

曲酸发酵的研究

I. 紫外线照射对黄曲霉产生曲酸的影响*

钱存柔 罗大珍

孙淑丽

(北京大学生物系微生物学教研组, 北京) (北京市日用化学一厂, 北京)

用曲酸生产菌株黄曲霉 *Aspergillus flavus* Link AS 3.2789 为出发菌株进行紫外线诱变, 从 73 个突变株中选出 UI 1202, 产曲酸达 34.7 毫克/毫升, 比原始菌株提高 50.8%。再以 UI 1202 进行第二次紫外线照射, 从 183 个突变株中选出 UII 1223, 产曲酸达 46.5 毫克/毫升, 比原始菌株提高 78.8%。说明以紫外线为诱变剂, 可以提高曲酸产量, 并有积累诱变效果。

将 UII 1223 在 5000 升发酵罐进行工业水平生产[实际装量 4000 升, 搅拌速度 160 转/分, 通风量每分钟 1:0.5 (体积: 体积), 温度 31°—33℃, 发酵 120 小时左右], 说明经二次紫外线诱变后的突变株性能比原始菌株有不少优越性, 不仅提高了曲酸产量, 而且性能稳定, 不产毒素, 降低了原料消耗, 节约生产时间, 已在生产中正式使用。

曲酸 (kojic acid) 是制增香剂麦芽酚和乙基麦芽酚的原料, 并可用作杀虫剂、杀菌剂及胶片脱尘剂等。国外一般用黄曲霉或米曲霉以葡萄糖或蔗糖进行表面培养或深层发酵生产。北京日用化学一厂于 1967 年以廉价的白薯粉为原料, 用黄曲霉进行发酵生产。由于生产菌株黄曲霉 *Aspergillus flavus* Link AS 3.2789 有产酸能力差、生产性能不稳定、发酵醪液不易过滤等缺点, 有必要对菌种的性能加以改进。

关于曲霉属 (*Aspergillus*) 的人工诱变虽然有过一些报告^[1-5], 但未涉及曲酸生产性能。石家骏治虽然观察到紫外线对米曲霉诱变有提高产生曲酸的效果^[6], 但并未用于实际生产。我们将曲酸生产菌株黄曲霉 AS 3.2789 通过连续二次紫外线照射, 获得 UII 1223。以此突变株在 5000 升罐进行深层发酵, 情况良好, 产曲酸量超过了北田牧夫在 1500 升罐的发酵水平^[7], 可以正式在工业生产中正式使用。本文主要报道这方面

的研究结果。

材料和方法

(一) 菌种

黄曲霉 AS 3.2789 由中国科学院微生物研究所提供。

(二) 斜面培养

麦芽汁琼脂培养基, 30℃ 培养 7 天。

(三) 摇瓶培养

培养基用白薯粉 1 份与水 10 份混合, 加淀粉酶 0.05%, 在 85℃ 液化 20 分钟后, 再加下列比例的无机盐:

KH_2PO_4 0.01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%,

NH_4NO_3 0.015%, CuSO_4 0.0064%。用磷酸调节 pH 2.3—3.0, 1 公斤/厘米²灭菌, 在 500 毫升体积的锥形瓶内装 80 毫升, 接种后在 30℃, 振荡培养 7 天。

本文于 1979 年 9 月 25 日收到。

* 参加本工作的还有北京日用化学一厂陈振文及劳日华等同志。

本文部分内容曾在 1978 年全国微生物第二次育种会及 1979 年全国微生物学术讨论会小组交流。

(四) 曲酸测定

发酵滤液 1 毫升、水 4 毫升、1% $\text{FeCl}_3\text{-HCl}$ 溶液 1 毫升,振荡后在 72 型分光光度计上,500 毫微米比色。

(五) 黄曲霉毒素 B_1 的测定

委托北京市卫生防疫站卫生科检验。

(六) 曲酸结构分析

用红外光谱 KBr 压片法进行,由北京大学化学系代做。

(七) 发酵装置

用不锈钢制的发酵罐。体积 5000 升,实际装量 4000 升,搅拌速度 160 转/分,通风量每分钟 1:0.5 (体积:体积),种子种龄 17 小时,接种量 7%,培养温度 31°C — 33°C ,发酵时间 120 小时左右。

(八) 诱变条件

将麦芽汁琼脂培养基上培养 7 天的菌株用无菌水洗下,经玻璃珠打散,无菌脱脂棉过滤,制成含孢子 1×10^6 个/毫升的悬液,在直径为 9 厘米的培养皿内放 5 毫升,置磁力搅拌器上,边搅拌边照射。

紫外光线是用普通灭菌用的 30 W 紫外光灯管,光源距平皿 30 厘米,剂量第一次为 5、8、12、16 及 20 分钟五种,第二次为 8、10、12、14 及 16 分钟五种。

照射后的悬液,在红光下经不同程度稀释后,取悬液 0.1 毫升涂布于麦芽汁琼脂平皿上。 30°C 培养 4 天后,挑选菌落接到麦芽汁斜面培养基上, 30°C 培养 7 天,进行产酸发酵试验。

实 验 结 果

(一) 第一次诱变结果

以原株 AS 3.2789 为出发菌株,不同剂量照射后挑出 73 株,经初筛和复筛后,选出产酸在 28 毫克/毫升以上者共 18 株。结果如表 1。

从表 1 可以看出,照射剂量以 8—12 分的诱变效果较好,其中 UI 1202 产酸最高,比对照提高 50.8%。

(二) 第二次诱变结果

以第一次诱变后挑出产酸最高的

表 1 不同剂量紫外线照射对 AS 3.2789 产生曲酸的影响

照射时间 (分)	挑出株数 (株)	产曲酸在 28 毫克/ 毫升以上 者(株)	编 号	曲酸产量 (毫克/ 毫升)
3	4	0	—	—
5	16	2	UI 503 505	29.1 32.9
8	16	5	UI 802 803 809 811 816	34.2 33.3 32.5 28.4 27.2
12	17	8	UI 1202 1203 1205 1208 1212 1214 1216 1217	34.7 28.9 31.3 30.8 32.4 28.5 30.4 28.5
15	8	1	UI 1502	28.8
20	12	2	UI 2004 2006	28.5 29.1

对照 AS 3.2789 产曲酸 23 毫克/毫升

UI 1202 为出发菌株,再次用紫外线照射 8、10、12、14 及 16 分五个剂量,共挑出 183 株,在摇瓶进行初筛,其结果见表 2。

表 2 以 UI 1202 为出发菌株经紫外线照射诱变结果

照射时间(分)	初筛株数(株)	平均产曲酸 (毫克/毫升)
8	31	29.4
10	39	29.4
12	27	33.2
14	45	33.7
16	41	35.7

对照 AS 3.2789 产曲酸 26 毫克/毫升

对照 UI 1202 产曲酸 31.9 毫克/毫升

以上结果表明,UI 1202 经紫外线第二次照射后,在剂量为 12—16 分的范围内,

随剂量增高又提高了产酸能力。在初筛的 183 株中, 选出产曲酸在 40 毫克/毫升以上者 30 株进行复筛, 其结果见表 3。

表 3 UI 1202 经第二次紫外线诱变对产曲酸的影响

照射时间 (分)	挑出株数 (株)	曲酸在 40 毫克/毫 升以上者 (株)	编 号	曲酸产量 毫克/毫 升
8	31	7	UII 802	40.0
			804	41.8
			806	41.8
			807	40.0
			809	41.5
			812	44.5
			828	40.0
10	39	1	UII 1043	47.2
12	27	10	UII 1204	44.1
			1206	43.9
			1207	41.6
			1211	44.2
			1215	41.9
			1217	44.3
			1220	42.4
			1222	44.3
			1223	46.5
			1226	44.2
14	45	1	UII 1435	43.0
16	41	11	UII 1603	43.0
			1605	41.0
			1606	42.1
			1615	42.5
			1623	40.9
			1625	42.6
			1627	41.7
			1628	44.5
			1629	43.5
			1630	40.9
			1640	40.2

对照 UI 1202 产曲酸 31.9 毫克/毫升

对照 AS 3.2789 产曲酸 26.0 毫克/毫升

表 3 结果说明, 在复筛的 30 株菌中, UII 1043 产酸最高, 达 47.2 毫克/毫升, 比 UI 1202 提高了 47.9%, 比 AS 3.2789 提高

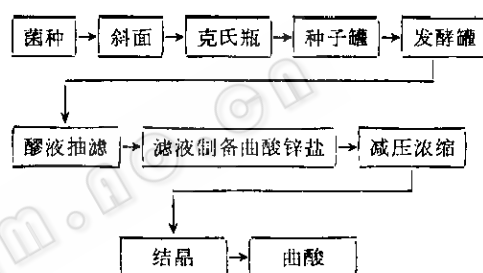
81.5%。UII 1223 其次, 产酸达 46.5 毫克/毫升, 比 UI 1202 提高 45.7%, 比 AS 3.2789 提高 78.8%。

(三) 菌种的稳定性

我们选取 UII 1043 及 UII 1223 进行反复比较(表 4), 并进行了菌种传代试验, 最后认为 UII 1223 确实是较好的突变菌株, 产酸高, 性能稳定, 可以在生产中进行试验。

(四) UII 1223 在 5000 升罐深层发酵结果

1. 生产工艺流程



2. 深层发酵结果: 在 5000 升发酵罐中装料 4000 升进行深层发酵, 结果说明诱变后的突变株性能较原始菌株优良, 提高了原料的利用率和产酸量(表 5)。

3. 曲酸结晶的制备及红外光谱分析结果: 在复筛基础上, 任意选了数株产量较高的突变株, 从发酵液中制得曲酸小样, 结果说明, 突变株从发酵液提取曲酸的收率也高于对照(表 6)。

将 UII 1223 发酵液中制得的曲酸与标准曲酸一同进行红外吸收光谱分析, 结果(见图 1)说明, UII 1223 制得的曲酸结晶, 其分子结构与标准曲酸基本一致。

4. 黄曲霉毒素的测定: 由于黄曲霉毒素对人体有剧毒, 因此产品是否含黄曲霉毒素是个关键问题。我们将诱变后产酸较高的菌株的发酵产物请北京市卫生防疫站卫生科代为检测, 产品均未发现有黄曲霉毒素。

表 4 UII 1043 及 UII 1223 传代的稳定性试验

菌株号	产酸量 传代 次数	曲 酸 产 量 (毫 克/毫 升)				
		第 二 代	第 三 代	第 四 代	第 五 代	第 六 代
UII 1043		47.2	41.0	40.7	37.6	—
UII 1223		46.5	42.4	43.8	41.4	42.0
AS 3.2789		29.0	24.4	26.0	23.1	27.8

表 5 UII 1223 在 5000 升罐中发酵结果

罐 次	初 总 糖 (克/100 毫升)	曲酸产量 (毫克/毫升)	转化率(%)	平均比对照提 高产量(%)	平均比对照提高 转化率(%)
1	6.99	35.8	51.2	32.9	16.0
2	7.45	37.8	50.7		
3	7.05	34.1	48.4		
对照 AS 3.2789	6.25	27.0	43.2		

表 6 由发酵滤液制取曲酸结晶

菌 株 号	发酵液中曲 酸 含 量 (毫克/毫升)	第一次结晶 (克/升)	第二次结晶 (克/升)	回收率(%)	结晶形状	熔点(℃)
UII 1223	40.9	23.0	6.0	70.9	柱状	152
UII 1226	37.6	20.6	6.3	71.5	柱状	152
AS 3.2789	28.2	11.3	2.9	50.3	柱状	151
曲酸试剂 (英 BDH 产)	—	—	—	—	粉末	152

表 7 黄曲霉毒素 B₁ 检测结果

被测菌株	UI 803	UI 1212	UII 1223	UII 1226	UII 812	UII 818
检测结果	—	—	—	—	—	—

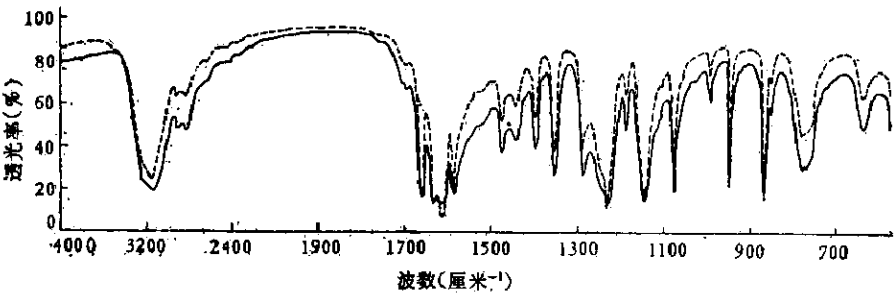


图 1 曲酸的红外吸收光谱 (KBr 压片)
—— 为标准曲酸; ——— 为 UII 1223 发酵液提取的曲酸

讨 论

黄曲霉 AS 3.2789 经紫外线照射,可以

提高曲酸产量。在第一次诱变基础上选择产酸高的菌株再一次照射,产酸能力比第一次又有提高,具有明显积累正变的结果。

UII 1223 在 5000 升不锈钢发酵罐进行深层发酵结果, 不仅曲酸产量比原始菌株高, 而且糖的转换率及从发酵液提曲酸的收率也均有所增高。不仅如此, 工人反映发酵液过滤的时间缩短(4000 升醪液过去 3 天滤完, 目前只要 1 天)、曲酸锌盐分解时间提高效率 1 倍(过去 40 公斤需 8 小时, 目前为 4 小时)。说明经二次紫外线诱变后的突变株具有产酸力高、性能稳定、不产毒素、降低原料消耗、节约生产时间等优点, 已经从 1979 年 1 月开始在生产中正式使用。

为了进一步发挥突变后菌株的潜力, 除提取工艺急待改进外, 对发酵最适条件还有必要进行探索, 其它育种手段亦待进行。

参 考 文 献

- [1] Hollaender, A. et al.: *Am. J. Bot.*, **32**: 160, 1945.
- [2] Lockwood, L. B. et al.: *Am. J. Bot.*, **32**: 214, 1945.
- [3] 井口信義: 日本农艺化学会誌, **23**: 16, 1949.
- [4] 堀井和男: 醸酵协会誌, **8**(3): 9, 1950.
- [5] 石谷千代子: 日本农艺化学会誌, **25**: 98, 1951.
- [6] 石家骏治: 同上, **40**(10): 359, 1966.
- [7] 北田牧夫: 醸酵工学会誌, **49**(4): 343, 1971.

STUDIES ON KOJIC ACID FERMENTATION

I. EFFECT OF ULTRAVIOLET IRRADIATION ON PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *ASPERGILLUS*

Qian Cunrou Luo Dazhen

(Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Beijing University, Beijing)

Sun Shuli

(The First Daily Chemical Plant of Beijing, Beijing)

Kojic acid is the raw material for preparing the important flavor enhancing agent, maltol. *Aspergillus flavus* Link AS 3.2789 was used as the producing strain but the yield is low and fluctuating. After irradiating it with ultraviolet light, we obtained 73 mutants, among which UI 1202 was found to increase the yield of kojic acid to 34.7g/l corresponding to an increase of 50.8% compared with that of the original strain. When UI 1202 was irradiated once more, 183 mutants were obtained and UII 1223 was used for the production of kojic acid.

An increasing of yield to 46.5 g/l was obtained (78.8% increasing of yield).

The properties of the mutant after irradiation two times were proved to be much better than those of the original strain by the results of submerged fermentation in a 5000 l tank (working volume 4000/l, agitation rate 160 rpm, aeration: 0.5 vvm and at 31—33°C for 120 hours). It did not only increase the yield of kojic acid and enhance the percentage of conversion of sugar but also decrease the time of filtration considerably.