

两个强同化甲醇的球拟酵母新种的鉴定

林伯荃 汪锦邦

(北京市饲料科学研究所, 北京)

从我国 14 个省、34 个县市的 10458 个样品中, 分离到两株同化甲醇能力强的酵母。根据其形态、培养特征和生理生化特性, 鉴定为球拟酵母属中的两个新种, 定名为北海球拟酵母 *Torulopsis beihaiensis* Lin et Wang sp. nov. 和荣县球拟酵母 *Torulopsis rongensis* Lin et Wang sp. nov.

我们在 1978 年从我国 14 个省、34 个县市采样分离, 得到两株同化甲醇能力强的(下简称强同化甲醇的)球拟酵母, 经鉴定为两个新种。现将分离、鉴定结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌种来源

供试菌株系从我国 14 个省、34 个县市所采集的 10458 个样品中分离得到。其中 BF70 菌株系从北京市北海公园的菊花花瓣样品上分离得到, BF1015 系从广西荣县土壤样品中分离得到。

(二) 分离培养基

1. 甲醇无机盐液体培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 克, KH_2PO_4 4 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 克, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, 酵母膏 0.2 克, 甲醇 10 毫升, 维生素混合液(成份: 核黄素 100 毫克, 生物素 1 毫克, 泛酸钙 200 毫克, 叶酸 1 毫克, 肌醇 100 毫克, 烟酸 200 毫克, 盐酸硫胺素 200 毫克, 吡哆醇 200 毫克, 对氨基苯甲酸 100 毫克, 蒸馏水 50 毫升) 1 毫升, 水 1 升, pH4.5。

2. 甲醇无机盐固体培养基: 成份同上, 加 2% 琼脂。

(三) 分离方法

1. 富集培养: 将样品接种至装有 50 毫升甲醇无机盐液体培养基的 500 毫升三角瓶中, 置 28°—30℃ 振荡培养(旋转式摇床, 200 转/分), 2

周后用相同培养基转接 3 次, 接种量为 1%, 每次培养一周。

2. 分离培养: 将富集培养所得的菌液稀释涂平板, 挑单菌落接种斜面, 再将斜面菌株稀释分离, 反复数次, 以获得纯培养菌株。

3. 初筛: 将上述菌株接种 2%(V/V, 下同)甲醇无机盐斜面, 28℃ 培养 72 小时, 选出生长速度快、菌苔丰厚的作为同化甲醇能力较强的菌株。

4. 复筛: 将初筛所获菌株接种甲醇无机盐液体培养基, 28℃ 振荡培养 3 天, 用国产 72 型分光光度计(波长 610 毫微米)比较其光密度。选出强同化甲醇的菌株, 再在 MD250 型 2.6 升发酵罐中进行生长比较试验。

(四) 鉴定方法

按 Lodder (1970)^[1] 的方法进行。试验重复三次, 均于 30℃ 进行。其中繁殖方式系用麦芽汁培养, 镜检观察。形态和细胞大小观察系接种麦芽汁和 2% 甲醇无机盐斜面, 培养 7 天, 制成压水片, 进行观察。假菌丝的产生系用马铃薯琼脂培养基加盖片的方法培养。子囊孢子的产生系用 Kleyn 和 Gorodkova 培养基培养后, 每周镜检一次, 共观察一个月。

碳源同化作用系采用生长图形法和液体培养测定法, 其中对甲醇、乙醇的同化作用系采用无碳

本文于 1980 年 1 月 9 日收到。

陈佑才、钱存柔同志审阅文稿。侯庆、党平同志参加筛选工作。国敏元同志参加部分鉴定工作。本室发酵组及本所分析组提供有关数据, 徐国器同志协助拍摄照片, 特此致谢。

源固体培养基灭菌后,分别加 2% 甲醇或乙醇,制成斜面,培养 7 天观察。

对硝酸钾的同化采用以下 4 种方法测定: (1) 生长图形法; (2) 硝酸钾斜面法: 无氮源培养基加 1% 硝酸钾制成斜面,培养 7 天观察; (3) 液体培养测亚硝酸法: 用不加琼脂的硝酸钾培养基,培养 72 小时后,用亚硝酸试剂测定; (4) 液体培养比浊法。

尿素分解: 用酚红指示剂培养基。对生物素和硫胺素的需要: 生长图形法。最适生长温度: 用日本 TN3 型温度梯度仪测定。

(五) 分析方法

用凯氏定氮法测定干酵母粉的粗蛋白。用日立 8350 型氨基酸分析仪测定氨基酸。用国产 SP2305 型气相色谱仪测定甲醇含量。细胞干重测定: 将发酵液离心所得之沉淀,用水洗涤 2 次,于 110℃ 下干燥,称重,计算出每百克甲醇所获得的细胞干重。

试验结果

经分离、筛选,得到同化甲醇的球拟酵母 187 株,在其中强同化甲醇的 8 株菌中,又以 BF70 和 BF1015 两株菌同化甲醇的能力最强。

(一) BF70 菌株

培养特征: 麦芽汁培养基培养 36 小时,不产生膜、醭和环。在麦芽汁平板上

培养 7 天,菌落呈卷发状或合状,奶油色,边缘整齐,质地平滑透明,不产生类胡萝卜素。在合成培养基上菌落表面有小突起(图 1)。在甲醇无机盐斜面上培养 36 小时,菌苔丰厚,乳白到浅黄色。

形态特征: 麦芽汁培养基培养 24 小时,多边芽殖。培养 3 天,细胞呈球状,直径 2.55—6.11 微米,单个或成双(图 2)。在甲醇无机盐固体培养基上培养 3 天,细胞直径为 2.55—6.09 微米。不产生子囊孢子、假菌丝和真菌丝。无掷孢子、冬孢子和节孢子。

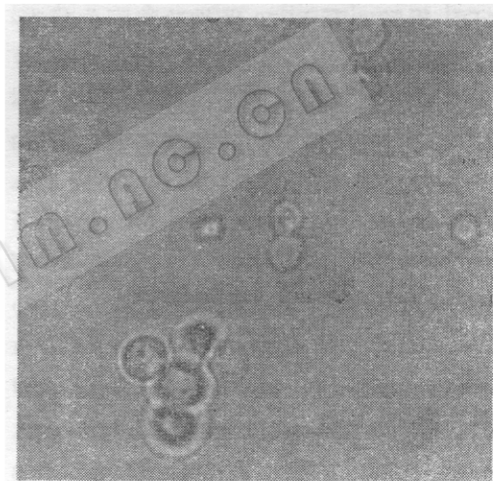


图 2 BF70 菌株的细胞形态

生理生化特性: 能发酵葡萄糖、不发酵麦芽糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、菊糖、松三糖、可溶性淀粉、 α -甲基 D-葡萄糖苷和纤维二糖。

能同化的碳源有: 葡萄糖、鼠李糖、乙醇、甲醇、甘油、D-甘露醇和 D-山梨醇。不能同化的碳源有: D-半乳糖、D-乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、菊糖、棉子糖、蜜二糖、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、核糖、木糖、山梨糖、松三糖、 α -甲基 D-葡萄糖苷、熊果苷、可溶性淀粉、赤藓糖醇、阿东醇、卫矛醇、水杨苷、DL-乳酸、琥珀酸、柠檬酸和肌醇。

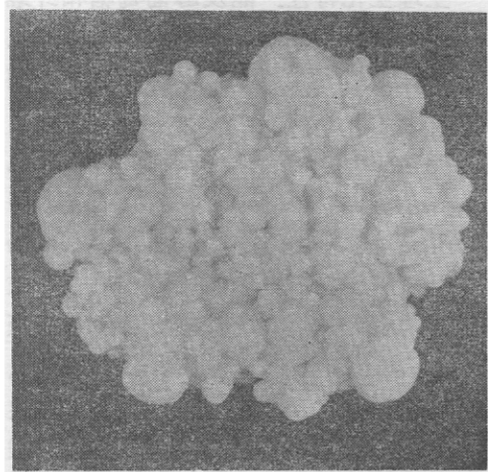


图 1 BF70 菌株在合成培养基上的菌落形态

其他性状: 明胶液化(-), 石蕊牛乳反应(-)、熊果苷分解(-), 类淀粉化合物产生(-), 同化硝酸钾(-), 产酸(-), 产酯(-), 水解尿素(+).

需要生物素。硫胺素对生长有刺激作用。在含 15% NaCl 的培养基上可以生长。pH2—9 均可生长, 最适 pH 为 5—7。25°—32°C 生长良好, 20°C 可以生长。

根据上述结果, 可以确定 BF70 菌株属于球拟酵母属 (*Torulopsis*), 但与该属的已知种^[2]又有所区别。与近似种 *T. bovina* 相比, 后者只能同化葡萄糖, 微弱同化乙醇和 DL-乳酸, 而 BF70 菌株除能同化葡萄糖、乙醇外, 还可同化鼠李糖、甘油、山梨醇和甘露醇, 但不同化 DL-乳酸。因此, 将 BF70 定为新种, 定名为北海球拟酵母 *Torulopsis beihaiensis* Lin et Wang sp. nov.

Torulopsis beihaiensis

Lin et Wang sp. nov.

Cellulae in extraco multi globasae vel bravioidae 2.55—6.11 μm . Singulae aut binae. Pillicula non formatur. Cultura in striis post umum menses ad 20°C crenea, nitida elevata, leavis, margine glabra. Gemmae multilaterales faciunt. Ascosporae hyphae pseudohyphae non sunt. Fermentatio: D-glucosum, Fermentatur at non; D-galaetosum, saccharosum, lactosum, inulinum, maltosum, raffinsum, melezitsum, amyllum solbile, trehalosum cellobiosum nec α -metyl-D-glucosidum. Assimilatio carbo-compositorum: D-glucosum, rhamnosum, glycerolum, D-sorbitolum, D-mannitolum, ethanolum et methanolum. Assimilantur at non: D-galaetosum, lactosum, saccharosum, maltosum, cellobiosum, treha-

losum, inulinum, raffinsum, melibiosum, L-sorbosum, melezitsum, α -methyl-D-glucosidum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, D-xylosum, arbutinum, amyllum solbile, erythritolum, adonitolum, dulcitolum, salicinum, acidum DL-lacticum. Nitras kalicus non assimilatur. Arbutinum non finditur. Biotinae necessariae.

生产特性测定: 在 2.6 升发酵罐中, 比增殖速度为 0.198, 转化率为 21.16 克酵母(干重)/克甲醇。粗蛋白含量为干重的 51—58%。氨基酸含量为干重的 48.2%。

(二) BF1015 菌株

培养特征: 麦芽汁培养基培养 36 小时, 不产生膜、醭及环。在麦芽汁平板上培养 7 天, 菌落圆形, 奶油色, 边缘整齐, 断面为中凹台状, 质地平滑透明, 不产生类胡萝卜素。在甲醇无机盐斜面上培养 36 小时, 菌苔丰厚, 乳白色到淡黄色。

形态特征: 麦芽汁培养基培养 24 小时, 细胞长圆形, $3.56—7.26 \times 2.55—5.06$ 微米。在甲醇无机盐固体培养基上培养 3 天, 细胞为 $2.55—5.09 \times 2.55—4.07$ 微米。不产生子囊孢子、假菌丝和真菌丝。无掷孢子、冬孢子和节孢子。

生理生化特性: 能发酵葡萄糖和纤维二糖, 不发酵麦芽糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、菊糖、松三糖, 可溶性淀粉和 α -甲基 D-葡萄糖苷。

能同化的碳源有: 葡萄糖、纤维二糖、L-阿拉伯糖、木糖、可溶性淀粉、乙醇、甲醇、阿东醇、D-甘露醇、D-山梨醇、水杨苷、DL-乳酸。微弱同化 D-阿拉伯糖与核糖。不同化 D-半乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、菊糖、棉子糖、蜜二糖、山梨糖、松三糖、鼠李糖、 α -甲基 D-葡萄糖苷、可溶性淀粉、赤藓糖醇、甘油、卫矛醇、琥珀酸、柠檬酸和肌醇。

其他性状: 明胶液化(-), 石蕊牛乳反应(-), 熊果苷分解(+), 类淀粉化合物产生(-), 同化硝酸钾(-), 产酸(-), 产酯(-), 水解尿素(+).

需要生物素。硫胺素对生长有刺激作用。在含 10% NaCl 的培养基上可以生长。pH 2—9 均可生长, 最适 pH 为 4—6。最适生长温度 29°—34°C, 20°C 可以生长。

根据上述结果, 可以确定 BF1015 菌株属于球拟酵母属, 但与该属的已知种^[2]又有所区别。与近似种 *T. bovina* 相比, 均不同化硝酸钾而能同化葡萄糖。但前者发

酵纤维二糖, 而后者不能。此外, 前者除能同化葡萄糖和乙醇外, 还可以同化纤维二糖、L-阿拉伯糖、木糖、熊果苷、甘露醇、山梨醇、水杨苷和 DL-乳酸。因此确定 BF1015 为一新种, 定名为荣县球拟酵母 *Torulopsis rongensis* Lin et Wang sp. nov.

Torulopsis rongensis

Lin et Wang sp. nov.

Cellulae in extraco multi ovatae aut longovatae 3.56—7.26 × 2.55—5.06 μ m. Pellicula non formatur. Singulae aut binae. Cultura in striis post unum mensem ad 20°C crenea, nitida, elevata, leavis, margine glabra. Gemmae multilaterales faciunt. Ascosporae hyphae pseudohyphae non sunt. Fermentatio: D-glucosum et cellobiosum. Fermentatur at non: D-galactosum, saccharosum, lactosum, inulinum, maltosum, raffinose, melezitosum, amyllum solubile, trehalosum, nec α -methyl-D-glucosidum. Assimilatio carbo-compositorum: D-glucosum, cellobiosum, L-arabinosum, D-xylosum, salicinum, D-mannitolum, D-sorbitolum, salicinum, acidum DL-lacticum, ethanolum et methanolum. Assimilantur at non: D-galactosum, lactosum, saccharosum, maltosum, trehalosum, inulinum, raffinose, melibiosum, D-arabinosum, L-sorbose, melezitosum, α -methyl-D-glucosidum, arbutinum, amyllum solubile, erythritolum, adonitolum dulcitolum, acidum succinicum, acidum citricum, rhamnosum glycerolum nec inositolum. Nitras kalicus non assimilatur. Arbutinum finditur. Biotinae necessariae.

生产特性测定: 在 2.6 升发酵罐中,

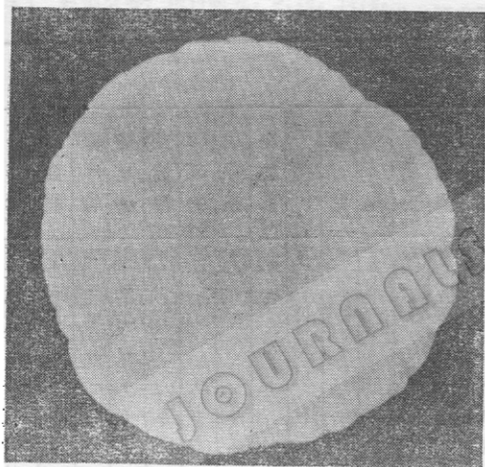


图 3 BF1015 菌株在麦芽汁培养基上的菌落形态

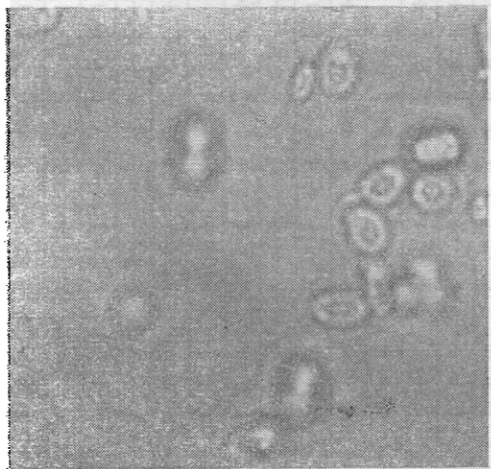


图 4 BF1015 菌株的细胞形态

比增殖速度为 0.231, 转化率为 32.8 克酵母(干重)/克甲醇。粗蛋白含量为干重的 48—60%, 氨基酸含量为干重的 50.05%。

讨 论

自 1969 年 Ogata^[3] 开始分离出同化甲醇的酵母以来, 不少人已陆续分离到这类酵母。从生产性能上看, 希望较大的菌株多属于球拟酵母、假丝酵母、毕赤氏酵母和汉逊氏酵母等属。1979 年 6 月底前所报道的同化甲醇的球拟酵母, 属于 5 个已知种^[4-7]、22 个新种^[8-23]。BF70 和 BF1015

两株菌和已知的同化甲醇的球拟酵母有明显区别, 其主要生理生化特性比较见表 1。

由表 1 可以看出, BF1015 和 *T. aurantimethanolica* 及 *T. methanoescule* 较为近似。BF1015 与 *T. aurantimethanolica* 的主要区别是, 前者同化 L-阿拉伯糖、DL-乳酸, 不同化甘油, 而后者正好相反。BF1015 与 *T. methanoescule* 的主要区别是, 前者发酵纤维二糖, 微弱同化核糖, 同化甘露醇, 而后者不发酵纤维二糖, 同化核糖, 不同化甘露醇。

同化硝酸钾试验采用生长图形法和液

表 1 同化甲醇的球拟酵母主要生理生化特性比较

种 名	同 化														发 酵					
	硝 酸 钾	半 乳 糖	蔗 糖	麦 芽 糖	纤 维 二 糖	海 藻 糖	松 三 糖	木 糖	赤 藴 糖 醇	甘 油	核 糖	L- 阿 拉 伯 糖	山 梨 醇	琥 珀 酸	DL- 乳 酸	甘 露 醇	葡 萄 糖	蔗 糖	海 藻 糖	纤 维 二 糖
<i>T. molischana</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+								+	-	+	
<i>T. nitratophila</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-								+	-	+	
<i>T. pinus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+								-	-	-	
<i>T. candida</i>	-	+	+	+	+	+	√	+	√								√	√	√	
<i>T. glabrata</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-								+	-	+	
<i>T. enokii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	±	-
<i>T. methanophiles</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	-	+	-
<i>T. methanosorbosa</i>	+	+	-	-	-	+		+		+	-	+	+	+	+	+	+	-		-
<i>T. methanodomercqii</i>	+	-	+	-	-	-		+			+	-		+			+	-		-
<i>T. methanofloa</i>	+	-	-	±	±	±	-	+	+		+	-	+	+		+	+	-	-	-
<i>T. methanothorma</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	±	+		+	±	+	+	-	±	-
<i>T. aurantimethanolica</i>	-	-	-	-	+	-	-	+		+	-	-			-		+	-		
<i>T. methanoidonea</i>	+	+		-	-	+	-	+	-	+	-	+		-	-	+	+	-	+	+
<i>T. nagoyaensis</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+			+	+	+	+	-	+	+
<i>T. methanolovesens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+		+	+	+				
<i>T. methanoescule</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+		-		-	+	-	-	-
<i>T. methanothermophilus</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>T. ethanophilola</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	±	+	+	+		-		+	-	-	+
<i>T. okinawanensis</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-		
<i>T. methanolophagus</i>	-	-	+	+	+	+		+				+	+				+	+	+	-
<i>T. thailandia</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>T. thermophila</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>T. beihaiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>T. rongensis</i>	-	-	-		+	-	-	+	-	-	√	+	+		+	+	+	-	-	+

注: + 正反应; - 负反应; V 反应微弱; ± 反应不明确。

体培养比浊法,结果不够理想。我们与此同时,还采用了硝酸钾斜面法和液体培养测亚硝酸法。硝酸钾斜面法系接种硝酸钾斜面,培养7天观察,同化者不仅生长良好,且使培养基由乳白色变为浅麦芽汁色,而不同化者不生长、不变色。液体培养测亚硝酸法系接种后培养3天,用亚硝酸试剂测定,同化者呈现红色,不同化者无色。本试验用已知菌为对照,用后两种方法获得了较满意的结果。

参 考 文 献

- [1] 林伯荃等: 饲料研究, 5:18, 1979。
- [2] Lodder, J. ed: The yeasts a taxonomic study. North-Holland Publ. Co. Amsterdam-London, 1970.
- [3] Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 33(10): 1519, 1969.

- [4] Asthana, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 13:92, 1971.
- [5] Oki, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18: 295, 1972.
- [6] Yokota, Y.: *J. Ferment. Technol.*, 52(4): 201, 1974.
- [7] Hazeu, W.: *Arch. Microbiol.*, 87: 185, 1972.
- [8] van Dijken, J. P.: *J. Gen. Microbiol.*, 84: 409, 1974.
- [9] Asai, Y.: *J. Gen. Microbiol.*, 22: 197, 1976.
- [10] 浦上貞治: 特許公報, 51-9031, 1976。
- [11] 阿部重雄: 公開特許公報, 48-72381, 1973。
- [12] 阿部重雄: 公開特許公報, 50-5583, 1975。
- [13] 外村健三: 公開特許公報, 51-9835, 1976。
- [14] 河野景明: 公開特許公報, 51-130584, 1976。
- [15] 石川州澤: 公開特許公報, 52-18877, 1977。
- [16] 富田耕右: 公開特許公報, 52-18876, 1977。
- [17] 富田耕右: 公此特許公報, 52-15883, 1977。
- [18] 津川優: 公此特許公報, 52-18875, 1977。
- [19] 高山義博: 公此特許公報, 52-15882, 1977。
- [20] 阪田展次: 公此特許公報, 53-13784, 1978。
- [21] 南清司: 公此特許公報, 53-38685, 1978。
- [22] 南清司: 公此特許公報, 53-41479, 1978。
- [23] Michel, W.: 英国专利, 1520979, 1978。

IDENTIFICATION OF TWO NEW SPECIES OF THE STRONGLY METHANOL ASSIMILATING YEASTS OF GENUS *TORULOPSIS*

Lin Boquan Wang Jinbang

(Institute of Beijing Feedstuff, Beijing)

Two strongly methanol assimilating yeasts were isolated by enrichment cultivation of 10,458 samples from 14 provinces, 34 districts in China. On the basis of taxonomic characteristics, they were identified belonging to the genus *Torulopsis*. In the carbohydrate fermentation test and

assimilation test, their reaction is apparently different from that of any other species so far known. They were designated as two new species of *Torulopsis*, namely: *Torulopsis beihaiensis* Lin et Wang sp. nov. and *Torulopsis rongensis* Lin et Wang sp. nov.