酒精液体曲菌种选育和培养条件的研究

上海市工业微生物研究所
上 海 酒 精 厂

用淀粉质原料生产酒精一般都采用液体曲作糖化剂。一些人重点地研究了糖化菌[1-8]。我们采用放射性同位素^{60}钴 γ-射线辐射育种，获得了液体曲新菌种 pr_3-6-10（上海工微所编号 M_{85}），几年来取得了显著效果。现将研究结果报告如下：

材 料 与 方 法

一、菌种

以 *Aspergillus niger* NRRL 330（以下简称330菌株）为出发菌株。

二、培养条件

将供试菌株接种在米曲汁琼脂斜面上，30℃培养7日。从斜面上挑取一环孢子，接入供试培养基中（500毫升三角瓶装量100毫升，培养基经1公斤/厘米²蒸汽灭菌60分钟）。置往复式摇床上（振幅：7厘米；100次/分），培养40—72小时。过滤、测定酶活力[9]。

三、培养基

A. 米曲汁琼脂培养基：6Be米曲汁，2%琼脂。

B. Czapeck-Dox改良培养基：蔗糖20克，$NaNO_3$ 3.5克，K_2HPO_4 1.5克，$MgSO_4$ 0.5克，KCl 0.5克，$FeSO_4$ 0.015克，琼脂15—20克，蒸馏水1,000毫升，pH 6.8。

C. Czapeck-Dox淀粉培养基：将Czapeck-Dox培养基中的蔗糖用30克可溶性淀粉代替，其它成份不变，pH 6.8。

D. 蛋白胨-淀粉培养基(%)：可溶性淀粉3，蛋白胨0.5，KH_2PO_4 0.1，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05，pH 3.0，McIlvaine缓冲液50（分开灭菌）。

结 果

一、330菌株的辐射诱变与筛选

（一）辐射剂量与分离用培养基对存活率、变异率的影响

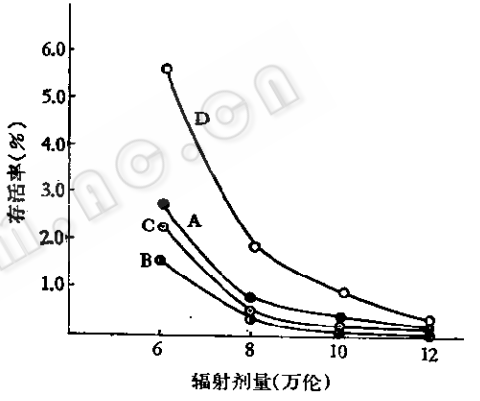

图1 辐射剂量、培养基对存活率的影响
存活率：辐射后的存活菌数与处理前的活菌数比值。

从图1看出：用营养较丰富的培养基D时的存活率最高，A次之，营养较贫乏的培养基C

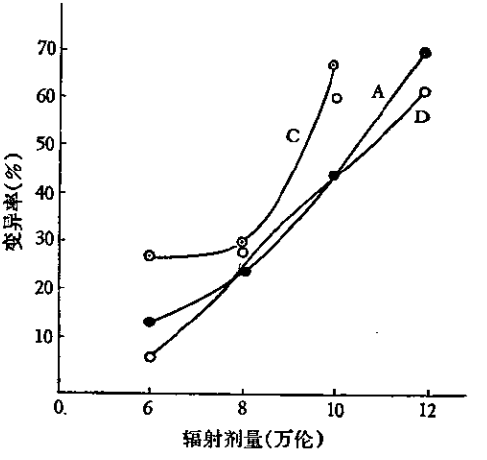

图2 辐射剂量、培养基对变异率的影响

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

及B最低。它们的变异率如图2所示。

从图2看出：用营养较丰富的培养基A及D时菌的变异率（辐射后外观形态改变的菌落数与总存活菌数的比值）非常接近，而且低于营养较贫乏的合成培养基C。然而从产量变异的正变株来统计，变异率高的贫乏培养基C却不是理想的分离培养基。诱变分离用的培养基应该采用营养较丰富的培养基为宜。如图3所示。

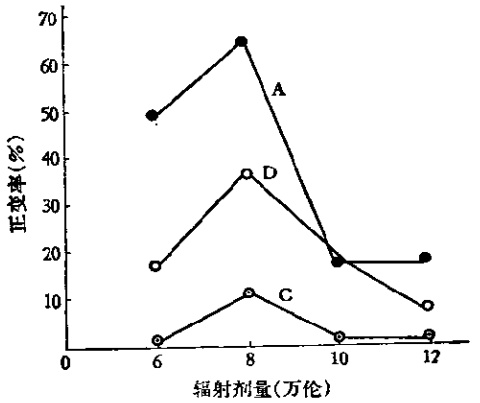

图3　辐射剂量、培养基对正变率的影响

正变率：即指比出发菌产量平均提高10%以上的变株数与总变异株数的比值。

从图3还可看出：辐射总剂量以8万伦为宜。此外，从负变率来看也证明采用贫乏培养基C是不适宜的。如图4所示：

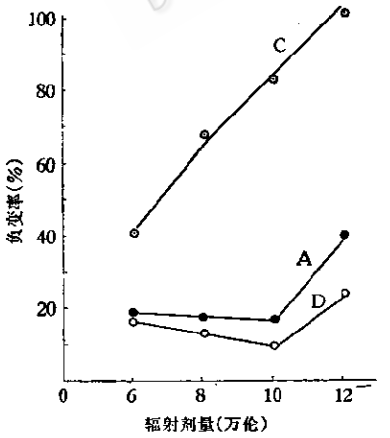

图4　辐射剂量、培养基对负变率的影响

负变率：指产量比出发菌平均低10%以上的变异菌数与总变异菌数的比值。

从图4看出：除培养基外，过高的辐射剂量是不适宜的。如在12万伦剂量下产生大量辐射损伤的不正常菌株，特别是不生孢子的变异株较多。这些菌株一般产量都很低。

（二）形态变异株与产量正变异的关系

对外观形态变异与产量的关系目前看法十分不一致。我们试验表明外观形态与产量有一定关系，如表1所示。

表1　变异菌的外观形态与产量正变率的关系

变异菌外观形态*	产量正变株占该形态总数的比值(%)
正常型(与出发菌形态相似)	7.0
菌落小、分生孢子穗大而稀少型	33.0
不生孢子型	0
孢子颜色改变型	14.3
菌丝颜色改变型	2.0
分泌色素型(总过筛变异菌为18株)	0
孢子穗细小而稠密型	3.3

* 不经注明者总过筛变异菌数不少于200株。

从表1可知：菌落小、分生孢子穗大而稀少的类型中出现的产量正变株为最多，其次是孢子颜色改变型和正常型。

（三）筛选方法

比较了下述三种筛选方法：

1. 形态筛选法：根据上述外观形态与产量关系，重点选取菌落小，分生孢子穗大而稀少型；正常型及孢子颜色改变型。

2. 碘显色法：采用上述分离培养基D，30℃培养三天。用碘试液（2*mM* 碘加入20*mM* 碘化钾的水溶液）显色，选取透明圈直径与菌落直径比值大者。

3. "浓缩"过滤法：将辐射后的孢子悬浮液移植于30毫升的察氏液中，30℃，静置培养18—24小时，滤去菌丝，滤液作分离用。

从表2看出，三种筛选方法都有一定效果，可以在筛选中结合起来使用。

表2　筛选方法与产量正变率的关系

筛选方法*	产量正变率(%)
形态筛选法(总过筛变异菌为141株)	19.1
碘显色法	28.6
"浓缩"过滤法	41.2

* 不经注明者总过筛变异菌数不少于200株。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

（四）筛选用摇瓶培养基

筛选用摇瓶培养基对筛选效率影响较大。我们在筛选中逐步摸索，得出下列较为适宜的摇瓶培养基：

麸皮 3.0 克，甘薯粉 2.0 克，$NaNO_3$ 0.3 克，米糠 0.5 克，蒸馏水 100 毫升。

上述培养基不但浓度适中，而且能够有效地控制绝大多数变种的生长 pH 在 4.5 左右(大多数变种有产酸倾向)，适宜于酶的生产和积聚。

我们应用此培养基，结合上述筛选诱变方法提出了下述的诱变筛选步骤，经过反复淘汰复筛，选出了优性变株 pr_3-6-10。

（五）诱变筛选步骤

出发菌株(330 菌株)
↓
孢子悬浮液
↓ ^{60}钴 γ-射线 8 万伦
浓缩过滤
↓ 稀释
培养基D分离
↓ 碘显色法、形态筛选法
初筛摇瓶(每株 1 瓶)
↓
复筛摇瓶(每株 2—6 瓶；复筛 4 次)
↓
传代试验(共试 10 代)
↓
工业生产条件及培养基选择试验
↓
酶液特性试验
↓
形态特征试验
↓
扩大生产试验

二、优性变株 pr_3-6-10的液体曲生产条件及工艺试验

1. 最适培养基的选择：从 88 种不同组成的培养基中，选出 pr_3-6-10 最适的工业培养基组成如下：

麸皮 3.0—4.0%，甘薯粉 1.0—2.0%，米糠 0.5%，$NaNO_3$ 0.1—0.3%，自然 pH。

2. 培养条件试验

(1) 接种量：采用麸皮3%，米糠0.5%，甘薯粉 1.0%，$NaNO_3$0.1% 的种子培养基。30℃，培养 24 小时。以不同接种量接入发酵培养基(麸皮3%，米糠0.5%，甘薯粉2.0%，$NaNO_3$0.3% 自然 pH)中，30℃ 培养 48 小时，结果如表 4 所示。

表 3 接种量对酶活力的影响

项目 \ 接种量(%)	2	5	10	15	20	30
酶活力(单位/毫升)	232	270	308	307	309	305

从表 4 可知接种量以 10% 以上为宜。

(2) 通风量：我们用 500 毫升三角瓶，以 100、150、200、250、300、350、400 毫升装液量进行比较，结果以 150 毫升为宜。

(3) 培养时间：从图 5 看出 pr_3-6-10 于培养 36 小时时酶活力已接近于高峰。而 330 菌一般要 64 小时以后才能接近高峰值。

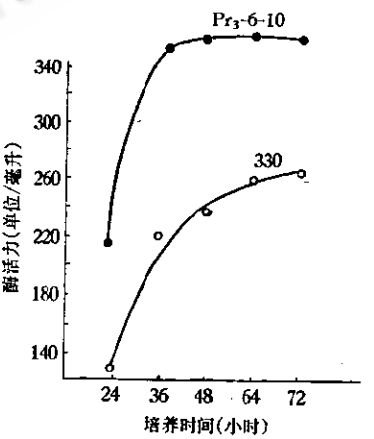

图 5 培养时间与酶活力的关系

3. pr_3-6-10 的粗酶液特性

(1) 不同作用 pH 对酶活力的影响

从图 6 可看出 pr_3-6-10 在 pH2.6 下仍然保持高酶活力，而 330 则大幅度下跌了。

(2) 酶液(培养液)的 pH-热处理

先把 pr_3-6-10 及 330 的酶液(培养液)调节至相似的糖化力，加 pH2.6 缓冲液于 50℃ 下保温 15 分钟，冷却，测定糖化力。结果如表 4 所示。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

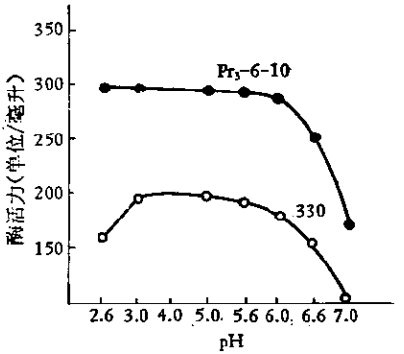

图 6　不同作用 pH 对酶活力的影响

表 4　酶液（培养液）pH-热处理对糖化力影响

菌　种	供试酶液酶活力（单位/毫升）	pH2.6-50℃ 处理 15 分钟	
		酶活力（单位/毫升）	损失(%)
330	101	82	18.0
pr_3-6-10	117	109	6.7

从表 4 看出 pr_3-6-10 的酶液较 330 能耐酸耐热。

讨　论

1. ^{60}钴 γ-射线诱变总剂量为 8 万伦时较适宜，在营养较丰富的分离培养基上，采用“浓缩过滤”筛选法并结合碘显色法及形态筛选法，能获得较高的筛选效率。

2. 采用上述筛选方法获得的变种 pr_3-6-10 在实验室中比出发菌株提高酶活力约 60%，培养时间缩短一倍，酶液又较能耐酸耐热。

3. 变株 pr_3-6-10 种子培养基：麸皮 3%，米糠 0.5%，甘薯粉 1.0%，$NaNO_3$ 0.1%。发酵培养基：麸皮 3.0—4.0%，甘薯粉 1.0—2.0%，米糠 0.5%，$NaNO_3$ 0.1—0.3%。30℃ 培养 36 小时，糖化力可达 300 单位/毫升以上。

参 考 文 献

[1] 富金原孝、黑田圭三：日本醱酵協会誌，18 (8) 17, 1960。
[2] 御園光信ら：日本醱酵研究所報告，15：1,1958。
[3] 御園光信ら：日本醱酵研究所報告，15：9,1958。
[4] 御園光信ら：日本醱酵研究所報告，20：37,1961。
[5] 御園光信ら：日本醱酵研究所報告，21：51,1962。
[6] 渡部，富金原：日本醱酵工学雑誌，41(12),641,1963。
[7] 大谷義夫，高橋慧ら：日本醱酵工学雑誌，35：397, 1957。
[8] 大谷義夫、高橋慧ら：日本醱酵工学雑誌，35：434, 1957。
[9] 上海市轻工业研究所等：应用液体曲制造酒精的研究，科技卫生出版社，1958。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn