

龟裂链霉菌高产株激光辐照的研究*

吴振倡

(浙江省微生物研究所, 杭州 310012)

石宝驹 游向东 戴春泉 陈守川

(浙江大学物理系, 杭州)

王凤仙

(浙江省医学科学院药物所, 杭州)

白 骅 陈建华**

(浙江海门制药厂, 椒江市)

Study of laser-irradiation on high-yielding strain in *S. rimosus*

WU Zhenchang

(Zhejiang Institute of Microbiology, Hangzhou 310012)

WANG Fenxian

(Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou)

SHI Baoju, YOU Xiangdong, DAI Chunquan, CHEN Shouchuan

(Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou)

BAI Hua, CHEN Jianhua

(Haimen Pharmaceutical Plant, Zhejiang)

Abstract High yield strains in laser breeding of *S. rimosus* were obtained by irradiation with He-Ne laser or copper vapor laser. It increased yield by about 6.79% higher than that of the controlled ones. The highest unit of fermentation arrived at best level. It was already applied in China.

Key words streptomyces rimosus, laser-radiation

作者曾报道有关铜蒸气激光在微生物中的研究与应用^[1]。本文在铜蒸气激光与氦-氖激光辐照龟裂链霉菌的研究中,获得高产菌株,它比对照未辐照株提高产量6.79%以上,最高发酵单位达最好水平,曾在国内应用。

1 材料和方法

出发菌株为龟裂链霉菌(*S. rimosus*)高产株4947与193。培养基^[2]为斜面培养基(小麦麸

*浙江省自然科学基金会资助课题; **郭红樱同志参加了部分实验工作。

皮 5.0%，琼脂(海燕牌)2.0%，深井水配制)；平板培养基(淀粉 3.0%，酵母粉 0.4%，硫酸铵 0.4%，碳酸钙 0.4%，氯化钠 0.5%，琼脂 2.0%，深井水配制)；种子培养基(淀粉 1.5%，糊精 1.5%，花生饼粉 1.0%，酵母粉 0.2%，硫酸铵 0.4%，碳酸钙 0.4%，磷酸二氢钾 0.03%，氯化钠 0.5%，深井水配制)和发酵培养基(淀粉 6.0%，麦芽糖 2.0%，花生饼粉 3.0%，酵母粉 0.2%，硫酸铵 0.9%，碳酸钙 0.8%，磷酸二氢钾 0.03%，氯化钠 0.3%，深井水配制，每只摇瓶加油 14 滴)。

斜面培养在 36 ± 0.5 °C 下培养 3~4 天，分离平板在 36 ± 0.5 °C 下培养 4~5 天。

摇瓶种子培养与发酵均在 30 °C，220 转/分左右旋转式摇床振荡培养；种令 22 h，移种发酵瓶，接种量 7.5%，发酵周期 160 h 左右。

用氯化高铁显色，光电比色法测定效价。

用铜蒸气激光器(波长:510.6 nm 与 578.2 nm,辐照时光脉冲能量面密度为 0.18 mJ/cm²,脉冲重复频率 15 kHz,连续可调)辐照龟裂链霉菌高产株单孢子悬液(孢子悬液浓度为 10^7 /ml),辐照时间 5,10,15,20,30 min 或氩-氟激光器(波长 632.8 nm,辐照时功率面密度为 12 mW/cm²)辐照 20 min,以未辐照的自然分离作对照,稀释分离在分离平板上, 36 ± 0.5 °C 培养 4~5 天后,每个辐照组与对照组各挑选菌落 90 个,接种斜面,待斜面孢子成熟后作摇瓶发酵,效价测定,比较筛选高产株。

2 结果与讨论

龟裂链霉菌 4947 菌株经铜蒸气激光辐照,随辐照时间从 5 min 至 30 min 不断延长,龟裂链霉菌孢子的致死率不断上升,存活率不断下降(图 1)。

激光辐照后,龟裂链霉菌的抗生素产量分布与未辐照的自然分离相比,前者的正变频率为 26~55%,后者的正变频率为 18%,激光辐照明显地提高了正变株的频率,而负变株的频率相应地降低(图 2),说明激光辐照比未辐照的自然分离更易得到高产菌株。龟裂链霉菌经铜蒸气激光辐照,其抗生素产量分布随辐照剂量不同,结果也不同。在产量正变范围内,以 20 min 辐照后正变频率为最高(46~55%),其次是辐照 30 min 者(正变频率为 34%)(图 2)。而氩-氟激光辐照 20 min 后,正变频率为 26%,比铜蒸气激光辐照者正变频率低,其负变频率则相反,说明在辐照时间相同时,铜蒸气激光辐照龟裂链霉菌效果比氩-氟激光好(图 2)。这是否与各类激光器的波长、功率及功率密度不同有关,值得进一步探讨。在辐照时间和辐照方法相同时,龟裂链霉菌 193 菌株经铜蒸气激光辐照 20 min 后,其变株的抗生素产量正变率为 55%,比菌株 4947(正变频率为 46%)高,而负变率则是菌株 4947 高(图 3)。这表明龟裂链霉菌随菌株不同对铜蒸气激光的敏感性亦不同。提示我们选用多个出发株进行激光育种比单一出发株进行选育更易得到高产菌株。

在铜蒸气激光辐照龟裂链霉菌(4947)20 min 后,曾分离得到高产株 5346。该菌株土霉素

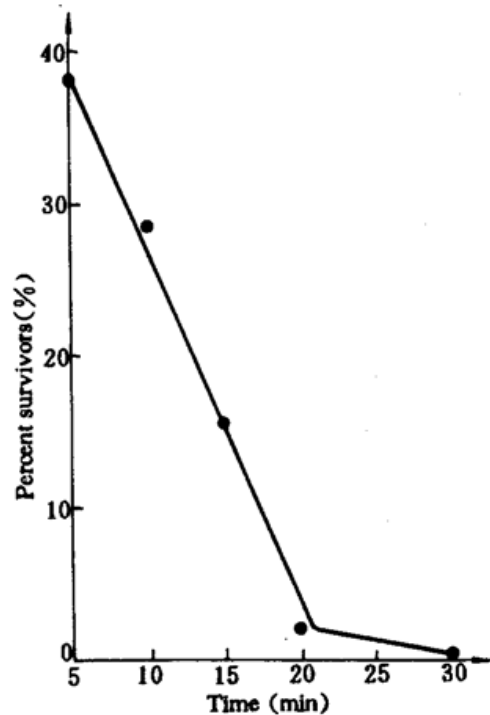


Fig. 1 Percent survivors of spores in *S. rimosus*

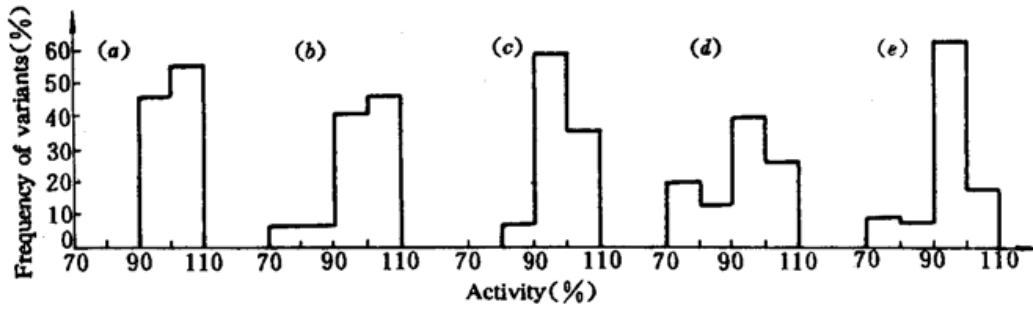


Fig. 2 Distribution of antibiotic yield of variants after irradiation of *S. rimosus* by lasers

(a) Irradiation of strain 193 with copper vapor laser for 20 min;

(b) Irradiation of strain 4947 with copper vapor laser for 20 min;

(c) Irradiation of strain 4947 with copper vapor laser for 30 min;

(d) Irradiation of strain 4947 with He-Ne laser for 20 min;

(e) Natural isolation of strain 4947

发酵代谢与对照未辐照者相类似,而抗生素产量则比对照未辐照者提高 6.79% 以上(图 3),最高发酵单位达最好水平,曾在国内应用。

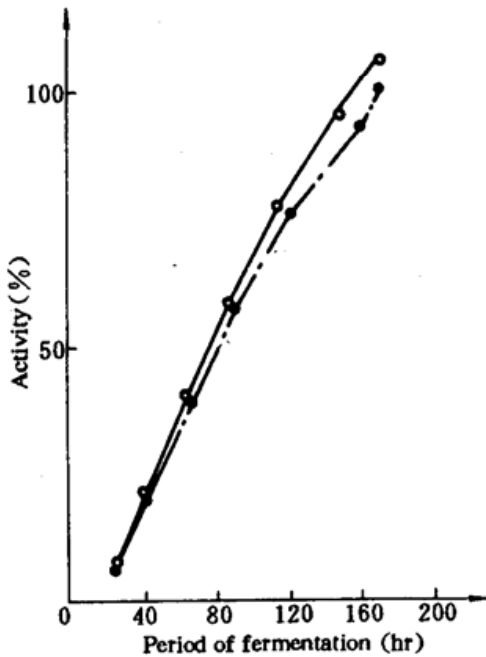


Fig. 3 Metabolic map of fermentation in producing oxytetracycline in *S. rimosus*

实验结果表明铜蒸气激光辐照龟裂链霉菌,在最适剂量时,能得到最好的抗生素产量分布,从中较易筛选得到高产菌株,可望进一步提高龟裂链霉菌高产株的土霉素发酵水平。这与作者曾用铜蒸气激光辐照棘孢小单孢菌的结果相类似^[1],展示了微生物激光育种的应用价值,可在育种工作中推广应用。

有关微生物激光育种机制限于激光生物学反应的复杂性,目前尚无卓有成效的学说或假说来阐明,比较容易被接受的观点一般认为是激光的刺激或激发作用。

此外,多年来作者曾比较铜蒸气激光辐照及其与氯化锂复合的产量分布。在用铜蒸气激光辐照龟裂链霉菌 20 min 后,与相同条件下铜蒸气激光辐照 20 min 后再氯化锂复合处理相比较,前者在产量分布为 100~110% 时,频率为 46.7%,而

后者为 23.3%,实验结果表明铜蒸气激光辐照龟裂链霉菌的效果比铜蒸气激光与氯化锂复合的效果好(另文发表)。鉴于作者曾在氯化锂对龟裂链霉菌的诱变作用探讨中,得到较满意的土霉素产量的正变作用^[3],上述实验结果是否与修复作用有关,是氯化锂的直接作用,还是氯化锂提高了细胞修复系统的活性而产生作用,有待进一步研究探讨。

参 考 文 献

- 1 吴振倡 *et al.*, 中国激光, 12(11), 654(1985)
- 2 吴振倡, 抗生素, 7(6), 392(1982)
- 3 吴振倡, 微生物育种学术讨论会文集(研究报告), 科学出版社, 北京, 107(1975)。