

# 根霉菌 F6 的分离复壮研究

张凤英<sup>1</sup> 朱江<sup>2</sup> 罗秋水<sup>1</sup>

(1.江西农业大学食品科学与工程学院,江西 南昌 330045; 2.江西省轻工业研究所,江西 南昌 330002)

**摘要:** 从活化液的选择、改变分离操作方法、选择有效菌落三方面进行了根霉菌 F6 的分离复壮研究。结果表明,用 PDA 营养液代替生理盐水作根霉 F6 分离源的活化液、制备孢子悬浮液时不用玻璃珠击打分散、分离培养 16 h 后选择直径为 0.8 ~ 1.0 cm 的菌落(菌丝稀疏型)为初筛对象,比较容易获得复壮菌株。

**关键词:** 微生物; 根霉 F6; 分离; 复壮; 孢囊孢子

中图分类号:TS261.1,Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2006)10-0023-04

## Study on the Separation and Rejuvenation of Rhizopus F6

ZHANG Feng-ying<sup>1</sup>, ZHU Jiang<sup>2</sup> and LUO Qiu-shui<sup>1</sup>

(1.Department of Food Science and Engineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang, Jiangxi 330045;

2.Institute of Light Industry of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330002, China)

**Abstract:** The separation and rejuvenation of rhizopus F6 was studied from three aspects: selection of activate fluids, change of separation methods, and selection of effective colonies. The results suggested the followings: PDA nutrient fluid instead of physiological saline used as activate fluids for rhizopus F6 separation, no striking by glass bead during the preparation of spore suspend solution, and selection of colony (diameter as 0.8 ~ 1.0 cm) for preliminary screening after 16 h separating culture which could obtain rejuvenated strains more easily.

**Key words:** microbe; Rhizopus F6; separation; rejuvenation; sporangiospore

根霉可产生淀粉酶、糖化酶,其淀粉液化力强,能作用原料产生酒精和芳香脂类物质,是酿酒工业的重要菌种。在食品发酵工业上是用来分解淀粉、蛋白质生产黄酒、白酒、醋、豆腐乳、乳酸等产品的重要微生物<sup>[1]</sup>。

F6 是从广东肇庆传统小曲中分离、纯化得到的一株优势霉菌,经鉴定 F6 为根霉属(*Rhizopus Ehrenberg*)、米根霉种(*Rhizopus oryzae*)。F6 不仅糖化酶活力强,而且所酿之酒具有独特的风味,现已在广西、广东、湖北、海南等地的酒曲厂得到广泛应用。

根霉 F6 在保藏过程中由于传代次数过多或受环境的污染而容易退化,为防止其退化,生产上常常对 F6 进行分离复壮。可是分离复壮历时长、操作复杂烦琐,且往往事半功倍,效率较低。因此本文从活化液的选择、改变分离操作方法、如何选择有效菌落三方面对根霉菌 F6 进行分离复壮的研究。

在分离过程中通常会出现 3 类形态的菌落。其形态分别为:圆形(菌丝浓密、直径 1.3 ~ 1.7 cm),不规则形

状(菌丝稀疏、直径 0.8 ~ 1.0 cm),树枝形状(菌丝极少、主干菌丝长 0.2 ~ 0.5 cm)。本文对这 3 种形态的根霉菌落进行了转接培养研究,并比较了它们的生长速度、繁殖特征、成活率及糖化能力。以避免在挑取分离菌落时眉毛胡子一把抓,盲目挑取大量效果不好的菌落去做生产性能的测定,从而在分离复壮工作中少走弯路、目的性强、降低工作强度,并以较快的速度获得复壮菌株,从而达到提高菌种分离复壮效率的目的。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

F6 根霉菌样:江西农业大学食品系保存,保存期为半年。

培养基原料:马铃薯、米粉、麸皮、琼脂,均为市售。

试剂:NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaCl, 均为分析纯。

#### 1.2 实验仪器

基金项目:江西省科技厅重点新产品项目 20041C1013000。

收稿日期:2006-07-03

作者简介:张凤英(1964-)女,江西宜春人,学士,副教授,主要从事食品发酵研究,发表论文 10 多篇。

显微摄像目镜、折光仪、高压灭菌锅(W52- 84- 64)、恒温培养箱(HH- BLL- 600)、恒温水浴锅(HH- 4)、超净工作台等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分离活化液的选取

分别称取4份1g根霉曲经蔡氏麸皮培养液、PDA培养液、生理盐水、无菌水4种不同培养液活化后,然后分别用该活化液稀释涂布分离到平板培养基中,计算菌落总数,并据此选出最佳的活化液。

#### 1.3.2 分离方法

取1g F6根霉曲用合适的活化液活化,摇荡几分钟制成孢子悬浮液后,再稀释涂布于PDA平板上,再放于30~32℃的培养箱中培养12~16h后,将各种形态的单菌落转移于空白平板培养基中培养观察。

#### 1.3.3 根霉曲的制备方法

将麸皮和水以2:1进行混合,分装到三角瓶中,经高压灭菌后,将分离培养好的每株菌分别接种到相应的三角瓶中,于30~32℃培养2d后,拔出麸皮培养物装入菌种袋中,低温烘干。

#### 1.3.4 糖化酶活力的测定方法见文献[6]。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离复壮用活化稀释液的确定

称取4份1g F6根霉曲分别用蔡氏培养液、PDA培养液、生理盐水和无菌水活化后,制备成合适浓度的根霉孢子悬浮液后分别涂布于分离平板培养基中,每种活化液涂10个平板。结果见表1。

表1 用不同活化液分离长出的菌落数

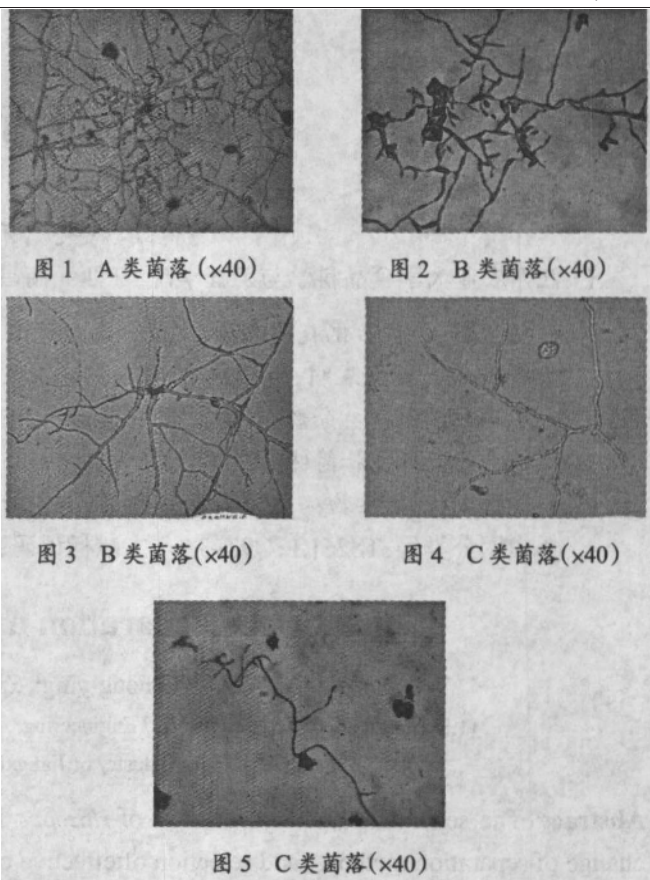
活化液稀释液	总菌落数
PDA培养液	63
蔡氏培养液	39
生理盐水	26
无菌水	17

由表1可知,经PDA培养液活化后,稀释分离长出的菌落数最多,说明根霉的休眠孢子在PDA活化液中活化率高,因此在以下的稀释分离操作中均选用PDA培养液为活化液。

### 2.2 孢子悬浮液经稀释涂布分离培养后的菌落形态

F6孢子悬浮液涂布分离培养16h后长出许多不同形态的根霉菌落,其显微镜观察照片见图1~图5。

根据图1~图5结果,笔者将各种菌落归纳为3类:图1为A类菌落即菌丝从圆心处向四周呈放射状生长的圆形状;图2,图3为B类即菌丝呈不规则形状或不规则圆弧形;图4,图5为C类即菌丝呈树枝状。A类为菌丝浓密;B类为菌丝稀疏;C类为菌丝极



少,主干菌丝往往只有1~2根。

### 2.3 3类形态菌落的生长繁殖情况

F6孢子悬浮液涂布分离培养16h后,分别将上述各种不同形态的菌落连同培养基整个转移到空白平板培养基中继续恒温培养观察32h。A类选取了10个,B类选取了10个,C类选取了20个(一般A,B类较少,C类较多)。结果如下:

#### 2.3.1 3类菌落在培养过程中的大小变化

3类菌落在转移时,A类直径为1.3~1.7cm;B类为0.8~1.0cm;C类肉眼可见菌丝长0.2~0.5cm。

3类菌落在培养过程中的直径变化结果见表2。

表2 菌落转移后的直径变化

培养时间(h)	A(cm)	B(cm)	C(cm)
0	1.3~1.7	0.8~1.0	0.2~0.5
4	5.2~5.9	3.5~4.1	无变化
8	6.9~7.2	5.1~7.1	无变化
12	覆盖整个平板	覆盖整个平板	无变化

注: # 指主干菌丝长度。

由表2可知,在转移培养4h内,B类菌落由于转移时菌丝稀疏、菌丝繁殖点少,所以其长势更慢一点,但培养8h后A、B类菌落的长势就基本一致,这表明B类菌落比A类菌落的匍匐菌丝的繁殖速度更快些。C类未生长,表明C类菌落易夭折,繁殖力差。

#### 2.3.2 3类菌落在培养过程气生菌丝生长情况(表3)

表 3 菌落在培养过程中气生菌丝生长情况

菌落类型	培养时间(h)							
	4	8	12	16	20	24	28	32
A	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
B	+	+	+	+	++	++	+++	+++

注: + 有气生菌丝, ++有较多气生菌丝, +++ 有大量气生菌丝。

由表 3 可知, A 类菌落在培养 4 h 后就长出了气生菌丝; B 类菌落培养 8 h 后也长出气生菌丝, 且随着培养时间的延长, 气生菌丝越长越多。培养 32 h 后 A 类菌落的气生菌丝浓密而细小, 略显衰老; B 类菌落的菌丝疏密有致、粗壮光鲜(见图 6, 图 7)。C 类菌落无生长。

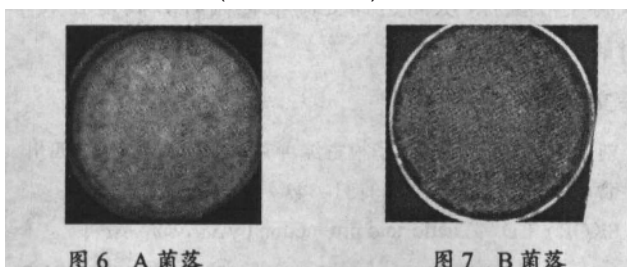


图 6 A 菌落

图 7 B 菌落

### 2.3.3 菌落在培养中黑孢子的生长情况(见表 4)

表 4 菌落在培养过程中黑孢子的生长情况

菌落类型	培养时间(h)							
	4	8	12	16	20	24	28	32
A			*	**	**	**	***	***
B			*	*	*	**	**	**

注: \*少数黑孢子; \*\*多数黑孢子; \*\*\*大量黑孢子。

由表 4 可知, A, B 类菌落在继续培养 12 h 后都开始长出黑孢子, 但随着培养时间的延长, A 类菌落长的黑孢子更多更密; 与菌落的气生菌丝生长情况一致, 这是因为黑孢子是由气生菌丝生长分化而来的。

### 2.4 A, B 菌落繁殖出来的菌株糖化力比较

将上述菌落转接繁殖出来的 24 株根霉菌分别制成麸皮曲, 并测其糖化力, 测定结果见表 5。

表 5 菌株的糖化酶活力 (u/g)

菌株编号	A 菌		B 菌	
	菌株编号	A 菌	B 菌	菌株编号
1#	1013	1362	7#	1187
2#	1230	1500	8#	1233
3#	1150	1363	9#	1240
4#	1135	1378	10#	1028
5#	1046	1155	平均值	1139
6#	1132	1310		1330

由表 5 可知, B 类菌落繁殖出来的菌株糖化力普遍比 A 类菌落高。

为什么 A 类菌落生长的气生菌丝和黑孢子更多更密, 其菌株糖化力反而更低, 笔者分析可能是因为 A 类菌落起始菌丝较浓密, 所以在转接培养后繁殖很快, 使菌丝迅速增多, 可平皿中的营养物质是一定的, 菌体繁殖过快导致菌体因营养缺乏而生长不良, 因此菌丝瘦弱

衰老, 糖化性能差。而 B 类菌落起始菌丝疏密有致, 生长速度适当, 菌体生长发育良好, 菌丝粗壮, 所以其繁殖出的菌株糖化力较强。

综上所述, 要通过分离复壮得到糖化力较强的根霉菌株, 就必须使稀释分离平板上的 B 类菌落尽可能的多一些。如何增加分离平板上的 B 类菌落数呢? 必须弄清楚根霉的孢囊孢子在孢子悬浮液中的存在状态, 因此笔者做了如下观察。

### 2.5 根霉孢囊孢子子在孢子悬浮液中的存在状态

取一滴适度稀释后的根霉孢子悬浮液于载玻片上, 盖上盖玻片于显微镜下观察, 观察结果见图 8~图 10。从图 8~图 10 中可知, 孢子悬浮液中的孢囊孢子是以单孢囊孢子和不同数量的孢囊孢子组成的孢子团的形式存在的。因此笔者推测, A 类菌落为较大孢囊孢子团萌发菌丝生长而成, B 类菌落为较小孢囊孢子团萌发菌丝生长而成, 而 C 类菌落为几个孢囊孢子组成的孢子团或单孢囊孢子萌发而成。所以要使稀释分离平板上的 B 类菌落尽可能的多一些, 就必须使待分离的孢子悬浮液中孢囊孢子团的数量多一些。

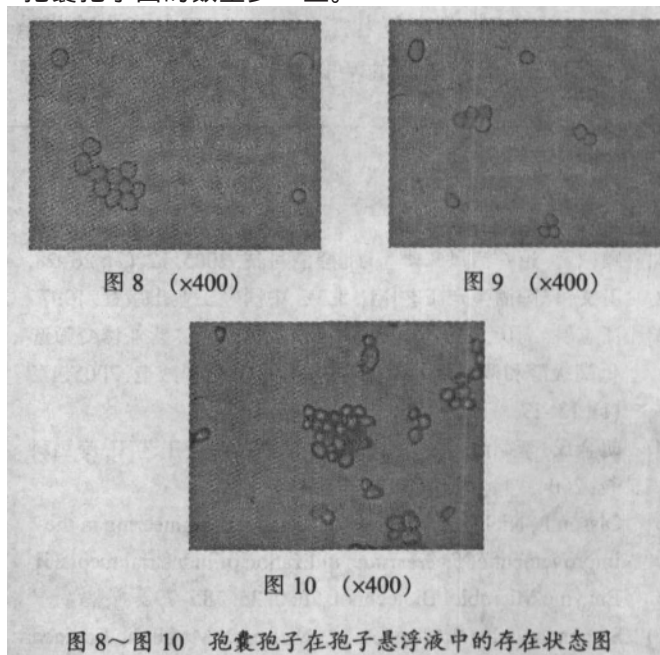


图 8 (x400)

图 9 (x400)

图 10 (x400)

图 8~图 10 孢囊孢子子在孢子悬浮液中的存在状态图

### 2.6 玻璃珠的击打对 3 类菌落数量的影响

笔者考虑到通过平常的玻璃珠摇荡击打制备孢子悬浮液时可能会打散许多孢囊孢子团, 所以又做了以下探讨。

取 2 份 1 g F6 根霉菌活化后, 分别加入装有玻璃珠和无玻璃珠的小三角瓶中, 摇荡几分钟制成孢子悬浮液后, 再分别稀释涂布于 PDA 平板上, 再放于 30~32 培养箱中培养 12~16 h 后, 观察计算 3 类菌落的数量, 结果见图 11。

由图 11 可看出, 未用玻璃珠击打过的根霉孢子悬

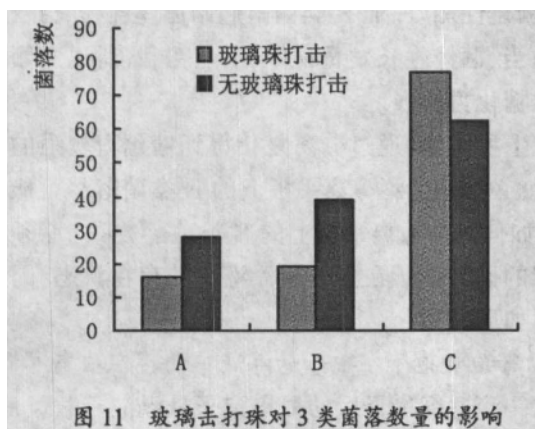


图 11 玻璃击打珠对 3 类菌落数量的影响

浮液分离培养后萌发的 A, B 类菌落比用玻璃珠击打过的明显更多。C 类菌落则是用玻璃珠击打过的更多。

从 2.4 可知, B 类菌落繁殖出来的菌株菌丝疏密有致、粗壮、糖化力也较高, 生长速度也较快, 因此在根霉菌的分离纯化复壮工作中不采用玻璃珠击打震荡的方法来制备孢子悬浮液, 分离复壮的成功率会更高, 更易分离到复壮菌株。

### 3 结论

在对根霉 F6 分离复壮工作时, 用 PDA 营养液代替生理盐水作根霉分离源的活化液, 制备稀释分离孢子悬

浮液时不用玻璃珠击打分散, 分离培养 16 h 后选择直径为 0.8~1.0 cm 的菌落为初筛对象较容易获得复壮菌株。因为分离源经玻璃珠震荡分散后, 玻璃珠会打散许多孢子团, 使得根霉孢囊孢子绝大部分以单孢子或由 2~3 个孢囊孢子组成的孢子团的形式存在, 而它们萌发菌丝生长而成的微菌落被转移后又易夭折, 从而很难分离到复壮菌株。另外分离培养后在挑取初筛菌落时, 由于有了较强的针对性, 目标明确, 避免盲目挑取大量的菌落去做生产性能的测定, 从而在分离选育工作中可少走弯路、节省实验原料、降低工作强度, 并以较快的速度获得复壮菌株, 从而达到提高根霉菌种分离复壮效率的目的。

### 参考文献:

- [1] 刘云秀, 刘清斌, 周健. 华根霉纯种筛选的初步研究[J]. 四川食品与发酵, 2003, 39(3): 31-34.
- [2] SKORY CD. Lactic acid production by *Saccharomyces Cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(8): 22-27.
- [3] 唐丽杰. 微生物实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2005.
- [4] 陈卫平. 制曲工艺[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1993.

(上接第 19 页)

### 参考文献:

- [1] 顾国贤. 论啤酒风味类型[J]. 酿酒科技, 2005, 128(2): 26-28.
- [2] 王文甫. 啤酒生产工艺[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 汪志君, 高庆, 方维明, 姜涌明, 颜荣林, 周红. 紫外诱变筛选低高级醇和双乙酰含量的啤酒酵母[J]. 中国酿造, 2005, 142(1): 13-17.
- [4] 胡金成, 李德超, 曹又新. 低嘌呤啤酒的酿造工艺[J]. 啤酒科技, 2004, (11): 10-11.
- [5] Olsson L, Nielsen J. The role of metabolic engineering in the improvement of *S. cerevisiae*: utilization of industrial media[J]. Enzyme Microbiol Biotechnol, 2000, 26: 785-792.
- [6] Stephanopoulos G, Aristos AJ, Nielson J. Metabolic Engineer-

ing-Principles and Methodologies[M]. 赵学明, 白冬梅译. 北京: 化学工业出版社出版, 2003.

- [7] Liao JC, Hou SY, Cho YP. Pathway analysis engineering and physiological considerations for redirecting central metabolism[J]. Biotechnol Bioeng, 1996, 52(1): 129-140.
- [8] 白冬梅, 付卫明, 赵学明, 代海霞, 李鑫刚, 徐世民. 代谢通量分析优化米根霉 R1021 发酵生产 L(+)-乳酸过程[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6): 554-558.
- [9] A. Vanrolleghem, J.J. Heijnen. A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58(2&3): 133-138.

(上接第 22 页)

杂交株的产酒精能力和耐渗性均比亲株有所提高, 通过此方法可以达到合并工业菌株特性的目的。

### 参考文献:

- [1] 肖冬光, 等. 酒精废液回用理论的探讨[J]. 酿酒科技, 2001, 108(6): 76-78.
- [2] A.N. 格拉泽, 等著. 陈守文, 等译. 微生物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

- [4] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [5] 天津轻院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [6] 朱旭芬, 等. 酿酒酵母产孢条件及核倍性分析[J]. 科技通报, 2002, 18(5): 393-397.
- [7] 祖若夫, 等. 微生物学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [8] 王梅, 张彭湃, 等. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.