

衣康酸生产菌种的定向选育和产酸条件的研究*

江洁 刘晓兰 吴耘红 陈士学

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院 齐齐哈尔 161006)

李勇

(齐齐哈尔出入境检验检疫局 齐齐哈尔 161005)

摘要: 通过紫外线-高温复合诱变处理衣康酸生产菌株土曲霉 *Aspergillus terreus* As 3.2811, 用以琥珀酸为唯一碳源的选择性平板定向筛选高产菌株, 获得产酸率较其亲株提高了 5 倍以上的突变株。用正交试验的方法对突变株的适宜产酸条件进行了研究, 通过分批补糖发酵可提高其产酸率高达 39.92%。

关键词: 土曲霉, 定向筛选, 衣康酸, 产酸条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0020-05

STUDIES ON THE DIRECTIVE BREEDING AND CULTIVATION OF ITACONIC ACID PRODUCING STRAIN

GANG Jie LIU Xiao-Lan WU Yun-Hong CHEN Shi-Xue

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

LI Yong

(Qiqihar Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qiqihar 161005)

Abstract: This paper described the treatment of itaconic acid strain of *Aspergillus terreus* As 3.2811 with uv-irradiation and high temperature. The mutant was obtained which grew in culture media containing succinic acid as the only carbon source. Its productivity of itaconic acid was 5 times higher than the original strain. The producing acid conditions were optimized by orthogonal experimental design. By batch-feeding glucose fermentation, the itaconic acid productivity could be improved by 39.92%.

Key words: Itaconic acid, *Aspergillus terreus*, Directive breeding, Producing acid condition

衣康酸及其酯类是制造合成树脂、合成纤维、塑料、橡胶、离子交换树脂、表面活性剂和分子螯合剂等的良好添加以及防水性剂和单体原料。它作为交联剂和乳化剂, 在含量为 1% ~ 5% 时, 生产的苯乙烯-丁二烯共聚物是质轻、易塑、绝缘、防水、抗腐蚀性能好的塑料和涂料。含衣康酸的丙烯酸胶乳可以作为非织造纤维的粘合剂, 含衣康酸的聚氯乙烯显示对纸张、塞璐玢和聚对苯二甲酸乙二醇酯薄膜的粘着性增强, 聚丙烯睛纤维中含少量的衣康酸, 就能大大改善其染色性能, 使着色加深。衣康酸聚合物有特殊光泽、透明, 适合于制造人造宝石和特种透镜, 性能良好的抗化学剂和涂料等。由衣康酸与芳香二胺生成的吡咯烷酮衍生物是润滑剂和增稠剂, 与其他各种胺生成的吡咯烷酮衍生物可用于洗涤剂、医药和除草剂之中^[1]。具有广阔的开发前景。

以微生物发酵法生产衣康酸已成为当前普遍使用的生产方法, 国内外许多学者对衣康酸生产菌种及发酵条件进行了研究^[2-7], 但对于发酵菌种的研究还局限于传统的诱

* 黑龙江省教育厅研究基金资助项目 (No. 9541064)

收稿日期: 2002-05-13, 修回日期: 2002-07-20

变筛选,通常最普遍的方法是随机筛选,即将大量的变异菌株通过单菌分离后进行摇瓶培养,从摇瓶数据筛选出优良的突变株。尽管这种方法简单实用,但工作量大,效率低^[9]。在本研究中,根据代谢控制理论,设计了以琥珀酸为唯一碳源的筛选方法,简便直观,筛选效率高,国内外未见报道。该方法筛选出的菌株增强了衣康酸合成过程中关键酶丙酮酸羧化酶的活性,强化了CO₂固定反应,增加了衣康酸合成的前体草酰乙酸的合成,从而增加衣康酸的合成。该筛选方法的建立,对定向选育衣康酸高产菌株具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

土曲霉 *Aspergillus terreus* As 3.2811 中国微生物菌种保藏中心提供。

1.2 培养基

斜面培养基: NaNO₃ 2.0g, K₂HPO₄ 1.0g, KCl 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 蔗糖 30.0g, 琼脂 15.0g, 蒸馏水(或自来水) 1.0L, pH 自然, 采用 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

初筛(平板)培养基: 葡萄糖 70.0g, (NH₄)₂SO₄ 4.0g, 玉米浆 1.6g, MgSO₄·7H₂O 4.0g, 溴甲酚绿 0.1g, 琼脂 20.0g, CaCO₃ 10.0g(预先 160℃ 干热灭菌 2h), 定容至 1.0L, 用衣康酸调节 pH 3.0, 0.75 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

以琥珀酸为唯一碳源的培养基: 琥珀酸 30.0g, (NH₄)₂SO₄ 4.0g, 玉米浆 1.6g, 溴甲酚绿 0.1g, MgSO₄·7H₂O 4.0, 琼脂 20.0g, 定容至 1.0L, 用衣康酸调节 pH 3.0, 0.75 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

摇瓶培养基: 葡萄糖 70.0g, (NH₄)₂SO₄ 4.0g, MgSO₄·7H₂O 4.0g, 玉米浆 1.6g, 定容至 1.0L, 用硝酸调节 pH 3.0, 0.75 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化: 将原种接入斜面培养基中, 在 30℃ 下, 培养 3~4d。

1.3.2 菌种纯化: 稀释涂平皿法。

1.3.3 紫外线-高温复合诱变处理: 30W 紫外灯, 距离 30cm; 打开紫外灯预热 20min。用无菌吸管吸取 10mL 浓度为 10⁷ 个/mL 的孢子悬液, 放到直径 9cm 的无菌平皿中, 同时放入无菌搅拌铁芯, 悬液层厚度约为 2mm。将平皿放在电磁搅拌器台面上, 启动电磁搅拌器, 打开平皿盖, 让孢子悬液在紫外灯下均匀照射, 当照射达到要求时间后, 立即盖上皿盖, 取出并用黑布罩好。吸取紫外线照射的孢子悬液 15mL 置入一支无菌试管中, 于恒温水浴中处理, 处理完毕后, 立即取出, 冷却后, 将诱变后的孢子悬液涂布于选择培养基上。

1.3.4 筛选方法: 将稀释后的孢子悬液 0.2mL 分别涂布于初筛培养基和以琥珀酸为唯一碳源的培养基的平板上, 倒置在 30℃ 的培养箱中, 培养 3~4d, 挑选生长快、产生变色圈与菌落直径比大的单菌落, 进行斜面培养。

1.3.5 摇瓶种子培养: 在 250mL 三角瓶中装入种子培养基 40mL, 在斜面培养基上刮取适量孢子, 接入灭菌后的液体培养基中, 置于 37℃ 的摇瓶机上 180r/min 振荡培养 2d。

1.3.6 摇瓶发酵培养: 250mL 三角瓶装液 40mL, 37℃, 180r/min 振荡培养 5~6d。

1.4 分析方法

1.4.1 产酸分析: (1) 简易分析: 标准 NaOH 滴定。(2) 碘法: 衣康酸分子中含有一个双键, 可定量吸收一分子碘。

1.4.2 菌体生长量的测定: 测量菌体干重法。

1.4.3 残糖的测定: DNS 法。

2 结果与讨论

2.1 菌种初步筛选

将 As3.2811 原菌经斜面活化, 然后进行稀释平板分离, 在初筛培养基上选取 30 个变色圈与菌落直径比大的单菌落接斜面培养, 刮取斜面上孢子接摇瓶发酵培养基进行产酸实验, 发酵 108h 测定结果, 产酸率高于 10.0 g/L 的有 8 个菌株, 其中第 6 号菌产酸为 11.2g/L, 相对较高, 并且随发酵时间的进行它的降糖和菌体生长皆较正常, 选其做为下一步物理诱变的出发菌株。

2.2 衣康酸生产菌种的定向选育

采用紫外-高温复合物理诱变方法对初筛获得的出发菌株进行处理。

2.2.1 诱变剂量的确定: 将孢子悬液经紫外线分别照射 3min, 4min 和 5min 后, 再分别于 70℃ 处理 5min, 或 100℃ 处理 1 min, 初筛平板计算死亡率及正突变率, 实验结果如表 1。

表 1 物理诱变剂量的选择

诱变条件	紫外线 3min		紫外线 4min		紫外线 5min	
	70℃	100℃	70℃	100℃	70℃	100℃
死亡率 (%)	95	98	97	92	98	100
正突变率 (%)	50	13	24	57	7	0

从表 1 的实验结果可以看到, 实验中紫外-高温复合诱变的剂量选择皆过大, 致使死亡率过高, 存活菌数过少, 因此, 下一

步紫外-高温复合物理诱变的剂量选定为紫外线照射 3min, 然后 70℃ 处理 5min。

2.2.2 定向筛选结果: 以 6 号菌为出发菌株, 经紫外-高温复合诱变, 处理后的孢子悬液涂布在以琥珀酸为唯一碳源的平板上, 选取生长快、大的单菌落 20 个接斜面, 再将生长良好的斜面接摇瓶培养 96h 测定产酸量。其中第 2 号菌产酸为 31.1g/L, 较出发菌株产酸量提高了 178%, 第 7 号菌产酸量为 35.5g/L, 提高了 217%, (以 NaOH 滴定测得酸量计)。这一方面是因为出发菌株的产酸量较低, 使其产酸量提高的几率和幅度较大的可能性很大, 另一方面, 我们根据代谢控制理论和衣康酸合成机理设计的选择性平板科学合理, 筛选效率高。选择出的产酸较高的第 2 号和第 7 号菌都是以琥珀酸为唯一碳源生长快的菌株。以琥珀酸为唯一碳源, 菌体要想生长, 碳代谢必须走四碳二羧酸脱羧反应, 菌体生长越快, 四碳二羧酸的脱羧反应越强, 而四碳二羧酸的脱羧反应与 CO₂ 固定反应是相同的丙酮酸羧化酶所催化的, 所以以琥珀酸为唯一碳源生长的菌株, 增强了丙酮酸羧化酶的活性, 强化了 CO₂ 固定反应, 增加了衣康酸生物合成的前体草酰乙酸的合成, 从而增加了产酸量。这也证明了 Bentley 等人认为的葡萄糖经糖酵解途径和三羧酸循环合成柠檬酸, 柠檬酸再脱水脱羧生成衣康酸的生物合成机理。

关于衣康酸生物合成机理至今尚无统一的看法, 主要学说有两种: 一种是上述提到的 Bentley 学说, 另一种是 Shimi 等人认为的乙酸和琥珀酸先缩合成三羧酸, 再脱氢脱羧, 生成衣康酸。现在研究证据支持第一种学说占优势, 因此衣康酸生物合成走 Bent-

key 认为的途径可能性较大, 本研究也证明了这一点。

2.3 菌株稳定性测试

对诱变后选育出的菌株传代, 考察其产酸稳定性, 试验结果表明, 菌株的产酸性能稳定。同时各代斜面培养及摇瓶发酵, 菌落及菌丝形态基本无改变。

2.4 发酵工艺的研究

2.4.1 种龄, 接种量对发酵的影响: 衣康酸的发酵可以直接接种斜面孢子, 也可以接经摇瓶种子培养所得的菌悬液, 后者较前者可缩短发酵时间, 更有利于发酵的进行。通过单因素实验确定了最佳种龄和接种量。种子培养基基本与发酵培养基相同, 只是初糖浓度略低, 降为 5%。

从摇瓶发酵的产酸结果看出: 最佳种龄为 48h, 最佳接种量为 10%。

2.4.2 发酵培养基组成的优化: 对影响发酵的主要因素: 发酵初始 pH, 玉米浆浓度和糖浓度通过正交试验进行优化。

由表 2 的 R 值大小, 可以确定正交试验各因子对衣康酸产酸率的影响先后顺序为: 还原糖浓度 > 玉米浆浓度 > pH, 从正交试验结果分析得知, 发酵培养基的最佳组成为: 玉米浆 (以干物质计): 0.22%, 还原糖: 10%, pH 3.0。

初始糖浓度对发酵的影响很大, 糖浓度过高, 将抑制菌体的生长, 不利于发酵产酸, 糖浓度过低, 将使菌体进入产酸期后, 碳源供应不足, 降低产酸率和设备利用率。

玉米浆在发酵中作为辅助氮源, 葡萄糖为主碳源的发酵液中, 可以在大大促进菌体生长和缩短发酵时间。但加量不能过大, 亦不能作为主氮源, 以防止长菌不产酸。

衣康酸发酵是典型的低酸发酵, 即发酵在较低的 pH 条件下进行。pH 对最终衣康酸的产量起着重要作用,

pH 除了影响菌体生长和产酸外, 对土曲霉菌丝成球性影响较大, 当 pH 在 2 以下时, 土曲霉几乎不生长和产酸, 当 pH 在 4.5 以上时, 菌丝将形成较大的菌丝球, 有时直径可达 5~6mm, 严重影响物质传递, 产酸量大幅度下降或不产酸; 当 pH 3.0 时, 利于菌体生长, 形成的菌丝球小, 直径为 1mm 左右, 利于产酸。

2.4.3 补糖发酵实验: 衣康酸发酵是典型的有机酸发酵类型, 分菌丝增殖期和产酸期。根据衣康酸发酵过程中底物消耗速率和代谢产物合成的关系, 找出补料发酵的规律。在 48h, 菌体完成生长期, 进入产酸期, 此时补入的糖使发酵液中糖浓度较长时间保持一定范围, 用于菌体产酸, 达到延长产酸期, 提高产酸率的目的 (表 3)。

从实验结果可以看出, 补糖有利于衣康酸产率的提高, 并且进入产酸期后, 早补比晚补好, 补晚了, 菌体对加入的糖不能很好利用, 致使残糖过高, 不利于提取。

表 2 正交试验结果

试验号	pH	玉米浆浓度 (%)	还原糖浓度 (%)	衣康酸产率 (g/L)
1	3.0	0.16	5.0	20.2
2	3.0	0.22	7.0	32.8
3	3.0	0.28	10.0	35.2
4	3.5	0.16	7.0	30.2
5	3.5	0.22	10.0	38.5
6	3.5	0.28	5.0	17.6
7	4.0	0.16	10.0	33.5
8	4.0	0.22	5.0	18.5
9	4.0	0.28	7.0	31.2
k ₁	29.4	28.0	18.8	
k ₂	28.8	29.9	31.4	
k ₃	27.7	28.0	35.7	
R	1.70	1.90	16.9	

表3 补糖发酵实验结果

初糖浓度 (%)	补糖时间 (h) 和 补糖量 (%)			提高产酸率 (%)
	48	60	84	
8	1			29.92
8	2			22.43
8	1	1		39.92
8	2	2		32.32
8	1	1	1	37.32
8	2	2	2	27.30
8		1		9.89
8		2		17.49
8			1	19.78
8			2	2.28

注：对照为初糖10%，不补糖发酵

补糖方式以多次少量为宜。这与其他类型产品的补糖发酵规律一致，采用补料分批发酵近年来在工业生产上较为普遍，衣康酸补糖发酵目前尚处于实验室研究阶段。

本实验补糖发酵提高衣康酸产率幅度较大，最高为39.92%，产酸率为53.9g/L (NaOH 滴定法)，杂酸率：4%，衣康酸产率为51.7g/L (碘法)，糖酸转化率为：54.42%。

参考文献

- [1] 金其荣, 张继民, 徐勤, 等. 有机酸发酵工艺学, 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 550~551.
- [2] 柴红梅, 赵永昌, 宋今荣, 等. 生物技术, 1992, 9(6): 27~32.
- [3] 金其荣, 徐虹, 张力. 微生物学报, 1986, 26(1): 76~82.
- [4] 贾士儒, 王明霞, 陈贵斌. 食品与发酵工业, 1998, 25(2): 39~42.
- [5] 蔡谨, 周玮华, 姚恕. 应用激光, 1996, 16(5): 231~233.
- [6] 杨玉华, 何伯安, 李慧林, 等. 河南科学, 1994, 12(1): 75~78.
- [7] Kazotoyo Y, Tetsushi T. J of Fermentation & Bioengineering, 1995, 79(5): 506~507.
- [8] 王博彦, 金其荣主编. 发酵有机酸生产与应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 474~475.