

# 柠檬酸生产菌 D<sub>353</sub> 的选育

上海市工业微生物研究所 上海市新型发酵厂 上海酵母厂

为了进一步提高柠檬酸的生产水平,我们开展了新菌株的选育和发酵条件的研究,现将结果简报如下。

## 一、新菌种 D<sub>353</sub> 的选育

从 700 余份土壤中选取了 7,000 余株黑曲霉,又经产酸力的鉴别,获得产柠檬酸菌种 40 余株。其中,产酸能力在 3—6% 者占 0.5%, 6—8% 者占 0.1%, 所有产酸高的菌株产酸稳定,且不产生草酸和其它有机酸。

从产酸高的野生型菌株中,经钴 <sup>60</sup>γ-射线 8—10 万伦(剂量率为 100 伦/秒)照射后,共获得 6 株高产酸变异株。其中 D<sub>353</sub> 产酸率可达 9% 以上。该菌株在麦芽汁斜面上孢子穗为大型、黑色、不产色素。外观形态与原生产用菌 N<sub>508</sub> 菌系显著不同。

## 二、D<sub>353</sub> 的发酵条件

### (一) 种子和发酵培养基

经过 100 多种不同组合的种子培养基的比较发现,当山芋粉用量为 1% 时,柠檬酸产量随着氮源的增加而增加。山芋粉为 14% 时,则只要添加 0.03—0.20% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 0.03—0.10% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 时,就可以完全代替用量较大的麸皮而得到较高的产酸量,在经过多次重复试验后,如种子培养基为 14% 的山芋粉, 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 则发酵培养基只用 16% 山芋粉即

可,而不必添加任何其它氮源。

### (二) 种龄与接种量对产酸的影响

采用 14% 山芋粉和 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的种子培养基,经试验,16—40 小时的种龄和 2—10% 的接种量均可得到较高的产酸率。

### (三) 孢子液接种对产酸的影响

用灭菌水 100 毫升洗下 D<sub>353</sub> 菌株斜面菌体,灭菌玻璃珠打散,以不同的接种量接入种子培养基。33℃ 培养 24 小时后,以 5% 接种量接入发酵培养基,观察对产酸的影响(表 1)。从表 1 中可看出发酵产酸随着种子培养基的孢子悬液接入量的增加而增加。为达到高产,种子培养基中接入孢子悬液量不能少于 0.8 毫升。

表 1 不同量孢子悬液对发酵产酸的影响

孢子悬液量(毫升)	发酵液中菌球数(个/毫升)	菌球直径(毫米)	产 酸 (%)		
			1 天	2 天	3 天
0.1	203	1.5	1.1	2.4	4.0
0.2	350	1.0	1.2	2.7	4.7
0.3	393	0.8	1.2	2.6	4.8
0.4	375	0.7	1.3	3.0	5.0
0.5	375	0.6	1.4	3.0	5.2
0.8	825	0.4	1.5	3.2	6.0
1.0	1740	0.4	1.5	3.8	6.0

## 三、D<sub>353</sub> 的中间扩大试验

种子培养: 培养基为 14% 山芋粉, 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 种龄: 33℃ 培养 24 小时。通气量: 1:0.2 (V/V), 搅拌转速 350 转/分。

表 2 D<sub>353</sub> 菌株 5000 升罐发酵产酸过程

发酵时间(小时)	18	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
总酸(%)	1.7	2.5	3.4	4.4	5.1	5.7	6.6	7.3	8.1	8.6	9.2
还原糖(%)	5.8	5.6	5.0	4.6	4.0	3.1	2.4	1.8	1.0	0.6	0.4
pH	2.5	2.4	2.0	2.0		2.0					2.0

发酵培养：培养基为 16% 山芋粉，接种量为 5%。通气量：24 小时前为 1:0.2(V/V)，24 小时后为 1:0.35 (V/V)，搅拌转速 160 转/分。33℃ 温度发酵 4 天。

上述条件下，连续发酵 9 批 (5000 升罐)，产酸均达 9% 以上。转化率在 90% 以上 (表 2)。

#### 四、讨论

1. 在发酵培养基中添加 0.01—0.1% 的 NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 及 0.01—0.03% ZnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> 等盐时，对发酵影响不大。

2. 在 5000 升罐发酵试验中，通气量过小对

产酸和发酵速率影响很大。此时，发酵液中除正常菌体外，还出现较多的异状粗体菌丝，比正常菌丝约粗 3—10 倍。此粗体菌丝可以产生顶囊、小梗和分生孢子。我们曾对菌种、培养基成份和培养条件等进行了一系列试验研究，结果表明，发酵液内溶解氧过少与产生异状粗菌丝有关。异状粗体菌丝发展到严重时，几乎使产酸停止。因此，适当地控制通气量是控制粗体菌丝生长以达到高产酸率的措施之一。有关粗体菌丝的研究有待进一步深入研究。