

# 高浓度薯干直接发酵柠檬酸的研究

## ——黑曲霉 5016 的选育

朱亨政 侯琴芳 杨芸芬 郑安梅

(上海市工业微生物研究所, 上海)

王 桂 香

(上海新型发酵厂, 上海)

肖 曼 夫

(上海酵母厂, 上海)

本文报道了利用高浓度薯干粉产生柠檬酸的菌种选育。从一份土壤样品中, 分离出一株黑曲霉野生菌株 628。628 菌株能代谢柠檬酸。在发酵培养基中, 菌丝呈纤维状。利用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线处理 628 菌株, 并采用选择培养的筛选方法, 获得了一支突变株黑曲霉 5016 (*Aspergillus niger* 5016)。在发酵培养基中 5016 菌株的菌丝形成粗糙的小球生长。在  $33^\circ\text{C}$  振荡培养 5 天, 其柠檬酸可达 15—17%, 对总糖的转化率为 90%, 而且不含其他的有机酸。

利用柠檬酸为唯一碳源的合成培养基进行选择培养的筛选方法, 可比传统的筛选方法效率高三倍。

对于突变株的高产原因也进行了讨论。

我国柠檬酸深层发酵主要采用黑曲霉为菌种, 直接利用薯干粉为原料, 在主发酵中不添加任何营养盐和生酸促进剂。1969 年投产时产酸 6—7%, 对投入总糖的转化率约为 80%。1975 年通过菌种诱变与筛选, 获得生产菌种黑曲霉  $D_{333}^{12}$ , 使发酵产酸提高到 9% 以上, 对糖转化率达 90%。1977 年我们采用土壤野生菌为出发菌, 经放射性同位素钴  $\gamma$ -射线诱变育种, 获得新菌种黑曲霉 5016, 使发酵产酸又有了进一步提高, 本文主要报道黑曲霉 5016 的选育。

## 材 料 与 方 法

### (一) 材料

### 1. 出发菌种的选择

将土壤分离得到的高产酸野生菌, 分别移植在以柠檬酸为唯一碳源的合成培养基\*斜面上, 观察野生菌对柠檬酸利用情况, 如表 1 所示。

从表 1 可看出野生菌 628 及生产菌  $D_{333}$ , 能利用柠檬酸, 在柠檬酸为唯一碳源的培养基上生长旺盛, 这对发酵是不利的。又野生菌 628 在发酵液中呈“纸浆状”生长 (图版 I-1), 较稠厚比呈小球状生长的  $D_{333}$ , 生产菌更不利于发酵中氧的溶解与传递。通过诱变育种克服上述二个缺点, 以利于柠檬酸发酵, 为此, 我们决定选择野生菌 628 为出发菌进行辐射诱变育种。

### 2. 诱变因子

放射性同位素  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线。

### 3. 培养基

出发菌株用的斜面培养基: 同柠檬酸为唯一

本文于 1980 年 3 月 10 日收到。

本文由屠乃琰同志审阅, 特此致谢。

\* 合成培养基组成 (%): 柠檬酸钠 2.0;  $\text{FeSO}_4$  0.05;  $\text{KCl}$  0.05;  $\text{MgSO}_4$  0.05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1;  $\text{NaNO}_3$  0.3; 琼脂 2.0 (精制、洗涤); pH 5.0。

表 1 野生高产酸菌对柠檬酸的利用

结果 菌号	项 目	培 养 天 数**							发 酵 产 酸	
		1	2	3	4	5	6	7	发酵菌丝状态	产酸(%)
2363		—	—	—	—	—	—	+	小 球 +++	6.0
7003		—	—	—	—	—	—	+	小 球 +++	6.7
6548		—	—	—	—	—	±	++	小 球 +++	6.1
628		—	±	+	++	+++	++++	++++	纸浆状 ++++	4.5
D <sub>353</sub> *		—	—	±	+	++	++	+++	小 球 +++	7.2

\* D<sub>353</sub> 为生产菌。

\*\* 培养生长情况：“—”不生长；“±”极微量生长；“+”微生长；“++”生长差；“+++”生长；“++++”生长旺盛。

碳源的合成培养基。

“选择培养的”培养基：同上，但不添加琼脂。

分离培养基：4°Brix 麦芽汁，琼脂 2.0%。

斜面培养基：8—10°Brix 麦芽汁，琼脂 2.0%。

发酵筛选培养基：1 公斤薯干粉与 4 公升水在水浴中混合，将水浴升温至 70—80℃，添加 1 克 α-细菌淀粉酶(上海酒精厂生产)，继续升温至 90℃，液化 30 分钟。

## (二) 方法

### 1. <sup>60</sup>Co γ-射线的辐照及处理

辐射方法、剂量及条件见以前报道<sup>[1]</sup>。

将出发菌株黑曲霉 628 接种在上述以柠檬酸为唯一碳源的出发菌用的斜面培养基中，33℃ 培养 10 天。取 4 支此斜面，用 pH6.8 磷酸盐缓冲液冲洗 2 次，洗下孢子将其置于含有玻璃珠的锥形瓶内，振荡 5 分钟。用二层薄型宣纸过滤，将滤液定容至 100 毫升，置 25 毫升比色管中，于 30 伦/秒的 <sup>60</sup>Co γ-射线辐照至总剂量 8 万伦。将此辐射处理后的孢子悬浮液接种于选择培养的培养基中，33℃ 静止培养 18—24 小时，再经上述二层薄型宣纸过滤，以除去能在柠檬酸为唯一碳源的培养基中生长的野生型菌种，以提高筛选效率。

### 2. 诱变菌的分离

将处理过的滤液稀释，用分离培养基进行分离选择。将选出菌落移植在麦芽汁斜面培养基上，33℃ 培养七天。

### 3. 诱变菌的筛选

取在麦芽汁斜面培养七天的诱变菌孢子一铂金耳，接种在发酵筛选培养基中(装液量为 250 毫升锥形瓶装 50 毫升)，在 200 转/分迴转摇瓶机

上，33℃ 发酵 4 天，测定其产酸能力。

## 4. 分析测定

取发酵滤液 1 毫升用 0.143N NaOH 滴定。产酸高者再用五溴内酮法或醋酸-吡啶比色法及纸上层析法鉴定其柠檬酸含量。

# 结果与讨论

## (一) 选择培养分离筛选的效果

采用上述以柠檬酸钠为唯一碳源的培养基，将选择培养方法与不经选择培养的直接筛选法进行比较，结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出：选择培养法处理比不经选择培养处理的筛选效率约高三倍。而且最终选获的最高产酸变株 5016 及 4072 均为选择培养法选得的。另外，变异菌的外观形态与产量有一定关系。从 16 株优性变株中 S 型占 12 株，L 型及 BI 型各占 2 株。而且最高产酸变株 5016 及 4072 均为 S 型(如图版 I-4)。

## (二) 变株 5016 的菌落形态

变株 5016 在麦芽汁平板上开始呈乳滴状小菌落，形似“细菌”。发酵培养液中总是形成细小毛糙的菌球体。(如图版 I-2)而出发菌 628 则呈正常的大菌落，发酵培养液中呈“纸浆”状生长。(如图版 I-1)。

## (三) 变株 5016 的发酵结果

在实验室内将 23% 薯干粉(W/V)经 0.1% α-细菌淀粉酶(W/W)液化(90℃，

表 2 选择培养与不经选择培养的分离筛选效果

菌号	辐照后的处理	分离菌类型	菌落形态	发酵产酸 (%)	备注
D <sub>333</sub>	—	L	正 常	6.00	生产菌出发菌
628	—	L	正 常	4.00	
5087	选择培养	S	S-小菌落 (约为正常菌落的三分之一大小)	8.40	变异的优良变株。
5085	选择培养	S		8.15	
3098	选择培养	S		8.80	
3097	选择培养	S		8.15	
5016	选择培养	S		9.10	
4072	选择培养	S		9.10	
274	选择培养	S		8.10	
7314	选择培养	S		8.30	
7494	选择培养	S		8.40	
9096	选择培养	S		8.10	
9073	选择培养	L		8.10	
7204	选择培养	BI	BI-菌丝或孢子颜色改变菌落	8.70	
7183	选择培养	BI		8.50	
3009	未经选择培养	L	L-正常菌落	8.60	变异的优良变株。
3026	未经选择培养	S		8.05	
7081	未经选择培养	S		8.00	

30 分钟), 分装于 250 毫升锥形瓶中, 每瓶装液量 50 毫升。灭菌后接入已培养好的 5016 菌孢子一环, 置 300 转/分的回转式摇瓶机上, 33℃, 发酵 5—6 天。产酸可达 15—17%, 对总糖的转化率为 90% 以上。而出发菌 628 产酸仅 4—6%, 转化率约 30%。5016 菌的发酵液经分析确证几乎全为柠檬酸。

(四) 变株 5016 的生长与产酸

变株 5016 在发酵初期(30 小时以前), 菌体生长很差, 仅为出发菌 628 的 20% 以下, 而发酵后期 (80 小时左右) 菌体重量颇为接近, 如图 1 所示。它是边生长边产酸的。这与通常的糖质原料发酵明显地分为生长与产酸期是显著不同的。

(五) 变株 5016 与出发菌 628 的一些特征

5016 及 628 在以葡萄糖和有机酸为

唯一碳源的合成培养基及天然培养基 (麦芽汁) 上的生长, 如表 3 所示。

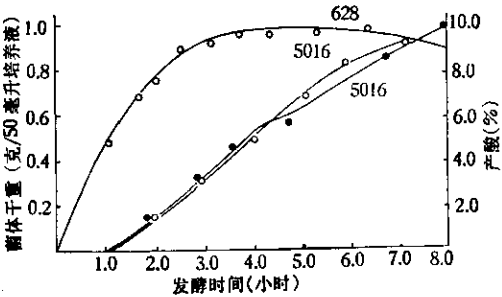


图 1 变株 5016 和出发菌 628 在发酵中菌体的生长与产酸

○—○ 菌体 ●—● 产酸

表 3 5016 及 628 在合成及天然培养基上的生长情况

唯一的碳源*	菌种	5016		628	
		菌落直径 (厘米)	孢子量**	菌落直径 (厘米)	孢子量
麦 芽 汁		5.0	++++	7.0	++++
葡 萄 糖		2.3	—	6.2	++++
醋 酸		2.0	—	2.3	+++
乳 酸		3.0	—	4.5	+++
柠 檬 酸		0.1	—	1.8	++
异柠檬酸		4.4	++	4.5	+++

\* 基础培养基组成(%):

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.2; MgSO<sub>4</sub> 0.1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05; 琼脂 2.0; pH5—7。培养温度: 33℃。培养时间: 四天。

\*\* 孢子量: “—” 无孢子; “++” 一般; “+++” 较多; “++++” 多; “+++++” 特多。

从表 3 可以看出:

1. 5016 在柠檬酸为唯一碳源的合成培养基中生长极为微弱, 不着生孢子。628 虽生长稍缓但能正常地生长与着生孢子。

2. 在异柠檬酸为唯一碳源的合成培养基中, 5016 与 628 均能正常生长并着生孢子。

3. 在天然培养基上 5016 比 628 生长缓慢(四天), 但都能正常地着生孢子。

4. 在葡萄糖为唯一碳源的合成培养基上, 628 生长正常并能着生孢子(如图版 I-5), 而 5016 生长显著缓慢(如图版 I-7)且

不着生孢子,如果向培养基中添加少量的铁离子则可加快它们的生长,并使 5016 着生少量孢子(如图版 I-8)。如加入少量的单氟乙酸则可使 5016 和 628 均生长缓慢并失去着生孢子的能力。

据报道铁离子是乌头酸水合酶的激活因子<sup>[3]</sup>,单氟乙酸是乌头酸水合酶的竞争性抑制剂<sup>[4]</sup>。由此推测上述生长缓慢及不着生孢子等现象可能与菌种的乌头酸水合酶的强弱有关。从 5016 在柠檬酸为唯一碳源的培养基上生长极为微弱而 628 则生长较正常等现象推测,5016 的乌头酸水合酶的水平比 628 低。这样就改变了出发菌 628 能利用柠檬酸的缺点,从而提高了菌种的发酵产酸水平。

5. 5016 菌在发酵液中总是“顽固”地

形成微小毛糙的菌球体(如图版 I-2),这样发酵液菌体浓度总是能保持在一定的菌球体数量级上,使发酵液相对地比出发菌 628 那样的“纸浆”状生长(如图版 I-1)稀薄。这就改善并提高了发酵罐内通气与搅拌的效率,从而对柠檬酸发酵有利。这是 5016 菌高产酸的另一个主要原因。

由此可知出发菌的选择及诱变筛选方法是重要的。

### 参 考 文 献

- [1] 上海市工业微生物研究所等: 微生物学通报, 5 (2): 10—11 (1978)
- [2] 上海市工业微生物研究所, 上海酒精厂: 微生物学通报 5 (5): 10—13 (1978)
- [3] 鈴木智雄ら: クエン酸発酵阻害の研究(第 1 報), 工芸技術院发酵研究所研究报告第 29 号, pp31—43, 1966.

## STUDIES ON DIRECT FERMENTATION OF CITRIC ACID FROM HIGHLY-CONCENTRATED SWEET POTATO MASH — THE SELECTION OF *ASPERGILLUS NIGER* 5016

Zhu Hengzheng Hou Qinfang Yang Yufeng Zheng Anmei

(Shanghai Institute of Industrial Microbiology)

Wang Guixiang

(Shanghai Xin Xing Fermentation Factory)

Xiao Manfu

(Shanghai Yeast Factory)

The selection of citric acid-producing strains that utilize highly-concentrated sweet potato mash was studied. A wild strain 628, belonging to the *Aspergillus niger* group, was isolated from a soil sample. The strain 628 metabolized citric acid and its mycelia were filamentous in the fermentation medium. A mutant named *Asp. niger* 5016 was obtained from the wild strain through treatment with  $\gamma$ -rays of  $^{60}\text{Co}$  and screening by selective culture. The mycelia of this mutant formed

rough pellets in the fermentation medium. When this mutant was cultured in shake flask at 33°C for 5 days, the citric acid produced was 16—17%, and the total sugar conversion rate was 90%.

The screening by selective culture was carried out in a sythetic medium containig citric acid as the sole carbon source. The screening efficiency of this method was 5 times higher than those of the conventional methods.