

定向培育同化五碳 糖的高產量的食用酵母菌*

錢 存 柔

方 心 芳

(北京大學生物學系)

(中國科學院菌種保藏委員會)

酵母菌是一種含有豐富營養的微生物，其蛋白質的含量約佔乾重量的 50% 左右，並有多量乙種維生素的複合體。由於它繁殖迅速，沒有嚴格的營養要求，所以有可能在工業上大量生產以供人類的食用或作家畜的補充飼料。前者叫食用酵母，後者叫飼料酵母。實際上除去食用酵母在洗滌排除雜質的過程需要給予更多的注意外，這二種酵母並沒有什麼區別。

食用酵母的大量生產是由於第一次世界大戰時德國由於缺少糧食而迫使找尋其他的代用品所致。第二次大戰時，德國許多發酵生物化學家如 Fink、Lechner、Just 等氏又在酵母的生產原料、化學成分及營養價值等各方面做了很多工作^[1-6]。1929 年日本 Takata 氏曾企圖從黴菌的菌絲體中得到蛋白質^[7]，1934 年 Skinner 氏發現 *Penicillium flavo-glaucum* 的菌絲體中含有多量蛋白質^[8]。1943 年日本山口和夫氏分離出一種同化五碳糖的酵母菌，定名為 *Mycotorula japonica*^[9]，至今仍在日本廣為採用。同年英國的 Thaysen 及 Morris 二人利用樟腦誘致了一種 *Torula utilis* 的巨大細胞的變種^[10]，但因在實踐應用中失去此特性而被放棄。其他在酵母菌生產技術上，如原料的處理、營養的要求、菌種的選擇、培養的條件 (pH、通氣量、去泡沫劑…) 等等均有人作了很多的工作^[11-15]。但將酵母的生產正式作為工業性的生產方式還是在第二次大戰時期。據 Bunker 氏的報告^[16]，德國當時的年產量是 25,000 噸。戰後美國也設廠生產，其他國家也多有專門工廠生產。

食用酵母的原料主要是不能被發酵的五碳糖。自然界中五碳糖的來源很多，如藁桿、稻殼、玉蜀黍穗軸、棉子殼等等所含的多戊糖經酸水解後均能生成五碳糖。此外工廠中的廢液，如木材水解液、酒精發酵後的殘液、造紙廠的亞硫酸廢液等等都是培育食用酵母菌的原料。這些原料不僅價值低廉，而且有些工廠的廢液若不加以處理，還會引起河流的污染。

食用酵母用得最廣泛的菌種是 *Torula utilis*，特點是能同化五碳糖、營養價值高^[17]，適於在木材水解液及亞硫酸廢液中生長。日本多用 *Mycotorula japonica*，蘇聯多用

1957 年 8 月 15 日收到。

* 本工作是在中國科學院菌種保藏委員會進行的。

Candida 屬的菌種等^[18]。

我國具有廣大的農業地區，而工業發展也將隨社會主義的建設逐漸加多。因而我國不僅具有生產食用酵母菌所需的大量原料，同時食用酵母菌對人類的健康及畜牧業、養魚業等各方面的要求也將日益增加。但迄至目前，我國尚少專門生產食用酵母的工廠，這是頗引以為憾的事。

優良的菌種是工業生產的先決條件。我們從已有的菌種中選出生長較佳的菌，根據定向變異的原則並加以適當的人工選擇來進行培育能够同化五碳糖的菌種，目的在於改良菌種的品質，在較短的時間內能獲得較高的產量。在學理上，也提出一些資料來證實定向培育的可能性。

材 料 及 方 法

(一)玉蜀黍穗軸水解液的製備

我們決定採用文獻中所提倡的玉蜀黍穗軸的水解液^[19-22]來試作食用酵母培養的基質。水解時常壓或加壓均可，可視各地的設備條件而定，但以加壓水解較省事。水解液中含還原糖量也較高(同樣條件下水解結果加壓水解者含還原糖3%，常壓水解者含糖2.2%)。

常壓水解時係將風乾後的玉蜀黍穗軸粉碎，用3%硫酸按1(樣品重):7(硫酸重)在沸水浴水解3小時。若為加壓水解則可用等量物質在15磅壓力下水解30分鐘。水解液將殘渣濾過後以CaO及CaCO₃ 1:3的混合物中和至pH 5—5.5。

水解液中的還原糖(按木糖計)用Lane & Eynon氏法以費令液滴定^[23]。用紙上層析法測定水解液中所含糖的性質^[24]。結果知道主要為木糖，其次為阿拉伯糖，六碳糖中只有少量半乳糖存在(圖版I,1)。此結果與Panasyuk 1943年所報告者相似^[21]。

作為培養酵母時所用的水解液係將水解液中的含糖量稀釋至2%，加入0.2%(NH₄)₂SO₄及0.1%KH₂PO₄，pH 5—5.5。若為固體培養基，則另加2%瓊脂。

(二)選種

1. 菌種 從中國科學院菌種保藏委員會所收藏的酵母菌中選了43株菌。其中包括*Candida*屬9株，*Torula*屬14株，*Oidium*屬6株，其他類型的酵母菌14株。各菌培養在玉蜀黍穗軸水解液上選擇生長最好的菌種。菌種的名稱見表1。

2. 劃綫培養比較 所試驗的43株菌首先在含木糖的合成培養基及玉蜀黍穗軸水解液培養基斜面上劃綫培養。在25—28°C下培養三日後，記錄各菌菌落之最寬部分。

合成培養基的成分如下：

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
木糖	2%
20%豆芽汁	1%
瓊脂	2%

劃綫培養比較結果，以*Candida*、*Torula*及*Oidium*等屬的菌生長最佳，*Saccharomyces*屬的數株菌生長均不良。

表1 選種所採用的菌種名稱

菌 號	學 名	菌 號	學 名
2.25	<i>Trichosporum pullulans</i>	2.273	<i>Torula fermentati</i> , Saito
2.67	Lactose fermenting yeast B	2.274	<i>Torula galatosa</i> , Kluyver
2.71	<i>Candida tropicalis</i>	2.275	<i>Torula gelatinosa</i> , Saito
2.77	<i>Candida krusei</i>	2.276	<i>Torula lactosa</i> , Kluyver
2.78	<i>Candida krusei</i>	2.277	<i>Torula minuta</i> , Saito
2.92	<i>Prototheca zopfii</i> , Krüger.(藻)	2.278	<i>Torula rubescens</i> , Saito
2.114	<i>Cryptococcus albidus</i>	2.279	<i>Torula ruba</i> var., Saito
2.119	<i>Saccharomyces formosensis</i>	2.280	<i>Torula rufula</i>
2.120	<i>Candida utilis</i>	2.281	<i>Candida utilis</i>
2.122	<i>Torula</i>	2.282	T. B.
2.123	<i>Oidium lactis</i>	2.303	<i>Hansenula saturnus</i>
2.142	<i>Candida utilis</i>	2.335	<i>Saccharomyces logos</i>
2.164	<i>Candida tropicalis</i>	2.336	<i>Torula</i> sp.
2.165	<i>Torula</i> King	2.337	<i>Torula</i> sp.
2.168	<i>Candida tropicalis</i>	2.360	<i>Oidium lactis</i> , Fresenius
2.178	<i>Saccharomyces rouxii</i>	2.361	<i>Oidium lactis</i> , Fresenius
2.195	<i>Saccharomyces mellis</i>	2.362	<i>Oidium lactis</i>
2.243	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	2.363	<i>Oidium ludwigii</i> , Hansen.
2.247	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2.364	<i>Oidium snaveolens</i> , Krzemecki
2.270	<i>Torulopsis candida</i>	2.365	<i>Oospora lactis</i> , var. <i>parasitica</i>
2.271	<i>Torulopsis candida</i>	2.402	<i>Candida tropicalis</i>
2.272	<i>Torula corallina</i> , Saito		

3. 巨大菌落比較試驗 選擇大小相同、底部平坦的二重皿，將等量(每管 30 毫升)水解液固體培養基溶化後傾入皿內做成平板。將所試驗的菌株分成二組進行比較。一組為 *Oidium* 屬各株菌，在平板中央每皿點植一株，在 25—28°C 培養一週後記錄菌落的直徑(圖版 I, 2)。另一組為其他各株菌，在每一平板上點植三種菌，25—28°C 培養二週後記錄菌落的直徑。結果第一組中以 2.361 及 2.362 的菌落最大。第二組中以 2.25、2.77 及 2.402 等株直徑最大。但詳細觀察生長過程時，發現 2.25 生長緩慢，在第一週時菌落很小。2.77 及 2.402 生長迅速，但 2.77 所生的菌落薄而平坦，2.402 菌落較厚。

從表 4 中結果可以看出，*Oidium* 屬中以 2.361 號菌生長的菌落最大。在其他各株酵母菌中以 2.25、2.77、2.402 及 2.270 號等菌的菌落較大，這與劃綫培養的結果相似。由於巨大菌落是在靜止狀態下生長的結果，且菌落的直徑或面積不能表示菌落的厚度，因而不足真正代表生物量(biomass)積累的情況，為此，我們又由巨大菌落中挑出較好的菌株作搖床振盪培養後所生成的菌體乾重比較試驗。

4. 振盪培養菌體乾重比較 參加振盪培養的菌株除去是在巨大菌落試驗中生長較好的菌株外，尚有一部具有一定經濟價值的紅酵母和魏氏酵母共計 18 株：2.25、2.77、2.402、2.270、2.273、2.272、2.78、2.142、2.281、2.92、2.165、2.275、2.120、2.280、2.276、2.303、2.361 及 2.123。

培養器係採用 250 毫升的三角瓶，每瓶裝玉蜀黍穗軸水解液液體培養基 40 毫升，等

表2 酵母菌劃綫培養的比較

菌 號	合成培養基	水解液培養基	菌 號	合成培養基	水解液培養基
2.25	+++	+	2.273	+++	+++
2.67	±	+	2.274	+	+
2.71	+	++	2.275	±	++
2.77	+	++	2.276	+	+
2.78	+	++	2.277	++	+
2.92	+	+	2.278	+++	+
2.114	+++	+++	2.279	++	++
2.119	+	++	2.280	+++	++
2.120	+++	++	2.281	+++	++
2.122	+	++	2.282	++	+++
2.123	+	++	2.303	+++	++
2.142	+++	+++	2.335	+	++
2.164	+	++	2.336	±	+
2.165	+++	++	2.337	±	+
2.168	+	++	2.360	++	+
2.178	+	++	2.361	+++	+++
2.195	+	+	2.362	+++	+++
2.243	±	+	2.363	±	+
2.247	±	+	2.364	±	+
2.270	+++	++	2.365	++	++
2.271	+	++	2.402	+++	++
2.272	++	+++			

量接種各菌後，放置在每分鐘搖盪 160 次的搖床上培養 40 小時，培養係在 25—28°C 的恆溫室中進行，培養基的 pH 為 5.1。

菌體的乾重係將在搖床上生長 40 小時的菌取下，用已稱重的中科 1 G 5 號玻璃漏斗過濾。爲了過濾順利進行，每瓶加用酒精及乙醚處理過的乾燥活性炭 1 克。沉澱用蒸餾水洗滌，最後用酒精及乙醚各 5 毫升分別各洗一次，在 70°C 烘箱中烘 1 小時正，立刻取出放置乾燥器中冷卻後稱重。以未接種的空白水解液 40 毫升同法處理，所得的重量作爲對照，二者之差即每 40 毫升水解液所生菌體的乾重。結果如表 5 及圖 1。

表 5 指出，*Oidium* 屬中仍以 2.361 最佳，其他酵母菌中則以 2.402 最好，而原在巨大菌落中較 2.402 好的 2.77 及 2.25 則退居到第十二位及第十八位。這一現象可能由於 2.25 生長遲緩，在 40 小時中不能趕上他菌，而 2.77 菌落雖大，但因過於薄而平，實際所積累的生物量不及 2.402 多。

總之，2.402 及 2.361 在各種選種試驗的方式中結果均較突出，可以用來作爲定向培育的對象。2.281 係過去飼料酵母著名的菌種，一併選出以資比較。

(三)定向培育

根據前人經驗，如蘇聯 Л. Г. Логинова^[26] 及我國方心芳等人^[27] 在研究高溫酵母時的結果指明，酵母菌在長期適應於高溫的條件下，逐漸改變了原有的本性。將適應於高溫的酵母菌回復到原來適溫下生長時，酵母菌的增殖率大大加速。利用這一規律，使飼料酵

表 3 酵 母 菌 的 巨 大 菌 落 比 較

菌 號	菌落直徑 (毫米)	面積	序 號	菌 落 特 徵
2.25	17×17	289	18.06	淺褐色,中央突起處有白色的絨毛,無光澤
2.67	5×5	25	1.56	乳白色,略有光澤,邊緣整齊,有同心圈
2.71	5×7	35	2.18	乳白色波浪狀的邊緣,有放射綫
2.77	12×12	144	9	菌落無光澤,中央乳白色,邊緣淺褐色,邊不整齊
2.78	9×9	81	5	與 2.77 相似
2.92	8×8	64	4	灰白色菌落,無光澤,邊緣色較淺,呈大波浪狀
2.114	7×7	49	3.06	菌落光亮,淺褐色,邊緣整齊
2.119	6×6	36	2.25	菌落乳白色,無光澤,邊緣整齊
2.120	6×7	42	2.62	菌落灰白色,微光亮,中央平坦,邊緣整齊
2.122	4×5	20	1.25	菌落淺褐色,無光澤,邊緣白色,整齊
2.142	9×9	81	5	菌落灰白色有光澤,中央平坦,邊緣整齊
2.164	6×6	36	2.25	菌落乳白色,光亮平坦,邊緣整齊
2.165	8×8	64	4	乳白色,中部色較深,略有光亮,邊緣整齊
2.168	6×7	42	2.62	與 2.164 相似
2.178	4×4	16	1	灰白色,微有光,邊緣整齊
2.195	6×6	36	2.25	灰白色,中央平坦光滑,邊緣有小的褶皺
2.243	4×4	16	1	淺褐色,餘與 2.195 相似
2.247	5×5	25	1.56	菌落灰白色,光滑平坦而有光亮,邊緣整齊
2.270	10×10	100	6.25	菌落乳白色,邊緣呈大波浪狀
2.271	7×7	49	3.06	菌落乳白色,光亮平滑,邊緣整齊
2.272	9×10	90	5.6	淺紅色菌落,光滑整齊,生長緩慢
2.273	10×11	110	6.25	菌落乳白色,光滑平坦,邊緣整齊
2.274	4×5	20	1.25	菌落灰褐色,光亮整齊
2.275	7×8	56	3.5	乳白色,光滑平坦,邊略皺,有小波紋
2.276	6×6	36	2.25	淺褐色,光亮平滑
2.277	4×5	20	1.25	淺紅色,不易生長
2.278	5×6	30	1.87	紅色,光亮,表面略皺
2.279	6×6	36	2.25	淺紅色,光亮潤濕,邊緣整齊
2.280	6×7	42	2.62	淺紅色,無光澤,菌落中央有小孔,並有波紋
2.281	8×9	72	4.5	乳白色有光澤,菌落平滑,邊緣整齊
2.303	6×6	36	2.25	白色平坦的菌落,無光澤,邊緣為小波浪狀
2.335	4×5	20	1.25	乳白色光亮平坦的菌落,邊緣整齊
2.336	5×6	30	1.87	乳白色有光亮,中部隆起,邊緣整齊
2.337	4×4	16	1	乳白色,中央平坦,邊緣有波紋
2.402	11×12	132	8.25	灰白色菌落,中央褶皺,邊緣整齊

母有可能在較短的時間內得到更多的菌體。微生物受新環境的影響,個性改變的速度是不一致的。根據作者等^[28]前一報告中所用的方法,即在培育過程中加以適當的人工選擇,連續挑選變異最快的個體定向培育,則將促進變異的速度加快。

培育的方法如下:將選出的 2.402、2.361 及 2.281 三株菌先找出它們生長最適的溫度及生長最高的溫度,然後將各菌分為二組進行培育。始終在適溫培養的一組稱為原始型,作為對照;另一組則經常培育在生長最高的溫度下使適應高溫,稱為適應型。為了比較人工選擇的方法是否能加速變異,本組又採用了二種不同的方法。一種方法是過去所

採用的移植法,即使微生物在高溫的條件下連續不斷的移植和培養在水解液製成的斜面培養基上,為普通適應型。我們所採用的另一種新的方法是加以人工選擇的分離培育法,為分離適應型。把定向培育的酵母菌用水解液培養基在平板上分離培育在高溫,待菌落形成後挑選由變異最快的細胞所長成的最大菌落(圖版 I, 3),移植到水解液的液體培養基中,在高溫培育 24 小時後再行分離培育。如此連續操作,每移種一次算作一代。每隔適當時期測定原始型及適應型的細胞增殖率,在高溫下的死亡率,菌體的乾重,同化糖及同化氮的能力,以及遺傳性改變後穩定的程度等等。

表 4 *Oidium* 屬各菌的菌落比較

菌 號	菌 落 直 徑 (毫米)	面 積	序 號	菌 落 特 徵
2.361	70×70	4900	1	白色疏鬆的絨毛
2.362	62×62	3742	2	白色疏鬆的絨毛
2.360	48×48	2304	3	白色疏鬆的絨毛
2.123	28×30	840	4	菌落邊緣光滑,愈近中央絨毛愈多,中部有乳頭狀突起
2.364	18×19	342	5	白色疏鬆的絨毛
2.363	13×13	169	6	白色疏鬆的絨毛
2.365	4×4	16	7	白色疏鬆的絨毛

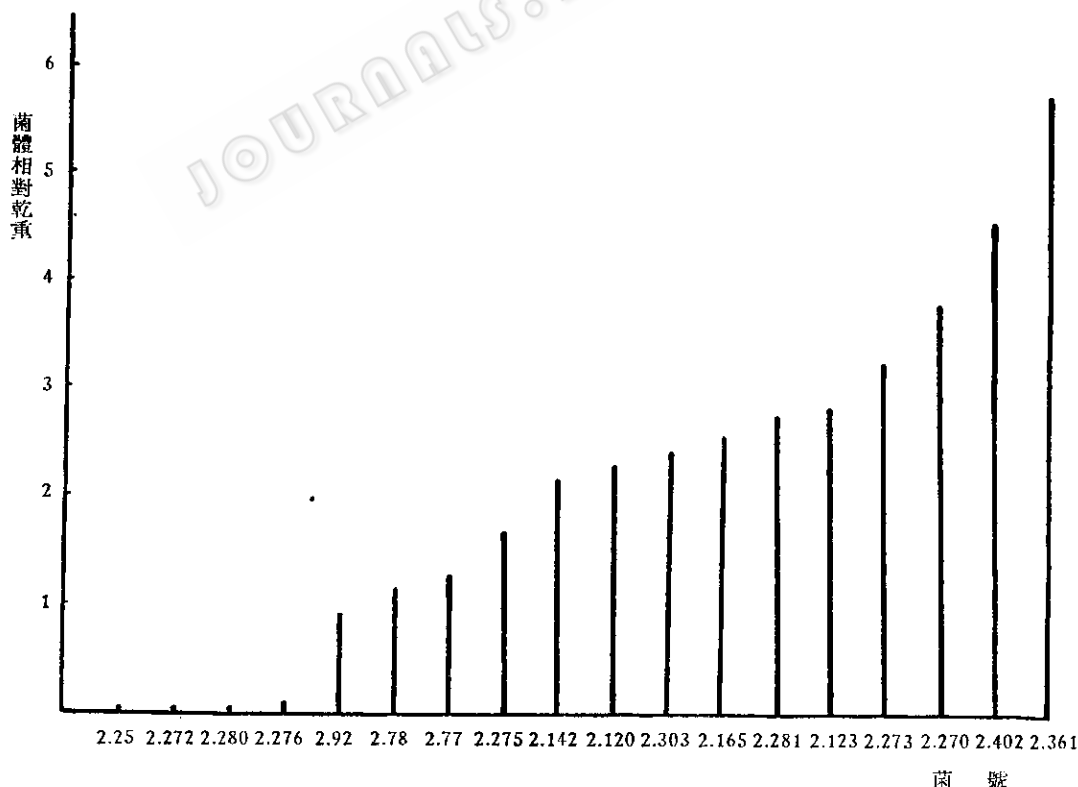


圖 1 振盪培養各種酵母菌的乾重比較

表5 振盪培養酵母菌之乾重

菌 號	毫克乾重/40c.c.	相 對 重	序 號	菌 號	毫克乾重/40c.c.	相 對 重	序 號
2.361	414.6	5.74	1	2.142	159.4	2.20	10
2.402	332.4	4.60	2	2.275	122.7	1.70	11
2.270	278.9	3.86	3	2.77	91.8	1.27	12
2.273	239.5	3.31	4	2.78	86.6	1.20	13
2.123	207.3	2.84	5	2.65	72.2	1.00	14
2.281	202.6	2.81	6	2.276	9.6	0.132	15
2.165	193.6	2.65	7	2.280	3.8	0.052	16
2.303	177.6	2.44	8	2.272	3.1	0.043	17
2.120	168.1	2.30	9	2.25	2.4	0.037	18

表6 適應型及原始型培育的溫度

菌 號	適應型培育的溫度 (°C)	原始型培育的溫度 (°C)
2.402	40	30
2.281	40	30
2.361	35	25

實驗結果及討論

定向培育的工作係自 1956 年 5 月初開始，到 1957 年 6 月底其中 2.402 已經培育 203 代，2.361 為 210 代，2.281 也有 179 代了。在培育過程中，經常注意到適應型和原始型的一些生理特性和形態上變異的情況。結果確實表現了微生物在改變生活條件後，逐漸適應新的環境，並且在一些生理特性上，有時甚至微生物的形態都發生了改變。在適應的過程中，如果用人工選擇變異最快的個體加以移種時，能够更快的看到變異的結果。同時，在培育過程中所獲得的改變了的性質，可以遺傳到後代，但遺傳的穩定性是與微生物在改變了的環境裏所處時間的久暫成比例的。現在將實驗中的一些結果列下：

(一)適應型與原始型在高溫培養時生長情況的比較

適應型在高溫培育時死亡率較原始型為低，在平板上生長的巨大菌落也較大，說明它適應高溫的能力較強。

1. 死亡率 在等量水解液的液體培養基內接種 2.402 (200代) 各型菌的等量細胞，40°C 培養，一定時間後取出用血球計計數，並用 0.01% 亞甲基藍染色。死細胞因脫氫酶失去效用被染成藍色，活細胞無色。由死活細胞的數目，算出在高溫下的死亡率。

2. 巨大菌落 在平板上將兩種適應型菌及原始型菌一同點植，在高溫培養，量取菌落直徑數。結果無論是那一種菌種，適應型的菌落均較原始型大，分離適應型較普通適應型尤大。可見適應型已經在高溫適應，經過人工選擇的適應型對高溫的適應性能更強（圖版 I, 4; 圖版 II, 5, 6）。

(二)適應型與原始型生物量累積速度的比較

1. 細胞增殖的速率 蘇聯 Л. Г. Логинова 及我國方心芳等對高溫酵母試驗的報告

表 7 2.402 (200代) 在 40°C 培養時細胞的死亡率

菌型 每毫升細胞數 培養小時	0 (接種數)	20	44	64
分離適應型				
細胞總數	4×10^6	41.25×10^6	261×10^6	436×10^6
死細胞數			36.5×10^6	92×10^6
死亡率%			13.98	21.10
普通適應型				
細胞總數	4×10^6	39×10^6	243.5×10^6	326×10^6
死細胞數			41×10^6	86×10^6
死亡率%			16.83	26.38
原始型				
細胞總數	4×10^6	37×10^6	199.5×10^6	244×10^6
死細胞數			38.5×10^6	76×10^6
死亡率%			19.29	31.29

表 8 三種酵母菌在高溫培養時的巨大菌落

菌	型	菌落直徑(毫米)	菌落面積(毫米 ²)	培育溫度(°C)
2.361	分離適應型	20×20	400	35
	普通適應型	17×17	289	35
	原始型	13×14	182	35
2.402	分離適應型	21×21	441	40
	普通適應型	19×19	361	40
	原始型	18×18	324	40
2.281	分離適應型	13×13	169	40
	普通適應型	12×12	144	40
	原始型	10×10	100	40

中均指出,若將已適應於高溫的酵母菌回到低溫(即原始型培育的溫度)培育時,細胞增殖率大大加速。但他們所用的是能生子囊孢子的 *Saccharomyces* 屬中的酵母菌。我們在培育食用酵母的菌種時,也就是依據了這一規律。雖然我們培育的三個菌種都是不生子囊孢子的酵母,但也得到了預期的結果,可見高溫型微生物回到低溫培育時增殖率加速是一個相當普遍的事實(表 9, 圖 2)。

由圖 2 看來,在 40 小時之內,分離適應型的增殖率始終較其他二種為快。普通適應型的增殖速度雖不及前者,但也較原始型快,與前人結果相符。

2. 菌體乾重比較 前培養在 50 毫升及 150 毫升的三角瓶中進行培養,最後將各型菌接種等量細胞至大底三角培養瓶內培養。其過程如下:

5 毫升 (50 毫升三角瓶) 培養液 $\xrightarrow{1 \text{ 天}}$ 10 毫升 (150 毫升三角瓶) 培養液 $\xrightarrow{2 \text{ 天}}$ 50 毫升 (大底三角培養瓶) 培養液 $\xrightarrow{3 \text{ 天}}$

培養 2.402 及 2.281 時均在 30°C。培養後的菌液用中科 1G5 號漏斗過濾後稱重,結

表 9 2.402 各型菌在低溫培養時細胞的增殖率

代數及菌型		每毫升百萬數	培養 小時	0	22	40		0	24
2.402 40代	分離適應型	40—30℃		0.88	91.9	151.5	2.402 190代	1.2	363
	普通適應型	40—30℃		0.88	78	120.5		1.2	279.5
	原始型	30—30℃		0.88	57.4	85		1.2	167
	原始型	30—40℃		0.88	27.8	64.5			—

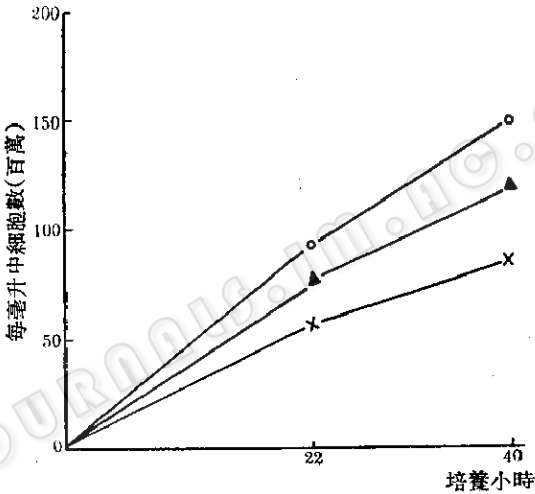


圖 2 2.402 適應型及原始型在低溫培育時細胞的增殖率
○——分離適應型； ▲——普通適應型； ×——原始型。

果折合成每百毫升培養液所生的菌體乾重(表 10)。

表 10 2.402 及 2.281 的各型菌菌體乾重比較

菌 型	菌 體 乾 重	2.402(40代)		2.402(100代)		2.281 (90代)	
		乾重克/100毫升	相對重	乾重克/100毫升	相對重	乾重克/100毫升	相對重
分離適應型		0.7358	162.1	0.4680	174.8	0.7202	153.6
普通適應型		0.6073	133.8	0.3448	128.4	0.6940	148.0
原始型		0.4538	100	0.2676	100	0.4688	100

(三)氮的同化率

食用酵母的主要目的在於利用細胞內的蛋白質。我們對於所選出的三種酵母菌的含氮量,對同一菌種的不同菌型的含氮量和對培養液中氮的同化率均作了測定。

測定氮係採用微量 Conway 擴散法^[29]，蛋白質的量係以全氮 $\times 6.25$ 計。

1. 適應型及原始型的含氮量 將2.402、2.361及2.281三種菌的各型菌用離心機自培養液中分出菌體，以0.35% HCl洗一次，再以蒸餾水洗二次，在105°C烘至恆重，菌體用Conway法測定全氮。測定結果指出，無論是分離適應型或是普通適應型的含氮量，均與原始型沒有什麼差異。2.402號菌的分離適應型含氮量為7.77%，普通適應型為7.79%，原始型為7.92%；2.281號菌分別為7.27%、7.56%、7.90%；2.361號菌為4.53%、4.46%及4.43%。

2. 適應型及原始型對培養液中氮的同化率比較 以2.402號菌為例，若將各型菌的等量細胞接種到一定數量的水解液培養基內，在30°C培養三日後，測定培養液中的殘氮。空白水解液中的含氮量作為對照，則實際同化了的氮與培養基中原有氮量之比乘以100即為氮同化的百分率。結果2.402的分離適應型同化率最高，為69.80%，普通適應型次之，為54.71%，原始型為36.64%。若以原始型為100%計，則分離適應型為190.7，普通適應型為149（表11，圖3）。

表 11 2.402 號菌 100 代的適應型與原始型比較

	菌體乾重 克/100毫 升	含 N 量 %	氮 的 同 化				糖 的 同 化			
			培養基中的 N 毫克/ 100 毫升	殘 N 毫克/100 毫升	同化率	相對比	培 養 基 中的糖克/ 100 毫升	殘糖克 /100毫 升	同化率	相對比
分離適應型	0.4180	7.77	58.32	17.61	69.80	190.7	2.06	1.08	48.15	152
普通適應型	0.3448	7.80	58.32	26.41	54.71	149.0	2.06	1.15	44.17	139
原 始 型	0.2676	7.92	58.32	36.95	36.64	100	2.06	1.41	31.56	100

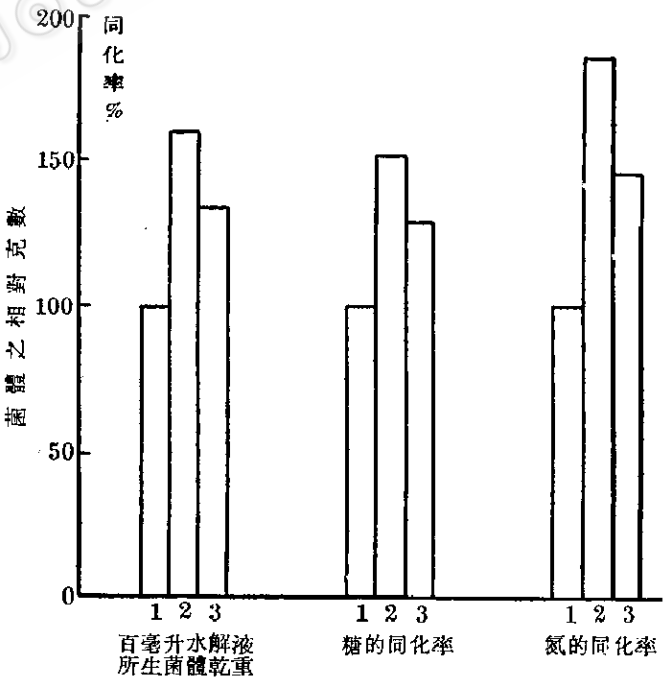


圖 3 2.402 (100 代) 適應型與原始型的比較

1——原始型； 2——分離適應型； 3——普通適應型。

3. 2.402、2.361 及 2.281 三種菌的含氮量比較 將以上三種酵母菌的分離適應型在同一條件下作靜止培養及通氣培養，培養後的菌體測定全氮。結果以 2.281 號菌含氮量最高，2.402 次之，2.361 含氮量最少。通氣培養與靜止培養的菌體在含氮量方面的差異也並不大(表 12)。

通氣培養係在 Kluyver 氏通氣發酵罐內進行，罐之底部為一玻璃濾板。通入空氣用活性碳濾菌，氣體的流量為 1—1.6 立升/1000 毫升培養液/分鐘。

(四)糖的同化率

1. 適應型及原始型對糖同化率的比較 無論用紙上色層分析法或用費令液測定培養液中的殘糖時，結果均顯示了適應型同化糖的能力較原始型強，尤其是分離適應型的能力最強。根據用費令液測定 2.402 各型菌培養液中殘糖的結果，培養液原含糖為 2.06%，分離適應型的殘糖為 1.08%，普通適應型為 1.15%，而原始型為 1.41%。糖的同化率相應為 48.15%、44.17%、31.56%(表 11, 圖 3)。用紙上層析法也有類似的結果(圖版 II, 7)。

2. 適應型、原始型及原始保藏菌種對糖的同化率的比較 適應型比較原始型具有較強同化糖的能力，除去因為適應型在低溫時細胞的增殖率較高，生物量累積的能力較強外，還可能是由於適應型對於水解液的適應力較強所致。為了說明這一可能，更進一步比較了 2.402 分離適應型、原始型及保藏的未經馴養的原始菌種在水解液中以及在木糖合成培養基中作了比較。結果將培養後的水解液用紙上層析法測定，顯示出的色點以保藏的原始菌種最深，原始型次之，分離適應型的色點最淺(圖版 7)。再將以上各菌等量接種到木糖合成培養基中，30°C 24 小時後用血球計計數的結果，分離適應型每毫升有 635.2×10^6 個細胞，原始型為 456×10^6 個，保藏原始種有 313.6×10^6 個。由此可見，微生物長期適應於富含木糖的水解液基質中的結果，顯然比較未經馴養的原種具有較高的同化木糖的能力，而經定向培育後的菌種對木糖的同化率更強。

3. 2.402、2.361 及 2.281 三種菌種在糖的同化率上的比較

(1) 紙上層析法測定水解液中的殘糖，結果顯明地指出 2.281 對水解液中的糖很少利用，殘餘的糖分與對照水解液中的糖分幾乎相等。2.402 號菌及 2.361 號菌都能够充分利用水解液中的糖分，因而在紙譜上幾乎不留殘糖的痕跡(圖版 II, 8)。

(2) 靜止培養後，用費令液滴定培養液中殘糖的結果也是一致的。將 2.402、2.281 及 2.361 三種菌的分離適應型在含 50 毫升水解液的大底三角瓶內分別培養在 30°C 及 25°C，培養液用中科 1G5 號玻璃漏斗過濾，將沉澱在 70°C 烘乾後稱重，折合成每百毫升水解液所生菌體的重量。濾液用費令液滴定，求得各種菌對糖的利用率。結果如表 12 所示，以 2.361 對糖的同化率最高，2.402 次之，2.281 最少。

(3) 通氣培養 2.402、2.361 及 2.281 三種菌的結果，大大提高了 2.402 及 2.281 的糖的利用率，但 2.361 則反而有所降低。由於對通氣量未做詳細的比較，此結果僅可作初步參考。

總結以上結果，在所選出的三種菌種中，以 2.402 在水解液中生長的情況最好。2.361 雖然有較高的利用糖的能力，所生菌體的重量也較多，但因含氮量過低，不合實用。2.281 號的含氮量最高，可惜在此種水解液基質中不能充分生長。所得的菌體量太少，有繼續培養及提高對五碳糖同化率的必要。現將結果綜合後以表 12 及圖 4、5 表示。

表 12 2.402、2.361 及 2.281 三種酵母菌靜止培養和通氣培養的比較

	菌體乾重		菌體含 N量 %	蛋白質量 N×6.25	培養液 含糖量 克/100 毫升	殘糖 克/100 毫升	同化率 %	培養液含百克糖 所生菌的乾重		培養液含百克糖 所生蛋白質之量	
	克/100 毫升	相對比						克	相對比	克	相對比
靜止培養	2.402	0.8840	408.5	5.00	31.28	2.16	0.936	56.66	40.92	408.3	12.51
	2.361	1.5252	704.8	3.23	20.16	2.16	0.198	95.46	70.61	704.6	16.10
	2.281	0.2164	100	8.13	50.83	2.16	2.135	1.11	10.02	100	5.09
通氣培養	2.402	1.6786	233.0	5.27	32.94	1.95	0.307	84.26	86.08	241.1	28.35
	2.361	1.2084	167.7	3.79	23.69	2.02	0.730	63.86	59.82	167.7	14.17
	2.281	0.7204	100	7.47	46.69	2.02	1.710	15.34	35.66	100	16.76

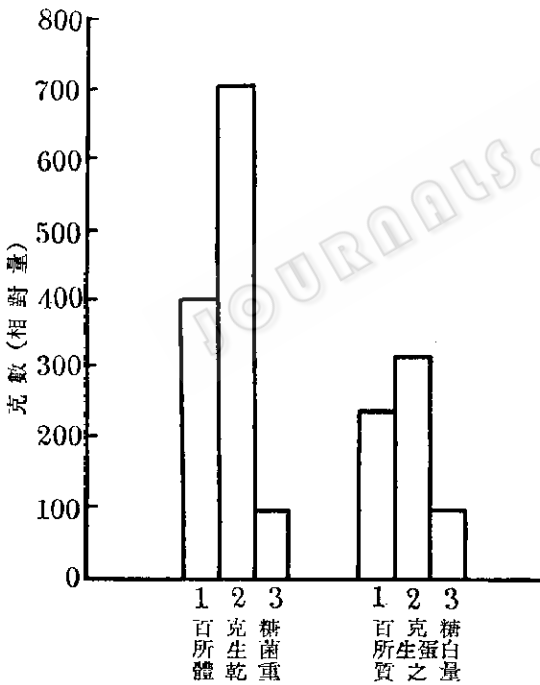


圖 4 靜止培養 2.402、2.361 及 2.281 三種酵母菌的比較
1——2.402； 2——2.361； 3——2.281。

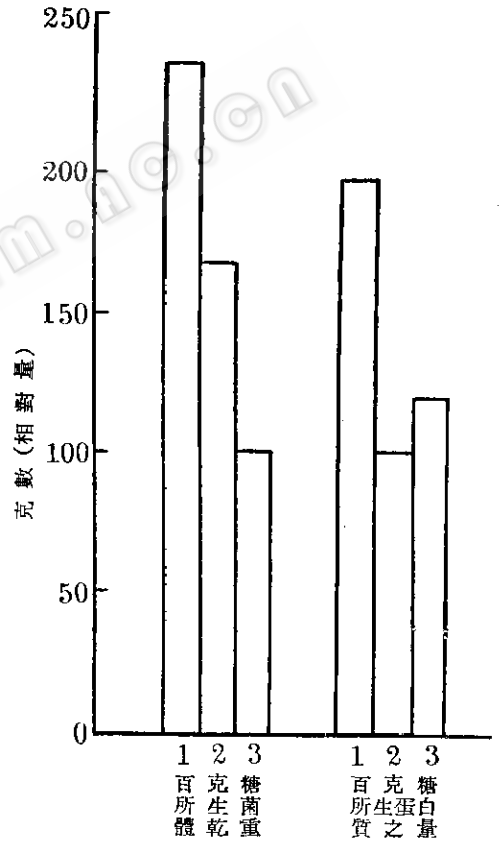


圖 5 通氣培養 2.402、2.361 及 2.281 三種酵母菌的比較
1——2.402； 2——2.361； 3——2.281。

(五)適應型與原始型最適 pH 及呼吸強度比較

很多學者認為高溫型微生物一般具有較快的代謝過程。蘇聯 Мишустин 氏研究各羣嗜熱性微生物時，發現這一羣微生物繁殖速度的加強是與細胞內代謝過程的加速有關。Логинова 氏認為不同的酶對於溫度的敏感度不等，呼吸酶是比較水解酶敏感的^[26]。我

國方心芳等在研究高溫酵母的報告中也指明，適應於高溫的類型比較原始型的呼吸強度為高^[27]。但他們所用的係酒精發酵的菌種，我們採用 2.402 號菌 (*Candida tropicalis*)，是好氣類型的菌來重複這一試驗，以求進一步說明適應於高溫後的類型在細胞繁殖速度加快與呼吸加強的關係。

試驗係採用 Warburg 氏技術^[30]，按湯佩松氏^[31]關於酵母菌呼吸的工作進行。

1. 2.402 適應型及原始型的最適 pH。

菌種：2.402 的分離適應型，普通適應型及原始型在水解液斜面生長 24 小時的菌。

材料：Sorensen 磷酸鹽緩衝液 pH 4.5、5、5.4、5.7、6.4 及 7.1 六種。

實驗條件：溫度 30°C，振幅 4 厘米，振速 70 次/分鐘。中央小槽加濾紙片，加 20% KOH 0.3 毫升，反應瓶內加菌懸浮液 2 毫升（共含 60×10^6 個細胞），20% 木糖溶液 0.2 毫升。

結果如表 13。可以看出適應型與原始型的最適 pH 差異不大，前者為 pH 5.7，後者為 pH 5.4。

表 13 2.402 適應型及原始型在 30°C 時生長最適 pH (Q_{O_2} 以 $\mu l O_2 / 10^6$ 細胞/小時表示)

Q_{O_2} \ pH	4.5	5	5.4	5.7	6.4	7.1
菌 型						
分 離 適 應 型	1.932	—	2.329	2.579	2.310	2.014
普 通 適 應 型	2.212	2.764	3.144	3.262	3.225	2.618
原 始 型	2.614	3.044	3.330	3.288	3.130	2.805

2. 2.402 適應型與原始型在 30°C 及 40°C 時的呼吸 實驗時分離適應型及普通適應型均用 pH 5.7 的磷酸鹽緩衝液，原始型用 pH 5.4 的磷酸鹽緩衝液，溫度為 30°C 及 40°C，其餘條件均同上。

試驗結果可以看出，無論那一種菌型在 40°C 時呼吸的 Q_{O_2} 值均較在 30°C 大，說明在高溫時微生物呼吸加強。從不同的菌型來看，經常在高溫培育的適應型呼吸較原始型強，特別是分離適應型在 40°C 時上升的趨勢更為明顯。這也說明由於生活環境改變而使生理活動加強(表 14，圖 6)。

表 14 2.402 在 30°C 及在 40°C 時之呼吸情況

Q_{O_2} \ 溫度	30°C		40°C	
	I	II	I	II
分 離 適 應 型	2.464	2.665	3.075	4.122
普 通 適 應 型	2.096	2.400	2.805	3.355
原 始 型	1.665	1.642	2.773	2.360

(六)適應型在形態上的變異

根據上述各項試驗結果看來，微生物在改變生活環境後，由於長期適應的結果，在生

理特性上已引起一系列的變化。不僅如此,在培育的過程中也觀察到一些形態上的改變,但各個菌種在形態上的改變程度是不等的。我們初步觀察,2.402 號菌無論是在斜面培養或液體培養,在菌苔的特徵上以及細胞的形態上改變均較顯著。2.361 號菌在斜面培養

時菌落的形狀差異很大,然而細胞形態則未發現什麼變化。至於 2.281 號菌形態上全都沒有改變。

1. 2.402 號菌(180 代)形態的變異

(1) 水解液斜面菌苔的特徵 將 2.402 的分離適應型在斜面上劃綫接種,40°C 培養時,菌落比較光滑,用接種針易於將細胞挑起。原始型在 30°C 培養時,生成的菌落乾燥,並似皮膜狀,用接種針很不易將細胞挑起。普通適應型菌落特性介乎二者之間。如將長好的菌落放置室溫 2—3 日則各型菌均長成粗糙且有褶皺的表面(圖版 III,12)。

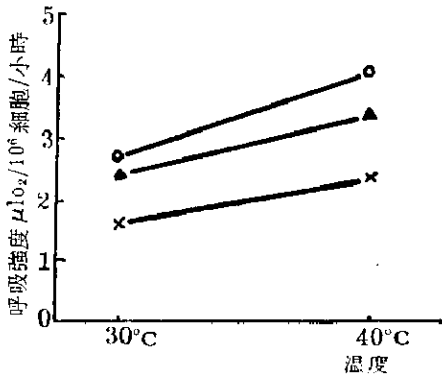


圖 6 2.402 在 40°C 及在 30°C 時之呼吸情況

○——分離適應型: ▲——普通適應型:
×——原始型。

(2) 水解液液體培養的細胞形狀 將 2.402 的二種適應型在液體培養基中 40°C 培養,原始型在 30°C 培養時,細胞的形狀顯示有不同。原始型的細胞多數為卵圓形(6 × 10 微米),大的成長圓形(4.6 × 12 微米),小細胞為圓形(4.6 × 4.6 微米),但均佔少數。液體中多假菌絲及真菌絲(圖版 III,9)。分離適應型在液體中以圓形及卵圓形的細胞居多數,但長圓形細胞極少,且假菌絲亦不多見(圖版 III,10)。普通適應型的細胞形狀卵圓形者居多數,假菌絲較原始型略少,但較分離適應型多(圖版 III,11)。此種細胞的特性,如果各型菌均在 30°C 培養時,3 日後觀察,其形態仍保持了以上各型的特徵。

這種分離適應型的細胞在形態上的改變,可能是由於在高溫的情況下,細胞代謝速度加快,促使細胞分裂次數增多。因而尚未等到細胞延長形成假菌絲即已經分離。文獻上過去也有不少學者在研究某些寄生性的真菌形態時,發現微生物在適溫生長時多酵母形的細胞,而在低溫生長多菌絲狀的細胞。這種現象叫做“溫度的多形態性”(thermal dimorphism)^[32]。至於是如何的機制控制了細胞的分裂尚有待深入的研究。

(3) 麥芽汁中生醭的情況 將各型菌種植在麥芽汁液體試管中,30°C 培養時,生醭的性狀也不相同。原始型及普通適應型很快即在表面生成一厚層白色無光的醭,但分離適應型生成的醭較少,甚至不成整個一片,有成島的趨勢。

2. 2.361 號菌 200 代在形態上的變異

(1) 水解液斜面生長的特徵 原始型在 25°C 培養時,斜面的菌落為白色疏鬆絨毛的形狀,下部並有少數褶皺。分離適應型在 35°C 培養時,菌落為緊密的茸毛狀;而普通適應型在 35°C 生長時為白色乾燥褶皺很深的菌落。如將普通適應型每日移種在 25°C 培養時,連續 9 代後始失去這一性狀(圖版 III,13)。

(2) 液體培養時細胞的形狀沒有改變

(七)適應型在高溫培育時所改變的一些性質可以遺傳,而且已有了一定的穩定程度

在定向培育的過程中,適應型在高溫下生活,逐漸改變了一些生理和形態上特性,這

在上面所述的一些結果中已很顯著。應當指出的是，我們所培育的三種酵母，經鑑定都是不生子囊孢子的酵母菌，它們主要以芽殖或是菌絲斷裂的方法來增殖，在生活過程中沒有發現有性生殖過程。因之，這些在培育中所發生的新性狀，不可能是由於性的作用而引起的。我們認為這些性質的改變，可能是由於長期適應於新環境的結果，細胞內的酶系統也作了相應的改變，因而加速了代謝過程，促使呼吸作用加強，同化糖和氮的能力增高。並由於細胞增殖率加速的關係，使得分離適應型就減少了形成假菌絲的機會。細胞不及加長又行第二次分裂，所以多為圓形的細胞，在固體斜面上生長也就比較光滑了。

在培育中所獲得的性質是可以遺傳到後代的，而且新性質的穩定程度是和適應時間的久暫成比例的。這一點在下面的實驗結果中可以清楚地看出。

我們用 2.402 做過二次試驗。第一次是在 2.402 (88 代) 的結果。將 2.402 各型菌每次用等量細胞分別接種到等量水解液液體培養基內，30°C 培養 24 小時後計數每毫升中細胞的數目時，可以看出適應型比原始型細胞增殖快的這一性質由第一代傳到第二代，第二代又傳到第三代等等。在分離適應型中這一性質一共維持到第 4 代，而普通適應型只維持到第 3 代，以後就與原始型的增殖速度相等了(表 15)。

表 15 2.402 (88代)遺傳性穩定程度試驗(30°C 培養)

代 數	每毫升百萬數	菌型	分離適應型	普通適應型	原始型
1			38.6	34.8	26.25
2			4.42	3.14	2.18
3			106.2	95.3	40
4			135.2	67.8	79.6
5			35.5	33.7	37
6			133.4	143.2	140.8

這次實驗由於各代接種的細胞數目不一致(同代中三種菌型的接種數相等)，所以不能看出前後代細胞增殖數目的關係。第二次用 2.402 (190 代) 做重複試驗，仍是每 24 小時接種一次，每次接種量相等，各代的接種量也保持一定。結果二種適應型對細胞增殖加快這一性質一直維持到第十代，幾乎每代都是分離適應型最快，但在十代以後這一性質又重消失(表 16)。可以注意的是：此次遺傳性的穩定程度已經大大提高了。這一結果在理論上和實踐上均很有意義。Martin 氏在“生物對毒劑抵抗性的起源”討論會上的發言中曾提到 Sewertzoff 的“演化過程中退化的逆序定律”^[33]，認為一個器官或一部分發生了演變的退化過程時，這退化過程的進行與發生過程成為相反的次序。新形成的部分最先消失，最老的部分最後消失；一個性徵愈老，它就越能遺傳，並且維持的時間最久。Sewertzoff 的這一定律也同樣可以用來解釋我們實驗中的結果。

結 論

1. 各種定向培育的酵母菌對高溫的適應能力均較原始型強。
2. 適應型回到適溫培育時，代謝過程較原始型大大加速，這表現在細胞增殖率快、生

表 16 2.402 (190 代) 遺傳性穩定程度試驗 (30°C 培養)

每毫升百萬數 南型 代 數	分離適應型	普通適應型	原 始 型
接種數(5 毫升培養基中總數)	47	47	47
1	363	279.5	167
2	237.3	191	179
3	289.5	202	157
4	243.5	214.5	185
5	216	193	150
6	220	119.5	128
7	257	235	195
*8	281.5	84.5	49.5
9	205	267	175.5
10	303	220	166
11	133.5	115.5	120.5
12	120	134	125

* 第 8 代曾因培養時停電關係，溫箱內溫度下降。

物量積聚多、同化糖及同化氮的效率提高、以及呼吸加強等等。

3. 適應型在培育時，用人工選擇的方法加以分離，比較每次用連續移種的方法更有效地促進變異。

4. 選出的 2.402、2.361 及 2.281 菌株在玉蜀黍穗軸水解液上生長時，以 2.402 最好，2.281 最差。

5. 在定向培育中所獲得的特性可以遺傳，這種新性質的穩定程度是與它們在新環境裏培育時間的久暫成比例的。

參 考 文 獻

- *[1] Fink, H. H. Haehn, und Hoerbuger, W.: *Chem. Ztg.*, **61**: 689, 723, 744, 1937.
- *[2] Fink, H., Lechner, R., und Heinisch, E.: *Biochem. Z.*, **278**: 23, **283**: 71, 1935.
- *[3] Fink, H. und Lechner, R.: *Biochem. Z.*, **288**: 83, 1936.
- *[4] Fink, H. und Just, F.: *Biochem. Z.*, **300**: 84, 1938.
- *[5] Fink, H. und Just, F.: *Biochem. Z.*, **303**: 234, 1939.
- *[6] Fink, H. und Just, F.: *Biochemie. Z.*, **312**: 390, 1942.
- [7] Takata, R. J.: *J. Soc. Chem. Ind., Japan*, **32**: 243, 1929.
- [8] Skinner, C. S.: *J. Bact.*, **28**: 95, 1934.
- [9] 山口和夫: 日本農藝化學會誌, **19**: 10, 800, 1943.
- [10] Thaysen, A. C. & M. Morris: *Nature*, **162**: 526, 1943.
- [11] Prescott, S. C. & Dunn, C. G.: *Industrail Microbiology*, 2nd. ed. Mc Graw-Hill. N.Y. 1949.
- [12] Whit, J.: *Yeast technology*, Chapman and Hall, London, 1954.
- [13] Плевако, Е. А. и Гивартовский, Р. В.: *Технология дрожжевого производства, пищевого издателя, Москва*, 1949.
- [14] Dunn, C. G.: *Wallerstein Lab. Commun.*, **15**: 61, 1952.

有 * 號者未見原文。

- [15] Thatcher, F. S.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 1954.
- [16] Bunker, H. J.: *J. Appl. Bact.*, **18**: 180, 1955.
- [17] Bunker, H. J.: *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **1**: 10, 1946.
- [18] Крючкова, А. П., Г. С. Родионова: *Лесохим. Промыш.*, **4**: 11, 1955.
- [19] 黑野勤六、深井冬史、館野正淳、勝月英: 釀造試報 97, 1928.
- [20] Dunning, J. N. & Lathrop, E. C.: *Ind. Eng. Chem.*, **37**: 24, 1945.
- [21] Panasyuk, V. G.: *Лесохим. промыш.* **3**: 1943.
- [22] 高盤銘: 黃海, **6**: 4, 1944.
- [23] Brown, C. A. & Zerban, F. W.: *Sugar Analysis*, 3rd. ed., John Wiley and Sons, N. Y., 1948.
- [24] Block, R. J., Durrum, E. L. & Zweig, G.: *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, 1955.
- [25] А. А. 伊姆舍茨基等著(裘維蓀譯): 全蘇微生物定向變異及選種會議論文集, 科學出版社, 1955.
- [26] Логина, Л. Г. и Василевская, М. М.: *Микробиол.*, **23**: 410, 1954. (見應用微生物學參考資料第一集 42 頁)
- [27] 方心芳、湯佩松、蔡金料、吳瓊發: 植物學報, **5**: 137, 1956.
- [28] 錢存柔、方心芳: 科學通報, 1956 年 12 月號.
- [29] 四川醫學院生物化學教研室譯 (Мешкова, Н. П., С. Е. Северин 著: 動物生物化學實驗指導, 高教出版社, 1955).
- [30] Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F.: *Manometric techniques and tissue metabolism*, 1951.
- [31] (a) 湯佩松: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1**: 475, 1936.
(b) 湯佩松及 French: *Chinese J. Physiol.*, **10**: 499, 1933.
- [32] Scherr, G. H., Weaver, R. H.: *Bact. Rev.*, **17**: 51, 1953.
- [33] С. Р. 馬丁著(張宗炳譯): 關於進化的幾個問題, 緩變變異與後天獲得性遺傳, 科學出版社, 1957.

ADAPTATION ORIENTÉE DES LEVURES ALIMENTAIRES PENTOSE-ASSIMILANTES DE HAUT RENDEMENT

Ts'ien Ts'un-jou

Fang Hsin-fang

(Department of Biology, Peking University) (Type Culture Collection, Academia Sinica)

A partir de 43 espèces de levure appartenant aux différents genres, nous avons choisi, en les cultivant sur le milieu au pentose et d'après les dimensions des colonies, le poids de la biomasse et la teneur en azote de la cellule, 3 espèces: *Candida tropicalis*, *Oidium lactis* et *Torulopsis utilis*.

Pour les faire adapter à la haute température, nous avons utilisé 2 méthodes: l'une ordinaire, les levures sont cultivées à leur température maximum et repiquées fréquemment; l'autre méthode est de choisir la plus grande colonie après avoir disséminé les levures sur une plaque de gélose et de cultiver également à la haute température. L'adaptation des levures par la dernière méthode (sélection artificielle) est plus rapide que par la première.

Si l'on cultive à la température ordinaire les souches adaptées à la haute température, elles se multiplient beaucoup plus vite que les souches originelles. Nous avons aussi remarqué quelques autres différences physiologiques et morphologiques entre les souches adaptées et originelles.

Les caractères acquis sont héréditaires; Avec le temps, les souches adaptées deviennent de plus en plus stables.