

激光技术用于获得微生物胞内产物

李祖义 史济良 朱明华 顾嘉良 冯 青

(中国科学院有机化学研究所, 上海)

随着微生物胞内材料在工业和医药方面的应用日益增加, 细胞破碎装置的操作也越显得重要。通常采用的菌体处理方法都不同程度地存在局限性, 如超声波法和冻融法存在着能源成本问题; 机械粉碎法完全破坏了细胞壁, 菌体内部物质均被排出, 因而给分离带来困难; 自溶法, 细胞壁溶解法只对小部分菌体适用, 药剂处理法可能引起一些物质的分解等。

激光技术在生物学、医学等方面的应用是近期生物工程的热题。低能量激光有促进菌体生长^[1]、诱发突变^[2,3]等功能, 大功率激光能有效地局部击破细胞壁, 从而选择性地提取胞内有用的小分子物质。本文主要报道用大功率激光照射微生物菌体以提取核苷酸类物质的方法, 并就影响效率的因素进行了讨论。

材料与 方法

(一) 菌种与培养基

菌种 *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pseudomonas* sp. 均由本实验室筛选得到, 并经初步鉴定。前 2 株酵母的培养液成分为葡萄糖 10%, 酵母膏 1%, 尿素 0.1%, pH6.5。后一株细菌采用由蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.5%, NaCl 0.5% 组成的培养基, pH7.0。

(二) 方法

1. 菌体培养: 将在斜面上生长良好的菌体, 接入培养液中, 置往复摇床 (120rpm) 上, 28℃, 48h。离心后的菌体用生理盐水洗后, 悬浮于 0.05mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0) 中, 待激光照射。

2. 激光处理: 实验所用激光为 XeCl 准分子激光, 脉冲能量约 50mJ, 波长 308nm, 重复率 1 次/秒, 辐照时间 5 min, 透镜焦距 20cm。在进行辐照时, 一般将菌体容器的中心与焦点重

合 (图 1)。在进行不同能量密度照射对菌体的影响时, 变化容器中心与透镜间的距离: 12、14、16、18 和 20cm, 这时能量密度分别为 0.188、0.357、0.581、1.250 和 2.50J/cm²。

3. 菌体存活观察: 用亚甲基蓝溶液对酵母菌体染色, 然后压片, 显微镜观察。透明者为活体, 蓝色者为死亡菌体。菌体死亡率即为蓝色者占总菌体数的比例。

4. 核苷酸类物质 HPLC 检测: 参照 M.W. Taylor 等^[4]的方法, 柱: Shim-pack CLC-ODS ($\phi 6.0\text{mm} \times 15\text{cm}$); 移动相: 0.02mol/L

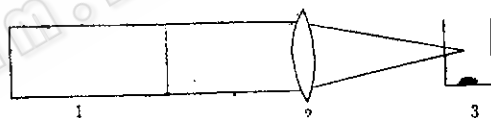


图 1 激光照射装置图

1. 准分子激光仪 2. 透镜 3. 菌体容器

NH₄H₂PO₄ (以 H₃PO₄ 调节 pH 至 5.1), 流量 1ml/min, 检测器: UV254nm, 进样量 5μl。

结果与 讨论

(一) 激光处理后外渗物质 HPLC 图谱

对 *Torulopsis* sp., *Saccharomyces* sp. 及 *Pseudomonas* sp. 悬液进行激光照射, 然后对外渗液进行 HPLC 分析。结果 (图 2) 看出, 激光处理后菌体外渗液的紫外吸收物质中大部分为核苷酸类物质, 因而该方法是提取核苷酸类物质的简便方法。

(二) 激光处理时间对核苷酸得率的影响

对一定浓度的两种酵母菌株进行不同时间的激光照射。对各不同处理条件下菌体存活情况及核苷酸类物质 (CMP、AMP、UMP、GMP 含量总和) 相对外渗量进行比较 (表 1)。结果表明,

本文于 1989 年 8 月 21 日收到。

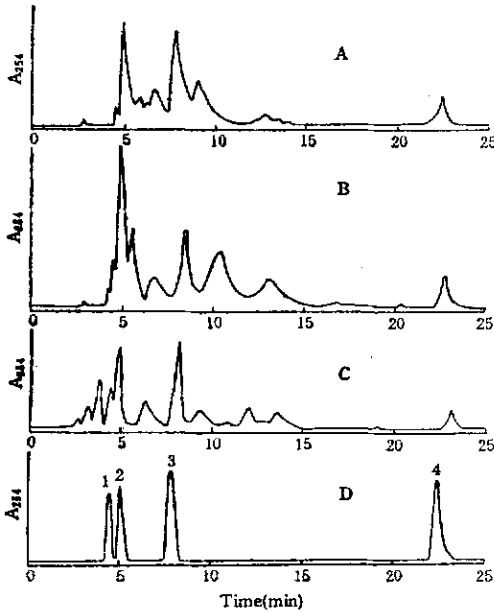


图2 激光处理后菌体外渗液(A, B, C)与核苷酸标准样品(D)色谱图

A. *Torulopsis* sp. B. *Saccharomyces* sp.

C. *Pseudomonas* sp.

1. CMP 2. UMP 3. GMP 4. AMP

激光处理后菌体细胞壁遭到破坏,从而使胞内的核苷酸等物质外渗于胞外,核苷酸的相对外渗量与菌体死亡率存在着较好的相关性。

表1 激光处理时间对菌体(A. *Torulopsis* sp.; B. *Saccharomyces* sp.) 死亡率和核苷酸得率的影响

处理时间 (min)	死亡率 (%)		核苷酸相对得率 (%)	
	A	B	A	B
0	0	0	0	0.2
0.5	3.0	10	3.7	7.8
1	7.5	25	13.8	27.0
2	40	50	11.7	39.8
4	50	90	75.8	85.2
8	85	92	89.2	89.9
12	95	100	100	100

(三) 菌体浓度对核苷酸得率的影响

对三种菌株的菌体分别制成4种浓度悬液,相对浓度为2、4、6、8。激光照射后,核苷酸相对得率与菌体浓度的关系见图3。如图可见,两者之间并不存在直线关系,即核苷酸得率并不随着菌体量的增加而线性增加。我们对不同浓度的

Torulopsis sp. 受外理后的菌体死亡率进行了观察,发现菌体死亡率与菌体浓度不存在正相关。假设相对浓度为2时菌体数为200,那么这时死亡菌体为 $200 \times 87.2\% = 174.4$ 。相对浓度为4的菌体数为400,死亡菌体数为 $400 \times 64.3\% = 257.3$ 。依次可以算出,相对浓度为6、8时的死亡菌体数为336.0及332.0(见表2)。因此,实际受激光处理到的菌体数并不随菌体浓度的增高而线性增高,即菌体浓度高时,有的菌体受激光处理多次,有时则未处理,因而外渗核苷酸物质与菌体浓度不存在线性关系。

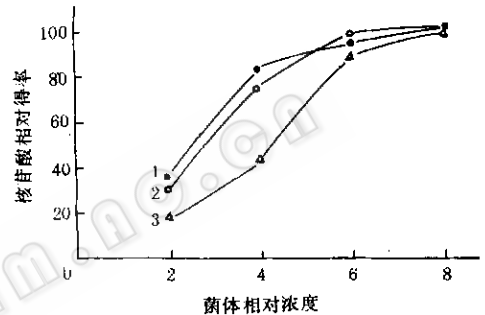


图3 菌体浓度对核苷酸得率的影响

1. *Torulopsis* sp. 2. *Saccharomyces* sp. 3. *Pseudomonas* sp.

表2 菌体浓度对受激光处理后菌体死亡数的影响

菌体相对浓度	死亡率(%)	死菌相对数
2	87.2	174.4
4	64.3	257.2
6	56.0	336.0
8	41.5	332.0

(四) 激光能量密度对核苷酸得率的影响

移动菌体容器的位置,使容器中心与透镜的距离为12、14、16、18和20cm,从而使菌体接受到的激光能量密度依次递增。表3为不同激光能量密度对菌体死亡率及核苷酸得率的影响。被照射菌体为 *Saccharomyces* sp. 由表3看出用1.250—2.50J/cm²的能量密度的激光照射该菌

表3 激光能量密度对菌体死亡率和核苷酸得率的影响

能量密度 (J/cm ²)	0.188	0.357	0.581	1.250	2.50
死亡率 (%)	42	66	91	100	100
核苷酸相 对得率 (%)	47.3	70.8	84.1	90.1	100

体,核苷酸得率较高,这时菌体死亡率为100%。
而当能量密度为 $0.188\text{J}/\text{cm}^2$ 时,菌体死亡率仅
42%,核苷酸得率也较低(相对得率为47.3%)。

激光技术是一种冷处理技术,又能局部地选
择性地作用细胞,因而该技术必将作为一种有效
的方法应用于生物工程及医学行业。

参 考 文 献

- [1] Karu, T. I., *Laser in Life Sciences*, 2(1):53, 1988.
- [2] Fedoseyeva, G. E. et. al., *Laser in Life Sciences*, 2(2):137, 1988.
- [3] Karu, T. I., *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-23(10):1703, 1987.
- [4] Taylor, M. W. et. al., *J. Chromatogr.*, 219:133, 1981.

Extraction of Microbial Intracellular Substances by Laser Technology

Li Zuyi Shi Jiliang Zhu Minghua Gu Jialiang Fong Qin
(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

After high intensity laser irradiation, some microbial intracellular substances (e.g. nucleotides) were obtained. This laser technology was superior to other cell disintegrated methods, such as sonic disintegrator, freezing and thawing, French pressing, lysozyme and treatment with perchloric acid. Effect of irradiation time, cell concentration and laser power density on mortality of cells and yield of nucleotides was studied. With the increasing of irradiation time, the mortality of cells and the concentration of nucleotides exuded out of cells increased. Under certain cell concentration and laser power density ($1.25\text{--}2.50\text{J}/\text{cm}^2$), the yield of nucleotides was high.

Key words

Laser technology; nucleotides; laser power density