

# 葡萄糖母液摇瓶发酵生产柠檬酸

朱亨政 赵国础 王熙萍 王杏枝 宣家祥

(上海市工业微生物研究所, 上海)

深层发酵生产柠檬酸, 国内主要以薯干为原料。而利用葡萄糖母液为原料发酵生产柠檬酸, 国内尚无报道。为此我们进行了菌种选育和发酵条件试验的研究。

## 材料和方法

### (一) 菌种

1. 出发菌株: 黑曲霉 No. 3008 (薯干深层发酵生产菌)<sup>[1]</sup>。

2. 柠檬酸生产菌: 黑曲霉 r-130 等。

### (二) 培养基

1. 斜面培养基: 4Be' 麦芽汁, 琼脂 2.5%。

2. 分离培养基: 2Be' 麦芽汁, 琼脂 2.5%。

3. 种子培养基: 2% (含糖量) 葡萄糖母液, 米糠 5%, pH4.5。

4. 发酵培养基: 15% (含糖量) 葡萄糖母液, 米糠 4%, pH4.5。或上述培养基添加 1% 碳酸钙, 将糖浓度提高到 20% 左右。

### (三) 摇瓶发酵条件

种子与发酵培养基均采用 250ml 三角瓶装 50ml 培养基, 33—35℃, 置 300 rpm 摇床上, 种子培养 24 小时左右, 发酵培养 120 小时左右。每次实验重复三次。

### (四) 诱变因子和诱变方法

化学诱变剂: 硫酸二乙酯 (DES), 使其在孢子悬液中的浓度为 80mg/ml, 常规方法处理。

物理诱变因子: 同位素<sup>60</sup>Co $\gamma$ -射线, 方法与前同<sup>[1]</sup>。

### (五) 分析测定

1. 还原糖测定: 用斐林氏定糖法。

2. 酸度测定: 取发酵液 1ml 用 0.1429N 的 NaOH 滴定, 产酸高者再用醋酐-吡啶比色法鉴定其柠檬酸含量。

## 结果与讨论

### (一) 菌种的诱变选育

对黑曲霉 No. 3008 进行了连续诱变。先经 DES 处理后, 根据柠檬酸高产菌的形态特征, 挑取了 229 株菌, 其中一株 D-147 菌经初复筛, 产酸稳定在 12% 左右, 比出发菌提高产酸约 20%。再以<sup>60</sup>Co $\gamma$ -射线辐照 D-147, 挑取了近 200 株菌, 其中一株产酸达 14%, 比出发菌 No. 3008 菌提高产酸近 40%。经过初复筛, 产酸能力稳定, 是一株性能较好的高产变异株, 暂定名为黑曲霉 r-130。

r-130 菌株继承了 No. 3008 菌株的优良性状, 其发酵液中几乎无其它杂酸生成, 因此是一株利用葡萄糖母液发酵生产柠檬酸较理想的菌株。

### (二) r-130 菌的发酵条件

#### 1. 种子培养基组成对发酵的影响

试验结果表明, 种子培养基中需添加适量的有机氮源。以 5% 的米糠和 2% 糖浓度的葡萄糖母液所组成的种子培养基较有利于发酵产酸 (表 1)。在此发酵条件下, 种醪接种与孢子液直接接种比较, 产酸水平相近。

#### 2. 种龄与接种量对产酸的影响

从表 2 中可以看出, 种龄长短对产酸的影

表 1 种子培养基组成对发酵产酸的影响\*

种子培养基(%)			产酸率(%)	
含糖量	米 糠	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	I	II
2	4	—	13.7	13.8
2	5	—	14.9	14.5
2	6	—	13.9	13.1
2	7	—	11.7	11.8
2	—	0.4	6.8	7.0
2	—	0.5	7.8	7.6
2	—	0.6	5.5	4.5
2	—	0.7	2.8	2.4
5	4	—	9.7	10.0
5	5	—	11.8	11.9
5	6	—	11.2	11.1
5	—	—	10.8	11.2

\* 发酵时间: 5天, 接种量为 10%。

响不大, 而接种量大小则对产酸影响较大, 适宜的接种量为 8—10% (表 2)。

表 2 种龄、接种量对产酸的影响\*

产酸率(%)	种龄(h)	接种量(%)			
		12	18	24	30
2	2	6.5	6.3	6.1	5.9
4	4	9.1	8.9	8.7	8.5
6	6	11.6	12.3	12.1	11.2
8	8	14.9	15.0	15.3	14.8
10	10	15.3	15.5	15.7	15.4

\* 发酵总糖: 16%

表 3 接种孢子数对发酵产酸的影响

稀释倍数*		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
产酸率(%)	I	14.4	15.8	9.5	4.1
	II	14.4	13.7	8.8	4.0

\* 将培养好的麸曲瓶中加入 1000 ml 无菌水, 然后逐级稀释

### 3. 接种孢子数对发酵的影响

将麸曲瓶培养的孢子稀释成不同浓度后接入发酵培养基中, 试验结果表明, 在以葡萄糖母液为原料的柠檬酸发酵中, 接种孢子数对发酵产酸的影响非常显著, 只有接入定量的孢子, 使

发酵液中维持一定量的菌球数, 才能使产酸达到预定的指标(表 3)。

### 4. 发酵培养基组成对产酸的影响

发酵培养基是否适合于菌种的发酵产酸, 不但影响到柠檬酸的产量和质量, 而且直接影响黑曲霉菌的代谢。

(1) 氮源试验: 氮源对发酵的影响很大, 经多次试验, 氮源过多过少均对产酸不利, 这说明 r-130 菌在发酵中需限制氮源添加<sup>[2]</sup>。从表 4 中也可看出, 氮源的种类对发酵影响也很大, 有机氮优于无机氮, 而有机氮中, 米糠较为适合。

表 4 几种主要氮源对发酵的影响

添加物及量(%)		产酸率(%)	
		I	II
米 糠	3.0	8.4	9.5
	3.5	12.6	11.1
	4.0	13.7	13.9
	4.5	13.6	13.5
	5.0	12.7	12.5
麸 皮	2.0	6.8	6.7
	2.5	8.4	9.1
	3.0	10.5	11.0
	3.5	10.8	10.6
蚕蛹粉	4.0	10.2	10.0
	0.5	9.0	8.2
	1.0	10.1	11.1
	1.5	6.1	6.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	5.1	5.0
	0.15	3.3	3.0
	0.20	3.4	4.1
	0.25	1.1	0.8
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.30	1.5	2.1
	0.15	2.9	3.5
	0.20	4.7	4.0
	0.25	6.9	6.7
对照(无添加物)*	0.30	5.8	6.1
		1.5	2.1

\* 即基本培养基: 15%(含糖量)葡萄糖母液, pH4.5

(2) 不同糖浓度对发酵的影响: 在基本培养基为米糠 4%, pH 为 4.5 时, 以不同糖浓度

表 5 添加碳酸钙对产酸的影响

产酸率(%)* / 碳酸钙添加量(%)	糖浓度 (%)		
	15	18	20
0	14.4	15.2	14.5
0.5	14.5+0.7**	15.6+0.7	15.8+0.7
1.0	14.8+1.4	16.9+1.4	17.6+1.4
1.5	14.6+2.1	16.0+2.1	16.4+2.1
2.0	14.0+2.8	15.4+2.8	15.6+2.8

\* 发酵时间为 144 小时

\*\* 为碳酸钙所中和的酸

(10%、15%、20%、25%) 的葡萄糖母液进行发酵试验,结果表明,糖浓度为 15—20% 时,发酵周期短,转化率高,单产高。r-130 菌不适于高糖

发酵,较适的发酵糖浓度为 15% 左右。为摸索 r-130 菌的高糖发酵条件,进行了下列试验。

(3) 碳酸钙的添加与高糖发酵试验: 在柠檬酸发酵中,由于 pH 下降很快,对酶活力有一定影响,添加一定量的碳酸钙,能中和部分柠檬酸,使发酵前期的 pH 不致下降太快。另一方面,  $Ca^{++}$  对酶活力有一定的保护作用。试验结果表明,添加一定量的碳酸钙对产酸有促进作用,特别在高糖浓度发酵时,作用更明显(表 5)。

### 参 考 文 献

- [1] 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。
- [2] Nagashima, N. and S. Uzami: *Kogyo Kagaku Zasshi*, 72: 509, 1969.