

二甲基亚砷对 固体发酵生产柠檬酸刺激作用的初步研究

郭守令 张云英 郝燕燕

(河南省科学院生物研究所, 郑州)

二甲基亚砷(CH_3SOCH_3 , 简称 DMSO) 是对哺乳动物极低毒的物质, 对微生物有促生作用和抗辐射保护作用^[1,2]。研究了 DMSO 对固体发酵生产柠檬酸产酸菌株宇佐美曲霉的生理作用及对产酸的影响, 并进行了扩大试验。结果表明, 不同浓度的 DMSO 对菌丝生长有刺激作用和抑制作用, 并在当代生长发育中能引起孢子头颜色的变化。适宜浓度对柠檬酸有刺激增产作用, 实验室试验可增产 15%, 生产条件下可增产 6.5%。在柠檬酸固体发酵中使用, 用药量少, 作用集中, 能取得经济效益。

(一) DMSO 对宇佐美曲霉的生长影响

供试菌种: 宇佐美曲霉(*Aspergillus usami*) G_2B_3 是国内固体发酵生产柠檬酸的通用菌种, 麦芽汁斜面培养基 30℃ 培养(下同)。

DMSO: 分析纯, 含量 99% 以上, 测定 pH 为 6.5(下同)。

平皿培养基: 红薯干粉 8%, 琼脂 2%, 加自来水, 自然 pH(测定为 6.5)。

用无菌水配制成不同浓度的 DMSO 药液, 每 100ml 灭菌后的平皿培养基中分别加入 10ml 不同浓度的药液。取培养 6 天长满孢子的 G_2B_3 斜面 1 支, 加 20ml 无菌水刮洗下孢子, 移入有玻璃珠的三角瓶中振摇 5 分钟制成孢子悬浮液。用直径小于 1mm 的灭菌毛细管蘸菌液点于平板中央, 每皿接种一点, 毛细管始终用 1 支, 每次调节毛细管内菌液达固定高度, 使接种量相同。30℃ 下培养, 测微游标卡尺量取菌落直径。结果如表 1。

结果表明, 加 DMSO 在 2000 ppm 以下的浓度无论培养 4 天或 6 天均有刺激菌丝生长的作用, 3000 ppm 以上的浓度对菌丝有明显的抑制作用。100、500、1000、2000 ppm 浓度与不加药对照比较菌丝增加率: 培养 4 天平均为 0.2%、3.5%、4.1%、4.4%, 培养 6 天分别为 3.9%、4.8%、8.2%、3.6%。

观察发现, 试验浓度范围内, DMSO 对孢子头的数量没有影响, 而对孢子头颜色则有明

表 1 不同浓度 DMSO 对宇佐美曲霉生长的影响

药液浓度 (ppm)	培 养 4 天			培 养 6 天		
	菌落直径 (mm)	直径增加量 (mm)	孢子头颜色	菌落直径 (mm)	直径增加量 (mm)	孢子头颜色
100	34.52	+0.07	黑 色	48.28	+1.83	黑 色
500	35.66	+1.21	黑 色	48.69	+2.24	黑 色
1000	35.87	+1.42	黑 色	50.26	+3.81	黑 色
2000	35.98	+1.53	浅黑色	48.13	+1.65	浅黑色
3000	33.13	-1.32	灰黑色	44.21	-2.24	浅黑色
4000	32.52	-1.93	灰白色	43.02	-3.43	深灰白色
5000	31.54	-2.95	灰白色	41.26	-5.19	灰白色
10000	27.65	-6.80	灰白色	34.25	-12.20	灰白色
对照	34.45	0	黑 色	46.45	0	黑 色

注: 菌落直径是五个菌落的平均值

显的影响。当药液浓度增加到 2000ppm 时，孢子头的颜色开始变浅，4000 ppm 以上的浓度培养菌落孢子头颜色明显变为灰白色。随着培养时间延长，孢子头变浅的颜色稍有回复趋势。为进一步考察孢子头颜色变化的性质，将不同浓度条件下培养 6 天的变色孢子，分别接种麦芽汁斜面各 2 支，30℃ 培养 4 天观察表明。仅传一代后孢子头颜色即全部恢复成黑色。证明不属于遗传性变异，而可能是对菌体合成孢子头的颜色起了阻遏作用。

(二) DMSO 对固体发酵生产柠檬酸的刺激作用

试验方法：(1) 菌种制备：麸皮 100g，碳酸钙 10g，硫酸铵 0.5g，加自来水 110ml，制成麸皮培养基分装于 3 个 300 ml 三角瓶包扎灭菌。接入培养好的 G_2B_3 斜面孢子，培养 1 天后摇散，孢子长出后翻瓶。30℃ 下培养 5 天。长满孢子的培养基集中于 1 瓶，加 300ml 无菌

水搅洗，孢子液倒入有玻璃珠的瓶中，振摇制成孢子悬浮液供用。(2) 固体发酵：红薯渣颗粒(直径约 3mm) 20g，麸皮 7.6g，碳酸钙 0.8g，加自来水 35ml 搅匀放入 250ml 烧杯，牛皮纸包扎，121℃ 灭菌 1 小时，灭菌后分别加入不同浓度的无菌 DMSO 29ml 搅匀，再接入 4ml 孢子悬浮液搅匀，每处理浓度一烧杯，重复三次。在经过灭菌的自制恒温保湿的水浴培养器中培养，培养温度 30℃，相对湿度 93%，培养 4 天。(3)浸曲提取：每处理烧杯中加 100℃ 水 85ml，充分搅碎，使水埋住培养物，盖上玻璃皿，80℃ 保温 2 小时，取出趁热用滤纸过滤。吸取滤液 2ml 用 0.1429 N NaOH 液滴定，按以下公式算出产柠檬酸率，结果如表 2。

$$\text{曲产柠檬酸率}(\%) = \frac{\text{曲中含柠檬酸重量}}{\text{曲中干物质重量}} \times 100\%$$

在固体发酵条件下，DMSO 浓度在 100~

表 2 不同 DMSO 浓度对固体发酵产柠檬酸量的影响

DMSO 浓度 (ppm)	100	500	1000	1500	3000	对照
曲产酸率(%)	18.75	20.80	21.33	19.02	18.59	18.53
酸增产率(%)	1.19	12.25	15.11	2.64	0.32	0
孢子头颜色	黑色	黑色	黑色	黑色、边缘稍灰	灰白色	黑色

3000ppm 范围内均有刺激柠檬酸产量增加的作用，而孢子头颜色变化同平板试验一致，1500 ppm 以上的浓度仍使孢子头颜色变浅变灰白色。500 和 1000 ppm 浓度柠檬酸产量增加较显著，分别增产 12.25% 和 15.11%。

(三) DMSO 刺激柠檬酸增产的扩大试验

试验方法：干红薯渣粉碎成直径约 2—4mm 的颗粒，每处理各 100kg 料，分别加轻质碳酸钙 2kg 和冷水 50kg 充分拌匀，用扬麸机扬匀，煮料灭菌 40 分钟。在半无菌条件下，经扬麸机摊晾。400g 尿素溶于 40kg 30℃ 凉开水中，再按最后总加水量计算分别加入各处理相应数量的 DMSO 于溶液中，加入料充分拌匀。每处理接种同批号的 12 瓶种子，放入 80kg 30℃ 凉开水中制成菌悬液，接种入料充分拌匀，每处理平敷

于灭菌的 79 个搪瓷盘中，平均厚度约 4cm，在同一间曲房上架培养，72 小时出料，每处理定位各选 5 盘，每盘取样 10g 于 110℃ 烘干 5 小时称重计算曲含水量。同时取 30g 样品加 100℃ 水 100ml，充分搅碎浸泡两小时，滤纸过滤。取 1ml 滤液用 0.1429N NaOH 滴定。按以上公式计算出平均曲产柠檬酸率。

由试验室小试选出刺激柠檬酸产量增加较多的 1000 和 500ppm 两个 DMSO 最适浓度，在生产条件下进行扩大试验，结果表明，500 ppm 时，柠檬酸产酸率可达 36.2%，对照为 34.0%，柠檬酸增产率为 6.5%；1000ppm 时，产酸率为 35.4%，增产率为 4.1%。生产试验表明，添加适量的 DMSO 是一种有效益的增产途径。

(四) 讨论

1. 采取考察菌丝生长量常用的测定菌落直径方法, 观察到二甲基亚砷对柠檬酸固体发酵菌种宇佐美曲霉 G_2B_8 有刺激生长和抑制生长两种作用, 符合一般刺激生长剂的规律。100—2000ppm 浓度范围均有刺激生长作用, 3000—10000ppm 浓度具有明显的抑制作用, 培养时间延长刺激生长和抑制生长作用都表现加强。可以认为, 二甲基亚砷刺激菌丝生长是促进柠檬酸增产的重要原因。

2. 较高浓度的二甲基亚砷无论在平板试验或者在固体发酵中都能引起宇佐美曲霉 G_2B_8 菌株的孢子头变色。培养基中含二甲基亚砷在

4000ppm 以上的浓度时产生的孢子头颜色呈灰白色, 不同于正常的黑色孢子头。孢子头开始改变的浓度也正是抑制菌丝生长的最低浓度。

参 考 文 献

- [1] USP, 3558434, 1971.
- [2] 上海市工业微生物研究所等: 微生物学通报, 4(2): 19—23, 1977.
- [3] Cochrane, V. W., 陈驹声等译: 真菌生理学, 科学出版社, 北京, 1963 年.
- [4] Bridges, B. A.: *Radiation Research*, 17: 801—808, 1962.
- [5] Bridges, B.A.: *J. Gen. Microbiol.*, 31: 405—412, 1963.