

# $\Delta^9-1, 18-$ 十八烯二元酸生产菌株的筛选和诱变\*

陈远童 庞月川 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

$\Delta^9-1, 18-$ 十八烯二元酸( $\Delta^9\text{DC}_{18}$ )是合成名贵香料——灵猫香的重要原料。灵猫香是四种名贵动物香(龙涎香、麝香、灵猫香和海狸香)中的一种。由于人民生活水平的不断提高,对名贵香料的需求量与日俱增,又由于人类保护野生动物,所以名贵香料的供求关系日渐紧张,因此合成人造香料是一种发展方向。

$\Delta^9\text{DC}_{18}$ 自然界中不存在,化学方法又无法合成,微生物具有一种特异的氧化能力,能在常温常压下发酵油酸或油醇,生成相应链长的二元酸而不破坏其双键结构,因此可用微生物方法生产 $\Delta^9\text{DC}_{18}$ 。1983年日本田冈映<sup>[1]</sup>用假丝酵母(*Candida*)MD-105,从反式- $\Delta^9-$ 十八碳脂肪酸和顺式- $\Delta^9-$ 十八碳脂肪酸发酵生产,用休止细胞转化96h,前者产生反式- $\Delta^9-1, 18-$ 十八烯二元酸(反式 $\Delta^9\text{DC}_{18}$ )达到32.9g/L,后者产生顺式- $\Delta^9-1, 18-$ 十八烯二元酸(顺式 $\Delta^9\text{DC}_{18}$ )达到48.1g/L。本文报道生产 $\Delta^9\text{DC}_{18}$ 菌株的筛选和诱变。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

实验室保存的570株酵母菌。

### 1.2 试剂

油酸,分析纯,北京金龙化学试剂有限公司出品;油醇,日本进口;油酸甲酯,分析纯,国产。其它药品为试剂级。

### 1.3 培养基

1.3.1 诱变培养基:麦芽汁培养基:10Bé的麦芽汁琼脂固体培养基,0.06MPa灭菌30min。无碳源培养基(%): $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.07,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5, 酵母膏 0.1, 琼脂粉 1.5, 蒸馏水配制,0.1MPa灭菌30min。指示培养基:在培养皿上放一张吸饱油酸的灭菌滤纸,然后倒入无碳源培养基,做成约2mm厚的平板

1.3.2 筛选和发酵培养基(%): $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.8,  $\text{NaCl}$  0.1, 蔗糖 0.2, 酵母膏 0.2, 玉米浆 0.1, 尿素 0.1, 油酸 7.0, 自来水配制, pH7.3, 0.06MPa灭菌30min。

### 1.4 筛选方法

将待筛菌株接入麦芽汁琼脂斜面,28℃培养2d,刮入筛选培养基中,在200r/min的旋转摇床上发酵3d,每24h调pH至7.5~8.0,发酵終了,进行提取分析。

### 1.5 二元酸的提取分析

发酵終了,调pH3.0,用乙醚提取,去乙醚后,得产品二元酸和原料油酸,用甲醇和石油醚萃

\*此研究得到中国石油化工总公司资助。

本文于1996年1月5日收到。

取, 除去油酸后, 用标准 NaOH 溶液滴定, 计算二元酸总量。

二元酸的成份用气相色谱分析测定。

## 2 结果

### 2.1 菌种筛选

以油酸( $\Delta^9$ -十八碳脂肪酸,  $\Delta^9\text{MC}_{18}$ )为发酵基质, 对实验室保存的 570 株酵母菌进行发酵生产  $\Delta^9\text{DC}_{18}$  的筛选, 获得 48 株产酸菌, 经第一次复筛, 选取产酸在 5g/L 以上的 10 株菌, 进行第二次复筛, 获得一株重复性较好, 且总酸达到 10g/L 的菌株热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) NP-103, 并作为诱变的出发菌株。

### 2.2 NP-103 菌株的 $\text{NaNO}_2$ 诱变

取一满杯在 28℃ 培养 36h 的 NP-103 菌体, 接入装有 10ml 诱变培养基的 250ml 三角瓶中, 振荡培养 36h, 取 4ml 培养液, 加入 2ml 0.1mol/L 的  $\text{NaNO}_2$  和 2ml pH4.5 的醋酸缓冲液, 28℃ 保温 10min, 取出 2ml 加入到 10ml 0.07mol/L pH8.6 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶液中, 终止反应, 取 1ml  $\text{NaNO}_2$  处理液加到 10ml 麦芽汁中, 28℃ 增殖 20h, 稀释成不同浓度, 涂平板, 28℃ 培养 2~3d, 挑出小菌落分别接入含有油酸的指示平板和麦芽汁琼脂平板上, 28℃ 培养 2d, 挑出在指示平板上不生长或生长较弱的菌株 320 株, 以油酸为基质, 经过初筛和两次复筛, 获得一株产酸提高 40% 的突变株 OU-145。

### 2.3 OU-145 菌株的进一步诱变

以 OU-145 菌株为出发菌株, 按照上述的诱变方法, 再一次  $\text{NaNO}_2$  诱变, 挑选出 107 株新突变株, 以油酸为基质进行发酵筛选, 获得三株产酸提高 30% 以上的新菌株, 经过气相色谱分析, 选取一株纯度较高, 总酸提高 35% 的优良突变株 OU-145-3。

### 2.4 不同基质的产酸试验

试验了 OU-145-3 突变株以油酸、油酸甲酯和油醇为基质时的产酸情况。发酵液中加入基质浓度为 20%, 发酵 5d 后测定, 产酸量分别为 25.3g/L、35.5g/L 和 42.8g/L。结果表明, OU-145-3 突变株以油醇为基质时, 产酸量最高。

## 3 讨论

以 NP-103 为出发株, 经过两次  $\text{NaNO}_2$  诱变和反复筛选, 获得一株较好的生产菌株, 当以油醇为基质发酵生产  $\Delta^9\text{DC}_{18}$  时, 5d 后产酸水平达到 42.8g/L, 比用油酸为基质时总酸水平提高 69.2%, 说明 OU-145-3 菌株是一株以油醇发酵生产  $\Delta^9\text{DC}_{18}$  的较好菌株。

## 参 考 文 献

- [1] 田国映, 川口市芝. 特许出願公开昭 58-165794: 539 ~ 543, 1983.

## SCREENING AND MUTAGENESIS OF $\Delta^9-1, 18-$ OCTADECENEDIOIC ACID-PRODUCING *CANDIDA TROPICALIS*

Chen Yuantong Pang Yuechuan Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** A mutant, *Candida tropicalis* OU-145-3, which can produce  $\Delta^9-1, 18-$ octadecenedioic acid ( $\Delta^9\text{DC}_{18}$ ), was obtained by treating the parent strain NP-103 with nitrite. The results showed that the yield of  $\Delta^9\text{DC}_{18}$  reached 42.8g /L from 20% oleic alcohol in 5 days fermentation.

**Key words** Oleic alcohol,  $\Delta^9-1, 18-$ octadecenedioic acid, *Candida tropicalis*