

分 类 号

密 级

硕 士 学 位 论 文

题 目：山芋粉柠檬酸发酵耐高温菌株的
选育及工艺条件研究

英文并列题目：The Breeding of Thermotolerant Citric Acid
Overproducing Strains from *Aspergillus niger*

研 究 生：兰青道 专 业：发 酵 工 艺 学

研究方向：发 酵 工 艺 学

导 师：朱宝镛教授 、 金其荣教授

学位授予日期：一九九一年六月

年 月 日

无 锡 轻 工 业 学 院

地址：无锡市青山湾

The Study on the Breeding of Thermotolerant Strains of *Aspergillus niger* and the Technical Condition of the citric Acid Production from Sweet potato

ABSTRACT

The rational breeding of thermotolerant citric acid over-producing strains from *Aspergillus niger* H-142 was studied in this paper. Mutagens such as γ -radiation, Diethyl sulphate and hot treatment were used in the experiment separately or compositely. Asp. niger HQL-601, a thermotolerant citric acid producer derived from more than 600 mutants of H-142, could accumulate 13.0 g/100ml citric acid in 20% sweet potato flour medium under the condition of 250 rpm and 40-41 °C with the fermentation time of 60-64 hours. The addition of 500 ppm small molecular substance JQ in the medium offered good effect on the yield of citric acid. The results of HPLC indicated that the purity of citric acid in the broth of HQL-601 was much higher than that of Co-01, the strain which has been used by factories up to date. In the paper, the process of the citric acid fermentation, the morphological and physiological and biochemical characteristics of HQL-601 were detailed. The mechanism of rational breeding of thermotolerant citric acid producer was also discussed.

Keywords *Aspergillus niger*
sweet potato
thermotolerant mutant
citric acid
breeding

摘要

本文讨论了山芋粉柠檬酸发酵耐高温生产菌种的选育。以实验室保藏菌株 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株耐高温柠檬酸高产菌株 HQL-601。其发酵温度为 40-41 $^{\circ}\text{C}$ ，周期 60-64 小时，20% 山芋粉摇瓶产酸 13%。对发酵液的高压液相色谱分析结果表明，其产酸纯度明显优于现生产菌株。发酵液中添加 500ppm 小分子物质 JQ，能显著提高产酸率。本文详细讨论了柠檬酸发酵过程以及 HQL-601 的形态与生理生化特性。文中还初步探讨了柠檬酸耐高温生产菌选育的机制。

关键词

└黑曲霉

└柠檬酸

└山芋粉

耐高温突变株

✓菌种选育

目 录

前言	1
材料与amp;方法	2
一 菌种选育	2
(一) 出发菌株	2
(二) 培养基	3
(三) 诱变方法	4
(四) 筛选方法	5
二 初步生理生化试验	6
(一) 培养基	6
(二) 实验方法	7
三 摇瓶发酵	7
(一) 培养基	7
(二) 设备	8
(三) 方法	8
四 菌种的短时断氧敏感性实验	8
五 玉米粉固态发酵试验	8
六 种子培养基的选择	9
七 测定方法	10
结果与讨论	12
一 A. niger HQL-601 的选育	12
(一) HQL-601 的选育谱系	12
(二) HQL-601 的选育过程	13
二 A. NIGER HQL-601 特性研究	17
(一) 生长及相关因素的影响	17
(二) 形态特征	21
(三) 初步生理生化实验 - 碳氮源利用情况	24
三 HQL-601 发酵工艺条件研究	28
(一) 发酵过程	28
(二) 工艺条件研究	32

(三) 种子培养基的选择	39
四 发酵液高压液相层析结果分析	40
五 玉米粉固态发酵	44
六 实施低温蒸煮、高温发酵工艺的可行性	44
七 关于柠檬酸高温发酵生产菌定向选育机制的讨论	47
1 菌种选育方案思路	47
2 柠檬酸生物合成代谢途径及SAM平板筛选机制	48
结论	51
致谢	51
参考文献	52

前 言

柠檬酸是目前世界上生产量最大的一类食用有机酸，在食品饮料、医药化工及其它许多方面具有广泛的用途（1）（2）。柠檬酸是三羧酸循环的成员之一。其滋味爽口，营养丰富，能被人体直接吸收，因此备受人们喜爱。是现代社会所不可或缺的第一酸味剂。

柠檬酸的生产和研究已有200多年历史。早在1783年，瑞典化学家Sheel就已从柠檬汁中制备提纯了柠檬酸结晶。从此，人们开始从柠檬汁中提取制备柠檬酸作为酸味剂。直到本世纪初叶，柠檬酸发酵生产工艺才得以确立，其间整整经历了一个多世纪。

1891年，德国霉菌生物化学家Wehmer首先发现桔青霉具有产生柠檬酸等有机酸的能力（3），并于1893年进行了发酵法生产柠檬酸的生产实验，但终因发酵周期长，产酸水平低，成本高及杂菌感染等原因而放弃（4）。

1916年，Currie和Thom一起对曲霉属的产生柠檬酸的能力进行了普查（5）。其后，Currie又系统地研究了柠檬酸发酵的各个方面。其研究成果构成了柠檬酸发酵工业的科学基础（6）。Currie率先成功地进行了浅盘发酵法柠檬酸生产工艺的研究，使美国Chas. Pfizer公司得以率先实现大规模的浅盘发酵法柠檬酸生产（7）。这在柠檬酸生产史上是一个革命性事件，从此开创了柠檬酸的发酵法生产时代。五十年代以后，深层通气发酵工艺又逐步取代浅盘发酵工艺成为柠檬酸发酵的主导工艺。

目前，见于生产的菌种主要有：产朊假丝酵母（*Candida utilis*），热带假丝酵母（*C. tropicalis*），解脂假丝酵母（*C. lipolytica*），解脂复膜孢子假丝酵母（*Saccharomycopsis lipolytica*）（8）（9），泡盛曲霉（*Aspergillus awamori*）（10），及黑曲霉（*Aspergillus niger*）。其中，最常用的生产菌种是黑曲霉。关于菌种的研究，目前有三个方向：一是筛选产酸水平更高的菌株；二是选育适宜特定原料的菌株；三是选育适应特殊工艺要求的菌株。至于生产原料，则国外以糖蜜为大宗，淀粉精料次之。国内以山芋粉为主要原料，少数厂家以糖蜜为原料，用浅盘发酵法生产。关于糖蜜深层通气发酵生产柠檬酸的研究早已

展开〔11〕，最近亦有人进行了生产中试〔12〕〔13〕，但尚未见正式投产的报道。由于山芋粉价格上涨等因素的影响，国内亦有寻求以精淀粉为原料生产柠檬酸的趋向〔14〕，这方面的研究已取得很大进展〔15〕。

我国的山芋粉柠檬酸生产技术在国际上处于领先地位。所用菌种 *A. niger* Co-01 条件粗放，不需要预先对培养基进行酸化处理，亦不必预先除去原料中的重金属离子。这与国外繁复的原料预处理工艺形成了鲜明的对照。其转化率可达到 93-95% 的水平。

然而，由于柠檬酸发酵周期长，通气要求高，发酵和提取过程蒸气耗用量大，使柠檬酸生产的能耗水平很高，严重制约了柠檬酸行业节能降耗，低成本的努力。在目前出口受阻，成本上涨，市场萎缩的严峻形势下，选育更为优良的生产菌株，缩短发酵周期，降低能源消耗就成为柠檬酸行业在新的形势下求得生存和发展的一项重要措施和紧迫任务。

众所周知，高温菌具有生长快，产酸快，周期短的特点。然而，许多研究者认为高温条件下容易产生杂酸。也有人认为高温发酵期产酸快但后期产酸低，影响了产酸率的提高。迄今，尚未见关于柠檬酸高温菌选育及应用的文献报道。笔者以实验室保存菌株 *A. niger* H-142 为出发菌株，通过 γ -射线、硫酸二乙酯 (DES)，高温热处理等因子单独或复合诱变，并以定向选育方法筛选，从 600 多株突变子中获得一株耐高温柠檬酸高产菌株 HQL-601，其发酵温度为 40-41℃，发酵周期 60-64 小时，20% 山芋粉发酵摇瓶产酸 13% (总糖 14%)。与目前行业平均水平相比，其发酵温度提高 4-5 度，发酵周期缩 12 小时，产酸水平提高 18.2%。对 HQL-601 发酵液的高压液相色谱分析表明，其产酸纯度大大优于目前的生产菌株。

材料与方 法

一、菌种选育

(一) 出发菌株：黑曲霉 H-142

Aspergillus niger H-142

实验室保存菌株

(二) 培养基：

1. 察氏琼脂培养基 (CM)

蔗糖	3 g	磷酸氢二钾	0.1 g
七水硫酸镁	0.05g	氯化钾	0.05 g
硝酸钠	0.3g	四水硫酸亚铁	0.001g
琼脂	2 g	蒸馏水	100ml

1.0Kg/cm² 灭菌 20 分钟

2. 察氏 - 溴甲酚绿鉴别培养基 (BCM)

察氏培养基 100ml 加 2% 溴甲酚绿乙醇溶液 1ml, 于 1.0Kg/cm² 灭菌 20 分钟。冷却至 50 ℃ 后倒平板。

3. 柠檬酸 - 察氏培养基 (ACM)

a 液：称取 30g 柠檬酸，以少量水溶解，定容至 35ml。

b 液：蔗糖	3g	磷酸氢二钾	0.1 g
七水硫酸镁	0.05g	氯化钾	0.05 g
硝酸钠	0.3g	四水硫酸亚铁	0.001g
琼脂	2g	蒸馏水	65ml

a 液和 b 液分别灭菌 (1.0kg/cm²、15 分钟)。取出后将 a 液冷却至室温 (高于 20 ℃)。b 液冷至 50 ℃。将 a 液与 b 液迅速混合后立即倒平板。

4. 柠檬酸 - 高糖察氏培养基 (ASCM)

a 液：同 ACM a 液

b 液：蔗糖	30g	磷酸氢二钾	0.1g
七水硫酸镁	0.05g	氯化钾	0.05 g
硝酸钠	0.3g	四水硫酸亚铁	0.001g
琼脂	2g	蒸馏水	65ml

平板的制备同 ACM

5. 琥珀酸钠培养基 (SAM)

以琥珀酸钠 3g 代替蔗糖，其余同察氏培养基。

6. 山芋粉发酵培养基

(1) 山芋粉液化液的制备

称取 200g 山芋粉，加水 900ml，搅拌均匀后于沸水浴中加热糊化 10 分钟。预先称取 0.2g α -淀粉酶，1.0g 氯化钙，用少量热水溶解，倒入山芋粉糊化浆中。搅拌均匀，并于沸水浴中边搅拌边液化至碘液反应兰色消失。于电炉上加热煮沸十分钟灭酶。此为山芋粉液化液。

(2) 将山芋粉液化液冷至室温后，加水定容至 1000ml。分装 500ml 三角瓶，装量 50ml/500ml。于 1.0Kg/cm² 灭菌 15 分钟。

(三) 诱变方法

1. 单孢子悬浮液的制备

用 10ml 灭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 亿个 /ml，即为单孢子悬浮液。

2. γ -射线诱变

射线源 :Co60

取单孢子悬浮液 5ml 置 15 × 150 灭菌试管中，送辐化实验室作 γ -射线照射。剂量 6 万伦琴。经诱变处理的孢子悬浮液稀释 10 万 -100 万倍后涂布平板。

3. 硫酸二乙酯 (DES) 诱变

吸取 50%DES 乙醇溶液 0.2ml，置于 100ml 三角瓶中，加 PH 7.2 磷酸缓冲溶液 5ml、前法制备的单孢子悬浮液 5ml。于 30℃、摇床 200rpm 振荡培养 60 分钟，加入 25% 硫代硫酸钠溶液 1 ml 中止反应。处理液稀释 10 万 -100 万倍后涂布平板。

4. 高温处理 (1)

吸取孢子悬浮液和生理盐水各 5ml 分别置于两支 15 × 150 灭菌试管中。在盐水管中插一温度计。二管同时放入预先恒温于 75 °C 的恒温水浴锅中。待管内温度上升至 75 °C 后开始计时。于 75 °C 保温 10 分钟后取出迅速冷却。处理液稀释 10- 100 万倍涂布平板。

5. 复合处理

a. γ - 射线—高温复合处理

γ - 射线 : 4 万伦琴

高温处理 : 7 分钟

b. γ - 射线—DES 复合处理

γ - 射线 : 4 万伦琴

DES 处理 : 40 分钟

c. DES —高温复合处理

DES 处理 : 40 分钟

高温处理 : 10 分钟

(四) 筛选方法

1. 平板筛选

方法 (一) 耐高温突变株 (HT*CMg) 的筛选

将经诱变处理的孢子悬浮液稀释适当倍数后涂布 BCM 平板 , 每皿 0.2ml 。将平皿倒置于 44 °C 培养。4-5 天后挑取变色圈直径/菌落直径比值较大的菌落划接斜面, 于 40 °C 培养 8-10 天待孢子成熟后作摇瓶初筛。

方法 (二) 耐高温高酸突变株 (HT*ACMg) 的筛选

将经诱变的孢子悬浮液稀释至适当倍数后涂布 ACM 平板 , 每皿 0.2ml 。于 42 °C 培养 3-4 天后挑取首先长出的菌落移接于 SAM 平板 , 继续培养 2 天后挑取生长迅速的菌落划接斜面。于 40 °C 培养 8-10 天待孢子成熟后作摇瓶筛选。

方法（三） 耐高温高酸高渗透压菌株（HT*ASCMg）的筛选

将经诱变的孢子悬浮液稀释至适当倍数后涂布 ASCM 平板。其余操作同方法（二）。

2. 摇瓶筛选

初筛 将培养成熟的斜面孢子接种山芋粉发酵培养基，每瓶三环，每株一瓶。

发酵条件： 40-41 °C ,250rpm

发酵时间： 60-64 小时

复筛 将培养成熟的斜面孢子接种山芋粉发酵培养基，每瓶三环，每株二瓶。发酵条件及发酵周期同初筛。

二. 初步生理生化试验

（一）培养基

1. 察氏培养基

2. 无碳源察氏培养基

察氏培养基减去蔗糖

3. 无氮源察氏培养基

察氏培养基减去硝酸钠

☆ 为防止药品中杂质的影响，无碳源培养基和无氮源培养基均用分析纯试剂配制。

4. 麦芽汁培养基

4-6 Bx 麦芽汁 100ml

琼脂 2g

1.0Kg/cm² 灭菌 20 分钟

5. 土豆培养基

土豆去皮洗净，称取 100g，切成小块，加水 500ml，煮沸 1 小时。用双层纱布过滤，滤清液加水至 500ml。加琼脂 10g，煮熔后分装。1.0 Kg/cm² 灭菌 15 分钟。

6. 玉米粉琼脂培养基

称取玉米粉 100 g，加水至 900ml，调匀，于沸水浴中糊化。预先称取 α - 淀粉酶 0.1g，氯化钙 1.0g 以少量热水溶化，加入玉米粉糊化浆中，搅拌均匀，于沸水浴中液化至碘液反应兰色消失。补加水至 1000ml，加琼脂 20 g，煮熔分装，于 1.0Kg/cm² 灭菌 30 分钟。

7. 麸皮固体培养基

称取适量麸皮，按 1:1.4-1.6 加水比加水拌匀。分装 500ml 三角瓶（每瓶 50g 湿麸皮）或 18 × 180 试管（每管 2-3g 湿麸皮）。用八层纱布包扎。1.0Kg/cm² 灭菌 30 分钟。

8. 山芋粉琼脂培养基

同山芋粉发酵培养基制备山芋粉液化液，加入琼脂 2%，煮熔分装灭菌。

9 甘露糖琼脂斜面培养基

以甘露糖 3 克代替蔗糖，其余同察氏培养基。

（二）实验方法

1. 形态特征观察

将孢子悬浮液稀释至足够倍数后涂布察氏培养基平板，于 40℃ 或指定温度下培养 1-2 天后，将长出的微小菌落转接至另一察氏平板中央，于同一温度下培养。观察菌落形态，生长速度，孢子梗、孢子头及孢子的形态、颜色等。

2. 碳、氮源同化实验

将孢子悬浮液涂布培养基 2 或培养基 3, 每皿 0.5ml。用滤纸片法加入待试碳源或氮源, 于 40℃ 倒置培养, 观察生长及利用情况。

三. 摇瓶发酵

(一) 发酵培养基

山芋粉发酵培养基

(二) 设备

单轴旋转式摇床 无锡县查桥机械厂

(三) 方法

培养基分装灭菌后冷至室温, 接种培养成熟的孢子, 每瓶三环。于 40℃ -41℃, 250rpm 振荡培养 60-64 小时。测定总酸及残糖。

四 菌种的短时断氧敏感性实验

(一) 培养基

山芋粉发酵培养基

(二) 方法

用孢子悬浮液 (0.1-1 亿 /ml) 接种 30 瓶山芋粉发酵培养基, 于 40-41℃, 250rpm 条件下发酵。于 12 小时、24 小时、36 小时各取下 9 瓶。其中三瓶静置 30 分钟后重新振荡发酵, 另外三瓶静置 60 分钟后重新振荡发酵, 其余三瓶作为该停机点对照样测定总酸和残糖。总对照样亦为三瓶, 正常连续发酵 64 小时后测定总酸和残糖。各实验样的发酵时间为: 静置时间 + 64 小时。

五 玉米粉固体发酵实验

称取玉米粉 100g 加水 200ml 经液化后 (参见玉米粉琼脂培养基的制备), 加入 100g 麸糠, 拌匀后分装二只 1000ml 三角瓶, 于 1.0 Kg/cm² 灭菌 25 分钟。冷却至室温后接种发酵。发酵温度 30℃, 发酵时间 72 小时。发酵过程中每 24 小时扣瓶一次。

六 种子培养基的选择

(一) 种子扩大培养流程

原种——→斜面（试管）种子——→三角瓶麸皮种子——→液体种子
——→发酵

(二) 培养基

1 察氏斜面培养基

2 马铃薯斜面培养基（16）

3 麦芽汁斜面培养基（16）

4 甘露糖琼脂斜面培养基

5 玉米粉琼脂斜面培养基

6 三角瓶麸皮培养基

麸皮按 1:1.4-1.6 加水比（有说明者除外）加水拌匀，分装 500ml 三角瓶，每瓶约 30 克湿麸皮，于 1.0 Kg/cm^2 灭菌 20 分钟。

7 试管麸皮培养基

麸皮按 1:1.4-1.6 加水比加水拌匀，分装 18×180 试管，每管 1-3 克湿麸皮。于 1.0 Kg/cm^2 灭菌 20 分钟。

(三) 方法

1 斜面（试管）培养

斜面划接孢子后，于 40°C 培养至成熟。观察菌丝生长及孢子生成情况。成熟孢子接种山芋粉发酵培养基作发酵实验，考察斜面对发酵产酸的影响。

2 麸曲培养

三角瓶麸皮培养基接种斜面孢子后，于 40℃ 培养。前期（1-6 天）每天扣瓶一次，打散结块。定期观察菌丝生长及产孢子情况。

七 测定方法

1 总酸测定（1）

将发酵成熟醪（初始装液量 50ml，发酵终点体积 30-35ml）稀释定容至 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% 酚酞指示剂 2 滴，用 0.1429-0.1430N NaOH 溶液滴定至微红色。所消耗 NaOH 毫升数即为发酵醪柠檬酸百分比含量（折算成初始装液体积）。

总酸（g 柠檬酸 /100ml）

$$\begin{aligned} &= N \times V/V_s \times 210/3 \times 100/50 \times 1/1000 \times 100 \\ &= 0.1429 \times V/2 \times 210/3 \times 100/50 \times 1/1000 \times 100 \\ &= V \end{aligned}$$

其中：N-NaOH 溶液当量浓度 0.1429-0.1430 N

V- 滴定消耗 NaOH 溶液毫升数

Vs- 吸取滤清液体积 2ml

210/3- 柠檬酸毫克当量数 mg

100/50- 相对于初始装液体积的稀释倍数

2 发酵液的纸层析分析（1）

层析纸：新华三号层析滤纸

展开剂：正丁醇：甲酸：水 =5:5:1

显色剂：0.2% 溴甲酚绿乙醇溶液

点样量：5 微升

3 发酵醪的高压液相色谱分析

样品处理 发酵液稀释定容至 100ml，用定性滤纸过滤。滤清液用蒸馏水稀释 10 倍。在冰箱中保存。

仪器 HP 1050 HPLC

操作条件

柱： ODS-hypersil 粒度 5 微米

柱尺寸： 100 × 4.6mm

流动相： 0.5% 磷酸二氢铵溶液用磷酸调节至 PH2.5

流速： 1ml/min

紫外线波长： 214nm

4 还原糖测定 (1)

斐林试剂滴定法

5 总糖测定 (1)

快速测定法

6 PH

用精密PH试纸和PHS-2C型PH计测定

7 糖化酶活力测定 (17)

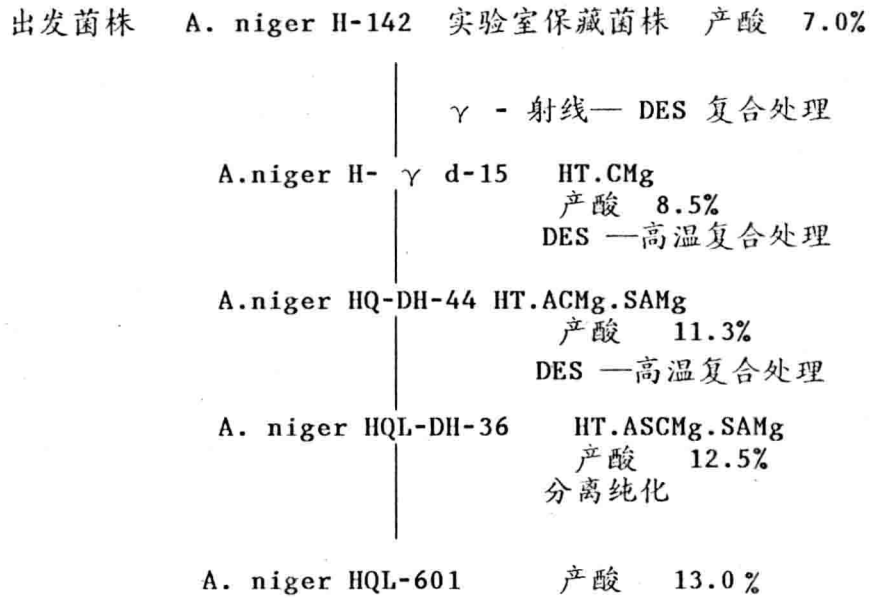
按液体曲糖化酶活力测定方法测定

酶活定义：每毫升发酵液，于 40 ℃、 PH4.6 、 1 小时水解可溶性淀粉为葡萄糖的毫克数。

结果与讨论

一. *A. niger* HQL-601的选育

(一) *A. niger* HQL-601 的选育谱系



* 出发菌株在 250rpm, 36 °C 条件下, 发酵周期 72 小时, 产酸 11.5%, 转化率 82.1%。

250rpm, 40 °C 时, 发酵 72 小时产酸 7.0%。