

# 用紫外綫及氮芥誘发黑曲霉 變異的研究

檀耀輝 王承珍 姜錫瑞

(无錫輕工業學院, 无錫)

用強烈因素誘发微生物菌種的變異, 在發酵工業上已獲得良好效果<sup>[1-8]</sup>。許多學者如斯宏生 (Swanson)<sup>[9]</sup>、李鍾慶、方心芳<sup>[10]</sup> 及 B. Б. 柯托夫 (Котов)<sup>[11]</sup> 等認為用兩種強烈因素聯合處理菌種比用一種因素單獨處理菌種的效果好。我們在本文中報道試用紫外綫及氮芥聯合處理黑曲霉的成果, 並獲得了生產澱粉酶能力更強、生長速度更快的新變種。

## 實驗材料及方法

### (一) 菌種

1. *Aspergillus usami*, 編號 3024 (上海酒精廠贈)。
2. *Aspergillus niger*, 編號 3025 (我院<sup>[13]</sup>从无錫水稻上分離的)。
3. *Aspergillus usami* 變種滬輕 II 號, 編號 3026 (上海酒精廠贈)。

以上三菌種的形態及生理特性均見原報<sup>[12,13]</sup>。試驗前, 菌種都用平板分離純化。

### (二) 培養基

1. 分離及斜面培養基: 米曲汁 8Brix, 琼脂 2%, pH 5.5—6.0。
2. 初篩培養基: 可溶性澱粉 0.1%; 磷酸二氫鉀 0.2%; 琼脂 2—2.5%; pH 5.5—6.0。
3. 精選培養基: 麸皮加自來水(1:1)。

### (三) 實驗方法

1. 孢子懸浮液用無菌磷酸鹽緩沖液 (pH 6.0) 制成, 使孢子濃度達  $2-3 \times 10^4$  個/毫升, 并使單一狀態的孢子數量達到 95% 以上。

#### 2. 紫外綫的照射條件與方法

(1) 紫外綫的光源為管長 30.5 厘米的滅菌燈, 裝在無菌箱內, 波長主要為 2537 Å, 功率 15 瓦, 電源 220 伏。

(2) 照射時間為 0.5、1、1.5、2、2.5、3 分鐘; 照射距離為 15 厘米。

(3) 靜止照射 于 9 厘米的無菌培養皿內注入 10 毫升琼脂培養基, 俟凝固後, 注入 8 毫升上述孢子懸浮液, 放在復有黑布的無菌箱內, 在紫外綫燈下進行照射。

3. 平板分離和活計數 照射後取各個培養皿中試液 0.1 毫升, 加入盛有 10 毫升曲汁琼脂的試管中, 混勻後, 傾入無菌培養皿中, 于 30℃ 進行培養。另取原孢子懸浮液, 稀釋 50 倍, 作為對照培養。培養 2 天左右, 選每個培養皿中所長出的菌落約為 30—40 個的培養皿, 進行計算菌落總數目與變異菌落數目, 記錄變異菌落的形態, 並計算存活率及變異率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{被照射液中存活菌落数}}{\text{对照液中长出的菌落数}} \times 100$$

$$\text{变异率} = \frac{\text{变异菌落数}}{\text{存活菌落数}} \times 100$$

$$\text{稀释倍数} = \frac{20000}{40} \times 0.1 = 50$$

4. 氮芥处理 取上述孢子悬浮液按照宇佐美方法<sup>[9]</sup>处理。

5. 菌落的选择 经紫外线照射及氮芥处理后的菌种在培养基上长出的菌落, 凡分生孢子头的颜色, 菌落直径大小, 菌落背面的皱纹, 分泌的色素, 气菌丝长短及分生孢子密度与对照培养不同者, 均视为变异菌落。

#### 6. 筛选

(1) 初筛 在直径 9 厘米的无菌培养皿中注入 10 毫升初筛培养基, 使其凝成平板。用直径 6 毫米的木塞钻孔器挖出变异菌落块, 移置上记本板上, 于 40℃ 保温 16 小时后, 喷射 0.01 N 碘液, 菌落周缘可出现直径不同的透明圈。

(2) 精选 取透明圈最大的菌株用精选培养基作成麸曲 (30℃ 培养 48 小时)。再用 Willstrier-Schudel 法<sup>[14]</sup>测定麸曲糖化力。

## 实验结果与讨论

### (一) 紫外线照射时间与存活率及麸曲糖化力的关系(见下表)。

表 1 照射时间与存活率及麸曲糖化力变化的关系

菌 种 名 称	照射时间(分)	0*	1	2	3
	项 目				
<i>Asp. usamii</i> (3024)	菌 落 数	2050	33	30	27
	存活率(%)	100	1.6	1.45	1.3
	糖 化 力**	134	139	145	150
<i>Asp. niger</i> (3025)	菌 落 数	850	23	15	2
	存活率(%)	100	2.7	1.77	0.25
	糖 化 力	113	117	125	132
<i>Asp. usamii</i> 变种沪轻 II 号 (3026)	菌 落 数	900	20	17	1
	存活率(%)	100	2.2	1.9	0.11
	糖 化 力	170	160	159.5	163

\* 照射时间 0 分为对照试验;

\*\* 每毫升 10% 麸曲浸出液糖化淀粉所得葡萄糖毫克数。

从上表可以看出, 3 菌种中前 2 种在紫外线照射 3 分钟时糖化力最高。继续延长照射时间糖化力是否再能提高, 有待进一步试验。后一种即沪轻 II 号, 经紫外线照射后糖化力没有提高。水稻黑曲霉 (*Asp. niger*) 原本是野生菌种, 糖化力较低, 但经紫外线照射后, 糖化力提高较快。*Asp. usamii* 原有糖化力较高, 照射后糖化力更显著提高。因此我们选定该菌种经 3 分钟照射后糖化力最高的菌株, 定名为 *Asp. usamii* U<sub>1</sub>, 作为以后试验的菌株。

## (二) 紫外线照射对黑曲霉形态变异的规律

上述 3 种黑曲霉經紫外线 3 次重复照射,并經平板分离数次結果,发现它們形态变异有下列几类: (1) 孢子很多、紧密、顏色棕黑,气菌絲較短。(2) 孢子很少、菌絲浅黄、菌落背面有皺紋。(3) 孢子較少、头較大,菌落背面鮮黄色。(4) 孢子較少,菌落背面乳白色或混有黄色。(5) 孢子穗黑色、較大、菌落直径很大,背面有皺紋,气菌絲較长。

这些不同形态的菌落,經過初篩和精选的結果,发现如下規律,凡气菌絲較短,孢子着生少或不生孢子的菌落,糖化力最低;几乎无气菌絲帶潮湿的菌落則沒有糖化力;气菌絲长,孢子头較大,顏色較黑的菌落,糖化力較強。我們选用的菌株即属于糖化力最強的第五类菌落。

(三) 氮芥处理時間对 *Asp. usamii* U<sub>1</sub> 的存活率、变异率及糖化力的影响 (如下表)。

表 2 氮芥处理時間对 *Asp. usamii* U<sub>1</sub> 的存活率及变异率的关系

处 理 时 間 (分)	存 活 率 (%)	变 异 率 (%)	备 注
0	100	0	原菌株糖化力为 121.5
5	50	20.6	
10	20	32.5	
15	10	46.3	
20	5	64.5	
25	2.5	75.0	其中有一株糖化力为 134

从表 2 看出, *Asp. usamii* U<sub>1</sub> 經氮芥处理后,死亡率和变异率是随着处理的时间增加而增加。初篩和精选后糖化力变化規律不明显。菌落有分泌鮮黄色素較多的,也有分泌粉紅色素和背面产生梅花状皺紋的菌落。从氮芥处理 25 分鐘的变异菌落中分出一株具棕黑色孢子,不产生色素的菌株。这一菌株的糖化力比原株 *Asp. usamii* U<sub>1</sub> 高 15% 左右,定名为 *Asp. usamii* U<sub>1</sub>N<sub>10</sub>。

(四) 紫外线照射時間对 *Asp. usamii* U<sub>1</sub> 及 *Asp. usamii* U<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 的存活率、变异率和糖化力的影响(如表 3)。

从表 3 看出,两个菌种的死亡率和变异率都是随着照射时间的增加而增加,但是它們糖化力变化显然不同。*Asp. usamii* U<sub>1</sub> 的糖化力有增加,有减少,說明紫外线連續处理效果不明显。随着照射时间的延长, *Asp. usamii* U<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 的糖化力逐渐提高,在 3 分鐘照射后,其中有一菌株糖化力比原菌株 *Asp. usamii* U<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 高 16% 左右,我們把該菌株定名为 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>10</sub>。

(五) 各个变异菌株、原种 *Asp. usamii* 和沪輕 II 号糖化力的比較。

再在同一条件下把上記各变种、原种 *Asp. usamii* 及沪輕 II 号制成麸曲,并測定糖化力,結果如表 4。

从表 4 知,变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 的糖化力比原种提高了 20.1%,比沪輕 II 号高 5.16%。

(六) 在制曲过程中变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 与原种 *Asp. usamii* 淀粉酶生成动态的比較。

表 3 紫外照射时间对 *Asp. usarii* U<sub>1</sub> 及 *Asp. usarii* U<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 的存活率、变异率和糖化力的关系

菌 种 名 称	照射时间 (分)	生成菌落数	存 活 率 (%)	变异菌落数	变 异 率 (%)	糖化力变化*
<i>Asp. usarii</i> U <sub>1</sub>	0	800	100	0	0	117
	0.5	21	2.6	2	9.5	112
	1.0	15	1.9	2	13.3	108
	1.5	11	1.4	2	18.0	115
	2.0	7	0.9	2	28.6	112
	2.5	5	0.6	3	60.0	113
	3.0	1	0.105	1	100	120
<i>Asp. usarii</i> U <sub>1</sub> N <sub>1</sub>	0	1400	100	0	0	99
	0.5	24	1.7	3	12.5	101
	1.0	19	1.4	3	15.8	101.5
	1.5	11	0.9	2	18.2	102
	2.0	7	0.5	3	43.0	107
	2.5	3	0.2	2	66.7	109
	3.0	3	0.2	3	100	116

\* 表中两个菌种的糖化力是用各自同一批的曲来比较的。

表 4 原种 *Asp. usarii* 与各变种及沪轻 II 号糖化力的比较

项 目 \ 菌 种	原 种 <i>Asp. usarii</i>	<i>Asp. usarii</i> U <sub>1</sub>	<i>Asp. usarii</i> U <sub>1</sub> N <sub>1</sub>	<i>Asp. usarii</i> U <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	沪 轻 II 号
糖化力	98	101.5	112.5	117	111.5
对原种增加率(%)	0	4.02	15.3	20.1	14.1
对沪轻 II 号增减率(%)	-12.4	-8.9	0.9	5.16	0

变种 *Asp. usarii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 与原种 *Asp. usarii* 在同一条件下并接工厂操作各制成 2 个曲盒的麸曲(麸皮加水比 1:1, 装盒曲层厚 2 厘米, 接种菌龄 5 天, 接种量 0.5%)。从每盒中定时取样测定水分、酸度、pH 及糖化力, 结果如图 1、2、3 所示。

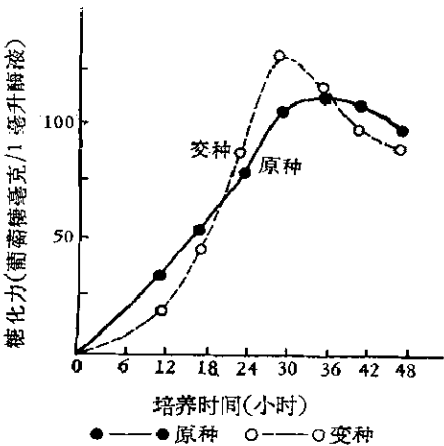


图 1 原菌株及变异株 *Asp. usarii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 在制曲过程中淀粉酶生成动态曲线。

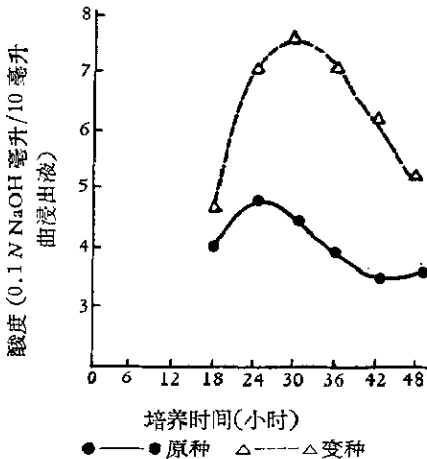


图 2 原菌株及变异株在制曲过程中酸度变化曲线。

从图看出,变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 比原种 *Asp. usamii* 糖化力高 20% 左右,糖化力高峯到达比原种早 6 小时,也就是说从接种到出曲,原种需 36 小时,变种只需30小时,制曲时间缩短 1/6。变种产酸量比原种高 63.4%,这对防止杂菌,改进淀粉酶的抗酸能力都有好处。

(七) 原种 *Asp. usamii* 和变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 的形态特征比较

将原种 *Asp. usamii* 及变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 两个菌株在曲汁琼脂培养基上于 30℃ 培养 4 天,菌落形态有如下区别:

1. 原菌株 菌落直径 40 毫米,分生孢子头球形,灰黑色、菌丝灰白色,菌丝与孢子相间生长,形成很多同心环,菌落背面棕黄色,无皱纹(图 4)。
2. 变异株 菌落直径 35 毫米,分生孢子头比原菌株大,球形、黑色、着生比原菌株密。菌丝淡黄色。菌落边缘与中央部分有些突起,菌落正面和背面均呈皱纹状,分泌黄色素于培养基中,菌落周围白边比原菌株宽(图 5)。

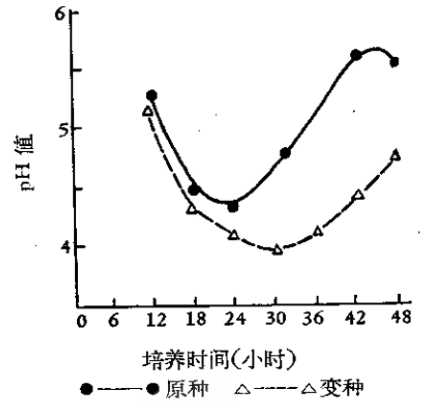


图 3 原菌株与变异株在制曲过程中 pH 值变化曲线。

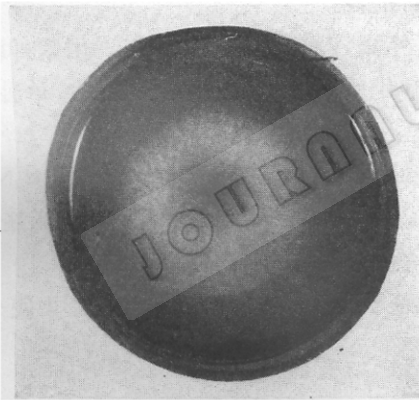


图 4 原菌株 *Asp. usamii* 的菌落形态 (培养 60 小时)。

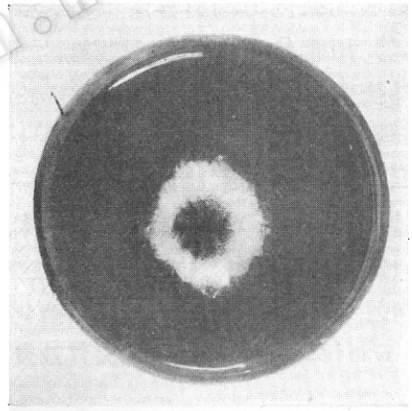


图 5 变异株 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 的菌落形态(培养 60 小时)。

两菌株的分生孢子柄表面光滑,内部均质透明,顶囊球形呈淡棕色;梗子在顶囊周围

表 5 原菌株与变异菌株的各器官的大小

器官名称	菌种名	各器官的大小 (微米)	
		原菌株 <i>Asp. usamii</i>	变异株 <i>Asp. usamii</i> U <sub>2</sub> N <sub>1</sub>
分生孢子柄		1000—1200×19—22	660—990×13.2—16.5
顶囊		50—79	60—66
第一列梗子		16—20×3.5—4.5	19—26×4.0—5.0
第二列梗子		9—10×2.5—3.0	12—15×3.2—3.5
分生孢子		3.5—5.0	3.3—5.0
分生孢子头		122—132	130—215

呈放射状,有二列,第一列棍棒形,第二列椭圆形。两菌株各种器官大小如表 5。

### (八) 透明圈直径与糖化力的关系

在进行诱发黑曲霉变异前,使用木塞钻孔器挖出琼脂菌落块移植到含有 0.1% 可溶性淀粉的琼脂培养基上,在 40℃ 保温 16 小时后,用碘液显出透明圈。透明圈直径与糖化力大小的关系如表 6。

表 6 透明圈直径与糖化力的关系

第一次试验	透明圈直径(毫米)	19	20	21	21.5	22
	糖 化 力	99	101	111	113.5	114.5
第二次试验	透明圈直径(毫米)	13.5	14.0	14.5	15	15.5
	糖 化 力	113	116	119	121.5	134

从表 6 看出,两次试验都表示透明圈直径大小与糖化力的大小成正比例。这说明在选育过程中,我们所用的初筛方法是正确的。

## 摘 要

(一) 用紫外线处理黑曲霉 *Asp. usamii*, *Asp. niger* 及 *Asp. usamii* 变种沪轻 II 号时,前两者的糖化力均有显著提高,后者基本上没有提高。

(二) 用紫外线氮芥联合处理的效果比单用紫外线连续处理的效果好,用紫外线-氮芥-紫外线交叉处理,可以使 *Asp. usamii* 变种的糖化力比原种提高 20% 左右,单独用紫外线连续处理只提高 8%。

(三) 我们这次通过紫外线-氮芥-紫外线联合处理所得的变种 *Asp. usamii* U<sub>2</sub>N<sub>1</sub> 糖化力比原种 *Asp. usamii* 提高了 20%,生酸能力提高了 63.4%,达到糖化力最高峰的时间比原种缩短了 1/6。对生产来说,这些都是有利条件。

(四) 我们设计的透明圈初筛糖化菌种的方法证明是有效的。用这一方法可使一般初筛方法简化得多,且不会漏脱有效变种。

## 参 考 文 献

- [1] Anderson, R., et al.: *Ind. Eng. Chem.*, **45** (4): 768, 1953.
- [2] Soltero, F., et al.: *Appl. Microbiol.*, **2** (1): 41, 1954.
- [3] Dulaney, E., *Mycologia*, **45** (4): 481, 1953.
- [4] 井口等: 农艺化学会志, **23**: 16, 1949, **24**: 357, 1950.
- [5] 堀井、寺田、渡边: 发酵协会志, **8**: 79, 1950.
- [6] 饭塚等: 农艺化学会志, **26**: 71, 1952, **28**: 972, 1954.
- [7] 饭塚等: 农艺化学会志, **35**: 1218, 1961.
- [8] 宇佐美昭次等: 发酵协会志, **18** (5): 231, 1960.
- [9] Swanson, C. P.: *J. Cell Comp. Physiol.*, **39**: 127, 1952.
- [10] 李钟庆、方心芳: 微生物学报, **6**(3): 321, 1958.
- [11] Котов, В. Б.: *Спиртовой промышленность*, **3**: 7, 1963.
- [12] 檀耀辉等: 无锡轻工科研汇编, 1961.
- [13] 坂口、饭塚、山崎: 应用菌学, **3**: 54, 1949; **4**: 1, 1950.
- [14] Willstater-Schudel: *Ber.*, **51**, 780, 1918.

## STUDIES ON THE MUTATION OF *ASPERGILLUS NIGER* WITH ULTRAVIOLET RAY AND NITROGEN MUSTARD

TAN YAO-HUI, WANG CHEN-ZEN AND JIANG XI-RUI

(*Light Industrial College of Wu-Sih, Wu-Sih*)

By the irradiation of ultraviolet ray and treatment with nitrogen mustard on the original strain of *Asp. usamii* 3024, one mutant strain of *Asp. usamii*, U<sub>2</sub>N<sub>1</sub>, was obtained. This mutant was found to have the following properties:

1. The amylolytic power and acid-producing power were higher than its parent strain as shown in Table 5.
2. It was a fast growing strain in mold bran preparation.