

# 用琼脂柱筛选麦角隐亭产碱菌株

钱秀萍 冯慧琴 杨庆尧

(上海师范大学生物系 上海 200234)

麦角菌(*Claviceps purpurea*) ATCC 20019 菌株在深层培养中只产生一种生物碱——麦角隐亭(Ergocryptine)<sup>[1,2]</sup>。本研究室引进的 ATCC 20019 原始菌株因反复传代,产碱能力下降,并且产碱不稳定。而用常规的直接摇瓶发酵进行菌株筛选,则工作量大,筛选效率低<sup>[3]</sup>。因此,我们设计了用琼脂柱对产碱菌株进行初步筛选,以获得一种简单易行的筛选方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

麦角菌 [*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.] ATCC 20019 菌株,由美国菌种保藏中心引进。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面、平皿培养基: PDA 培养基。

1.2.2 种子培养基: 见文献[1]。

1.2.3 发酵培养基: 见文献[1]。

1.2.4 琼脂柱固体培养基: 发酵培养基中加入 4% 琼脂。

### 1.3 培养方法

将 ATCC 20019 菌株接种于 PDA 斜面, 24℃ 左右培养约 14d 后, 制备孢子悬浮液, 均匀涂布于 PDA 平皿上。24℃ 左右培养约 7d, 表面长出单个菌落。将单菌落菌丝接种于琼脂柱上(高 12~13mm、直径 10mm、底部垫有二层纱布), 24℃ 培养。其间不时滴加无菌水, 以免琼脂柱失水萎缩。约 20d 后对菌株进行筛选。分别镊取长满菌丝体的琼脂柱至试管中, 各加入 1ml Van Urk 试剂, 静置片刻后, 观察柱面菌丝体颜色的变化。选择菌丝体与 Van Urk 试剂反应呈蓝色的菌株作为初筛菌株。初筛菌株经种子培养 5d 后, 于发酵培养基中振荡培养 14d。测定发酵液中麦角隐亭的含量。

## 2 结果

### 2.1 用琼脂柱初筛麦角隐亭产碱菌株

ATCC 20019 菌株自然选育获得的单菌落, 接种于发酵培养基的琼脂柱上, 保湿培养约 20d 后, 琼脂柱表面与四周长满菌丝体。气生菌丝平坦或绒毛状, 菌落颜色呈白色~灰白色。将琼脂柱菌落浸没于 Van Urk 试剂中, 结果在 390 株分离的单菌落中 20019-7、20019-48、20019-83、20019-130、20019-179、20019-211、20019-240 和 20019-308 等 8 株菌株的菌丝体与 Van Urk 试剂呈深浅不同的蓝色反应, 其余菌株未显蓝色。

### 2.2 摇瓶发酵复筛产碱菌株

将在琼脂柱初筛中菌落与 Van Urk 试剂呈蓝色阳性反应的 8 株菌株与 2 株不呈蓝色反应的菌株, 进行摇瓶发酵培养。比较发酵液的麦角隐亭产量, 结果(表 1) 2 株未显蓝色反应的菌株 20019-1、

20019-328 的产碱量很低, 只有  $18.43\mu\text{g}/\text{ml}$  和  $22.51\mu\text{g}/\text{ml}$ 。琼脂柱菌落与 Van Urk 试剂显蓝色反应的菌株比不显蓝色的菌株产碱能力强, 其中呈浅蓝色反应的菌株 20019-7、20019-48、20019-136、20018-240 和 20019-308 麦角碱产量为  $35.46 \sim 41.8\mu\text{g}/\text{ml}$ , 而 3 株蓝色较深的菌株 20019-83、20019-179 和 20019-211 产碱量稍高, 为  $49.28 \sim 55.71\mu\text{g}/\text{ml}$ 。证明发酵液的含碱量与琼脂柱菌落反应的颜色深浅正相关。

表 1 10 株麦角菌菌株发酵液产碱能力的比较

菌株	麦角碱产量 $/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	菌株	麦角碱产量 $/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
20019-1	$18.43 \pm 2.39$	20019-136	$35.46 \pm 1.98$
20019-48	$39.14 \pm 1.08$	20019-211	$50.13 \pm 3.05$
20019-83	$55.71 \pm 1.67$	20019-240	$41.82 \pm 2.46$
20019-179	$49.28 \pm 2.79$	20019-308	$40.33 \pm 2.31$
20019-7	$38.56 \pm 2.11$	20019-328	$25.51 \pm 1.28$

### 3 讨论

我们从美国引进麦角菌株 ATCC 20019, 该菌株能通过发酵产生次级代谢产物麦角隐亭<sup>[1,2]</sup>。但由于把菌株保藏于 PDA 斜面, 经过多次反复传代接种后, 发现该菌株产碱能力下降, 并且产碱不稳定。因此尽管该菌株在 PDA 培养基上能良好生长, 但分生孢子丰富<sup>[1]</sup>。而菌种退化现象往往与分生孢子的产生有关<sup>[3]</sup>。建议采用美国专利报道的不产孢子的 SP 和 T22 营养培养基<sup>[1]</sup>, 保藏麦角菌产碱菌株。

在麦角菌高产菌株的筛选中, Kobel 等<sup>[6]</sup>、Keller 等<sup>[7]</sup>将麦角菌的突变菌株或原生质体突变株进行逐一摇瓶培养, 以检测其发酵产碱能力, 耗时耗力。选择合适的方法可以加快筛选速度。因此我们参照日本春日霉素诱变育种中采用的琼脂块培养法<sup>[3]</sup>, 并根据陆师义等人的实验结果: Van Urk 试剂不仅适用于测定发酵滤液的含碱量, 还可用于测定菌落的产碱能力<sup>[8]</sup>。采用琼脂柱对麦角菌株进行初筛, 发现麦角菌不仅在发酵培养基的琼脂柱上生长良好, 并且累积代谢产物麦角隐亭, 琼脂柱菌落反应的蓝色深浅与发酵液的含碱量正相关。可见该方法简单易行, 筛选效率高, 可用于大批量筛选麦角碱菌株。

### 参 考 文 献

- [1] Amici A M, Minghetti A, Scotti T *et al.* U S Patent 3485722, 1969.
- [2] 袁 萍, 杨庆尧. 上海师范大学学报, 1995, 24(2): 75 ~ 81.
- [3] 微生物诱变育种编写组. 微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1973.
- [4] Socic H, Gabrec-Porekar V, Didek-Brumec M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 21: 91 ~ 95.
- [5] 陈 忠, 陈玉梅, 陆师义. 微生物论文集. 北京: 科学出版社, 1985. 167 ~ 173.
- [6] Srikrishna S, Robbers J E. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45(4): 1165 ~ 1169.
- [7] Keller U. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(3): 580 ~ 584.
- [8] 陆师义, 陈玉梅. 工业微生物学成就. 北京: 科学出版社, 1988, 33 ~ 37.

## SELECTION THE STRAIN OF PRODUCING ERGOCRYPTINE WITH THE AGAR PILLAR

Qian Xiuping Feng Huiqin Yang Qingyao

(Shanghai Teachers University Biology Department Shanghai 200234)

**Abstract** The single colonies of *Claviceps purpurea* ATCC 20019 were inoculated on the agar pillar of fermentative medium and cultured by controlling humidity. The mycelia grew well. After the agar pillar mycelia being immersed in Van Urk reagent, the results indicated that the mycelia of eight strains 20019-7, 20019-48, 20019-83, 20019-136, 20019-179, 20019-211, 20019-240, and 20019-308 among 390 strains appeared various blue colors after reacting with Van Urk reagent. These strains and two strains 20019-1, 20019-328, which appeared blue colorless continued to be fermented. It showed that the alkaloid yields of the two strains being blue colorless were very low, respectively 18.43  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 22.51  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the yields of the five strains being light blue color were also low 35.46 ~ 41.82  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and the yield% ergocryptines of three strains being blue color were slightly higher 49.28 ~ 55.71  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The agar pillar could be regarded as the model of selection the ergocryptine strain.

**Key words** *Claviceps purpurea*, Strain selection, Ergocryptine.