

柠檬酸发酵高温生产菌株选育

金其荣 兰青道 朱宝镛

(无锡轻工业学院发酵工程系, 无锡 214036)

以黑曲霉 (*Aspergillus niger*) H-142 为出发菌株, 通过 γ -射线、硫酸二乙酯及高温热处理单独或复合诱变, 并采用高温、高酸及高渗培养条件定向筛选, 从 600 多株突变株中筛选出一支耐高温柠檬酸高产菌株 HQL-601。其发酵温度为 40—41 °C, 周期 60—64 小时, 20% 山芋粉摇瓶产酸 13%。发酵液的高压液相色谱分析结果表明, 其产酸组成明显优于现生产菌株。

关键词 黑曲霉; 柠檬酸; 耐高温突变株; 菌种选育

高温发酵菌株应用于生产具有十分明显的优势。高温菌生长快、代谢活力高、发酵周期短, 有利于提高设备利用率、降低能耗、降低生产成本; 采用高温生产菌将大大减少冷却水用量, 这对缺水地区的生产具有特别显著的意义; 采用高温生产菌能实现高温季节的稳定生产, 有利于缩短停产期, 进一步提高设备利用率。由于高温菌的这些突出优点, 使之受到广泛重视。例如酒精生产、及某些酶制剂的生产等就已实现了高温发酵。

目前, 国内柠檬酸发酵温度为 35—37 °C, 国外则更低, 一般为 30—32 °C。研究者普遍认为高温发酵容易产生杂酸, 也有人认为高温发酵前期产酸快, 后期产酸低, 影响转化率的提高, 因此很少有人涉足柠檬酸高温发酵这一领域。迄今, 国内外尚未见关于柠檬酸高温生产菌选育的文献报道。

材 料 与 方 法

(一) 培养基

1. 察氏琼脂培养基 (CM)^[1]。
2. 察氏-溴甲酚绿指示培养基 (BCM): 察氏培养基加入 0.02% 溴甲酚绿指示剂。
3. 高柠檬酸-察氏培养基 (ACM): a 液: 称取柠檬酸 30g, 加入少量水溶解后粗略定容至 35ml; b 液: 同 100ml 察氏培养基, 蒸馏水减至 65ml。a 液与 b 液分别灭菌 (0.1mPa, 15min), 将 a 液冷却至室温 (高于 20 °C), b 液冷至 45—50 °C 后迅速混匀, 立即倒平板。
4. 高柠檬酸-高渗察氏平板 (ASCM): 将 b 液中蔗糖量改为 30g, 其余同 ACM 平板的制备。
5. 山芋粉发酵培养基: 称取山芋粉 200g, 加水 900ml, 加酶保温液化至碘液反应蓝色消失。煮沸 5 分钟灭活, 冷却后定容至 1000ml。分装三角瓶 50ml/500ml, 用八层纱布扎口, 0.1mPa 灭菌 15 分钟。

本文于 1991 年 6 月 17 日收到。

6. 琥珀酸琼脂培养基 (SAM): 以 3g 琥珀酸代替蔗糖, 其余同察氏培养基。

(二) 诱变方法

1. 单孢子悬浮液的制备: 用 10ml 无菌生理盐水洗下培养成熟的斜面孢子。置于预先灭菌的具玻璃珠和 20ml 生理盐水的 200ml 三角瓶中, 于摇床上震荡 30—60 分钟至镜检为分散的单孢子。用血球计数法计数并用无菌水调节孢子浓度为 1×10^8 个/ml, 即为单孢子悬浮液。

2. γ -射线诱变: 取单孢子悬浮液 5ml 置入 15×150 的无菌试管中, 进行 γ -射线照射。剂量为 6 万伦琴。经诱变处理的孢子悬浮液稀释 10^{-5} — 10^{-6} 后涂布平板。射线源为 Co^{60} 。

3. 硫酸二乙酯 (DES) 诱变: 吸取 50% 的 DES 乙醇溶液 0.2ml, 置于 100ml 三角瓶中, 加入 0.2mol/L、pH7.2 的磷酸缓冲液 5ml、单孢子悬液 5ml。于 30℃、摇床 200r/min 振荡培养 60 分钟, 加入 25% 的硫代硫酸钠溶液 1ml 中止反应。处理液稀释 10^{-5} — 10^{-6} 后涂布平板。

4. 高温处理^[2]: 吸取孢子悬液和生理盐水各 5ml 分别置于两支 15×150 无菌试管中, 两支试管同时放入预先恒温的 75℃ 水浴锅中, 待管内温度上升至 75℃ 后开始计时。于 75℃ 保温 10 分钟后取出迅速冷却。处理液稀释 10^{-5} — 10^{-6} 后涂布平板。

5. 复合处理: (1) γ -射线和高温复合处理, γ -射线: 4 万伦琴; 高温处理: 7 分钟。(2) γ -射线和 DES 复合处理, γ -射线: 4 万伦琴; DES 处理: 40 分钟。(3) DES 和高温复合处理, DES 处理: 40 分钟, 高温处理: 10 分钟。

(三) 筛选方法

1. 筛选方法: (1) 将经诱变的孢子悬浮液稀释至适当浓度后涂布 BCM 平板。于 44℃ 培养 5—7 天, 挑取变色圈直径与菌落直径之比较大的菌株划接察氏斜面, 于 40℃ 培养 9—12 天待孢子成熟后作摇瓶筛选。(2) 将经诱变的孢子悬浮液稀释至适当倍数后涂布 ACM 平板, 于 42℃ 培养 3—5 天后挑取首先长出的菌落接至 SAM 平板, 继续培养 3—5 天, 挑取生长迅速的菌株划接察氏斜面, 于 40℃ 培养 9—12 天待孢子成熟后作摇瓶筛选。(3) 将经诱变的孢子悬液稀释至适当浓度后涂布 ASCM 平板, 其余同方法 (2)。

2. 摇瓶发酵条件: 20% 的山芋粉发酵培养基, 于 40—41℃ 摇瓶培养, 转速 250r/min, 发酵周期 60—64 小时。

(四) 测定方法

1. 总酸测定^[2]: 将发酵液 (初始装液量 50ml, 发酵终点体积 30—35ml) 加水定容至 100ml, 用定性滤纸过滤。吸取滤清液 2ml, 置于 100ml 三角瓶中, 加蒸馏水 10ml、0.5% 的酚酞指示剂两滴, 用 0.1429—0.1430mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 所消耗 NaOH 毫升数即为发酵液中柠檬酸百分比含量 (g/100ml)。

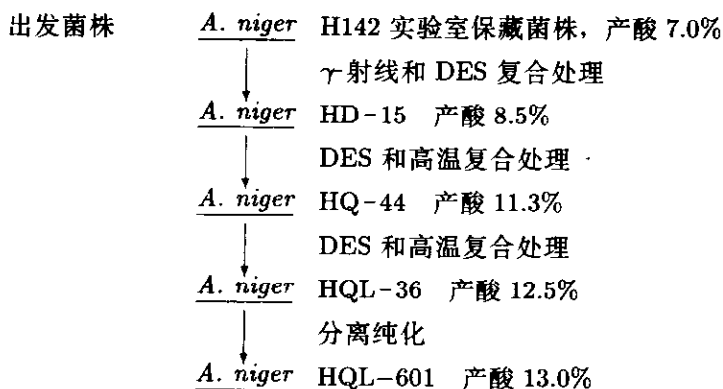
2. 还原糖测定: 斐林试剂氧化-还原滴定法^[2]。

3. 总糖测定: 快速测定法^[2]。

4. 柠檬酸的纸层析测定法^[2]。

5. 高压液相色谱分析: 仪器, HP1050 HPLC; 操作条件, 柱: 100×4.6mm, ODS-hypersil, 粒度: 5 μ m, 流动相: 0.5%(NH₄)₂HPO₄ 溶液用磷酸调节至 pH2.5, 流速: 1ml/min。

实 验 结 果

(一) *A. niger* HQL-601 的选育谱系 *(二) *A. niger* HQL-601 的选育过程

1. 耐高温突变株的筛选: 以 H-142 为出发菌株, 采用 γ -射线和 DES 复合诱变及 γ -射线和高温处理复合诱变, 按筛选方法 (1) 进行平板筛选, 共挑出 108 株进行初筛, 正突变 (产酸高于 7.5% 者) 9 株, 占总数的 8.3%。负突变 (产酸低于 6.5% 者) 42 株, 占总数的 38.9%。若加上因形态异常而被剔除的菌落, 则负突变率将更高。这说明仅以耐高温性状作为“筛子”效率低, 考虑用高酸平板作进一步筛选。

取初筛产酸高于 8.0% 的、且经纸层析检验无杂酸斑者四株进行复筛, 其结果见表 1。

表 1 复筛结果

Table 1 Result of rescreening

菌株编号 Number of strain	产酸 (%) Yield of acid	残糖 (%) Residual sugar	初筛产酸 (%) Yield of acid in first screening
HD-15	8.7	4.4	8.5
HD-31	8.0	4.9	8.2
HD-6	7.8	5.0	8.4
HD-48	7.6	4.8	8.0

注: 表中所列为两瓶平均值

Note: The data of table 1 are the mean of two shaking flasks

由于 HD-15 产酸较高且重复性好, 故以之作为进一步诱变的出发菌株。

2. 耐高温高酸突变株的筛选: 以 HD-15 为出发菌株, 以 DES 单因素诱变或 DES 和高温处理复合诱变, 按筛选方法 (2) 进行平板筛选。共选出 246 株进行摇瓶初筛。其结果是正突变 (产酸高于 9.0% 者) 64 株, 占总数的 26%, 大大高于第一次诱变的 8.3%。说明采用高酸平板筛选是成功的。但在用高酸平板筛选时, 蔓生型形态异常菌落较多, 有时整块平板上全是这种变异菌落, 其原因不详。

* 出发菌株在 250r/min、36℃ 条件下, 发酵周期 72 小时, 产酸 11.5%, 转化率 82.1%。250r/min、40℃ 时, 发酵 72 小时产酸 7.0%。

取 18 株产酸高于 10.0%、纸层析无杂酸者进行复筛(结果略), 根据复筛结果选择 HQ-12 和 HQ-44 作为进一步诱变的出发菌株。

3. 耐高温高酸高渗透压突变株的筛选: 为了进一步提高菌种活性, 考虑“赋予”菌种耐高温特性, 以 HQ-12 和 HQ-44 为出发株, 用 DES 单因素或 DES 和高温处理复合诱变, 按筛选方法(3) 平板筛选。共挑取 205 株进行初筛, 产酸水平集中在 8.5%—12.5% 的狭小范围内。其中产酸率高于 11.5% 者 41 株, 占总数的 19.5%, 产酸率低于 10.5% 者 52 株, 占总数的 25.4%。由初筛菌株中选取产酸高于 12.0% 者 5 株进行复筛, 结果见表 2。

表 2 复筛结果*
Table 2 Result of rescreening

菌种编号 Number of strain	产酸 (%) Yield of acid	残糖 (%) Residual sugar	初筛产酸 (%) Yield of acid in first screening
HQL-d-1	12.0	1.4	12.2
HQL-dh-36	12.5	1.0	12.4
HQL-dh-37	11.7	2.0	12.3
HQK-dh-4	12.0	1.5	12.0
HQK-dh-29	11.5	2.0	12.2

* HQL-系列菌株由 HQ-44 诱变获得

The strains numbered with HQL—are obtained from HQ-44

HQK-系列菌株由 HQ-12 诱变获得

The strains numbered with HQK—are obtained from HQ-12

(三) 纯化与传代试验

根据表 2 结果, 对 HQL-36 反复分离纯化, 获得一支稳定的高产菌株 HQL-601。其遗传稳定性见表 3。

表 3 *A.niger* HQL-601 遗传稳定性*
Table 3 Genetic stability of *A.niger* HQL-601

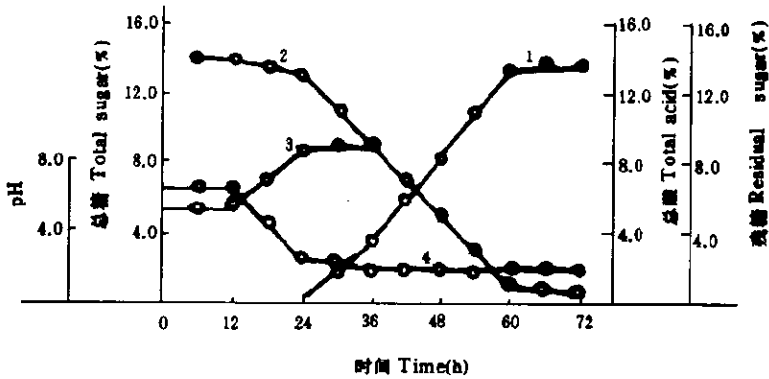
代数 Generations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
产酸 (%) Yield of acid	13.0	13.1	13.0	13.2	13.0	13.3	13.1	13.2	13.2	13.2

* 传代所用斜面培养基为察氏培养基

The medium used for slant culture is Czapek's medium

(四) HQL-601 发酵过程曲线

从图 1 可以看出, 20 小时发酵液总酸开始上升。24—60 小时, 产酸速率基本恒定, 总酸曲线为一直线。64 小时以后产酸速率迅速降低。此时耗糖亦趋于停止, 说明已达到发酵终点。还原糖曲线在 12 小时以前为水平直线, 以后迅速上升, 至 28 小时达到最大值, 以后与总糖曲线同步下降, 说明 28 小时以前糖化已经完成。发酵液 pH 值在 12 小时以前也维持不变, 以后迅速降低, 24 小时后降低至 2.5, 以后缓慢降低至 pH2.0, 维持不变至终点。

图1 *A. niger* HQL-601 发酵过程参数曲线Fig. 1 Time course of fermentation by *A. niger* HQL-601

1. 总酸 Total acid(%); 2. 总糖 Total sugar(%);

3. 还原糖 Reducing suger(%); 4. pH

(五) 发酵液高压液相色谱分析结果

目前, 柠檬酸发酵界流行着一种观点, 即高温发酵产生杂酸。为了寻找支持或否定这一观点的实验依据, 作者委托本院测试中心对黑曲霉 HQL-601 发酵液 (发酵温度 40—41 °C 和某厂柠檬酸车间的发酵液 (发酵温度 35—36 °C) 进行了高压液相色谱分析, 其结果见图 2 和图 3。生产厂家的样品液相层析图谱除柠檬酸峰外, 尚有一个草酸峰和另外八个未知峰。草酸峰面积占总面积的 20.4%, 而柠檬酸峰面积仅占总面积的 72.1%。HQL-601 发酸液的液相层析图谱只有一个柠檬酸峰和一个很小的草酸峰。其柠檬酸峰面积占总面积的 91.8%。两相对比, 一目了然。



图2 黑曲霉 HQL-601 发酵液 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of the broth by fermentation of *A. niger* HQL-601

1. 草酸 Oxalic acid; 2. 柠檬酸 Citric acid

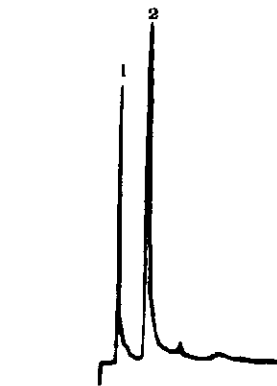


图3 生产样品发酵液的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC of the broth from the industrial production

1. 草酸 Oxalic acid; 2. Citric acid

由此我们可以得出结论, 菌种特性是决定柠檬酸发酵产酸组成的决定性因素, 高温发酵并不一定导致产生大量杂酸。

结 论

综上所述, 可以得出以下结论:

1. γ -射线、DES 及高温处理是有效的诱变因子。
2. 高温培养条件及高温高酸培养基对耐高温柠檬酸生产菌株的筛选具有定向性。
3. *A. niger* HQL-601 是适于高温 (40—41 °C) 发酵的柠檬酸高产菌株。其发酵温度为 40—41 °C, 发酵周期 60—64 小时, 产酸率 13%, 转化率 92.9%。其发酵产酸组成优于目前生产菌株。
4. 菌株特性是决定产酸组成的关键因素, 高温发酵并不一定导致产生大量杂酸。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院《菌种保藏手册》编著组: 菌种保藏手册 p.63, 科学出版社, 北京, 1980 年。
- [2] 金其荣等: 有机酸发酵工艺学, 第 41—312 页, 轻工业出版社, 北京, 1989 年。

THE BREEDING OF THERMOTOLERANT CITRIC ACID OVERPRODUCING STRAINS FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Jin Qirong Lan Qingdao Zhu Baoyong

(Department of Fermentation Engineering, Wuxi College of Light Industry, Wuxi 214036)

Aspergillus niger HQL-601, a thermotolerant citric acid producer derived from more than 600 mutants of *Asp. niger* H-142, could accumulate 13.0 g/100ml citric acid in 20% sweet potato flour medium under the condition of 250 r/min and 40—41 °C with the fermentation time of 60—64 h. The results of HPLC indicated that the purity of citric acid in the broth of HQL-601 was much higher than that of the strain used by factories.

Key words *Aspergillus niger*; Citric acid; Thermotolerant mutant; Breeding