

一株新的石油脱蜡酵母——脱蜡球拟酵母 及其发酵性能*

高鸿图 牟川静 李仁和 魏柳根

(中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 乌鲁木齐)

谭维业 李月英 李子权 张孝珍 王继谔

(新疆独山子炼油厂, 克拉玛依)

从新疆克拉玛依油田土壤中分离到一株 C_7 酵母, 经鉴定属于球拟酵母 (*Torulopsis*), 但不同于该属内所描述的各个种。它不同化纤维二糖和 L-阿戊糖, 对石油一些馏份脱蜡效果好, 定名为脱蜡球拟酵母 (*Torulopsis deparaffina* n. sp.)。该菌对 300—400℃ 馏份油 (正烷烃含量为 5.60%) 发酵 50 小时, 油凝点由 +4.5℃ 降至 -53℃, 发酵 70 小时降至 -60℃; 每公斤原料油 (正烷烃含量为 8.87%) 可收获精制干酵母 5.42 克。

采用馏份油生产石油蛋白, 是近十余年来国内外研究的重要课题。该方法的优点是不需要提取精制正构石蜡, 直接以炼油厂分馏出来的馏份油为原料, 经过石油发酵脱蜡, 生产低凝固点油品, 同时回收菌体蛋白。

在自然界中, 有些微生物能利用石油馏份中的正烷烃作为唯一碳源而生长繁殖。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, 它们主要集中于假丝酵母属。不同种的酵母, 对碳链长短不同的正烷烃具有专一氧化的能力, 同时不同种的酵母, 其生成物和转化率也存在着很大的差异^[1]。为了寻找对新疆原油馏份利用和转化率高而无毒的菌种, 我们选出一株 C_7 酵母, 经鉴定是一株优良的微生物脱蜡新菌种, 具有生长速度快、脱蜡效果好、菌体蛋白收率较高等特点。现将该菌的筛选、鉴定、发酵脱蜡和菌体蛋白收率等试验结果整理如下。

菌种的分离鉴定

一、菌种分离

表1 培养基的组成成份

成份	油斜面培养基* (克)	摇瓶培养基 (克)
$(NH_4)_2HPO_4$	6.0	6.0
KH_2PO_4	2.0	2.0
Na_2HPO_4	0.5	0.5
$MgSO_4$	2.0	2.0
$ZnSO_4$	0.01	0.01
$FeSO_4$	0.01	0.01
$CaCl_2$	0.01	0.01
$MnSO_4$	0.01	0.01
酵母膏	0.1	0.1
琼脂	20	—
自来水	1000	1000
pH	自然	4.5—5.0

* 加数滴直馏润滑油

本文于 1975 年 9 月即投本刊, 因故未发表。第二次收到日期为 1979 年 3 月 9 日。

* 菌种分类鉴定工作承中国科学院微生物研究所方心芳副所长等指导, 并协助命名。新疆独山子炼油厂吴凤琴、杨建强、加米娜和中国科学院新疆化学所马映军分别参加部分工作。

(一) 培养基成份见表 1。

油品系独山子炼油厂的直馏润滑油馏份。

摇瓶发酵,每 500 毫升三角瓶装培养基 100 毫升,投油比 5%。 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 振荡(振幅 8 厘米,频率 110 次/分)培养。

(二) 分离方法

取克拉玛依油田土样 3 克,放入备好培养液的三角瓶内,振荡培养 4 天后,取 1 毫升再放入备好培养液的三角瓶中,振荡培养 2 天,用平板划线法分离,挑取单菌落于油斜面培养基上培养 2 天,然后进行 3 次平板划线纯化。最后进行摇瓶发酵,选取脱蜡效果高的菌株。

二、鉴 定

主要依据 1970 年 Lodder 主编的《酵母分类学》^[2],同时参考其它有关酵母的鉴定资料^[3-7]。

1. 细胞形态和培养特征

在麦芽汁培养基中,细胞球形或卵形, $2.0-3.8 \times 2.4-4.6$ 微米(图 1),芽殖。用麦芽汁在 28°C 培养 1 天,有香气产生,并形成薄的不完整菌膜,易碎下沉,继续培养沿管壁稍有上伸。

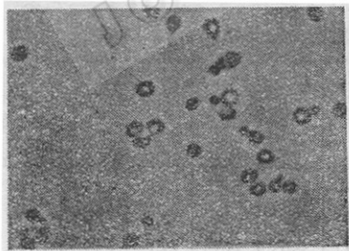


图 1 C_7 菌的细胞形态

在麦芽汁琼脂斜面上,菌苔乳白色,表面光滑发亮,边缘较规则。在其平板上形成直径 2—3 厘米的巨大菌落。

在土豆汁琼脂培养基上加盖片培养,未见真菌丝及假菌丝。

2. 子囊孢子

在胡萝卜切片培养基、Gorodkova 氏培养基和醋酸盐培养基上 28°C 培养 2 周,无子囊孢子。

3. 糖的发酵

以 10% 的豆芽汁培养基为基础,糖浓度为 2—5%。将配好的溶液装入存有杜氏管的小试管中进行试验。结果只微发酵葡萄糖,对半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、棉子糖、蜜二糖均不发酵。

4. 碳素化合物的同化

对碳素化合物的同化,包括糖类、醇类、有机酸类等。主要采用生长图形法。对乙醇、淀粉、菊糖或其它碳源,则采用液体培养法,以培养液的混浊度进行判断。

(1) 糖类的同化

同化葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、蜜二糖、海藻糖、棉子糖、松三糖、可溶性淀粉、D-木糖、菊糖;不同化纤维二糖、山梨糖、乳糖、L-阿戊糖、D-阿戊糖、D-核糖、鼠李糖。

(2) 醇类的同化

同化乙醇、甘油、阿东醇、甘露醇、山梨醇;不同化赤藓醇、卫矛醇、肌醇。

(3) 酸类的同化

同化延胡索酸、苹果酸、丙酮酸、葡萄糖酸钠、柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、乳酸;不同化顺丁烯二酸、酒石酸、乌头酸。

(4) 正烷烃的利用

用无碳源琼脂斜面加烷烃划线接种培养。形成宽大的菌落。进一步将试验菌接种于含 5% 正烷烃或馏份油的无机盐培养液中, 28°C 振荡培养 12 小时生长旺盛,乳浊作用显著。振荡培养 6 小时镜检,可观察到酵母细胞表层吸附大量油滴,说明对油有亲和力。

(5) 其他碳源的同化

同化 α -甲基葡萄糖苷和柳醇(较弱)。

5. 对维生素的需要

试验采用生长图形法。结果证明,需要生物素、维生素 B_1 、 B_2 、 B_6 、 B_{12} 和对氨基

苯甲酸,不需要叶酸、烟酸、泛酸钙。

6. 对氮源的利用

除硝酸钾采用液体培养法外,其他均采用生长图形法。结果证明,能利用亚硝酸钠、尿素、DL-赖氨酸、硫酸铵,不利用硝酸钾。

- 7. 不胨化牛奶。
- 8. 不分解脂肪。
- 9. 不水解尿素。
- 10. 分解熊果甙。
- 11. 产生类淀粉化合物。
- 12. 不产生类胡萝卜素。

上述结果说明, C₇ 菌应列为球拟酵母属^[2]。又因为 C₇ 菌不同化纤维二糖、L-阿戊糖,所以不同于属内所描述的各个种,也区别于近年来国内外报道的石油发酵菌白色球拟酵母 (*Torulopsis candida*), 故定为新种, 命名为脱蜡球拟酵母 (*Torulopsis deparaffina* n. sp.)。

C₇ 菌对馏份油的脱蜡效果

以 13 株石油发酵菌株作试验菌,并以

具有氧化正烷烃的菌株作为对照。这些菌株分别属于解脂假丝酵母、热带假丝酵母、皱褶假丝酵母、粉状毕赤氏酵母和白色球拟酵母等,有的尚未鉴定。

一、研究方法

(一) 菌株的活化和培养

将菌接入油斜面培养基, 30±1℃ 培养 48 小时, 活化后的菌种经镜检无杂菌者, 转接于装蛋 100 毫升的 500 毫升三角瓶中, 投油比 5%, 在 30±2℃ 摇床(频率 115 次/分, 振幅 4 厘米)上培养 48 小时。然后接入装量 1000 毫升的 5000 毫升摇瓶中继续培养 48 小时, 投油比 5%。

(二) 发酵

试验采用 100 升开启式发酵罐。发酵前在灭菌的发酵罐内加入预先配制的基础培养液 15 升及独山子炼油厂 A 号馏份油(馏程 300—400℃, 凝点+4.5℃, 正烷烃含量 5.6%) 10 升。待温度升至 30±1℃ 后, 接入摇瓶培养的种子, 通气发酵 70 小时。通气量 44 升/分。发酵 22 小时后通气量提高到 47 升/分。

基础发酵培养液组成(克): (NH₄)₂SO₄, KCl 1.5, NaCl 0.1, MgSO₄ 0.5, CaCl₂ 0.5, H₃PO₄

表 2 C₇ 菌与 13 株对照菌在不同发酵时间的比较

项目	菌号 时间 (小时)	C ₇	A ₁	B _{7a}	A ₃	C ₀₁	C ₀₄	h _{4s}	369	386	371	h _{4s}	2.270	287	376
* 耗氧量(毫升)	20	125	88	55	140	95	45	17	89	145	195	35	45	5	24
	30	300	178	160	230	120	85	60	105	280	390	85	100	45	99
	40	310	339	310	265	380	155	160	140	340	390	120	255	105	344
	50	330	453	375	305	475	340	220	290	340	415	210	485	295	354
	60	330	453	390	340	510	400	405	385	345	430	225	490	525	—
	70	330	453	400	350	510	410	560	445	345	440	395	495	545	—
油酸值 (KOH毫克/克)	40	1.60	0.87	0.66	0.52	0.62	0.61	0.64	0.60	0.78	0.98	0.48	0.55	0.43	0.98
	50	2.01	1.57	1.10	0.63	1.33	1.00	0.64	0.69	0.93	—	0.52	1.08	0.60	—
	60	2.08	2.10	1.62	0.73	2.06	1.66	0.76	1.23	1.07	1.17	0.60	2.08	1.22	1.17
	70	2.10	2.32	1.84	1.06	2.32	2.08	2.01	2.47	1.14	1.21	1.15	2.33	1.52	1.21
油凝点 (℃)	50	-53	-34	-33	-12	-36	-15	+4	-4	-47	-37	+3	-29	-8	-43
	60	-59	-49	-49	-30	-59	-49	0	-21	-52	-55	-5	-56	-50	-47
	70	-60	-58	-55	-42	-60	-53	-57	-47	-56	-59	-28	-60	-60	-48

* 耗氧量为累积数字, 氨水浓度 6.3%。

0.5, FeSO_4 0.01, ZnSO_4 0.01, MnSO_4 0.01, 酵母膏 0.05, 自来水 1000 毫升, pH 3.8—4.2。

二、结 果

实验结果(见表 2)表明 C_7 菌耗氮量最低, 仅 330 毫升, 其中 300 毫升集中于发酵前 30 小时内消耗。从油品的酸值数据分析, C_7 菌在发酵 40—60 小时均居首位。 C_7 菌发酵油品凝点下降快, 凝点都较低, 50 小时为 -53°C , 70 小时达 -60°C 。

为进一步证实上述结果, 又以解脂假丝酵母 A_1 为对照菌进行测定。碳源改为独山子炼油厂 B 号馏份油(馏程为 300—380 $^\circ\text{C}$, 凝点 $+17^\circ\text{C}$, 正烷烃含量 8.87%),

表 3 C_7 和 A_1 菌发酵 40 小时的比较

项 目	时间 (小时)	菌 号	C_7	A_1
耗氮量(毫升)	20		218	104
	30		475	225
	40		475	475
油酸值(KOH 毫克/克)	40		2.04	0.40
油凝点($^\circ\text{C}$)	40		-42	+5
备 注				40 小时 后氨水继续消耗

* 氨水浓度 6.3%。

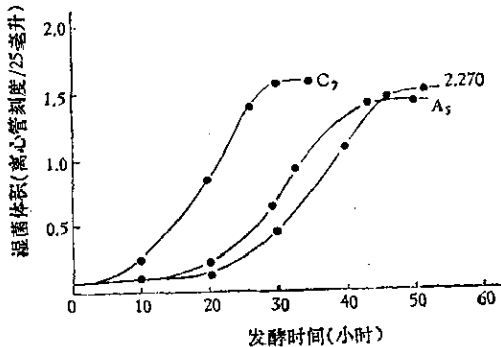


图 2 C_7 A_1 和 2.270 菌生长曲线

投油量 6 升, 基础培养基改为 18 升, 其它方法和程序不变。结果见表 3。发酵 40 小时凝点降至 -42°C 。

C_7 和解脂假丝酵母 A_1 及白色球拟酵母 2.270 的生长曲线见图 2。另外 6 株对照菌的生长曲线与 A_1 、2.270 相近(略)。结果指出: C_7 菌比对照菌 A_1 、2.270 的调整期短, 接种后 10 小时即进入对数生长期。

三、菌体收率

将发酵液全部取出, 称重, 充分搅拌, 取 200 克离心分离。所得酵母用丙酮、丁醇、蒸馏水等洗脱, 置 105°C 恒温干燥, 即为精制干酵母^[6], 结果见表 4。 C_7 菌发酵菌体收率较高。

表 4 C_7 菌和对照菌菌体收率的比较

项 目	耗氮量 (毫升)	精制干酵母占 原料油(%)	精制干酵母占 总油量(%)
C_7	490	5.42	61.14
371	510	4.85	55.04
A_1	550	4.93	55.60
C_{91}	705	5.23	58.98
B_{74}	535	4.78	53.84

参 考 文 献

- [1] 武田勤: 石油と石油化学, 12:(8), 37—40, 1968.
- [2] Lodder, J.: The Yeasts. A. Taxonomic Study, Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1235—1303, 1970.
- [3] Smith, G.: 《工业真菌学纲要》(徐浩译), 60—81, 科学出版社, 1964.
- [4] 微生物学ハンドブック编辑委员会编: 微生物学ハンドブック, 712—732, 1958.
- [5] 饭塚廣、后藤昭二: 酵母の分类同定法, 1972.
- [6] 方心芳: 应用微生物学实验法, 21—47, 60—62, 中国财政经济出版社, 1962.
- [7] 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》, 146—157, 科学出版社, 1973.
- [8] 石油发酵研究会编: 石油发酵, 61—119, 天津工业微生物研究所资料组译, 科学出版社, 1973.

A NEW STRAIN OF DEPARAFFINING YEAST—*TORULOPSIS DEPARAFFINA* N. SP. AND ITS CHARACTER OF FERMENTATION

Gao Hong-tu Mou Chuan-jing Li Ren-he Wei Liu-gen

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

Tan Wei-ye Li Yue-ying Li Zi-quan Zhang Xiao-zen Wang Ji-e

(*Xinjiang Dushanzi Petroleum Refinery, Karamay*)

A strain of C₇ yeast, isolated from the soil of Karamay oil-field in Xinjiang, was identified as a *Torulopsis*, but it is different from any other described species of the genus. It does not assimilate cellobiose and L-arabinose, and is very effective for deparaffining certain distilled fraction of petroleum. It is nominated as *Torulopsis deparaffina*

n. sp. The freezing point of 300—400°C fraction petroleum (n-paraffins content 5.60%) was dropped from +4.5°C to -53°C after fermentation with this strain for 50 hours, and to -60°C after 70 hours. The yield of refined dry yeast was 5.42 g per liter of petroleum used as raw material (n-paraffins content 8.87%).