

N⁺ 离子注入热带假丝酵母对长链二元酸产量的影响*

陈祖华 叶 晴 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要: 用热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) SCB412 作为出发菌株, 经能量 50KeV、剂量 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 的 N⁺ 离子注入诱变处理, 以产生可遗传的诱变。N⁺ 离子注入后, 存活率与剂量呈指数衰减关系: $\log(\text{存活率} \%) = 8.23 - 0.604 \times \log(\text{剂量})$, 在培养过程中可观察到酵母菌菌落和细胞形态均发生了变化。经筛选, 获得了一株能够利用正十二烷烃发酵产生长链二元酸的高产菌热带假丝酵母 SCB609。在初始正十二烷烃浓度为 15%(v/v) 下产酸量由 43.5g/L 上升到 73.2g/L。比较两株菌发酵生长特性的差异, 产酸过程有一定的变化。

关键词: 离子注入, 热带假丝酵母, 长链二元酸

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0174-04

MUTATION OF *CANDIDA TROPICALIS* IMPLANTED BY NITROGEN IONS AND ITS EFFECT IN LONG CHAIN DICARBOXYLIC ACID YIELD

CHEN Zu-Hua YE Qing YIN Guang-Lin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai 200233)

Abstracts: A mutant, *Candida tropicalis* SCB609, which can produce decane dicarboxylic acid from n-dodecane, was obtained after implanted by Nitrogen ions with energy 50keV and ion fluence from 1×10^{11} to 5×10^{15} ions/cm². Furthermore, the amount of decane dicarboxylic acid was up to 73.2g/L when the fermentation medium contains total 15% n-dodecane. After implanted the logarithm value of survive fraction had good linear relationship with the logarithm value of ion fluence.

Key words: Ion implantation, *Candida tropicalis*, Decane dicarboxylic acid

* 上海-联合利华研究与发展基金资助项目 (No.9801)

收稿日期: 1999-02-26, 修回日期: 1999-04-21

长链二元酸作为一种重要的原料,可用于合成麝香丁、尼龙工程塑料、热熔胶、树脂、高级润滑油等物质,而十二个碳以上的长链二元酸自然界中不存在。目前,由于其化学合成方法比较困难,国内外大都采用微生物发酵法生产二元酸,并且对菌种的筛选、发酵条件的优化、生长动力学和相关酶系以及小分子效应物作用等进行了较为深入的研究^[1~4]。但在该菌种的诱变选育研究方面,都集中在常规的物理、化学方法上,如紫外线、亚硝酸、亚硝基胍。离子束作为一种新的诱变源,在诱变育种方面,因其独特的诱变机理和生物效应而发展迅速,离子注入时由于低能离子与生物物质相互作用而产生其特有的特性:能量沉积、动量传递、质量沉积(粒子注入)及电荷交换。采用 N^+ 离子注入,该离子不仅是构成生物体的基本元素,而且 N 的位置、共价键数可区别不同的碱基。离子注入生物效应显出一些不同于辐射生物学的特征,低能生物学原理在诱变育种和外源基因上可获得广泛的应用^[5]。较为成功的例子是水稻育种、工业微生物菌种改良、离子束介导外源基因转移等。中国科学院等离子体所对 α -淀粉酶菌株和利复霉素生产菌种采用离子束进行诱变筛选,利复霉素发酵水平提高 40%,化学效价达 6300 单位;浙江省农科院利用离子束辐照糖化酶生产菌不同生长阶段的孢子,经筛选产酶活力从出发菌株 1 万单位提高到平均 2 万单位,最高可达 2.6 万单位,传代实验产酶性能稳定,已投入生产^[6~7]。此外, N^+ 离子注入诱变在维生素 C 产生菌株的优化方面也进行了有益的尝试。

本文报道了在能量 50keV、剂量 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 下对热带假丝酵母 SCB412 进行 N^+ 离子注入的实验结果,并且使产量有 50% 的提高。关于离子束注入酵母菌诱变育种的文章在国内尚未见到。

1 材料与方法

1.1 菌种

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) SCB412 由本中心微生物代谢与代谢工程课题组尹光琳

研究员提供。

1.2 试剂

混合正烷烃($nC_{14} \sim nC_{18}$)由上海皮革化工厂提供,十三碳二元酸(DC_{13})由日本东京化成工业株式会社提供,十六碳二元酸(DC_{16})由 Sigma 提供,其它均为市售试剂。正十三烷(nC_{13})、正十五烷(nC_{15})和正十二烷(nC_{12})由抚顺美时化工制品有限公司提供。

1.3 仪器

气相色谱仪:GC7890F 型,上海天美科学仪器有限公司生产。

离子注入机:Ion Implanter IM-200M,日本 ULVAC Corporation 公司生产。

1.4 培养基

种子培养基:10Bril 麦芽汁琼脂斜面:10Bril 麦芽汁 100mL,蛋白胨 1g,琼脂 2g,

诱变培养基:酵母膏 10g,蛋白胨 10g,NaCl 3g,琼脂 20g,定容至 1L 水中。

筛选培养基: $KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 2g, Na_2HPO_4 0.7g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 5g,豆芽汁 30g,琼脂 20g 二元酸 10g,定容至 1L 水中。

发酵培养基: $KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 6g, Na_2HPO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,酵母膏 0.5g,玉米浆 0.3g,尿素 5g,正烷烃(nCx)150mL,定容至 1L 水中。

1.5 种子的培养与发酵

菌种在麦芽汁琼脂斜面上,30℃ 培养 48h 后,接入 500mL 中含有 20mL 种子培养基的三角瓶中,于 30℃ 在摇床上培养 48h,再接入发酵培养基中,培养 100h,且每天调节 pH 维持在 7.5~8.0。

1.6 二元酸的提取与鉴定

发酵液的 pH 约为 6.0,将其调节至 pH7.5 左右,加热至 70℃,保温过滤除去菌体,加 6N HCl 调节 pH 为 2.0 左右,出现结晶,有沉淀析出,离心分离得到沉淀,烘干,除去水分,可得到二元酸样品。该样品可溶解于 95% 乙醇溶液中,用标定过的 NaOH 滴定。

气相色谱:样品经甲醇-硫酸酯化,GC7890F 型色谱,LZ-FFAP 毛细管柱,进口汽化温度

300℃,柱温 200℃,检测温度 300℃,FID 检测。

1.7 诱变方法

取培养好的种液,离心收集菌体,用 pH7.0 的磷酸缓冲液 (PBS) 悬浮,得到菌悬液,取菌悬液 20μL, 在无菌载玻片上涂薄层, 风干制成菌膜。在 Ion Implanter IM-200M (ULVAC Corporation) 注入特定能量和剂量的 N⁺ 离子。

用 2mL 缓冲液洗下得到处理后的菌悬液。

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定

对所采用的菌株在不同的生长阶段观察其菌落和细胞形态变化,以及研究其生理生化特性。

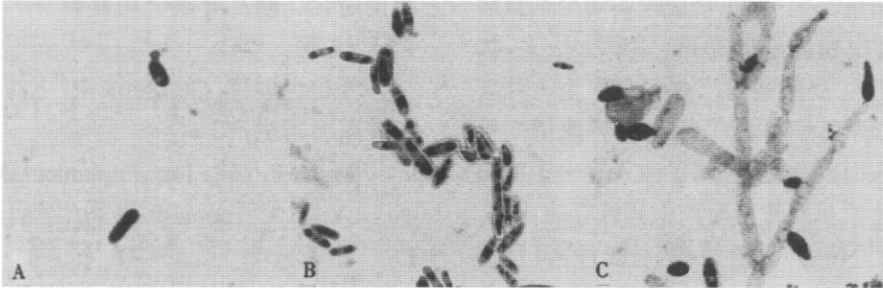


图1 不同时期的细胞形态

A: 4h时液体培养基中的细胞形态, B: 20h 时斜面培养基中的细胞形态,
C: 30h时液体发酵培养基中的细胞形态

2.1.1 形态鉴定:在麦芽汁琼脂斜面上培养,菌落白色到奶油色,无光泽或稍有光泽,软而平滑或部分有皱纹,培养久时菌落渐硬并呈菌丝状。在加盖片的玉米粉琼脂培养基上培养,可见大量假菌丝,包括伸长的分枝假菌丝,上面带有芽分生孢子或轮生而分枝的或成短链的芽生孢子。

在液体培养中,菌的不同生长阶段用相差显微镜拍摄照片,如图 1。

在菌生长的最初 1~4h 内,细胞卵形或球形 4~8×5~11μm;4h 后,菌的一端开始出芽,并进而增殖为两个菌;16h 后,逐渐有假菌丝出现。将含大量假菌丝的液体转接到液体培养基中,能重复观察到上述结果。根据该菌的生活史以及菌落和细胞形态,可以判定为假丝酵母属。

2.1.2 生理生化特性的鉴定:除此之外,我们采用液体试管法和生长图谱法研究了该菌对各种碳源和氮源的利用情况,进一步研究其生理生化特性。得到的结果如表 1。

根据生理生化特性,参照文献 [8] 鉴定,进一步定名为热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)。

表1 微生物对不同碳源和氮源的利用情况

基质	液体试管法	生长图谱法
葡萄糖	+	+
蔗糖	+	+
乳糖	-	-
甘油	+	+
山梨糖	-	-
乙醇	+	+
甘露醇	+	+
可溶性淀粉	+	+
丁二酸钠	+	+
麦芽糖	+	+
棉子糖	-	-
半乳糖	+	+
纤维二糖	+	+
酵母膏	+	+
硝酸铵	+	+
硫酸铵	+	+
尿素	+	+

2.2 离子注入诱变处理后的存活率

在 50KeV、剂量为 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ ions / cm² 下进行 N⁺ 离子注入,诱变处理后,将缓冲液洗下的菌液与对照菌株菌液稀释后涂平板,30℃

培养 48~60h 后进行菌落计数。根据得到的统计数据,可以看出菌体的损伤程度与注入剂量有关,随着离子注入剂量的增大,菌株的存活率减少。按照离子处理后存活率的变化规律, $S = A \times (1/D)^B$, 其中 S: 存活率 %, D: 注入剂量, A: 校正系数, B: 常数。回归上面的数据,得到该方程式的各常数为: $\log(A) = 8.23343 \pm 0.68506$;

$B = 0.60485 \pm 0.05056$; $R = -0.98631$; $SD = 0.20269$ 。

2.3 高产菌种的筛选

将诱变后所得菌悬液直接作为种子液,先转接到麦芽汁液体培养基中 30℃ 培养 48h,然后接入发酵培养基培养 100h,得到的二元酸产量如表 2 所示。

表2 不同剂量处理后的混合二元酸产量

剂量(ions/cm ²)	1×10 ¹¹	1×10 ¹²	1×10 ¹³	1×10 ¹⁴	1×10 ¹⁵	5×10 ¹⁵
二元酸产量(g/L)	25.3	31.2	24.4	23.8	23.2	21.6

由表 2 可知,随着处理剂量的增加,其二元酸产量是逐步减少的;在低剂量时产量要普遍高于高剂量处理后的产量,尤其以 1×10^{12} ions/cm² 处理后的产量最高。然后取该剂量处理后的菌悬液稀释涂于麦芽汁固体培养基上 30℃ 培养 48h,挑取生长良好的菌落分别在筛选培养基和完全培养基上划线,继续在 30℃ 培养 48~60h,选取那些在完全培养基上生长良好,而在筛选培养基上不生长或生长很弱的菌落。复筛后在摇瓶上进行产酸发酵实验,最后筛选得到 SCB609 菌株,能够达到产混合二元酸 44.5g/L 的水平。

子注入诱变处理,得知在较低剂量下,正突变率高,总体产酸水平高,再从中筛选,得到一株利用正十二烷并且转化率也高的菌株热带假丝酵母 SCB609,为今后微生物诱变育种又增加了一种有效的方法。

致谢 N⁻ 离子注入处理由中国科学院上海冶金研究所离子束实验室完成,林梓鑫高级工程师给予大力协助,特此致谢。乔春红同志和上海大学实习生倪春芳在微生物发酵和产品的提取及分析方面参加部分工作,在此一并致谢。

2.4 两株菌对不同烷烃的利用情况

分别以正十二烷(nC₁₂)、正十三烷(nC₁₃)、正十五烷(nC₁₅)三种纯烷烃和含 nC₁₄~nC₁₈混合烷烃作为原料,研究了菌株 SCB412 和 SCB609 在相同条件下进行摇瓶发酵,测得其最终产酸结果如表 3 所示。

表3 不同烷烃作为原料时的二元酸产量(g/L)

菌株	正十二烷	正十三烷	正十五烷	混合烷烃
SCB412	43.5	30.7	13.4	23.6
SCB609	73.2	56.4	27.6	44.5

由上表可见,两株菌对 nC₁₂ 的利用、转化率相对其它烷烃都要高。离子注入诱变筛选得到的 SCB609 菌株相对于初始菌株 SCB412 对各种烷烃的转化率有较显著的提高,同时也可以看到,随着烷烃碳链的增加,转化率也在逐步下降。

经过对热带假丝酵母 SCB412 进行 N⁻ 离

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所经代谢组及发酵车间. 微生物学报, 1980, 20(1): 88~93.

[2] 刘祖同, H. G. Sato. 石油学报, 1987, 3(2): 29~37.

[3] 陈远意, 庞月川, 郝秀珍. 微生物学报, 1999, 39(3): 279~281.

[4] 李元广, 曹竹安等. 生物工程学报, 1994, 10(3): 250~257.

[5] 余增亮, 霍裕平. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 221~225.

[6] 中国科学院等离子体物理研究所编. 第二次全国离子注入生物效应学术会议论文集. 合肥: 安徽农业大学出版社, 1994.

[7] Chen Yuanru. Nucl. Instr. And Meth., 1987, B23: 344~346.

[8] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌. 北京: 科学出版社, 1973, 146~159.