

柠檬酸高产黑曲霉菌株选育与发酵新底物研究*

赵琴,李红,魏婷婷,唐平华,韦伟
(重庆师范大学生命科学学院,重庆400047)

摘要 本研究利用 *Aspergillus niger* AS3.3928 作为对照菌株以废弃苹果榨汁为底物,设计了四因素四水平的正交实验。在 pH6, 温度 31℃, 甲醇含量 2%, 发酵时间 4d 的最适条件下,黑曲霉的发酵最好。将土壤中分离培养获得的 20 株黑曲霉,选出菌株透明圈相对较大的 A1、A2、A5、A11 这 4 株。在最适条件下,根据 4 株菌发酵废弃苹果榨汁生产柠檬酸的情况来进行复筛,得到菌株 A2,进而对 A2 进行鉴定,初步确定所得菌株为黑曲霉。在最适条件下,A2 发酵废弃苹果榨汁其柠檬酸的产量为 1.539 mg/mL,经对 A2 进行 T21 紫外诱变,筛选得到 A2-1。结果表明 A2-1 菌株柠檬酸产量比其父本增加了 36.6%,比对照菌株 AS3.3928 增加了 38.53%。

关键词 黑曲霉;菌株;柠檬酸;发酵;诱变

中图分类号:Q93-331;TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2008)01-0079-04

柠檬酸是一种重要的有机酸,在食品、化工、医药、建筑、印染、皮革、洗涤等行业都有广泛的用途。柠檬酸的工业生产通常采用黑曲霉进行的深层发酵法,原料以薯干和玉米为主^[1]。20世纪80年代后,随着工业的发展人们对含柠檬酸产品的需求增加,而黑曲霉菌株的产酸能力是制约柠檬酸生产能力的瓶颈。因此筛选获得高产柠檬酸的黑曲霉菌株具有重大意义。在原料方面,薯干和玉米的价格不断上涨,致使柠檬酸的生产成本提高,新的廉价原料成为迫切解决的需求。2000年我国苹果的产量达到2043万t,废弃的大概有20%^[2]。目前,废弃苹果大都作为垃圾或部分作为牲口饲料,其价值没有得到充分的利用。

本研究从上述两个目的出发,一方面从壤中分离纯化并选育高产柠檬酸的黑曲霉菌株,另一方面利用筛选得到的菌株发酵废弃苹果生产柠檬酸并摸索其发酵的最适发酵条件,以期对柠檬酸的产量提高和生产成本降低提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

(1)土壤样品采集地点为重庆市江北农场果园水果树周围、重庆市黄花园酱油厂发酵罐周围、库房

四角、花园中的土壤,共采集10个样本。

(2)对照菌株采用黑曲霉 *Aspergillus niger* AS3.3928,购自中国科学院菌种保藏中心。

(3)分离菌种培养基为 PDA 培养基;初筛培养基为 2% 淀粉查氏培养基^[3];发酵培养基为废弃苹果榨汁培养基^[4]。

(4)主要试剂有 3-5 二硝基水杨酸、结晶酚、酒石酸钾钠,均为国产分析纯)。

(5)主要仪器有:Nikon E200 显微镜,JD-801 形态学显微镜图象分析系统,722 型紫外分光光度计,组织捣碎机。

1.2 方法

(1)菌株采样与分离纯化^[5-6]:取采样地表层以下 5~10 cm 的土壤以 500 mL 无菌锥形瓶封装。样本当天稀释使用,未用完的置 4℃ 保存。

称取各种土壤样品 1 g,分别装入有 100 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,振荡打散,制成土壤悬液。参照吴雪梅等的方法对土壤中的黑曲霉进行分离纯化。从土壤样本中总共获得了 20 个具有黑曲霉特征的菌株。

(2)初筛:用接种环刮取各纯化的黑曲霉孢子于装有 100 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,振荡 4 层纱布过滤并稀释计数,制成每毫升 3~5 个孢子的

* 收稿日期 2007-03-09 修回日期 2007-05-21

资助项目:重庆师范大学挑战杯基金资助项目

作者简介:赵琴(1985-),女,重庆人,2004级本科学学生,研究方向为微生物。

孢子悬液。取1 mL孢子悬液注入2%淀粉查氏培养基平板中涂布,28℃倒置培养3 d后,向培养基中滴入I₂-KI试剂,用直尺测量菌落产生的透明圈大小并记录下数据。

(3)复筛以及发酵废弃苹果榨汁最适条件的确定。将初筛所得透明圈较大的菌株发酵废弃苹果榨汁生产柠檬酸的实验,通过检测发酵液中的柠檬酸的产量和总糖、还原糖的量进一步筛选高产柠檬酸的黑曲霉菌株。柠檬酸含量检测采用GB/T8269~1998中柠檬酸的检测方法^[7]。总糖和还原糖的检测用3-5二硝基水杨酸法^[8]。

为了使复筛的结果更加稳定、可信并接近实际生产,先用对照菌株摸索确定最佳发酵条件,再进行复筛。用对照菌株设计了甲醇浓度、pH值、温度、发酵时间四因素四水平的正交实验。正交表的设计参照洪伟等方法^[9]甲醇1%~4%;温度25~34℃,发酵时间2~5 d,pH4~7。然后再检测发酵液中柠檬酸、总糖、还原糖的量,用正交设计的方差分析找到黑曲霉发酵废弃苹果榨汁的最佳条件。

(4)鉴定。根据魏景超的《真菌鉴定手册》^[10]中对黑曲霉的描述对所得的菌株进行鉴定。

表1 黑曲霉培养基透明圈的大小比较

菌株编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20
透明圈直径/cm	4.0	4.1	3.4	2.6	4.4	2.6	3.0	3.6	2.8	3.7	4.3	3.2	3.2	2.6	3.4	3.9	2.7	2.3	2.7	2.5

从表1中可以看出A1、A2、A5、A11这4株菌株的透明圈的直径在4.0 cm以上,故选取这4株进行复筛实验。

2.2 复筛及黑曲霉发酵废弃苹果榨汁最适条件

2.2.1 发酵废弃苹果榨汁最适条件的确定。为了提高复筛结果的可靠性,并能应用到实际生活中,特采用参照菌株做发酵条件的正交实验并进行了方差分析,结果见表2、表3。

根据表2可得AS3.3928发酵的最适条件是:时间为4 d,甲醇量为2%,pH为6,温度为31℃是黑曲霉发酵的最适条件。从此最适条件下,柠檬酸的产量达到2.387 mg/mL。从表2可得 $R_{\text{甲醇含量}} > R_{\text{pH}} > R_{\text{时间}} > R_{\text{温度}}$,由此可以看出黑曲霉发酵影响程度的因素由大到小排列为:甲醇含量 > pH > 时间 > 温度,其pH对发酵的影响最大。由于显著性 $p > 0.1$,所以这几个因素的差异都不显著。这可能是黑曲霉的代谢中还有其它的因素对柠檬酸的产量有较大的影响。

(5)诱变及结果检测:引用刘丽等人的方法对所得的高产菌株进行了T21紫外诱变^[11],操作过程为取筛选的菌种的斜面,加入无菌水约2~3 mL,洗下孢子并加入100 mL无菌水带玻璃珠的三角瓶中打散孢子,4层纱布过滤,获得孢子悬液,调整孢子浓度至约3~5个/mL,取1 mL涂布查氏培养基平板,置紫外箱中,灯管距平板17.5 cm,功率40W,照射45 s,然后置30℃培养箱中培养6~7 d。从致死率约为70%的平板挑取菌落最大的菌株采取(3)的方法做发酵柠檬酸的检测。

2 结果和分析

2.1 初筛试验

由于黑曲霉在生长过程中消耗了淀粉查氏培养基中的淀粉,向培养基中滴入I₂-KI试剂后,菌落周围的淀粉因被黑曲霉分解而不会变蓝,而培养基的其他部分因含有淀粉与I₂-KI反应变蓝,因此菌落周围就形成了一个透明圈(图1)。透明圈越大则该菌株代谢越旺盛,可以作为筛选优良黑曲霉菌株的一个间接指标。据此对分离所得的20株菌株进行了初筛,测定各个菌株的透明圈的大小,结果见表1。

2.2.2 复筛及筛选结果。将初筛所得4株黑曲霉在最适条件下,即时间为4 d,甲醇含量为2%,pH为6,温度为31℃,进行发酵对比,结果见表4。

由表4可见4株野生黑曲霉中A2、A11经过4 d的发酵后,柠檬酸产量较另外两株菌株稍高,分别为1.539 mg/mL和1.521 mg/mL。除A5出现反常外,其余的结果都与初筛结果一致。对于A5初筛是透明圈最大,但复筛是产酸量最小的反常现象,分析与其菌丝生长速度较快有关。在淀粉培养基中,由于其生长速度较快,菌落大,透明圈也大。而在液体发酵时,在菌丝快速生长期,代谢产物积累较少,因此造成复筛时产酸低的现象。这也可以从它对总糖的消耗量比其他几株菌都大得到佐证。A5应该是一株很有潜力的菌株。在对A2和A11进行选择时,综合考虑了它们的产酸量和耗糖量之间的关系。A2的产酸与总糖及还原糖之比分别为1.46%与1.77%,均高于A11的1.21%与1.71%。基于上述分析,选择A2作为高产研究菌株进行下

一步实验。

表2 发酵条件正交表

时间/ d	甲醇体积 百分比	pH	温度/ ℃	柠檬酸产量/ (mg·mL ⁻¹)
-	-	-	-	0.184
1	2	4	31	1.115
2	2	1	5	1.207
3	2	3	6	1.483
4	2	2	7	1.307
5	3	3	4	1.428
6	3	2	5	1.911
7	3	4	6	1.594
8	3	1	7	2.009
9	4	1	4	1.585
10	4	4	5	1.023
11	4	2	6	2.571
12	4	3	7	2.112
13	5	2	4	2.147
14	5	3	5	0.673
15	5	1	6	2.295
16	5	4	7	0.359
K ₁	5.112	4.091	6.275	6.368
K ₂	6.942	7.096	4.814	7.060
K ₃	7.291	5.696	7.943	5.338
K ₄	5.474	7.936	5.787	6.053
k ₁	1.278	1.023	1.569	1.592
k ₂	1.736	1.774	1.204	1.765
k ₃	1.823	1.424	1.986	1.335
k ₄	1.369	1.984	1.447	1.513
R	0.545	0.961	0.782	0.430

注:1.柠檬酸的产量为发酵后1mL培养基中柠檬酸含量与未接种培养基中柠檬酸含量的差值。2.“—”在文中表示前的废弃苹果汁培养基。

表3 正交方差分析表

变差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性p
时间	0.863	3	0.288	1.072	0.478
甲醇含量	2.13	3	0.71	2.645	0.223
pH	1.284	3	0.428	1.594	0.355
温度	0.383	3	0.128	0.476	0.721
误差	0.805	3	0.268		
总和	43.963	16			

表4 复筛的发酵对比

	柠檬酸产量/ (mg·mL ⁻¹)	总糖含量/ (mg·mL ⁻¹)	还原糖含量/ (mg·mL ⁻¹)
对照1	0.820	339.5	302.3
A1	1.484	243.0	209.9
A2	1.539	234.3	215.2
A5	1.392	236.0	200.0
A11	1.521	213.5	213.4

2.3 鉴定

根据魏景超《真菌鉴定手册》对A2进行了鉴定。在光学显微镜下观察,该菌株的菌丝是有隔的,表面凝集有淡色的物质(图2)。孢子头呈椭圆形,分身孢子穗黑色(图3)。该菌株的孢子着生在分生孢子梗上,小梗单层或双层(图4)。分生孢子链,在孢子与孢子间是由小梗连接的(图5)。分生孢子串生于小梗顶端,作辐射状排列或丛集成柱形(图6)。根据以上所观察到的形态特征,初步鉴定所得菌株为黑曲霉。

2.4 诱变及其结果检测

取A2菌株进行T21紫外诱变,获得5株突变株A2-1,A2-2,A2-3,A2-4,A2-5。将突变菌株父本菌株A2和对照菌株发酵废弃苹果榨汁并检测其发酵结果,结果见表5。

表5 诱变复筛所得菌株与复筛菌株的发酵对比

	柠檬酸产量/ (mg·mL ⁻¹)	总糖含量/ (mg·mL ⁻¹)	还原糖含量/ (mg·mL ⁻¹)
对照1	0.367	170.0	162.8
对照2	1.365	182.8	164.7
对照3	1.384	165.6	160.6
A2-1号	1.891	163.0	151.0
A2-2号	1.667	156.4	146.8
A2-3号	1.642	165.0	159.1
A2-4号	1.503	168.5	158.4
A2-5号	1.374	169.3	164.1

注:对照1是未接种的培养基,对照2是参照菌株,对照3是A2菌株。

由表5可见,野生黑曲霉菌株A2在经过诱变后,其多数突变株产酸量有了一定的提高,比父本菌株增长了8.65%(A2-4)~36.6%(A2-1)。其中A2-2和A2-3也表现出较高的增长,分别提高了20.4%与18.6%,比参照菌株在同样条件分别增加了38.53%(A2-1),22.12%(A2-2),20.29%(A2-3),10.11%(A2-4)与0.66%(A2-5)。诱变菌株产酸量最高的是A2-1为1.891mg/mL。同时从糖酸转化关系来看,A2-1柠檬酸产量与总糖及还原糖消耗量之比分别为9.55%与13.8%,与父本菌株总糖转化率8.05%相比,稍有上升。但是与其还原糖转化率33.76%相比,则大不如后者。分析原因,可能是诱变后的A2-1菌株由于诱变的作用和连续的人工培养增强了对速效碳源的依赖。综合来看,诱变菌株A2-1相比之下具有较好的目的特征。

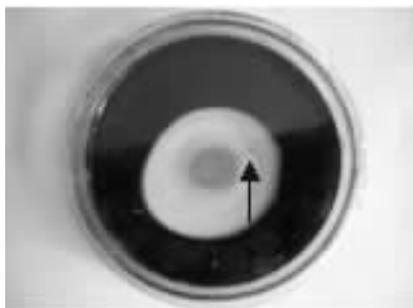


图 1 黑曲霉的透明圈

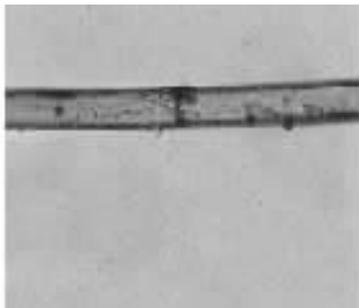


图 2 黑曲霉的菌丝(400×)



图 3 黑曲霉的孢子头(400×)



图 4 黑曲霉的分生孢子梗(400×)

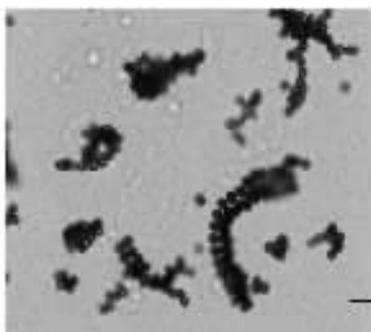


图 5 黑曲霉的孢子链(400×)



图 6 黑曲霉的辐射状的孢子串(400×)

3 结论

本实验从土壤中分离纯化出黑曲霉。通过参照菌株 AS3.3928 对发酵条件的摸索找到了黑曲霉的最适发酵条件为:发酵时间第 4 天;甲醇的量为 2% pH 值为 6 温度为 31℃。对筛选出的优良菌株 A2 号菌株进行了诱变,把复筛所得的菌种和诱变后所得的菌种进行了发酵对比,得到高产柠檬酸黑曲霉菌株 A2-1 号诱变菌株,其柠檬酸产量比父本菌株增加了 36.6%,比标准菌株增加了 38.53%。为以后工业生产提供了实验依据。

致谢:本文承蒙胡尚勤教授的指导,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 朱亦仁,王锦化,张振超,等. 发酵柠檬酸提取方法的研究进展[J]. 精细与主用化学品, 2003(14):18-24.
- [2] 国家数字文化网. 我国果树生产存在问题及发展趋势 [B/OL]. 农业知识. (2006-04-10) <http://www.ndcnc.gov.cn/datalib/2003/AgroKnowledge/DL/DL-182923>.
- [3] 杜连祥,路福平. 微生物实验技术[M]. 上海:中国轻工业出版社, 2005. 150-151.
- [4] 贾士儒. 生物工程专业实验[M]. 上海:中国轻工业出版社, 2004. 125-136, 383-386.
- [5] 吴雪梅. 小曲霉的分离纯化鉴定[J]. 酿酒科技, 2004(6):33-36.
- [6] 顾敏舟,汤建才,黄敏. 一株高产黑色素菌的筛选及发酵条件优化[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2006, 29(6):735-738.
- [7] 中华人民共和国国家标准. 柠檬酸的检测方法[P]. 中国专利:GB/T8269, 1998.
- [8] 张龙祥,张庭芳. 生化实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社, 1982. 3-5.
- [9] 洪伟,吴承祯. 试验设计与分析[M]. 北京:中国林业出版社, 2004. 95-105, 335.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社, 1979. 487-495.
- [11] 刘丽,刘谨,仇润祥,等. 丝状真菌表达分泌系统中受体菌的构建[J]. 生物工程学报, 2002, 18(6):667-670.

(下转第 90 页)

(上接第 82 页)

Study of Isolated and Mutated High-yield *Aspergillus. Niger* Strain and the Optimal Condition Soil for Fermenting the New Substrate to Produce Citric Acid

ZHAO Qin ,LI Hong ,WEI Ting-ting ,TANG Ping-hua ,WEI Wei

(College of Life Science , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract :Used as a control strain *Aspergillus. niger* AS3. 3928 is inoculated in abandon apple juice medium and a 4 * 4 cross experiment is designed. The optional condition for *A. niger* is pH6 ,temperature 31℃ ,cultivating time 4 days and with 2% menthanol. 20 strains of *A. niger* which are isolated from the soil are first inoculated by the diameter of the crystal circle. With larger crystal circle diameter than the rest strains ,the A1 ,A2 ,A5 and A11 strains are inoculate again in abandon apple juice medium at the optional condition. The production of citric acid of the A2 strain reaches the highest ,1. 539mg/mL. The A2 strain is initially identified to be *A. niger* according to *Zhen Jun Jian Ding Shou Ce* written by Jingchao Wei. Then ,the A2 strain is mutated by T21 ultraviolet and detected the procluction of critic acid of mutation strains in the optional condition. The A2-1 strain has the highest production of critic acid ,which is 36. 6% higher than A2 strain and 38. 53% higher than the control strain *A. niger* AS3. 3928.

Key words :*Aspergillus. niger* ,strain ,citric acid ,ferment ,mutagenesis

(责任编辑 李若溪)