

出芽短梗霉菌株 CBS591.75 和 DSM2404 发酵生产聚苹果酸的研究

刘双江

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Alexander Steinbuchel

(Institute of Microbiology, University of Muenster, Correnstrasse, Correnstrasse 3, D-48149 Muenster, Germany)

摘 要 研究了出芽短梗霉菌株 CBS591.75 和 DSM2404 在 2L 发酵罐中发酵生产聚苹果酸的过程,并以 CBS591.75 为菌种进行了 20L 规模的初步放大试验。结果表明,发酵过程可以分为 3 个阶段,第一阶段从接种开始,到发酵液的 pH 上升到最高点并开始下降为止,这一阶段中细胞缓慢增长,没有聚苹果酸产生;第二阶段以 pH 迅速下降和聚苹果酸大量产生为特征,这一阶段中聚苹果酸的产生与细胞增长相平行;在第三阶段中,聚苹果酸产生速度减慢, pH 趋于稳定。试验结果还表明,菌株 CBS591.75 产生聚苹果酸的能力大于 DSM2404,发酵结束时,前者聚苹果酸的产量为 6.9g/L,而后者为 5.4g/L。CBS591.75 菌种在 20L 规模的初步放大试验表明,发酵 144h 后发酵液中聚苹果酸浓度为 8.0g/L,稍高于 2L 发酵罐的结果,为今后的放大提供了依据和参考。

关键词 聚苹果酸,出芽短梗霉,生物多聚物

聚苹果酸以苹果酸为唯一单体、相互通过酯键联接而成(图 1)。它是天然多聚物中新近开发的一种生物多聚物。与许多其它天然多聚物不同,聚苹果酸分子中有许多自由羧基,这些自由羧基赋予了它许多特别的性质,例如,在一定条件下分子带电荷;水溶性极强;可以与其它化合物反应而对分子进行改造。基于这些性质,聚苹果酸正在被开发用于制造药物载体(Drug delivery system)或作为原生药物(Pro-drug)^[1]。

聚苹果酸可以通过化学的或生物的方法合成,目前两种方法都在研究中^[2,3]。通过化学合成可以得到 3 种聚苹果酸,即 α 、 β 、 γ 3 种类型;而从微生物细胞中分离的聚苹果酸仅有 β 型一种。同化学合成相比,生物合成产品的分子量较高,可达 200~760kDa^[4],而化学合成的聚苹果酸分子量一般低于 7kDa^[5]。另外,生物合成所需的原料简单易得,反应条件温和,近来受到普遍的重视。

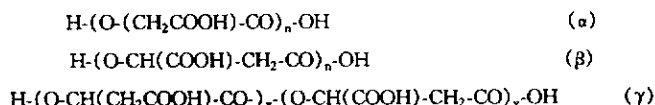


图 1 3 种类型的聚苹果酸

Fig.1 Three types of polymeric acids

Shimada 等人最早从环状青霉 (*Penicillium cyclopium*) 中分离到一种酸性大分子化合物, 该物质能抑制蛋白酶的活性, 推测可能是聚苹果酸^[6]。之后, 聚苹果酸先后从 *Physarum polycephalum*、*Aureobasidium* sp. 中分离出来并进行了化学鉴定^[5,7]。到目前为止, 对微生物合成聚苹果酸的研究还很少, 分离到的菌种也很少。作者从荷兰和德国的两个菌种保藏中心的菌种中筛选到了几株产生聚苹果酸的菌株^[3], 本文报道在 2L 和 20L 发酵罐中生产聚苹果酸的试验结果。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养条件

出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) CBS591.75 和 DSM2404 分别来自荷兰和德国菌种保藏中心。培养基采用 PDA(Difco, USA), 初始 pH 为 4.5, 培养温度为 25℃。

1.2 发酵培养基及发酵罐的运行

发酵培养基组成参照 Nagata 等人^[5]的方法配制而成, 省去使用碳酸钙, 培养基初始 pH(灭菌后)为 4~5。

2L 发酵罐的运行条件是: 温度控制 25℃, 搅拌子转速为 800~900r/min, 通气量 1.0~1.5L/min。20L 发酵罐的运行条件是: 温度控制 25℃, 搅拌速度为 400r/min, 通气量 4.0L/min。选取在斜面培养基上生长良好的菌种为种子, 接种液体培养基(300ml 规格三角瓶中装有 100ml 液体培养基), 培养 3d 后做种子, 以 1% 种量接种发酵罐。2L 发酵罐中加入 1000ml 培养基, 20L 发酵罐中加入 15L 培养基。

1.3 分析及测定

1.3.1 聚苹果酸的测定: 发酵液经离心(15000r/min×3min)后取上清液, 加入等体积的 1mol/L 硫酸, 90℃ 水解过夜。采用 L-苹果酸酶试剂盒分别测定发酵液水解前后的苹果酸浓度, 二者之差即为发酵液中聚苹果酸的浓度。水解前发酵液中苹果酸含量一般不超过 0.02g/L。

1.3.2 葡萄糖浓度的测定: 发酵液中残余葡萄糖浓度采用 HPLC 测定, HPLC 的运行条件是: 柱温 65℃, 流量 0.6mL/min, 0.005mol/L 硫酸为洗脱液。

1.3.3 细胞干重的测定: 取 5mL 发酵液, 经 45μm 醋酸纤维纸过滤, 100℃ 干燥至恒重。

1.3.4 普鲁兰的测定: 1ml 发酵液 3000r/min 离心 2min, 取上清液 0.5ml 并加入等体积乙醇, 混匀, 离心(1300r/min×5min), 蒸发掉残余乙醇, 加入 0.5ml 水溶解沉淀物, 转移到含有 2ml、0.1mol/L 乙酸钠缓冲液(pH4.5)的试管中, 加入 70μl 淀粉葡萄糖苷酶和普鲁兰酶混合液(活力分别为 25.5 和 4.5μ/ml), 37℃ 水解过夜, HPLC 测定葡萄糖含量。用同样方法处理普鲁兰标准品(Sigma, USA)做参照物。

1.3.5 发酵过程中碳元素流向比例的分析: 分别以葡萄糖分子的含碳量(40%)和苹果酸的含碳量(35.8%)代表普鲁兰和聚苹果酸分子的含碳量, 计算发酵过程中碳元素的流向和分布比例, 计算方法是:

合成某物质的碳元素流向比例(%) = (该物质分子含碳量 × 该物质产量) ÷ (葡萄糖分子含碳量 × 葡萄糖消耗量) × 100%

2 结 果

2.1 2L 发酵罐中两菌株发酵过程的比较

菌株 CBS591.75 和 DSM2404 发酵情况见图 2。从表观上看,二者发酵过程大致相似,整个过程可以分为 3 个阶段,在启动后的最初一段时间里,CBS591.75 在 72h 前和 DSM2404 在 48h 前,尽管细胞有所增长,基本上没有聚苹果酸产生,此阶段内 pH 上升到最高并开始下降。之后,CBS591.75 在 72~168h 和 DSM2404 在 48~96h 间,细胞继续生长,pH 缓慢下降,发酵液中聚苹果酸浓度成线性升高,在最后一个阶段里,聚苹果酸浓度仍缓慢升高,pH 趋于稳定。但二者也有不同,在本试验结束发酵时,CBS591.75 产生的聚苹果酸为 6.9g/L,葡萄糖消耗掉 50%(初始浓度 98g/L,终浓度 48g/L),干物质细胞产量 13g/L,在培养 168h 前发酵液 pH 高于 3.0,而 DSM2404 在 96h 时 pH 已降至 2.8。相对而言,DSM2404 产生的聚苹果酸量较少,最终产量为 5.4g/L,而葡萄糖消耗较多,72% 葡萄糖被利用(初始浓度 99g/L,终浓度 27g/L)。分析表明,DSM2404 发酵过程中产生了相当量的普鲁兰,发酵结束时其浓度为 15.1g/L,而 CBS591.75 菌株普鲁兰的产量为 2.3g/L。另外,在整个发酵过程中,菌株 CBS591.75 不产生黑色素,而 DSM2404 在发酵 90h 后开始产生黑色素,使发酵液变黑,这不利于发酵的进行。

2.3 两菌株发酵葡萄糖过程中碳元素流向的比较

以上结果可以看到,菌株 CBS591.75 发酵产生聚苹果酸的能力高于 DSM2404,对葡萄糖发酵过程中碳元素流向分布的分析更清楚地表明,菌株 CBS591.75 发酵过程中利用了更多的碳元素(约 12%)合成聚苹果酸,而合成普鲁兰的比例仅为 5%;相比而言,DSM2404 合成聚苹果酸的比例仅有 7%,而合成普鲁兰的比例达 21%(图 3)。

2.3 20L 发酵罐中聚苹果酸的发酵情况

参考以上试验结果和以往的结果^[3],作者选用 CBS591.75 菌株进行了稍大规模的发酵试验,以便为今后发酵规模的放大提供依据和参数。20L 发酵罐中聚苹果酸、细胞的产量及葡萄糖的消耗情况见图 4。从图 4 中可以看到,20L 发酵罐中的发酵情况与 2L 发酵罐中的情况类似,发酵进行了 144h,聚苹果酸产量达 8.0g/L,高于 2L 发酵罐的产量,这可能是由于 20L 发酵罐中的通气好于 2L 罐中的原因,也有可能是由于二者的物料流态状况不同所致。试验过程中还分别选用了葡萄糖和蔗糖作为碳源,所获得的结果相似。

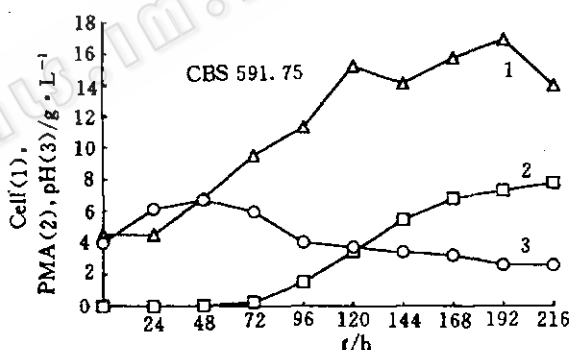


图2 菌株 CBS591.75 和 DSM2404 在 2L 发酵罐中发酵情况

Fig.2 PMA fermentation in 2L fermenters with strains of *A. pullulans*.

Experiments were conducted at 25℃, stirring speed of 800-900r/min and aeration of 1.0-1.5 L/min.

3 讨 论

许多细菌能够合成聚羟基烷酸酯类作为碳源和能源的贮存形式,但聚羟基二元酸酯还是近来才发现的一类生物聚酯^[7],到目前为止,只在少数真菌中发现有聚苹果酸, Holler 等人研究 *Physarum polycephalum* 发现,聚苹果酸存在于细胞内和发酵液中,并对 DNA 聚合酶有抑制作用^[4],而对 *Aureobasidium pullulans* 研究表明,聚苹果酸仅存在于发酵液中^[3]。到目前为止,对聚苹果酸的生物合成途径及功能还不清楚。

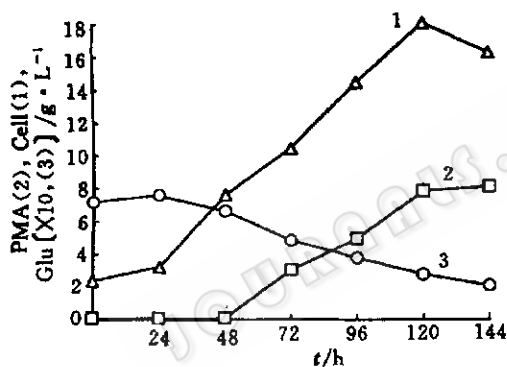


图 4 20L 发酵罐的发酵情况

Fig. 4 PMA fermentation in 20L fermenter with *A. pullulans* CBS591.75
Fermentation was performed at 25°C, stirring speed of 400r/min and aeration of 4.0 L/min.

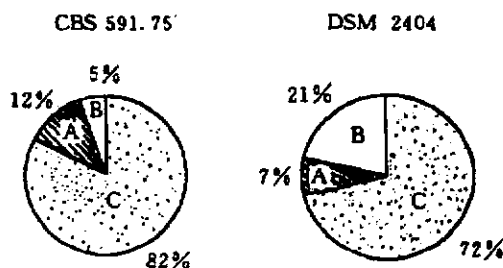


图 3 葡萄糖发酵过程中碳元素流向比例
Fig. 3 Carbon flow during PMA fermentation by strains of *A. pullulans*
Data derived from the experiments diagrammed in Fig. 2.
A. PMA; B. pullulan; C. Cells, CO₂ etc.

目前,尽管可以通过化学的或生物的方法合成聚苹果酸,但规模生产的技术还有待于优良菌种的选育及发酵工艺的完善。本试验结果表明,菌株 CBS591.75 合成聚苹果酸的能力高于 DSM2404,不仅产量高,而且发酵过程中产生的普鲁兰少,不产生黑色素,有利于聚苹果酸的分离提纯。从 2L 规模放大到 20L 规模的试验表明,聚苹果酸的产量稍有提高,这为今后更大规模的放大和生产工艺的制定提供了有利的支持和依据。

致谢 本项研究过程中得到了德国教育、科学及研究技术部(BMBF)的支持,特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Braud B, Bunel C, Vert M. Polymer Bulletin, 1985, 13: 293~299.
- [2] Guerin P, Francillette J, Braud C et al. Makromol Chem Makromol Symp. 1986, 6: 305-314.
- [3] Liu S, Steinbuechel A. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 273~278.
- [4] Holler E., Angerer B, Achhammer G et al. FEMS Microbiol Rev, 1992, 103: 109~118.
- [5] Nagata N, Nahara T, Tabuchi T. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 638-642.
- [6] Shimada K, Matsushima K, Fukumoto J et al. Biochem Biophys Res Commun, 1969, 35: 619-624.
- [7] Fischer H, Erdann S, Holler E. Biochemistry, 1989, 28: 5219~5226.

Production of Polymalic Acid by *Aureobasidium pullulans* CBS591.75 and DSM2404 in 2L and 20L Fermenters

Liu Shuangjiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Alexander Steinbuchel

(Institute of Microbiology, University of Muenster, Muenster D-48149, Correnstrasse 3, Germany)

Abstract Polymalic acid(PMA), a polyester formed from condensation of L-malic acids, was produced by *Aureobasidium pullulans* CBS591.75 and DSM 2404 in 2L and 20L fermenters. Results from the 2L fermentation with the above two strains showed that three stages could be recognized (by examination of the cell growth, PMA production and pH changes of the medium) during the whole fermentation with the following features: The first stage started right after inoculation, and cells grew slowly with no production of PMA. A characteristic event is that the pH of the medium came up to a highest point and be ready to go down. The second stage followed the first stage, PMA production increased sharply, almost linear to the cell growth, and pH also dropped quickly. This is a stage which PMA was produced proportional to cell growth. Fermentation was stopped when PMA production rate slowed down and pH became almost stable. Although fermentation process of CBS 591.75 and DSM 2404 was similar to each other, there were a few differences. CBS 591.75 exhibited better PMA productivity than DSM 2404 did. The final PMA concentration in the medium reached 6.9 and 5.4 g/L for CBS 591.75 and DSM 2404 respectively. DSM2404 was easy to produce melanin, which was harmful to isolation and purification of PMA from the medium. Fermentation in 20L fermenter with CBS 591.75 was conducted and showed better PMA production, 8.0g/L after 144h fermentation. This result will definitely stimulated further magnification of the PMA fermentation.

Key words Polymalic acid, PMA, *Aureobasidium pullulans*, biopolyester