

微波诱变和激光诱变相结合选育金霉素链霉菌的研究

李永泉 贺筱蓉

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

摘 要 采用激光和微波两种物理因子,对去甲基金霉素生产菌-金霉素链霉菌进行诱变处理,选育到一株产量较高的生产菌 HL11,发酵效价从 2831 u/ml 提高到 4683 u/ml,提高了 65.4%。所选育的菌株经多次传代,遗传性状非常稳定。

关键词 激光诱变,微波诱变,金霉素链霉菌,去甲基金霉素
学科分类号 Q 939.97

去甲基金霉素是一个较好的广谱抗生素,以其为原料合成的二甲氨基四环素,在临床上因其口服吸收快、排泄慢、在体内存留时间长、毒性低而副作用小^[1],被认为是现有四环素抗生素中最好的品种。在制药工业上,生产去甲基金霉素具有良好的发展前途,因此去甲基金霉素高产菌的选育有较大的经济意义。

激光诱变在农业上已有广泛应用,并选育到不少良种;近年来在微生物遗传育种上也有陆续报道,尤其是产量性状上,诱变效果相当不错^[2-4],是一个值得探索的新的研究领域;微波在生物学上主要用于杀菌、刺激植物种子发芽生长^[5-6],用于工业微生物诱变育种至今未有文献报道。激光、微波诱变设备简单、方法易行、操作安全,诱变效果远较传统的理化因子好,在工业微生物菌种选育中有较大的推广价值。

1 材料和方法

1.1 菌种

金霉素链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) HMO1,原系四环素和金霉素生产菌,经紫外线和乙烯亚胺诱变得到^[1],由浙江海门制药厂菌种中心提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(%):麸皮 6.0,琼脂 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.005,葡萄糖 0.1, pH7.0。

1.2.2 平板分离培养基(%):麸皮 2.0,玉米粉 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.01,葡萄糖 0.1, KH_2PO_4 0.1,琼脂 2.0, pH6.5。

1.2.3 种子培养基(%):葡萄糖 3.0,豆饼粉 2.0,蛋白胨 0.5,酵母粉 1.0, CaCO_3 0.2, KH_2PO_4 0.02, pH6.5, 28℃, 220 r/min 振荡培养 28h。

1.2.4 发酵培养基(%):淀粉 6.0,玉米粉 3.0,豆饼粉 3.5,蛋白胨 1.0,酵母粉 0.4,豆油 2.0, NaCl 0.1, NH_4Cl 0.16, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CuSO_4 0.05, CaCO_3 1.0,耐高温 α -淀粉酶 0.03, pH6.5。

收稿日期:1997-11-10,修回日期:1998-06-01。

1.3 诱变选育方法

1.3.1 孢子悬液的制备: 将7d的孢子斜面加入适量的无菌水,刮下孢子置于盛有玻璃珠的三角瓶中,在往复式摇床上 110 r/min、36℃充分振荡培养 5h,使孢子分散和活化(发芽率约 70%),诱变处理时的孢子浓度稀释至 10^6 /ml。

1.3.2 诱变处理: 采用浙江大学光学研究所的纯铜医学蒸气激光器,输出两种波长的激光分别为 510.6 nm 和 578.2 nm,辐照时采用两者的混合光,光斑直径为 2 cm,脉冲重复频率为 7kHz,功率 7W,以辐照不同的时间对孢子进行诱变处理。

微波诱变采用的微波炉最大功率 800W,脉冲频率 2450MHz,以辐照不同的时间对孢子进行诱变处理。

1.3.3 初筛和复筛: 将诱变处理过的孢子悬浮液稀释成一定的梯度浓度,涂布在分离平板上,36℃培养 4~5d,活菌计数,计算致死率。以菌丝颜色赤褐色并有可溶性色素分泌为初筛标志,挑取长势较好的菌落,在斜面上传代 2~3 次,然后在三角烧瓶内进行摇瓶复筛。接种量 5%,500ml 三角瓶装液量 60ml,转速为 220r/min、28℃振荡培养 7d。

1.4 去甲基金霉素效价化学检定方法

发酵液用饱和草酸溶液酸化至 pH1.8~2.0,过滤后将滤液稀释至原体积 3 倍;取 1 ml 稀释液加到 5 ml 6N 盐酸中,沸水浴煮沸 15 min,冷却后稀释至 50 ml;最后用分光光度计在 440 nm 处测其 OD 值,对照标准曲线即得其效价。本测定方法和去甲基金霉素标准曲线,均由浙江海门制药厂菌种中心提供。

2 结 果

2.1 激光的诱变效应

将冷藏的菌株传代 3 次后,在平板上自然分离选出 50 株单菌落进行摇瓶试验,取发酵效价 2831u/ml 的菌株为出发菌株,选用 510.6nm 和 578.2nm 两种波长的纯铜蒸汽混合激光进行辐射诱变,辐照时间为 5、10、15、20 和 30 min,辐照处理后,孢子致死率和辐照时间关系见图 1。从图 1 可知,诱变 20min 致死率接近 100%,30min 已完全致死,而吴振昌等用同样的激光辐照金霉素链霉菌孢子悬液,结果 60min 致死率才达 100%^[7],这说明萌动孢子比休眠孢子对激光敏感。

激光诱变后,在平板分离培养基上分离单菌落,结果发现有 8% 的菌落光秃不产孢子,摇瓶效价低于 1000u/ml;甚至极个别出现回复突变,菌丝体不分泌色素、孢子灰白色、不产生去甲基金霉素。选出菌丝体赤褐色并分泌可溶性色素的菌落 50 株进行摇瓶筛选,将其中效价高的 5 株连续传代 3 次,然后进行摇瓶复筛,结果见表 1。L74 产量最高,比出发菌株提高 21.4%,L86 产量较低弃置,L83、L69、L65 冷藏备用,L74 用以继续诱变。

2.2 微波诱变效应

激光诱变筛选出的 L74 突变株继续用微波处理,处理时间为 20、40、80、100、120 和 140s,其致死效应见图 2。

从图 2 可知,处理 120s 几乎全部致死,存活率已接近零,这说明金霉素链霉菌对微波比激光更敏感、致死效应更明显。在平板分离培养基上分离单菌落,结果只发现 3% 的菌落光秃不产孢子,菌丝体不分泌色素、孢子灰白色的回复突变菌落没有出现。挑出 40 个

表 1 激光诱变后高产突变株发酵效价(单位:u/ml)

Table 1 Fermentation unit of some mutant strains by laser irradiation(u/ml)

No.	Check	L65	L69	L74	L83	L86
1	2853	3176	3384	3458	3363	2755
2	2846	3221	3298	3410	3527	2910
3	2794	3410	3365	3416	3310	2903
Averag	2831	3269	3349	3437	3400	2856

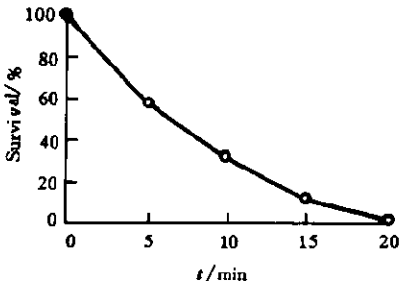


图 1 激光辐照金霉素链霉菌孢子存活率

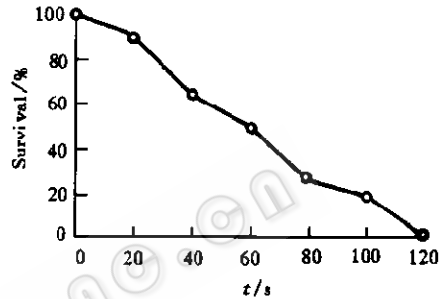
Fig.1 Survival percentage of *S. aureofaciens* spores by laser irradiation

图 2 微波辐照金霉素链霉菌孢子存活率

Fig.2 Survival percentage of *S. aureofaciens* spores by microwave irradiation

单菌落进行摇瓶初筛,然后选出 7 株进行摇瓶复筛,其中最高的一株发酵效价稳定在 4720u/ml,连续传代 5 次后,发酵效价稳定在 4683u/ml 左右,比出发菌株产量提高了 36.3%,将此菌株命名为 LH11。LH11 菌落形态和 MHO1 很相似,菌落直径 5~6 mm,呈圆形扁平状,基内菌丝棕红色,气生菌丝棕色,孢子颜色灰棕色,菌落周围分泌玫瑰红色可溶性色素。但 LH11 比 MHO1 基内菌丝颜色更深一些,从平板背面比较现象很明显。菌落颜色和去甲基金霉素发酵效价似乎有某种必然的联系,其机理有待进一步探究。

3 讨 论

从本实验可知微波比激光效果更佳,似乎激光选育性状回复突变较大,而微波选育的菌种相对稳定一些。

激光热效应所产生的组织损伤尤其是 DNA 结构的损伤,使菌体遗传性状产生不可逆的改变;当孢子受激光处理,DNA 分子内发生能级跃迁,引起分子内化学键断裂^[8],从而使碱基损伤、畸变导致遗传变异。这种光效应和电磁场效应是激光产生诱变效应的主要因素;激光激发分子产生自由基^[9],通过自由基的直接或间接作用,导致碱基损伤、糖基损伤、链的断裂、嘧啶二聚体的形成以及核酸和蛋白质的交联等变化,引起生物分子的生理、遗传变异。

2450MHz 微波引起水分子在 1s 内 180°来回转动 24.5 亿多次,强烈的转动摩擦使得

胞内 DNA 分子氢键和碱基堆集化学力受损, 最终引起 DNA 分子结构变化导致遗传变异; 微波极强的穿透效应使细胞壁内外的水分子产生剧烈转动, 从而引起细胞壁通透性发生变化, 更易使胞内代谢物分泌出来; 微波诱变过程中, 微生物体的动态代谢受微波“干扰”而发生平衡过程紊乱, 从而使代谢路径发生改变, 这种生化效应^[10] 萌动孢子可能比休眠孢子更明显, 可由进一步的实验加以证实。

参 考 文 献

- 1 许菊彦, 姚天爵, 李焕姿. 微生物学报, 1974, 14(1): 66~69
- 2 李永泉, 蒋萍萍, 赵小立等. 食品与发酵工业, 1995, 5: 46~49
- 3 赵小立, 李永泉, 贺筱蓉等. 真菌学报, 1995, 14(4): 289~296
- 4 方善康, 刘恩泉, 侯学元等. 中国激光, 1988, 15(7): 447~448
- 5 梁海曼, 周菊华, 广西植物. 1992, 12(1): 64~75
- 6 Moor G M, Hall R G, James E A. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 1982, 32: 45~55
- 7 吴振昌, 郭红缨, 王凤仙. 中国激光, 1992, 19(7): 555~557
- 8 向 洋. 光电子·激光, 1994, 5(2): 87~90
- 9 李缙熙. 生物电磁学理论, 西安: 西安电子科技大学出版社, 1986, pp. 232~320
- 10 黄卡玛, 刘水清, 唐敬贤等. 微波学报, 1996, 12(2): 126~132

Studies on the Screening of High Yielding Demethylchlorotetracycline Strain by Combining Laser Irradiation with Microwave Irradiation

Li Yongquan He Xiaorong

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310018)

Abstract A Mutant strain HL11 of high-yielding demethylchlorotetracycline was screened from its parent strain *S. aureofaciens* MHO1 by combining laser irradiation with microwave irradiation. The results showed that the titer of demethylchlorotetracycline of *S. aureofaciens* was increased from 2831 u/ml upto 4683 u/ml and the increasing rate was 65.4%. It's high capacity for producing demethylchlorotetracycline remained stable after many times of subculture and two months storage.

Key words Microwave irradiation, laser irradiation, *Streptomyces aureofaciens*, demethylchlorotetracycline