

金霉素链霉菌无活性菌株回复突变的研究

汤建中 王伯平 胡树藩 龚淑贞

李蓉仙 余培基 崔俊惠

(上海第三制药厂抗菌素研究所, 上海)

近年来,在有关抗菌素合成途径的研究中,报道了由于产生遗传性障碍而不能合成抗菌素,亦即产生了“零”突变菌株^[1-3]。又在次级代谢途径障碍性菌株的回复突变研究中,报道了能使抗菌素产量大幅度提高的回复突变型菌株^[4]。

我们在对产金霉素链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)菌株进行诱变试验中,筛选到一些不产生抗菌素的无活性突变型菌株,在此基础上进行了无活性菌株回复突变的试验。部分回复突变菌株在摇瓶中的金霉素产量高于生产菌株,最高者平均高于生产菌株8%左右。

一、材料和方法

菌株: 产金霉素链霉菌 10—32。

培养基: 斜面培养基(麸皮3.5%, 琼脂2%, 自然pH); 分离培养基(面粉2%, 蛋白胨0.05%, KH_2PO_4 0.08%, 琼脂2%, 自然pH)。

生物检定: 琼脂块培养法^[5]。

诱变因素: 紫外线、 ^{60}Co - γ 射线和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称NTG),采用常规诱变方法处理菌悬液。

回复突变方法: 用pH 6.0的Tris-maleic acid(简称TM)缓冲液溶解NTG,使成浓度为

300r/毫升,于28℃震荡处理无活性菌株的孢子悬液1小时。

二、实验结果

(一) 无活性菌株的获得

在常规方法诱变试验中,从紫外线诱变的715株菌中得到3株无活性菌株,从 ^{60}Co - γ 射线诱变的345株中得到1株,NTG诱变的854株中得到5株。三种诱变剂获得的无活性菌株出现的机率值分别是0.42%、0.23%和0.58%。

无活性菌株同生产菌株比较,在菌落形态、孢子颜色、孢子成熟时间、可溶性色素及发酵生理特性方面都存在着较大的差异(表1)。

(二) 无活性菌株的回复突变株的选育

用NTG做诱变剂所得到的回复突变株,从金霉素产量来看得到三种结果。其中,8-61菌株经诱变后,通过琼脂块培养法(下同),筛选的1004株菌株的产量均为零;从11-46菌株筛选的1550株菌株的产量均低于生产菌株;而从2-66菌株筛选的687株菌株的产量分布范围较宽,约有1.4%的菌株金霉素产量平于和高于原生产菌株,最高者为生产菌株产量的114%(表2)。

从上述结果可看出,无活性菌株经诱变后,

表1 无活性突变株与生产菌株生理特性比较

菌 株		菌落形态	孢子颜色	孢子成熟时间 (日)	可溶性色素	发酵液颜色
无活性菌株	8-61	馒头型	绿	2.5	绿 灰	米 黄
	11-46	扁 平	棕 灰	4-4.5	红 棕	深 绿
	2-66	草帽型	鼠 灰	2.5	青 灰	米 黄
生产菌株		草帽型	鼠 灰	3.5	棕 黑	深 棕

表 2 无活性菌株的回复突变菌株产量分布*

回复突变菌株所 占比率(%)	为生产菌株产 量的百分率 (%)	0—20	20—40	40—60	60—80	80—100	100—120
无活性菌株							
11—46		85.6	10.7	3.5	0	0	0
2—66		95.6	0.6	1.6	0.44	0.3	1.4

* 以生产菌株产量为 100% 计。

其中 2-66 菌株由于原来“零”突变稳定性差,因此,控制产量的基因容易发生较大的突变,表现为产量变异范围较 11-46 菌株宽得多,产量在 100—120% 的有 10 株菌。而 11-46 菌株的回复突变体均为负变菌株。此外,8-61 菌株经诱变后的回复突变菌株的产量均为 0,这可能是染色体部分缺失所致,也可能由于控制产量的质粒消除,有待进一步试验研究。

2-66 菌株回复突变后所获得的高产菌株经过 2 次自然分离得到的 16-51 菌株,在摇瓶多次发酵试验表明,比生产菌株的产量提高 8%

左右,12 次发酵数据如下(以生产菌株做对照,以 100% 计): 104.1、106.2、121.2、106.6、110.6、115.8、104.7、106、107.5、104.5、107.8、105.1。

参 考 文 献

- [1] Alikhanian, S. I. et al.: *Nature*, **189**: 939, 1961.
- [2] McCormick, J. R. D. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 5006, 1960.
- [3] Delic, V. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 103, 1969.
- [4] Dulaney, E. L. and D. D. Dulaney: *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **29**(11): 782, 1967.
- [5] Ichikawa, T. et al.: *Folia Microbiologica*, **3**: 218, 1967.