

TD92.DP3
308

发酵与 微生物

III

〔日〕植村定治郎 相田 浩 编

科学出版社

发 酵 与 微 生 物

III

〔日〕植村定治郎 相田 浩 编

天津市工业微生物研究所《发酵与微生物》翻译组 译

科 学 出 版 社

1 9 7 9

内 容 简 介

本书共分四大部分：一、石油资源与微生物，其中包括一般研究方法和石油的微生物利用；二、无机物与微生物，着重叙述无机营养与微生物和细菌浸出；三、废水处理与微生物；四、瘤胃发酵与微生物。

本书可供微生物研究工作者和从事微生物发酵工作的科技人员参考。

植村定治郎 相田 浩 編集

発酵と微生物 III

朝倉書店 1970

发 酵 与 微 生 物

III

〔日〕植村定治郎 相田 浩 编

天津市工业微生物研究所《发酵与微生物》翻译组 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1979年10月第一版 开本：787×1092 1/32

1979年10月第一次印刷 印张：10 7/8

印数：0001—14,120 字数：245,000

统一书号：13031·1022

本社书号：1441·13—9

定价：1.10 元

序

自古以来，人们就把微生物分为所谓寄生菌和非寄生菌（或称独立营养菌）两大类，但对包括病毒在内的微小个体以及以单细胞群生的现代微生物来讲，应该说其寄生性是它的本来面目。尽管尚不明瞭现代微生物是由原始细胞群单生后自养化，还是由原始细胞群组织化之后，通过对其组织的寄生才被单生并发展到自养化，但对非寄生菌，也应理解为在根本上是和寄生菌有密切关系的。当我们以这种看法为基础时，就能全面地把握作为生物现象的微生物整体。

然而，连寄生性的本质也还未搞清楚的今天，依照上述观点把非寄生性当作既成事实，从概念上阐明非寄生菌的特征，是非常困难的。由于现代寄生菌主要是以单细胞状态生存，因此，目前只不过是估计被诱导产生的各种旺盛的代谢活性及其对环境的适应性，才有可能赋予它以非寄生性特征达到今天的程度。《发酵与微生物》一书的编辑，主要是以这种见解为基础，并从理论和实际两个角度强调了微生物的各种功能。

在当前，发酵这一词汇的涵义极为混乱。尤其在日本，由于那些将发酵现象作直接目标进行研究的人们，过去几乎没有进行有关能量代谢方面的理论性研究，因此通常更加乱用此词。在日本，微生物的应用方面取得了较大成果，这种重应用轻理论的倾向也是这一混乱的原因之一。而在本书标题“发酵与微生物”中所指的发酵，正如在前面所述，意味着非寄生菌所示旺盛的代谢活性，或意味着其有用性得到发展而旺盛

化了的代谢活性，或者更确切地说，是意味着一般的细胞机能。

在第二次大战后，日本主要借助营养缺陷型或其他人工变异株开发了各种氨基酸及核酸类物质的生产。这不仅为微生物工业开辟了新的领域，而且对微生物生理学方面以及作为证实代谢调节机制方面都具有重要意义。在过去，是直接筛选具有有价值的专一性代谢活性的微生物；但在现在，是利用生物化学以及分子生物学所提供知识，以所确定的要求产物为目标，按着既定计划可以顺利地进行微生物的筛选。换句话说，现在实际上已经可以将微生物的机能按人们的意图自由地调节。此筛选不仅限于单一微生物，而且现阶段已触及到了微生物群体。利用微生物处理废水以及瘤胃发酵，即为其第一步对象。这一工作是将目前以单菌为主的微生物培养提高到混合培养的高度上去的一种尝试，因而人们正寄予它以很大期望。

日本的应用微生物学，主要是以化学为基础发展起来的，但通过开发上述各种新领域，使其发展到了如今的日新月异之状态。现在所归纳三卷本“发酵与微生物”，预计还会出更多的续卷。如果这种归纳，作为一种基础，能为日本的应用微生物学的更大发展起些作用，那对编者将是很大的鼓舞。

植村定治郎

相田 浩

1970年8月

目 录

I. 石油资源与微生物	1
(一) 一般研究方法	3
1. 菌株的分离	3
2. 菌的培养	4
3. 菌的变异	6
(二) 石油的微生物利用	7
1. 利用链状烃的微生物	7
2. 链状烃的代谢	13
3. 环状烃的代谢	23
4. 菌体蛋白质的生产	39
5. 氨基酸的生产	44
6. 脂肪酸、脂肪、蜡等的生产	48
7. 多糖类、糖类的生成	54
8. 核酸类物质的生成	54
9. 维生素、辅酶的生成	56
(三) 石油二次制品的微生物利用	60
1. 醇和二醇类的利用	60
2. 有机酸	69
3. 不饱和化合物	73
4. 羰基化合物	75
II. 无机物与微生物	88
(一) 无机营养与微生物	88
1. 无机营养微生物在分类上的地位	89
2. 无机营养微生物的能量代谢	95
3. 无机营养微生物在自然界的作用	101

(二) 细菌浸出	108
1. 细菌浸出概要	108
2. 参与浸出的微生物	109
3. 微生物浸出原理	113
4. 对象矿石与浸出方法	115
5. 回收铜的方法	120
6. 实施例子	127
7. 研究概要	130
8. 细菌浸出的存在问题	136
9. 铜以外金属的细菌浸出	141
III. 废水处理与微生物	145
(一) 处理废水的微生物	145
1. 生物学处理法	145
2. 处理废水的微生物	155
3. 菌胶团的形成与膨胀现象	166
(二) 废水处理法	182
1. 甲烷发酵法	183
2. 活性污泥法	197
IV. 瘤胃发酵与微生物	218
(一) 瘤胃及其主要的内部环境要素	219
1. 瘤胃的构造和机能	219
2. 瘤胃内的环境要素	220
3. 瘤胃内的环境要素与外来菌的关系	222
(二) 瘤胃内存生的微生物	226
1. 瘤胃内的细菌	228
2. 瘤胃内的原生动物	268
3. 瘤胃内的噬菌体	283
4. 原生动物与细菌的关系	283
(三) 瘤胃发酵系的解析方法	285
1. 总发酵能力的测定法	286

2. 利用特定代谢能力的解析法	289
3. 人工瘤胃的技术方法	292
(四) 结束语	313
索引	324
缩写字索引	331

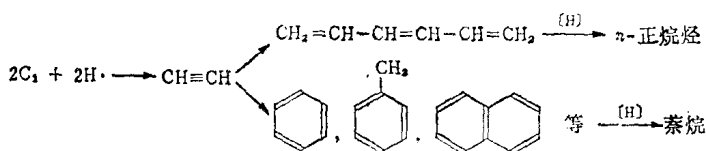
I. 石油资源与微生物

1895 年,日本三好博士观察到叫做葡萄孢霉的微生物分解利用石油的事实。其后又有很多的石油分解菌被陆续发现,至 1950 年知道利用石油的微生物已达 100 种以上¹⁾。但把石油作为微生物工业原料的积极的想法乃是较近的事情,在预计将来粮食可能发生危机的背景下,于 1960 年间,这方面的研究工作更加开始活跃起来。欧美由石油、天然气生产菌体蛋白质,日本由石油和石油化学制品生产氨基酸等的研究极为热烈。

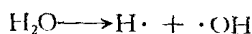
就石油资源而言,不仅包括石油的各组分、各馏分,也包括以化学方法从石油演变来的种种廉价的有机化合物。历来对各种微生物所进行的物质代谢的研究,大部分是考察植物体及动物体既有成分的变化,关于石油及石油相关物质的物质代谢的研究,是近期以来才开始的,它的出发点与借助微生物利用石油资源的应用研究有关。已知对石油及石油化学制品起作用的微生物的种类很多,其产物也未必仅限于用作食粮,考虑石油也是广泛的微生物工业的原料,相信这样的未开拓的科学领域,在其基础研究与应用研究的相互结合下定将得到发展。

把石油作为微生物工业原料考虑时,必须预料到将来石油资源不会因消费而枯竭。现在一般说来,世界的石油埋藏量是 620 亿千升,全世界一年的消费量约 20 亿千升²⁾。若按这个比例计算,约 30 年就会耗完,但在实际上,推定的埋藏量每年都在增加。

另一方面，也有现在石油在地下继续生成的学说。已往关于石油是由动植物或微生物的遗体于嫌气条件下慢慢分解生成的学说，一般是可以置信的。但是从生物产生的脂肪酸生成石油设想，因生物脂肪酸是偶数碳，若是从此放出二氧化碳而成为正烷烃（正石蜡）的话，那么正烷烃必然是奇数碳。但是石油中的正烷烃并不限于是奇数碳，也不限于偶数碳，由此推想，石油的生成与生物并没有关系。现在在没有生物化石的地方也有石油正在出产，这就表明就是现在在地下也有石油正在生成的事实。于是，最近堤教授提出了石油的无机成因学说³⁾：即从地壳中的金属的碳酸盐生成碳酸气，此气体在地下的高温、高压下变成激发态碳（Hot carbon），继之激发态碳与氢的自由基起如下的反应：



又，利用激发态碳生成的二碳至六碳化合物与氢的自由基进行反应生成二碳至六碳的正烷烃，此时的氢的自由基的供给源是水。



现在由于有机合成化学及其它学科的发展，从石油及其它物质合成了无数的有机化合物，其中很多化合物似乎是与生物没有关系的物质。仅借助于人的智慧所合成的物质考虑于地球内部的高温高压下也有微量合成的可能性。并且认为，这些似乎与生物无关的各种有机化合物周围自古以来就环绕着的微生物，不能不考虑它们对这些物质具有各种代谢活性。

今后将越发挖掘出微生物对石油及由石油衍生的种种有机化合物的潜在作用能力，并随着对我们生活方面表现出的作用，认为也终将形成新的学科领域。

（一）一般研究方法

将石油资源通过微生物加以应用的时候，首先要考虑的是用什么方法能分离到适合于目的的特殊微生物及作为其目的的菌种在自然界是否存在；第二点，就是要对分离的菌种创造适宜的培养条件与菌体反应条件，以使有效的产物能大量蓄积；第三点，是要把分离的菌种通过变异以获得有用的变异菌株。以上这些问题必须逐步地予以解决。为使研究得到发展，还必须使微生物的分离、分类方面，微生物的生理、生化方面，微生物的遗传、遗传生化方面，以及发酵工学方面的知识互相紧密的联系起来。作为应用生物学则要进行综合性的研究。为了实现这样的目的，把迄今已形成体系的种种知识加以整理并加以应用，当然是重要的。但从这样的未知的学科领域也会有很多不可预料的新的事实产生出来，于是展望具有创造性的研究工作尤其是重要的，由此在生物学、遗传学、生理学、生物化学等领域也会产生出很多新的有意义的问题。

1. 菌株的分离

通常是按不同目的以石油资源的各种化合物作为唯一碳源的培养基用作菌种分离，而培养基中各个化合物使用多大浓度是个重要的问题。作为筛选分离菌种的方法，大致分为两种^①：其一是在最初不给予严密的条件，尽可能分离到广泛

的纯菌株,先通过简单的定性反应,再逐步通过复杂的定量反应从中筛选出作为目的的菌株;其二是最初就给以特殊的培养基与培养条件,仅让作为目的的菌株得以增殖的方法,尽可能把只成为目的的菌株,或有时只将其最适菌株的一株纯化分离的方法。菌种的筛选是最重要的,考虑通过对自然的复杂结构作忠实观察的人的努力和以独创性的有效方法进行工作是能够发现有意义的菌种的。

从烃、乙醇、醋酸等分离大量产生菌体的微生物是比较容易的,但真正作为工业生产用的优秀菌株的获得还不那么容易。作用于各种特殊的化合物,产生特殊的或有效产物的有意义的菌种的获得,不可仅认为是偶然的,也不可认为只要付出劳力就可以成功的,研究者根据各自的独立思考和用不同的方法,便能够把固有的微生物发掘出来,研究工作者的技巧和干劲就在于此。

2. 菌 的 培 养

以石油类化合物作碳源培养微生物的时候,同以碳水化合物作碳源的场合有很多相同的方面,但对于石油作碳源的场合要新创造特殊的培养条件与方法也是重要的。(1)必须考虑到单单是借助于碳源的变更而使产物收率显著提高的事实。柠檬酸生产中从葡萄糖更换为正石蜡使收率提高就是一例,与其相反,象琥珀酰葡聚糖的生产中,把乙二醇更换为葡萄糖时,收率增高的例子也是有的。(2)通过对培养液的 pH 的调节也屡屡看到产量增高的事实,在此注意考虑碳源与氮源的种类很重要。(3)在维生素 B₁ 缺乏的条件下,发现由正烷烃产生谷氨酸,使用各种维生素缺陷型菌株,在限制维生素的培养基中,通过特殊酶的缺损来改变代谢方向,可以使产物

多量生成,对此今后也可能有更多的方法。(4)考虑利用青霉素、氯霉素等抗菌素对代谢的影响或是利用丙烯酸等类对特殊代谢的抑制作用,在培养过程中加入这些物质以得到特殊产物的方法。例如从正烷烃或醋酸生产谷氨酸时加入青霉素,产酸效果大为提高。(5)对虽然不能作唯一的碳源,但它是能被氧化的物质时,可在培养基中使用廉价的烷烃作碳源,并加入基质使进行所谓的辅氧化作用。例如在加入正烷烃的同时,加入对-伞花烃,对-伞花烃被氧化得到枯酸的尝试等。(6)把也能成为唯一碳源的物质进一步良好化,例如使之与葡萄糖共存,将其发酵变得更为有效的方法也被尝试了。有用葡萄糖与醋酸共存和葡萄糖与反丁烯二酸共存得到谷氨酸的方法。(7)把与生产物相关的物质,有时把认为是前体的物质与碳源同时添加,借此提高收率。例如加入 α -氨基丁酸,提高异亮氨酸的收率,添加煤油提高类胡萝卜素和生物素的收率,又如加入吲哚和邻氨基苯甲酸提高色氨酸的收率的研究都作过了。(8)与葡萄糖作碳源的场合不同,石油化学制品浓度高的时候会导致生长的抑制,因此,一般在培养中采用徐徐的添加或流加(Feeding)的方法。乙醇、醋酸、赤藓糖醇、辛二酸等作碳源的场合,皆采用这种方法。(9)由于发酵产物对菌的生长和代谢活性有抑制作用,因此借助于透析培养把代谢产物除去,如产物系酸性物质时,可于培养液中加入离子交换树脂使之去除。(10)在使用正烷烃混合物那样的不单一物质时,采用对所用基质具有不同特异性的适当的两个菌株混合培养也被进行了。一种菌不能生长而若两种菌混合就能生长时,也采用混合培养。今后将会有更新的培养方法被研究者所创造。

3. 菌 的 变 异

利用碳水化合物发酵氨基酸的场合，采用很多氨基酸缺陷型菌株进行了各种氨基酸生产的研究。以正烷烃和醋酸作碳源的时候，也出现同样的情况，并得到了种种的变异株。正如从季戊四醇生成三羟基甲基醋酸时使用变异株那样，需要使某代谢途径的某种酶缺损，以使此酶作用的物质得以积累。变异菌株在培养或保存中偶而得到的情况也有。如酸性多糖琥珀酰葡聚糖的生产菌失去了琥珀酰葡聚糖的生成能力而变成生产中性多糖（Curdian）的变异菌株就是偶然的从保存中得到的。另外，还有获得变异株的特殊方法，如从萘多量生成水杨酸的变异株，是于含有萘的固体培养基上的菌落处搁置浸有硝酸铁的滤纸片检出的。原田把这种使用试纸的方法叫做滤纸试纸法。但生产种类繁多的代谢产物与酶等的场合，不仅变异株，就是一般的菌也可使用这个方法。

通常的变异菌株都是特殊的基因被破坏，与这个基因相关连的酶不能生成。但是似乎也得到了某酶的基质特异性改变的菌株。例如，已知用乙酰胺作为唯一的碳源能够生长，而在丁酰胺作为唯一碳源的培养基中不能生长的一株铜绿色假单胞菌，在变异后能利用丁酰胺进行生长。又如把大肠杆菌培养于戊二酸作碳源的培养基时，创造了组成性的生成 α -羟基戊二酸合成酶的变异株，这也是一个奇妙的例子。今后也还会得到意想之外的变异株。

以上分别简单地说明了菌株的分离、培养与变异，但也必须要综合考虑这三方面的相互关系并加以研究。既要估计到一开始就可能发现优秀的菌株，也必须考虑通过对菌的特殊培养和特殊变异菌株的发现，选出优秀菌株。很多的有意义

的例子分别被研究者得到了,并积累了丰富的经验,但尚未开拓的方面还很多,今后也将陆续产生出一些独创性的研究,逐渐使研究方法系统化。

(二) 石油的微生物利用

1. 利用链状烃的微生物

利用链状烃的微生物在油井、炼油厂、汽油贮池等附近的油浸土壤中是很多的,但是,在一般的土壤中也颇广泛的分布着。利用链状烃的很多微生物也能利用碳水化合物,其中也有仅能利用特殊烃的菌种,现在知道的很多利用链状烃的微生物不需要生长因子,在仅含有烃和无机物的培养基中即能生长。其中也知道有要求蛋氨酸或要求半胱氨酸与甘氨酸的嗜麦芽糖假单胞菌⁷⁾及要求维生素 B₁ 的裂烃棒杆菌⁸⁾等。但是要求种种的氨基酸或维生素的乳酸菌中还没有发现利用烃的菌。

(1) 细菌

假单胞菌 (*Pseudomonas*): 其中最具有特征的菌种是甲烷假单胞菌 (*P. methanica*)^{7,8)}, 最初把它叫做甲烷单毛杆菌 (*Methanomonas methanica*), 它是介于仅利用无机物便能生长的所谓自养细菌和必须要有有机物的所谓异养细菌中间位置的细菌。它能氧化甲烷, 并以其能量同化氧化生成物二氧化碳, 此菌本为淡红色, 但其变异株看到的有黄色、褐色和无色的类型。其生物化学特性由 Quayle 等进行了详细的研究。此菌不能把甲烷、甲醇以外的物质作唯一碳源利用。但具有在甲烷共存下能够利用葡萄糖或氨基酸等物质的有意义的性

质。在甲烷中生长的菌体，以甲醇、甲醛、甲酸诱导 20 分钟后，也能使之氧化。

已知能够利用庚烷的假单胞菌⁹⁾可组成性的生成庚烷脱氢酶，*P. stutzeri* 菌株不经诱导期即能氧化烷烃。Eykh¹⁰⁾ 等发现铜绿色假单胞菌 473 (*P. aeruginosa* 473) 菌株的烷烃氧化酶的诱导性生成，可因葡萄糖与琥珀酸的存在而发生阻遏，但丙二酸能为其生长所利用，并不阻遏对氧化酶的诱导性。醋酸也能使氧化酶的生成受阻遏，但指出这可能是“终产物效应”所造成。于是以含有丙二酸盐 ($5 \times 10^{-3}M$) 与种种化合物 ($5 \times 10^{-3}M$) 的培养基对各种化合物的诱导能力进行了调查。五碳至八碳的正烷烃由于作为唯一碳源被利用，因此也发生了氧化和能引起诱导。另外，不能作唯一碳源被利用的正丁烷却有极好的诱导作用。将不能为生长所利用但可作为诱导剂的物质，按其作用力大小排列，有二甲基甲烷、二环丙基甲烷、二环丙基甲醇、1,2-二环丙基乙烷、环丙烷。大山等¹¹⁾研究了环烷的细菌氧化，结果指出不能供作生长的三至八碳的环式化合物完全被氧化，但仅有环丙烷被切断。与此相反，Eykh 等发现在假单胞菌中有诱导能力的物质却是环丙烷，这是很有趣味的。

Coon 等使用食油假单胞菌 (*P. oleovorans*) 的近似菌株¹²⁾，在七至九碳的正烷烃中生长良好，在五碳的正烷烃中生长弱，此氧化酶系是诱导生成的。山田等使用的铜绿色假单胞菌类似菌¹³⁾，据说对十二碳以上的正烷烃能随着碳素数目的增加，伴以很好的利用，尤以正廿二烷和正十八烷最好。还分离了对正十六烷¹⁴⁾、正十八烷¹⁵⁾ 及三至十六碳的正烷烃能较好利用的假单胞菌。很早就知道，在天然气渗漏的土壤中含氮量比通常的土壤显著的增大。根据这一有趣的现象，Cory 等将甲烷与空气通过玻璃柱装的土壤，一年间含氮量增加 3 倍，以

后分离纯化了能够氧化甲烷且能固定空气中氮素的细菌甲烷硝化假单胞菌¹⁶⁾。进一步分离了 *P. nitroreducens*, *P. desmolytica*, *P. maltophila* 等⁵⁾, 证明在假单胞菌中能利用链状烃者很多。据说某假单胞菌接种于通常培养基时, 氧化烃的能力即完全丧失, 但未作详细的研究。

固氮菌: 作为能够同化空气中的氮素的细菌, 很早就知道有固氮菌。但是食油固氮菌¹⁷⁾能利用十四烷作为唯一的碳源。

小球菌 (*Micrococcus*): 用石蜡小球菌 (*M. paraffinae*)¹⁸⁾ 作了很多的研究, 八碳至十八碳的正烷烃能很好的被利用, 而仅有癸烷不能很好被利用。据称其理由在于癸烷外侧末端的甲基呈环状构造, 此石蜡小球菌即是在通常的培养基中也能生长, 它的烃氧化酶系是以组成性地生成。还知道在以十六烷作唯一碳源的培养基中分离了 *M. cerificans*¹⁹⁾。

棒杆菌 (*Corynebacterium*): 此菌的特征是菌体呈两两并列的状态。分离的能够利用丙烷作为唯一碳源的棒杆菌 7EIC²⁰⁾, 能很好利用八碳至十八碳, 尤其是十碳至十六碳的正烷烃, 但不能利用甲烷和乙烷, 各种糖类与柠檬酸、琥珀酸, 以及种种的高级醇、脂肪酸也能作为碳源被利用。椎尾等²¹⁾报告指出, 保存菌株中的棒杆菌的大部分都能利用煤油。饭塚等从石油地带的土壤中分离了数量众多的裂烃棒杆菌 (*C. hydrocarbonoclasticus*)。此菌不运动、呈浅粉红色, 能利用十碳至十六碳的正烷烃, 但不利用八碳以下的正烷烃。山田等分离的谷氨酸产生菌也属于此种菌⁶⁾。此外, 嗜石油棒杆菌 (*C. petrophilum*)²²⁾ 也能形成谷氨酸。

短杆菌 (*Brevibacterium*): 此菌和棒杆菌很类似。解脂短杆菌 (*B. lipolyticum*)⁵⁾ 能利用十碳至十六碳正烷烃, 不利用正辛烷。*B. acetylicum* (解醋短杆菌), *B. fulvum*, *B. quale*²¹⁾