

衣康酸产生菌的分离和选育

金其荣¹ 徐虹 张力

(无锡轻工业学院, 无锡)

本文叙述了从土壤分离衣康酸产生菌的过程和方法, 使用 Co^{60} 与 UV- 高温复合处理土曲霉野生菌株, 获得一些突变体 (No. 82-r₁₇, No. 25-13B, No. 25-23B and No. 25-24B), 用正交试验确定较佳培养基组成, 在 37℃ 下摇瓶培养 No. 82-r₁₇, 培养液积累衣康酸 3.5g/100 ml, 对供给糖转化率 35%, 从培养液回收衣康酸与标准衣康酸进行红外光谱测定, 比较两者吸收曲线, 确证它是衣康酸。

关键词 衣康酸; 分离; 选育; 衣康酸产生菌

衣康酸及其酯类是制造合成树脂、合成纤维、塑料、橡胶、离子交换剂、表面活性剂、锅炉除垢剂、润滑油添加剂等良好原料; 用它制成塑料质轻、易塑、绝缘、防水, 抗化学腐蚀, 以此塑料填充玻璃纤维, 即成高强度玻璃钢, 代替钢材来制造飞机、汽车、船舶外壳以及自行车架子等, 在工业上有重大意义。

衣康酸酯的聚合物有特殊光泽、透明、适合制造人造宝石和特种透镜以及防水性良好的抗化学剂的涂料等。

过去, 由柠檬酸经高热分解脱水制造衣康酸, 成本较高, 应用受到限制, 利用微生物发酵廉价的糖蜜、淀粉、木屑、稻草等农付产品生产衣康酸, 工艺简单, 成本较低, 有经济效益, 但在国内尚属空缺, 所以选育衣康酸高产菌株是生产的关键。

本文报道从土壤中分离、筛选、诱变衣康酸产生菌以及较佳培养基的选择结果。

材料与方 法

(一) 材料

1. 土样来源: 土样来自无锡县、杭州、南昌、安庆以及山东、辽宁、福建等地麦田、菜地、果园。

2. 培养基:

(1) 分离培养基(%): 衣康酸 4, $(NH_4)_2SO_4$ 2, 酵母膏 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 调节 pH 3—4。

(2) 斜面培养基: 4—5°Be 麦芽汁, 2% 琼脂。

(3) 摇瓶培养基: 水解糖 70g/L (以糖计), $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4%, 玉米浆 0.16%, pH 4.0—4.5。

(4) 诱变后初筛培养基: 培养基 (3) 添加 0.01% 溴甲酚绿与 1% $CaCO_3$ (预先干热灭菌), 2% 琼脂。

上述培养基中, 除 (3) 在 0.5kg/cm² 灭菌 20 分钟外, 其余均为 0.7kg/cm² 灭菌 20 分钟。

3. 原料淀粉水解糖液由无锡第三制药厂赠送。

(二) 分析与方法

1. 衣康酸简易定量法: 按常法以 0.1N NaOH 滴定换算为衣康酸。

2. 纸层析定性方法: 采用新华 3 号层析滤纸, 取发酵过滤液与 2% 标准衣康酸点样。展开剂: 正丁醇—甲酸—水 (6:1.5:8), 展开时间为 8 小时。显色剂: 甲基红—溴酚蓝溶液 (25mg 甲基红和 75mg 溴酚蓝溶于 100ml 95% 乙醇中,

本文于 1984 年 12 月 3 日收到。

承本院辐射实验室、紫外-红外光谱室的大力支持, 特此致谢。

再用 0.1N NaOH 调 pH 为 7.0)。在兰紫色背景上出现与标准衣康酸 Rf 值相同的黄色斑点(Rf 值为 0.84)。

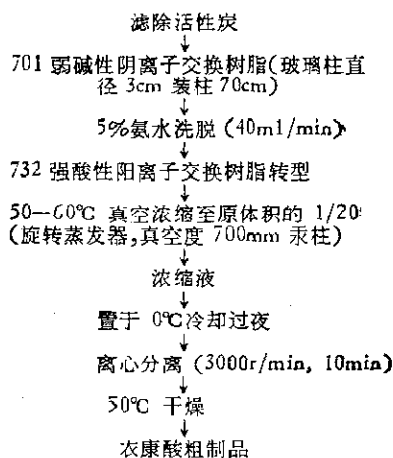
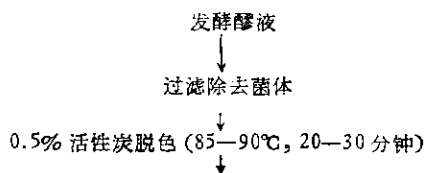
3. 从土壤中分离土曲霉: 依常法采用察氏培养基进行分离, 黑曲霉与青霉生长旺盛, 不利于土曲霉的分离^[1]。我们改用分离培养基, pH 调节至 3.0, 将各种土样稀释液混合于培养基中, 平皿内预先铺好三层定性滤纸, 于 35—40℃ 培养, 待平板上长出土褐色菌落, 挑选出来接种在培养基(2)上。

4. 初筛方法: 所分离的曲霉经 1—2 次纯化后, 采用培养基(3)于 37—40℃ 摇瓶(500ml 三角瓶装液 40ml)培养 3—4 天, 测定衣康酸含量, 对产酸高的发酵液进行纸层析定性分析。

5. UV 诱变-高温复合处理以及 Co^{60} 诱变: 纯菌种斜面试管注入无菌生理盐水 8ml, 刮下分生孢子, 倒入有玻璃珠小三角瓶内, 强烈振荡后经脱脂棉过滤, 获得分生孢子悬液, 置于 15 瓦 UV 灯下照射, 距离 30cm, 分别照射 3、4、5 分钟, 取孢子悬液各 0.5ml, 装于 4 支小试管中, 于恒温水浴中处理, 分别为 70℃15 分钟; 80℃10 分钟; 90℃5 分钟; 100℃1 分钟; 处理完毕, 立即取出冷却, 吸取 0.1ml 孢子悬液涂平板, 37—40℃ 培养, 挑生长快、产生变色圈大的单菌落, 进行初筛、复筛。而 Co^{60} 诱变处理则先按上述方法制备孢子悬液, 再用生理盐水稀释 100 倍进行 Co^{60} 照射, 照射剂量分别为 10 万、12 万伦琴, 同前法涂平板挑单菌落进行初筛和复筛。初筛时, 为了便于观察产酸情况, 培养基(3)中添加溴甲酚绿 0.01% 和 1% CaCO_3 (预先干热灭菌), 按变色圈大小来挑选单菌落。

6. 衣康酸的提取: 收集约 1100ml 发酵醪过滤液及洗水, 含衣康酸约 2%, 通过阴、阳离子交换树脂处理, 去除残糖和杂质, 提纯后的衣康酸溶液经真空浓缩、冷却结晶、干燥, 获得衣康酸成品。

具体步骤如下:



结果和讨论

(一) 产衣康酸菌株及其形态描述

从各地土样中共分离出 100 多株土曲霉, 极少数产衣康酸, 且产酸量甚少, 只有如下几株产酸略高(表 1)。

这些菌株摇瓶培养时菌丝球细小而均匀, 淀粉水解糖液经摇瓶培养后, 发酵液几乎无色素, 在纸层析图谱上未出现其它杂酸斑点。

以 No. 25 菌为例, 在麦芽汁琼脂培养基上, 菌落初期淡黄色, 生长迅速, 广泛扩展, 渐渐转变成土褐色, 单个菌落 4—5 日可布满直径 9cm 的培养皿; 菌落背面深黄色, 有明显的放射状沟纹(见图版 I-1)。在水解糖液琼脂培养基上生长缓慢, 分生孢子颜色略淡, 菌落背面淡黄或黄色, 无放射状沟纹(见图版 I-2-A, 2-B)。

(二) UV-高温复合处理结果

以 No.3、No.22、No.25 为出发菌株, 经 UV-高温复合处理后的突变率和衣康酸产酸率如表 2 和表 3。

在表 2 和表 3 中, No.22、No.25 为出发菌株, 其余均为 UV-高温复合处理后获得的菌株。(菌株编号: 上标为照射时间, 分别为 3、4、5 分钟; 下标分别为 70°、80°、90°、100℃ 下处理一定时间后所分离出的

表 1 产衣康酸菌株

Table 1 Itaconic acid producing strains

菌株编号 Number of strain	3	22	25	82	90	73	35
衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)	0.75	0.88	0.91	0.88	0.63	0.63	0.63

表 2 UV-高温复合处理3个菌株的突变率

Table 2 The mutation rate of three strains of *Asp. terreus* treated by UV-Irradiation and high temperature

出发菌株 Parent strains	土曲霉 No. 3 <i>Asp. terreus</i> No. 3	土曲霉 No. 22 <i>Asp. terreus</i> No. 22	土曲霉 No. 25 <i>Asp. terreus</i> No. 25
存活菌数 Survival	38	50	40
正突变 Positive mutation	0	7	8
正突变率 Positive mutation rate	0	14%	20%

表 3 土曲霉 No.22、No.25 诱变处理后产酸

Table 3 Itaconic acid yield of *Asp. terreus* No. 22 and No. 25 after mutagenesis

菌 号 Number of strain	No. 22	No. 22- ₄₇₃	No. 22- ₄₈₄	No. 22- ₃₇₁	No. 22- ₃₉₃	No. 22- ₅₈₄	No. 22- ₃₇₂	No. 22- ₅₈₂
衣康酸产率 Yield of itaconic acid(g/100ml)	0.71	0.88	0.56	0.63	0.44	0.56	0.59	0.50
菌 号 Number of strain	No. 25	No. 25- ₅₁₀₁	No. 25- ₄₈₄	No. 25- ₄₈₅	No. 25- ₃₇₂	No. 25- ₄₉₁	No. 25- ₄₉₂	
衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)	0.38	0.88	0.75	0.63	0.56	0.65	0.41	

表 4 野生株 No. 82 经 Co^{60} 照射后突变株产酸水平Table 4 Itaconic acid yield of mutants of *Asp. terreus* No. 82 by Co^{60} radiation

突变株编号 Number of mutant	r ₁	r ₂	r ₆	r ₈	r ₁₁	r ₁₃	r ₁₇	r ₂₀	r ₂₈
衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)	0.69	0.38	0.69	0.50	0.94	0.81	1.31	0.75	0.56

表 5 UV-高温处理突变株 No. 25-5₁₀₁ 经 Co^{60} 照射突变株产酸水平Table 5 Itaconic acid yield of mutants by Co^{60} radiation from the mutant no. 25-5₁₀₁ treated by UV-irradiation and high temperature

突变株编号 Number of mutant	2A	8A	18B	13B	23B	24B	20B	27B
衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)	0.75	0.85	1.19	1.88	1.69	2.13	1.19	1.06

表 6 培养基因子水平对照

Table 6 Factor-level comparison of media

水平 Level	因子 Factor	A 淀粉水解糖 Hydrolytic saccharide from starch (%)	B (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	C MgSO ₄ ·7H ₂ O(%)	D pH
1		6	0.25	0.08	2—3
2		8	0.30	0.20	4—5
3		10	0.40	0.40	6

表 7 培养基的正交试验

Table 7 Crossing design tests of media

试验 Experiment	因子 Factor	A 淀粉水解糖 Hydrolytic saccharide from strach (%)	B (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	C MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	D pH	衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)
1		(1) 6	(1) 0.25	(1) 0.08	(1) 2—3	2.00
2		(1) 6	(2) 0.30	(2) 0.20	(2) 4—5	2.30
3		(1) 6	(3) 0.40	(3) 0.40	(3) 6	1.13
4		(2) 8	(1) 0.25	(2) 0.20	(3) 6	1.38
5		(2) 8	(2) 0.30	(3) 0.40	(1) 2—3	2.80
6		(2) 8	(3) 0.40	(1) 0.08	(2) 4—5	2.25
7		(3) 10	(1) 0.25	(3) 0.40	(2) 4—5	3.50
8		(3) 10	(2) 0.30	(1) 0.08	(3) 6	1.25
9		(3) 10	(3) 0.40	(2) 0.20	(1) 2—3	0.22
K ₁		1.81	2.27	2.25	1.67	
K ₂		2.14	2.02	1.30	2.66	
K ₃		1.64	1.20	2.46	1.25	
R		0.5	1.07	1.16	1.41	

菌株,例如:土曲霉 No.22-4₇₅ 指出发菌株土曲霉 No.22 经 UV 照射 4 分钟于 70℃处理 15 分钟后获得第 5 个突变株)。从表 3 可见,经 UV-高温复合处理所获得的土曲霉 No.22-4₇₅ 与 No.25-5₁₀₁ 产衣康酸较高。

(三) Co⁶⁰ 诱变情况

选用土曲霉野生株 No.82、突变株 No.22-4₇₅、No.25-5₁₀₁ 作为出发菌株,经 Co⁶⁰照射, No.22-4₇₅ 诱变后所获得突变株大多数产酸略有提高,但不显著,而野生株 No.82 与 No.25-5₁₀₁ 诱变后 结果如表 4、表 5 所示。土曲霉 r₁-r₁₃ 系野生株 No.82 经 Co⁶⁰ 照射(剂量为 8 万伦琴)后突变株,土曲霉 r₁₄-r₂₈ 系野生株 No.82 经 Co⁶⁰ 照射



图 1 土曲霉 No. 82-r₁₇ 在不同培养基摇瓶培养液中积累有机酸纸层析图谱

Fig.1 Paper chromatogram of organic acids produced by *Asp. terreus* No. 82-r₁₇ on various culture broths in shaking flasks

1. 衣康酸 Itaconic acid (2%, 5μl)

表 8 摇瓶培养 No. 25-24B 产酸和残糖

Table 8 The variation of itaconic acid yield and residual sugar during cultivation of *Asp. terreus* No. 25-24B in culture broth

发酵时间 Fermentation time (day)	0	1	2	3	4
衣康酸产率 Yield of itaconic acid (g/100ml)	0	0.12	0.65	1.82	3.24
残 糖 Residual sugar (%)	7.8	6.4	5.0	3.4	1.6

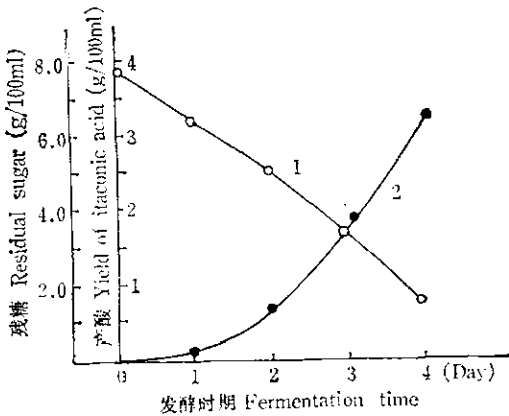


图 2 No. 25-24B 摇瓶培养产衣康酸动态

Fig. 2 Kinetics of itaconic acid production of No. 25-24B in shaking flasks

1. 残糖 Residual Sugar
2. 产酸 Yield of itaconic acid

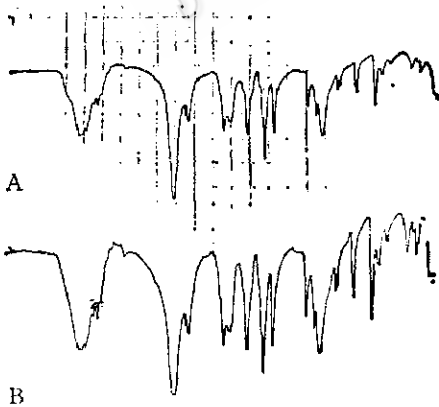


图 3 红外光谱图

Fig. 3 Ultra-red adsorption spectrogram

- A: 衣康酸标准品 Standard itaconic acid
B: 土曲霉培养液提取的结晶样品
Crystal recovered from culture
broth of *Asp. terreus*

(剂量为 12 万伦琴)后突变株。而 UV-高温处理突变株 No.25-5₁₀₁ 再经 Co⁶⁰照射获得 No.25-5₁₀₁-2A 与 No.25-5₁₀₁-18B(简称 2A 与 18B)等 (A 系 Co⁶⁰照射剂量为 10 万伦琴; B 则为 12 万伦琴)。

我们获得了产酸较高的 No. 82-r₁₇、No.25-13B、No.25-23B 和 No.25-24B 共 4 株。Co⁶⁰ 照射剂量以 12 万伦琴较为适宜。

(四) 较佳培养基成分选定

考虑到培养基成分之间的相互关系, 采用正交试验, 使用菌株为土曲霉 No.82-r₁₇, 结果见表 6 和表 7。

经纸层析, 图谱上未检出其他有机酸 (见图1, 上标为培养基编号, 下标为菌株编号, 17 为 No.82 经 Co⁶⁰照射诱变株)。

根据表 7 中 R 值大小, 确定正交表中各因子对产酸影响的先后顺序为: pH > MgSO₄·7H₂O > (NH₄)₂SO₄ > 水解糖。

按正交试验结果分析可知: 发酵培养基较佳组成为: 淀粉水解糖 7—8% (NH₄)₂SO₄ 0.25%, MgSO₄·7H₂O 0.4%, 玉米浆 0.16%, pH4—5。

(五) No.25-24B 摇瓶培养产酸动态

采用培养基(3), 使用 No.25-24B 于 37℃ 进行摇瓶培养, 逐日测定产酸和残糖 (表 8, 图 2)。

从表 8、图 2 可知: 衣康酸产率在 2 日后迅速上升, 发酵初期碳源用于生物合成菌丝球, 以后大部分转化为衣康酸, 发酵

4日,残糖还很高,若延长5—6日,产酸还会增加。若采用较佳培养基组成和适宜培养条件,产酸率和转化率可进一步提高。

(六) 产物鉴定

将提取的衣康酸与标准品进行红外吸收光谱比较,发现两者吸收曲线吻合(图3)。说明提取物确系衣康酸,杂质很少。

结 论

1. 通过分离、筛选诱变,从土壤中选出几株产衣康酸的土曲霉。单纯采用UV-高温处理效果不理想。 Co^{60} 照射正突变率较高。UV-高温- Co^{60} 照射获得No.25-24B菌株经摇瓶试验产酸速率很高,有相当大的潜力,有待于进一步研究。

2. 野生株No.82经 Co^{60} 照射获得No.82-r₁₇与美国工业上使用的衣康酸产生菌*Asp. terreus* NRRL 1960^[2]的比较如表9所示:以淀粉水解糖为主原料,采用正交试验7培养基培养No.82-r₁₇。

我们所选育出的土曲霉No.82-r₁₇,37℃摇瓶培养4日,产酸3.5g/100ml,对供给糖转化率35%以上,达到美国土曲霉NRRL 1960水平。

3. 经正交法试验初步确定了No.82-r₁₇菌株的较佳培养基组成。

4. 从培养液所提取出的结晶与衣康酸标准品经红外吸收光谱测定,两者吸收曲线吻合,确证所提取的结晶是衣康酸,而且纯度相当高。

表9 土曲霉 No. 82-r₁₇ 与土曲霉 NRRL 1960 对比

Table 9 Comparison of *Asp. terreus* No. 82 and NRRL 1960

培养基组成 (g/L) Composition of medium	<i>Asp. terreus</i> NRRL 1960	<i>Asp. terreus</i> No. 82-r ₁₇
结晶葡萄糖 Glucose monohydrate	66	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75	4
NH ₄ NO ₃	2.5	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	2.5
酒石酸铁 Ferric tartrate	0.25	—
玉米浆 Corn steep liquor	1.5	1.6
HNO ₃ (sp. gr. 1.19)	1.6ml	—
装液量 Full load (ml)	125/500ml	40/500ml
培养温度(℃) Culture temperature	30	37
发酵时间 Fermentation time (day)	8	4
衣康酸产率 (g/100ml) Yield of itaconic acid	2—2.18	3.5
转化率(对供给糖) Conversion rate by weight of the supplied sugar (%)	30—33	35

参 考 文 献

[1] Smith, J. E. et al.: Genetics and Physiology

of *Aspergillus*, 427, 1977.

[2] Pfeifer, V. F. et al.: *I. E. C.*, 44: 2975, 1952.

STUDIES ON THE ISOLATION AND BREEDING OF ITACONIC ACID PRODUCING STRAINS

Jin Qirong Xu Hong Zhang Li

(Wuxi College of Light Industry, Wuxi)

This paper described the isolation of itaconic acid producing strains from soil, and the treatment of wild type itaconic acid strain of *Asp. terreus* by Co^{60} irradiation and VU-irradiation and high temperature treatment. Some mutants (*Asp. terreus* No. 82-r₁₇, No. 25-13B, No. 25-23B and 25-24B) by crossing design test a suitable medium for producing itaconic acid has been found. The strain No. 82-r₁₇ was able to accumulate itaconic acid 3.5 g/dl

in shaking flask at 37°C, its conversion rate by weight of sugar was 35%. The ultra-red adsorption spectogram of itaconic acid from culture broth and standard was compared, and showed to be identical.

Key words

Itaconic acid; Isolation; Breeding;
Itaconic acid producer