



以淀粉为碳源衣康酸高产菌株的筛选

魏凌云^{1,2*} 梁海秋² 周河治² 张佑红¹ 丁一刚¹

(1. 武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室 湖北 武汉 430073)

(2. 广西大学生命科学与技术学院 广西 南宁 530004)

摘要: 对土曲霉出发菌株进行紫外线诱变、LiCl 诱变以及代谢终产物抗性菌株选育。代谢终产物抗性菌株选育是一种有效的遗传育种方法,能显著提高产酸量。得到一株代号为 At394 的菌株,以玉米淀粉部分水解糖为碳源,产酸量为 53.9 g/L,比出发菌株提高了 42.6%。糖酸转化率为 61.5%,为所有筛选菌株最高。用红外光谱进行结构分析证实所得产物为衣康酸。

关键词: 衣康酸, 土曲霉, 玉米淀粉, 筛选

Screening of High Itaconic Acid Yielding Strain Using Corn Starch

WEI Ling-Yun^{1,2*} LIANG Hai-Qiu² ZHOU He-Zhi² ZHANG You-Hong¹ DING Yi-Gang¹

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan, Hubei 430073, China)

(2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract: This paper described the screening of itaconic acid strain of *Aspergillus terreus* with UV-irradiation, LiCl treatment and breeding resistant strain to metabolic end product. Breeding resistant strain was an effective measure to help raise yields steadily. A strain, designated At394, producing itaconic acid with a high yield was successfully obtained. The itaconic acid concentration produced by At394 was 53.9 g/L using starch hydrolysate in shaking flasks, which was 42.6% higher than that of the parental strain. The conversion rate was 61.5%, which was the highest value found in tests. The structure determination by infrared spectrum showed the production obtained was itaconic acid.

Keywords: Itaconic acid, *Aspergillus terreus*, Corn starch, Screening

衣康酸(Itaconic acid)又称为甲叉丁二酸或亚甲基琥珀酸,化学结构式见图 1。最早是由 Baup 于 1837 年在研究柠檬酸 175°C 的热分解产物时发现并得到的^[1]。通过化学合成的方法可以制得衣康酸,但受生产成本的制约,该方法真正工业化的不多。工业发酵是制取衣康酸的主要方法^[2-3]。该方法工艺简

单、成本较低。主要是采用廉价的淀粉、蔗糖、糖蜜、木屑、稻草等农副产品为原料,选用适当的菌种,经生物发酵生产^[4-5]。采用该法所得产品的收率及其分离、纯化等都与菌种性质密切相关,因此优良菌种的选育是制备衣康酸的技术关键。当今国内外几乎所有用深层发酵生产衣康酸的工厂均采用土

基金项目: 湖北省教育厅科研项目(No. B20081509)

* 通讯作者: Tel: 86-27-65014300; E-mail: weilingyun@mail.wit.edu.cn

收稿日期: 2009-07-02; 接受日期: 2009-11-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

曲霉作为菌种。为了达到生产的要求, 还需定期对菌种进行筛选。日本科学家 Yahiro 用衣康酸梯度平板法筛选出一株代号为 TN-484 的菌株, 产酸量是出发菌株的 1.3 倍^[6]。菌种筛选可以采用诱变育种和定向选育的方法。本研究通过紫外线诱变、LiCl 诱变、代谢终产物选育等过程来提高以玉米淀粉部分水解糖为碳源土曲霉菌株的产酸量。

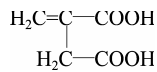


图 1 衣康酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of itaconic acid

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

琼脂、蔗糖、玉米淀粉、淀粉液化酶为生化试剂; 其他试剂均为分析纯。

HYG-2 型回转式恒温调速摇床柜, 上海新星自动化控制设备厂; PYX-DH-40 50 隔水式电热恒温培育箱, 上海跃进医疗器械厂; 电热恒温水浴锅, 上海器械厂; YXQGO2 型电热式蒸汽消毒器, 山东新华医疗器械厂; W-CJ-IF 超净工作台, 苏净集团安泰公司; UV-1601 紫外分光光度计, SHIMADZU 公司; BS223S 电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司; Delta320 pH 计, Mettler Toledo 公司; JEM-1200EX 型电镜, 日本日立公司; Avatar 370 付里叶红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 蔗糖 70, MgSO₄·7H₂O 2.5, (NH₄)₂SO₄ 4, 玉米浆 1.6, 琼脂 20, pH 4.5。指示剂平板培养基(g/L): 玉米淀粉部分水解糖(DE 值为 35%) 70, MgSO₄·7H₂O 2.5, (NH₄)₂SO₄ 4, 玉米浆 1.6, 琼脂 20, 0.2% 的溴甲酚绿溶液 50, pH 4.5。摇瓶发酵培养基(g/L): 玉米淀粉部分水解糖(DE 值为 35%) 100, NH₄NO₃ 3, MgSO₄·7H₂O 4, 玉米浆 2, KH₂PO₄ 0.2, pH 3.0。

1.3 出发菌株的选择

从广西大学食品与发酵工程研究所保存有的土曲霉(*Aspergillus terreus*)中选择一株产孢子多的菌株作为出发菌株。以玉米淀粉部分水解糖为碳源摇瓶平均产酸量为 37.8 g/L。

1.4 诱变处理

1.4.1 孢子悬浮液的制备: 培养 4 d 的斜面, 用 9 mL 无菌水洗下孢子, 通过振荡玻璃珠使结成团的孢子分散, 然后用脱脂棉过滤得孢子悬浮液。

1.4.2 紫外线诱变: 在直径 9 cm 的培养皿中加 5 mL 孢子悬浮液, 在 35 cm 距离下用 40 W 紫外灯照射 15 min, 在黑暗条件下静置 24 h 后取出稀释涂布指示剂平板。

1.4.3 LiCl 诱变: 用无菌水制备单孢子悬浮液, 稀释孢子悬浮液涂 LiCl 平板(指示剂平板培养基另外加浓度为 1% 的 LiCl)。

1.5 菌株的定向选育

代谢终产物抗性菌株的选育: 在发酵培养基中加入 2% 的衣康酸。再用孢子悬浮液接种, 在摇床上振荡培养 2 d, 稀释涂布指示剂平板。

1.6 菌株的平板筛选

将稀释后的孢子悬浮液 0.2 mL 涂布于指示剂平板培养基, 倒置在 30°C 的培养箱中, 培养 4 d, 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。

1.7 菌株的摇瓶筛选

将平板筛选所得的菌株接种到 250 mL 摇瓶发酵培养基中培养。装液量为 50 mL、温度为 35°C、摇瓶转速为 200 r/min。4 d 后测定产酸量。筛选出产量高的菌株。

选取产酸量高的突变株进行传代稳定性试验, 连续传代 5 次后, 摇瓶培养测定产酸量, 同时对平板上的菌落和菌丝形态进行观察。

1.8 菌体的电镜观察

从紫外线诱变时所涂的指示剂平板和 LiCl 平板上取菌体进行扫描电镜观察, 对比两者之间的形态差别。

1.9 定量分析方法

1.9.1 衣康酸产量的测定: 取 1 mL 样品加 15–20 mL 蒸馏水, 以酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定, 粉红色为终点, 每消耗 1 mL NaOH 溶液相当于衣康酸 6.5 g^[7]。

1.9.2 残糖的测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定^[8]。

1.9.3 糖酸转化率的计算:

$$\text{糖酸转化率} = \frac{\text{产酸量}}{\text{初糖浓度} - \text{残糖浓度}} \times 100\%$$

1.10 衣康酸的红外吸收光谱分析

将发酵液离心、活性炭脱色、过滤,滤液上阴阳离子交换柱,再经浓缩、干燥得白色粉末。称取 2 mg 粉末放在玛瑙研钵中,加入 200 mg 溴化钾研磨,使其粒度在 2.5 μm 以下,在压片专用模具上加压成片。随即用傅里叶红外光谱仪 Avatar 370 在 4000–400 cm^{-1} 区间内扫描测定。用同样方法扫描衣康酸标准品。

2 结果与讨论

2.1 诱变剂的诱变效果分析

从表 1 可以看出,紫外线诱变能够产生很高的致死率,但正变率低,产酸量提高相对较少。LiCl 诱变致死率较低,但正变率高,产酸量提高相对较多。平板中的 LiCl 对土曲霉菌株的作用时间是 4 d,而紫外线对土曲霉孢子的作用时间是 15 min。对 LiCl 产生抗性的菌株生存能力更强,其产酸水平也相应提高。

2.2 诱变对土曲霉菌体产生的影响

平板照片见图 2。肉眼观察显示:紫外线诱变后的土曲霉产生较多的孢子、菌落较大。推测紫外线杀死了大部分孢子,但存活的孢子在平板上能正常生长。LiCl 平板上的土曲霉菌落较小、白色菌丝明显。平板中的 LiCl 抑制了土曲霉的生长。

表 1 不同诱变剂的诱变效果
Table 1 Effect of different mutagenic agents

诱变剂 Mutagenic agent	剂量 Dose	致死率 Lethality rate (%)	正变率 Variability of positive variation (%)	产酸量 Production rate (g/L)
紫外线 UV	15 min	98.3	13.3	41.9
LiCl	1%	47.6	38.9	45.6

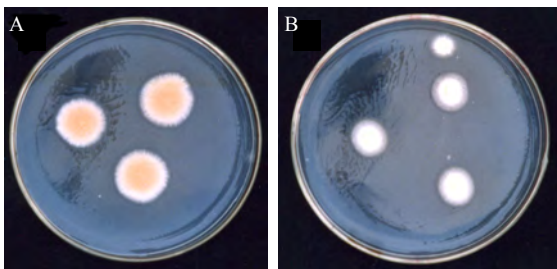


图 2 平板上的菌落形态

Fig. 2 Colony shape on plate

注: A: 紫外线诱变后的土曲霉菌落; B: LiCl 平板上的土曲霉菌落。

Note: A: *Asp. terreus* with UV-irradiation; B: *Asp. terreus* with LiCl treatment.

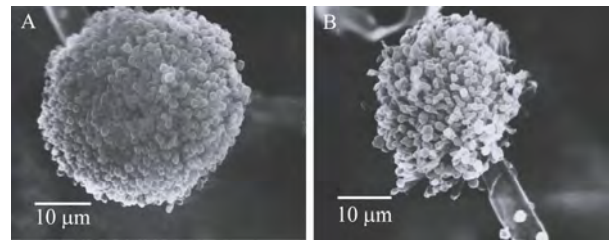


图 3 土曲霉孢子的电镜照片

Fig. 3 Scanning electron micrographs of *Asp. terreus* spore
注: A: 紫外线诱变后的土曲霉分生孢子; B: LiCl 平板上的土曲霉分生孢子。

Note: A: *Asp. terreus* conidiospore after UV-irradiation; B: *Asp. terreus* conidiospore after LiCl treatment.

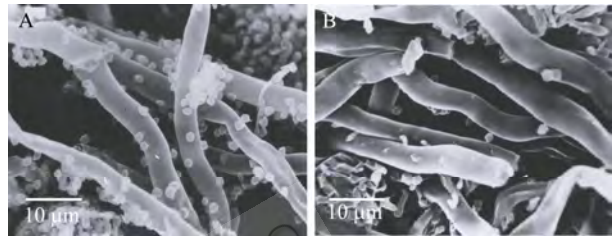


图 4 土曲霉菌丝体的电镜照片

Fig. 4 Scanning electron micrographs of *Asp. terreus* hypha

注: A: 紫外线诱变后的土曲霉菌丝体; B: LiCl 平板上的土曲霉菌丝体。

Note: A: *Asp. terreus* hypha after UV-irradiation; B: *Asp. terreus* hypha after LiCl treatment.

电镜照片见图 3 和图 4。放大倍数为 2000 倍。电镜观察显示:普通平板上的土曲霉分生孢子头较大、孢子密而多、菌丝体细小。LiCl 平板上的土曲霉分生孢子头小、孢子稀疏、菌丝体粗壮。

肉眼观察与电镜观察结果都表明 LiCl 平板上的土曲霉虽然产孢子比普通平板上的土曲霉少许多,但菌丝体比普通平板上的土曲霉粗壮。由 LiCl 抗性 与菌种产酸有着正相关性推测土曲霉菌丝体的粗壮程度与衣康酸的代谢旺盛程度存在着某种正相关。而产孢子的多少则决定着土曲霉的生长繁殖快慢。上述结论在生产实践中得到了验证,减少了筛选的工作量。

2.3 定向选育的效果分析

参考诱变筛选的结果,在指示剂平板培养基上挑取变色圈直径大、颜色浅、菌丝粗壮、产孢子多的菌落进行摇瓶发酵试验。表 2 为定向选育出的 5 个菌株的摇瓶发酵结果。可以看出,菌株的产酸量已得到较大的提高。含衣康酸的发酵培养基可以减少不耐自身代谢产物的菌株,所得的菌株为乌头酸酶活强、耐自身代谢产物衣康酸的抗反馈抑制的突

变株^[9]。其中 At226 菌株产酸量最高; At394 菌株产酸量较高, 但糖酸转化率最高。定向选育能显著提高土曲霉的产酸量。

表 2 定向选育的摇瓶发酵结果

Table 2 Results of fermentation in shaking flasks by directed screening

菌株 Strain	产酸量 Production rate (g/L)	糖酸转化率 Conversion rate (%)
At103	47.2	54.7
At226	54.6	59.4
At258	48.3	55.8
At379	52.8	59.6
At394	53.9	61.5

2.4 菌株的遗传稳定性

对 At226 和 At394 菌株进行传代试验。表 3 显示了传代对菌株产酸量的影响。对 At226 菌株, 从第 4 代开始, 产酸量有加速下降的趋势, 而 At394 菌株的产酸量相对稳定。同时进行平板培养观察, At226 菌株孢子色素增加、菌丝变短, 表明正在退化。At394 菌株相对于其它菌株, 产酸量高且稳定, 糖酸转化率最高, 是一株很有价值的菌株。

表 3 传代对菌株产酸量的影响

Table 3 Effect of transfer of culture on itaconic acid production

菌株 Strain	产酸量 Production rate (g/L)				
	第 1 代 Generation 1	第 2 代 Generation 2	第 3 代 Generation 3	第 4 代 Generation 4	第 5 代 Generation 5
At226	54.6	54.2	54.5	53.7	52.8
At394	53.9	53.6	53.6	53.4	53.5

2.5 衣康酸的红外吸收光谱结果分析

衣康酸标准品的红外光谱图见图 5。发酵液提取的衣康酸样品红外光谱图见图 6。2930 cm^{-1} 有宽峰说明该化合物是羧酸, 这是由羧基上羟基的伸缩振动($\nu_{\text{O-H}}$)产生的。1702 cm^{-1} 处的强峰($\nu_{\text{C=O}}$)说明该羧酸为共轭羧酸(α, β 不饱和羧酸)。1215 cm^{-1} 处的峰是羧基上 C-O 的伸缩振动($\nu_{\text{C-O}}$)。1635 cm^{-1} 处是 C=C 双键的伸缩振动($\nu_{\text{C=C}}$), 986 cm^{-1} 和 910 cm^{-1} ($\delta_{\text{C-H}}$ 面外)出现谱带, 可以进一步断定该化合物为带有双键的共轭羧酸。

衣康酸样品的红外光谱图中含有一些小杂峰, 是由于粉末容易受潮, 受潮后水的干扰产生杂峰。

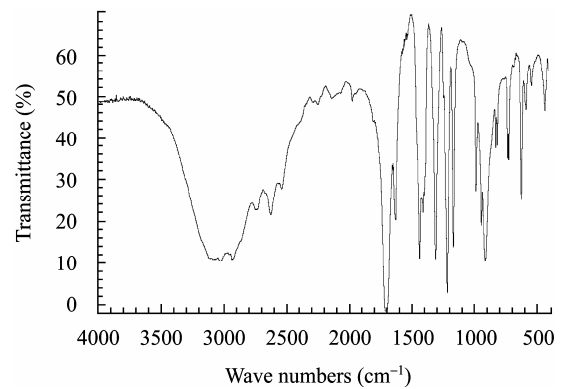


图 5 衣康酸标准品的红外光谱图

Fig. 5 Standard sample infrared spectrum of itaconic acid

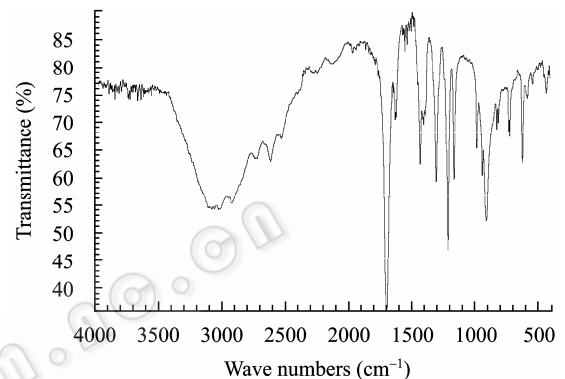


图 6 衣康酸样品的红外光谱图

Fig. 6 Sample infrared spectrum of itaconic acid

比较两张图谱, 证明发酵液提取所得的样品就是衣康酸。

3 结论

本研究对土曲霉出发菌株进行紫外线诱变、LiCl 诱变以及代谢终产物抗性菌株选育。代谢终产物抗性菌株选育是一种有效的遗传育种方法, 能显著提高产酸量。最后得到一株代号为 At394 的菌株, 以玉米淀粉部分水解糖为碳源产酸量为 53.9 g/L, 比出发菌株提高了 42.6%。糖酸转化率为 61.5%, 为所有筛选菌株最高。用红外光谱进行结构分析证实所得产物为衣康酸。

通过对大量菌株的观察, 发现菌丝、菌落形态和产酸量有一定的关系。高产菌株的菌丝粗壮, 分支比较少, 菌丝白色, 菌落大, 孢子产色素少; 而低产菌株菌丝细小, 分支多, 菌丝淡黄色, 孢子产色素多。参考形态观察的结果, 可以明显减少菌种筛选的工作量。

参 考 文 献

- [1] Baup S. Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Ann Chim Phys*, 1837, **19**(1): 29–38.
- [2] Lockwood LB, Reeves MD. Some factors affecting the production of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Arch Biochem*, 1945(6): 455–469.
- [3] 刘建军, 姜鲁燕, 李丕武, 等. 发酵法生产衣康酸技术的研究——衣康酸生产菌株的选育(I). 食品与发酵工业, 2003, **29**(2): 17–21.
- [4] 芦国营, 张朝晖, 洪伟杰. 利用水解淀粉高产衣康酸菌株的诱变育种. 现代食品科技, 2005, **21**(2): 37–39.
- [5] 刘建军, 姜鲁燕, 李丕武, 等. 发酵法生产衣康酸技术的研究——衣康酸发酵工艺条件的研究(II). 食品与发酵工业, 2003, **29**(4): 27–32.
- [6] Yahiro K, Takahama T, Park YS, et al. Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield. *J Ferment Bioeng*, 1995, **79**(5): 506–508.
- [7] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 500–501.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 10–11.
- [9] 章健, 杨云华. 定向选育衣康酸高产菌株的研究. 工业微生物, 2000, **30**(3): 1–3.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!