

核黄素菌种的保藏

李明南 唐月薇 周昭然 徐维东

(广州市微生物研究所, 广州)

核黄素是生物体正常生活必不可少的维生素之一, 它能促进生物生长发育, 在医药卫生、畜牧和农业上都有重要用途。用微生物发酵生产核黄素, 一般用阿氏假囊酵母 (*Eremothecium ashbyii*) 作为生产菌株, 但此菌种在生理性状上变异较大, 在生产性能上也不稳定, 容易衰退, 用液体石蜡法、沙土法、麸皮法等保藏此菌种, 效果均不理想。用冰箱保存斜面菌种, 通常只能有效地保存 7 天左右。因此, 寻求有效而较长期的保藏方法, 减少转代的次数, 从而有效地防止菌种衰退, 是核黄素发酵生产中亟待研究解决的重要课题。为此, 我们开展了核黄素菌种的培养基改进等试验研究。现将试验情况介绍如下:

材料与方 法

一、材料

1. 一号基础培养基 (M_1 培养基):

麦芽糖 1 克	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015 克
葡萄糖 1 克	NaCl 0.2 克
蛋白胨 1 克	琼脂 2.5 克
KH_2PO_4 0.2 克	蒸馏水 100 毫升

调 pH6.7, 1.1 公斤蒸气压力灭菌 30 分钟。

2. 二号基础培养基 (M_2 培养基):

麦芽糖 4 克	KH_2PO_4 0.1 克
玉米浆 3 克	$CaCl_2$ 0.1 克
骨 胶 3 克	NaCl 0.2 克
糠 油 5 克	蒸馏水 100 毫升

调 pH6.7, 1.1 公斤蒸气压力灭菌 30 分钟。

3. 改进培养基 (M_3 培养基):

麦芽糖 1 克	玉米粉 1 克
葡萄糖 1 克	小米粉 1 克

蛋白胨 1 克	$CaCl_2$ 0.1 克
KH_2PO_4 0.15 克	K_2HPO_4 0.15 克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.015 克	琼脂 2.5 克
NaCl 0.2 克	蒸馏水 100 毫升

调 pH6.7, 1.1 公斤蒸气压力灭菌 30 分钟。

4. 玉米和小米: 颗粒饱满, 无霉坏虫蛀, 质地新鲜。

5. 硅胶 G: 薄板层析用, 萤光化工厂生产。

6. 菌种: 阿氏假囊酵母。

二、方法

1. 玉米培养基保藏法(玉米法):

① 玉米培养基的配制: 将玉米粒压成片状, 用 1.1 公斤蒸气压力 30 分钟干蒸熟, 然后放入 M_3 培养基(无琼脂)中浸泡 1 小时左右, 沥去多余的液体, 分装入 15×150 毫米试管中, 每管装培养基的高度约为 3 厘米, 塞紧棉塞, 1.1 公斤蒸气压力灭菌 30 分钟, 便成玉米培养基。该培养基以水分适宜不板结为佳。

② 接种培养: 往克氏瓶平板菌种中倾入无菌生理盐水 50 毫升, 用接种环搅拌, 6 层纱布过滤, 其滤液即成孢子悬浮液。取孢子悬浮液 1 毫升接种入玉米培养基中, $28-30^\circ C$ 培养 7 天。

③ 干燥与保藏: 把上述培养的菌种置于干燥器内干燥 7 天后, 用石蜡封口, 置于冰箱保存。

④ 单菌分离与效果测定: 将保存的菌种按期转出, 接种于克氏瓶 M_3 培养基上, $28-30^\circ C$ 培养 9 天, 进行单菌落分离, 培养 4 天后, 挑选金黄色较深的优良菌落, 接种于摇瓶 M_2 培养基中, $28-30^\circ C$ 振荡培养 9 天, 用氧化还原

法测定其发酵单位。

2. 小米培养基保藏法(小米法):

本法与玉米法相似,所不同的是小米培养基的配制方法:用 pH6.8 生理盐水将小米淘洗干净,放入 M₃ 培养基(无琼脂)中浸泡 1 小时左右,沥去余液,以常压蒸气蒸 1 小时,再放入 M₃ 培养基(无琼脂)中浸泡 30 分钟,沥去余液,分装入试管中。

3. 硅胶 G 保藏法(硅胶 G 法):

将硅胶 G 装入 10 × 100 毫米试管中,装入的高度约为 1 厘米,塞紧棉塞,以 1.5 公斤蒸气压力灭菌 1 小时,置于烘箱中干燥后备用。以接种环挑取斜面菌种掺入硅胶 G 中,充分搅拌均匀,然后置于干燥器内干燥 7 天左右,再用石蜡封口,置于冰箱保存。单菌分离与效果测定与玉米法相同。

4. 营养液保藏法(营养液法):

本法与“液体石蜡法”^[1]相似,所不同的是用 M₃ 培养基(无琼脂)作为营养液代替液体石蜡。单菌分离与效果测定与玉米法相同。

结果与讨论

1. 保藏后的菌种,经试验测定其发酵单位(即每毫升发酵液中含有核黄素的微克数),结果比原菌种都有所提高,均能有效地保存较长时间(见表 1),用 M₃ 培养基与 M₁ 培养基培育菌种的结果, M₃ 培养基比 M₁ 培养基较为优越,

表 1 各种保藏方法的试验结果

保藏效果 保藏方法	有效保存期 (天)	发酵单位比原菌种提 高的百分比(%)
玉米法	493	28.9
硅胶 G 法	344	111.1
小米法	248	21.9
营养液法	168	14.7

注:保藏后的菌种,经单菌落分离后,挑选 5 个菌落进行效果测定,取 3 株最高发酵单位的平均值作为保藏后的发酵单位。

M₃ 培养基上的菌种长势较旺盛,金黄色较深,衰老较缓慢,发酵单位比 M₁ 培养基提高 4.1% (5 个菌株的平均值)。

2. 本试验在培养基方面作出的较大改进是:

① 玉米法在营养成分和质地结构上优于麸皮法。因玉米含有丰富的养分和多种生长素,而且又添加了 M₃ 培养基,这就给菌种生长发育提供了充分的营养条件;由于玉米压成片状,碎裂深刻,缝隙繁多,质地疏松,这就扩大了菌丝体与培养基的接触面,既有利于菌种吸取养分,起着一定的复壮育种作用,又有利于培养基对菌种的保护。

② M₃ 培养基优于 M₁ 培养基,主要是 M₃ 培养基的成分有较大改进。如 M₃ 培养基中的玉米粉和小米粉均含有丰富的养分及生长素; KH₂PO₄ 与 K₂HPO₄ 的合用,对 pH 值有较好的缓冲作用; Ca⁺⁺ 对维持细胞蛋白质的分子结构有一定作用^[4]。这样 M₃ 培养基不仅有利于菌种生长发育,促进核黄素发酵单位的提高,还有助于稳定菌种的生理性状,减缓遗传基因的自发突变,故适用于菌种的保藏和选育。

③ 营养液法保藏菌种优于液体石蜡法及普通斜面法,主要原因在于营养液的作用。营养液除具有隔绝空气的作用外,还是菌种的一种较好的保护剂,可以减少细胞周围的代谢产物过多积累,还可以继续微弱地给菌种提供一些养分,以补充其呼吸作用所消耗的能量,从而减缓菌种的衰退。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所: 常见与常用真菌, 科学出版社, 1973, 第 80—81, 274—276 页。
- [2] 北京大学、南京大学生物化学教研组编: 普通生物化学(上册), 人民教育出版社, 1961, 第 190 页。
- [3] 山田浩一: 微生物利用学概论, 应用微生物学シリーズ I, 1974, 210—213。
- [4] Trollope, D. R.; *J. Appl. Bacteriol.*, **38**: 115—120, 1975。