

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年3月5日 (05.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/042481 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 7/48 (2006.01) C12R 1/685 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/123053
- (22) 国际申请日: 2018年12月24日 (24.12.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810986196.4 2018年8月28日 (28.08.2018) CN
- (71) 申请人: 江苏国信协联能源有限公司 (JIANGSU GUOXIN UNION ENERGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号孙福新, Jiangsu 214203 (CN)。 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号邱玉宇, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 石贵阳 (SHI, Guiyang); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 胡志杰 (HU, Zhijie); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 李由然 (LI, Youran); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 蒋小东 (JIANG, Xiaodong); 中国江苏省无

锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 金赛 (JIN, Sai); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 孙福新 (SUN, Fuxin); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 张成 (ZHANG, Cheng); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 周东姣 (ZHOU, Dongjiao); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 卢佳伟 (LU, Jiawei); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 苗茂栋 (MIAO, Maodong); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。 范子豪 (FAN, Zihao); 中国江苏省无锡市宜兴市经济开发区热电路1号, Jiangsu 214203 (CN)。

(74) 代理人: 无锡华源专利商标事务所 (普通合伙) (WUXI HUAYUAN PATENT AND TRADEMARK AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国江苏省无锡市梁溪区清扬路228号地铁大厦1108室聂启新, Jiangsu 214023 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) Title: METHOD FOR CONTINUOUSLY CULTURING ASPERGILLUS NIGER SEEDS AND PRODUCING CITRIC ACID USING SAME

(54) 发明名称: 一种黑曲霉种子连续培养及其生产柠檬酸的方法

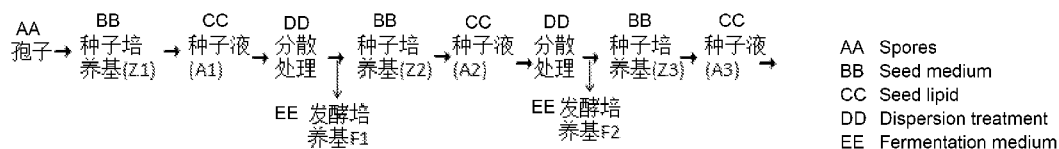


图 1

(57) Abstract: A method for continuously culturing *Aspergillus niger* seeds and producing citric acid using same. The method for continuously culturing *Aspergillus niger* seeds comprises: (1) an initiation stage, inoculating *Aspergillus niger* spores into a seed medium to obtain a seed lipid; (2) a continuous seed culture stage, performing a continuous dispersion treatment on the seed lipid obtained in step (1), and continuously culturing the seed lipid obtained by means of dispersion, and supplementing a fresh seed feed medium at the same time; and (3) a termination stage, stopping supplement of the fresh seed feed medium and dispersion, continuing culture to obtain a seed lipid, and transferring same to a fermentation medium for fermentation culture.

(57) 摘要: 一种黑曲霉种子连续培养及其生产柠檬酸的方法, 黑曲霉种子连续培养方法包括: (1) 启动阶段, 将黑曲霉孢子接种至种子培养基, 得到种子液; (2) 种子连续培养阶段, 对步骤 (1) 得到的种子液进行连续分散处理, 分散得到的种子液进行连续培养, 并同时补充新鲜种子补料培养基; (3) 停止阶段, 停止补充新鲜种子补料培养基和分散, 继续培养得到种子液, 移入发酵培养基进行发酵培养。

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种黑曲霉种子连续培养及其生产柠檬酸的方法

技术领域

本发明涉及微生物培养的技术领域，尤其是涉及一种黑曲霉种子连续培养及其生产柠檬酸的方法。

背景技术

柠檬酸是世界上生产量和使用量最大的有机酸，是一种重要的化工产品，具有广泛的用途。柠檬酸主要用于食品工业，如酸味剂、抗氧化剂、胶凝剂等，而且医药、饲料、化工、电子、纺织等工业领域都有十分广阔的应用，市场需求量逐年增加。我国是最大的柠檬酸生产和出口国，生产工艺先进，市场竞争力强，特别是独创以玉米、薯干等淀粉质原料的深层发酵指数居世界前列。

虽然近年来生物发酵技术不断快速发展，新的发酵技术不断涌现，多种高效率的连续培养方式在不同发酵产品上得到广泛应用，但由于柠檬酸生产菌种黑曲霉是多核丝状真菌，其生长特性和菌体形态完全不同于酵母和细菌等单细胞微生物，以酵母和细菌为生产菌株的高效成熟的发酵方式并不能很好的应用于黑曲霉柠檬酸发酵生产中，严重制约了柠檬酸等以丝状菌作为生产菌株的发酵产业发展。

当前，柠檬酸发酵生产仍然沿用传统的方式，即先制备大量的黑曲霉孢子；再将孢子接入种子培养基中培养获得成熟的种子液；然后将种子液移入发酵培养基中发酵得到柠檬酸发酵液。柠檬酸传统发酵方式存在以下问题：

- (1) 黑曲霉孢子制备繁琐、周期长、效率低：黑曲霉菌种需要经过复壮，平板筛选和三级扩培，制备周期超过 30 天；人工操作繁琐，染菌风险大。
- (2) 菌种稳定性、一致性差：当前孢子制备机械化程度低，麸曲培养容器小，在不同容器内一致性较差，导致种子培养质量和发酵结果不稳定。
- (3) 种子培养效率低：孢子接种至种子培养需要 8~12h 的萌发时间，降低了种子罐的利用效率。
- (4) 种子分批间歇培养不稳定：分批间歇培养中，菌体生长环境（如糖浓度、pH 等）在不断变化，导致菌体生长无法长期处于最适的环境中。

目前行业内还没有丝状菌的种子连续培养方法，原因在于丝状菌一般为多细胞，生长慢，成块、成球，在连续培养中细胞容易流失。常见的连续培养主要集中在细菌、酵母等种类的微生物方面，它们都是单细胞，形态简单，容易控制。专利 CN201410329652.X 公布了一种基于菌丝球分散技术的柠檬酸黑曲霉种子连续培养的方法，虽然称为“连续”培养，但其本质为“循环”培养，该方法是将前一批剩余的分散菌丝接种至新的种子培养基培养成种子液来实现种子的循环培养。该方法虽然减少了孢子使用量和节省了孢子的萌发时间；但是种子需要在不同罐体内进行切换培养，设备系统增加，操作相对繁琐；而且每一批种子液仍然采用分批间歇培养的方式进行，培养环境在不断变化，无法保障种子在最适的环境条件下生长，不仅存在批次间的不稳定，更为重要的是容易导致菌种衰退，影响发酵水平。因此，目前行业内还没有产生真正的种子连续培养方法。

相比专利 CN201410329652.X 中分批间歇培养，黑曲霉种子连续培养需要克服以下技术难点：（1）菌体生长慢；菌丝球容易流失；（2）减少菌种传代次数，避免菌体退化；（3）确定合适的种子液停留时间，避免菌体流失过快，同时保障移种种子液中菌体量充足，且保证培养环境稳定；（4）确定合适的菌丝大小，使菌体生长速率和稀释速率达到平衡。

因此，如何突破多细胞丝状菌的局限，改进种子液制备过程，既能减少孢子使用量，提高种子培养效率，又能使种子的生长环境恒定在最适状态，培养环境根据菌体生长状态实时进行反馈调整，避免菌种退化，保证种子液质量稳定，提高发酵水平，是当前柠檬酸生产中亟待解决的一个问题。

发明内容

针对现有技术存在的上述问题，本发明申请人提供了一种黑曲霉种子连续培养及其生产柠檬酸的方法。本发明方法突破性解决了多细胞丝状菌生长缓慢，以及菌丝球在连续培养中容易流失的问题，完全实现了种子连续培养，使菌体恒定在最适的生长环境中，避免了菌种退化，使种子液处于连续稳定的高活力状态，对应发酵指标显著提高。

本发明的技术方案如下：

一种黑曲霉种子连续培养的方法，所述方法包括如下步骤：

（1）启动阶段：将黑曲霉孢子接种至种子培养基，培养 16~36h，得到种子

液；

(2) 种子连续培养阶段：对步骤(1)得到的种子液进行连续分散处理，分散得到的种子液进行连续培养，培养过程中种子液连续流出至发酵培养基进行发酵培养，同时以与流出种子液相同的速度补充新鲜种子补料培养基；

(3) 停止阶段：停止补充新鲜种子补料培养基和分散处理，继续培养得到种子液，之后将种子液移入发酵培养基进行发酵培养。

步骤(1)中黑曲霉孢子接种后终浓度为 $1\sim 9\times 10^5$ 个/mL；步骤(1)中种子培养基的总糖为 100~180 g/L，C/N 为 20~40；步骤(1)中种子培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.2~0.4 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 100~200 rpm。

步骤(2)中补充的新鲜种子补料培养基的总糖为 150~200 g/L，C/N 为 15-30；步骤(2)中连续培养条件为：温度为 35~37℃，风量为 0.3~0.6 vvm，罐压为 0.05~0.07 Mpa，搅拌转速为 150~200 rpm。

步骤(3)中继续培养的培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.3~0.6 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 150~200 rpm。

步骤(2)中所述种子液连续分散处理的方法为：采用分散器将种子液中的菌丝球分散成 10~80 μ m 的絮状菌丝。

步骤(2)中新鲜种子补料培养基补充速度和种子液流出的速度 $F=V/t$ ，其中 V 为种子罐内种子液体积，以不同罐体进行确定；t 为种子液停留时间，根据絮状菌丝的细胞浓度反馈调节，通常取 6-24 h。

步骤(2)、步骤(3)中发酵接种比例为 5~25% (v/v)。

步骤(2)、步骤(3)中发酵培养基的总糖为 160~200g/L，C/N 为 50-90；步骤(2)、步骤(3)中发酵培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.1~0.4 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 100~200 rpm，还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵。

所述种子培养基、新鲜种子补料培养基、发酵培养基分别为淀粉质原料液化液和氮源配制而成；所述淀粉质原料至少包括玉米粉、木薯粉、高粱粉、小麦淀粉其中一种；所述氮源至少包括硫酸铵、尿素、豆粕粉、玉米浆其中一种。

一种生产柠檬酸的方法，该方法采用种子连续培养的方法所得的黑曲霉进行发酵，用于生产柠檬酸。

本发明有益的技术效果在于：

本发明方法完全实现了丝状菌的种子连续培养，相比专利 CN201410329652.X，大幅度简化了设备系统，种子罐使用量减少至 1/3；减少了操作步骤，显著提高生产效率，每批发酵罐对应的种子培养辅助时间节省 12 h；提高了种子培养自动化水平。

本发明种子连续培养方法，相比专利 CN201410329652.X，减少了菌种传代次数，能有效避免菌种退化，可以连续运行 15 天保持种子活力不下降，发酵指标稳定。高效率的连续运行不仅减少启停的辅助时间，而且黑曲霉孢子的使用量可以减少 1/3，大幅降低黑曲霉孢子培养成本。

本发明方法突出的优势是菌体恒定在最适的生长环境中，使种子始终处于连续稳定的高活力成熟状态，保证了种子液质量的稳定性和一致性。而专利 CN201410329652.X 中种子采用分批间歇培养，罐内 pH 不断下降和营养物质逐渐消耗，培养条件逐渐不利于菌体生长和活力保持，从而影响种子液质量，并且批次间种子液质量差异较大；更大的缺陷是移入发酵罐内的种子液是分散器处理后的分散菌丝，需要在发酵罐前期恢复生长，从而影响发酵指标。相比专利 CN201410329652.X，在发酵初糖浓度为 16% 时，发酵强度提高了 27.5%，发酵转化率提高了 3.4 个百分点，且发酵稳定性显著提高。

另外，由于种子活力的提高，产酸速率增加，本发明方法在高浓度发酵条件下相比专利 CN201410329652.X 具有更大的优势，将发酵初始糖浓度提高至 18% 时，发酵产酸可超过 18%，发酵周期小于 60 h，发酵转化率超过 100%，发酵强度提高了 31.6%，发酵转化率提高了 4.8 个百分点。因此，利用本发明方法可以完全实现柠檬酸的高浓度、高转化率和高效率发酵生产，对柠檬酸产业技术提升具有重要促进作用。

本发明首次采用连续补料耦合连续分散来实现黑曲霉种子连续培养的方法，确定了最适的停留时间和菌丝大小，并且优化得到种子培养不同阶段的培养参数，解决了多细胞丝状菌生长缓慢，以及菌丝球在连续培养中容易流失的问题，完全实现了种子连续培养，使菌体恒定在最适的生长环境中，避免了菌种退化，使种子液处于连续稳定的高活力状态，对应发酵指标显著提高。

附图说明

图 1 为 CN201410329652.X 的培养方法示意图。

图 2 为本发明的培养方法示意图。

具体实施方式

下面结合附图和实施例，对本发明进行具体描述。

以下实施例和对比例所涉及原料和试剂均为市售商品；黑曲霉菌来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC），保藏编号 CICC 40021。总糖、还原糖测定均采用菲林滴定法，氮源测定采用凯氏定氮法，柠檬酸测定采用 0.1429 mol/L 的 NaOH 滴定，孢子计数采用血球计数板。如无特殊说明，均采用本领域常用设备和工艺方法。

实施例 1

玉米粉与自来水按 1:3 的质量比混合均匀，用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将粉浆 pH 调至 6.0，按 20U/g 玉米粉的添加量加入 α -高温淀粉酶；经过喷射液化，碘试呈浅棕色后得到合格玉米液化液；将 80% 的玉米液化液经过板框过滤去掉滤渣，得到玉米糖液。

启动阶段：将玉米液化液与硫酸铵配制成种子培养基（总糖 100g/L，C/N 为 20），灭菌冷却后将黑曲霉孢子接种至种子培养基，孢子终浓度为 9×10^5 个/mL，在温度 35℃，风量 0.2 vvm，罐压 0.05 Mpa，搅拌转速 100 rpm 条件下培养 16 h，得到种子液。

连续阶段：将玉米液化液和硫酸铵配制成种子补料培养基（总糖 150g/L，C/N 为 15）。利用分散器对得到的种子液进行连续分散处理，将菌丝球分散成 10 μm 的絮状菌丝；同时按停留时间为 6 h 控制连续补充新鲜种子补料培养基的速度，种子液以相同速度连续流出到发酵培养基进行发酵培养。种子连续培养阶段的培养温度为 35℃，风量为 0.3 vvm，罐压为 0.05 Mpa，搅拌转速为 150 rpm。

停止阶段：检测到种子活力呈下降趋势时，停止补充新鲜种子补料培养基和分散处理，将剩余种子液移入发酵培养基进行发酵培养。该阶段种子培养条件：温度为 35℃，风量为 0.3 vvm，罐压为 0.05 Mpa，搅拌转速为 150 rpm。

发酵培养基由玉米液化液、玉米糖液和硫酸铵配制成（总糖 160g/L，C/N 为 50）；发酵接种比例为 25% (v/v)；发酵培养条件为：温度 35℃，风量 0.1 vvm，罐压 0.05 Mpa，搅拌转速 100 rpm，当还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵，测定每批发酵酸度、残糖，并计算转化率、发酵强度等指标。

实施例 2

玉米粉与自来水按 1:3 的质量比混合均匀,用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将粉浆 pH 调至 6.0,按 20U/g 玉米粉的添加量加入 α -高温淀粉酶;经过喷射液化,碘试呈浅棕色后得到合格玉米液化液;将 80%的玉米液化液经过板框过滤去掉滤渣,得到玉米糖液。木薯粉与自来水按 1:3 的质量比混合均匀,用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将粉浆 pH 调至 6.0,按 20U/g 木薯粉的添加量加入 α -高温淀粉酶;经过喷射液化,碘试呈浅棕色后得到合格木薯糖液。

启动阶段:将玉米液化液与尿素配制成种子培养基(总糖 140g/L, C/N 为 30),灭菌冷却后将黑曲霉孢子接种至种子培养基,孢子终浓度为 4.5×10^5 个/mL,在温度 37℃,风量 0.3vvm,罐压 0.075 Mpa,搅拌转速 150 rpm 条件下培养 26 h,得到种子液。

连续阶段:将玉米液化液和尿素配制成种子补料培养基(总糖 175g/L, C/N 为 23)。利用分散器对得到的种子液进行连续分散处理,将菌丝球分散成 45 μm 的絮状菌丝;同时按停留时间为 15 h 控制连续补充新鲜种子补料培养基的速度,种子液以相同速度连续流出到发酵培养基进行发酵培养。种子连续培养阶段的培养温度为 36℃,风量为 0.45 vvm,罐压为 0.06Mpa,搅拌转速为 175 rpm。

停止阶段:检测到种子活力呈下降趋势时,停止补充新鲜种子补料培养基和分散处理,将剩余种子液移入发酵培养基进行发酵培养。该阶段种子培养条件:温度为 37℃,风量为 0.45 vvm,罐压为 0.075 Mpa,搅拌转速为 175 rpm。

发酵培养基由玉米液化液、玉米糖液、木薯糖液和尿素配制成(总糖 180g/L, C/N 为 70);发酵接种比例为 15% (v/v);发酵培养条件为:温度 37℃,风量 0.25vvm,罐压 0.075 Mpa,搅拌转速 150 rpm,当还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵,测定每批发酵酸度、残糖,并计算转化率、发酵强度等指标。

实施例 3

玉米粉与自来水按 1:3 的质量比混合均匀,用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将粉浆 pH 调至 6.0,按 20U/g 玉米粉的添加量加入 α -高温淀粉酶;经过喷射液化,碘试呈浅棕色后得到合格玉米液化液;将 80%的玉米液化液经过板框过滤去掉滤渣,得到玉米糖液。小麦淀粉与自来水按 1:3 的质量比混合均匀,用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将粉浆 pH 调至

6.0, 按 20U/g 小麦淀粉的添加量加入 α -高温淀粉酶; 经过喷射液化, 碘试呈浅棕色后得到合格小麦糖液。

启动阶段: 将玉米液化液与豆粕粉配制成种子培养基 (总糖 180g/L, C/N 为 40), 灭菌冷却后将黑曲霉孢子接种至种子培养基, 孢子终浓度为 1×10^5 个/mL, 在温度 39°C, 风量 0.4vvm, 罐压 0.1 Mpa, 搅拌转速 200 rpm 条件下培养 36 h, 得到种子液。

连续阶段: 将玉米液化液和豆粕粉配制成种子补料培养基 (总糖 200g/L, C/N 为 30)。利用分散器对得到的种子液进行连续分散处理, 将菌丝球分散成 80 μm 的絮状菌丝; 同时按停留时间为 24 h 控制连续补充新鲜种子补料培养基的速度, 种子液以相同速度连续流出到发酵培养基进行发酵培养。种子连续培养阶段的培养温度为 37°C, 风量为 0.6 vvm, 罐压为 0.07 Mpa, 搅拌转速为 200 rpm。

停止阶段: 检测到种子活力呈下降趋势时, 停止补充新鲜种子补料培养基和分散处理, 将剩余种子液移入发酵培养基进行发酵培养。该阶段种子培养条件: 温度为 39°C, 风量为 0.6 vvm, 罐压为 0.1 Mpa, 搅拌转速为 200 rpm。

发酵培养基由玉米液化液、玉米糖液、小麦糖液和豆粕粉配制成 (总糖 200g/L, C/N 为 90); 发酵接种比例为 5% (v/v); 发酵培养条件为: 温度 39°C, 风量 0.4 vvm, 罐压 0.1 Mpa, 搅拌转速 200 rpm, 当还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵, 测定每批发酵酸度、残糖, 并计算转化率、发酵强度等指标。

对比例 1 (CN201410329652.X 中实施例 1)

葡萄糖与豆粕粉分别配制种子培养基 (总糖为 80 g/L, 总氮 1.5 g/L) 与发酵培养基 (总糖为 160 g/L, 总氮 1.5 g/L); 移种后孢子浓度为 55 万个/mL 接种; 培养 20h, 得到成熟的种子液, 种子液菌丝经分散器分散, 处理后的菌球平均直径为 100 μm , 分别接入下一级种子培养基与发酵培养基; 其中接入下一级发酵培养基的, 当发酵培养基中还原糖浓度降至 5 g/L 以下时发酵结束。如此循环直到种子活力显著衰退时停止。测定每批发酵酸度、残糖, 并计算转化率、发酵强度等指标。

对比例 2

发酵培养基总糖为 180 g/L, 总氮 1.5 g/L; 其他条件与对比例 1 相同。

对比例 3

玉米粉液化液和玉米糖液制备与实施例 1 相同。玉米液化液与硫酸铵配制种子培养基(总糖 120 g/L, 总氮 2 g/L)和发酵培养基(总糖 160 g/L、总氮 1.0 g/L)。将黑曲霉孢子接种至种子培养基, 孢子终浓度为 4×10^5 个/mL, 培养 20h, 得到一级成熟种子液。将 70%的成熟种子液转接至第一批发酵培养基内培养, 当还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵。将剩余 30%种子液经过分散器处理, 得到菌丝球或菌块的平均直径为 62 μ m, 转接至种子培养基, 培养 16 h 重新得到二级成熟种子液。如此循环直到种子活力显著衰退时停止。测定每批发酵酸度、残糖, 并计算转化率、发酵强度等指标。

对比例 4

玉米粉液化液和玉米糖液制备与实施例 1 相同。玉米液化液与硫酸铵配制种子培养基(总糖 120 g/L, 总氮 2 g/L)和发酵培养基(总糖 160 g/L、总氮 1.0 g/L)。将黑曲霉孢子接种至种子培养基, 孢子终浓度为 4×10^5 个/mL, 培养 20h, 得到一级成熟种子液。将 70%的成熟种子液转接至第一批发酵培养基内培养, 当还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵。将剩余 30%种子液经过分散器处理, 得到菌丝球或菌块的平均直径为 50 μ m, 将新鲜种子培养基补加至剩余种子液, 培养 16 h 重新得到二级成熟种子液。如此循环直到种子活力显著衰退时停止。测定每批发酵酸度、残糖, 并计算转化率、发酵强度等指标。

对比例 5

种子连续培养阶段中连续补充新鲜种子补料培养基的速度按停留时间 4 h 控制; 其他条件与实施例 1 相同。

对比例 6

种子连续培养阶段中种子补料培养基的 C/N 为 40; 其他条件与实施例 1 相同。

测试例 1

将实施例 1 和对比例 1、3、4 的技术效果进行对比, 如表 1 所示。

表 1

	实施例 1	对比例 1	对比例 3	对比例 4
种子连续运行时间 (h)	288	260	260	260
种子罐使用个数	1	3	3	1
每批种子罐辅助时间 (h)	0	12	9	1
麸曲使用量 (桶/发酵罐)	0.22	0.33	0.33	0.33
对应发酵罐数量	18	12	12	12
对应发酵初始总糖平均 (g/L)	160	160	160	160
对应发酵产酸平均 (g/L)	162.5	157.0	159.0	158.5
对应发酵周期平均 (h)	52.5	64.7	57.2	56.6
对应发酵转化率平均 (%)	101.6	98.1	99.4	99.1
对应发酵强度平均 (g/(h·L))	3.10	2.43	2.78	2.80

将实施例 1 和对比例 1、3、4 的技术效果进行对比显示：(1) 本发明方法相比专利 CN201410329652.X，简化了设备系统，种子罐使用量减少至 1/3；减少了操作步骤，显著提高生产效率，每批发酵罐对应的种子培养辅助时间节省 12 h。(2) 本发明方法连续运行时间更长，黑曲霉孢子的使用量可以减少 1/3，大幅降低黑曲霉孢子培养成本。(3) 相比专利 CN201410329652.X，在发酵初糖浓度为 16% 时，发酵强度提高了 27.5%，发酵转化率提高了 3.4 个百分点。

测试例 2

将实施例 2 和对比例 2 的技术效果进行对比，如表 2 所示。

表 2

	实施例 2	对比例 2
种子连续运行时间 (h)	360	260
种子罐使用个数	1	3
种子罐单罐辅助时间 (h)	34	480
麸曲使用量 (桶/发酵罐)	0.16	0.33
对应发酵罐数量	25	12
对应发酵初始总糖平均 (g/L)	180	180
对应发酵产酸平均 (g/L)	181.2	172.6

对应发酵周期平均 (h)	59.4	78.2
对应发酵转化率平均 (%)	100.7	95.9
对应发酵强度平均 (g/(h·L))	3.03	2.30

将实施例 2 和对比例 2 的技术效果进行对比显示, 本发明方法在高浓度发酵条件下相比专利 CN201410329652.X 具有更大的优势, 将发酵初始糖浓度提高至 18% 时, 发酵产酸可超过 18%, 发酵周期小于 60 h, 发酵转化率超过 100%, 发酵强度提高了 31.6%, 发酵转化率提高了 4.8 个百分点。因此, 利用本发明方法可以完全实现柠檬酸的高浓度、高转化率和高效率发酵生产, 对柠檬酸产业技术提升具有重要促进作用。

测试例 3: 本发明实施例 1 和对比例 5、6 的性能对比, 如表 3 所示。

表 3

	实施例 1	对比例 5	对比例 6
种子连续运行时间 (h)	288	136	152
种子罐使用个数	1	1	1
种子罐单罐辅助时间 (h)	24	24	24
麸曲使用量 (桶/发酵罐)	0.22	0.50	0.44
对应发酵罐数量	18	8	9
对应发酵初始总糖平均 (g/L)	160	160	160
对应发酵产酸平均 (g/L)	162.5	158.7	157.3
对应发酵周期平均 (h)	52.5	55.9	58.1
对应发酵转化率平均 (%)	101.6	99.2	98.3
对应发酵强度平均 (g/(h·L))	3.10	2.84	2.71

本发明实施例 1 和对比例 5、6 的性能比较显示, 当改变种子连续培养阶段停留时间和补料培养基 C/N 等参数时, 种子连续运行时间会受到显著影响, 运行时间缩短, 种子活力快速下降, 对应发酵转化率、发酵强度等指标也明显降低。

以上所述仅是本发明的优选实施方式, 本发明不限于以上实施例。可以理解, 本领域技术人员在不脱离本发明的精神和构思的前提下直接导出或联想到的其他改进和变化, 均应认为包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1、一种黑曲霉种子连续培养的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

(1) 启动阶段：将黑曲霉孢子接种至种子培养基，培养 16~36h，得到种子液；

(2) 种子连续培养阶段：对步骤(1)得到的种子液进行连续分散处理，分散得到的种子液进行连续培养，培养过程中种子液连续流出至发酵培养基进行发酵培养，同时以与流出种子液相同的速度补充新鲜种子补料培养基；

(3) 停止阶段：停止补充新鲜种子补料培养基和分散处理，继续培养得到种子液，之后将种子液移入发酵培养基进行发酵培养。

2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(1)中黑曲霉孢子接种后终浓度为 $1\sim 9\times 10^5$ 个/mL；步骤(1)中种子培养基的总糖为 100~180 g/L，C/N 为 20~40；步骤(1)中种子培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.2~0.4 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 100~200 rpm。

3、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(2)中补充的新鲜种子补料培养基的总糖为 150~200 g/L，C/N 为 15-30；步骤(2)中连续培养条件为：温度为 35~37℃，风量为 0.3~0.6 vvm，罐压为 0.05~0.07 Mpa，搅拌转速为 150~200 rpm。

4、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(3)中继续培养的培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.3~0.6 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 150~200 rpm。

5、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(2)中所述种子液连续分散处理的方法为：采用分散器将种子液中的菌丝球分散成 10~80 μ m 的絮状菌丝。

6、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(2)中新鲜种子补料培养基补充速度和种子液流出的速度 $F=V/t$ ，其中 V 为种子罐内种子液体积，以不同罐体进行确定；t 为种子液停留时间，根据絮状菌丝的细胞浓度反馈调节，通常取 6-24 h。

7、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(2)、步骤(3)中发酵接种比例为 5~25% (v/v)。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤（2）、步骤（3）中发酵培养基的总糖为 160~200g/L，C/N 为 50-90；步骤（2）、步骤（3）中发酵培养条件为：温度为 35~39℃，风量为 0.1~0.4 vvm，罐压为 0.05~0.1 Mpa，搅拌转速为 100~200 rpm，还原糖浓度低于 5g/L 时结束发酵。

9、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述种子培养基、新鲜种子补料培养基、发酵培养基分别为淀粉质原料液化液和氮源配制而成；所述淀粉质原料至少包括玉米粉、木薯粉、高粱粉、小麦淀粉其中一种；所述氮源至少包括硫酸铵、尿素、豆粕粉、玉米浆其中一种。

10、一种生产柠檬酸的方法，其特征在于，该方法采用权利要求 1 所述种子连续培养的方法所得的黑曲霉进行发酵，用于生产柠檬酸。

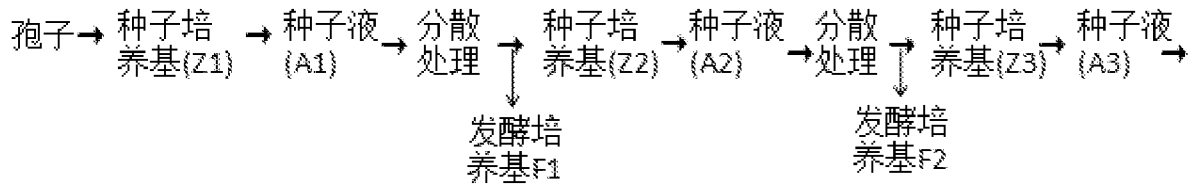


图 1

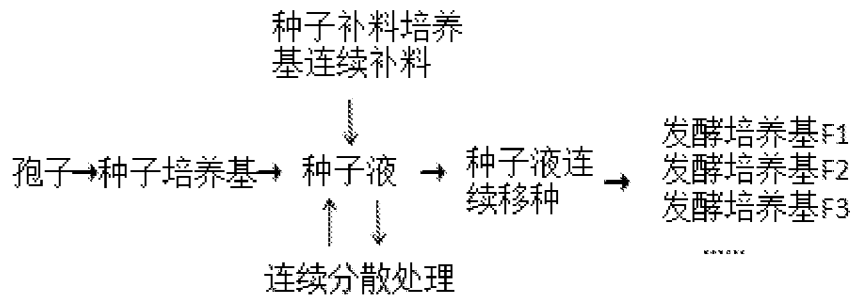


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/123053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/48(2006.01)i; C12N 1/14(2006.01)i; C12R 1/685(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P, C12N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 黑曲霉, 真菌, 柠檬酸, 种子液, 分散, 连续, 流加, 补料, 补充, Aspergillus niger, fungus, citric acid, seed+, dispers+, continuous, feed+, supplement+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104099253 A (JIANGNAN UNIVERSITY ET AL.) 15 October 2014 (2014-10-15) claims 1-6	1-10
Y	CN 103290070 A (NANTONG KAISAI BIOCHEMICAL ENGINEERING EQUIPMENT CO., LTD.) 11 September 2013 (2013-09-11) embodiment 2	1-10
PX	CN 109055444 A (JIANGSU GUOXIN UNION ENERGY CO., LTD. ET AL.) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 1-10	1-10
A	CN 102409066 A (COFCO BIOCHEMICAL (ANHUI) CO., LTD.) 11 April 2012 (2012-04-11) entire document	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2019

Date of mailing of the international search report

21 May 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/123053

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104099253	A	15 October 2014	CN	104099253	B	06 July 2016
CN	103290070	A	11 September 2013	CN	103290070	B	11 March 2015
CN	109055444	A	21 December 2018	None			
CN	102409066	A	11 April 2012	CN	102409066	B	25 September 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/123053

<p>A. 主题的分类 C12P 7/48(2006.01)i; C12N 1/14(2006.01)i; C12R 1/685(2006.01)n 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12P, C12N, C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, 百度学术: 黑曲霉, 真菌, 柠檬酸, 种子液, 分散, 连续, 流加, 补料, 补充, Aspergillus niger, fungus, citric acid, seed+, dispers+, continuous, feed+, supplement+</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104099253 A (江南大学等) 2014年 10月 15日 (2014 - 10 - 15) 权利要求1-6</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103290070 A (南通凯赛生化工程设备有限公司) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 实施例二</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109055444 A (江苏国信协联能源有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102409066 A (中粮生物化学安徽股份有限公司) 2012年 4月 11日 (2012 - 04 - 11) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 104099253 A (江南大学等) 2014年 10月 15日 (2014 - 10 - 15) 权利要求1-6	1-10	Y	CN 103290070 A (南通凯赛生化工程设备有限公司) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 实施例二	1-10	PX	CN 109055444 A (江苏国信协联能源有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-10	1-10	A	CN 102409066 A (中粮生物化学安徽股份有限公司) 2012年 4月 11日 (2012 - 04 - 11) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 104099253 A (江南大学等) 2014年 10月 15日 (2014 - 10 - 15) 权利要求1-6	1-10															
Y	CN 103290070 A (南通凯赛生化工程设备有限公司) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 实施例二	1-10															
PX	CN 109055444 A (江苏国信协联能源有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-10	1-10															
A	CN 102409066 A (中粮生物化学安徽股份有限公司) 2012年 4月 11日 (2012 - 04 - 11) 全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>																	
国际检索实际完成的日期	2019年 4月 28日	国际检索报告邮寄日期 2019年 5月 21日															
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王静 电话号码 62411063															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/123053

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104099253	A	2014年 10月 15日	CN	104099253	B	2016年 7月 6日
CN	103290070	A	2013年 9月 11日	CN	103290070	B	2015年 3月 11日
CN	109055444	A	2018年 12月 21日	无			
CN	102409066	A	2012年 4月 11日	CN	102409066	B	2013年 9月 25日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)