

## 长链二元酸专栏

## 生产长链二元酸菌株的诱变筛选

陈远童

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

能用于正烷烃发酵生产长链二元酸的较好微生物都是酵母菌,尤其是假丝酵母属中的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和阴沟假丝酵母(*Candida cloacae*)。

关于二元酸,知道  $C_{10}$  以下的短链二元酸在自然界广泛存在,确立起来的工业制造方法也多,而  $C_{10}$  以上的长链二元酸,天然存在的少,化工上难以合成。迄今为止,对二元酸的研究主要集中在  $C_{10}$  以上的长链二元酸。但是,所有野生菌株都难以积累和基质链长相同的长链二元酸,也就是说,它们的  $\beta$ -氧化能力太强。

Uclio 等研究了阴沟假丝酵母 310 菌株从  $C_9$ - $C_{18}$  的各种单一正烷烃产生的二元酸,当以  $C_9$ - $C_{14}$  的正烷烃为基质时,发现了和各种基质链长相同的二元酸生成,而以  $C_{15}$ - $C_{18}$  的正烷烃为基质时,则不能积累和基质链长相同的二元酸。发现碳链越长的二元酸,越容易降解,而对  $C_5$ - $C_7$  二元酸则不能降解。为了积累大量的长链二元酸,必须降低微生物对长链二元酸的  $\beta$ -氧化能力。

**1 菌种的诱变** 要想发酵正烷烃生产大量与基质链长相同的长链二元酸,首先必须培养出对正烷烃两端氧化( $\omega$ -氧化)能力强,对所生成的二元酸降解能力( $\beta$ -氧化)弱的优良生产突变菌株。目前应用比较成功和常用的诱变方法有:(1)亚硝基胍处理诱变;(2)紫外线照射处理诱变;(3)亚硝酸钠处理诱变;(4)多倍体诱变育种,沈永强等用秋水仙碱和樟脑分别诱发 N-26 菌株产生多倍体细胞 NPco2 和 NPca18,其产生  $DC_{15}$  能力从出发株 N-26 的 10g/L 分别提高到 17.3g/L 和 18.3g/L;(5)  $N^+$  离子注入诱变处理,陈祖华等用热带假丝酵母 SCB412 作为出发菌株,经能量为 50keV、剂量  $1 \times 10^{11}$ - $5 \times 10^{15}$  inos/cm<sup>2</sup> 的  $N^+$  离子注入诱变处理,筛选获得一株能够利用  $nC_{12}$  生产  $DC_{12}$  的高产菌株  $nC_{12}$ ,产酸量从 43.5g/L 上升到 73.2g/L;(6)构建基因工程菌, Picataggio 等用基因工程方法,构建一株  $\beta$ -氧化阻断型菌株  $H_{5343}$ ,在小发酵罐中,发酵  $nC_{12}$  生产  $DC_{12}$ ,产酸水平从 95 g/L 提高到 140 g/L。

**2 菌种筛选** 我们在研究烷烃代谢的基础上,用本所及本组保存的 15 个属及未鉴定的菌株共 720 株进行筛选,有 344 株能利用烷烃产生二元酸,其中 21 株产酸较多,尤其以 1230 号菌为最优。1230 号菌能利用长链烷烃作碳源和能源产生  $C_{10}$  以下的短链二元酸,产生一元酸极少。由此看来,该菌对烷烃具有很强的两端氧化能力,很弱的单端氧化能力以及很强的对二元酸的  $\beta$ -氧化能力。选择 1230 号菌为出发菌株,进行亚硝基胍及紫外线的诱变和筛选,挑选那些在完全培养基上生长好,而在指示培养基上几乎不生长的菌落,再用筛选培养基进行产酸试验,测定它们产二元酸的总量,并分析二元酸的组分。通过第一次亚硝基胍处理后复筛得到一株产酸量明显提高的突变株 ND<sub>30</sub>;再在不同温度下用亚硝基胍处理 ND<sub>30</sub>,在平板筛选和产酸比较后得到比 ND<sub>30</sub> 菌株产酸进一步提高的突变株 T<sub>25-14</sub>。

作者以 T<sub>25-14</sub> 为出发菌株,用紫外线和亚硝酸钠反复诱变处理,挑选那些在完全培养基上生长好而在指示培养基上不生长或生长弱的菌株进行产酸试验,获得一系列生产各种单一二元酸的高产菌株。