

高产柠檬酸的 SHAM 特性黑曲霉突变株的选育

王庆昭 李 剑 刘 伟 杨 枫 高年发

(天津轻工业学院食品工程系, 天津, 300222)

摘 要 研究了 SHAM(水杨酸氧肟酸)对产酸的影响。5 mg/60 mL 的 SHAM 基本抑制柠檬酸的产生。当 W3 菌株在加有 10 mg/10 mL SHAM(L1)的平板上生长时,只能着生 10% 的孢子,在加有 20 mg/10 mL SHAM(L2)的平板上生长时不能着生孢子。据此选育出不能够在 L1 平板上着生孢子的 SHAM 敏感株和在 L2 平板上能够着生孢子的 SHAM 抗性株。通过发酵试验,SHAM^S-2 菌株产柠檬酸比出发菌株 W3 高 40%,转化率达到 91.7%。

关键词 黑曲霉 柠檬酸 ⁶⁰Co- γ 诱变 全玉米 SHAM 敏感株

关于柠檬酸发酵的研究工作已经进行了许多年,产酸已经达到了一定的水平,因此要进一步提高柠檬酸的产量仅仅停留在原有的方法上是不够的,必须探索新的思路。本文从国外理论研究较多的黑曲霉的侧系呼吸体系着眼,重点探讨了此理论对实践的指导意义。

现有的研究认为在黑曲霉之中除了质子泵呼吸酶系,如黄素还原酶 I,细胞色素 C 还原酶(Ⅲ)和细胞色素 C 氧化酶(Ⅳ)以外,还存在 2 个额外 NADH 脱氢酶,和 2 个黄素还原酶,它们可以不经过呼吸链而直接把电子传给氧,这个过程称为侧系呼吸链。CN(质子泵呼吸抑制剂)单独存在抑制线粒体酶活性的 83%,水杨酸氧肟酸(简称 SHAM,侧系呼吸链抑制剂)单独存在则抑制 66.0%,全部存在则抑制 100%。如图 1 所示。^[1,2]

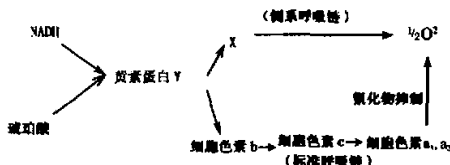


图 1 黑曲霉内的标准呼吸链和侧系呼吸链

Jurgen 等分离出了酶系 I、Ⅲ、Ⅳ和替代 NADH 还原酶,研究了其在生酸培养基和

非生酸培养基上的活性变化,最重要的发现是在生酸培养基上酶系 I、Ⅲ和Ⅳ的活性均下降许多,其中 I 下降最多,而替代 NADH 还原酶的活性上升了 2 倍以上,同时野生黑曲霉菌种在生酸和非生酸培养基上不显示任何区别,酶系活力不变化^[3]。

他们在 1992 年以 ³⁵S 标记从分子生物学角度进一步研究了酶系 I,又发现在生酸过程中酶系 I 可以正常工作,而在产酸阶段,变得非常脆弱和不完整,推测主要是因为缺乏锰而导致正常呼吸链的合成受损^[4]。

由以上研究可以看出,比较脆弱的酶系 I,只在某种条件之下如营养条件不充分时会导致工作不正常,比较强的侧链呼吸酶系是决定黑曲霉产酸的重要因素。而从理论上阐述侧链呼吸与 TCA 循环的关系以及为何侧系呼吸链强会产酸的问题,现在一般认为 NADH 通过标准呼吸链氧化产生 ATP,会抑制磷酸果糖激酶的活性,而通过侧系呼吸链则不产生 ATP,因此保证了 EMP 途径的畅通。

本文基于上述理论,初步研究我国柠檬酸产生菌是否存在呼吸侧链,进而探索通过分离选育 SHAM 特性株的方法来提高我国柠檬酸生产菌产酸的水平。

1 材料和方法

1.1 出发菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) W3 为本室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 玉米液化液摇瓶培养基

市售玉米粉以 1:4 和水混合,加热到 70℃,以每克 6 单位加入耐高温淀粉酶,保温 10 min 后继续加热到 90℃保温 30 min,碘检不变色后继续加热到 100℃煮沸 5~10 min。趁热经过两层纱布过滤。滤清液冷却后加水调整糖度和蛋白浓度到要求的浓度。

1.2.2 玉米液化液固态培养基

将上述玉米液化液加入 2% 的琼脂。

1.2.3 SHAM 固态培养基

玉米液化液固态培养基中加入一定量的 SHAM。

1.3 诱变方法

将制好的菌悬液调整浓度后放置于 120 mm × 12 mm 的试管中。射线的剂量率为 3.28 Gy/s(328 rad/s)。照射距离 60 cm,以时间控制辐射剂量,室内温度 20℃,湿度 60%,照射以后的孢子悬浮液立即涂布平板。辐射源由天津农业科学院农作物所提供。

1.4 培养方法

250 mL 三角瓶,装液量 45 mL,两层纱布封口,33℃,250 r/min 于 Y-X-I 独轴旋转式摇床上培养 96 h。初总糖 13%,pH 值自然,蛋白质含量 0.4%,接种量 10^5 个/mL。

1.5 分析方法

(1)总糖、还原糖、蛋白的测定方法见文献[5];

(2)发酵液之中的总酸的测定见文献[6];

(3)发酵液之中的酸的组成的纸层析分析见文献[7];

(4)草酸的检出:见英国药典;

(5)发酵液之中的柠檬酸的纯度测定:酞酐-吡啶比色法[6];

(6)pH 值的测定:精密 pH 试纸;

(7)细胞干重的测定见文献[8]。

2 结果与讨论

2.1 SHAM 特性菌的选出及其特性的研究

2.1.1 不同浓度 SHAM 对菌种产酸的抑制

以 W3 为出发菌株,接种孢子在玉米液化液摇瓶培养基上发酵 96 h,按不同浓度加入 SHAM 到培养基中测柠檬酸的产量。其中摇床转速 140 r/min,发酵初总糖 13%,500 mL 摇瓶装液 60 mL,其它条件不变,结果见表 1。

表 1 不同浓度 SHAM 对产酸的影响

浓度	产酸/%	转化率/%
空白	6.75	61.9
1 mg/60 mL	6.02	46.3
5 mg/60 mL	0.99	7.6

从表 1 可以看出,SHAM 对菌体的产酸影响很大,基本导致了菌体的产酸停止,发现 ≥ 5 mg/60 mL 的 SHAM 会导致产酸基本停止。

2.1.2 SHAM 对黑曲霉生物量的影响

分别测定加 SHAM 和不加 SHAM 时 W3 菌的生物量变化曲线和产柠檬酸变化曲线,结果见图 1、图 2。

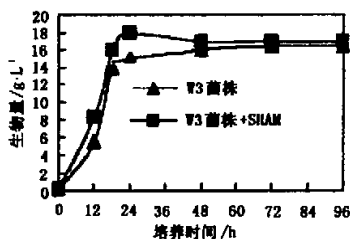


图 1 生物量变化曲线

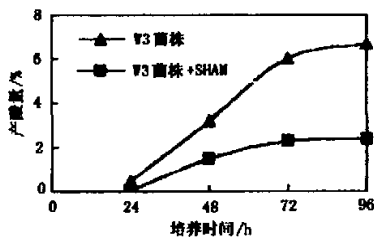


图 2 产酸量变化曲线

由图 1 可以看出, W3 菌株在玉米液化



2.4.2 SHAM 抗性菌株的选出



2.5 SHAM 特性菌的产酸测定

将获得的 SHAM^s 菌和 SHAM^r 菌株在玉米液化液摇瓶培养基中测酸。摇床转速 250 r/min, 250 mL 三角瓶装液量 45 mL, 培

表 4 SHAM 特性菌的产酸测定

菌株	柠檬酸产量/%	转化率/%
W3 菌株	8.36	64.3
SHAM ^r -1	8.00	61.5
SHAM ^r -2	6.81	52.4
SHAM ^r -3	8.53	65.6
SHAM ^r -4	6.47	49.8
SHAM ^r -5	6.93	53.3
SHAM ^r -6	7.88	60.6
SHAM ^r -7	6.74	51.8
SHAM ^r -8	2.30	17.7
SHAM ^r -9	2.01	15.5
SHAM ^r -10	8.74	67.2
SHAM ^r -11	6.55	50.4
SHAM ^r -12	7.42	57.1
SHAM ^r -13	6.44	49.5
SHAM ^s -1	11.61	89.3
SHAM ^s -2	11.92	91.7
SHAM ^s -3	11.58	89.1
SHAM ^s -4	10.50	80.8
SHAM ^s -5	9.45	72.7
SHAM ^s -6	11.20	86.2
SHAM ^s -7	10.74	82.6
SHAM ^s -8	9.81	75.5
SHAM ^s -9	10.00	76.9
SHAM ^s -10	11.91	91.6
SHAM ^s -11	10.65	81.9
SHAM ^s -12	11.84	91.1
SHAM ^s -13	11.21	86.2
SHAM ^s -14	10.85	83.5
SHAM ^s -15	10.62	81.7

注:装液量 45 mL;以上数据为 3 瓶的平均值(柠檬酸纯度均>90%)。

养温度 33℃, 摇床间空气湿度 60%, 蛋白质含量 0.5%, 初总糖 13%, 其它条件不变, 测得结果如表 4 所示。

由表 4 可以看到, SHAM^s 菌株的产酸提高幅度较大, 而且几乎所有的敏感菌株的产酸均有不同程度的提高。而 SHAM^r 菌株的产酸则基本都呈下降趋势, 很少有超过出发菌株的菌。其中 SHAM^r-8 菌的产酸甚至下降到 2.01%。虽然有可能是其它的因素影响产酸, 但我们认为这样的结果并不是偶然的。应该有明确的结论, 即 SHAM 敏感菌有利于产柠檬酸, 而抗性菌不利于产柠檬酸。

SHAM^s 有利于产柠檬酸, 似乎和现有的理论不一致。现有的理论认为在黑曲霉内存在 2 种呼吸体系: 正常呼吸体系和侧系呼吸体系。正常呼吸链经过一系列中间体将电子传递给氧会释放出 ATP, 而 ATP 会对柠檬酸产生过程中的关键酶——磷酸果糖激酶 (PFK) 起到抑制作用, 从而抑制了 EMP 途径。如果电子通过侧系呼吸链氧化则不产生 ATP, 从而解除了其对 (PFK) 的抑制作用, 保证了 EMP 途径的畅通。按此理论, 黑曲霉细胞内需要更强的侧系呼吸体系, 而 SHAM 是侧系呼吸链的抑制剂, 那么就应选育 SHAM 抗性菌株。因为按传统的育种理论, 耐受 SHAM 的能力提高意味着侧系呼吸链的增强。但实际结果恰恰相反, SHAM 抗性菌株产酸下降而 SHAM 敏感菌株(按理论侧系呼吸链减弱)的产酸反而上升。

对于上述问题, 我们参考了大量的理论资料, 发现和理论的研究并不矛盾。Jürgen 等人的研究结果认为, 在黑曲霉产柠檬酸的初始阶段, 正常呼吸体系的酶活力并没有受到影响, 即和野生黑曲霉的活性保持一致; 而随着时间的延长, 由于缺乏锰离子或其它营养物质而导致正常呼吸体系的受损, 活性下降, 而侧系呼吸体系的酶活性上升。这与平常所说的, 在柠檬酸发酵过程中的长菌期和产酸期的划分非常一致。因此 SHAM 抗性菌株的侧系呼吸酶系极有可能经过诱变而变

成组成性酶,在黑曲霉的长菌期,由于侧系呼吸的增强而使其达不到足够的 ATP 的供应影响菌的发育,由此造成产酸的急剧下降。反观 SHAM 敏感菌株则可能是在菌体生长阶段发育正常,而在产酸阶段其侧系呼吸链的酶活性和正常呼吸链的酶活性的比例比较合适,即电子经过正常呼吸链和侧系呼吸链氧化的比例比较合适而导致产酸的增加。

3 小 结

通过上述研究表明:(1)SHAM 对我国柠檬酸生产菌 W3 株的生长无影响,对产酸有显著影响,可推测柠檬酸生产菌 W3 株存在呼吸侧链;(2)利用 SHAM 筛分平板分离选育出 SHAM 敏感菌和抗性菌,比较它们的产酸结果,可以得出 SHAM 敏感菌有利于产

柠檬酸的结论。

参 考 文 献

- 1 Solomons T. Ann. Rev. Plant Physiol., 1997 (28):279
- 2 Kohtaro Kirimura et al. Agric. Biol. Chem., 1987, 51(5):1299~1303
- 3 Weiss H et al. Eur. J. Biochem., 1987 (14):76~81
- 4 Jurgen Wallrath et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991 (36):76~81
- 5 无锡、大连、天津轻工业学院合编.工业发酵分析.北京:中国轻工业出版社,1980
- 6 金其荣等.有机酸发酵工艺学.北京:轻工业出版社,1989
- 7 天津轻工业学院食品工程系.调味品检验.天津轻工业学院食品工程系讲义,1985.2
- 8 Kohtaro Kirimura. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1988, 27:504~506

High Producing Citric Acid by Selection of SHAM Mutants of *Aspergillus niger*

Wang Qingzhao Li Jian Liu Wei Yang Feng Gao Nianfa

(Dept. of Food Eng., Tianjin University of Light Industry, Tianjin, 300222)

ABSTRACT The influences of SHAM (salicylhydroxamic acid) on the respiratory system of *Aspergillus niger* were studied. The 5 mg/60 mL SHAM will almost completely inhibit the citric acid production in shaken cultures. When W3 was cultivated on agar plate (L1), which contains 10 mg/10 mL SHAM, it only can produce 10% spores. When it is cultivated on plate (L2), which contains 20 mg/10 mL SHAM, it can not produce spores. According to this, many SHAM mutants which can produce normal amount of spores on L1 plate and many SHAM mutants which can produce spores on L2 plate were selected. By means of fermentation test SHAM-2 strain can produce 40% higher of citric acid than original strain W3 and the yield of citric acid is 91.7%.

Key words *Aspergillus niger*, citric acid, $^{60}\text{Co-}\gamma$ irradiation, whole corn powder, SHAM mutants