

产生二羧酸的耐高温酵母菌的研究

刘祖同 李冠英 夏玉棉 郝秀珍 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

野生株热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 1230 能在 40℃ 生长, 而其产二羧酸的突变株 U_{3-21} 则不能在这样高的温度下生长和产酸。用高温 (40℃) 直接处理的方法从突变株 U_{3-21} 获得能在该温度下产酸的耐高温株, 其机率为亿分之三。这些菌株在高温下的产酸能力绝大多数相近, 经筛选获得在 40℃ 产酸为 3% 以上的耐高温株 MHT₃₉₋₉。该菌株经室温转接保存三年, 高温产酸性能稳定。

关键词 耐高温酵母菌; 二羧酸

U_{3-21} 在夏季高温下难以正常生产。为了节约能源使生产能全年连续进行, 我们进行了产生二羧酸的耐高温酵母菌的选育, 利用高温直接处理的方法获得在高温下产酸稳定的耐高温菌株^[1]。

材料与方法

(一) 菌种

热带假丝酵母 1230 (本实验室保藏菌); U_{3-21} 是从热带假丝酵母 1230 诱变出的产二羧酸突变株^[1]。

(二) 培养基

1. 种子培养基: 麦芽汁琼脂斜面。

2. 发酵培养基组成 (W/V%): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.8; KH_2PO_4 0.02; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05; 酵母膏 0.05; 玉米浆 0.03; 尿素 0.1; 混合烷烃 15 (V/V); 自来水配制。500ml 三角瓶中装 15ml 培养基, 尿素及烷烃分别灭菌, 接种前加入培养基中。

3. 指示培养基组成 (W/V%): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.07; KH_2PO_4 0.2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05; $(NH_4)_2SO_4$ 0.5; 水洗琼脂 2.0; DC₁₀₋₁₄ 混合二羧酸 1.0; 蒸馏水配制。

(三) 二羧酸的鉴定

MHT₃₉₋₉ 菌产生的二羧酸用 E. W. Robb 的方法^[2]制成四甲基铵盐, 以 SP 2305 型气液色谱仪进行分析。分析条件为: 气化室温度: 300℃,

柱温: 210℃, 氢气: 25ml/min, 氮气: 42ml/min, 空气: 400 ml/min, 固定液: 15% SE-30; 担体: 60—80 目, 上海白色担体。

(四) 试剂: C_{10-14} 混合正烷烃, 东方红炼油厂出品; DC₁₀₋₁₄ 混合二羧酸, 本实验室发酵制取; 其他试剂均为化学纯试剂。

结 果

(一) 原始株 1230 与突变株 U_{3-21} 的耐高温性能

以 10^6 和 10^8 个细胞比较了原始株 1230 和突变株 U_{3-21} 的耐高温特性。1230 菌株在 40℃ 下培养 24 小时就长满麦芽汁琼脂平板, 而 U_{3-21} 菌则于 4 天后在接有 10^8 个细胞的平板上只长出 2—3 个菌落。说明原始株 1230 是一株耐高温菌株。这可能是通过亚硝基胍和紫外线诱变的突变株 U_{3-21} 丧失了耐高温性能。挑出那些在平板上生长的菌落, 按前文报道的方法^[1]置高温下进行产酸实验, 观察到各菌株的产酸能力基本相近。

(二) 耐高温菌株的选育

将 U_{3-21} 菌一环接入麦芽汁中振荡培养 24 小时后, 倒入麦芽汁琼脂平板上, 在

本文于 1982 年 8 月 27 日收到。

表 1 U_{3-21} , HT_{39} , MHT_{39-9} 在高温下利用混合烃发酵产生二羧酸量的比较Table 1. The yield of dicarboxylic acids produced by strains U_{3-21} , HT_{39} , MHT_{39-9} at 39—40°C

菌 号 strains	生 长 Growth	二羧酸产率 Yields (%)	二羧酸的组分 Composition (%)					二羧酸纯度 purity (%)
			DC ₁₀	DC ₁₁	DC ₁₂	DC ₁₃	DC ₁₄	
U_{3-21}	—	—	—					—
HT_{39}	+++	2.26	—					—
MHT_{39-9}	+++	2.49	9.0	34.7	33.3	15.6	1.8	94.4

表 2 MHT_{39-9} 菌高温产酸性能稳定性Table 2 The stability of MHT_{39-9} at 39°C in producing acid

菌 号 strain	发 酵 温 度 Fermentation temperature(°C)	二羧酸产率 Yields of dicarboxylic acid (%)
U_{3-21}	28	2.48
MHT_{39-9}	28	2.52
MHT_{39-9} (12—20°C 存放一月)	39	2.37
MHT_{39-9} (28°C 转接 7 次)	39	2.49
MHT_{39-9}	39	2.41

表 3 流加碳源时 MHT_{39-9} 在高温下的产酸量Table 3 The yield of acids produced by MHT_{39-9} with supplemental carbon source at 39—40°C

菌 号 Strains	流加碳源 With supplemental carbon source	耗 0.202 N NaOH Volume of 0.202N NaOH consumed (ml)	二羧酸产率 The Yield of acids (%)
U_{3-21}	+	0.75	0.22
MHT_{39-9}	+	10.65	3.08
MHT_{39-9}	—	7.30	2.12

表 4 1230, MHT_{39-9} , U_{3-21} 菌在不同温度下的形成菌落数Table 4 The comparison of colony-forming percentage of 1230 MHT_{39-9} U_{3-21} strains at different temperatures

菌 号 Strain	加在平板上的 细胞数 Number of cells on the plates	平均菌落数 Average number of colonies formed		菌落形成百分数 Percentage of colonies formed(%)	
		28°C	40°C	28°C	40°C
1230	28	24.5	20.8	87.50	74.29
	288	251.8	229.5	87.43	79.72
MHT_{39-9}	40	36.4	27	91.00	67.50
	288	272.2	188	94.51	65.27
U_{3-21}	10^4	满 Full	0		0
	10^8	满 full	2.5		3×10^{-4}

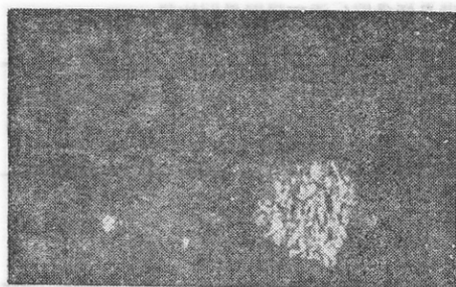


图1 MHT₃₉₋₉ 和 U₃₋₂₁ 在 39°C 下培养的巨大菌落

Fig. 1 Giant Colony of MHT₃₉₋₉ and U₃₋₂₁ Strains at 39°C

左 U₃₋₂₁ Left U₃₋₂₁; 右 MHT₃₉₋₉ Right MHT₃₉₋₉

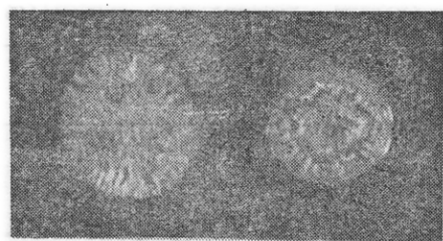


图2 MHT₃₉₋₉ 和 U₃₋₂₁ 在 28°C 培养下的巨大菌落

Fig. 2 Giant colony of MHT₃₉₋₉ and U₃₋₂₁ strains at 28°C

左 U₃₋₂₁ Left U₃₋₂₁

右 MHT₃₉₋₉ Right MHT₃₉₋₉



图3 MHT₃₉₋₉ 及 U₃₋₂₁ 先在 28°C 后在 39°C 培养的生长情况

Fig. 3 Growth of MHT₃₉₋₉ and U₃₋₂₁ strains first at 28°C for 5 days and then at 39°C for 5 days

左 U₃₋₂₁ Left U₃₋₂₁

右 MHT₃₉₋₉ Right MHT₃₉₋₉

39°C 温箱培养 4 天, 淘汰高温下不生长的菌, 挑选出在 39°C 生长快的单菌落。按前述方法^[4] 和出发菌株 U₃₋₂₁ 在 39°C 发酵混合正烷烃比较产酸量, 结果 U₃₋₂₁ 菌在 39°C 下不生长, 而经高温选出的菌株都生长良好, 筛选出的在高温下生长的 48 株菌中,

产酸大都在 2% 左右。将其中 12 株菌置 41°C 发酵和生长, 较在 39°C 差, 大部分产酸也很少, 仅三株产酸在 1.4% 左右。

为得到在高温下产酸高及性能稳定的菌株, 将筛选出产酸高的菌株 HT₃₉ 以混合二羧酸作指示培养基在高温下再进行单菌落分离, 挑出在指示培养基上生长差的菌落进行产酸筛选, 得到一株比 HT₃₉ 产酸高的耐高温株 MHT₃₉₋₉ (表 1), MHT₃₉₋₉ 产生的二羧酸经气液色谱分析其组分的百分含量为: DC₁₀, 9.0; DC₁₁, 34.7; DC₁₂, 33.3; DC₁₃, 15.6; DC₁₄, 1.8。粗品的酸含量为 94.4%。

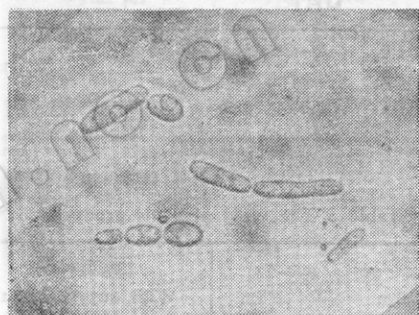


图4 U₃₋₂₁ 菌在麦芽汁培养基中的营养细胞 (28°C 培养 2 天)

Fig. 4 The cells of U₃₋₂₁ grown on malt extract medium for 2 days at 28°C

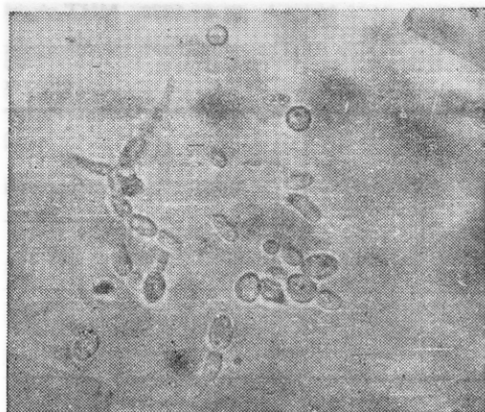


图5 MHT₃₉₋₉ 在麦芽汁培养基中的营养细胞 (28°C 培养 2 天)

Fig. 5 The cells of MHT₃₉₋₉ grown on malt extract medium for 2 days at 28°C

(三) MHT₃₉₋₉ 菌株高温性能的稳定性

为探讨 MHT₃₉₋₉ 在高温下产酸性能是否稳定, 将在室温保存 1 个月和 3 年的 MHT₃₉₋₉ 菌再在高温下发酵, 其产酸量不变(表 2), 表明 MHT₃₉₋₉ 菌耐高温性能稳定, 不因菌株在室温保存而发生改变。将 MHT₃₉₋₉ 置 28℃ 发酵, 产酸量与 U₃₋₂₁ 相似(表 2), 表明 MHT₃₉₋₉ 菌产酸温度范围较广, 既能用于高温又能用于常温发酵。

(四) 流加碳源对产酸的促进作用

考虑到耐高温菌在高温条件下的代谢较快^[5], 以及发酵液中维持一定的烃浓度有利于提高酸产量, 在发酵 48 小时后补加 5% 的碳源, 96 小时的酸产量提高到 3% 以上(表 3)。

(五) 不同温度下原始株 1230 和耐高温株 MHT₃₉₋₉ 的菌落形成

用计算平板上出现菌落数的方法, 比较了 1230 及 MHT₃₉₋₉ 菌在 28℃ 及 40℃ 的菌落形成百分数(表 4)。不同温度下菌落形成百分数之差为 26%, 耐高温株 MHT₃₉₋₉ 在高温下的菌落形成百分数比原始株 1230 低 11%(表 4)。

(六) MHT₃₉₋₉ 和 U₃₋₂₁ 菌在不同温度下的生长

观察了耐高温菌 MHT₃₉₋₉ 和 U₃₋₂₁ 菌在 39℃ 及 28℃ 下的生长情况。MHT₃₉₋₉ 菌在高温下生长 10 天能形成直径为 2 cm 的巨大菌落。U₃₋₂₁ 菌则不能形成巨大菌落(图 1, 3), 而两菌株在 28℃ 培养时都生长很好, 但菌落形态不同。MHT₃₉₋₉ 菌落较小而厚, U₃₋₂₁ 菌落大而薄(图 2)。此外, MHT₃₉₋₉ 菌在不同温度下的菌落形态也不

同, 高温下为边缘不整齐的皱褶型(图 1—3)。两菌在麦芽汁培养基中生长的营养细胞也有差别, MHT₃₉₋₉ 呈卵圆形(图 5), U₃₋₂₁ 则多为长圆形(图 4)。

讨 论

原始株 1230 为一株能在 40℃ 高温下生长的菌株, 其突变株 U₃₋₂₁ 经诱变剂处理后, 不能在高温下生长和产酸。但在高温下直接处理可从中得到耐高温菌株, 耐高温性能可能是回复突变的结果^[6]。

用高温处理得到的耐高温菌, 经室温转接及长期保存后, 高温下产酸性能不变, 可认为高温遗传性稳定, 因而可以在室温下保存。

MHT₃₉₋₉ 在高温下的菌落形成百分数比原始株 1230 低 11%。

利用高温处理选育耐高温菌, 能节省时间, 操作也简便。得到的高温菌可用于夏季高温连续生产, 又能节约能源, 这项研究值得进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Clegg, L. F. L. and S. E. Jacobs: In "Adaptation in Microorganisms" (ed. by R. Davies and E. F. Gale) Cambridge Uni. Press, London, 1953, pp. 306—325.
- [2] 中国科学院微生物所经代谢组等: 微生物学报 20 (1): 88—93, 1980.
- [3] Robb, E. W. et al.: *Anal. Chem.*, 35: 1644, 1963.
- [4] 中国科学院微生物所经代谢组等: 微生物学报 19(1): 71—75, 1979.
- [5] Fang, S. F. et al.: *Scientia Sinica*, 5 (2): 239—252, 1956.
- [6] 钱存柔、方心芳, 科学通报, 1956 第 12 期, 41—42.
- [7] 钱存柔、方心芳, 微生物学报, 6(2): 161—177, 1958.

STUDIES ON THERMOPHILIC AND ACID-PRODUCING DICARBOXYLIC ACID YEAST

Liu Zutung Li Guanying Xia Yumian Hau Xiuzhen Fang Xinfang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The wild strain, *Candida tropicalis* 1230, can grow at 30—40°C. But its mutant U₃₋₂₁ derived from the wild strain is able to produce dicarboxylic acid at room temperature only from n-alkane, and is unable to grow and produce any acid at 40°C. It appeared that this mutant U₃₋₂₁ had lost the thermophilic property.

Generally, the thermophilic yeast are obtained by the method of long term adaptation at high temperature. Usually a long time is needed to obtain such yeast and the properties of such yeast is often unstable. In this paper a rapid new method is presented, by which thermophilic yeast is obtained directly from treating a mutant of *Candida*

tropicalis U₃₋₂₁ at 39—40°C. The probability is approximately 3×10^{-8} . The yields of dicarboxylic acid produced by these strains are similar. The thermophilic yeast MHT₃₉₋₉ which produces more than 3% dicarboxylic acid at 39—40°C is obtained by selection. And the obtained strain still produces dicarboxylic acid from n-alkane at 39—40°C after three year storage at room temperature. The ability of producing dicarboxylic acid of MHT₃₉₋₉ at high temperature is stable. This strain also have an advantage over others for continuity of production in hot summer or warm region.

Key words

Candida tropicalis; dicarboxylic acid