

张国强 编著
刘文海

微生物初筛 实验技术

-33

河南科学技术出版社

序 言

对于从事微生物菌种选育的科技人员，寻找一种适宜的初筛方法是希望已久的。因为在人员固定，实验条件有限的情况下，通过合理的初级筛选，能够迅速淘汰大量负突变株，浓缩正突变株，从而提高整个筛选效率。本书就是为此目的而编写的。希望向有关工作者介绍一些基本方法。

本书系编著者在实验教学及菌种选育科研的基础上，深入有关科研单位进行调查研究，并参阅了许多国内外的有关资料而写成的。全书包括四个部分：酶产生菌的初筛；有机酸产生菌的初筛；抗生素产生菌的初筛；其它类型微生物的初筛。在编写时主观上希望能突出国内外微生物初筛实验的新技术、新方法，力求简明实用。在每一章的实验项目前，围绕这些实验技术，论述了有关的实验原理和应用范围，并附有一些图表和图片，以利于读者对论述的理解，仿照图表和图片去对照实践。

由于我们水平所限，书中可能有错漏之处，望读者不吝指教。

作者

一九九〇年三月

目 录

第一章 酶产生菌的初筛..... (1)

- 一、蛋白水解酶..... (1)
- 二、淀粉水解酶..... (21)
- 三、纤维素水解酶..... (26)
- 四、核酸水解酶..... (32)
- 五、碱性脂肪酶..... (40)
- 六、磷酸酯酶..... (41)
- 七、细胞壁溶解酶..... (43)
- 八、柠檬酸合成酶..... (44)
- 九、柠檬酸裂解酶..... (45)
- 十、鸟氨酸脱羧酶..... (47)
- 十一、赖氨酸脱羧酶..... (48)
- 十二、右旋糖酐酶..... (49)
- 十三、 β (1 $\rightarrow$ 3) 葡聚糖酶..... (50)
- 十四、胶原酶..... (51)
- 十五、果胶酶..... (52)

第二章 有机酸产生菌的初筛..... (54)

- 一、乳酸..... (54)
- 二、醋酸..... (56)
- 三、柠檬酸..... (58)
- 四、衣康酸..... (63)
- 五、氨基酸..... (64)
- 六、核苷酸..... (71)

第三章 抗生素产生菌的初筛..... (74)

- 一、常规筛选方法..... (74)
- 二、选择性筛选法..... (74)
- 三、抗生素效价测定..... (79)

第四章 其它类型微生物的初筛..... (84)

- 一、呼吸缺陷型突变菌株的初筛..... (84)
- 二、水解水不溶碳氢化合物的初筛..... (86)
- 三、分解聚氯联二苯的细菌的初筛..... (89)
- 四、泡沫减少的酵母突变体的初筛..... (89)
- 五、黄曲霉素产生菌的快速鉴定..... (91)
- 六、大肠杆菌的简易检出法..... (92)
- 七、厌氧菌及其培养、快速鉴别法..... (93)
- 八、具有抗污染特性的啤酒酵母的选育..... (113)
- 九、葡萄酒、清酒酿造中野生酵母的快速检出法..... (116)
- 十、嗜杀酵母 (killer yeast) 及其快速检出法..... (122)
- 十一、营养缺陷型菌株的筛选..... (126)
- 十二、噬菌体的分离、纯化及其效价的测定..... (137)
- 十三、抗结构类似物突变菌株的筛选..... (142)
- 十四、葡萄酒酵母的筛选及其存活力的快速测定..... (148)
- 附录..... (152)
 - 一、常用缓冲液的配制..... (152)
 - 二、指示剂的配制..... (156)
- 主要参考文献..... (160)

第一章 酶产生菌的初筛

在以酶活力作为主要指标评定原料利用率及成曲质量的发酵生产中，对经诱变剂处理或通过基因重组手段获得的大量突变菌，一般要通过初筛与复筛两个阶段完成。目前国内普遍采用的初筛方法是“直接测定法”，即每挑出一个菌落，就要转入斜面，而后进行酶活力测定。往往一次育种实验，至少要选出几百支乃至上千支菌株，这就需要测定几百次甚至上千次，因此，造成工作量大、进度慢。这里所介绍的初筛方法，是指在固体培养基平板上通过观察突变株的生理效应范围（透明圈、变色圈）进行初筛测定。初级测定多以鉴别培养基为基础。鉴别培养基是在培养基中加入某种试剂或化学药物，使培养后发生某种变化，如培养基透明度的变化或菌落周围的颜色变化，由此区别不同类型或生理特性不同的微生物。根据不同种类微生物和所产生的不同类型酶，通过实验，来决定采用哪种鉴别培养基。

一、蛋白水解酶

（一）内肽酶

1、以酪蛋白为底物、TC (Trypitanase) 为补充生长因子。

（1）目的及原理

采用该种培养基的初筛方法主要用于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、酱油曲霉 (*Asp. sojae*) 和毛霉 (*Mucor Link*)、蛋白酶正突变菌的检出，以及菌种

复壮的单胞分离。还可用于专门生产碱性蛋白酶的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 正突变菌的分离与检出。

蛋白酶产生菌经培养后向周围基质分泌蛋白酶, 这些酶类分解酪蛋白为氨基酸类物质, 使菌落周围出现分解圈, 即透明圈。

(2) 方法与步骤

①培养基

KH_2PO_4	0.36克
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.07克
ZnCl_2	0.04克
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50克
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002克
NaCl	0.16克
TC	0.03~0.05克
酪蛋白	3.5~4克
琼脂	15克
蒸馏水	1000毫升
	pH7.0或9.0

该培养基的组成是这一方法的关键, 应严格按配方中的不同组分进行配制。首先将磷酸盐制成基础液, 然后再依次加入其它成分。其中 TC 的存在是很重要的, 它能够补充菌体所需要的氨基酸类物质。因此, 对其质量有严格要求, 起码必须是不含维生素的。

酪蛋白先经 0.1 N 的 NaOH 溶解后再加入。

③ 操作程序

经诱变剂处理的霉菌孢子或细菌芽孢，先接种于斜面进行培养，然后用SLS制成孢子悬液，过滤，稀释，涂布于琼脂平板上。培养后使每皿中长有10~15个菌落。最后以分解圈直径与菌落直径之比，即HC比值（Halo-Colony）作为初筛指标。具体操作：如图1—1所示。

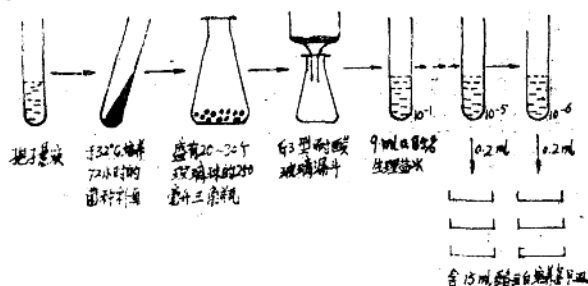


图 1—1 初筛程序

凡 HC 比值大者作为选留菌。这样使低产菌株在平板分离阶段就被淘汰掉。其中，碱性蛋白酶产量与 HC 比值有更明显的正相关。在曲霉菌所产生的混和蛋白酶（酸性、中性、碱性蛋白酶）中，碱性蛋白酶恰好起着主导作用，即碱性蛋白酶活性越高，蛋白水解率越高，这就进一步确定了该基质在初筛中应用的可靠性。

（3）结果与讨论

通过对数百株突变菌三角瓶发酵酶活力和HC比值的比较,发现提高了蛋白酶活力的突变株,占有HC比值大的菌株的70%(包括蛋白酶活力高,而不适于目前某些生产工艺要求的形态突变株)。

以曲霉菌(*Aspergillus*)作为出发菌株时,经诱变剂处理后,其孢子悬液不直接进行平板分离,而是先接种于斜面经培养后进行分离的。这样做可以直接获得突变固定的变异株。因为曲霉孢子经诱变剂作用后,引起最初的突变变更与突变的固定之间,至少要经历一个世代的时间间隔;加之曲霉的分生孢子往往是多核的,如果只其中一个核发生了突变,就必须经过几次细胞分裂,才能确立起纯的突变型菌株。如果诱变后立即进行突变型筛选,往往是低效的。大量实验表明:先经培养再分离所筛选的菌株,其性能确实较为稳定。

在初筛过程中,调制孢子悬液采用浓度为0.01% SLS(十二烷基磺酸钠)是十分必要的。这种表面活性物质,有利于孢子的分散。孢子悬液浓度以 $1 \sim 3 \times 10^6$ 细胞/毫升为宜。悬液中的细胞数可用直接计数法(血球计数法)或以光密度法(光电比色计测定法)测定。悬液的过滤一般采用G3型酸性玻璃漏斗。因为漏斗的孔径恰恰相当于孢子的直径,只有单孢子才能通过,这样就可以滤去成团的孢子,制成其真正的单孢子悬液。如条件不具备,采用慢速滤纸,亦可获得较多的分散孢子。然后,取适量的过滤孢子悬液加入酪蛋白平皿中,用涂布器(灭过菌的玻璃刮刀)涂布均匀,使每皿中能长有10~15个菌落,调节到这个密度便于对菌落的观察和透明圈的测量。平皿中应加入定量的培养基,一般

直径为9厘米的平皿，以加入15毫升为宜，量过大，透明圈很小，以致难以测量；量过小，透明圈很大，以致光圈连接成片。所用平皿应挑选底部平整的，否则培养基厚薄不均，会造成误差。

2、以 K_2HPO_4 为营养盐

(1) 目的及原理

检出产蛋白酶的霉菌，原理同“1”。

(2) 方法与步骤

①培养基

酪蛋白	4克
K_2HPO_4	0.3克
蒸馏水	900毫升
琼脂	20克

pH6.5(酸度计精确测试)

1公斤/厘米²灭菌20分钟(时间过长容易沉淀)。

该培养基的pH值很重要，pH值大于7不显示分解圈，pH小于6，灭菌后酪蛋白沉淀。因此，常用酸度计测试而不用pH试纸，以减少误差。酪蛋白先用100毫升0.1N NaOH溶化，若未化开，可稍加热。

②操作程序

突变处理过的霉菌孢子，经培养后用SLS制成单孢子悬液，适当稀释后涂布于琼脂平板上。于35℃培养60小时，置平皿于黑色纸上，观察并测量透明圈的大小。

(3) 结果与讨论

该方法对于检出米曲霉蛋白酶产生菌有较好的效果。在筛选的过程中，要把好培养基制备这一环节。如稍有疏忽，

透明圈界限就不明显。

3. 以酪蛋白为底物, NaCl等为营养盐

(1) 目的及原理

检出产蛋白酶的细菌, 原理同前述“1”。

(2) 方法与步骤

①培养基

培养基由双层琼脂组成。

底层:

牛肉膏	0.5克
蛋白胨	1.0克
NaCl	0.5克
琼脂	2.0克
蒸馏水	100毫升
	pH7.2

上层:

酪蛋白	1.0克
琼脂	2.0克
蒸馏水	100毫升
	pH7.4

②操作程序

将肉汤培养基倒于平板作为底层, 待凝固后, 加入5毫升酪蛋白培养基, 摇匀。再凝固后, 加入细菌悬液0.1毫升, 涂匀, 于36℃培养18~24小时后, 观察分解圈。

(3) 结果与讨论

在筛选过程中要严格控制培养时间。如培养时间过长, 分解圈互相连接, 不易分辨, 影响挑选; 如培养时间过短,

三角瓶酶活单位与分解圈的大小无明显正相关。

4、以酪蛋白为底物CA (Cazanminoacid) 为补充生长因子

(1) 目的及原理

检出产中性、碱性蛋白酶的曲霉菌。

原理同前述“1”。

(2) 方法与步骤

①培养基

酪蛋白	0.40克
CA (不含维生素)	0.005克
K_2HPO_4	0.036克
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.107克
$ZnCl_2$	0.0014克
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0002克
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05克
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0002克
NaCl	0.016克
蒸馏水	100毫升

pH6.5~7.0

该培养基中CA的存在十分重要，它可供给菌体需要的氨基酸类物质。此药品如无专用商品可自行制备。制备方法如下：

1) 取酪蛋白(不含维生素)5克，于100毫升圆底烧瓶中，加入10~30毫升2N HCl，水浴回流24小时，至水解完全为止。可用1% $CuSO_4$ 液进行鉴定，由蓝色至紫玫瑰色。

2) 将烧瓶放在90℃水浴中，以真空蒸馏法反复驱赶水

解液中过量盐酸，直至蒸馏液呈中性为止。

3) 将烧瓶中的水解物定溶到100毫升，即浓度为5%的水解酪蛋白。

②操作程序

将经诱变剂处理的曲霉菌孢子接种于斜面，于32℃培养72小时。然后，把斜面成熟孢子制成单孢子悬液，涂布于酪蛋白培养基平板上，再于32℃培养48小时。凡透明圈直径与菌落直径比值大者作为选留菌。

(3) 结果与讨论

从总的初筛效果看，提高了蛋白酶活力的突变株，占有HC比值大的菌株的65%。

在初筛过程中发现，凡产生1~4个扇形面的菌落，均具有较低的蛋白酶活力；而菌落较小，菌丝体发白色，产孢子能力极差的菌株，均具有较高的蛋白酶活力。

SeKine·H也曾采用该方法，分离到了86株高产酪蛋白酶的米曲霉突变株。其中有20株属产碱性蛋白酶菌。

5、以脱脂牛奶为底物

(1) 目的及原理

检出产蛋白酶的细菌。

原理同前述“1”。

(2) 方法与步骤

①培养基

蛋白胨	0.5克
酵母膏	0.25克
脱脂牛奶	10.0克
琼脂	15.0克

蒸馏水

1000毫升

pH7.0

该培养基中的脱脂牛奶必须是新鲜的，脱脂要彻底。如果使用商品脱脂奶粉，使用前必须重新脱脂。

②操作程序

将细菌样品用0.85%生理盐水稀释后涂于平板，于37℃培养18~24小时，观察透明圈的大小。

(3) 结果与讨论

该方法主要用于芽孢细菌或非芽孢细菌蛋白酶产生菌的分离。

6、以酪蛋白为底物，溴甲酚绿为指示剂

(1) 目的及原理

检出产碱性蛋白酶的细菌或霉菌。

初筛培养基中含有溴甲酚绿试剂，经灭菌后，培养基呈蓝绿色(pH7.0)，底物经酶水解后，由于酸度增加，在菌落周围形成黄绿色光圈。

(2) 方法与步骤

①培养基

培养基由双层琼脂组成。

底层：

酵母膏	0.5克
蛋白胨	1.0克
葡萄糖	0.5克
琼脂	2.0克
蒸馏水	100毫升
	pH7.2

上层:

酪蛋白	1.0克
琼脂	2.0克
溴甲酚绿	0.5克
蒸馏水	100毫升
	pH7.4

②操作程序

将底层琼脂溶化后倒入平板内。待凝固后,加入5毫升上层培养基,再凝固后加入孢子悬液0.1毫升,涂匀,于32℃培养3天后,观察黄绿光圈的大小。

(3) 结果与讨论

该方法常用于曲霉菌碱性蛋白酶突变菌的分离鉴定。如用于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)碱性蛋白酶、沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)蛋白酶Ⅰ(一种类似胰蛋白酶的专性蛋白酶)突变菌的分离,则应去掉底层培养基中的葡萄糖,加入牛肉膏,但分离效果不及前者。

7、以酪蛋白为底物,甲酚红为指示剂

(1) 目的及原理

检出产中性蛋白酶的霉菌。含有甲酚红指示剂的酪素培养基呈紫红色,底物经酶水解后,培养基变为金黄色。

(2) 方法与步骤

①培养基

酪素	2克
KH_2PO_4	0.1克
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05克
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.05克

甲酚红	0.012克
琼脂	2克
蒸馏水	100毫升
	pH7.2

②制备过程

精确称取2克干酪素,置于100毫升烧杯中,加5毫升0.5N NaOH后,再加适量的pH7.2的0.02M磷酸缓冲液,在沸水中加热(应经常搅拌),使之完全溶解,然后加入其它无机盐。溶解冷却后,移入100毫升容量瓶中,加入0.04%甲酚红30毫升,并用磷酸缓冲液(0.02M, pH7.2)定容至100毫升,调节pH至7.2,移入三角瓶中,加2%琼脂,常压灭菌。加入定量抗菌素后,备用。

③操作程序

取经纯化的稳定曲霉斜面菌株作为供试菌株。挑取孢子一环,放入盛有100毫升生理盐水,并含有玻璃珠的三角瓶中,经振荡,制得孢子悬浮液。按常规操作进行稀释分离,培养皿培养,定时观察菌落形成与指示剂变色圈,并测量相应的直径。为了求出变色圈直径与菌落直径比值的大小与中性蛋白酶活力的相应关系,将测量过的菌落挑斜面培养,并进行摇瓶发酵,测定酶活力。下面以5种曲霉菌为例,测试结果见表1—1。

表 1—1 HC比值与蛋白酶活力的关系

菌种编号	H 变色圈直径 (厘米)	C* 菌落直径 (厘米)	H/C	酶 活 (单位/毫升)
290	1.3	0.6	2.17	1140
291	1.5	0.8	1.825	1050
292	1.3	0.7	1.82	1040
293	1.5	0.8	1.625	1000
294	1.4	0.7	2.0	1080

*菌落直径(C)仅测量比较致密的菌盖，四周边缘的蔓延菌丝不计。

由表 1—1 看出，HC比值大，酶活单位基本上高，说明它们之间存在相应的正变关系。

(3) 结果与讨论

含有甲酚红指示剂的酪素培养基，起始pH为7.2，呈紫红色，涂布菌液进行培养后，40小时左右开始出现菌落，菌落生长部位变为金黄色；当出现孢子时，菌落周围的培养基也变为金黄色；72小时后，菌落周围出现透明圈的痕迹。80小时测量并作记录，其结果见图 1—2。

为了进一步了解曲霉蛋白酶对酪蛋白的分解产物，在不同时间取出连同变色部分的菌落浸出液进行纸层析。以米曲霉为例，测试结果见表 1—2。

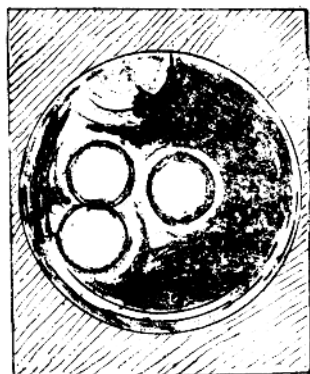


图1-2 实验菌株在甲酚红培养基上的变色情况

表1-2 不同时间酪蛋白的分解产物

取时 (小时)	样 间 时	0	4 5	5 7	6 9	8 1	9 3	1 0 5
的 氨 基 酸	与 标 准 氨 基 酸 对 照 得 出	未 层 析 出	未 层 析 出	赖 苏 谷	赖 甘 苏 组 谷	赖 甘 苏 组 谷 亮 缬 色 酪	赖 甘 苏 组 谷 亮 缬 色 酪	赖 甘 苏 组 谷 亮 缬 色 酪