



微生物

资料汇编

第六集

中国科学院微生物研究所编

科学出版社

微 生 物

资 料 汇 编

第 六 集

中国科学院微生物研究所汇编

(内部资料·注意保存)

科 学 出 版 社

1972

内 容 简 介

《微生物》资料汇编第六集收集了十二篇科学实验报告,内容有:石油发酵酵母的鉴定、微生物对烃类氧化的研究、微生物对石油的发酵脱蜡、固相5'-磷酸二酯酶、分子筛层析法生产5'-单核苷酸注射液、酵母菌与合成甾体激素的旋光性以及从酵母提取凝血质、麦角固醇、卵磷脂、酵母海藻糖、多种氨基酸和辅酶甲等。此外,还简要报道了在啤酒生产中应用淀粉酶和用豆渣生产糖化菌粉。并且还介绍了水不溶酶——固相酶的有关制备和应用。

本书可供从事微生物研究的科技工作者、有关石油发酵和制药方面的工人、干部以及微生物专业的师生参考。

《微生物》资料汇编 第六集

(只限国内发行)

科学出版社出版

北京朝内大街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

*

1972年12月第一版

1972年12月第一次印刷

定价: 0.40 元

目 录

石油发酵酵母菌的鉴定.....	中国科学院微生物研究所四室	(1)
	杭 州 炼 油 厂	

微生物对烃类氧化的研究

I. 分枝杆菌 A-3 对石蜡油的发酵	中国科学院上海有机化学研究所	(17)
---------------------------	----------------	--------

微生物对烃类氧化的研究

II. 分枝杆菌 A-3 氧化石蜡油的产物——有机酸 的分离与鉴定.....	中国科学院上海有机化学研究所	(27)
---	----------------	--------

微生物对烃类氧化的研究

III. 不同链烃碳源对分枝杆菌 A-3 体内脂肪酸 组成的影响.....	中国科学院上海有机化学研究所	(35)
--	----------------	--------

石油脱蜡酵母的筛选与鉴定.....

.....	中国科学院上海有机化学研究所	(43)
-------	----------------	--------

影响热带假丝酵母 Y-308 生长和发酵的几种因素

.....	中国科学院上海有机化学研究所	(53)
-------	----------------	--------

热带假丝酵母 Y-308 对大庆原油馏分的脱蜡发酵

.....	中国科学院上海有机化学研究所	(61)
-------	----------------	--------

固相 5'-磷酸二酯酶及其应用的研究

.....	中国科学院上海生物化学研究所	(70)
	上 海 啤 酒 厂	

- 葡聚糖凝胶(分子筛)层析法生产 5'-单核苷酸注射液.....上海啤酒厂 (85)
中国科学院上海生物化学研究所
- 酵母菌与合成甾体激素的旋光性.....中国科学院微生物研究所真菌组 (99)
北京制药厂实验车间
- 凝血质、麦角固醇、卵磷脂、酵母海藻糖和多种氨基酸的制取.....上海酵母厂 (110)
- 从酵母提取辅酶甲.....上海酵母厂 (123)

简 讯

- 在啤酒生产中淀粉酶的应用..... (132)
- 利用豆渣生产糖化菌粉..... (137)

资料综述

- 水不溶酶——固相酶.....中国科学院上海生物化学研究所 (139)

微生物学知识

- 微生物诱变育种的基本原理与方法.....中山大学生物系 李宝健 (151)

石油发酵酵母菌的鉴定

中国科学院微生物研究所西室

杭州炼油厂*

摘 要

鉴定了一些工厂及研究单位使用的石油酵母菌，分别定为两个属六个种。其主要特征如下：

1. 解脂假丝酵母 只芽殖，胨化牛奶，不发酵，只同化葡萄糖。

2. 链孢假丝酵母 只芽殖，不胨化牛奶，不发酵，只同化葡萄糖及半乳糖。

3. 热带假丝酵母 只芽殖，不胨化牛奶，发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖及麦芽糖；同化可溶性淀粉；不同化棉子糖、菊糖。

4. 季也蒙假丝酵母 只芽殖，不胨化牛奶，发酵葡萄糖、蔗糖；不发酵麦芽糖。同化棉子糖、菊糖；不同化可溶性淀粉。

5. 皮状丝孢酵母 生真菌丝及节孢子，有芽殖，同化乳糖。

6. 乳头状丝孢酵母 生真菌丝及节孢子，有芽殖，不同化乳糖。

*杭州炼油厂派人到中国科学院微生物研究所学习参加了部分工作。

前 言

石油发酵酵母菌，就是能利用正烷烃及正烯烃等作为碳源的酵母菌。石油中的其他成分，如芳烃、环烃等一般酵母菌不能利用。所以，脱蜡酵母、石油酵母、柠檬酸酵母、反丁烯二酸酵母、 α -酮戊二酸酵母、琥珀酸酵母、烃代谢酵母等都是些利用正烷烃的酵母菌。

六十年代初，法国人用酵母菌发酵进行石油脱蜡，并生产富有蛋白质及维生素的酵母菌体，引起了世界各国的广泛注意。首先是各菌种保藏单位对酵母菌进行了能否利用烷烃的试验。从中外的研究结果获悉，能利用正烷烃的酵母菌，大致有十四个属^[1]，但是氧化正烷烃强的酵母菌，多归假丝酵母属。

近几年来，我国各有关工厂及研究单位，分离筛选了大批石油酵母。这些酵母多产于有油的处所（动物油、植物油及矿物油）。我们对所获得的工业用菌及可能有生产价值的酵母进行了鉴定。结果大多是假丝酵母，也有丝孢酵母。这与国外的研究结果是一致的。

关于酵母菌的鉴定，从1952年娄德氏（Lodder）等的《酵母菌分类学》出版后，大家基本上都按该书进行鉴定。可是近廿年来研究酵母菌分类及应用的人增加，发现新种、新属以及新的代谢产物甚多。因此，酵母分类所依据的形态特征和生理、生化试验项目，也随之大大增加。这种趋势，在1970年出版娄德氏主编的酵母分类学^[2]一书中有所反映，但其方法颇为繁杂，一般实验室难以应用。我们认为在进行酵母菌鉴定时，最好应用“种群”这个范畴。“种群”以下分为“株型”。一般只定“种群”即可；如有必要时，才进行“株型”的区划，此

法较为简便,易于普及。

鉴定方法

1. 培养基 培养基能影响酵母菌的形态与生理。但在一般情况下酵母菌的细胞形状与大小变化不大,所以它在分类上的价值日益降低,甚至有人已不把细胞形状与大小列为分类的根据。因此,在进行酵母菌鉴定时,培养基的选择不再是重要条件,不必墨守成规,可视具体情况灵活运用。如:有机物培养基可用葡萄糖(2%)、酵母膏(0.5%)、豚(1%)、蒸馏水混合液、麦芽汁、水果汁等;也可用黄豆芽汁或其他蔬菜煮汁(蔬菜二两,加水一斤,煮半小时,过滤得清汁加糖 2—5% 即成)。甚至也能用无毒的青草煮汁代替。另一种常用的是无机物培养基。其成分如下:硫酸铵(或氯化铵、硝酸铵等) 0.5%,磷酸二氢钾 0.1%,硫酸镁 0.05%,不加糖的菜煮汁(含维生素) 0.5—5%,葡萄糖 1—5%,用冷开水配制。

2. 纯化 酵母菌在鉴定前必须先进行纯化。纯化的简单原理是:当液体培养基的 pH 在 3.5—4.0 时,一般细菌难以生长;霉菌则生长适宜并形成菌丝体;而酵母菌能生长但无菌丝体,故能将三者分开。具体做法是,用乳酸或无机酸把杀菌后的有机液体培养基(麦芽汁、加糖豆芽汁等)调 pH 至 3.7 左右。接入待纯化的酵母菌,在 25—30℃ 培养 1—2 天后,若有菌丝即挑出。把酵母菌转接于另一管酸性培养液中,如此移植三、四次,即无细菌和霉菌。再用有机培养基琼脂平板进行分离,即得纯种。

3. 烃的利用 一般石油发酵酵母菌,都能利用烷烃,只需作一简单测验,便可证明。用蔬菜煮汁琼脂斜面加烷烃(C_{10} — C_{20})数滴作碳源,划线接种酵母菌,若能利用烷烃则生长茂

盛,形成宽大的菌落,记录生长情况及菌落颜色。

4. 对油的亲和力 石油发酵酵母菌对烷烃、油类都有亲和力,并能产生乳化剂;而普通酵母菌则无此特性。测定方法是:把油和调至中性的水加入同一大试管中,接入适量的健壮的酵母菌,激烈摇动一定时间后,进行镜检。对油有亲和力的酵母菌,它的细胞附贴于油滴表面;对油无亲和力的酵母菌细胞则均匀散布(图1和2)。

5. 乳化作用 将无碳源的无机物培养液,分装于250毫

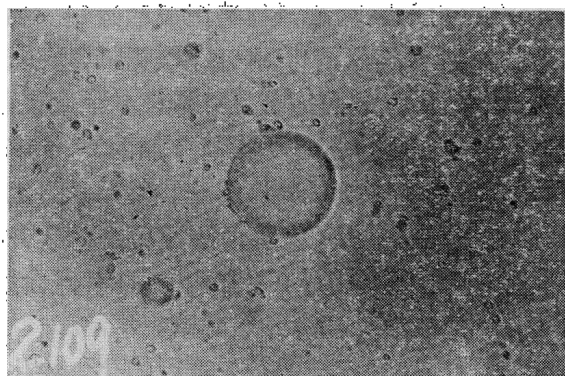


图1 对油无亲和力的酵母菌

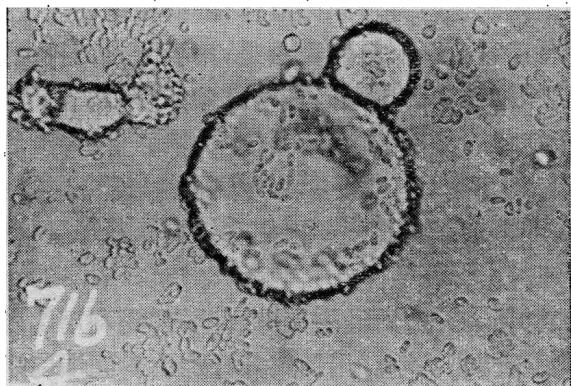


图2 对油有亲和力的酵母菌

升三角瓶中,每瓶20毫升,灭菌后加无菌烷烃(2%)作碳源,接入斜面菌落一管,摇床培养1—2天后取出观察,产生乳化剂的酵母菌,发酵液乳化似牛奶;不产生乳化剂的酵母菌,发酵液透明,油浮在上面。

离心显微观察 将含糖的有机培养液装入试管中,倒放入一个一端封闭一端开口的“杜氏小管”,杀菌后接入酵母菌,在25—30℃静置培养,每天观察:(1)有无酒精发酵,放出CO₂溶于杜氏管中;(2)有无醭膜。培养1—3天进行镜检,记录:(1)细胞形状及大小;(2)无性增殖形式,芽殖或裂殖;或二者都有;(3)有无假菌丝或真菌丝。

7. 子囊孢子 有性生殖在分类上居于首要地位,所以鉴定酵母菌必须查明是否产生子囊孢子。一般说来,酵母菌仅在特殊条件下才生孢子。例如在石膏块上;在用醋酸盐代替葡萄糖的琼脂培养基上;蔬菜或其他汁液的琼脂培养基等。根据这一特点,最简单的方法是把酵母菌接种在灭过菌的胡萝卜条上,培养3天、7天和二周,镜检,看有无子囊孢子以及孢子的形状、文饰等。我们这次所鉴定的石油酵母都不生子囊孢子。

8. 硝酸盐的利用 在有生长素的培养基中,酵母菌都能利用铵盐;必须要氨基酸作氮源的酵母菌极少。但能否利用硝酸盐,在分类上很有价值,所以必须测定。进行此项测定一般用固体培养基,但这种方法不太适用于大多数生假菌丝的石油酵母。我们的经验是用液体法较好。该法用前述无机培养液,以硝酸钾代替硫酸铵。把培养液分装于大试管中,每管15—20毫升。杀菌后接入少量酵母菌,在25—30℃静置或摇床培养(每天摇动1—2次),于2天、4天、一周后取出观察培养液是否混浊,若清而不混,则证明该菌不能利用硝酸盐;若混浊,虽说明菌体生长,但还不能证明该菌是否利用硝酸盐,

还必须进一步试验加以确证。酵母菌利用硝酸盐是先将其还原为亚硝酸盐。所以若测定培养基中有亚硝酸盐的存在，即证明该菌能利用硝酸盐。据此原理，经多次实验，我们认为下述方法简便可靠。于大管酵母培养液中加入少量可溶性淀粉（高粱粒大小），摇匀，加热到透明糊化，冷却，加碘化钾少许（麦粒大小一块），摇动使溶化，再加浓乳酸一滴，摇匀，使 pH 到 2—4。若有亚硝酸盐即生兰色。如不生色，可加少量亚硝酸盐（小米粒大小一块），即生兰色，加以反证。一般书中说加浓硫酸，我们察觉加浓硫酸易出差错。因为，培养液中虽只含有硝酸盐，而没有亚硝酸盐，但若加浓硫酸过量，pH 过低，也会有兰色反应造成错觉。若改用乳酸则无此谬误。

9. 碳化合物的利用 可用生长图形法进行测定。但乙醇、甘油、淀粉、菊糖等，以用液体培养法为妥。方法与前述硝酸盐测定类似。其区别仅是去硝酸盐而改用硫酸铵并加某种碳源。当培养 1—3 天后，观察培养液的混浊度，能利用该碳源者，培养液必十分混浊，如稍混浊者，仍系不能利用。

10. 酒精发酵 糖类的酒精发酵生成乙醇及 CO_2 。酵母菌只有发酵葡萄糖才能发酵其他糖类，而且，只有能利用（同化）的糖，才有发酵该糖的可能，若能同化或发酵葡萄糖，即能同化或发酵甘露糖及果糖，这是一般规律。所以在酵母菌鉴定书刊中，提到葡萄糖时，即包括甘露糖及果糖。利用这些规律，可以减少试验项目，节省人力物力。

前面已提到用麦芽汁杜氏管培养时，若不生 CO_2 的菌，即无酒精发酵作用，也没有必要再进行糖类酒精发酵的测定（因麦芽汁中有葡萄糖）。再有，若经测定，属于不能同化的糖，也不需进行该糖的酒精发酵试验。糖类酒精发酵的测定仍用杜氏小管进行。

11. 牛奶发酵 石蕊牛奶发酵的测定是石油发酵酵母菌

鉴定的重要项目之一。娄德氏1970年版的酵母菌分类一书中未录此项是其缺点之一。进行此项试验的具体方法是：将去脂牛奶杀菌后接入菌种（不加石蕊也行），25—30℃培养，牛奶由上而下逐渐变清，即是胨化所致。

12. 脂肪酶 脂肪水解酶的测定也是石油发酵酵母菌鉴定的重要项目之一。将杀过菌的牛油熔化倾入热的培养皿中，于皿底均匀铺上一薄层，把过多的牛油倾出，冷却，使油凝固，倒入40℃的含有0.1% CaCO_3 的哥姿克娃氏培养基* 18毫升，铺平冷凝，划线接种酵母菌（一皿可接种数个菌）。若该菌能分解油脂，则其菌落周围出现白色的脂肪酸钙沉淀。

13. 需要维生素的测定 用生长图形法测定，相当简便。即用不加菜煮汁的无机物琼脂培养基，接入多量新鲜酵母菌体，充分和匀，倾入培养皿中，做成平板。将无菌的小滤纸片吸湿各维生素液后，贴于培养皿的琼脂培养基上。25—30℃培养一天后观察记录。若纸片周围出现生长圈，即证明需要该种维生素。各种维生素溶液的配制方法如下：称生物素1毫克溶于10毫升蒸馏水中；称肌醇10毫克或其他维生素1毫克，溶于1毫升蒸馏水中，加塞、煮沸灭菌、冷却备用。

其他测定照一般方法进行。

鉴定结果

1. 解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 解脂假丝酵母的主要特征是，蛋白酶、脂肪酶活性较强。我们鉴定的假丝酵母中，只有这种酵母菌能胨化牛奶。它的一般特征是：芽殖、营养细胞为卵形到长形，(3—5) × (5—25)微米，生假菌丝及真

* 成分为：0.1% 葡萄糖，1% 胨，0.5% NaCl ，琼脂2%。

菌丝(图3),生醭膜,菌落无色,皱褶或光滑。无厚膜孢子和子囊孢子。无酒精发酵作用。利用葡萄糖、赤藓醇;不利用半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、菊糖、可溶性淀粉、木糖、肌醇等。不利用硝酸盐;需要维生素 B_1 。胨化牛奶,生油脂酶。有人把能否利用纤维二糖及柳醇等 β 糖苷,将此菌分为二个变种,甚至有人将其定为两个种。我们认为无此必要,可列为株型。

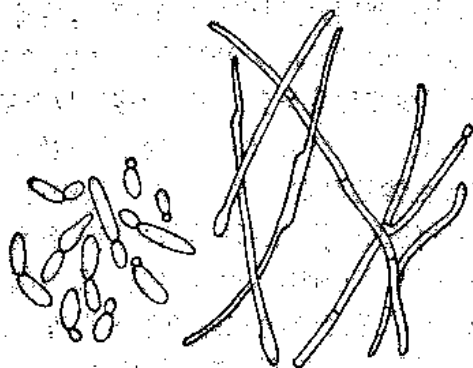


图3 解脂假丝酵母

解脂假丝酵母氧化正烷烃的能力很强,是石油发酵的主要菌种。它形成油脂酶多,我国已用它生产脂肪酶制剂。国外也有用于干酪的生产,并有用它生产蛋白酶制剂的专利^[3]。近来更有人研究用解脂假丝酵母代替有致病性的铜绿色假单孢菌作为塑料霉腐的检验菌;因为解脂假丝酵母是非致病性菌^[4]。由此可见,近十年的研究和应用,已使解脂假丝酵母成为一个主要的工业菌种。

各地工厂应用及研究的石油发酵菌种: 716、C83、E89-2、A5、B-11、B2、B74、营口1号、营口4号、H₁₀等都是解脂假丝酵母。

2. 皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*) 有人把皱褶假丝酵母与解脂假丝酵母列为一群^[5],我们认为有一定道理,因为有

许多特性是一致的。其主要区别仅在于皱褶假丝酵母不陈化牛奶，但利用半乳糖。皱褶假丝酵母的特征是：芽殖、营养细胞卵形到长形， $(3.5-5) \times (5-15)$ 微米，多数生醭。菌落无色，皱褶或光滑，生假菌丝，但无真菌丝（图4）。无厚膜孢子，不生子囊孢子。无酒精发酵作用。利用葡萄糖及半乳糖；不利用蔗糖、麦芽糖、乳糖、菊糖、淀粉、赤藓醇、肌醇等。不利用硝酸盐，需要多种的维生素，几乎所有菌株都需要生物素与泛酸。不陈化牛奶，脂肪酶有或无。

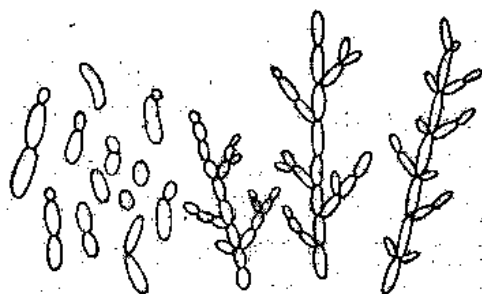


图4 皱褶假丝酵母

各地研究及应用的石油酵母菌： D_1 、 D_3 、 G_2 、 G_3 、 G_5 、至玉1、上1、上5、兰州14号、 C_{20} 、 C_{28} 等，都是皱褶假丝酵母。

3. 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 在石油发酵的酵母菌中，热带假丝酵母的主要特性是，发酵普通的四种糖，而不利用棉子糖。它的一般特征是：芽殖、营养细胞圆或卵形 $(3.5-5) \times (5-9)$ 微米，醭膜有或无。假菌丝发达，有真菌丝，菌落无色。无厚膜孢子和子囊孢子。酒精发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖及麦芽糖。除利用前四种糖外，还利用木糖、可溶性淀粉等。不利用蜜二糖、棉子糖、菊糖、赤藓醇、肌醇等；利用或不利用纤维二糖。不利用硝酸盐。需要多种维生素，但因株型而定。不陈化牛奶，但有的能使牛奶凝固。脂肪酶有或无。

热带假丝酵母是有名的饲料酵母菌种之一^[6]，近来有人^[7]指出，它可作为用石油来生产酵母菌体的生产菌种。另外，日本人已登记专利^[8]用热带假丝酵母的一个突变型来提取大量的核糖核酸。

各地应用和研究的 G1、G6、406、Y017 等，都是热带假丝酵母。

4. 季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii*) 季也蒙假丝酵母与热带假丝酵母的主要区别是，能利用棉子糖、菊糖；但不发酵麦芽糖。它的一般特征是：芽殖、营养细胞圆或卵形， $(3-5) \times (3-7)$ 微米，也有长形。醭有或无，菌落无色，光滑或皱褶。假菌丝发达。无厚膜孢子及子囊孢子。酒精发酵葡萄糖、半乳糖(不或弱)、蔗糖(或弱)；不发酵麦芽糖、乳糖。利用葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、蜜二糖、棉子糖、菊糖、木糖等；不利用乳糖、可溶性淀粉(或弱利用)、赤藓醇、肌醇等。不利用硝酸盐。需要多种维生素，但因株型而异。不胨化牛奶，无脂肪酶。522 号菌等是季也蒙假丝酵母。

5. 皮状丝孢酵母 (*Trychosporon cutaneum*) 这种酵母的主要特征是，菌落霜粉面、真菌丝多、节孢子及芽细胞同时存在。利用乳糖而不利用硝酸盐。它的一般特征是：裂殖，也能芽殖，生真菌丝(图 5)，节孢子多但也有芽殖细胞，节孢子及芽细胞卵形或方形 $(3.5-8) \times (3.5-12)$ 微米。形成厚醭，菌落白霜状。未见厚膜孢子，不生子囊孢子。无酒精发酵作用。利用葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖、蜜二糖、棉子糖、可溶性淀粉、木糖等；不利用菊糖、赤藓醇、肌醇等，不利用硝酸盐。只需维生素 B₁、弱胨化牛奶，生脂肪酶。

G₄ 号酵母菌是皮状丝孢酵母。这种酵母利用烷烃的能力可能不强，但有人研究皮状丝孢酵母能够同化芳烃^[9]。

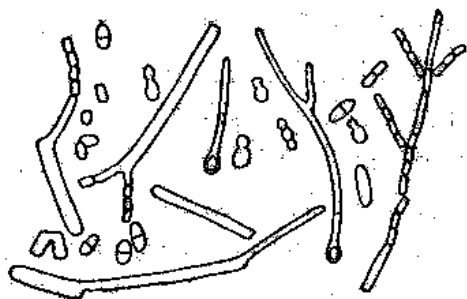


图5 皮状丝孢酵母

6. 乳头状丝孢酵母 (*Trichosporon capitatum*) 这种酵母菌的主要特征是,菌落白绒毛,真菌丝多,节孢子及芽细胞同时存在。只利用葡萄糖及半乳糖,无酒精发酵作用。它的一般特征是:生厚皮状醭膜、生真菌丝裂殖成节孢子(3.7—7) × (7—12) 微米,也能芽殖,芽殖细胞卵形(图6)。菌落白绒毛

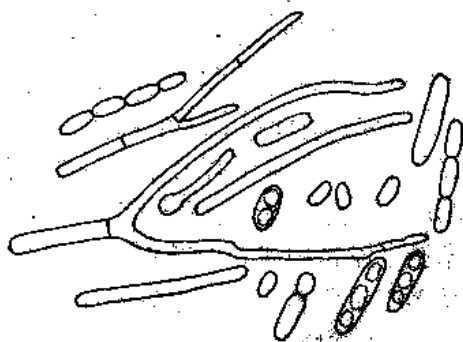


图6 乳头状丝孢酵母

状,很象白地霉。未见子囊孢子,可能有厚膜孢子。无酒精发酵作用。利用葡萄糖、半乳糖、木糖、菊糖等;不利用蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖、蜜二糖、棉子糖、可溶性淀粉、赤藓醇、肌醇等。不利用硝酸盐。不胨化牛奶,生脂肪酶。只需要维生素 B_{10} 。

兰大及 351 工厂的脂肪酶酵母菌是乳头状丝孢酵母。该菌同化烷烃的能力很弱。不生乳化剂或生乳化剂的能力很弱。我们认为它不是石油酵母。与这种酵母类似的菌有发酵丝孢酵母及青霉状丝孢酵母。前者能发酵葡萄糖、半乳糖为酒精；后者菌丝断裂成节孢子后象青霉穗。我们未见青霉穗状的断裂节孢子堆，这个形态特征似不重要。乳头状丝孢酵母与青霉状丝孢酵母很可能是一个种，因其生理上类似。

讨 论

十多年来，国内外的研究和应用，明显地指出，石油发酵酵母菌只限于少数几个种。我们鉴定的这些酵母菌主要集中在三个种：解脂假丝酵母、皱褶假丝酵母、热带假丝酵母。我们认为这种趋势是正常的。

我们所鉴定的六个种，分归两个属：假丝酵母属及丝孢酵母属，主要的还是假丝酵母属，从石油发酵的十四个属酵母菌检索表中（附录一），查出这两个属并不困难。不过丝孢酵母属与地霉属的区别很小，仅限于有无芽殖现象。这里所指的芽殖，当然不是指孢子（节孢子等）的发芽，而是指营养细胞的芽殖。但由于节孢子常常很多，而芽殖的营养细胞很少不易发现。还有人认为^[2]在实验室内长期培养后芽殖营养细胞易退化消失，所以文献中常把丝孢酵母归入地霉属，把两者混为一谈。我们鉴定的两个菌种（G₁ 及兰大 3512）初次观察时，都见到营养细胞的芽殖现象，但最近再观察时，就很难找到芽殖的营养细胞了。我们仍依照第一次的观察结果，定名为丝孢酵母。这样处理是否正确，有待以后大量收集此类菌种并加以详细研究后确定。

几十年的演变证明，生理生化特征越来越显出它在分类