

# 曲酸菌选育及发酵工艺研究

孙 微 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

**摘要** 筛选获得产曲酸菌株米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) MSA 进行 UV 与  $^{60}\text{Co}$  诱变, 并进行了发酵工艺条件研究, 以葡萄糖为碳源、豆饼粉为氮源, 在 pH3.0、33℃ 摇瓶培养, 可达到 5d 产酸 5% 以上水平。发酵液采用直接浓缩结晶工艺, 脱色与重结晶后获得无色针状晶体, 红外图谱检测确证为曲酸。

**关键词** 曲酸, 米曲霉,  $^{60}\text{Co}$  诱变

曲酸 (kojic acid) 是微生物好氧发酵产生的一种具有抗菌作用的有机酸。化学名称 5-羟基-2-羟甲基- $\gamma$ -吡喃酮。近年来国外将曲酸及衍生物用于美白化妆品, 食品护色、果蔬保鲜及鲜切花保鲜延长货架期等方面<sup>[1~3]</sup>, 曲酸产品日益

受到重视, 曲酸应用的市场日益扩大。许多日本学者对曲酸的生物合成进行了研究<sup>[4~6]</sup>, 80

---

江苏省应用基础项目

1996-10-30收稿

年代北京钱存荣等曾对 *Asp. flavus* 进行 UV 诱变, 达到 7d 产酸 4%<sup>[7]</sup>, 最近报道郑铁霞等用黄曲霉 8004 将发酵周期缩短至 5d<sup>[8]</sup>。我们选用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) MSA 为出发菌株, 进行 <sup>60</sup>Co 诱变与紫外诱变, 并进行发酵工艺研究; 使摇瓶 5d 产曲酸水平超过 5%, 经检测不含黄曲霉素。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

无锡市调味食品总厂用及本实验室保藏菌种米曲霉、黑曲霉、构巢曲霉等共 12 株。

### 1.2 培养基

斜面培养基: 察氏琼脂培养基; 土豆汁琼脂培养基。筛选平板培养基: 土豆汁琼脂培养基 + 0.5% FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O。孢子培养基: 麸皮与水之比为 1:1。摇瓶与发酵培养基: 葡萄糖 10%, 豆饼粉 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, pH3.0, 蒸馏水配制。

### 1.3 测定方法

曲酸测定: 参考石家骏治方法<sup>[4]</sup>, 将显色剂中硫酸改为盐酸, 取 1ml 样品稀释液加 4ml 蒸馏水与 1ml 1% FeCl<sub>3</sub> · HCl 显色剂, 于 500nm 处测吸光 OD 值, 以蒸馏水代替样品作为空白, 用标准品作工作曲线查得曲酸含量。

残糖测定: 费林滴定法测还原糖<sup>[9]</sup>。

### 1.4 诱变条件及方法

孢子悬浮液制备: 土豆琼脂斜面上培养 5d 孢子, 无菌水洗下, 经玻璃珠打散, 无菌擦镜纸过滤, 制成含孢子  $1 \times 10^6$  个 / ml 悬浮液。

紫外诱变: 5ml 悬浮液置于直径 9cm 平皿中, 磁力搅拌, 15W 紫外灯 30cm 照射。分别于 5, 10, 20, 30, 40min 作致死率, 选用 90% 致死率进行诱变, 吸 0.1ml 涂布筛选平板。

<sup>60</sup>Co 诱变: 于本校辐化实验室分别以 6 万、8 万伦琴对试管中  $1 \times 10^6$  / ml 孢子悬浮液进行 <sup>60</sup>Co 照射, 吸取 0.1ml 涂布平板。

### 1.5 曲酸标准样品

分析纯, 瑞士 Riedl-de HaOn 公司。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种选育与诱变

对起始菌种进行摇瓶初筛和黄曲霉素检测, 获得两株产酸较高出发菌株米曲霉 M336 与 M334, 经纯化分离后得产酸稳定菌株 MSA。对 MSA 进行 UV 诱变与 <sup>60</sup>Co 诱变, 涂布平板培养 4d 后, 挑选使培养基变红的菌落共 50 余个进行摇瓶筛选, 结果如下:



不同菌株在如方法所述发酵培养基中 33℃ 培养 5d (图 1)。其中 C11h 产酸达 5.35%, AC6

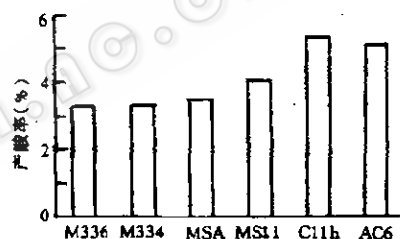


图 1 不同菌株相对产酸率

也达 5.1% 以上, 在重复实验中, 发现它们在某些批次 4d 即可达 5%, 5d 超过 6%。由以上结果可看出 <sup>60</sup>Co 诱变比紫外诱变效果更显著, <sup>60</sup>Co 诱变后的菌株的菌落形态变化极大, 许多产酸株菌丝体变异为白色。可见 <sup>60</sup>Co 诱变的方法是菌种选育极为有用的方法。

### 2.2 发酵工艺

用复筛分离所得菌株 MSA 进行发酵工艺条件试验。

2.2.1 氮源对产酸的影响: 根据文献, 分别选用 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.05%, 蛋白胨 1.4%, 豆饼粉 1% (60 目筛) 为氮源, 培养基其他成分相同, pH3.5, 直接接入斜面孢子, 于 30℃、旋转式摇床 200r / min 进行摇瓶培养。结果 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 或蛋白胨为氮源的培养基产酸 OD<sub>500</sub> 为 0.13, 而豆饼粉为氮源的培养基产酸 OD<sub>500</sub> 为 0.24, 比前二者高出约一倍。

表现为以  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  与蛋白胨等非固性物为氮源的培养基所得菌体少而菌丝结球颗粒大, 产酸低; 以豆饼粉为氮源的菌体量多而菌丝结球小, 产酸高。

以不同豆饼粉量进行摇瓶发酵, 培养 7d, 结果如图 2, 0.5% 的豆饼粉最有利于产酸, 豆饼粉量不足使菌体生长量不足, 而豆饼粉量过高使菌体生长旺盛, 都不利于产酸。

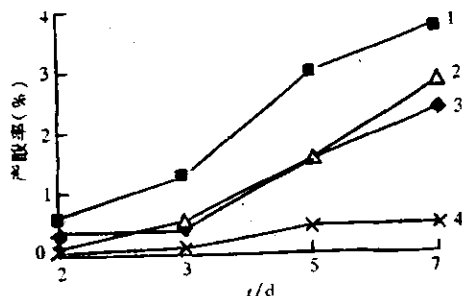


图2 不同豆饼粉浓度对产酸影响

1. 豆饼粉量为 0.20%; 2. 豆饼粉量为 0.50%;

3. 豆饼粉量为 1%; 4. 豆饼粉量为 2%

**2.2.2 pH 对产酸的影响:** 以 0.5% 豆饼粉为氮源, 调节不同 pH, 条件如上培养 5d, 结果如表 1 表明, 在 pH2.5~3.0 时, 有利于产酸, 分析原因估计为低 pH 时有利于豆饼分解利用, 并抑制副反应。

表 1 不同 pH 值产酸比较

pH	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
产酸	2.94	2.95	2.37	1.95	2.40	2.67

**2.2.3 温度对产酸的影响:** 对不同温度产酸的数据进行分析, 温度在 33℃ 左右产酸较高, 而高于或低于 33℃ 都呈下降趋势。实验中发现当气温过高时由于温度难以控制, 使数据不稳定, 而且温度与 pH 等因素可能也有关联, 表明温度是个重要影响因素。

**2.2.4 装液量的影响:** 在 250ml 三角瓶中, 分别装发酵培养基液 20~70ml, 摇瓶培养 5d, 结果表明当装液量为 40ml 时产酸最高, 产酸达 4%, 而 30ml 与 50ml 只有 3.2% 与 3.1%。说明装液量太大致使溶氧不足, 而装液过小使菌体产量

小也不利于产酸。

**2.2.5 种龄与接种量的影响:** 分别以培养 1d 与 2d 的发酵液作种子, 液体接种于 250ml 三角瓶的培养基中, 接种量 10%~40%, 装液 50ml, 33℃ 培养 4d。结果接种量超过 10% 对产酸并无多大影响, 而 2d 种龄接种明显提高产酸: 1d 种子 4d 产酸为 2.9%, 2d 种子 4d 产酸为 4.3%。

**2.2.6 发酵时间曲线:** 在 2L 玻璃发酵罐中, 采用发酵培养基, 接入麸皮孢子, 通气 50~100l/h, 搅拌 300~500r/min, 30℃ 培养, 取样测定, 如图 3。

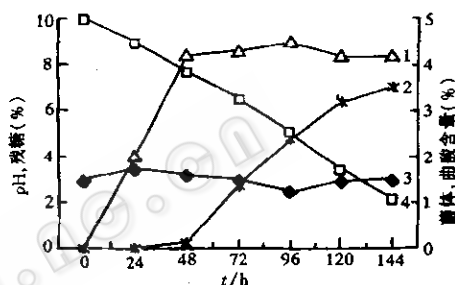


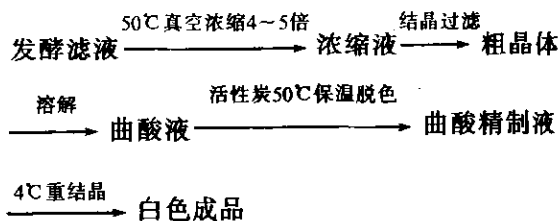
图3 发酵时间曲线

1. 菌体量; 2. 曲酸含量; 3. pH 值; 4. 残糖

诱变株 AC6、C11h 与出发株 MSA 比较, 在 33℃ 按发酵培养基配方, pH2.5~3.0 摇瓶培养 5d, 产酸最高可达到 5.1% 与 5.35%, MSA 平均产酸为 3.5%。

## 2.3 提取方法

参考北田与富金的直接浓缩结晶法<sup>[6]</sup>, 流程如下:



将提取所得白色晶体于本校测试中心进行红外图谱检测, 确定所得晶体与标准样品完全一致(红外图谱略)。

本课题所用全部菌种的发酵液经无锡市卫

生防疫站与江苏省微生物研究所酶联免疫法检测, 均不含黄曲霉毒素。

### 参 考 文 献

- [1] 杨跃飞. 日用化学工业. 1995, 1: 28~32.
- [2] 特开昭: 平 1-132502; 特开昭: 平 2-4001; 特开昭: 昭 62-224267; 特开昭: 昭 61-38466.
- [3] US.P: 4, 443, 483.
- [4] 石家骏治. 日本农艺化学会志. 1966, 40(10): 359~

363.

- [5] 川手昭平. 发酵协会志. 1975, 33(10, 11): 345~352.
- [6] 北田牧夫, 富金原孝. 发酵工学会志. 1971, 49(4): 13~28.
- [7] 钱存柔, 罗大珍, 孙淑丽. 微生物学报, 1981, 21(1): 102~106.
- [8] 郑铁震, 涂提坤, 黄登禹等. 天津微生物. 1995, 3: 1~5.
- [9] 天津轻工学院等. 《工业发酵分析》. 北京: 轻工业出版社, 1994. 6~14.

## STUDIES ON THE BREEDING AND FERMENTATION CONDITIONS OF KOJIC ACID PRODUCING STRAIN

Sun Wei Tao Wenyi

(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** *Asp.oryzae* MSA was screened from 12 strains. Two mutants Ch11h and AC6 with higher ability of production of kojic acid were obtained by UV and  $^{60}\text{Co}$  ray. Fermentation technology was studied, the result showed that the two stains can produce kojic acid over 5% after five days. Fermentation broth was concentrated directly, decolorized and recrystized, and the product of prismatic needles were obtained.

**Key word** Kojic acid, *Asp.oryzae* Mutantion