

一株缬氨酸产生菌的激光诱变育种

刘建龙¹ 魏显起² 郭航³

¹山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014

²济南大学物理科学与技术学院, 山东 济南 250022

³宜昌三峡制药有限公司, 湖北 宜昌 443000

摘要 为提高缬氨酸产量,以一株产L-缬氨酸的黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) BFS为出发菌株,通过He-Ne激光诱变育种,分别设置不同的诱变强度和照射时间,确定最佳诱变条件为照射功率15 mW、照射时间20 min。对发生正突变的菌株进行L-缬氨酸耐受性筛选,得到的突变菌株产酸量提高了25.50%,并且该菌株可稳定遗传至少10代。激光诱变是一种安全有效的微生物育种技术,低剂量激光辐射更有利于菌株诱变效果的改善。

关键词 生物光学; 缬氨酸; 激光诱变; 黄色短杆菌; 生物制药

中图分类号 Q631 文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201643.0704002

Breeding of an L-Valine Producing Strain by Laser Mutation

Liu Jianlong¹ Wei Xianqi² Guo Hang³

¹School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China

²School of Physics and Technology, University of Jinan, Jinan, Shandong 250022, China

³Yichang Sanxia Pharmaceutical Co., Ltd, Yichang, Hubei 443000, China

Abstract To improve the production of L-valine, the He-Ne laser is used for *Brevibacterium flavum* to induce mutagenesis. The He-Ne laser with different power and duration is tested, and the best laser treatment condition that the intensity and time of irradiation is 15 mW and 20 min, respectively is decided. The positive mutants are selected directionally and stepwise on the agar plates containing extra L-valine of different concentrations, and L-valine overproducing mutant is derived with production increased by 25.50%. The results show that the mutant strain can keep steady properties for at least 10 generations. He-Ne laser is an effective technique for microbial mutagenesis, and the He-Ne laser with low power is suitable for *Brevibacterium flavum* mutagenesis.

Key words biotechnology; L-valine; laser induced mutation; *Brevibacterium flavum*; biopharmacy

OCIS codes 170.1420; 000.1430; 140.3460; 170.5380

1 引言

L-缬氨酸是一种人体必需氨基酸,具有补充蛋白质的营养效果,主要应用于医药上配制复合氨基酸制剂,特别是高支链氨基酸输液及口服液。最近,研究发现L-缬氨酸也是一种免疫抗生素的重要中间体,市场上需求量剧增。我国发酵生产规模及产酸水平与国际水平相比仍有一定差距,需对菌种及发酵工艺等环节进行改良和优化。

目前,L-缬氨酸主要通过微生物发酵法生产,发酵法生产L-缬氨酸已有数十年历史,其关键在于选育稳定的高产菌株,通过物理诱变获得高产菌株是较为普遍的途径。王均成等^[1]以L-缬氨酸APV-5为原始菌株,经硫酸二乙酯(DES)诱变处理,获得一株在高糖培养基中产酸质量浓度为36.4 g/L的良好菌株。赵丽丽等^[2]以黄色短杆菌TV10为原始菌株,经原生质体紫外和DES多次诱变处理,筛选出一株带有目的遗传标记的L-缬氨酸高产稳定性菌株,产酸质量浓度可达50.71 g/L。相对于利用激光进行诱变育种,传统的理化因子诱变

收稿日期: 2015-07-08; 收到修改稿日期: 2015-11-13

作者简介: 刘建龙(1961—),男,博士,研究员,主要从事发酵工程技术等方面的研究。E-mail: jlong1818@126.com

方法易损伤细胞活性^[3],突变效率低,育种周期长^[4-5],易造成细胞活性损伤致死、筛菌工作量大、菌种退化等问题。而He-Ne激光具有能量密度高、靶点小、单色性和方向性好的特点^[6],激光诱变当代就可出现遗传性突变,已经在抗生素育种中得到广泛的应用^[7-8]。本文利用He-Ne激光对黄色短杆菌进行育种,并经过缬氨酸耐受性筛选,得到耐受性好、产酸高、稳定性强的优良菌株。

2 材料与方 法

2.1 菌 株

黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)BFS,本菌种室保藏。

2.2 培养基

斜面培养基各成分及其质量分数分别为:葡萄糖0.5%、牛肉膏1.0%、酵母膏0.3%、氯化钠0.5%、蛋白胨1.0%、琼脂2.5%。pH值为7.0±0.1,灭菌压力为0.10 MPa,温度为121℃,灭菌时间为25 min。

种液培养基各成分及其质量分数分别为:葡萄糖2.5%、玉米浆4.0%、硫酸铵0.5%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、碳酸钙1.0%。pH值为7.0±0.1,灭菌压力为0.10 MPa,温度为121℃,灭菌时间为30 min。

发酵培养基各成分及其质量分数分别为:葡萄糖16.0%、玉米浆2.0%、硫酸铵4.5%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.05%、碳酸钙4.0%。pH值为7.0±0.1,灭菌压力为0.06~0.08 MPa,温度为110℃,湿热灭菌时间为20 min。

2.3 黄色短杆菌BFS的生长曲线及生物量与产酸的相关性^[9]

将菌株以5%(质量分数)的接种量转接到种液培养基中培养,每隔2 h取样测定发酵液在562 nm波长下的吸光度(A_{562}),根据时间和吸光度绘制生长曲线。

将菌株在平板培养基上进行稀释涂布培养,挑取50个单菌落,接入发酵培养基中,温度为(30±1)℃,转速为270 r/min,振荡培养60 h,检测发酵液生物量和产酸值。平行进行5次实验,分别统计 A_{562} 在0.55~0.65、0.66~0.75、0.76~0.85范围内的产酸平均值,以 A_{562} 值为变量,使用SPSS软件计算生物量和产酸的相关性。

2.4 激光诱变

2.4.1 菌悬液的制备

将BFS接入制备好的种液培养基中,培养12 h后,4000 r/min离心5 min,弃上清,菌体沉淀用无菌生理盐水制备成浓度为 $10^7 \sim 10^8$ counts/mL的菌悬液。

2.4.2 激光照射

取0.2 mL菌悬液于无菌玻璃小试管(1.0 cm×9.0 cm)中,小试管置于激光束正下方20 cm处,按照射时间为5、10、15、20 min,照射强度为5、10、15、20、25、30 mW进行组合诱变,未经照射的原始菌液作为空白对照。吸取0.1 mL菌液进行稀释涂布,每个稀释度做3个平行样,进行菌落计数,并计算诱变致死率:致死率(%)=(对照组菌落数-诱变所得菌落数)/对照组菌落数×100%。

2.5 突变筛选

2.5.1 平板初筛

激光诱变处理的菌悬液涂布在斜面培养基上,于(30±1)℃培养20 h后,挑取生长较快、表面光滑、边缘整齐的单菌落接种至斜面培养基。

2.5.2 正突变筛选

将初筛到的菌株接入种液培养基,根据2.3节统计结果,以同等条件下的原始菌株为对照,考察菌株生长量,测得同等条件下生长量高于对照组的菌株作为正突变菌株进行下一步筛选。

2.5.3 摇瓶筛选

将培养好的斜面接入发酵培养基中(500 mL三角瓶装培养液50 mL),于(30±1)℃、270 r/min发酵60 h,发酵结束后,称重,并检测产酸浓度,以发酵产酸浓度为筛选指标,高于空白对照20%以上的菌株作为目的菌株。

2.6 耐受性筛选

选择产酸高的正突变菌株接种至斜面培养基,并转接于添加1%(质量分数)L-缬氨酸的种液培养基中,以未经激光照射的同等培养条件下的原始菌株为对照,于270 r/min、(30±1)℃培养12 h,检测生长量,选择生长量高于原始菌株20%的菌株进行1.5% L-缬氨酸耐受性筛选,并依次进行2.0%、2.5%、3.0%的L-缬氨酸耐

受性筛选,最终将得到的高耐受性菌株进行摇瓶发酵实验,检测产酸浓度,得到高产菌株。

2.7 分析方法

生长量:吸取样品菌液 0.20 mL,用 0.20 mol/L 稀盐酸稀释 50 倍,摇匀,以稀盐酸作为空白,检测 562 nm 波长下的吸光度。

还原糖:采用 SBA-40C 多功能谷氨酸-葡萄糖分析仪测定。

染色方法:草酸铵结晶紫染色。

缬氨酸:采用纸层析洗脱法测定^[10]。

2.8 主要仪器

He-Ne 激光器(功率为 0~30 mW,波长为 632.8 nm),国雄光电。

3 结果与分析

3.1 黄色短杆菌 BFS 的生长曲线

按 2.3 节所述方法绘制 BFS 的生长曲线,如图 1 所示,其中 12 h 为菌株 A_{562} 值变化最大的时段,说明菌株已进入对数生长期,此时生长最为旺盛,胞内酶系活性最强,因此选择照射时间为 12 h 的菌体作为 He-Ne 激光诱变的研究对象。

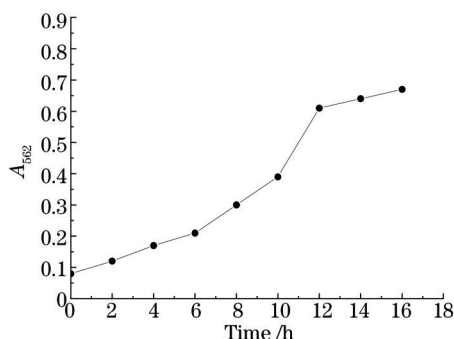


图 1 黄色短杆菌 BFS 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Brevibacterium flavum* BFS

按 2.3 节所述方法进行 5 组平行实验,统计 A_{562} 在 0.55~0.65、0.66~0.75、0.76~0.85 范围内的产酸平均值,结果如表 1 所示。

表 1 不同生长量(A_{562})的产酸水平统计

Table 1 *L*-valine production under different biomass (A_{562})

No.	A_{562}	Average production of <i>L</i> -valine /($g \cdot L^{-1}$)	A_{562}	Average production of <i>L</i> -valine /($g \cdot L^{-1}$)	A_{562}	Average production of <i>L</i> -valine /($g \cdot L^{-1}$)
1		28.72		28.05		29.75
2		29.05		29.90		31.35
3	0.55~0.65	26.02	0.66~0.75	29.65	0.76~0.85	28.70
4		27.94		28.95		30.85
5		27.03		30.93		32.08

从表 1 可以看出,整体范围内,随着生长量 A_{562} 的增加,平均产酸呈现递增的趋势,运用 SPSS 进行方差分析,统计生长量与产酸之间的相关性是否显著,分析结果如表 2 所示。

表 2 方差分析结果

Table 2 Variance analysis results

	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
Inter-class	18.583	2	9.292	5.785	0.017
Intra-class	19.274	12	1.606		
Total	37.857	14			

根据方差齐性检验结果,由于显著性 $P=0.769$,大于0.05,方差齐性相等,进一步进行方差分析。由表2方差分析结果可以看出,显著性 $P=0.017$,小于0.05,由此得到产酸量受生长量的影响显著,两者存在正相关性。

3.2 激光诱变结果

按照射时间为5、10、15、20 min,照射强度为5、10、15、20、25、30 mW进行组合诱变后^[11],诱变致死率没有呈现出规律性,如表3所示,其中激光强度为5 mW时,随着照射时间的延长,致死率变化不大,均在25%以下,而在10、15、20、25 mW光强度下,致死率随着照射时间的延长而升高。据此可以看出,低强度激光照射有利于保持菌体活性,有利于筛选出正突变率较高的菌株,需进一步设计实验验证。用不同的光强度照射5 min产生的致死率随机性较大,推测是由于5 min的时间过短,导致操作误差较大,稳定性较差,所以验证实验中舍去该条件。

表3 He-Ne激光诱变对菌株致死率的影响
Table 3 Effect of He-Ne laser on lethal rate

Laser condition /(min×mW)	Lethal rate /%	Laser condition /(min×mW)	Lethal rate /%	Laser condition /(min×mW)	Lethal rate /%
5×5	<1	5×15	13	5×25	63
10×5	<1	10×15	42	10×25	87
15×5	22	15×15	68	15×25	92
20×5	24	20×15	72	20×25	100
5×10	7	5×20	17	5×30	65
10×10	32	10×20	59	10×30	100
15×10	37	15×20	71	15×30	100
20×10	52	20×20	83	20×30	100

一般认为致死率在70%~80%之间诱变效果最好^[2],根据第一次诱变结果,选择激光强度为15 mW和20 mW,分别照射10、15、20 min,计算致死率,并进行正突变筛选,结果如图2所示。当照射强度为15 mW,照射时间为20 min时,菌株的致死率为71%,与第一次实验结果基本一致,此时正突变率为41%。照射强度为20 mW,照射时间为10 min时,正突变率普遍较低,最高仅为23%。据此,确定最佳诱变条件是照射强度为15 mW,照射时间为20 min。

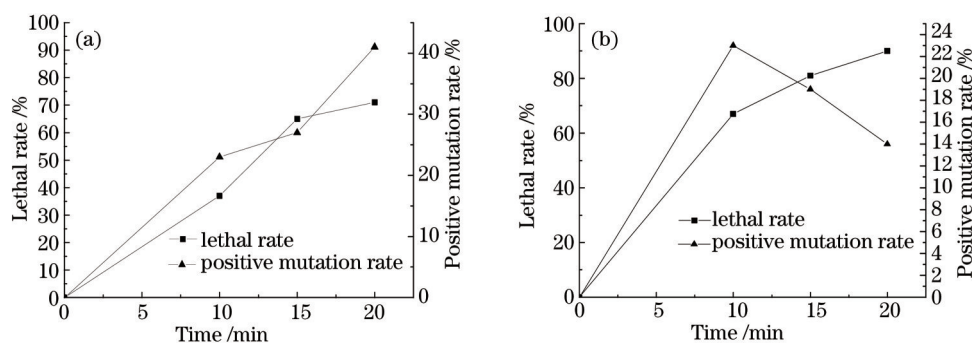


图2 不同激光强度下诱变时间对致死率和正突变率的影响。(a) 15 mW; (b) 20 mW

Fig.2 Effect of irradiation intensity on lethal rate and positive mutation rate. (a) 15 mW; (b) 20 mW

3.3 筛选目的菌株

将平板筛选得到的7株突变株进行摇瓶发酵实验,每株菌平行接3个摇瓶,以原始菌株作为空白对照,270 r/min、(30±1)℃振荡培养60 h,检测发酵产酸,结果如表4所示。

由表4可知,共有6株突变菌株在平均产酸、干燥失水产酸和糖酸转化率上比原始菌株高,且3项指标保持一致的相关性,BFS5产酸最高,比原始菌株高21.42%。BFS2和BFS3虽然平均产酸较高,但是存在发酵蒸发量大的问题,导致其糖酸转化率只有22.8%,原因在于菌种生长过于旺盛且菌体量大,进入产酸期后,衰老过快,导致产酸不高。综合两项指标,BFS5在产酸和底物利用率方面均比原始菌株提高较多,选择该菌株作为目的菌株。

表4 突变菌株与原始菌株产酸的比较

Table 4 *L*-valine production of mutated strains and initial strain

Strain	BFS1	BFS2	BFS3	BFS4	BFS5	BFS6	BFS7	Initial strain
Average production of <i>L</i> -valine /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	32.63	37.14	33.85	36.55	38.25	36.90	36.72	31.50
Average production of <i>L</i> -valine concerning water loss /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	31.90	32.52	28.20	35.25	37.60	34.92	35.55	29.85
Conversion rate /%	20.50	21.84	17.92	22.70	23.72	22.15	22.82	18.80

将培养了12 h后处于对数期的BFS5突变菌株和原始菌株在100倍油镜下进行比较,如图3所示,两菌株菌型较大,呈八字状态,栅形分布,是对数期的典型形态,但突变菌株BFS5菌型明显较原始菌株粗壮,这可能和菌株发生了突变有关,和产酸结果也有一定的相关性。

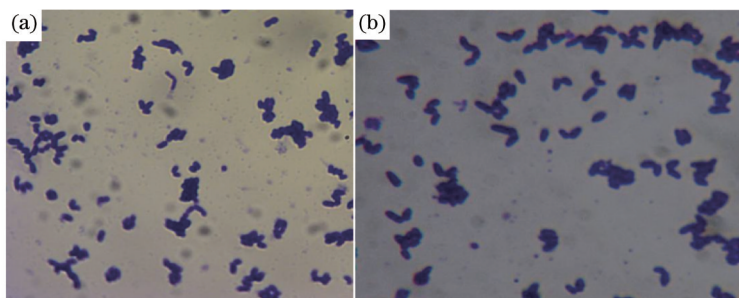


图3 (a) 突变菌株BFS5和(b)原始菌株菌体细胞形态对比

Fig.3 Cellular morphologies of (a) mutated strain BFS5 and (b) initial strain

3.4 菌株耐受性筛选

3.4.1 *L*-缬氨酸耐受性筛选结果

在缬氨酸合成途径中的第一个限速酶—乙酰乳酸合成酶受缬氨酸的反馈抑制^[12],*L*-缬氨酸作为发酵产物,在发酵液中积累到一定浓度时,会抑制菌株的生长代谢及缬氨酸的合成。据此可通过提高黄色短杆菌耐受性使得菌株在高*L*-缬氨酸浓度下保持活性,从而降低反馈抑制作用,提高缬氨酸的积累。

将BFS5首先接入添加有1.0% *L*-缬氨酸的种液培养基中培养,以原始菌株作为空白对照,考察菌种生长情况,突变菌株生长量基本一致,选择生长量高于平均值最多的一株再接种于添加有1.5% *L*-缬氨酸的种液中培养,依次在2.0%、2.5%、3.0% *L*-缬氨酸添加量的种液中进行筛选,以获得高耐受性的突变菌株,突变菌株和原始菌株的生长量对比如图4所示。

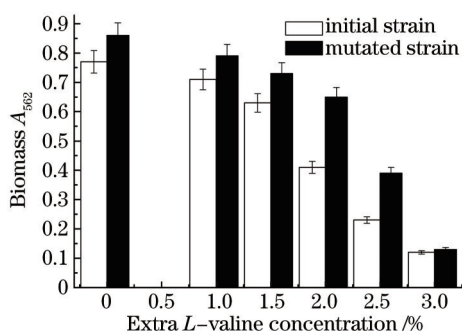


图4 突变菌株耐受性实验

Fig.4 Effect of extra *L*-valine concentration on biomass

由图4可知,*L*-缬氨酸添加量在1.5%以下时,突变菌株与原始菌株生长情况基本一致,均在基本生长量,即 $A_{562}=0.6$ 以上,其中突变菌株比原始菌株高20%左右。*L*-缬氨酸添加量为2.0%时,两者生长情况区别明显,原始菌株生长量下降约20%,而突变菌株维持正常生长量0.6左右,*L*-缬氨酸添加量增加到2.5%时,原始菌株基本无生长量,突变菌株生长量明显降低,说明此浓度下菌株生长受到抑制,该浓度也是菌株的耐受阈值,而*L*-缬氨酸添加量达到3.0%时,两者均无生长量也证实了这一点。

3.4.2 L-缬氨酸高产菌株

将筛选得到的两株目的突变株 BFS5-1 和 BFS5-2 进行摇瓶发酵实验,每株做 3 个平行样,270 r/min、(30±1)℃培养 60 h,其缬氨酸的产量明显高于原始菌株。检测差异显著性,总次数 N 为 9,总自由度为 8(菌株间 2+重复间 6),实测 F 值为 1210,大于同自由度 5% 时的 F 值(5.14),可以判断各菌株间有显著差异。

两株突变株中,BFS5-1 菌株产 L-缬氨酸的量最高,平均产酸质量浓度可达 39.95 g/L,相比同条件下原始菌株提高了 25.50%。可见通过诱变筛选、耐受性实验能够得到 L-缬氨酸高产菌株。

3.5 突变菌株稳定性考察实验

在菌株传代培养时,诱变菌株的性状往往不稳定,为了验证得到的突变株的遗传性状是否稳定,将筛选得到的 BFS5-1 与原始菌株进行了继代遗传稳定性实验,共转接 10 代,根据原始菌株的传代产酸情况,10 代以内区别基本不大,故选择 1 代菌株作为空白对照,此 10 代高产菌株和原始菌株检测结果如表 5 所示。

表 5 高产菌株发酵产酸稳定性实验
Table 5 Production stability of mutant strain

Strain	BFS5-1-1	BFS5-1-2	BFS5-1-3	BFS5-1-4	BFS5-1-5	BFS5-1-6
Average production of L-valine $/(g \cdot L^{-1})$	38.75	39.14	37.95	38.55	40.25	38.90
Average production of L-valine concerning water loss $/(g \cdot L^{-1})$	37.90	38.52	37.32	37.95	39.72	37.92
Conversion rate /%	24.05	24.24	24.00	24.05	25.00	24.10
Strain	BFS5-1-7	BFS5-1-8	BFS5-1-9	BFS5-1-10	Initial strain	
Average production of L-valine $/(g \cdot L^{-1})$	39.70	39.63	40.14	39.85	32.15	
Average production of L-valine concerning water loss $/(g \cdot L^{-1})$	39.00	38.90	39.52	39.20	30.95	
Conversion rate /%	24.60	24.46	24.88	24.62	20.08	

由表 5 可知,传代至第 10 代时,最高产酸出现在第 5 代,比原始菌株高 25.19%,糖酸转化率比原始菌株高 24.50%,第 3 代产酸最低,也比原始菌株高 18.04%,且从 10 代菌株的 3 项指标比较来看,高产菌株并没有因为传代而发生菌种退化和产酸能力下降的情况,产酸量、干燥失水产酸量、糖酸转化率三者相关性一致,据此推断是由于低能量的激光诱变产生的遗传性能稳定性增强作用。

4 结 论

激光作为一种新型诱变途径,可以通过诱发生物体产生热、压力、光、电磁场等多种效应而获得诱变菌株^[13],已经广泛应用于微生物遗传育种研究中,工业化生产中利用诱变菌株也已取得了显著的经济效益^[14-15]。采用 He-Ne 激光器,对产缬氨酸的黄色短杆菌进行诱变,结果显示菌株激光诱变的最佳条件是照射强度为 15 mW,照射时间为 20 min,诱变后菌株产酸提高了 25.50%,说明低剂量激光辐射更有利于菌株诱变效果的提高,推测这可能是由于激活了菌体合成基因、增加菌体数或者激活了菌体产生某种酶的能力^[16],从而提高了产酸活性。研究表明,诱变后菌株的产酸能力可以稳定遗传至少 10 代,说明 He-Ne 激光诱变的菌株稳定性较好。

参 考 文 献

- 1 Wang Juncheng, Wang Ke, Zhang Chunyu, *et al.*. The application in industry of L-valine and research progress of breeding[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2012, 41(1): 30-34.
王均成,王 可,张春宇,等. L-缬氨酸的应用和育种研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41(1): 30-34.
- 2 Zhao Lili, Chen Ning, Xiong Mingyong, *et al.*. The breeding of high-producing strain by UV induced mutagenesis[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(10): 22-24.
赵丽丽,陈 宁,熊明勇,等. 原生质体诱变选育 L-缬氨酸生产菌的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 22-24.
- 3 Chen Yunlin, Liu Xiaojuan, Wen Jianping. Research progress in technique of laser inducing microorganism[J]. Acta Biophysica Sinica, 2003, 19(4): 353-358.
陈云琳,刘晓娟,闻建平. 激光诱变微生物技术的研究进展[J]. 生物物理学报, 2003, 19(4): 353-358.

- 4 Zhang M, Zhu R, Zhang M, *et al.*. Creation of an ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain by 266 nm laser radiation and repetitive cultivation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(5): 508-513.
- 5 Wang Ling, Tu Pei, Xu Ming'en. Real-time monitoring of optical-thermal response of tissue to laser irradiation[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(1): 0104001.
王 玲, 涂 沛, 徐铭恩. 激光辐照下组织光热响应的实时监测研究[J]. 中国激光, 2015, 42(1): 0104001.
- 6 Zhang Yong, Chen Bin, Li Dong. A three-dimensional geometric Monte Carlo method for simulation of light propagation in biological tissues[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(1): 0104003.
张 永, 陈 斌, 李 东. 一种模拟生物组织内光传播的三维几何蒙特卡罗方法[J]. 中国激光, 2015, 42(1): 0104003.
- 7 Huang X, Tian B, Niu Q, *et al.*. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5-6): 719-727.
- 8 Xue Zhenglian, Wang Zhou, Zhang Xiangmei, *et al.*. Breeding of high lincomycin producing strains through irradiation of *Streptomyces fincolsis* protoplast by UV and He-Ne laser[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2010, 19(6): 838-842.
薛正莲, 王 洲, 张相美, 等. 紫外-激光复合诱变原生质体选育林可霉素高产菌株[J]. 激光生物学报, 2010, 19(6): 838-842.
- 9 Zhang Weiguo, Qian He. Breeding of *L*-valine producing mutant[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1995, 14(3): 221-225.
张伟国, 钱 和. *L*-缬氨酸菌种选育[J]. 无锡轻工大学学报, 1995, 14(3): 221-225.
- 10 潘家秀. 蛋白质化学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- 11 Liu Changchun, Cao Tingfen, Ye Haixian, *et al.*. Precise collimation technology and assembling optical modules in high power laser facility [J]. Chinese J Lasers, 2015, 35(9): 0922001.
刘长春, 曹庭分, 叶海仙, 等. 大型精密光学系统准直误差分析方法及其应用[J]. 中国激光, 2015, 35(9): 0922001.
- 12 Zhang Kexu, Zhao Lili, Zhang Bei, *et al.*. Analysis of *L*-valine biosynthesis mechanism by metabolic flux balance model[J]. Microbiology, 2003, 30(5): 49-53.
张克旭, 赵丽丽, 张 蓓, 等. 缬氨酸生物合成中的代谢流量分析[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 49-53.
- 13 Zhao Xinying, Hu Yihua, Gu Youlin, *et al.*. Transmittance of laser in the microorganism aggregated particle swarm[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 36(6): 0616001.
赵欣颖, 胡以华, 顾有林, 等. 微生物凝聚粒子群的激光透射率研究[J]. 光学学报, 2015, 36(6): 0616001.
- 14 Huang Mingjie, Zhang Jianqing, Mao Ning. Improving producing griseofulvin titer on *Penicillium patulum* strains by compound mutation [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2012, 21(2): 170-175.
黄铭杰, 张剑清, 毛 宁. 提高展青霉(*Penicillium patulum*)产灰黄霉素效价的诱变育种研究[J]. 激光生物学报, 2012, 21(2): 170-175.
- 15 Liu Jianlong, Liu Jianjun, Yang Liansheng. Study on the breeding of alkaline amylase producing strain by ultraviolet and He-Ne laser compound mutation[J]. Chinese J Lasers, 2006, 33(1): 138-142.
刘建龙, 刘建军, 杨连生. 碱性淀粉酶菌株的紫外线和He-Ne激光复合诱变的研究[J]. 中国激光, 2006, 33(1): 138-142.
- 16 Yang Qiang, Cao Liangcai, Jin Guofan. Progress in optical focusing techniques aiming to suppress scattering effect in biomedical tissues [J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(9): 0901001.
杨 强, 曹良才, 金国藩. 可抑制生物组织散射效应的光学聚焦技术研究进展[J]. 中国激光, 2015, 42(9): 0901001.

栏目编辑: 吴秀娟