

# 糖蜜深层发酵柠檬酸不需黄血盐新菌种的选育

涂桂洪 张木炎 陈崖崖 胡小莹

(广州食品厂, 广州)

糖蜜深层发酵柠檬酸, 国内一直采用黄血盐(亚铁氰化钾,  $K_4[Fe(CN)_6]$ ) 作生酸促进剂。国外也有这方面的报道<sup>[1,2]</sup>。该工艺复杂, 不易控制; 黄血盐又是一种有毒物质, 发酵废液不但难以综合利用, 还污染了环境。筛选不需黄血盐或其它任何生酸促进剂的新菌种, 研究其代谢机理, 不仅在理论上而且在实践上都具有很重大意义。因而引起国内外有关方面的重视。

我们以黑曲霉川柠 19-1 为出发菌株, 采用紫外线(UV)、硫酸二乙酯(DES)等物理-化学因子经多次反复诱变, 成功地筛选出新菌株 G20-5。经过摇瓶试验和五千升罐的中试工作, 以及两万升罐的生产实践证明, 该菌种不需添加黄血盐或其它任何生酸促进剂, 产酸一般可稳定在 7—8%, 最高可达 9.4%。五溴丙酮法<sup>[3]</sup>分析结果表明, 柠檬酸含量占发酵液滴定总酸的 90%。平均发酵周期为 100 小时左右, 比出发菌株大为缩短。现将研究结果简介如下:

## 材料与方 法

1. 出发菌株: 黑曲霉(*Aspergillus niger*) 川柠 19-1, 由四川省制糖发酵研究所提供。

2. 甘蔗糖蜜: 由广州糖厂提供, 含糖 50%, 总氮 0.6%, 用前经酸法处理。

3. 诱变处理: 在诱变筛选过程中采用了如下技术措施: ①交替使用紫外线(15 瓦, 20 厘米, 5 分钟)与硫酸二乙酯(0.1 克分子, 6 小时)作为诱变因子。其作用顺序是: UV → DES → UV; ②在用理化因子进行诱变处理时, 以发芽后的幼嫩菌丝作材料, 由于这种缘故, 实验时不存存活率统计; ③为减少筛选工作量, 按上述作

用顺序每作一个诱变因子处理后, 不作单菌落分离而将全部材料接入梯度培养基\*中, 经摇瓶培养 8—10 小时后, 用菌丝过滤法富集变异株(原菌株在含糖 13% 以上的糖蜜培养基中不能正常生长)。本实验从糖浓度 12% 开始按 2% 的梯度递增, 每进行一次处理之后, 即转入高一级培养基。如此反复进行几次处理后, 再在含糖 20% 的高浓度糖蜜培养基中进行多次的驯化培养。最后作单菌落分离, 按一般筛选程序经初筛、复筛挑选出优良菌株。

## 结果与讨论

1. 以黑曲霉川柠 19-1 为出发菌株经物理-化学因子诱变处理, 筛选出一株新菌株 G20-5, 深层培养时的形态特征与原菌株川柠 19-1 明显不同(如图); 耐糖能力比原菌株显著提高, 可在 20% 的高糖溶液中正常生长, 在含糖 14% 的糖蜜培养基中能大量积累柠檬酸; 无论在摇瓶或是在两万升发酵罐中均不需添加黄血盐作生酸促进剂, 产酸可达到或超过原菌株(添加黄血盐)的水平。据此, 我们认为, 这是一个新的突变菌株。

不需黄血盐新菌株 G20-5 选育成功为进一步研究糖蜜发酵柠檬酸的代谢控制理论和选育实践提供了新的材料。

2. 筛选不需黄血盐新菌种时, 过去在实践中碰到的最大困难是变异株不易在摇瓶中检出, 而必须在发酵罐中进行鉴别。本实验采用高浓度糖蜜培养基作为筛选培养基, 一方面易于富集变异株; 另一方面提高了糖蜜中有害因

\* 梯度培养基组成: 糖蜜 12—20%,  $NH_4NO_3$  0.2%, pH 4.5—5.0。

子的浓度,有效地挑选出不需黄血盐的新菌株 G20-5。

3. 在形态上,新菌株 G20-5 与出发菌株川柠 19-1 的重要区别在于: G20-5 发芽时芽管比川柠 19-1 多,并很早出现分枝(如图)。这种现象对川柠 19-1 来说,只有在添加黄血盐后才有可能出现。这种形态特征的变异显然是菌种本质发生变化的一种表现。由于这种优良的分枝特性,每一孢子在发芽生长过程中可相互交织成团而在发酵液中形成均匀的菌球体,基本上可通过接种的孢子量控制发酵液中的菌丝体含量。因而成功地避免了出发菌株在不添加黄血盐时出现的菌丝无限延伸(“徒长”)和不产酸的现象。

根据本实验所观察到的 G20-5 的某些表现,对进一步研究新菌种与出发菌株川柠 19-1 在本质上的区别,对于我们深入认识柠檬酸发酵代谢的控制理论和提高菌种筛选的技术都是必要的和有益的。

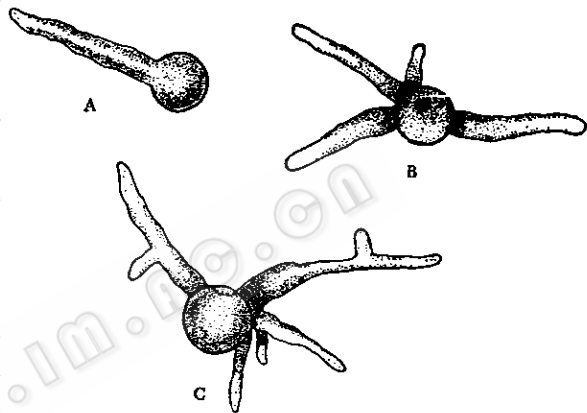


图 川柠 19-1 与 G20-5 孢子发芽时的形态特征\*

- A. 川柠 19-1 发芽时的形态: 单芽管。
- B. G20-5 发芽时的形态: 多芽管。
- C. G20-5 发芽时,在幼嫩菌丝上已有明显的分枝出现。

## 参 考 文 献

- [1] Hustede, H. et al.: US Patent, 3,940,315, 1976.
- [2] Hustede, H. and H. Rudy: US Patent, 3,941,656, 1976.
- [3] Natelson, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **175**: 745—750, 1948.