

紫外光綫及芥子氣處理黑麴霉引起 變異的試驗

李鍾慶* 方心芳

(中國科學院北京微生物研究室)

一. 前 言

由於霉菌在工業應用上日益增廣，研究霉菌變異與其選種的工作成為近來微生物學內的一個重大課題。人們為了獲得經濟價值更大的菌種，對於霉菌變異曾作過各方面的探討與研究。近十多年來，用強烈因素誘導霉菌變異得到良好效果的論文屢有刊錄，不僅提供了理論根據，而且在實際應用上亦具有重大意義。

例如 Alexander Hollaender^[1-3] 用紫外光照射各種微生物的研究，Horowitz^[5]、McElry^[6] 用氮芥子氣 (Nitrogen mustard gas) 處理 *Neurospora* 的研究等，都獲得了不同形態的與生理的變株。日本學者對霉菌應用方面的工作也很多，如坂口謹一郎，飯塚廣^[6]，井口信義^[7]，石谷千代子^[8]，小田雅夫^[9]，滋賀達二，有馬啓^[10]等等，對霉菌變異都進行過很多研究。最近 Броцкая^[11] 用紫外光處理 *Asp. nidulans* 及 *Asp. repens* 也得到了產生蛋白酶活性較原菌株提高一倍的變異株。

利用霉菌改造食品，我國發明最早，現在仍然用霉菌釀造許多食品、醫藥及工業原料。所用的菌種雖然已相當優良，但若加以培育處理，一定會得到產量更豐富的良種。此外，由於微生物變異的途徑與該微生物的演化史有一定的關係，研究變異就有助於自然分類。本試驗就是為達到這兩個目的的嘗試，而所用的菌種為 *Aspergillus batatae* 3.324 號是各酒精廠及白酒廠多用的。麴曲菌種中糖化力之最強的一種。

二. 試驗方法

1. 紫外光綫照射法

(a) 燈光的裝置：我們採用的紫外光源系一般實驗室所用的長管殺菌燈。

(b) 分生子液：於生長在察氏 (Czapek) 培養基斜面 30°C 7—10 天的菌株，加入 4 毫升 KH_2PO_4 緩衝液 (pH 4.5)，振搖洗下分生子並稀釋使每毫升含孢子數約五百萬個。

(c) 照射：將製備好的孢子懸液 3 毫升注入直徑 8.8 厘米無菌培養皿內。皿內事先注入 10 毫升純瓊脂，使其底部成極平坦的表面 (這樣孢子懸液可以薄厚一致)。將皿蓋打開，暴露在距光源 25 厘米處照射 30 分鐘 (距離與時間是我們多次摸索試驗而選定者)。

1957 年 10 月 4 日收到。

* 南京大學生物系助教，在微生物研究室進修。

(d) 照射後的處理：將照射後的分生子液用無菌水稀釋 100 倍或 1,000 倍，取此液每 0.5 毫升與麩皮瓊脂培養基 10 毫升混合，傾入二重皿，30°C 培養 48 小時。將未經照射的分生子懸液作同樣的稀釋與培養以作對照。

(e) 菌株的選擇：培養 48 小時後從照射的分生子培養基中首先選取變異的菌落。若無變異者，則從每一分平面培養中任意選一、二株到三、四株，移種在麩皮瓊脂及察氏瓊脂斜面上保存並編號，以待檢查其效能。

2. 芥子氣處理法

(a) 分生子處理法：將生長在察氏培養基斜面 30°C 培養 7—10 天的菌株用無菌生理鹽水 6 毫升洗下分生子使成懸液。取此液 4 毫升注入含有氮芥子氣* 8 毫克之安瓶中，此時芥子氣之濃度為 0.2%，浸漬 5—10 分鐘。然後取處理過之分生子液一滴 (30 滴 = 1 毫升) 與定量之察氏，麩皮，及含有不同濃度之麩皮浸汁等瓊脂培養基中作成平面，培養於 30°C。培養後的處理同紫外光法。

(b) 萌芽分生子處理法：將生長在察氏斜面 30°C 7—10 天的菌株加入 10 毫升麥芽汁培養液，振搖使分生子懸浮，30°C 孵育 8 小時，使其萌芽。用無菌濾紙及漏斗過濾，再用無菌生理鹽水 10 毫升洗下濾紙上之萌芽分生子，使再成懸液；然後用此液 4 毫升同氮芥子氣作與上項同樣的處理。

3. 所選菌株的檢查：我們試驗目的主要是想獲得工業應用上優良的變異株。我們知道原菌株產生澱粉酶及酸量均高，所以我們首先檢查其生理性能，測其糖化力及產酸力。對變異顯著者並進行形態的觀察。對形態既無變化而產酸力或糖化力又不高者則棄去。

(a) 澱粉酶活性的測定：按 50 度糖化法進行^[22]，以糖化度表示澱粉酶活性的大小。有時以原菌株的糖化力作為 100，計算變異株的糖化力。

(b) 測產酸量：將 10 Brix 的麥芽汁培養液 70 毫升注入 250 毫升之椎形瓶中。滅菌後接種欲檢查之菌株，25°C 培養 7 天後用約 0.1N NaOH 滴定其酸量。

(c) 變異菌株形態的觀察：把形態改變的菌株點植於察氏瓊脂培養基上作成三點培養，觀察其巨大菌落生長的情況，如形狀、顏色等。並用顯微鏡觀察其個體形態，如分生子柄 (Conidiophore)、頂囊 (Vesicle)、小梗 (Sterigmata) 以及分生子 (Conidia) 等。

三. 結 果

(一) 處理後分生子的萌發與生長的情況。

紫外光照射的分生子培育在察氏與麩皮瓊脂上，其萌發的快慢及萌發率無差別；其死亡率皆達 99—99.6%。惟培養在麩皮瓊脂上者萌發後生長快且產生分生子量也多。

氮芥子氣處理的分生子死亡率和萌發速度與培育時培養基的不同有顯著的差異。用麩皮浸汁者萌發快，死亡率較小，在察氏瓊脂上則萌發慢死亡率較大。處理的時間長短並不表顯出明顯的差別，5 到 10 分鐘則已收效。今以表 1 示其關係：

(二) 處理後所得菌株糖化力及產酸力的變化。

用紫外光照射先後選出 96 株，用氮芥子氣處理後選出 64 株，共計 160 株。將此 160

* 我們採用的氮芥子氣是匈牙利布達佩斯藥品有限公司出品的。Methyl-di (β -chloroethyl) amino-hydrochloride。

表 1 黑麴霉被 0.2% 氮芥子氣處理後其萌發及生長情況

處理的時間 培養天數 培養基的成分	5 分 鐘				10 分 鐘				20 分 鐘				30 分 鐘				對照 (未處理)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
察 氏 瓊 脂	-	-	±	+	-	-	-	+	-	-	±	+	-	-	±	+	+	++	+++	++++
察氏瓊脂含 2% 麩皮浸汁	-	-	+	++	-	-	+	++	-	-	+	++	-	-	+	++	++	+++	+++	++++
察氏瓊脂含 6% 麩皮浸汁	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	++	+++	+++	++++
麩 皮 瓊 脂	±	+	+++	++++	±	+	+++	++++	+	++	+++	++++	±	++	+++	++++	++	+++	+++	++++

(註) ‘-’ 沒有生長，‘±’ 已有萌發者但不顯著，‘+’ 已開始萌發，‘++’ 已有大量萌發，
‘+++’ 已形成稠密的小菌落，‘++++’ 菌落大而密集。

株先後分別與原株對照進行其糖化力及產酸量測定的結果，以原株作為 100，其增減百分率的統計列於表 2A 及表 2B。據表 2A 及 2B 統計結果指出，在糖化力提高方面，芥子氣處理者有 81%，紫外綫照射者有 58%，在產酸力提高方面紫外綫照射者有 54%，芥子氣處理者有 49%。變異株生酸力的遺傳性相當穩定，糖化力的遺傳性多趨下降，但也有上升者，表 3 為一例證。

表 2A 糖 化 力 增 減 的 統 計

統 計 增 減 %		紫 外 光 照 射		氮 芥 子 氣 處 理		紫 外 光 與 芥 子 氣 合 計	
		株數	佔總株數 (96) %	株數	佔總株數 (64) %	株數	佔總株數 (160) %
增 強	20 以上	1	1.04	7	10.94	8	5.00
	15—19.9	6	6.25	3	4.68	9	5.63
	10—14.9	31	32.29	13	20.32	44	27.50
	5—9.9	8	8.34	20	31.25	28	17.50
	0.1—4.9	10	10.41	9	14.06	19	11.88
	合 計	56	58.33	52	81.25	108	67.51
減 弱	30 以下	1	1.04	3	4.68	4	2.50
	20—25	3	3.12	2	3.12	5	3.12
	15—19.9	5	5.20	1	1.56	6	3.75
	10—14.9	10	10.41	2	3.12	12	7.50
	5—9.9	8	8.34	1	1.56	9	5.63
	0.1—4.9	9	9.38	2	3.12	11	6.87
合 計		36	37.49	11	17.18	47	29.37
與原株相等者		4	4.16	1	1.56	5	3.12

表2B 產 酸 力 增 減 的 統 計

統 計 增 減 %		紫 外 光 照 射		氮 芥 子 氣 處 理		紫外光與芥子氣合計	
		株數	佔總株數 (86)* %	株數	佔總株數 (64) %	株數	佔總株數 (150) %
增 強	20 以上	8	9.30	4	6.25	12	8.00
	15—19.9	1	1.16	0	0	1	0.67
	10—14.9	9	10.47	6	9.38	15	10.00
	5—9.9	19	22.09	11	17.19	30	20.00
	0.1—4.9	10	11.63	9	14.06	19	12.67
	合 計	47	54.65	30	46.88	77	51.34
減 弱	35 以上	4	4.65	5	7.81	9	6.00
	15—20	4	4.65	1	1.56	5	3.33
	10—14.9	3	3.49	3	4.68†	6	4.00
	5—9.9	8	9.30	6	9.38—	14	9.33
	0.1—4.9	8	9.30	8	12.50	16	10.67
	合 計	27	31.39	23	35.93	50	33.33
與原株相等者		12	13.95	11	17.19	23	15.33

* 總株數應該是 96 因有 10 株未測故按 86 株計。

表3 澱 粉 酶 活 力 的 增 減

菌 株	初處理後的糖化力	培養後的糖化力	養培後糖化力的增減
原 株	100	100	—
UV 44	120	103.5	-16.5%
N 44	131	109.1	-21.8%
UV 2—21	106	122.3	+15.3%

在產酸方面培養後的情形較穩固,增減幅度不大。

連續處理菌株的糖化力及產酸量能有所提高,一例如表 4。

表 4 連 續 處 理 的 效 果

活 力	第一次處理	第二次處理	第三次處理
產 酸 力 (發酵液酸度)	原 菌 株 → UV 7 → UV 2—7 → UV*3—12		
	0.488 N	—	0.584 N
糖化力 (糖化度)	原 菌 株 → UV 7 → UV 2—7 → UV 3—20		
	7.51	8.1	—
			8.63

* UV—紫外線照射。

(三) 處理後菌株形態的改變。

在我們實驗的條件下,用紫外光第一次處理後的菌株形態上變化不大,但經過三次處理後,出現了特別的變異。在這些變異中有三株最爲突出:

1. UV 3—12 變株: 這一變株在生理活性方面來說是所得菌株中產酸力最強的一株; 在形態方面來說亦是最明顯地變異之一。它所生的穗,已不是黑色,而是黃白色至肉桂色,其菌落的形態與色澤很像 *Asp. cinnamomeus* (圖 1、2)。

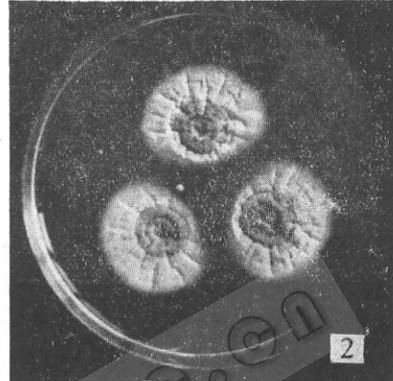
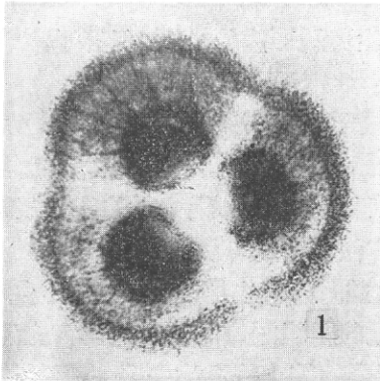


圖 1、2 培養在察氏瓊脂上的巨大菌落

1 是原菌株 3.324 號 *Asp. batatae*; 2 是 UV 3—12 號變異株。

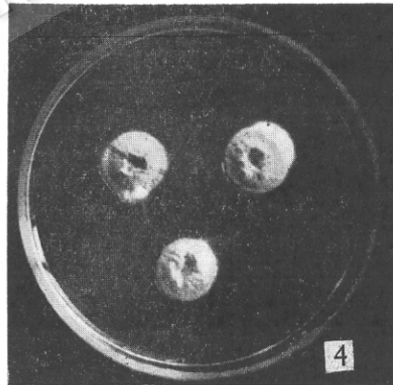
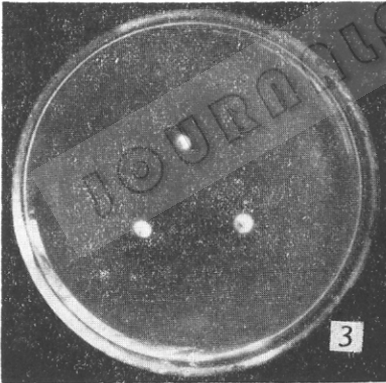


圖 3、4 培養在察氏瓊脂上的巨大菌落

3 是 UV 3—15 號變異株; 4 是 UV 3—13 號變異株。

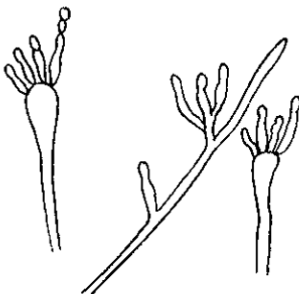


圖 5 UV 3—13 號變異株

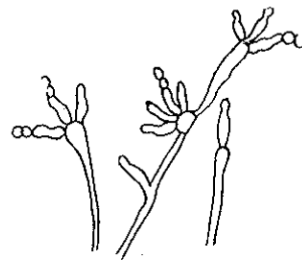


圖 6 UV 3—15 號變異株

2. UV 3—13, UV 3—15 變株: 這兩株菌產生分生子柄非常少, 而且見到的又很細小。其頂囊膨大的部分也極小, 頂囊上着生的小梗僅有三、四個, 至多五、六個。同時只有一層小梗, 此外小梗也着生在近似普通菌絲而不像分生子柄者情況很多(圖 5、6)。這兩株菌的區別是 UV 3—13 號成熟後的菌落為灰色、或黃灰色, 而 UV 3—15 號菌落則呈桔紅色, 並且較前者生長更慢(圖 3、4)。

結 論

用紫外光綫及芥子氣處理麴霉都容易得到生理及形態的變異; 但芥子氣較紫外光綫為緩和, 以處理萌芽孢子為合適。

兩種因素處理後的菌株 67% 的糖化力有所提高, 一半以上的生酸能力增加了。但是生酸力多穩定不變, 而糖化力於培養數代後絕大部分趨於下降, 雖然在麩皮上培養較察氏瓊脂上培養的糖化力減小較慢, 但也不能抑制這種退化作用; 絕少數的菌株經培養後, 糖化力趨於提高。所以還是可以肯定的說用這個方法能夠得有利菌種。

在形態方面最易起變化的是分生子的顏色, 並且都是由黑色變為淺色, 如淺黃色等。由此可見肉桂色麴霉與黑麴霉是有一定的相當近的親緣關係的。子實器官上的改變是分生子柄的退化及基層小梗的消失最為顯著, 而頂囊的縮小甚至消失及小梗數目的減少等亦頗明顯。我們認為這些形態的改變與黑曲霉的演化史有不可分割的關係。

參 考 文 獻

- [1] Hollander, A. & W. D. Claus, *Jour. Gen. Physiol.*, **19**: 753—765, 1936.
- [2] Hollander, A., Raper, K. B. & Coghill, R. D., *Amer. J. Bot.*, **32**: 160—165, 1945.
- [3] Hollander, A., Samsome, E. R., Zimmer, E. & Demerec, M., *Amer. J. Bot.*, **32**: 226—235, 1945.
- [4] Horowitz, N. H., Houlahan, M. B., Hungate M. G. & Wright, B., *Science*, **104**: 233—234, 1946.
- [5] McElry W. D., Cushing, J. E. & Miller H., *J. Cellular. Comp. Physiol.*, **30**: 331—346, 1947.
- [6] Sakaguchi, K. I., Suzuhi, I. & Iizuka, H., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**: 164—171, 1955. (微生物學文摘, **4**(4): 48).
- [6a] H. Iizuka & T. Yamaguchi, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**: 194—200, 1955.
- [7] 井口信義: 日本農藝化學會誌, **23**: 16, 1949.
- 井口信義: 日本農藝化學會誌, **24**: 257, 1950.
- [8] 石谷千代子: 日本農藝化學會誌, **25**: 89, 1951.
- [9] 小田雅夫等: 醱酵工學雜誌, **30**: 120, 1952.
- 小田雅夫等: 醱酵工學雜誌, **32**: 36, 1954.
- 小田雅夫等: 醱酵工學雜誌, **32**: 102, 1954.
- 小田雅夫等: 醱酵工學雜誌, **32**: 145, 1954.
- [10] 滋賀達二、有馬啓: *Japan. J. Antibiotics*, **5**: 211—216, 1952, **15**: 225—266, 1952.
- [11] С. З. Бродская: *Микробиология*, **25**: 2—11, 1956.
- [12] 方心芳: 黴菌實驗法, 1951 年, 三聯出版。

STUDIES ON THE MUTANTS RESULTING FROM ULTRA-VIOLET RAY IRRADIATION AND NITROGEN MUSTARD GAS TREATMENT*

LI CHUNG-CHING

(Nanking University, Department of Biology)

FANG HSIN-FANG

(Peking Laboratory of Microbiology, Academia Sinica)

(1) The amylolytic and acid producing power of the survivals resulting from ultra-violet ray irradiation and nitrogen mustard gas treatment was compared with those of the original strain, *Aspergillus batatae* 3.324. 81% mustard gas survivals and 58% ultra-violet ray survivals were superior in amylolytic power, about one half of either of these two survivals was superior in acid producing power.

(2) The amylolytic power of the survivals as a rule decreased after successive passage, but one strain increased its amylolytic activity under the same conditions.

(3) After further ultra-violet ray irradiation, we obtained distinct morphological mutants, which differed in the color of their conidial heads, the fructification organs and in the cultural characteristics. The color of conidial heads of mutants was very much lighter, the primary sterigmata of 2 mutants were reduced, and one mutant grew very slowly and its colony was restricted.

* The work was carried out at the Peking Laboratory of Microbiology, Academia Sinica.