

273 株假丝酵母菌的初步研究

付秀辉 李明霞

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 为了结合酵母菌资源的开发和利用, 对分离自各种基物的 273 株假丝酵母属的菌株进行了研究。根据它们对四种碳源的同化情况, 菌落特征, 挑选了较有代表性的 55 株菌作了胞外蛋白酶的测试, 并进行了菌种的初步鉴定。按 Kreger-van Rij 的分类分群标准, 共获 8 个群。又从中选出 13 株菌鉴定到种, 共有 10 个种, 其中 7 个种为我国新纪录。

关键词 假丝酵母菌; 胞外蛋白酶

假丝酵母菌具有重要的经济价值, 目前已知除用于发酵食品, 石油脱蜡, 石油发酵及污水处理外, 还能产生化工、医药等方面有用的某些酶类、有机酸和醇类。

假丝酵母属在分类学上属于半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 隐球酵母科。该属是由 Berkhout^[1] 创立的, 当时她把该属视为类酵母真菌 (Yeast-Like-Fungi) 而误编入丛梗孢属 (*Monilia*) 中。这个问题在真菌界经过数十年的变迁, 直到 1950 年在 Stockholm 召开的第七次国际植物学会议上, 假丝酵母属的名字才被正式确立^[2]。此后, 随着酵母菌分类研究的广泛深入, 该属中的成员不断增多。如在酵母分类专著第一版中曾报导该属有 30 个种和 6 个变种^[3]; 而在该专著的第三版中则增加到 81 个种^[4]; 到该专著的第三版已增加到 196 个种^[5]。到目前为止, 该属大约包括近 300 个种。

材料和方法

(一) 菌种来源

273 株假丝酵母菌主要分离自土壤及各种植物的花、果、流胶等。

(二) 菌种利用有关碳源的初步筛选

1. 初筛培养基的种类

(1) 同化碳源基础培养基 (NB): 参见《常见与常用真菌》第 270 页。

(2) 在 NB 培养基中分别加入 0.5% 淀粉、1% 木糖、2% 乳糖、1% 甲醇作为同化淀粉、木糖、乳糖和甲醇的培养基。

2. 筛选方法

(1) 将 273 株菌分别接种到上述初筛培养基中, 25℃ 静止培养, 分别在第 10 天和第 21 天观察各菌株同化不同碳源的情况。

(2) 将 273 株菌分别接种到麦芽汁斜面培养基上, 25℃ 培养两周后观察菌落的培养特征。

经过测试, 选择同化四种碳源较强, 培养特征又具特色的 55 株菌, 按 Kreger-van Rij^[6] 系统分群, 然后再从 55 株菌中选出较有代表性的 23 株菌进行定种。

(三) 胞外蛋白酶的测定

1. 培养基

(1) 前培养基 (%): 酵母膏 0.3、麦芽汁 0.3(V/V)、葡萄糖 1.0、蛋白胨 0.5、琼脂 2.0, 混合后分装小试管, 每管 2.5ml, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟。

(2) 测试培养基 (%): 酪蛋白 2.0 (先用 1mol/L NaOH 溶解后, 再加入其余成份)、牛肉膏 0.3、胰蛋白胨 0.5、葡萄糖 0.1、琼脂 2.0, 用盐酸调 pH 至 6.5, 然后分装大试管, 每管 15 ml, 0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟。

2. 测定方法: 参考 Ahearn 等^[6] 的方法进行。

3. 菌种鉴定: 参考 Kreger-van Rij^[6] 的方法进行。

结果和讨论

(一) 273 株菌对四种碳源的同化结果

在 273 株假丝酵母菌中能同化淀粉的有 51

株,占 18.7%;同化木糖的有 233 株,占 85.4%;同化乳糖的有 50 株,占 18.3%;同化甲醇的有 19 株,占 7%。可见假丝酵母菌在同化木糖方面较为普遍,这就为利用含五碳糖的废料提供了前景。

此外,这 273 株假丝酵母菌在麦芽汁斜面培养基上的培养差异也较大,可分为 6—7 类。这也是选择菌株时的一种依据。

(二) 55 株菌的分群结果

根据初筛的结果,从 273 株假丝酵母菌中选择了同化木糖较强的以及菌落培养特征差异较大的 22 株;选择同化淀粉较强的及培养特征异样的 13 株;选择同化乳糖及菌落表面异样的

12 株;加上同化甲醇的 8 株,共计 55 株菌进行了分群。按 Kreger-van Rij^[5]的分群检索表,假丝酵母可分为十个群。测定的 55 株假丝酵母共代表八个群(表 1)。

(三) 55 株假丝酵母菌胞外蛋白酶的测试结果

将选出的 55 株菌,按文献[6]方法测试后,有 2 株菌能明显地产生胞外蛋白酶,占测试菌株的 3.6%。可见假丝酵母菌在蛋白酶资源方面也值得进一步研究。

(四) 定种结果

1. 对所需定种的 23 株菌,分别采用 5 种培养基,于 25℃ 培养三天后镜检,其无性繁殖均

表 1 55 株假丝酵母菌的分群结果

结果 群	项目 重氮基 色 B 盐反 应	同化							各群菌 株数	各群菌株 百分率 (%)
		硝酸钾	棉子糖	麦芽糖	半乳糖	赤藓醇	D-甘露糖醇	肌醇		
1	+								1	1.8
2	-							+	8	14.6
3	-	+						-	19	34.5
4	-	-	+					-		
5	-	-	-					+		
6	-	-	+	+				-	11	20
7	-	-	-	+				-	5	9
8	-	-	-	-				-	4	7.3
9	-	-	-	-	+			+	5	9
10	-	-	-	-	-			+	2	3.6

表 2 13 株假丝酵母菌的发酵结果

结果 菌株	项目 葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	海藻糖	半乳糖	乳糖	蜜二糖	棉子糖
多梅假丝酵母(1 株)	-	-	-	-	-	-	-	-
无名假丝酵母(1 株)	+	+	-	+	W	-	+	+
季也蒙假丝酵母(1 株)	+	+	-	+	+	-	W	W
耐盐假丝酵母(1 株)*	+	-	-	-	-	-	-	-
炼乳假丝酵母(1 株)	+	+	-	-	-	-	-	+
生膜假丝酵母(3 株)	+	+	+	-	W	-	-	+
拟间型假丝酵母(2 株)	+	+	W	+	+	-	-	-
铁红假丝酵母(1 株)	+	W	-	-	+	-	-	-
皱褶假丝酵母(1 株)	-	-	-	-	-	-	-	-
热带假丝酵母(1 株)	+	+	+	+	+	-	-	-

* 该菌的发酵需在含 10% NaCl 的条件下进行。

W: 弱生长。

为多芽孢。细胞形态有球形,卵形、椭圆形、长柱形和少数尖形。在玉米粉培养基上,于25°C培养6天后,分别可形成三种类型的假菌丝,即假丝酵母型(*Candida* type)、菌丝假丝酵母型(*Mycocandida* type)和类菌丝圆酵母型(*Mycotoruloides* type),在高氏培养基(Gorodkova)和克氏醋酸盐培养基(Kleyn's acetate agar)上,于25°C培养1月后有21株酵母菌均未发现子囊孢子,符合假丝酵母属的特征。

2. 发酵结果: 对上述13株假丝酵母菌进行了八种糖的发酵试验。其中二株对八种糖均不发酵,有一株除发酵葡萄糖外,对其余七种糖均不发酵,有三株发酵结果彼此完全相同,其余六株对糖发酵能力各不相同,结果见表2。

3. 同化结果: 将13株酵母菌分别进行了同化33种碳源,同化硝酸钾,分解杨梅苷、分解尿素、产生类淀粉化合物、DBB颜色反应、在含10% NaCl的高渗透压培养基中的生长,在缺少维生素培养基中的生长及在4种温度条件下的生长等试验,结果见表3。

根据上述测试结果,这13株假丝酵母菌共代表了10个种: 即: 多梅假丝酵母菌(*Candida domercqii*), 无名假丝酵母(*C. famata*), 季也蒙假丝酵母(*C. guilliermondii*), 耐盐假丝酵母(*C. halonitratophila*), 炼乳假丝酵母(*C. lactis-condensi*) 生醭假丝酵母(*C. pelliculosa*), 拟间型假丝酵母(*C. pseudointermedia*), 铁红假丝酵母(*C. pulcherrima*), 皱褶假丝酵母(*C. rugosa*) 和热带假丝酵母(*C.*

tropicalis)。其中除炼乳假丝酵母菌外前7个种为我国新纪录。另外,耐盐假丝酵母和热带假丝酵母两个种在同化个别项目上与标准描述略有差异。但考虑到该项目在分类上并非十分重要,故仍暂且将它们纳入上述两个种中。

综上所述,从本文涉及的273株假丝酵母菌的研究结果来看,在利用淀粉、木糖、乳糖和甲醇等4种碳源中,尤其以利用木糖最为普通,在分群的55株菌中,有二株能产生胞外蛋白酶。在所进行定种的13株菌中,除它们都不同化乳糖和肌醇外,对其余各种碳源的同化情况都各有不同。其中有一株菌还能利用淀粉作为唯一碳源;7株菌能利用乙醇作为唯一碳源;7株菌能利用木糖作为唯一碳源。这就为利用农副产品中的废料及工厂里的废水等的综合利用提供了前景。

参 考 文 献

- 1 Berkhout C M: De Schimmelgeslachten, Monilia, Oidium, Oospora en Torula, Thesis, Utrecht, 1923.
- 2 Lanju W: Synopsis of Proposals Concerning the Intern. Rules of Botan, Nomenclature Submitted to the Seventh Intern. Botan. Congress, Stockholm, 1950.
- 3 Lodder J and Kreger-van Rij N J W: The Yeasts, a Taxonomic Study, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1952.
- 4 Lodder J: The Yeasts: A Taxonomic Study, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1970.
- 5 Kreger-van Rij NJW: The Yeasts, a Taxonomic Study, Elsevier Science Publ. B. V. -Amsterdam, 1984.
- 6 Ahearn D G, et al.: *Applied Microbiology*, 16(9): 1370-1374, 1968.