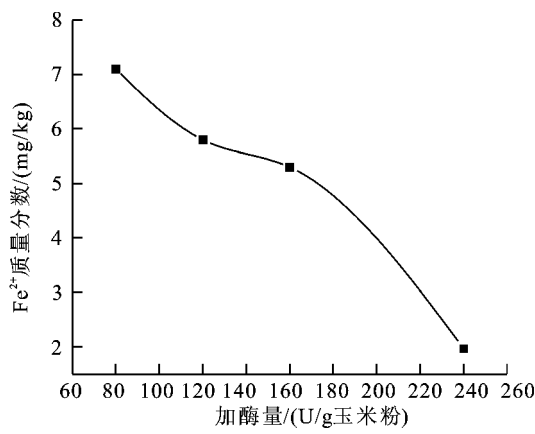


图 4 加酶量对液化清液中 Fe^{2+} 质量分数的影响

Fig. 4 Effect of enzyme amount on the Fe^{2+} concentration

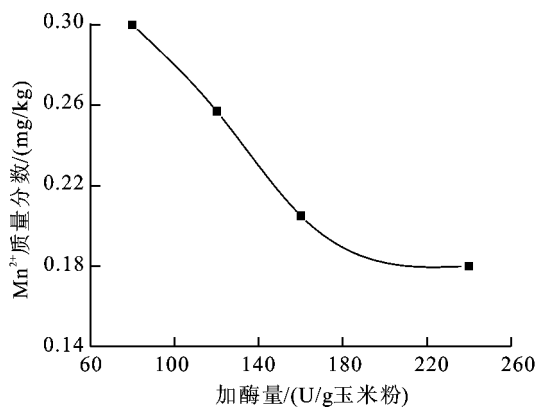


图 5 加酶量对液化清液中 Mn^{2+} 质量分数的影响

Fig. 5 Effect of enzyme amount on the Mn^{2+} concentration

由图 1 至图 5 可知,随着加酶量的增加,液化时间的缩短,液化清液中溶磷、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 的质量分数逐渐降低, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 质量分数先下降后有一定的上升,但是液化清液总氮的含量却没有明显变化。这说明,溶磷、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 的质量分数与液化时间呈正比,液化时间短,它们的溶出相对较少,质量分数相对较低。 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 的溶出曲线呈现谷底现象,这可能与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 的溶出受酶切反应和液化时间双重影响有关,液化时间长有利于它们的溶出,但是一定时间内,它们的溶出与酶切反应更为相关,酶浓度高,它们溶出的量相对多,目前关于此方面的报道不多,具体原因有待进一步研究。在柠檬酸发酵中,溶磷、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 处于低浓度水平有利于柠檬酸的高产^[11],因此,在柠檬酸发酵的玉米粉液化过程中,应适当的加大用酶量,保证液化液中溶磷、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 处于一个较低水平。

2.2.2 液化时间对液化液成分的影响 由以上实验可知,液化时间对液化过程中营养元素的溶出有很大影响。为了进一步验证这个结果,在 95℃、加酶量 160 U/g 玉米粉, 160 r/min, 3 17:1 液固比条件下,液化碘试合格后继续液化 15 min,对比二者液化液成分,结果见表 5。

显然,随着液化时间的延长,除 Cu^{2+} 外其他几种营养元素的溶出都相应增加。因此可知,液化时间的长短和液化液中营养元素的含量有很大关系。在柠檬酸发酵过程中,液化碘试合格后应立即终止液化,以降低营养元素的溶出给发酵带来的不利影响。

表 5 液化时间对液化结果的影响

Tab. 5 Effect of liquefying time on liquefying result

液化时间/min	溶磷/(U g/g)	总氮质量分数/%	Ca^{2+} 质量分数/(mg/kg)	Cu^{2+} 质量分数/(mg/kg)	Fe^{2+} 质量分数/(mg/kg)	Mn^{2+} 质量分数/(mg/kg)
液化合格(18 min)	133.43	0.044	11	0.39	5.4	0.21
多液化 15 min	152.02	0.0524	15	0.37	6.8	0.27

2.2.3 介质 pH 值对液化液成分的影响 耐高温 α -淀粉酶在 pH 5.5~6.5 之间活力最大,玉米粉调浆后 pH 值在 6 左右,液化过程中 pH 值会下降,一般在 5.7 左右,不会低于 5。所以生产中的液化一般自然进行。作者利用醋酸缓冲液为反应介质,对比液化过程中保持恒定 pH 值与自然 pH 值液化下液化液成分的不同。由于玉米粉调浆后 pH 值一般在 6,液化结束后一般在 5.7,所以作者分别以 pH 6

和 pH 5.7 醋酸缓冲液调浆,在 95℃、液固比 3.17:1、加酶量 160 U/g 玉米粉, 160 r/min 下进行,结果见表 6。

由表 6 可知,以醋酸缓冲液为介质进行液化,不但液化时间增长,各种营养元素的浓度也明显增高,这些改变对于柠檬酸发酵都是不利的,因此柠檬酸发酵过程中,玉米粉的液化应该在自然 pH 值下进行。

表 6 介质 pH 对液化效果的影响
Tab. 6 Effect of pH on liquefying result

介质 pH 值	液化 时间/ min	溶磷 质量分数/ (U g/ g)	总氮 质量 分数/%	Ca ²⁺ 质量分数/ (mg/ kg)	Cu ²⁺ 质量分数/ (mg/ kg)	Fe ²⁺ 质量分数/ (mg/ kg)	Mg ²⁺ 质量分数/ (mg/ kg)	Mn ²⁺ 质量分数/ (mg/ kg)
对照*	18	133.43	0.044	11	0.39	5.4	150	0.21
5.7	53	170.6	0.0685	31	0.5	9.7	220	0.9
6	65	180.05	0.0649	35	0.64	14	210	0.8

* 注: 对照指在液化过程中不对介质 pH 值进行处理, 自然完成。

3 结 语

柠檬酸发酵过程中, 高效的玉米粉液化条件为 95 ℃、液固比 3. 17: 1、搅拌转速 160 r/ min。加酶量、介质 pH, 液化时间对于液化液成分中溶磷、Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺ 等的浓度有一定影响, 根据实际生产的经验, 溶磷、Fe²⁺ 和 Mn²⁺ 的低质量分数水平有利于提高柠檬酸的转化率, 因此高加酶量、自然 pH、碘试合格后立即终止液化的液化条件最

有利于柠檬酸发酵。
加酶量增加虽然有利于保持液化液中一些离子处于低质量分数水平, 但是随着液化时间的减少, 液化液中总糖也有所降低, 这会增加柠檬酸发酵的糖耗。此外增加酶量会增加企业的成本, 如何寻找一个最佳的液化条件, 使得液化液保持一定的总糖, 同时又维持某些离子的低质量分数水平, 还能实现利益的增长, 有待进一步研究。

参考文献(References):

[1] 石忆湘, 刘祖同. 黑曲霉发酵玉米粉生产柠檬酸[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 1998, 28(6): 52- 55.
SHI Yi-xiang, LIU Zu-tong. Fermentation of citric acid using corn meal by *Aspergillus niger*[J]. **Journal of Tsinghua University: Science and Technology**, 1998, 28(6): 52- 55. (in Chinese)

[2] 郝晓梅, 王遂, 崔凌飞. α-淀粉酶水解玉米淀粉的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(02): 141- 143.
HAO Xiao-mei, WANG Sui, CUI Ling-fei. Study on enzymatic hydrolyss to corn starch by α-amylase[J]. **Food Science**, 2006, 27(02): 141- 143. (in Chinese)

[3] 肖志刚, 申德超. 酶解挤压玉米粉糖化条件分析[J]. 食品工业科技, 2008, 29(05): 188- 190.
XIAO Zhì-gang, SHEN De-chao. Analysis on saccharification conditions of enzyme hydrolysis for corn meal by extrusion [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(05): 188- 190. (in Chinese)

[4] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling[J]. **Biotechnology Advances**, 2007, 25(3): 244- 263. (in Chinese)

[5] 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: 57- 60.

[6] 张德权, 陈锦屏. 果胶酶液化条件对山茱萸汁品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(6): 3- 5.
ZHANG De-quan, CHEN Jin-ping. The effect of liquefying condition using pectinase on the quality of *Fructus corni*[J]. **Food Research and Development**, 2000, 21(6): 3- 5. (in Chinese)

[7] 陈俊英, 楚德强, 马晓建, 等. 以黄姜为原料发酵酒精的液化糖化条件的初步研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(11): 269- 273.
CHEN Jun-ying, CHU De-qiang, MA Xiao-jian, et al. Preliminary study on the condition for liquefaction and saccharification of dioscorea zingiberensis power for ethanol fermentation[J]. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, 2007, 23(11): 269- 273. (in Chinese)

[8] 赵世民, 吴敏仪. 大米的酸催化水解及焦糖化条件研究[J]. 韶关学院学报, 2009, 30(12): 64- 68.
ZHAO Shi-min, WU Min-yi. Research of factors affecting acid-catalyzed hydrolysis of rice and following caramelization reaction[J]. **Journal of Shaoguan University**, 2009, 30(12): 64- 68. (in Chinese)

[9] Collins B S, Kelly C T, Fogarty W M. The high maltose producing α-amylase of the thermophilic actinomycete, *Thermomonospora curvata*[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 1993, 39(1): 31- 35. (in Chinese)

[10] 李鹏飞, 李小莉, 李崎, 等. 不同前处理方法测定啤酒中钠、钾、钙和镁含量的比较研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 91- 94.
LI Peng-fei, LI Xiao-li, LI Qi, et at. A comparaative study on determination of Na⁺、K⁺、Ca²⁺ and Mg²⁺ in beer by different pre-treatment methods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 91- 94. (in Chinese)

[11] 刘展熊. 柠檬酸发酵中的限制性因子[J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(1): 44- 48.
LIU Zhan-xiong. Restriction factors in citric acid fermentation[J]. **Journal of Zhanjiang Fisheries College**, 1994, 14(1): 44- 48. (in Chinese)