

金霉素链霉菌的诱变育种

张筱玉 汤建中 俞学琴 叶爱琴 盛静娴

(上海第三制药厂, 上海)

从金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 重组体 2U-84 经紫外线处理得到 A3-32 突变株, 产量比 2U-84 提高 10.6% 以上。A3-32 突变株又经紫外线处理, 得到一株分泌金黄色色素的突变株 5-43, 产量为 A3-32 的 60—70%。而 5-43 突变株经不同诱变因素: 紫外线、乙烯亚胺及氮芥处理, 均得到色素形成能力消失的突变株, 这些菌株的产量均比 5-43 高, 提高的幅度也较大。其中紫外线处理得到的 U-42 突变株比 5-43 突变株提高 78%, 比重组体 2U-84 提高 21.5%。色素形成能力愈小者, 其产量愈高, 这说明产量与色素之间存在着一定的相关性。

由弱孢子型 6-15 突变株经乙烯亚胺与紫外线复合处理, 得到孢子丰富, 产量明显提高的 EU-63 突变株, 比重组体 2U-84 提高 49.6%。

微生物诱变育种的主要目的是获得高产菌株。长期来对寻找有效和高效诱变因素的研究较多, 在选育高产菌株时也往往比较注意某一诱变因素的作用, 而对出发菌株的选择则注意得不够。近年来的实践指出, 产量最高的菌株不一定是进一步选育的最适出发菌株。因此, 在诱变时有采用多株菌株进行诱变和改进筛选方法的必要^[1]。

据资料报道, 重组体用诱变因素处理后, 比野生型菌株具有较大的诱发突变频率。例如在红霉素产生菌的重组体诱发突变报告中, 以放线菌噬菌体、紫外线及 X 射线诱变, 重组体的诱发变异率比野生型显著增加^[2]。在金霉素链霉菌重组体的研究中指出, 重组体较野生型更易引起突变, 它对紫外线具有较大的敏感性^[3]。为此, 我们选择金霉素链霉菌重组体 2U-84^[4] 及生产菌株 S-12 作原始的出发菌株, 分别用不同诱变因素处理。本文报道从重组体 2U-84 菌株系谱中得到逐步提高的几株高产突变

株, 而这些高产突变株是以系谱中不同类型的菌株作为出发菌株选育而得到的。

材料与方法

一、菌株

原始出发菌株为金霉素/四环素产生菌金霉素链霉菌 *Streptomyces aureofaciens* 2U-84 及 S-12 菌株(简称 2U-84 及 S-12, 其余均同)。

二、培养基

1. 斜面培养基 麸皮 3.5%, 琼脂 2.0%, 自然 pH(6.8—7.0)。

2. 平皿培养基 淀粉 0.5%, 蛋白胨 0.3%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25%, KH_2PO_4 0.04%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, 琼脂 2.0%, pH 7.0—7.2。

3. 种子培养基 花生饼粉 1.5%, 淀粉 1.5%, 酵母粉 0.5%, 自然 pH(6.8 左右)。

4. 发酵培养基 花生饼粉 3.5%, 淀粉 3.0%, 麦芽糖 4.0%, 蛋白胨 1.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25%, NaBr 0.4%, 2-巯基苯骈噻唑 0.015%, 自然 pH(6.8 左右)。

本文 1973 年 8 月 7 日收到。

三、培养条件

斜面孢子及平皿培养均为 37℃, 培养 6—7 天。种子及发酵均为 28℃, 在每分钟 220—240 转的旋转式摇床上培养。种子生长 22 小时左右, 以 6% 接种量接入发酵培养基, 培养 6—7 天取样, 用比色法测定四环素效价。

四、诱变因素和处理方法

1. 紫外线(UV) 波长 2537 Å, 功率为 30 瓦, 处理时将单孢子悬液置于紫外灯下 30 厘米处照射, 照射时伴以往复摆动。

2. 氮芥(NM) 用氮芥盐酸盐, 以碳酸氢钠活化, 作用浓度为 1 毫克/毫升, 作用一定时间后用解毒剂中止作用。解毒剂为含碳酸氢钠 0.068% 及甘氨酸 0.06% 的蒸馏水溶液。

3. 乙烯亚胺(EI) 用无菌水稀释至一定浓度, 与孢子悬液混合, 作用浓度为 1:1000 和 1:10000, 在 4℃ 冰箱中进行处理, 经作用一定时间后用稀释法中止作用。

4. 放线菌素 D、紫外线复合处理 作用浓度为 3 微克/毫升, 与孢子液混合作用 24 小时, 再用紫外线处理。

经以上诱变因素处理后, 孢子液稀释至适当浓度, 进行平皿培养, 待菌落生长成熟后, 观察菌落形态, 挑选部份菌落接种斜面, 然后进行摇瓶初筛。

实验结果

一、不同特性的出发菌株的诱变效应

1. 2U-84 和 S-12 的诱变效应比较

2U-84 及 S-12 分别用紫外线、氮芥两种诱变因素进行处理。平皿培养出单菌落后, 挑选部份菌落进行摇瓶初筛。以出发菌株的效价为 100%, 根据初筛菌株的产量分布, 统计其为出发菌株产量百分数和突变频率(表 1)。

表 1 2U-84 及 S-12 诱变后初筛突变株的产量分布和突变频率

菌 株	产量分布		初筛突变株效价为出发菌株的百分数(以出发菌株效价为 100%)							
	处理因素	突变频率 (%)	50以下	60—70	70—80	80—90	90—100	100—110	110—120	120—130
2U-84	氮芥 13 分钟	55.5	0	22.2	0	22.3	0	0	0	
	紫外线 1 分钟	1.6	0	12.7	11.1	22.2	25.4	22.2	0	
S-12	氮芥 3 分钟+紫外线 1 分钟	0	0	35.8	0	0	35.7	28.5	28.5	
	氮芥 13 分钟	5	10	50	0	0	25	10	0	
	紫外线 1 分钟	0	8.4	50	0	0	41.6	0	0	

从初筛突变株的产量分布结果看来, 2U-84 经紫外线处理后, 产量分布的幅度大。在初筛的 63 株突变株中, 得到 A3-32 突变株, 比 2U-84 提高 10.5%, 经多次复筛仍能保持稳定。S-12 以氮芥处理引起产量变异的幅度较紫外线处理的大; 氮芥与紫外线复合处理的变异幅度亦大于紫外线单一处理。从氮芥 13 分钟处理的突变株中得到 4-91 突变株, 复筛后产量提高幅度不大。再用此菌株继续进行处理, 未能获得进一步提高产量的突变株。

实验结果指出, 紫外线对 2U-84 在产

量变异中具有较大的诱变效应, 在初筛的菌株中, 正突变株所占的比例大于负突变菌株, 产量提高的幅度亦较大。而氮芥 13 分钟的处理, 诱变效应全是负的突变。

2. 黄色突变型 5-43 菌株选择为出发菌株的特点

从 2U-84 菌株经紫外线处理得到 A3-32 后, 继续用几种不同诱变因素处理多次, 未能获得比 A3-32 产量再提高的突变株。但在这几次处理中, 经紫外线的处理获得一株在培养过程中分泌金黄色色素的 5-43 突变株, 其产量较低, 为 A3-32 菌株的

60—70%。这一突变株的产量降低与金黄色色素的产生是否存在一定的关系引起了我们的注意。当我们采用几种不同的诱变因素处理 5-43 时,发现金黄色色素的形成与产量有一定的相关性,凡色素形成能力消失者,其产量均能提高。反之,金黄色色素加深,产量均明显降低,低的突变株仅为 5-43 的 5% 左右,部份菌株则不产生金霉素。初筛时突变株的产量就表现出差异较大,无色素突变株的最高产量可达 10835 微克/毫升,分泌色素菌株的最低产量仅 0—500 微克/毫升,而 5-43 为 5000—5800 微克/毫升。从金黄色色素形成能力消失的突变株中获得了产量提高的菌株。

3. 6-15 菌株从弱孢子型突变为孢子丰富以及提高产量的可能

6-15 是一弱孢子型突变株,菌落较小,孢子层很薄,孢子量较正常型少,但摇瓶发酵产量与其出发菌株 1-65s 相仿。我们选择 6-15 菌株,以紫外线、乙烯亚胺单一处理及乙烯亚胺和紫外线复合处理,孢子的死亡率如表 2。

表 2 金霉菌 6-15 菌株经紫外线、乙烯亚胺及两者复合处理所引起死亡率

诱 变 因 素	孢子浓度 个/毫升	死 亡 率 (%)
紫外线 1 分钟	5.9×10^3	98.45
乙烯亚胺 1:2000 4℃ 2 小时	3.68×10^4	90.31
乙烯亚胺 1:10000 4℃ 2 小时 + 紫外线 30 秒	2.74×10^3	99.28
乙烯亚胺 1:10000 4℃ 24 小时	1.34×10^7	64.7
对 照	3.80×10^7	—

从乙烯亚胺 1:10000 4℃ 处理 24 小时后,再以紫外线照射 30 秒,死亡率达 99.28%。从初筛 47 个菌落中,得到 EU-63 菌株,其产量比 6-15 提高 1744 微克/毫升,提高率为 15.8%,而且 EU-63 的孢子量又变为丰富。在抗菌素产生菌的选育中,往往是随着产量的提高,形成孢子的量也越来越少,因此在选择出发菌株时常选择孢子量较丰富的。但在我们的实践中表明,弱孢子型可突变为孢子丰富型,并同时提高产量。

二、不同诱变因素对 A3-32 及 5-43 的诱变效应

1. 紫外线、乙烯亚胺对 A3-32 菌株的诱变效应

A3-32 经紫外线、乙烯亚胺处理后,均未得到产量进一步提高的突变株。但在紫外线处理初筛的 41 株菌株中,51.2% 与出发菌株效价相仿(表 3),其中有一株分泌金黄色色素的突变型 5-43。其发酵液经纸层析及薄层层析,在标准四环素及金霉素的相应 R_f 值位置上显示出荧光,根据荧光斑的大小估计,该发酵液中大部份是四环素,同时存在微量的金霉素。说明这一分泌金黄色色素突变型 5-43,其产量虽未提高,但其代谢产物则发生改变,主要产物是四环素。

2. 紫外线、氮芥、乙烯亚胺对 5-43 的诱变效应

5-43 经几种不同诱变因素处理后,产生了不同的诱变效应。从菌落形态变异观察,与 5-43 比较无显著的区别,但其产量变异的分布与 5-43 比较则有差异。如表

表 3 金霉菌 A3-32 菌株经紫外线、乙烯亚胺处理后初筛菌株的效价分布

产 量 分 布 处 理	初筛菌株效价为出发菌株的百分数(以出发菌株产量为 100%)					
	50—60	70—80	80—90	90—100	100—110	110—115
紫 外 线	2.1	2.1	21.8	51.2	0	0
乙 烯 亚 胺	64.3	14.3	14.3	7.1	19.5	2.1

表 4 5-43 经不同诱变因素处理后的产量分布

产量分布 处 理	初筛菌株产量为出发菌株的百分数(以出发菌株产量为 100%)						
	10以下	90—100	100—110	110—120	120—130	130—140	140 以上
紫 外 线	51.55	3.09	3.09	10.31	16.49	9.28	6.19
氮 芥	42	0	2.0	14.0	28.9	12.0	2.0
乙烯亚胺	75	0	0	2.5	22.2	0	2.5

表 5 5-43 菌株经不同诱变因素处理后黄色色素变异频率的比较

色素变异分布 处 理	筛选菌株数	分泌金黄色色素菌株数		无黄色色素菌株数	无色素菌株所占的百分数(%)
		与 5-43 菌株相近	比 5-43 菌株深		
紫 外 线	99	2	49	48	48.48
氮 芥	50	0	21	29	53
乙烯亚胺	24	0	18	6	25

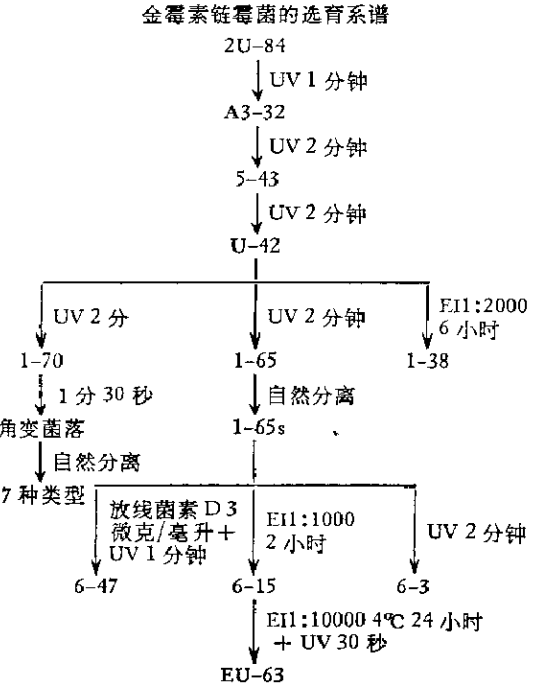
4、表 5。

从产量正突变株所占的比例比较（表 4），氮芥处理所占的比例最高，紫外线次之，乙烯亚胺最低。但从提高产量的幅度比较，则超过 140% 以上的，在紫外线处理中占 6.19%，氮芥、乙烯亚胺相仿。表 5 结果指出，5-43 经几种诱变因素处理后，无色素菌株所占比例以氮芥为最高，紫外线次之，乙烯亚胺最低。紫外线对 5-43 的产量诱变效应较为有效，从中获得 U-42 高产菌株。

三、金霉菌的选育系谱

选择重组体 2U-84 为出发菌株，用氮芥、紫外线分别处理。从紫外线处理中得到 A3-32 突变株，产量比 2U-84 提高 10.5% 以上。由 A3-32 出发，用乙烯亚胺、紫外线处理，又从紫外线处理中得到分泌金黄色色素的突变型 5-43，产量比 A3-32 低，为它的 60—70%，在斜面培养及发酵过程中均产生金黄色色素。对此突变型分别用紫外线、氮芥和乙烯亚胺进行处理，均得到无色素而产量较 5-43 大幅度提高的菌株，其中以紫外线处理得到 U-42 突变株，产量比 5-43 提高 78%，比 A3-32 提高 15% 以上，投产后稳定在应有的水平。继从 U-42

经紫外线处理得到 1-65 突变株，并经自然分离得到 1-65s 菌株。由 1-65s 经乙烯亚胺诱变得 6-15 突变株，该突变株产孢子能力弱，而发酵水平与 1-65s 相仿。我们选择 6-15 为出发菌株，从乙烯亚胺及紫外线复合处理中得到 EU-63 菌株，其产量较 6-15 有明显地提高，而且产孢子能力亦变为正常。通过连续不同因子的累积处理，突变株的选育系谱如下：



四、2U-84、A3-32、5-43、U-42、6-15 及 EU-63 等菌株的摇瓶试验

以本实验所采用的种子及发酵培养基,对 2U-84、A3-32、5-43、U-42、6-15 及 EU-63 等突变株测定了摇瓶发酵水平,并分别以 2U-84 及 5-43 的效价为 100%,比较各突变株产量提高的百分率,列于表 6。

表 6 突变株的摇瓶发酵水平比较

菌 株	150 小时效价 (微克/毫升)	以 2U-84 为 100%	以 5-43 为 100%
2U-84	8500	100	146.4
A3-32	9400	110.6	162
5-43	5800	68.2	100
U-42	10335	121.5	178
6-15	11000	129.4	189.5
EU-63	12744	149.6	219

讨 论

在抗菌素菌种选育中,采用多次选育的方法使抗菌素的产量逐步提高,每一处理选出一株较好的突变株,产量仅超过前一菌株的百分之几。这样经过几次选育,能获得产量超过原出发菌株较多的优良菌株,这是常用的选育方法。但在每次选育中,不是都能合乎理想地得到提高产量的突变株,此时或是从原始出发菌株重新进行处理,抑是选择具有一定变异特性的突变株,这是在实践中值得注意的问题。通常选择出发菌株的方法,即挑选产量最高的菌株作为进一步诱变的出发菌株。较少看到从低产的突变株中选择出发菌株的报道。在设计诱变育种工作中,一般在诱变因素的选择考虑较多,把对高产菌株的获得注意力集中在诱变因素的作用上,而往往忽视了不同菌株的生物学特性和它们的遗传型,以及同一诱变因素对不同的菌株有不同的诱变效应。我们在实践中体会到,选择二个或三个菌株作为出发菌株,优于用一株菌株作为出发菌株,因为产量最高

的菌株在进一步选育时,其产量提高的潜力不一定最大。我们过去的产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)选育工作亦说明了这点,产黄青霉菌 8-16 高产突变株就是从一株产量低于生产菌株的非生产菌株的突变型经几次诱变得到的,其产量比原出发菌株提高 50% 以上,超过从生产菌株出发的选育系谱。在本试验的金霉素链霉菌选育中,在选择产量较低的金黄色色素突变株 5-43 为出发菌株时,从紫外线处理中得到 U-42 突变株,产量明显上升,继续诱变处理 U-42,又获得高产突变株 EU-63。这些诱变处理的结果指出,选择出发菌株是诱变育种中的重要环节,因此必须从菌株多方面的特性来考虑。若在选育过程中以某一特性为指标未能获得产量提高的突变株时,我们认为从其它特征选择出发菌株可能较为有效。

不同的诱变因素往往引起不同位点的诱变效应,但剂量的高低又会引起诱变效果程度上的差异。关于剂量的选择,有主张采用高剂量,死亡率在 99% 以上;亦有主张用低剂量,死亡率在 70% 左右。我们在 2U-84 的一系列紫外线处理中,所用的剂量的死亡率都在 99.9% 以上,在这些处理中,变异类型多,除得到 A3-32、5-43、U-42 等菌株外,又从 U-42 经 2 次紫外线诱变,得到一株较大的角变菌落。此菌落的孢子为淡灰色,角变部份与非角变部份存在明显不同。经单孢子自然分离,分出 7 种不同类型的菌株,孢子颜色有淡灰、淡黄色;菌落表面结构有皱纹多、皱纹少;在这 7 种类型中,有的仍保持角变,而且这类保持角变的菌落再经分离,则角变仍然保持,表现出较大的稳定性。这些形态变异菌株的出现,或许与高剂量使用,使出发菌株的遗传性状发生了变异较广的结果。

青霉素生产初期使用的产黄青霉菌

(*Penicillium chrysogenum*) Q 176 菌株,在发酵培养过程中分泌黄色色素,此色素增加了青霉素提炼的困难,降低了得率。Alikhanian 等^[6]曾用紫外线处理此菌株,很易得到无色素的突变株,但这些突变株的产量却减少了 20—30%。夹竹桃霉素产生菌抗生素放线菌 (*Actinomyces antibioticus*) 分泌一种暗黑色色素,用紫外线、X 射线或乙烯亚胺三种诱变因素处理,得到一些无色素突变株,但所有这些突变株的产量均低于出发菌株。我们从分泌金黄色色素的 5-43 突变株,用紫外线、氮芥或乙烯亚胺处理,亦得到许多色素形成能力消失的突变株,这些菌株的产量都比 5-43 高,并且提高的幅度亦较大;色素形成能力增强者,

其产量下降愈多,二者之间存在一定的相应关系。致于与他人结果相反的原因,有待于进一步探讨。从实践中我们体会到,诱变过程中要仔细地进行观察,根据客观的现象进行具体地分析,勇于实践,不能墨守成规,试验中新的现象才能被认识,这种新的现象也才能用来改造菌株,提高抗菌素的产量。

参 考 资 料

- [1] Davies, O. L.; *Biometrics*, 20: 576, 1964.
- [2] 李焕荪, 抗菌素研究 II、抗菌素的生产工艺, 第 83 页, 上海科学技术出版社, 1963 年。
- [3] 刘颀屏, 经降仙: 同上, 69 页。
- [4] 刘颀屏, 王惠贞: 全国第三次抗菌素学术会议论文集, 第二册, 抗菌素生产工艺, 80 页, 1965 年。
- [5] Alikhanian, S. I. and Borisova, L. N.: *J. Gen. Microbiol.*, 25, 3, 1961.

INDUCED MUTAGENESIS IN THE SELECTION OF *STREPTOMYCES AUREFACEINS*

CHANG SHIAO-YU, TANG JIAN-ZHONG, YU HSUEH-CHIN,

YE AI-CHIN AND SHEN JING-XIAN

(The Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant, Shanghai)

In this paper, several improved tetracyclin producers were obtained by treating *Streptomyces aureofaceins* 2U-84 with various mutagenic agents.

1. A mutant A3-32, derived from the parent strain after the treatment with UV, produced 10.6% more tetracyclin than that of the parent strain. When the mutant A3-32 was further treated with UV, a golden yellow pigment producer, mutant 5-43, which produced smaller amount of the antibiotics (only about 60—70% of the parent strain) was obtained. However, when the latter was further treated with various mutagens, such as UV, EI and NM, non-pigmented mutants were easily

obtained, which usually showed higher tetracyclin production. One of these, strain U-42, which was produced by UV treatment, merits special attention, as it produced about 78% more antibiotics than its parent strain, 5-43, or 21.5% more than the original strain 2U-84. The antibiotic productivity was found to increase with the decrease in pigment formation.

2. Another very efficient antibiotic producing mutant with abundant spore formation, strain EU-63, which was derived from a poor spore formation strain, 6-15 by the treatment with EI and UV, produced about 49.6% more tetracyclin than that of the original strain, 2U-84.