

尖孢青霉 (*Penicillium spiculisporum* 44) 产生刺孢青霉酸的适宜条件

刘瑞勤 王修垣

(中国科学院微生物研究所,北京)

从7种52株不同的青霉中筛选到6株能产生刺孢青霉酸的菌株。它们分属于尖孢青霉 (*P. spiculisporum*, 4株)和产紫青霉 (*P. purpurogenum*, 2株),其中以 *P. spiculisporum* 44 的产酸量最高。产酸的适宜培养基组份为 (g/L): 葡萄糖 130—150, NH_4NO_3 0.6, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 玉米浆 0.6—0.8, 起始 pH 6.0。摇床培养 8—9 天, 发酵液中产酸量在 40 g/L 以上。酸的得率为消耗碳量的 53% 或更多。该酸溶液 (8.765×10^{-3} mol/L) 的表面张力及其对煤油的界面张力分别为 38.1 和 6.68 mNm⁻¹。

关键词 尖孢青霉; 刺孢青霉酸; 生物表面活性剂

Clutterbuck等^[1]于1931年发现, *Penicillium spiculisporum* 能产生一种抗生素——刺孢青霉酸。其他作者^[2-4]相继报道, 其它青霉也能产生这种酸, 但产量都比 *P. spiculisporum* 的低, 每升不超过 1g。因此, *P. spiculisporum* 是得到该酸的主要菌种^[5]。

Gatenbeck 等^[6-8]研究过酶法生产这种酸的途径。对影响该酸生物合成的因子很少报道^[4]。

由于该酸具有表面活性、抗生特性和抗腐蚀的能力, 对高温和高盐也较稳定, 因而对石油工业可能具有重要意义^[9]。我们研究了 *P. spiculisporum* 44 产生刺孢青霉酸的适宜条件。本文报道其主要结果。

材料和方法

(一) 菌株

筛选用的 52 株青霉由本所青霉和曲霉研究组齐祖同先生提供。

(二) 基础培养基和培养条件

培养基成份 (g/L) 为: 葡萄糖 75, NH_4Cl 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1.0, 玉米浆

1.0, 自来水 1L, pH 4.8^[10]。

葡萄糖和培养基于 0.55 kg/cm² 分别灭菌 30 min。用在 Czapek-Dox 琼脂斜面上生长约一星期的培养物作为种子, 经无菌水洗下, 作成悬浮液。取一定量的悬浮液接种于装有 100 ml 培养液的 250 ml 三角瓶中, 置振幅 50 mm, 220 r/min 摇床上 30—31°C 培养 10 天。

(三) 分析方法

按研究该酸的文献中通用的总酸度法测定发酵液中产生的刺孢青霉酸^[4,9]。用 0.1 mol/L NaOH 滴定 10 ml 发酵液至酚酞终点。葡萄糖用二硝基水杨酸比色法测定^[11]。为了测定菌体的干重, 取 25 ml 发酵液加蒸馏水稀释至 10 倍, 加碱中和, 3000 × g 离心 20 min。弃去上清液, 用丙酮萃取刺孢青霉酸后, 剩下的菌体置 50°C 干燥至恒重。

表面张力除特别说明者外, 均采用 Shimadzu 表面张力仪 St-1 进行测定。

结果和讨论

(一) 菌种筛选

筛选的青霉包括 7 种 52 株: *Penici-*

本文于 1987 年 10 月 24 日收到。

本所齐祖同先生提供筛选用菌株, 谨致谢忱。

表 1 产生刺孢青霉酸的菌株
Table 1 Spiculisporic acid-producing *penicillium*

菌种 Species	滴定酸度* Titratable acidity ml NaOH/10 ml of culture broth	pH	表面张力 Surface ten- sion mNm ⁻¹	针状结晶 Needle-like crystals
<i>P. spiculispodium</i> 44	14.9	1.8	32	+, long
<i>P. spiculispodium</i> 30	8.1	2.2	41	+, long
<i>P. spiculispodium</i> 73	11.6	1.8	46	+, long
<i>P. spiculispodium</i> 15	5.4	2.2	50	±, long
<i>P. purpurogenum</i> 10	7.6	1.8	39	+, short
<i>P. purpurogenum</i> 60	7.9	2.2	47	±, short

* NaOH 0.08406 mol/L

llium funiculosum 13 株, *P. luteum* 1 株, *P. purpurogenum* 11 株, *P. rugulosum* 3 株, *P. spiculispodium* 5 株, *P. stipitatum* 3 株和 *P. vermiculatum* 16 株。

根据文献 [4] 和 [9], 用发酵液中针状结晶的存在和滴定酸度作为得到可能产生刺孢青霉酸菌株的标志, 并测定了发酵液的表面张力和 pH。用这种方法, 从上述青霉中得到 6 株可能产生该酸的菌株。其中有 4 株 *P. spiculispodium* 和 2 株 *P. purpurogenum*, 而以 *P. spiculispodium* 44 的产酸量最高(表 1), 为本研究所采用。

表 1 列出的滴定酸度、pH 和表面张力三者之间的相关性不明显。这可能是由于菌种和菌株不同、副产物不同(如发酵液粘稠度不同, 有的有醇味等)等的干扰所致。

我们对菌株 44 的发酵产物进行了提取、纯化和理化分析(元素分析、核磁共振

测定和红外光谱分析)证实, 它是刺孢青霉酸^[11]。

应该指出的是, 文献中尚未见到 *P. purpurogenum* 能产生刺孢青霉酸的记载, 而它们在发酵液中产生的针状结晶也较 *P. spiculispodium* 的短(图 1)。

(二) 产酸条件

1. 菌龄: 用在 Czapek-Dox 琼脂斜面上生长不同时间的培养物作为种子接种, 测定菌龄对产酸的影响(图 2)。最好的结果得自菌龄 15 天以上的老种子。

2. 碳源: 菌株 44 可利用葡萄糖、蔗糖和淀粉产生刺孢青霉酸(表 2), 其中以葡萄糖用量 12—15% 为宜(图 3)。

3. 氮源: 将与基础培养基中的 NH₄Cl 等量的不同氮源分别加入培养基中, 试验表明硝酸铵是最好的氮源(表 3), 最适用量为 0.6% (图 4)。

4. 玉米浆: 加入玉米浆对产酸的影响

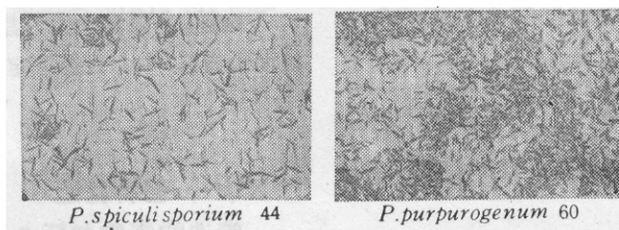


图 1 培养液中产物的针状结晶

Fig. 1 Needle-like crystals in culture broth (×400)

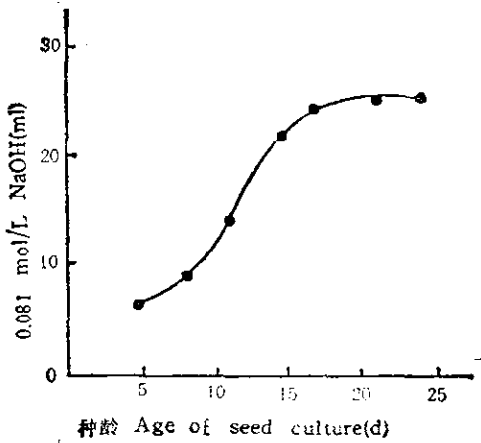


图2 种龄对产酸的影响

Fig. 2 Effect of age of seed culture
(图中所指为 10 ml 发酵液的 NaOH 滴定毫升数,下同)

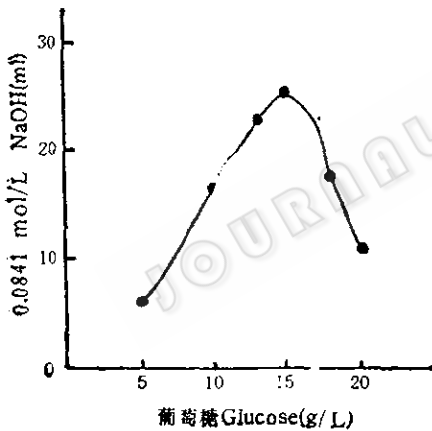


图3 葡萄糖浓度的影响

Fig. 3 Effect of glucose concentrations

显著,为菌株 44 产生刺孢青霉酸所必需,最适用量约为 0.6—0.8 g/L (图 5)。

5. 不同油品对产酸的影响: 所加的各种油品对该菌产酸有负作用(表 4)。而有些作者的试验证明,加入油品对生物表面活性剂的合成是有利的^[3]。

6. 其它无机盐: 磷酸盐低于 0.5 或高于 1.0 g/L 时降低酸的积累; 硫酸镁的适宜浓度在 0.2—0.5 g/L 之间。

表 2 不同碳源的影响

Table 2 Effect of carbohydrates

碳源 Carbohydrates	用量 Content (%)	滴定酸度* Titratable acidity (ml NaOH/10 ml of culture broth)
葡萄糖 Glucose	6	5.2
	10	15.9
	15	24.0
蔗糖 Saccharose	6	6.0
	10	14.2
	15	8.0
淀粉 Starch	6	6.0
	10	15.0
	15	10.0

* NaOH 0.12 mol/L

表 3 不同氮源的比较

Table 3 Comparison of different nitrogen sources

氮源 Compound	滴定酸度* Titratable acidity (ml NaOH/10 ml of culture broth)
NH ₄ Cl	18
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
(NH ₄) ₂ HPO ₄	16
NaNO ₃	30
NH ₄ NO ₃	32

* NaOH 0.1115 mol/L

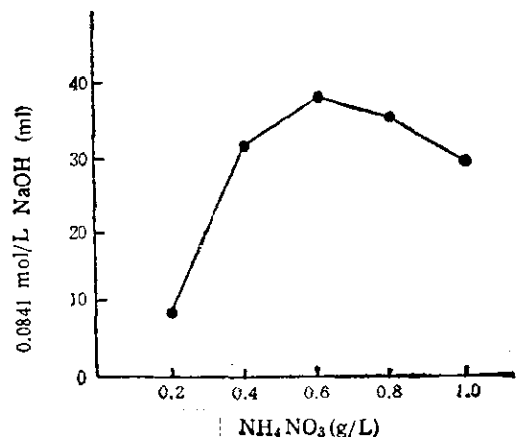
图4 NH₄NO₃ 浓度对产酸的影响

Fig. 4 Effect of NH₄NO₃ concentrations

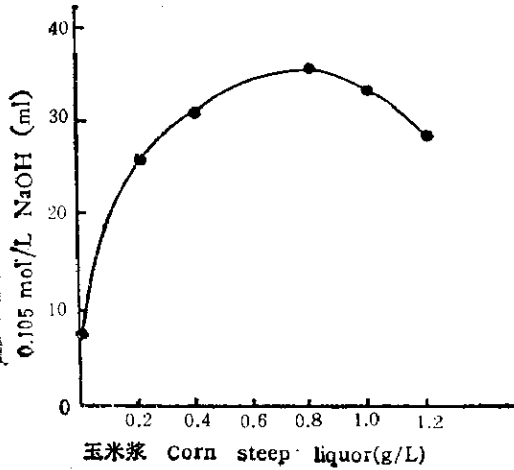


图5 玉米浆浓度对产酸的影响

Fig 5 Effect of corn steep liquor

表4 不同油品对产酸的影响

Table 4 Effect of different oils

油品 Oils	加量 Content (%)	滴定酸度* Titrable acidity ml NaOH/10 ml of culture broth
液体石蜡 Liquid paraffin	1	7.0
	5	几乎不生长
花生油 Peanut oil	0.3	11.2
	0.8	5.0
菜籽油 Rape oil	0.3	15.0
	0.8	4.0
对照 Control	0	31.2

* NaOH 0.115 mol/L

(三) 刺孢青霉酸的生物合成动态

如上所述, *P. spiculisporum* 44 合成刺孢青霉酸的适宜条件 (g/L) 为: 葡萄糖 120—150, NH_4NO_3 0.6, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 玉米浆 0.6—0.8, 起始 pH 6.0。在这些条件下测定了该酸的产量、底物的消耗、生物量和 pH 的变化。图 6 表明, 发酵液的 pH 在 24h 后从 6.0 降至 48h 的 1.8; 葡萄糖的消耗、生物量的增加和该酸的合成在 24h 后平行发生。在第

四天生物量达到最高, 约为 7.5 g/L。在第五至第八天, 酸的产量呈对数增加, 剩余的葡萄糖降至最低, 约 2.0%。每升可得刺孢青霉酸 40 g, 酸的得率为消耗碳的 53% 以上。

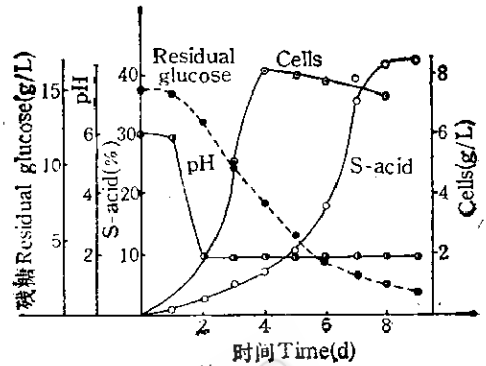


图6 刺孢青霉酸的合成动态(残糖×10)

Fig. 6 Time course of spiculisporic acid synthesis

(四) 产物的回收

刺孢青霉酸在发酵液中有两种类型同时存在。当 pH 低于 3 时, 发酵液中产生最典型的类型是开环酸, 即 4-羟基-4, 5-二羧基十五碳酸。加热至 80°C 以上, 开环酸即转化成内酯环结构 (图 7), 文献中称为 S-酸。平衡条件主要取决于高温。O-酸的溶解度高于 S-酸。S-酸在 70°C 的溶解度接近 150 mg/L, 并于 70—75°C 结晶和沉淀。O-酸在 30°C 的溶解度为 200 mg/L, 在 50°C 时为 55 g/L^[4,11]。S-酸的表面活性较高^[4,15]。刺孢青霉酸对温度的这种特性为产物的回收提供了简便的方法: 即将温度加热至 80°C 以上, 以 S-酸的类型回收产物。

(五) 表面张力和界面张力

将上法提取的产物纯化后配制成 8.765×10^{-3} mol/L 的水溶液, 用悬滴法测定。该溶液的表面张力为 38.1 mNm^{-1} , 对煤油的界面张力为 6.68 mNm^{-1} 。

该产物的应用尚待开发。

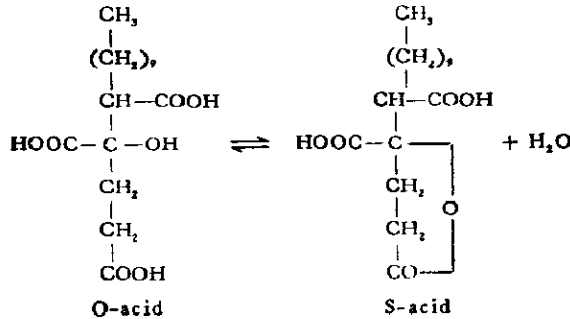
图 7 刺孢青霉酸 (S-酸) 与其开环酸 (O-酸) 之间的关系^[4]

Fig 7 Relation between spiculisporic acid (S-acid) and the open-ring acid (O-acid)

参 考 文 献

- [1] Clutterbuck, P. W. et al.: *Phil. Trans. Roy. Soc., London, Ser. B.*, 220: 301, 1931.
- [2] Birkinshaw, J. H. et al.: *Biochem. J.*, 28: 828, 1934.
- [3] Oxford, A. E. et al.: *ibid.*, 28: 1321, 1934.
- [4] Tabuchi, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55 (1): 37—42, 1977a.
- [5] Kobayasi, T. et al.: U. S. Patent 3, 625, 826, 1971.
- [6] Gatenbeck, S. et al.: *Proc. Congr. Antibiotics*, Prague, Butterworth, London, p. 540—541, 1964.
- [7] Gatenbeck, S. et al.: *Acta Chemica Scandinavica*, 22: 2613—2616, 1968a.
- [8] Mahlen, A. et al.: *ibid.*, 22: 2617—2623, 1968b.
- [9] Zajic, J. E. et al.: *International Bioresources J.* (Ed. Zajic and Donaldson), 1: 310—320, 1985.
- [10] Tabuchi, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 55 (1): 43—49, 1977b.
- [11] Wang Xiu-yuan: *Proceedings of the First International MEOR Workshop*, Apr. 1—3, 1986, Abilene, Texas, p. 188—213, Jan. 1987.
- [12] Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, 31: 426, 1959.
- [13] Cooper, D. G. et al.: *Appl. Environ. Microbiology*, 47: 173, 1984.
- [14] Inoue, K.: Japanese Patent 79, 80, 489, 1979.
- [15] Inoue, K.: *ibid.* 78, 37, 189, 1978.

THE SUITABLE CONDITIONS FOR SPICULISPORIC ACID PRODUCTION BY *PENICILLIUM SPICULISPORUM* 44

Liu Ruiqin Wang Xiuyuan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Six strains of *Penicillium* capable of producing spiculisporic acid were selected from 52 strains of 7 different *Penicillium* species. They belong to *P. spiculisporum* (4 strains) and *P. purpurogenum* (2 strains), of which *P. spiculisporum* 44 gave the maximum production of the spiculisporic acid. The suitable medium components (g/L) for the acid synthesis were: glucose 130—150, NH_4NO_3 0.6, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, corn steep liquor 0.6—0.8, initial pH 6.0. The

acid amounts in the shake culture broth reached more than 40 g/L after 8—9 days and the yield of acid was more than 53% of carbon consumed. Its surface and interface tension (8.756×10^{-3} mol/L) against kerosine are 38.1 and 6.68 mNm^{-1} respectively.

Key words

P. spiculisporum; Spiculisporic acid; Biosurfactant