

第 1 章 利用烃类的微生物及石油酵母菌的鉴定

1.1 利用烃类的微生物

Miyoshi(1895)和 Söhngen(1906)首次报道了利用烃类的微生物,但直到 20 世纪 60 年代,烃的生物化学方面的工业研究才广泛地开展起来。当时,主要的石油公司对以下领域很感兴趣,如细菌石油勘探、炼油厂废物处理及煤油与汽油的脱蜡等。从那时起,广泛而深入地开展了用廉价的石油组分来替代糖类进行菌体以及氨基酸、有机酸、甾体、维生素和其他商业上令人感兴趣的物质的发酵生产的研究工作。1973 年石油危机后,人们认识到,石油除了作为能源外,还是一种极重要的、非再生性的化工原料。尽管油价大幅度上涨带来严重的经济问题,但利用微生物转化潜力的开发工作继续深入,有关二元酸、 ω -羟基酸或生物乳化剂等产物的文章和专利数不断增加。此外,从学术研究的角度看,与传统的糖类发酵基质相比,烃类作为基质有其自身的特点。烃类的水不溶性与其他亲脂化合物在水相中的转化作用有明显的差异,而烷烃乳化、摄取和初始氧化与进一步代谢的机制以及遗传学基础研究引起了科研人员的广泛关注。

烃类不仅是从生物圈开采出来的储存于地球内部油层的化石残余物,而且是能被自然界许多植物和微生物重新合成的代谢物,后者在自然界重新循环的过程中也能作为其他微生物的生长基质,这解释了降解烃类的微生物普遍存在的缘由。

氧化烃类的微生物的存在依赖于环境条件,当各种群落生境里降解石油的微生物数目因相应基质的可用性而增加时,微生物种群也增加。在清除海洋或陆地上因事故造成的石油泄漏污染方面,微生物降解烃类的潜力是惊人的。

许多细菌、酵母菌和霉菌能利用石油,下面列出同化脂肪族烃的一些主要的属。

1.1.1 细菌

无色杆菌属(*Achromobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、放线菌属(*Actinomyces*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、小杆菌属(*Microbacterium*)、原放线菌属(*Proactinomyces*)和弧菌属(*Vibrio*)等。

1.1.2 酵母菌

假丝酵母属(*Candida*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、毕赤

氏酵母属(*Pichia*)、红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、酵母属(*Saccharomyces*)、掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、酒香酵母属(*Brettanomyces*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、内孢霉属(*Endomyces*)、拟内孢霉属(*Endomycopsis*)、地霉属(*Geotrichum*)、娄德酵母属(*Lodderomyces*)等。

1.1.3 霉菌

曲霉属(*Aspergillus*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、芽孢霉属(*Cladosporium*)、小克银汉霉属(*Cunninghamella*)、链孢霉属(*Fusarium*)、被孢霉属(*Mortierella*)、毛霉属(*Mucor*)、拟青霉属(*Daecylomyces*)、青霉属(*Penicillium*)、侧孢霉属(*Sporotrichum*)、轮枝孢菌属(*Verticillium*)、根霉属(*Rhizopus*)、蛙粪霉属(*Basidiobolus*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、赤霉属(*Gibberella*)、茎点霉属(*Phoma*)、黏滞霉属(*Gliocladium*)、帚霉属(*Scopulariopsis*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、木霉属(*Trichoderma*)、蠕孢菌属(*Helminthosporium*)、瓶霉菌属(*Phialophora*)、瘤孢属(*Sepedonium*)、穗霉属(*Spicaria*)、卵形孢霉属(*Oospora*)、枝顶孢属(*Acremonium*)、葡萄孢属(*Botrytis*)、单孢枝霉属(*Hormodendrum*)、附球菌属(*Epicoccum*)、黏束孢属(*Graphium*)、束梗孢属(*Stilbella*)、小孢霉属(*Microsporum*)、发癣菌属(*Trichophyton*)、多孔菌属(*Polyporus*)、*Allescherra*、*Pullularia*等。

来源不同的原油的成分有很大差异,一种菌不能降解其所有的组分。原油组分中的正烷烃或蜡是饱和的直链烃,通常较其他组分更容易被微生物利用。组分不同,降解程度不一,大致规律为:

- (1) 脂肪族烃较芳香族烃更易降解;
- (2) 长链烃较短链烃更易降解;
- (3) 饱和化合物较不饱和的化合物更易降解;
- (4) 直链烃较支链烃更易降解。

在有其他有机化合物存在的条件下,自然界烃类的生物降解主要是由混合的种群进行的。然而在实验室中,降解试验主要使用纯培养和一定成分的培养基。在这种情况下,有些已知不能利用某种烃的菌株在混合培养或者存在其他碳源时却能氧化该种烃,这种培养条件称为协同代谢或协同氧化(也有人称为辅-代谢、辅-氧化或共代谢、共氧化),并可能优先导致中间代谢物的积累。

在自然界的碳循环中,芳香族和杂环化合物的分解是至关重要的生化步骤,许多微生物能裂解芳香族结构的环。细菌、酵母菌、高等真菌以及少数能在厌氧条件下进行转化的光合成细菌能分解芳香族基质。这些微生物包括:

原核生物中的一些属:红螺菌属(*Rhodospirillum*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、假单胞菌属、产碱杆菌属、无色杆菌属、埃希氏菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、弧菌属、黄杆菌属、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、节杆菌属、分枝杆菌属、诺卡氏菌属、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属等。

真核生物中的一些属:德巴利酵母、毕赤氏酵母属、酵母属、脉孢霉属(*Neurospora*)、红菇属(*Rusulla*)、革褶菌属(*Lenzites*)、多孔菌属、假丝酵母属、单胞枝霉属、曲霉属、葡萄孢

属、卵形孢霉属、青霉属、红酵母、掷孢酵母属和丝孢酵母属等。

如前所述,实验室研究生物降解主要是用纯培养完成简单化合物的代谢。然而纯培养方法有多种不足,可能会导致人们对微生物在自然界中降解芳香族和杂环化合物的潜力作出不正确的评价。

近年来,科研人员已经了解这些化合物的生物降解常需要由许多不同种类微生物组成的微生物群落的参与。应用连续流富集法能分离出各种类型的群落,从而能研究不同微生物之间的相互作用。连续培养也能用来分析与生物降解有关的混合培养/混合基质体系,此外,这些体系可用来研究在连续或强选择性压力的条件下微生物对新基质的适应性。因此,用连续培养作为一种可能的与环境有关的实验室模型体系来研究能更全面地了解自然界中芳香族和杂环化合物的生物降解。

在自然界中,微生物的相互作用对芳香烃和杂环化合物的生物降解起重要作用。这些相互作用存在各种形式的互惠共生(混合体中的所有成员受益于彼此的存在)和偏利共生(群落中的一员受益于第二个种群的存在,该种群本身既不激发也不抑制第一种机体的活性)。因此纯培养和混合培养对混合基质的利用的研究在揭示自然界中芳香族和杂环化合物的生物降解方面是相当重要的。

1.2 石油酵母菌的分类鉴定

利用烃类的微生物种类很多,现以生产单位与研究单位送检的30株利用烃类的酵母菌为例进行分类鉴定,石油酵母菌指能利用石油馏分中的正烷烃、正烯烃及环烷烃等碳氢化合物作为生长碳源的酵母菌。与一般不利用烃的酵母菌不同,石油酵母菌接触烃类化合物能产生一种脂蛋白类乳化剂,使培养基中不溶于水的烃类化合物乳化成小滴,从而使水油相混,成为菌体生长与发酵的碳源,工厂中用于脱蜡生产低凝固点油的酵母菌,生产柠檬酸、^[1]长链二羧酸、^[2~5]L-谷氨酸、^[6]琥珀酸、^[7] α -酮戊二酸、甘露醇、各种维生素及单细胞蛋白^[6,67,297~312]等的酵母菌都是石油发酵酵母菌。目前,科学家们认为许多用糖类作碳源生产的产品,也可以用碳氢化合物来生产,所以将石油酵母菌开发成工业微生物生产菌种能很好地服务于国民经济,因而对其理化特性、代谢途径及分类鉴定的研究自然非常重要。人们除以Lodder的《酵母菌分类学》一书^[8]为依据对微生物进行分类鉴定外,还将红外吸收光谱、血清学反应、细胞壁成分、GC含量及DNA杂交等新技术引入微生物分类鉴定工作,从而能更准确地按微生物自然亲缘关系来确定它们的分类地位。

1.2.1 材料与方法

1. 菌种

各地工厂及研究所送检菌号为1045、1230、G₁、Y₄₅、Y₃、B₃₉、716、①-1、④-2、③、⑨-7、D₁₅、B₁₁、D₁、D₃、C₁₈、C₂₁、C₉₀、G₃、G₂、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₂₃、C₂₉、C₃₂、C₇、B₂₇、G₄。

2. 试剂

1) 糖类 葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、棉子糖、蜜二糖、山梨糖、海藻糖、松三糖、菊糖、木糖、核糖、L-阿戊糖、D-阿戊糖、可溶性淀粉,分别为市售试剂级及进口试剂级。

2) 醇类 丙三醇、赤藓醇、阿东醇、卫茅醇、甘露醇、山梨醇、柳醇、 α -甲基葡萄糖苷、肌醇,均为试剂级。

3) 酸类 柠檬酸、异柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸、乌头酸、 α -酮戊二酸、苹果酸、酒石酸、丙酮酸、乳酸、顺丁烯二酸、葡萄糖酸钠,均为市售试剂级。

4) 维生素类 生物素、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 B₁₂、叶酸、烟酸、泛酸、对氨基苯甲酸,均为试剂级。

1.2.2 鉴定方法

1. 样板菌

为易于识别,鉴定未知菌时最好同时选用几株已知菌作对照样板菌。

2. 培养基

有机物培养基采用 YPD 培养基[酵母膏质量分数为 0.5%(下同)、葡萄糖 2%、蛋白胨 1%],无机合成培养基为铵盐 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、蔬菜汁(1 kg 菜、0.5 kg 水煮沸 0.5 小时,过滤加葡萄糖 2.5%),自来水定容至 1000 ml。

3. 菌种纯化

用乳酸将灭菌后培养基的 pH 调至 3.5,接入待鉴定菌一环,置 28℃ 条件下培养 1~2 天。若有菌丝,用接种环挑出,如此重复更换培养基数次,即可除去霉菌和细菌,再用 YPD 或麦芽汁琼脂平板进行分离,即得酵母菌纯种。

4. 烃的利用

加数滴长链正烷烃于无碳源琼脂斜面,再接入酵母菌培养 2 天,斜面上生长出宽大菌苔者为利用烷烃的酵母菌。

5. 亲和力实验

将酵母菌接入烃与水的试管中,用力摇动数分钟后镜检,能吸附在烃滴表面的酵母菌为对烃有亲和力的石油酵母菌,一般非烃酵母菌则均匀分散于溶液中。

6. 乳化实验

取待测酵母菌斜面一支,接入含 1.5% 长链烷烃的无其他碳源无机合成培养基的摇瓶中,28℃ 摇床摇动培养 2 天,发酵液呈均匀乳白色者为产生乳化剂的石油酵母菌,不产生乳化剂的酵母菌发酵液透明,烃仍浮在培养基表面。

7. 形态观察

将待测菌接入麦芽汁培养基,置 28℃ 培养 36 小时,镜检细胞形态、大小、繁殖方式、真假菌丝,观察有无醭膜发生。

8. 子囊孢子

有性生殖特征在微生物分类学上有重要作用。将待测菌接种在灭过菌的胡萝卜条或石膏块上,也可以接种在醋酸盐琼脂培养基或蔬菜汁琼脂培养基上培养 3~14 周,观察有无子囊孢子及其形态特征。

9. 硝酸盐的利用

在生长素存在的情况下,酵母菌都能利用铵盐,利用必需氨基酸作氮源的酵母菌极少,但能否利用硝酸盐的特征在微生物分类上很有价值。将待测酵母菌分别接入用硝酸钾替代硫酸铵的无机培养液中,摇床摇动培养 2~7 天,如培养基混浊,可加入少量可溶性淀粉摇

匀,加热到透明糊化,冷却后加少许碘化钾,待溶化后再加一滴乳酸,生成蓝色者表明为利用硝酸盐的菌株。

10. 酒精发酵

将待测菌接入放有倒置杜氏小管的麦芽汁试管中,置温箱培养。如有 CO_2 充入杜氏小管者为有酒精发酵的菌种。只有能发酵葡萄糖的酵母菌才能发酵其他的糖类,而且只有能同化某种糖才有发酵该糖的可能,能同化或发酵葡萄糖的菌,即能同化或发酵甘露糖及果糖,在麦芽汁中不产生 CO_2 的菌即无酒精发酵作用,不能同化的糖都不需进行该糖的酒精发酵实验,利用这些规律可减少实验项目,能同化糖类的进行酒精发酵实验,可将待测菌接入含不同糖类的有机合成培养基中培养,观察杜氏小管中 CO_2 产生的量和速度,以决定待测菌发酵能力的强弱。

11. 牛奶胨化实验

将待测菌接入灭菌的脱脂牛奶中培养,牛奶由上而下逐渐变清的原因是胨化作用。

12. 脂肪酶

将灭菌的牛油均匀铺一薄层于培养皿底,凝固后倒入约 15 ml 含有 0.1% 碳酸钙的 Gorodkova 培养基,冷凝后分别点种数个待测菌,培养 1~2 天。菌落周围产生白色脂肪酸钙沉淀者为产脂肪酶酵母。

13. 含碳化合物与维生素实验

绝大多数情况下可用生长图形法测定糖类、醇类、酸类以及维生素的量,即分别制备无碳源及无维生素的无机物琼脂培养基,冷却至 40°C 时接入待测菌,充分混匀后倒入培养皿,凝固后,在平板上分别点植不同糖类或含不同维生素的滤纸小片,在 28°C 条件下培养 1~2 天,如点植处有生长圈出现,则说明该菌能同化该种糖和需要该种维生素。其中甘油、淀粉和菊糖宜采用液体法实验,与利用硝酸盐的测定方法类似,但培养基中需用硫酸铵替代硝酸盐。

1.2.3 鉴定结果

经鉴定,30 株待测菌(按 Lodder 酵母菌分类法)分别属于 3 个属 6 个种,它们是假丝酵母属、球拟酵母属和丝孢酵母属,其中属假丝酵母属的有 4 个种,球拟酵母属与丝孢酵母属各 1 个种,它们的主要特征如下所述:

1. 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)

一般繁殖特征为只芽殖,营养细胞多卵圆形,假菌丝发达,有真菌丝,菌落乳白色,生或不生醭膜,主要生理、生化特性为能同化可溶性淀粉,不同化棉子糖、菊糖;发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖及麦芽糖;不胨化牛奶;需要多种维生素,但因株型而异;产生或不产生脂肪酶,送检的 1045、1230、 G_1 、 Y_{45} 、 Y_3 、 B_{39} 均为热带假丝酵母,其中 1045 与 1230 菌株是生产长链二羧酸突变株 SD_1 、 HYU_m 、 U_{3-21} 等的原始菌株,突变株二羧酸的产酸率高达 16% 以上,是蜚声国内外的生产二羧酸的优秀菌株,该项科研成果获得 1979 年首届国家发明奖,至今仍在全国十多家工厂生产,为国家创造了丰厚的经济价值。 Y_3 与 B_{39} 菌株是可用于脱蜡生产低凝固点油的菌株;此外,热带假丝酵母还是饲料酵母优良菌种,它们可利用制糖、味精、豆腐、粉丝厂的下脚料生产单细胞蛋白。

2. 解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)

只芽殖,细胞卵形到长形,有真、假两种菌丝(图 1.1),生醭膜,蛋白酶与脂肪酶活性较

强,能胨化牛奶,只同化葡萄糖和赤藓醇,不发酵,不利用半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、菊糖、木糖、可溶性淀粉、肌醇及硝酸盐,需要维生素 B₁。解脂假丝酵母氧化烷烃能力强,是生产脱蜡的主要菌种,也是生产脂肪酶与蛋白酶的菌种。此外,有人用它替代致病性的铜绿假单孢菌作为塑料霉腐的检验菌,也有人用它来提取乳化剂,属于该种的送检菌有 716、①-2、④-2、③、⑨-7、D₁₅ 与 B₁₁ 菌株。

3. 皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)

除无真菌丝外,其形态基本与解脂假丝酵母相似(图 1.2)。其生理、生化特性与解脂假丝酵母的区别是它能利用半乳糖,不胨化牛奶,脂肪酶弱,需要多种维生素,特别是生物素与泛酸,送检的 D₁、D₃、C₁₈、C₂₁、C₉₀、G₂、G₃ 菌株都是皱褶假丝酵母,其中 C₉₀ 是生产反丁烯二酸及苹果酸的高产菌株。

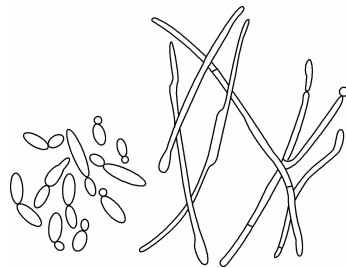


图 1.1 解脂假丝酵母

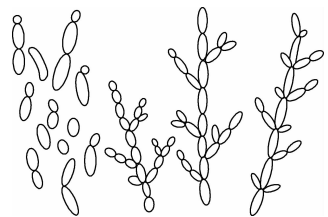


图 1.2 皱褶假丝酵母

4. 季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)

季也蒙假丝酵母形态与热带假丝酵母相似,能利用葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、蜜二糖、棉子糖、菊糖、木糖,需要多种维生素,但因株型而异,不发酵麦芽糖,不胨化牛奶,不利用硝酸盐,无脂肪酶,送检的 C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₂₃、C₂₉、C₃₂ 菌株为季也蒙假丝酵母。

5. 脱蜡球拟酵母(*Torulopsis deparaffin*)

细胞球形或卵圆形,无真假菌丝(图 1.3),菌落乳白光滑,除不同化乳糖外能利用大多数检测的糖类,不发酵麦芽糖,同化山梨醇及甘露醇,需要维生素 B₂、叶酸、烟酸、泛酸,但因株型而异,不利用硝酸盐,不胨化牛奶,不分解脂肪,送检的 C₇ 与 B₂₇ 属于脱蜡球拟酵母。

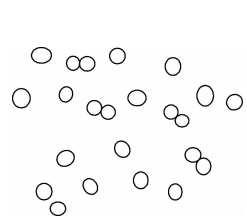


图 1.3 脱蜡球拟酵母

6. 皮状丝孢酵母(*Trychosporon cutaneun*)

主要特征是菌落表面有白霜,呈火山口状或不规则突起,真菌丝多,形成厚醭,芽殖或裂殖,节孢子方形,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、硝酸盐等;只需维生素 B₁,弱胨化牛奶,生脂肪酶。氧化烷烃能力不强,G₄ 号菌为皮状丝孢酵母(图 1.4)。

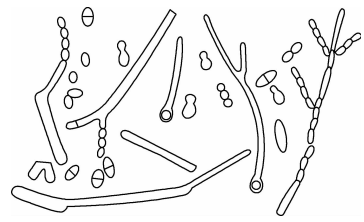


图 1.4 皮状丝孢酵母

迄今发现能发酵石油的酵母菌有 14 个属,根据我们的实验结果,检测的 30 株菌中属假丝酵母属的 27 株,有热带假丝酵母、解脂假丝酵母、皱褶假丝酵母及季也蒙假丝酵母 4 个种;属球拟酵母属的 2 株,为脱蜡球拟酵母 1 个种;属丝孢酵母属的 1 株,为皮状丝孢酵母 1 个种,送检的 30 株菌分别属于 3 个属 6 个种,其中绝大多数属于假丝酵母属(表 1.1)。

表 1.1 酵母菌的特征

鉴定菌名		解脂 假丝酵母	皱褶 假丝酵母	热带 假丝酵母	季也蒙 假丝酵母	皮状 丝孢酵母	脱蜡 球拟酵母
油水乳化		+	+	+	+	+	+
利用正烷烃		+	+	+	+	+	+
菌落		白	白	白	白	白绒	白
子囊孢子		—	—	—	—	—	—
增殖方式		芽	芽	芽	芽	裂芽	芽
细胞形状		长	卵	卵	卵	方卵	圆卵
假菌丝或真菌丝		假真	假	假真	假	真	无
节孢子		—	—	—	—	+	—
醭膜		(+)	+	+	(+)	厚	—
牛奶酪化		+	—	—	—	(+)	—
酒精发酵	葡萄糖	—	—	+	+	—	+
	半乳糖			+	—+		+
	蔗糖			+	+		+-
	麦芽糖			+	—		—
	乳糖				—		—
	蜜二糖				—		+-
	棉子糖				(+)		+-
同化	葡萄糖	+	+	+	+	+	+
	半乳糖	—	+	+	+	+	+
	蔗糖	—	—	+	+	+	+
	麦芽糖	—	—	+	+	+	+
	乳糖	—	—	—	—	+	—
	山梨糖	—	—	+-	+	—	+
	纤维二糖	—	—	+-	+	+	+-
	海藻糖	—	—	+	+	+	+
	蜜二糖	—	—	—	+	+	+
	棉子糖	—	—	—	+	+	+
	松三糖	—	—	+	+	—	+
	菊糖	—	—	—	+	—	+-
	可溶淀粉	—	—	+	—	+	+
	木糖	—	+	+	+	+	+
	L-阿戊糖	—	—	—	+	—	—
	D-阿戊糖	—	—	—	—	+	—
	核糖	—	—	—		+	—
	鼠李糖	—	—	—	—	+	—
	甘油	(+)	+	+-	+	+	+

续表

鉴 定 菌 名		解脂 假丝酵母	皱褶 假丝酵母	热带 假丝酵母	季也蒙 假丝酵母	皮状 丝孢酵母	脱蜡 球拟酵母
同 化	赤藓醇	+	—	—	—	—	—
	阿东醇	—	—	+	+	—	±
	卫茅醇	—	—	—	+-	—	+
	甘露醇	+	+	+	+	+	+
	山梨醇	—	+-	+	+	+	+
	α-甲基葡萄糖苷	—	—	+	+	+	+
	柳醇	—	—	—		—	+
	柠檬酸	+	—	+-	+	—	+
	异柠檬酸	(+)-	(+)-	(+)-		—	+
	琥珀酸	+	+	+	+	+	+
	延胡索酸	+	+	+	+	+	+
	顺丁烯二酸	—	—	+-	—	—	+
	乌头酸	—	—	—	+	—	—
	α-酮戊二酸	+	+	+	+	+	+
	苹果酸	+	+	—	+	+	+
	酒石酸	—	—	—		+	—
	葡萄糖酸钠	+-	+-	—	+	+	+
	乳酸	+	+	(+)-		—	—
	丙酮酸	—	—	(+)-	+	—	+
	肌醇	—	—	—	—	+	—
维 生 素 的 需 要	生物素	—	+	+	+	—	+
	维生素 B ₁	+	+-	+-	+	+	—
	维生素 B ₂	—	+-	+-	—	—	+
	维生素 B ₆	—	+-	+-	—	—	—
	维生素 B ₁₂	—	+-	+-	—	—	—
	叶酸	—	+-	+-	—	—	+
	烟酸	—	—	+-		—	+
	泛酸	—	+	+-	—	—	+
	对氨基苯甲酸	—	+-	+-		—	+
	肌醇	—	—	—	—	—	—
水杨酸的分解		(+)-	—	—	—	—	
硝酸盐的利用		—	—	—	—	—	—
油脂酶		+	—	—	—	—	+
生长最高温度/℃		35~37	43	41~44	42		37~41
鉴 定 菌 号		716,①-2,	D ₁ ,D ₃ ,C ₁₈	1045,1230	C ₁₁ ,C ₁₂		C ₇
		④-2,③	C ₂₁ ,C ₉₀	G ₁ ,Y ₄₅	C ₁₃ ,C ₁₄	G ₄	B ₂₇
		⑨-7,D ₁₅	G ₃ ,G ₂	Y ₃ ,B ₅₉	C ₂₃ ,C ₂₉		
		B ₁₁			C ₃₂		

参考文献

- [1] 金其荣. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 127.
- [2] LIU Z T, YI Z H. Oxidation of alkene-1 by *Candida tropicalis*. The China-USA Engineering Conference on Bioreaction and Bioseparation[C]. Hangzhou: [s. n.], 1992: 58-62.
- [3] 刘祖同, 高忠翔. 微生物发酵生产长链二羧酸的研究[J]. 石油学报, 1989, 5(3): 92-99.
- [4] LIU Z T, YI Z H, LI G Y, et al. Studies on thermotolerant yeast producing α, ω -dibasic acid from *n*-alkane[C]//[anon.]. Eur Congr Biotechnol 3rd. Weinheim: Verlag Chemie, 1984, 2, 71-76.
- [5] YI Z H, REHM H J. Formation of α, ω -dodecandioic acid and α, ω -tridecandioic acid from different substrates by immobilized cells of a mutant of *candida tropicalis* [J]. European J Appl Microbiol Biotechnol, 1982, 16(1): 1-4.
- [6] [日]石油发酵研究会. 石油发酵[M]. 天津工业微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1973: 166.
- [7] SATO M, NAKAHARA T, YAMADA K. Production of succinic acid from *n*-paraffin fermentation by *Candida brumptii* IFO 00731[J]. Agr Biol Chem, 1972, 36(11): 1969-1974.
- [8] LODDER J. The yeasts: a taxonomic study[M]. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1970.

第 2 章 微生物对烷烃的摄取

长链烷烃是基本上不溶于水的化合物,而且随着碳链的加长,其在水中的溶解度相应地减小。水溶性的生长基质能够和细胞保持恒定的接触。与之不同的是,和水不相混溶的烷烃在某种情况下必须被转运到细胞与基质接触。因此,能利用烃类的微生物必须具有一种机制来摄取疏水的烷烃并使之透过细胞的包膜到达细胞内氧化烷烃的某个部位。微生物转运烷烃有几种不同的机制:①细胞与溶解于水相中的烷烃接触;②细胞与“增溶的(solubilized)”烷烃,即烷烃微滴($\phi < 1 \mu\text{m}$)相接触;③细胞与较大的烷烃微滴($\phi > 1 \mu\text{m}$)相接触。然而多数相关研究是探究用生长烷烃的酵母菌生产单细胞蛋白条件优化方案的研究,而非阐明微生物转运摄取烷烃过程的生化或分子机制的研究。

2.1 生长于溶解的烷烃中的微生物

有些酵母菌能生长于某些溶解于水中的烷烃,然而多数研究者认为,从观察到的生长速率看来,烷烃溶解在水中的速率是不足以充分提供酵母菌的生长的。解脂假丝酵母生长于饱和以十一烷或十二烷蒸气的液体培养基,但相同的酵母菌在溶解的十三烷或更长链的烷烃上只能有限地生长,可能是由于较长链烷的低溶解度而非基质特异性。将烷烃以液体形式或蒸气溶解于培养基中,测量热带假丝酵母的生长速率,也能有类似的结果,细胞主要摄取溶解的烷烃。以后的研究表明,这种所谓“溶解的”烷烃实际上是以 $\phi 0.1 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 的微滴形式存在的。十六烷在这种生长培养基中的溶解度比其在水中的溶解度要大 20 倍。^[1]

解脂假丝酵母对 $\text{C}_{11} \sim \text{C}_{18}$ 混合烷烃的利用情况是这样的:在利用较高分子质量的烷烃以前,该菌首先选择性地利用较低分子质量的烷烃,可以设想为较短链的烷烃有较大的水溶解度而不是由于不同的基质特异性或亲和力。固态的芳烃也可以以溶解的状态被微生物利用。如果改变加入培养基中萘和二苯乙烷的量,细菌的代谢与培养基中存在的固体颗粒数无关,表明芳烃不以固相的形式被利用。^[2]利用类似的方法得知假单胞菌仅能生长于溶解的萘中。

2.2 乳化的或“增溶的”烷烃的摄取

烷烃摄取和转运的一个重要机制是基质乳化成小滴(有人称为大乳化,macroemulsions)或者烷烃在培养基中的“增溶作用”(有人称之为微乳化,microemulsions)。烷烃乳化或增溶作用可以通过搅动、使用合成的表面活性剂、通过产生胞外的微生物代谢物、生物表面活性剂或者通过细胞生长于烷烃时其表面的变化等方式产生。这些过程将在后面述及。基质的乳化形成了烷烃——表面活性剂的微团(micelles),这对微生物在烷烃上的生长可能是很重要的。在研究烷滴表面积与酵母菌的比生长率关系时,发现烷滴越小,烷滴的表面积越大,则