

甘薯原料发酵柠檬酸的菌种选育及发酵条件的研究

天津市工业微生物研究所柠檬酸组

(天津)

从腐烂水果上分离出一株柠檬酸产生菌——黑曲霉,经两次不同能源的 γ -射线照射获得一株变异株,产酸能力比原菌株提高50%以上,编号为 γ -144。

Aspergillus niger γ -144 能够利用甘薯粉做为唯一营养源进行柠檬酸发酵,在12%甘薯粉培养基上振荡培养5天,总酸产量达到9%,对总糖转化率达90%。

柠檬酸是食品、医药和化工等部门的重要原料,有着广泛的用途。解放前,我国柠檬酸完全依赖进口。在无产阶级文化大革命中,广大工人和科学工作者在毛主席的革命路线指引下,贯彻“独立自主、自力更生”的方针,实现了柠檬酸的工业化生产。

糖质原料发酵柠檬酸主要是利用黑曲霉 (*Asp. niger*)。通过分离筛选,我们在腐烂水果上获得一株能够以甘薯粉为原料,不再添加其他营养成分,进行深层发酵,积累柠檬酸的菌种。通过诱变*,产酸能力提高50%以上,编号为黑曲霉 γ -144。本文报道该菌的筛选、变异及摇瓶发酵条件。

材料与方 法

(一) 试样:取自果园,共39个。

(二) 培养基:

1. 分离培养基(%):甘薯粉15,柠檬酸10。分装在试管内,1公斤/厘米²压力灭菌20分钟。

2. 生长培养基:4°Bé 麦芽汁,2%琼脂。1公斤/厘米²压力灭菌15分钟。

3. 种子培养基(%):甘薯粉8,麸皮1。每500毫升三角瓶装100毫升,1公斤/厘米²压力灭菌30分钟。

4. 发酵培养基:12%甘薯粉,每500毫升三

角瓶装100毫升,1公斤/厘米²压力灭菌30分钟。

(三) 培养方法:采用迴转摇床,193转/分,偏心距25毫米;31—32℃振荡培养,菌丝接种,接种量5%(V/V),培养5天。

(四) 分析方法:

1. 总酸测定:用0.1429N的NaOH滴定,1%酚酞酒精溶液为指示剂,以消耗NaOH的毫升数表示总酸含量。

2. 柠檬酸测定:五溴丙酮法^[1]。

3. 总糖测定:用1:1盐酸把发酵液中的多糖分解成单糖,用费林氏溶液法测定^[2]。

试 验 与 结 果

(一) 菌种的分离与筛选

采用酸性滤纸法^[3],把少许试样混入分离培养基中,摇匀,倾入无菌培养皿内(内有2—3层滤纸做支持物),31℃培养4—5天,把长出的单菌落挑入生长培养基斜面上,31℃培养4—5天,即可见到孢子。

初筛:将上述生长好的斜面种子,用无菌操作切取一小块,投入发酵培养基中,振荡培养6天,测定总酸。

复筛:根据初筛总酸产量,选取产酸

本文1975年9月22日收到。

* 在菌种诱变工作中,南开大学生物系和河北大学物理系曾给予大力协助,特此致谢。

较高者,按上述方法进行平行发酵试验来考察其产酸能力。

由39个试样分离出353个单株,经过复筛,获得一株编号为5-6的黑曲霉。该菌是从天津市青光农场果园的烂梨上分离出来的,产总酸能力5—6%。

(二) 菌种诱变

1. 出发菌株: 5-6号。

2. 诱变能源: 钴⁶⁰和静电加速器产生的 γ -射线。

3. 诱变方法: 从生长培养基上用无菌水洗下嫩孢子,倒入有玻璃球的无菌三角瓶中,摇振数分钟,用带有脱脂棉的灭菌漏斗过滤,制成 10^5 — 10^6 个孢子/毫升的单孢子悬浮液,每支 10×100 毫米的试管装5毫升,用钴⁶⁰进行照射。把照射过的悬浮液经适当稀释涂布于有生长培养基的培养皿内,31℃培养3—4天,挑出单株,进行产酸试验。经8万伦琴剂量照射后,得到一株 γ -115,经复筛,产酸能力达8.1%。

为进一步提高产酸能力,以 γ -115为出发菌,以静电加速器产生的12万伦琴的 γ -射线进行第二次照射,获得一株编号为

γ -144的菌株,总酸产率在9%左右。

(三) 形态观察

用察氏(Czapek)琼脂培养基^[4]于30℃培养的菌落进行显微镜观察。

从结果(表1)可以看出:野生菌株5-6及其变异株的主要形态特征与黑曲霉(*Aspergillus niger*)基本一致^[4-5]。

(四) γ -144菌的培养条件

1. 碳源试验: 以不同的碳源代替察氏液体培养基的蔗糖,每250毫升三角瓶装入40毫升培养液,振荡培养5天,观察对碳源的利用情形。表2结果表明,该菌能够利用多种单糖、双糖、多糖及多元醇,但不能利用纤维素粉。我们发现,在甘薯粉培养基中菌种生长旺盛,pH值下降缓慢,有较强的缓冲能力,适应于糖化酶的活力。同时也说明,该菌和大多数真菌一样,在半乳糖、鼠李糖和乳糖培养基上生长不良^[5]。

2. 氮源试验:

用察氏液体培养基,以不同的氮源代替硝酸钠,每250毫升三角瓶装40毫升培养液,振荡培养5天。结果(表3)看出,有机氮和无机氮都是良好营养源,而 γ -144

表1 黑曲霉菌种的形态特征

项目 \ 菌号	5-6	γ -115	γ -144
菌落形态	生长扩展,边缘不整齐,菌落初白色,渐为黄色,孢子区域黑色	生长扩展,边缘不整齐,菌落成黄色,孢子区域黑色,气生菌丝少	生长扩展,边缘不整齐,菌落极淡,黄色,孢子区域黑色,气生菌丝少
分生孢子头	球形,黑色,直径160—380微米	球形,黑色,直径120—380微米	球形,黑色,直径200—480微米
分生孢子梗	长430—900微米,直径11—16微米,光滑	长680微米,直径11—16微米,光滑	长846—1200微米,直径16微米,光滑
顶囊	球形,直径31微米,全面着生小梗	球形,直径43微米,全面着生小梗	球形,直径37.5微米,全面着生小梗
小梗	双层,小梗 12.5×6.3 微米,梗基 31.3×9.3 微米	双层,小梗 12.5×6.3 微米,梗基 37.5×9.3 微米	双层,小梗 12.5×3.8 微米,梗基 31.3×9.3 微米
分生孢子	球形,直径5—7微米,明显具刺	球形,直径5微米,明显具刺	球形,直径5微米,明显具刺
菌核	无菌核	无菌核	无菌核

表 2 黑曲霉 γ -144 对碳源的利用

碳 源	pH 值	生 长	碳 源	pH 值	生 长	碳 源	pH 值	生 长
葡萄糖	3.2	+++	乳糖	5.0	+	玉米淀粉	3.0	+++
半乳糖	4.0	++	蜜二糖	3.0	+++	甘薯粉	5.0	+++
鼠李糖	3.0	++	棉籽糖	3.0	+++	玉米粉	4.0	+++
蔗糖	3.0	+++	可溶性淀粉	3.0	++	纤维素粉	6.5	-
麦芽糖	4.0	+++	糊精	3.0	+++	甘露醇	3.0	+++

注 “-” 未生长; “+” 生长较差; “++” 生长良好; “+++” 生长旺盛;

菌在有机氮的培养基上生长更好, 缓冲作用较强, pH 值较稳定。相反, 利用无机盐作为氮源时, 由于该菌优先利用铵态氮, 致使 pH 值显著降低。

表 3 黑曲霉 γ -144 菌株对氮源的利用*

氮 源	生 长	pH 值	氮 源	生 长	pH 值
豆饼粉	+++	1.8	蛋白胨	+++**	1.6
麸皮	+++	2.0	硝酸钠	+++	1.8
米糠	+++	2.0	硫酸铵	+++	1.0
酵母膏	+++	1.6	硝酸铵	+++	1.0

* 生长符号与表 2 同。 ** 生长为絮状菌丝。

3. 金属离子试验:

采用上述发酵培养基, 分别加入表 4 所示几种金属离子, 接入 γ -144 菌种, 振荡培养 5 天, 观察对生长的影响。从表 4 结果说明, 所试验的几种金属离子对生长的影响不明显。

4. 通气量试验:

每 500 毫升三角瓶分别装 60、80、120、140、160 毫升发酵培养基, 菌丝接种, 发酵 5 天。在振荡培养时, 溶解氧受装液量的影响, 而图 1 显示出在一定范围内, γ -144

表 4 金属离子对黑曲霉 γ -144 的影响

离 子	浓度(%)	pH 值	生长情况	离 子	浓度(%)	pH 值	生长情况
Cu^{++}	0.05	2.4	+++	Zn^{++}	0.05	2.0	+++
		2.2	+++			3.0	++
		3.1	+++			2.5	++
	0.01	2.0	++		0.01	2.8	+++
		2.0	+++			2.6	+++
		2.3	+++			3.2	+++
	0.001	2.5	+++		0.001	2.5	+++
		2.0	+++			3.5	++
		—	—			2.6	++
Mn^{++}	0.05	3.0	+++	Fe^{++}	0.05	2.5	+++
		2.5	+++			2.6	+++
		3.2	+++			3.7	+++
	0.01	2.2	+++		0.01	2.6	+++
		2.3	+++			2.4	+++
		2.5	++			2.5	+++
	0.001	3.5	+++		0.001	2.6	+++
		2.2	+++			2.5	+++
		3.0	+++			2.5	+++

* 金属离子的百分含量分别以 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 计。

菌产酸与装液量的关系不十分明显，当装液量为 140 毫升时，产酸仍在 8.8% 以上，当装液量达 160 毫升时产酸下降至 8.2%，这说明该菌需要的通气量较小。还发现，当装液量小时生成杂酸较多。

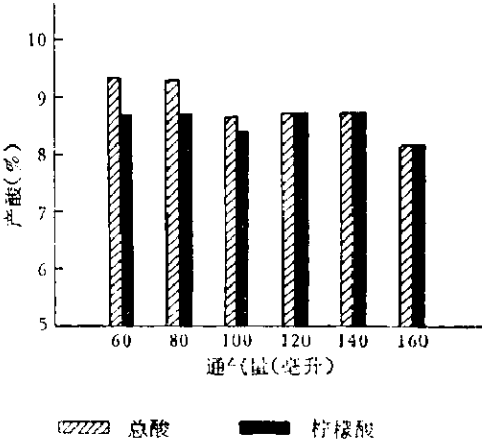


图1 通气量与产酸关系

5. 接种量试验：

用培养 23 小时的种子，以不同接种量接入发酵培养基，发酵 5 天。结果（图 2）表明，接种量对产酸影响不大。

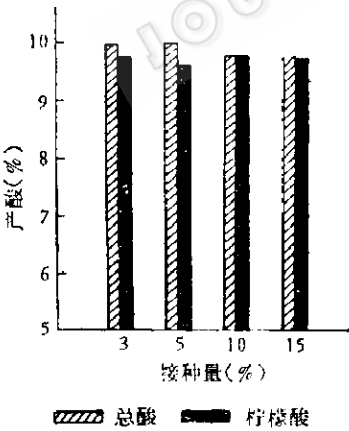


图2 接种量与产酸关系

6. 甘薯粉浓度试验：

甘薯粉浓度分别为 8%、12%、16%、20%。菌丝接种，发酵 5 天。结果（图 3）表明，柠檬酸产量随甘薯粉浓度的增加而提高，考虑到对原料的利用率，以 12—16% 的甘

薯粉浓度比较经济合理。

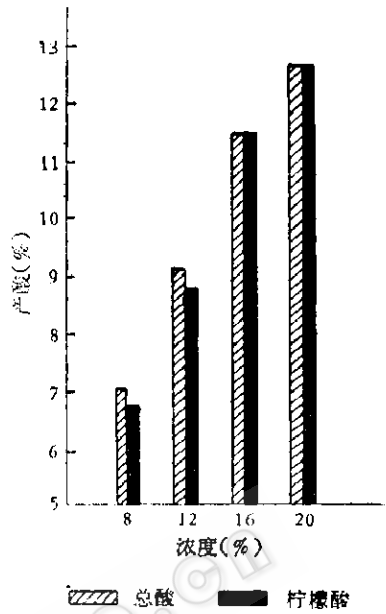


图3 甘薯粉浓度与产酸关系

(五) 综合发酵试验

综合上述培养条件：以 12% 甘薯粉为培养基，每 500 毫升三角瓶装 100 毫升，用 5% (V/V) 的菌丝接种，自然 pH 值，31℃ 振荡培养 5 天，获得图 4 所示的结果。从图 4 可以看出，淀粉糖化和发酵产酸是同时进行的，48 小时前产酸可达 4.5%。该菌前期发酵速度较快，当发酵进入后期，产酸随着糖的消耗呈直线上升，发酵至 5 天产酸

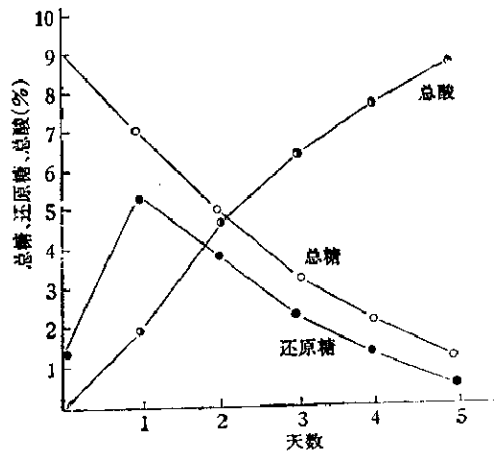


图4 摇瓶培养糖、酸的消长

达9%。我们依据小型试验确定的条件,进行过 50 升、500 升、2500 升发酵罐的放大试验,均获得良好结果。

结 束 语

1. 经由自然筛选和两种不同能源的 γ -射线照射后获得的 γ -144 是一支较优良的糖质柠檬酸产生菌,具有发酵速度快,通风量小,原料利用率高等优点。

2. 甘薯是一种高产经济作物。甘薯粉含有丰富的营养成份,能足以满足 γ -144 菌的生长与代谢的需要,因而不需加其它的营养盐。以甘薯原料直接发酵柠檬酸的工艺简单,发酵稳定,管理容易。

3. 黑曲霉 γ -144 前期产酸较快,可以

提高抗杂菌的能力和缩短发酵周期。然而 pH 值下降太快,不利于糖化作用。如何解决好糖化与产酸的关系,是保证产酸顺利进行的关键,有待于进一步研究探讨。

参 考 资 料

- [1] Nalelson, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **175**: 745—750, 1940.
- [2] 轻工业部食品工业科学研究所分析研究室: 农副产品及野生植物主要成分分析法, 第 133 页, 中国财政经济出版社, 北京, 1964。
- [3] 坂口谨一郎, 多田靖次: 日本农化会讲演, 1935。
- [4] Smith, G. (徐浩译): 工业真菌学纲要, 第 229 页, 科学出版社, 北京, 1964。
- [5] 中国科学院微生物研究所: 常见与常用真菌, 第 268 页, 科学出版社, 北京, 1973。
- [6] Cochrane, V. W. (陈驹声等译): 真菌生理学, 第 61 页, 科学出版社, 北京, 1963。

STUDIES ON STRAIN SELECTION AND FERMENTATION CONDITIONS OF CITRIC ACID FROM SWEET POTATO POWDER

CITRIC ACID FERMENTATION GROUP OF TIANJIN
INSTITUTE OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

(Tianjin)

A citric acid, producing strain of *Aspergillus niger* was isolated from rotten fruits. After treating this strain with γ -radiation of different energy sources twice, a mutant named *Asp. niger* γ -144, was obtained. The acid producing power of this mutant was raised more than 50% as compared with its parent strain.

Aspergillus niger γ -144 can utilize sweet potato powder as its sole nutrient source for citric acid fermentation. When it was cultured at 31—32°C by shaking for 5 days with 12% sweet potato powder, the total acid yield and the total sugar conversion rate was 9% and 90% respectively.