

文章编号:1673-1689(2007)05-0088-04

琥珀酸产生菌 SH-24 菌株的初步鉴定

孙莹, 林剑, 刘晓艳, 徐世艾

(烟台大学 化工制造山东省重点实验室, 山东 烟台 264005)

摘要: 根据丝状真菌的常用鉴定方法, 对诱变选育的一株琥珀酸产生菌(SH-24)进行菌落培养、菌株形态的观察和生理特性研究。结果表明, 该菌株为真菌门(Fungi)、藻菌纲(Phycomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、毛霉属(Muco)、总状枝毛霉组(Racemosus)中的总状枝毛霉(*Mracemosus fresenius*)。该菌株的平板生长温度范围在 37 °C 以下, 最适生长温度为 28 °C 左右; 对所研究的几种碳源均能利用, 且对葡萄糖的利用最好; 能利用各种氮源包括硝态氮、亚硝态氮、氨态氮和有机氮, 无机氮中氨态氮的利用效果最差, 有机氮中除豆粉之外都能很好利用。

关键词: 琥珀酸; 霉菌; 鉴定

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Primary Identification of Succinic-Producing Strain SH-24

SUN Ying, LIN Jian, LIU Xiao-yan, XU Shi-ai

(Key Lab of Chemical Manufacture Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: According to the critical method in common used of mold, the colony shape and procreation characteristic of the strain (SH-24) preserved in the laboratory which produces succinic acid were observed and the physiological characteristic was studied. The results indicated that the strain was *Mracemosus fresenius* which belonged to Racemosus, Muco, Mucoraceae, Mucorales, Phycomycetes in Fungi. Its growth temperature was under 37 °C, and the optimal temperature was determined to 28 °C. It could assimilate all the source of carbon, nitrogen including NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , all organic nitrogen studied in this study. The glucose assimilation is the best. All the organic nitrogen could be used well except the soya power. In the inorganic nitrogen, the NH_4^+ used was the worst.

Key words: succinic acid; mold; identification

琥珀酸(丁二酸, Succinic acid)及其衍生物由于广泛应用于食品、医药、冶金、轻工、饲料等各个领域, 因此琥珀酸的生产成为备受关注的研究课题^[1]。目前琥珀酸的生产主要是采用化学合成法^[2], 但制备相当复杂, 而且产品分离成本很高, 这

就给琥珀酸的应用带来了一定的限制。最近几年许多国家加大了对发酵法生产琥珀酸的研究力度, 发酵法生产琥珀酸工艺中涉及到的许多研究方向诸如: 菌种的选育、发酵工艺的优化、产物分离等已成为有机酸发酵研究领域的一个热门课题, 而我国

收稿日期: 2006-11-09.

基金项目: 山东省教育厅重点科技项目(J04C02).

作者简介: 孙莹(1982-), 女, 山东滨州人, 生物化工硕士研究生. Email: sunying_queen@sina.com

通讯作者: 林剑(1963-), 男, 山东烟台人, 工学学士, 副教授, 主要从事微生物发酵方面的研究.

在这方面的研究报道很少^[3]。

目前,国外已报道的分离出的琥珀酸产生菌都是从瘤胃中分离出来的专性厌氧或兼性厌氧细菌^[3]。细菌性琥珀酸产生菌都是在厌氧条件下进行液体培养,对发酵环境有较苛刻的要求,甚至需要通入 CO₂ 气体,另外琥珀酸作为酸性物质,其在发酵液中的合成与积累必然造成发酵液 pH 值的下降,而细菌性微生物的正常生长 pH 值通常要求在 7.0 左右,这就给琥珀酸的发酵带来了更大的困难,也是细菌性微生物琥珀酸发酵的需要解决的问题。针对上述情况,考虑到中国传统发酵食品例如白酒、黄酒在其发酵过程中都有一定量的琥珀酸生物合成,作者所在实验室现已成功地从生产用曲中分离出能够在好氧条件下合成并积累琥珀酸的霉菌菌株 S-1。S-1 菌株经过多次紫外线、亚硝基胍和激光诱变后,选育出了一株遗传稳定的菌株 SH-24,SH-24 菌株具有淀粉水解能力,在淀粉质量浓度为 6 g/dL 的培养基上液体摇瓶培养 96 h,可以得到琥珀酸质量浓度为 21.25 g/L 的发酵液;在三角瓶中固体培养 96 h,琥珀酸质量分数可达到 13.3 g/kg。利用霉菌以淀粉质原料为碳源进行琥珀酸的发酵研究,目前国内外尚未见报道。

作者对诱变选育的琥珀酸产生菌 SH-24 进行了初步鉴定,研究其生理特性,从而为进一步研究发酵条件和生长条件的优化,为琥珀酸的有氧发酵生产奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 原始菌种

霉菌(SH-24),烟台大学生物工程实验室保存。

1.2 培养基

菌落与菌丝观察培养基:马铃薯培养基(PDA 培养基)。

氮源同化培养基:不含氮源的查氏培养基。

碳源同化培养基:不含碳源的查氏培养基。

1.3 方法

1.3.1 霉菌 SH-24 鉴定 菌落特征观察用固体培养法,采用梯度稀释涂布接种法将菌种接种于马铃薯培养基^[4],置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 1~5 d。观察生长和发育的速度,菌落的颜色、表面、质地、边缘、高度、渗出物,培养基颜色变化,气味。

菌株形态特征观察用载玻片培养法,置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 1~5 d。用显微镜观察菌株的菌丝、孢子和子实体结构和形态。

根据《真菌鉴定手册》^[5]对菌株进行鉴定。

1.3.2 菌株 SH-24 最适生长温度 以固体培养基培养,将菌种点接于培养基上,在不同温度下培养 48 h 后,测量菌落直径^[6-7]。根据温度对菌落直径的影响确定最适生长温度。

1.3.3 菌株 SH-24 碳源同化利用 取各种碳源适量,使其在培养基中的质量浓度为 2 g/dL,接种后于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h,观察结果。根据霉菌在培养基中生长的优劣,分别记为“+++”(生长良好)、“++”(生长一般)、“+”(略有生长)和“-”(不能生长)。共试验 4 种碳源:葡萄糖、蔗糖、D-果糖、淀粉。以空白为对照,凡能同化者在所接菌种的周围形成生长圈。

1.3.4 菌株 SH-24 氮源同化利用 不含氮源的察氏培养基灭菌后冷却到 45 ℃ 时用倾注法倒平板,加菌悬液 1 mL 混匀。静置,待培养基凝固后,于 28 ℃ 倒置烘干后,用无菌不锈钢匙加不同氮源少许(约米粒大小)于培养皿中心。倒置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d,观察方法同碳源同化利用试验。共试验 9 种氮源分别代表 NO₃⁻、NO₂⁻、NH₄⁺ 和有机氮。以硫酸铵为对照,凡能同化者在所加氮源的周围形成生长圈。

2 结果与讨论

2.1 菌株 SH-24 菌种鉴定

2.1.1 菌株 SH-24 的菌落培养特征 将菌种梯度稀释涂布接种于马铃薯琼脂培养基,倒置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 1~5 d,结果见表 1。

表 1 菌落形态的观察

Tab. 1 Observation of colony shape

序号	观察项目	观察结果
1	菌落大小	直径最大 9.4 cm,最小 7.8 cm,平均 8.8 cm
2	菌落颜色	菌落初期为白色,培养了 5 d 之后变为浅褐灰色,菌落背面无色,有黑褐色孢子在菌落基部
3	菌落表面	表面有皱褶,菌丝较疏松,有同心环,菌落中心部分菌丝高且致密,中间部分菌丝疏松,边缘菌丝短
4	菌落质地	外观似羊毛状,边缘处菌丝贴培养基表面生长且菌丝较短,为绒毛状
5	菌落边缘	圆形,整齐,边缘呈绒毛状
6	菌落高度	中心部分呈丘状凸起,高约 1 cm 左右
7	培养基颜色的变化	培养基无颜色变化
8	渗出液	有无色液滴分泌
9	气味	有霉味,不特殊

2.1.2 菌株 SH-24 的形态特征 用载玻片培养法(用马铃薯培养基)置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 1

~5 d. 结果见表2, 图1。

表2 菌体生殖特征的观察

Tab.2 Observation of mold procreation

序号	观察项目	观察结果
1	菌丝	无色、光滑、基本无隔,一部分伸入培养基内为基内菌丝,一部分延伸到空气中为气生菌丝,菌丝呈树状分枝
2	无性孢子种类	无性孢子有孢囊孢子和厚垣孢子两种
3	孢子囊	孢子囊基本呈球形,成熟时孢囊壁消解,有的先裂开释放出部分孢子;直径30~100 μm,大多40~70 μm;孢子囊均有囊轴,囊轴呈球形或近似卵形,(25~60) μm×(15~40) μm
4	孢囊梗特性	光滑,最初不分枝,其后以单轴式生出不规则的分枝,长短不一,10 μm~3.32 mm,最长的有4.36 mm,梗宽5 μm~25 μm
5	孢囊孢子	呈短卵形或近似球形,有的为椭圆形;孢子大小一般为(4~6) μm×(5~9) μm;无色
6	厚垣孢子	形成大量的厚垣孢子,形状大小不一,光滑,无色或浅黄色
7	有性孢子	未见有性孢子

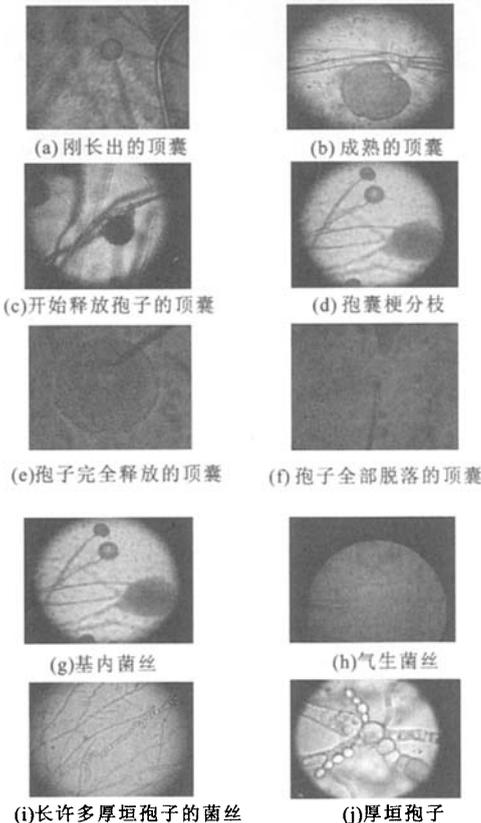


图1 菌株SH-24各部分的特征图

Fig.1 Characteristics of strain(SH-24) parts

根据以上该琥珀酸产生菌SH-24的菌落培养特征和菌株形态特征的观察结果,SH-24菌株气生菌丝呈树状分支,基本无格,孢囊梗有不规则分支,菌丝有大量厚垣孢子,未观察到有性孢子,根据《真菌鉴定手册》初步鉴定该菌株为真菌门(Fungi)、藻菌纲(Phycomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、毛霉属(Muco)、总状枝毛霉组(Racemosus)中的总状枝毛霉(*Mracemosus frese-nius*)。

2.2 菌株SH-24生理特性的研究

2.2.1 菌株SH-24的最适生长温度 使用固体培养基培养,将菌种点接于培养基上,在不同温度下培养48 h后,测量菌落直径、生长温度对菌株生长的影响,见图2。

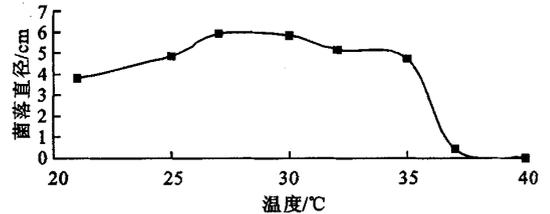


图2 生长温度对菌落直径的影响

Fig.2 Effect of growth temperature on the diameter of colony

该菌株在低于25 °C和高于35 °C时,生长均较缓慢,在37 °C时几乎不生长,在40 °C时完全不长。在25~30 °C时菌落生长随着温度的升高而加快,在27~30 °C时,生长速度无明显差异,因此该菌株的最适生长温度在28 °C左右。

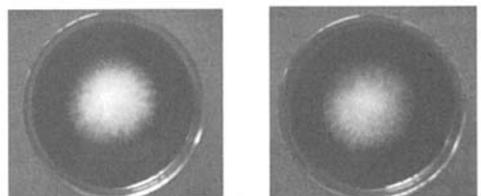
2.2.2 菌株SH-24碳源同化利用 菌株对葡萄糖、蔗糖、D-果糖、淀粉4种碳源同化利用结果见表3和图3。

实验结果表明,该菌能够很好的利用这4种碳源,对单糖的利用明显优于多糖。

表3 碳源同化结果

Tab.3 Results of carbon source assimilation

碳源	葡萄糖	蔗糖	D-果糖	淀粉	空白
生长情况	+++	+++	+++	++	+



(a)以葡萄糖为碳源的菌落 (b)以蔗糖为碳源的菌落

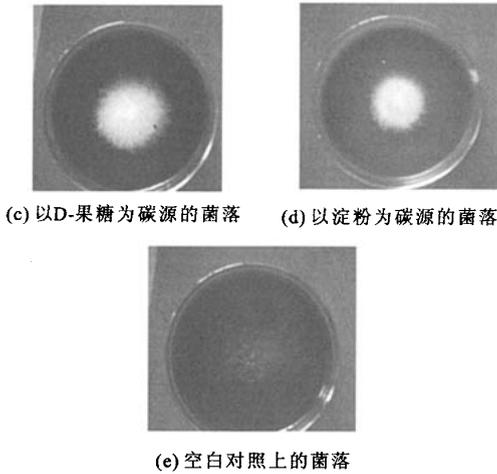


图 3 碳源同化利用结果

Fig. 3 Results of carbon source assimilation

该菌在蔗糖培养基上生长的优劣程度接近在葡萄糖和果糖等单糖培养基上的生长,但是菌丝较后两者的菌丝更为疏松,在淀粉培养基上也可生长,说明该菌有淀粉水解能力,应用在工业中可以降低生产成本。

2.2.3 菌株 SH-24 氮源同化利用 菌株对 9 种氮源的同化利用结果见表 4。结果表明,该菌能够利用 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 和有机氮等各种氮源,其中对氨态氮的利用最差,有机氮除豆粉之外均能很好的利用,无机氮中利用的最好的是硝态氮。因为该方法所加的各种氮源的量并不相等,只是一个米粒大小的约数,所以并不能定量的说明该菌对各种氮源利用的优劣,只能对其利用结果进行定性比较。

表 4 氮源同化结果

Tab. 4 Results of nitrogen source assimilation

氮源	酵母粉	豆粉	蛋白胨	脲	NaNO_3	NaNO_2	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4Cl
生长情况	+++	+	+++	+++	++	++	++	+	+

3 结 语

1) 初步鉴定该菌株为真菌门(Fungi)、藻菌纲(Phycomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、毛霉属(Muco)、总状枝毛霉组(Racemosus)中的总状枝毛霉(*Mracemosus fresenius*)。

2) 该菌最适生长温度在 28 °C 左右,能够很好的利用蔗糖、葡萄糖、D-果糖、淀粉,对单糖的利用明显优于多糖,能够利用 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 和有机氮等各种氮源,其中对氨态氮的利用最差,有机氮除豆粉之外均能很好的被利用,无机氮中利用最好的是硝态氮。

参考文献(References):

[1] 王庆昭,吴魏,赵学明.生物转化法制取琥珀酸及其衍生物的前景分析[J].化工进展,2004,23(7):794-799.
WANG Qing-zhao, WU Wei, ZHAO Xue-ming. Market analysis for bioconversion of succinic acid and its derivatives[J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2004, 23(7): 794-799. (in Chinese)

[2] 李春丽,陈新志,赵新丽.丁二酸的制备及用途[J].青海大学学报(自然科学版).1999,17(6):21-25.
LI Chun-li, CHEN Xin-zhi, ZHAO Xin-li. Preparation and uses of succinic-acid[J]. **Qinghai university Journal of Natural Sciences**, 1999, 17(6): 21-25. (in Chinese)

[3] 詹晓北,朱一晖, Wang Dong-hai. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场[J]. 食品科技, 2003, (2): 44-49.
ZHAN Xiao-bei, ZHU Yi-hui, Wang Dong-hai. Succinic acid production and potential market[J]. **Food Science and Technology**, 2003, (2): 44-49. (in Chinese)

[4] 诸葛健,李华钟.微生物学[M].北京:科学出版社,2004:102-135.

[5] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:58-74.

[6] 熊晓辉,张李阳,韦策.一株 Monacolin K 高产菌株生理特性[J].生物技术,2003,13(6):24-26.
XIONG Xiao-hui, ZHANG Li-yang, Wei Ce. Measurement of physiological and biochemical characteristics of a Monacolin K High-producing strain[J]. **Biotechnology**, 2003, 13(6): 24-26. (in Chinese)

[7] 栾雨时,包永明.生物工程实验技术手册[M].北京:化学工业出版社,2005:134-142.

(责任编辑:李春丽)