

毕赤氏酵母新种——嗜石油毕赤氏酵母 D₃

牟川静 高鸿图

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐)

李月英 李子权 谭维业 张孝珍

(新疆独山子炼油厂, 克拉玛依)

该菌是从我国南方豆饼酱中分离出一株石油酵母。它具有毕赤氏酵母属特征: 细胞呈圆形、卵圆形。营养繁殖为多边芽殖, 有假菌丝, 无真菌丝。子囊孢子呈卵形, 光面, 不利用硝酸盐, 发酵葡萄糖。在麦芽汁中培养易形成白色干燥皱皮膜。此外, 它有强嗜石油能力, 同化和发酵葡萄糖, 弱同化半乳糖和纤维二糖, 不同化其他糖类, 也不同化核糖、酒石酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸, 这些与本属的近似种粉状毕赤氏酵母 [*Pichia farinosa* (Lindner) Hansen] 不相同, 故定为新种——嗜石油毕赤氏酵母 D₃ [*Pichia petrophilum* Mu sp. nov. D₃]。

该菌在发酵轻重混合馏份油品时, 经 40—50 小时发酵, 能使油品凝固点下降到 -40℃ 至 -50℃ 以下。

该菌产子囊孢子, 能有性繁殖, 能耐 25% 的盐浓度, 这些特性在国内石油酵母中是少见的。

利用酵母菌生长而消耗石油里的正烷烃, 从而降低油品凝固点, 生产高级润滑油和富有蛋白质及纤维素的酵母菌体, 是六十年代以来世界各国广泛注意和研究的课题。目前发现能利用正烷烃的酵母菌有 14 个属, 但是氧化正烷烃强的酵母只限于少数几个种, 它们主要集中在假丝酵母属中^[1-3]。

我们从豆饼酱中分离到一株优良的石油酵母 D₃ 菌株, 它能使石油馏份脱蜡, 缩短发酵时间, 生产国防所需的高级低凝固点润滑油品, 并获得石油酵母菌体蛋白。

本文报道这一新种的鉴定工作。

材料和方法

(一) 菌种分离

分别称取豆饼酱等样品 2 克, 装入含有 M₁ 的 500 毫升摇瓶中。第一次增殖振荡培养 4 天, 然后吸取菌液 3 毫升, 接入有 M₁ 的 500 毫升摇瓶,

第二次增殖振荡培养 2 天, 用平板划线分离 (Sabouraud 氏培养基)。并多次在平板上纯化, 挑取单个菌落于油斜面上, 培养 2 天后镜检。若是纯种, 再接入含 M₁ 的小摇瓶中, 驯化振荡培养 4 天, 再用平板划线分离, 接入油斜面保存。

(二) 培养基和培养条件

培养基成份见表 1。

在 M₁ 培养基中加 2% 的琼脂作油斜面。发酵培养基为 M₂。试验油品为 A 号 (原凝固点 +17℃), B 号 (原凝固点 +6℃), C 号 (原凝固点 +7℃) 和 D 号 (原凝固点 +24℃) 馏份油。

培养温度为 30 ± 2℃。摇瓶接种量为 3—10% (体积比)。往复式摇床频率为 115 次/分, 振幅 4 厘米。500 毫升摇瓶装液量为 100 毫升。5000 毫升摇瓶装液量为 1000 毫升, 加入 5% 馏份油。

用 100 升开启式发酵罐发酵, 装 18 升培养液和 6 升馏份油。通气量开始为 44 升/分, 发酵 22 小时后, 通气量提高到 47 升/分。

本文于 1977 年 10 月 18 日收到。

本工作曾得到本所魏柳根同志的支持与帮助。

表 1 有关培养基成份

成分(%)	M ₁	M ₂	M ₃
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
NH ₄ NO ₃		0.4	
(NH ₄) ₂ SO ₄			0.3
KCl			0.15
KH ₂ PO ₄	0.2	0.047	
NaCl			0.01
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.05	0.03	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.1	0.05
ZnSO ₄	0.001		0.001
FeSO ₄	0.001		0.001
MnSO ₄	0.001		0.001
CaCl ₂	0.001		0.001
H ₃ PO ₄			0.065
酵母膏	0.01	0.05	0.005
各种油品 V/V	5	5	1:3
pH	6	4—5	4.4±0.2

(三) 菌株的筛选和发酵培养

把菌种接在含不同馏份油的斜面上,挑选生长旺盛的菌株,接入装有 M₁ 培养基的 500 毫升摇瓶中,振荡培养 2 天,再接入装有 M₁ 培养基的 5000 毫升摇瓶中,继续振荡培养 2 天,离心分离,

测定油层凝固点, pH 值或折光率,并测菌液 pH 值^[12]。

选出使油凝固点下降较低的菌株,接入装有 M₁ 培养基的摇瓶中,连续培养 3—4 天作为种子液,用离心法测定湿菌体的体积,以求出接种量。接种到 M₃ 培养基后,恒温通气发酵 70 小时,每小时测一次 pH 值,用氨水调 pH 为 4.4±0.2。发酵 40、50、60、70 小时时取样离心,测定油凝固点和 pH 值。

(四) 菌种鉴定方法

主要参考文献 [7] 及其他有关毕赤氏酵母属的鉴定资料^[4-6, 8-11]。

结 果

(一) 脱蜡菌株的筛选

从豆饼酱等样品中分离得到 98 株酵母菌,在柴油、A 号、C 号油品斜面上培养,有 D₃、D₇₄ 等 43 株酵母菌生长良好。

我们把 D₇₄、D₃、D₉₂、D₁₀₀、D₉₀、D₄ 等 43 株用 5 升大摇瓶振荡培养,发现 D₇₄、D₃ 菌经 48 小时培养后,能使 D 号油品凝固点下

表 2 发酵脱蜡试验

项 目		菌号		罐号						
		发酵时间(小时)	D ₇₄	D ₉₂	D ₃	D ₁₀₀	D ₄	D ₉₀	A ₅	C ₇
耗水量(毫升)		10	65	30	30	15	45	15	34	63
		20	145	105	55	45	135	100	104	218
		30	240	310	300	130	280	245	225	475
		40	510	630	465	350	560	390	475	
		50	620		650	650	705	435		
		60			660	655	720	530		
		70								
油凝固点℃		40	+9	-2	+8	+11	+11	+15	+5	-42
		50	-6	-49	-18	-15	-2	+15	-28	-42
		60	-34	-50	-48	-47	-28	+14	-41	-42
		70	-40	-51	-52	-48	-38	+9	-42	-42

降到 -30°C 以下。

(二) 发酵脱蜡试验

D_{74} 、 D_3 、 D_{100} 、 D_{90} 、 D_4 和已知菌 A_5 、 C_7 菌以 A 号油品为碳源用 100 升开启式发酵罐发酵脱蜡试验。结果表明 D_3 、 D_{74} 菌有较强的脱蜡效果。特别是 D_3 菌经 60 小时发酵, 使 A 号油凝固点由 $+17^{\circ}\text{C}$ 下降到 -48°C 和 -50°C (见表 2)。

(三) D_3 菌的鉴定结果

1. 细胞的形态和培养特征: 在麦芽汁培养基中, 细胞呈圆、卵圆、腊肠形。其中, 以圆和卵圆细胞为多数。一般大小为 $(2.5-7.5) \times (2.5-5.0)$ 微米, 多边芽殖 (图 1)。



图 1 D_3 酵母菌的细胞形态

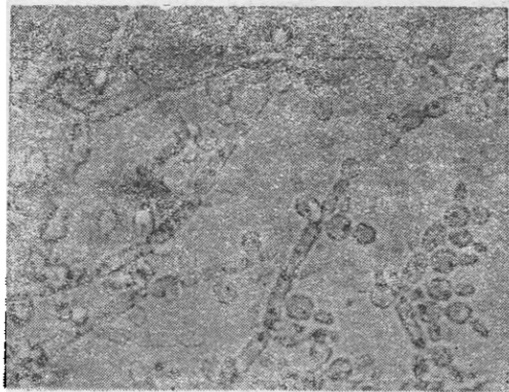


图 2 D_3 酵母菌的假菌丝形态

培养 36 小时后, 在麦芽汁表面形成白色干燥的皱皮膜, 且沿管壁上升。继续培养后, 皮膜增厚, 并破碎块沉, 在试管底部

有细胞堆积, 呈絮状沉淀。在麦芽汁琼脂斜面上, 直线划线接种, 菌苔呈白垩色、扁平、表面有网状皱纹, 边缘不规则。

2. 假菌丝: 在马铃薯培养基上加盖片培养, 细胞多边出芽, 假菌丝较发达, 未见真菌丝。菌丝约为 $(12.5-17.5) \times (2.5-3.0)$ 微米 (图 2)。

3. 巨大菌落: 酵母菌接种到麦芽汁琼脂平板上, $25^{\circ}-28^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天, 菌落直径为 4.3—4.5 厘米, 培养 10 天为 5.4—5.8 厘米。菌落白色, 有低圆锥状隆起, 有同心圆, 有放射线和沟纹, 有网状细皱纹, 大部分圆形, 边缘不规则, 呈锯齿状 (图 3)。

4. 子囊孢子: 在胡萝卜、Gorodkova、McClary 氏醋酸盐等培养基上接种, 在 $25-30^{\circ}\text{C}$ 培养 6 天后, 出现 2—4 个子囊孢子, 孢子呈卵形, 光面, $(2.5-3.0) \times (3.0-2.5)$ 微米 (图 4)。

5. 生理生化反应: D_3 菌的主要生理生化特征见表 3。

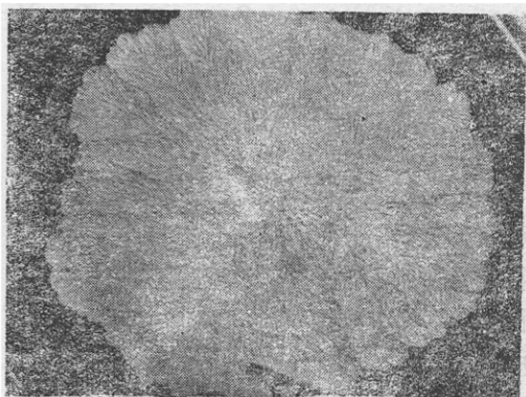


图 3 D_3 酵母菌的巨大菌落

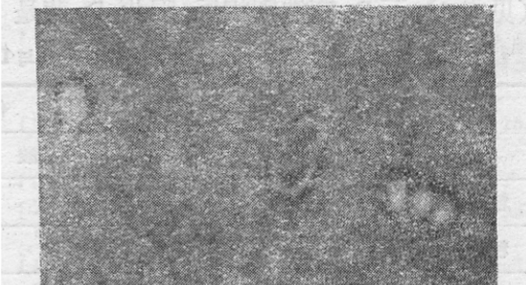


图 4 D_3 酵母菌的子囊孢子

表 3 D₃ 菌株的主要特征

项 目		试验结果	项 目		试验结果
酵 膜		白色,干燥,皱皮膜	酸 同 化	柠檬酸	+
菌 丝		假菌丝发达,无真菌丝		酮戊二酸	+
子囊孢子		1—4 个,孢子光面卵形		延胡索酸	(+)
糖 发 酵	葡萄糖	+	脂肪裂解		—
	半乳糖	—	牛奶陈化		—
糖 同 化	葡萄糖	+	硝酸盐利用		—
	半乳糖	(+)	水解尿素		—
	纤维二糖	(+)	类淀粉化合物		—
醇 同 化	甘油	+	维生素需要		不明显
	山梨醇	+	同化乙醇试验		同化乙醇
	柳醇	+	耐高渗透压试验		耐盐浓度高达 25%
	阿东醇	+	最 适 pH		在 pH2.5—7.0 范围内 均可生长 最适 pH 是 4—5
	赤鲜醇	+			
	甘露醇	+	致死温度		55℃

表 3 所列 D₃ 菌的这些特征,都是毕赤氏酵母属的特征^[4,5,7-9,12]。然而 D₃ 菌只能发酵葡萄糖,不发酵半乳糖等其他糖类;能同化葡萄糖,弱同化半乳糖、纤维二糖,不同化核糖等其它糖类;同化柠檬酸,酮戊二酸,弱同化延胡索酸,不同化乳酸、琥珀酸、苹果酸等酸类。这与毕赤氏酵母属的各个种在形态、培养特征和生化特征上皆不同。特别是 D₃ 菌与粉状毕赤氏酵母种,除形态特征不同外,在嗜石油能力和生理生化反应上也不同,后者不嗜石油,发酵半乳糖,同化核糖,同化醋酸、乳酸、琥珀酸、苹果酸(见表 4),而 D₃ 菌株则相反,因此,D₃ 菌是

毕赤氏酵母属的新种。因为它具有较强的嗜石油能力,故定名为嗜石油毕赤氏酵母菌(*Pichia petrophilum* Mu sp. nov. D₃)。它具有发酵馏份油脱蜡,生产低凝固点油品的能力,在发酵轻重混合油时能使油品凝固点下降到 -50℃,耗用氨水量高达 660 毫升。

(四) 嗜石油毕赤氏酵母新种描述

在麦芽汁中 25—28℃ 培养,细胞呈圆、卵圆形为多,其次有腊肠形细胞 (2.5—7.5) × (2.5—5.0) 微米。培养液表面有白色干燥皱皮膜,且沿管壁上升,皮膜增厚,并破碎块沉,呈絮状沉淀。

表 4 粉状毕赤氏酵母与 D₃ 菌同化和发酵部分碳源比较

菌 名	同 化					发 酵	备 注
	核 糖	酒石酸	乳 酸	琥珀酸	苹果酸	半乳糖	
粉状毕赤氏酵母	+		—	+ 或 —		+(弱)	Lodder, 1970 ^[12]
粉状毕赤氏酵母			+	+	+	—	
D ₃	—		—	—	—	—	Кудрявцев, ^[13] 1954

生长在麦芽汁琼脂斜面上的菌落呈白色, 扁平, 表面有网状皱纹, 边缘不规则。巨大菌落近于圆形, 有低圆锥状隆起, 有同心圆, 有放射线和沟纹, 边缘呈锯齿状。

在加盖片的马铃薯-葡萄糖琼脂上培养能形成藕节状发达的假菌丝。

能形成卵形光面的子囊孢子 2—4 个, 大小约 $(2.5-3.0) \times (3.0-2.5)$ 微米。

发酵糖, 不发酵半乳糖等糖类。

同化葡萄糖, 弱同化半乳糖、纤维二糖, 不同化麦芽糖、蔗糖、乳糖、蜜二糖、D-木糖、核糖、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、棉子糖、鼠李糖、松三糖、海藻糖、山梨糖。

同化乙醇、甘油、山梨醇、阿东醇、赤藓醇; 同化柠檬酸、酮戊二酸、弱同化延胡索酸, 不同化乳酸、琥珀酸、苹果酸、肌醇等酸类和醇类。

不同化硝酸钾。分解杨梅苷。

D₃ (模式) 于 1974 年 10 月由牟川静从江苏常州豆饼酱中分离, 保存于中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所和独山子炼油厂。

Pichia petrophilum Mu sp. nov. D₃

Cultura in agarum maltatum farinarium hylina, temperatura 25—28°C; cellulae plerumque rotundae et ovaes, aliquot cereae-longae $(2.5-7.5) \times (2.5-5.0)$ μm . In superficie solutionis culturae, membrasata, confracta in coagula, cum flocculatione sedimentum efformans.

Colonia quae crescit in obliquo agarum maltatum farinarium albescens, planodepressa, rugis reticulatis in superficie cum marginibus irregularibus. Colonia gigantea subrotunda, erectis basiconicis, concentri-circulosa, radiodiffusa, canalosa, tenuibus rugis reticulatis, et marginibus denticulosis.

Cultura in agarum potato-glucosi

hylina cum tecto vitreo, pseudo-mycelium devolutum nodusum radiceis loti efformans.

Ascosporae ovaes, leves 2—4, in longitudine fere $(2.5-3.0) \times (3.0-2.5)$ μm .

Fermentatin: glucosum; nulla, saccharidum, galactosum, v.g.

Assimilatur: glucosum; tenue assimilatur galactosum, cellobiosum, sed non assimilatur maltosum, saccharosum, lactosum, melibiosum, D-xylosum, ribosum, L-arabinosum, D-arabinosum, raffinose, rhamnosum, melezitose, trehalosum, sorbinosum.

Assimilatur: ethanol, glycerol, sorbitum, assimilatur: acidum citricum, tenue assimilatur acidum fumaricum; sed non assimilatur: acidum lacticum, acidum succinicum, acidum malicum, v.g.

Non assimilatur: potassium nitratum; dissolvitur: mylicetrinum.

Typus: Cultura D₃ isolata Changcow ex farina placentaes sojae (Jiangsu) a Mu Chuan-jing October 1974 anni, in Instituto Biologico, Pedologico, Deserto Xinjiangano Academiae Sinicae et in officina Petroraaffinarii Dushatzu conservatur.

参 考 文 献

- [1] 上海新型发酵厂和复旦大学生物系石油发酵科研协作组: 微生物学报, 13(1): 51—58, 1973.
- [2] 反丁烯二酸研究小组: 微生物学报, 15(1): 15—20, 1975.
- [3] 石油发酵研究会编: 《石油发酵》, 中译本, 第 33 页, 科学出版社, 北京, 1973.
- [4] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组: 《常见与常用真菌》, 第 133、271 页, 科学出版社, 北京, 1973.
- [5] G. 斯密士: 《工业真菌学纲要》, 徐浩译, 第 262 页, 科学出版社, 北京, 1964.
- [6] 飯塚廣、後藤照二: 酵母の分類同定法, 1972.
- [7] 武田义人、中野政弘: 酵母の一般研究法 II, p81—82, 89—90, 140—141, 196—202, 1949.
- [8] Кудрявцев, В. И.: Систематика дрожжей, 262—275, 1954.

- [9] 官路憲: 応用菌学上卷(解説編), 148—149, 1975。
- [10] 微生物ハンドブック編集委員会編: 微生物ハンドブック, 712—732。
- [11] 方心芳: 《应用微生物学实验法》, 第21—47页, 中国财政经济出版社, 北京, 1962。
- [12] Lodder: The yeasts a taxonomic study, 1970.

A NEW SPECIES OF YEAST *PICHIA* HANSEN

Mu Chuan-jing Gao Hong-tu

(Xinjiang Institute of Biology, Soil and Desert
Science, Academia Sinica, Ürümqi)

Li Yue-ying Li Zi-quan Tan Wei-ye Zhang Xiao-zhen

(Xinjiang Dushanzi Petroleum Refinery, Karamay)

A new species of petroleum yeast has been isolated from the food salted in sauce in South China. The cells are round or oval in shape. They reproduce by multilateral budding. Pseudomycelium is formed, without true mycelium. The ascospores have the shape of oval and smooth wall. The cells do not assimilate nitrate, but are able to ferment glucose. A white dry wrinkled pellicle growth are usually formed on the surface of malt extract. All these characteristics are in agreement with those of *Pichia* Hansen. The yeast has a great ability to assimilate petroleum. It does not ferment galactose. It weakly assimilates galactose and cellobiose. It does not assimilate maltose, suerose, lactose, melibiose, xylose and ribose, tartaric acid, lactic acid, succinic acid and malic acid.

It is different from *Pichia farinosa* (Lindner) Hansen. Thus, the yeast newly isolated is designated as *Pichia petrophilum* sp. nov. Mu. Fermentation of the mixture of light and heavy distillate oil for 40—50 hours, the yeasts can lower the congealing points of the oil to -40 — -50°C . It produces ascospores in sexual reproduction, and can grow in a concentrated salt solution of 25% salt. Of the petroleum yeasts in China, this one is scarcely found. The yeast D₃ was isolated by Mu Chuan-jing from the food salted in sauce in Changchow Jiangsu, in October 1974. It has been preserved in Xinjiang, Institute of Biology, Soil and Desert Science, Academia Sinica, and Dushanzi Petroleum Refinery, Xinjiang.