

紫外线诱发白地霉 (*Geotrichum candidum*) 变异的研究*

吴衍庸 徐成基 齐义鹏 陈克明 刘大江

(中国科学院西南生物研究所, 成都)

白地霉可作为代食品或饲料。白地霉 AS 2.361 富有蛋白质、脂肪等营养成分; 但为了更有利于推广, 尚有进一步提高其营养成分的必要。Броцкая 曾报导^[1]构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的紫外线辐射变种 2/7 号分解蛋白质活力比原始菌种高 2.5 倍。Кузюрина 的研究^[2]黑曲霉变种 82 号比原始菌种产柠檬酸的能力大大提高。我国学者李钟庆、方心芳^[3]得到的黑曲霉紫外线辐射变种不仅在形态上有很大的变异, 其糖化力也比原始菌种提高了 58%。

本试验试图利用紫外线对微生物的诱发变异作用来提高白地霉 AS 2.361 的蛋白质和脂肪的含量, 筛选出生产所需要的变异菌株; 同时并对紫外线诱发白地霉变异规律进行初步的探讨。

试验材料和方法

照射用菌种是中国科学院微生物研究所赠给的标准种白地霉 (*Geotrichum candidum* AS 2.361)。菌种保存于冰箱中备用。照射前取出以麦芽汁琼脂混合菌液倒入平皿, 挑选一个在形态上未发生自然变异的单个菌落, 接种斜面作为照射材料。取菌龄 6 天的斜面培养物制成 1×10^7 /毫升的孢子悬液, 备照射用。培养基用麦芽汁琼脂。照射前在平皿中先倒入 5% 的纯琼脂 20 毫升使底面平坦, 每平皿再加入孢子悬液 4 毫升, 在无菌箱内装置国产 30W 的紫外光灯下进行不同时间的照射。照射距离为 25 厘米。

照射后吸取 1 毫升照射液于平皿中, 与培养基混合。以 1:20 未经照射的孢子液 (5×10^5 /毫升) 进行同样接种作为对照。28℃ 培养 5 天。

2 次及多次照射材料: 前者由单次照射后的变株中选出蛋白质与脂肪含量高者, 后者是从 2 次照射后选出脂肪或蛋白质含量高的变株, 分别按原照射条件进行, 采用梯级选择法进行选种。

所得变异菌株在 8.2 波美的麦芽汁培养基中振荡培养, 过滤菌丝体, 以微量凯氏定氮法测定总氮求其粗蛋白质含量, 用酸水解索氏抽提法测定全脂。

试验结果和分析

(一) 紫外线照射剂量与白地霉存活率及变异率的关系

在培养 5 天后, 分别计算平皿中生长菌落数和形态变异菌落数。以对照生长菌落为 100% 计算不同剂量照射时的存活率, 以各剂量照射后的菌落总数而计算形态变异率。

* 黄永秀、郭世则、张发量、王西俊等参加了此项工作。
本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

紫外线照射白地霉 AS 2.361 共进行 4 次试验,研究菌落共 10761 个,其中有 660 个在形态上发生了不同程度的变异。各个照射剂量下的生长菌落,除照射 5 分钟、20 分钟在 1000 个菌落以下外,其余都在 1500 个以上。对照菌落共研究 2719 个,一般是较稳定的,很少发生自发突变。

从图 1 看出,经照射后细胞存活率是随着剂量的增加而降低,照射 1 分钟存活率为 11.61%,3 分钟为 3.55%。剂量增加即照射时间延长到 5、10、15 分钟存活率继续下降。存活率分别为 0.44,0.34,0.29%。当照射时间延长到 20 分钟时,存活率即降至 0.037%。变异率的变化是 5 分钟照射时为最大,其次是照射 20 分钟,获得了两个高峰的变异曲线。我们所得到的变异曲线性状与 Hollaender 报导的^[4]以紫外线照射土褐曲霉 (*Asp. terreus*) 得到的曲线性状相似。

(二) 紫外线照射白地霉所获得的菌落形态变异菌株的类型和特征

在所得的 660 个形态变株中,形态变异最大的有 360 个。根据它们在菌落形态上所

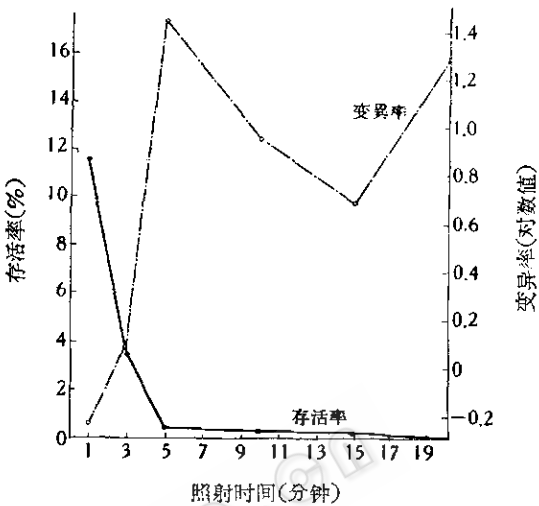


图1 白地霉 AS 2.361 经紫外光照射后的变异率和存活率(四次实验的平均数)。

表 1 白地霉 AS 2.361 经紫外线照射后出现的变异类型和特征

类 型	特征描述		菌 落 特 征	显 微 特 征
	代表菌株			
原 始 菌 种	白 地 霉 AS 2.361		菌落圆形,絨毛疏松,白色,边缘整齐,菌落边处的茸毛成交叉状排列	菌絲直径一般为 6 微米,节孢子圆柱形,末端稍呈钝圆,大小一般为 9×3.6 微米,发芽方式是从节孢子一端长出芽管并与长轴方向成一角度
第 一 类	UD 1.33		菌落呈凉帽状,菌落较厚,有平坦宽边	菌絲多数断裂成节孢子,节孢子粗细不等,大小为 $6.6-9.9 \times 4.5-5.5$ 微米,节孢子多从顶端长出一芽管状物,如蝌蚪
第 二 类	UE 1.31		菌落干瘪,并满布针状小孔,排列花纹状,菌落薄,茸毛干燥稀少而短,边缘茸毛排列	菌絲单条,直,粗细不均。节孢子有椭圆和近圆形,前者大小为 12×9 微米,后者直径 9 微米,亦夹有少数呈短杆状的
第 三 类	UE 1.55		菌落较小而厚,状如 坐 垫。茸毛短而丰盛,边缘有细长稀疏的茸毛,并贴于培养基的表面	菌絲细,直径约为 3 微米。节孢子亦较小,一般仅 7.5×4.5 微米
第 四 类	UA 1.47		菌落隆起,有明显絨毛边,中部凸凹不平,下陷处有空窗花心	菌絲较细长,直径 4.5 微米。节孢子丰满,大小在 $9.5-21.5 \times 5.5-9.2$ 微米之间,一般为 15×9 微米
第 五 类	UB 1.36		菌落较厚,中部下陷处茸毛短而稀疏,呈现针刺孔状	多为节孢子或短菌絲,节孢子较大,为长短不等的杆状,大小一般为 12×4.5 微米
第 六 类	UG 1.10		菌落厚,中部有梗状突起	

表现的差异分为 6 个类型。列于表 1。

在这 6 个类型中,不管是类型和变株数目都以照射 5 分钟的为最多,在这一剂量照射下,共出现 5 个类型 190 个变株,其次是照射 15 分钟的共四个类型,83 个变株。最少的是照射 1 分钟的,只有两个类型,共 20 个变株。

(三) 白地霉经紫外线照射后引起的蛋白质及脂肪含量的变异

白地霉 AS 2.361 经不同剂量的紫外线处理之后,在出现的菌落中初选了 310 个变异

表 2 白地霉 AS 2.361 脂肪、蛋白质含量的波动幅度

菌 株	测 定 时 间	蛋 白 质 含 量 (克)	脂 肪 含 量 (克)	备 注
原 始 菌 株	1962年 7 月20日	42.33	4.201	1961年微生物研究所推广菌株由我所保存作供试菌株
	1963年 1 月13日	44.08	4.380	
对 照 菌 株	1963年 1 月13日	41.29	3.610	测定前由微生物研究所寄送标准菌种
	1963年 5 月10日	39.68	3.250	

表 3 UV 单次照射对白地霉 AS 2.361 的蛋白质、脂肪含量的影响*

测定项目		脂 肪		蛋 白 质	
照射 时间 (分钟)	变株名称	含 量 (%)	增减值(%)**	含 量 (%)	增减值(%)**
1	UG 1.10	5.839	138.81	38.66	91.33
5	UD 1.39	6.396	152.16	49.37	116.63
	UB 1.31	6.316	150.11	47.94	113.25
	UD 1.33	6.185	147.07	40.15	94.85
	UI 1.38	6.175	146.76	42.44	100.26
	UF 1.32	6.088	144.71	45.21	106.80
	UE 1.31	5.902	140.28	38.93	91.97
	UX 1.35	5.758	136.86	42.94	101.44
	UV 1.33	5.448	129.50	43.15	101.94
	UG 1.35	4.425	128.95	50.54	119.94
	UQ 1.33	4.978	118.33	43.87	103.64
7	UY 1.47	4.988	118.58	41.83	98.82
15	UE 1.54	7.225	171.71	44.80	105.84
	UE 1.55	6.426	152.73	47.67	112.62
	UL 1.51	5.606	133.25	34.53	81.57
	UA 1.51	5.489	130.47	47.18	111.46
	UF 1.53	5.170	122.85	37.42	88.40
20	UC 1.61	6.390	151.87	49.46	116.84
	UL 1.67	5.889	139.97	49.60	117.17
	UC 1.62	4.420	105.83	33.15	78.31
0	2.361	4.206	100.00	42.33	100.00

* 重复两次平均结果。

** 增减值系变株的蛋白质和脂肪含量与原始菌株之含量相比较。

菌落,再經過巨大菌落點植,連續觀察 3 代(點植 1 次為一代),挑選未繼續分化的菌落即形態特征已基本固定者,對 20 個變株進行脂肪、蛋白質的測定。從 20 個變株中選擇脂肪、蛋白質含量高者進行 2 次照射。3 次照射材料又從經 2 次照射後其中出現的含脂肪或蛋白質量高的變株中選出。

為了確定照射後菌體內脂肪、蛋白質含量是否發生了變異的問題,測定了白地霉 AS 2.361 脂肪和蛋白質含量的波動幅度,同時還測定了供試原始菌株和另一對照菌株。

從表 2 看出,原始菌株和對照菌株在同一條件下測定結果說明,蛋白質含量的波動幅度較小,而脂肪含量的波動較大。但對不同菌株而言,不同時間測定同一菌株,脂肪、蛋白質含量幅度差異也不大。下面是單次或多次 UV 照射後的結果,分別列於表 3。

從表 3 測定結果看來,經單次照射之後,20 個菌株中脂肪含量均高於原始菌株,含量增加在 40% 以上者,占所測菌株的 50% 以上。增加在 30% 的菌株占 25%,其含量增加在 10% 左右的占 25%。超過原始菌株蛋白質含量的有 13 個變株,占所測菌株的 65%。

從表 4 結果看出,2 次照射後全部變株測定結果,其脂肪含量均低於第 1 次照射後變株的含量,但都高於原始菌株。在所測的菌株中,50% 的變株提高蛋白質含量,其中 UE 1.54 所產生的 2 次照射變株測定的 5 株都有提高,其含量提高了 1.52—5.25%;由 UE

表 4 2 次 UV 照射對白地霉 AS 2.361 的脂肪、蛋白質含量的影響*

參加照射材料 類型**	第二次照射 後測定變株 類型	脂 肪		蛋 白 質		與參加照射原株比 的含量增減值	
		含 量 (%)	增 減 值 (%)	含 量 (%)	增 減 值 (%)	脂 肪 (%)	蛋 白 質 (%)
UE 1.54	UE 2.541	4.65	110.56	47.05	111.15	-2.575	+2.25
	UE 2.542	4.82	114.60	49.86	117.79	-2.405	+5.06
	UE 2.544	5.39	128.15	46.32	109.43	-1.835	+1.52
	UE 2.545	4.86	115.59	51.05	120.60	-2.365	+5.25
	UE 2.546	5.42	128.86	49.93	117.95	-1.805	+5.13
UE 1.55	UE 2.551	5.26	125.06	49.45	116.82	-1.166	+1.78
	UE 2.559	5.19	122.91	50.37	118.99	-1.236	+2.70
	UE 2.552	5.05	120.06	40.12	94.78	-1.376	-7.55
	UE 2.554	4.87	115.79	48.76	115.19	-1.556	+1.09
	UE 2.553	4.70	111.75	43.58	102.95	-1.726	-3.09
UC 1.66	UC 2.612	5.42	128.86	48.55	114.69	-0.970	-0.91
	UC 2.619	5.21	123.87	50.58	119.49	-1.180	+1.12
	UC 2.611	4.88	116.02	49.35	116.58	-1.510	-0.11
UD 1.39	UD 2.394	5.41	128.63	48.49	114.55	-0.986	-0.88
	UD 2.391	4.90	116.50	45.37	107.78	-2.036	-4.00
	UD 2.392	4.38	104.14	48.17	113.80	-2.016	-1.20
UL 1.67	UL 2.672	4.46	106.04	48.36	114.32	-1.429	-1.24
UG 1.35	UG 2.353	5.13	121.97	48.87	115.45	-0.295	-1.67
原 始 菌 株		4.206	100	42.33	100	—	—

* 重複兩次平均結果。

** 由第一次照射後選出之變株作二次照射材料。

1.55 产生的变株中测定的 5 株,其中有 3 株提高了蛋白质含量,提高值为 1.09—2.70%;由 UC 1.61 产生的变株测定的 3 株中,仅 1 株蛋白质含量提高了 1.12%。与原始菌株比较,除 1 株降低外,其余变株均有不同程度的提高。含量高于原菌株 15% 以上的占总株数的 83.3% 含量高于原菌株 10% 的占 16.6%。

表 5 3 次 UV 照射对白地霉 AS 2.361 的脂肪、蛋白质含量的影响*

参加照射材料 类号**	照射后选出 的变株	脂 肪		蛋 白 质		与参加照射原始菌株比含量增减值	
		含 量 (%)	增 减 值 (%)	含 量 (%)	增 减 值 (%)	脂 肪 (%)	蛋 白 质 (%)
UE 2.559	UE 3.5594	5.476	130.19	39.55	93.43	+0.286	-10.82
	UE 3.5597	6.476	153.97	43.29	102.27	+1.286	-7.08
	UE 3.5592	4.454	105.90	38.55	91.07	-0.636	-11.82
UC 2.619	UC 3.6194	5.627	133.78	36.90	87.17	+0.417	-13.68
UE 2.545	UE 3.5451	4.743	112.76	37.29	88.10	-0.117	-13.76
	UE 3.5454	4.443	105.63	35.38	83.58	-0.417	-15.67
	UE 3.5453	3.499	83.69	38.50	90.95	-1.361	-12.55
UE 2.546	UE 3.5466	3.843	91.37	38.03	89.84	-1.577	-11.90
原 始 菌 株		4.206	100	42.33	100		

* 重复两次平均结果。

** 由 2 次照射后选出变株作照射材料。

从表 5 可见,3 次照射后变株蛋白质全部低于第 2 次照射变株及原始菌株。在所研究的 8 个变株中脂肪含量有 5 株低于 2 次照射变株,低于原始菌株的有 2 株,其余 6 株均高于原始菌株。特别是 UE 3.5594、UE 3.5597 其含量比第 2 次的 UE 2.559 变株提高了 7.8—30.06%。按梯级选择法,将这些高含量的变株进行选择,其步骤如下:(以 UE 1.55 为例)。



图 2 白地霉 AS 2.361 经单次及多次 UV 照射后选种程序图示。

从单次及多次照射的结果看来,第 1 次照射后可以获得比原始菌株脂肪、蛋白质含量均高的变株,第 2 次照射与第 1 次比较,筛选的变株蛋白质含量增高,相应脂肪含量降低,因此 2 次照射对筛选脂肪含量高的变株是不利的。第 3 次照射出现的情况相反,对筛选蛋白质含量高的变株不利,但可以获得脂肪含量高的变株。

所得高蛋白、高脂肪經濟性狀穩定性進行了測定。

經第 1 次紫外綫照射的變株，在 8 度波美麥芽汁琼脂斜面上于冰箱中保存。轉種 12 代，保存 19 個月時間，測定脂肪、蛋白質含量，并計算其增減變化。經 2 次照射的變株，只保存 7 個月，轉種 6 代。3 次照射的變株，因保存時間太短，未作測定。現將挑其中 3 株進行測定，結果列入表 6。

表 6 UV 變株保存期間經濟性狀的退化情況

照射次數	變株名稱	照射後增減值		保存後增減值		保存後增減變化	
		脂 肪 (%)	蛋 白 質 (%)	脂 肪 (%)	蛋 白 質 (%)	脂 肪 (%)	蛋 白 質 (%)
第一次	UE 1.54	171.71	105.84	139.30	89.23	-32.41	-16.61
	UE 1.55	152.73	112.62	144.27	101.67	- 8.46	-10.95
	UC 1.61	151.87	116.84	143.72	95.79	- 8.15	-21.05
第二次	UE 2.546	128.86	117.95	125.34	87.98	- 3.25	-29.97
	UE 2.559	122.91	118.99	111.12	92.09	-11.79	-26.90
	UC 2.619	123.87	119.49	114.10	89.39	- 9.77	-30.10
原 始 菌 株		100	100	100	100	0	0

表 6 結果表明，第 1 次照射的變株，經 19 個月保存，轉種 12 代，脂肪和蛋白質量均有下降。但脂肪量增高快，下降慢（有 1 株較快）。蛋白質含量變化較大，保存後絕大多數低於原始菌株。經 2 次照射的變株保存時間和轉種代數雖不如第 1 次照射變株時間長和轉種次數多，但其變化趨勢仍然一致。因此我們認為經過 UV 照射後的變株，在增高脂肪和蛋白質這一獲得性狀上，隨時間增長而退化。相對而言，脂肪比蛋白質較穩定，其含量仍高於原始菌株 40% 以上。

討 論

由紫外綫照射引起的微生物變異，其曲綫性狀是不同的。根據多數文獻資料上的報導，變異頻率是隨着劑量的增加而增高的，劑量繼續增加，變異率下降^[1,2,7,8,9]。但也有不同的情況，如 Pittenger 等^[10]以紫外綫照射的灰色鏈霉菌（*Streptomyces griseus*），Kelner^[11]以紫外綫照射黃微綠鏈霉菌（*Strept. flavovirens*）的實驗中就得到照射劑量末端點的高變異頻率。Hollaender 等^[4]以紫外綫照射土褐曲霉。Swanson 等^[12]以紫外綫照射粗糙鏈孢霉（*Neurospora crassa*）也得到與我們相類似的雙峯曲綫。因此變異曲綫性狀，隨着照射對象的不同，表現也不完全一致。Hollaender^[4]指出，高變異頻率的末端點是 1 個或多個細胞分裂後表現的平均突變率的結果。我們試驗中得到的雙峯曲綫是否可以用這點來解釋，尚不能作為定論。

紫外綫能誘發微生物體內新陳代謝的變化，在微生物選種實踐中得到有經濟價值性狀的變異。白地霉經紫外綫照射後得到了脂肪、蛋白質含量高的變株。但是這一性狀是不穩定的，在菌株保存期間表現了逐漸退化現象。因此經紫外綫照射後所獲得的這一性狀，如何防止其退化，仍有待繼續進行研究。但是考慮到紫外綫對提高白地霉 AS 2.361

脂肪、蛋白质含量的有效作用,对照射后发生了变异的菌株作适当筛选和利用,用于工厂生产上对提高产品质量作为一项方法和措施仍值得进一步研究。

摘 要

(一) 研究了紫外线照射的剂量与白地霉 AS 2.361 存活率和变异率的关系,存活率是随着剂量的增加而降低,变异率则随着剂量的增加而增高,并达到最高峰;当继续增加剂量时变异率就下降,当剂量达到最高时变异率重新上升,而获得双峰曲线。出现最大变异频率的最适剂量为距离在 25 厘米照射时间为 5 分钟。

(二) 共研究了 10761 个菌落,得到形态变异菌落 660 个,变异性最大的有 360 个,分为六个类型:第一类型是凉帽状菌落;第二类菌落干瘪而薄,表面满布针状小孔;第三类菌落紧密;第四类为中部下陷成空窗状菌落;第五类菌落茸毛短而稀疏;第六类菌落厚,中部呈梗状突起。其中以照射 5 分钟出现的类型和菌落都最多,照射 1 分钟最少。

(三) 白地霉 AS 2.361 经单次紫外线照射结果,筛选出的形态变株中能显著增高体内脂肪和蛋白质的含量。所测 20 个变株中,其脂肪含量全部高于原始菌株,有 65% 的变株增高了蛋白质含量。2 次照射后所选出变株蛋白质含量又有提高,脂肪情况则相反。3 次照射,蛋白质含量下降,而脂肪增高。

参 考 文 献

- [1] Броцкая, С. П.: *Микробиология*, 29 (3): 358—362, 1960.
- [2] Кузюрина, Л. А.: *Микробиология*, 30(5): 897—904, 1961.
- [3] 李钟庆,方心芳: *微生物学报*, 6 (3): 321—326, 1958.
- [4] Hollaender, A., Raper, K. B. & Coghill, R. D.: *Am. J. Botany*, 32: 160—165, 1945.
- [5] Мшенецкий, А. А.: *Микробиология*, 26(6): 632—650, 1957.
- [6] Кузюрина, Л. А.: *Микробиология*, 28(5): 667—674, 1959.
- [7] Anderson, E. H.: *Billen D. J. Bact.*, 70:35—43, 1955.
- [8] 杜比宁, Н. П.: *电离辐射与遗传*, 196—222, 上海科学技术出版社, 1961.
- [9] 阿列哈杨, С. И., 米德伦, С. З.: *微生物学译报*, 3 (6): 1—9, 1956.
- [10] Pittenger, R. C., McCoy, E.: *J. Bact.*, 65: 56—64, 1953.
- [11] Kelner, A. J.: *Bact.*, 56(4): 457—465, 1948.
- [12] Swanson, C. P., McElrog, W. D. & Miller, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 35:513—518, 1949.

ULTRAVIOLET INDUCED MUTATION OF *GEOTRICHUM CANDIDUM*

WU YAN-YONG, XI CHENG-JI, QI YI-PENG,

CHEN KE-MING AND LIU DA-JIANG

(Xi-Nan Institute of Biology, Academia Sinica, Chengtu)

1. The influence of different doses of ultraviolet irradiation on the survival rate and the morphological mutation rate was studied with *Geotrichum candidum* AS 2.361. It was found that the survival rate was decreased by the increasing doses of irradiation, but the mutation rate was increased at first, followed with a decrease, and then increased again. A double peaked curve was thus formed and the dose with the maximum mutagenic effects was to irradiate the spore suspension at a distance of 25 cm for 5 minutes.

2. Six hundred and sixty morphological mutant colonies were obtained from 10,761 colonies studied. Three hundred and sixty colonies of the 660 mutant colonies varied obviously, and were able to be divided into 6 types: that is, (1) the straw-hat shaped colony, (2) the thin colony with sear surface, (3) the small, thick, and dense colony, (4) the umbilicate colony, (5) the thick colony with short and wispy fluff in the center, and (6) the thick colony with a lug in the center. The most of these types were obtained with the 5 minutes irradiation, but the least, with the 1 minute irradiation.

3. A single treatment of *Geotrichum candidum* AS 2.361 with UV-irradiation, the protein and fat contents of the mycelium were increased. After a double treatment, the protein content was further increased but the fat content was decreased. A contrary result was obtained with a triple treatment.