

用石油及其制品代粮发酵酶制剂的研究概况

郑兆鑫

(复旦大学生物系微生物教研组)

发酵工业的主要原料是粮食,从发酵工业中减少或不用粮食,对于国民经济发展有着极其重大的意义。我国发酵行业的工人及技术人员为了进一步贯彻“以农业为基础、工业为主导”的发展国民经济总方针,大搞节粮和代粮的科学实验,取得了不少成果。石油发酵代粮的研究是节省工业用粮的一个有效途径。

六十年代以来,石油发酵生产菌体蛋白以及石油发酵柠檬酸等的研究都有突破。石油发酵酶制剂的研究开展较晚,但近年来发展迅速,除用石油发酵脂肪酶以外,用石油发酵蛋白酶、淀粉酶、过氧化氢酶、醇脱氢酶、葡聚糖酶、以及辅酶Q、辅酶A等也都有报道。本文仅对石油发酵蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、过氧化氢酶、乙醇脱氢酶及葡聚糖酶等做一简单介绍。

一、蛋白酶

自1955年以后,开始有正构烷烃或其他石油制品发酵蛋白酶的报道。至今工作不少,成绩也最显著。估计不久便可能投入工业化生产。

(一) 用正构烷烃发酵蛋白酶

1. 霉菌发酵:

(1) 菌种筛选: 1974年 Suzuki 等报道,筛选5000株霉菌,发现大约1000支菌株能够利用正构烷烃,其

表1 部分筛选菌株的碱性蛋白酶活力*

菌株名称	pH	生长(DNAC 微克/毫升)	酶活力 (单位/毫升)
淡紫青霉 (<i>Penicillium lilacinum</i>) IFO8504	6.3	628	3528
酱油曲霉 (<i>Aspergillus sojae</i>) IFO4243	6.0	910	1512
米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>) IFO4287	5.6	816	1304
溜曲霉 (<i>Aspergillus tamarii</i>) IFO4359	5.6	750	1680
烟玫瑰拟青霉 (<i>Paecilomyces fumosa-roseus</i>) IFO8555	5.0	720	1753
尖孢镰刀菌 (<i>Fusarium oxysporum</i>) IFO6383	6.4	820	2938
瓜类萎蔫病镰刀菌 (<i>F. nivale</i>) IFO7443	5.8	600	815
镰刀菌 S-19-5 (<i>F. sp.</i> -S-19-5) IFO8884	6.8	615	4980
镰刀菌 IFO 7491 (<i>F. sp.</i> IFO 7491)	5.5	750	1200
哥根棒束孢 (<i>Isaria kogane</i> IFO5299)	6.2	940	670
头孢霉 (<i>Cephalosporium sp.</i> IFO 8954)	5.9	810	920
地生翅孢壳 (<i>Emericellopsis terricola</i> IFO 7898)	6.5	652	880

* 筛选出21支菌株碱性蛋白酶活力较高,但由于其它几支菌未鉴定,而且酶活力在21支菌中不突出,所以表中略去。

中 21 支菌株碱性蛋白酶活力较高(表 1)。

从表 1 可见 21 株霉菌中以镰刀菌 S-19-5 和淡紫青霉的酶活力为最高。但是从工业化生产来看还不够理想,因此又对上述二菌株开展培养条件和诱变育种的研究。

(2) 淡紫青霉 IFO5350 (*P. lilacinum* IFO 5350) 菌株的培养条件研究^[1]: 认为不同氮源对产酶的影响极为明显。特别是石油发酵生产的脱核酸酵母(核酸成份已用食盐抽提,残留 RNA 含量在 0.5% 以下)作为氮源效果最好(表 2),酶活力比用脱脂大豆粉或含 RNA 量较高的干燥酵母作氮源时高出 4—5 倍。而且对其他菌种如镰刀菌、曲霉等,同样有些促进作用。

表 2 脱核酸酵母对产酶的影响

碱性蛋白酶 活力(单位/ 毫升)	培养时间 (小时)						
	0	20	40	60	80	100	120
干燥酵母 (RNA 含量 14%)	0	0	750	1000	1400	1800	2100
脱核酸酵母 (RNA 含量 0.5% 以下)	0	0	1500	3200	5100	6700	8200

注:培养基成份(%): 正构烷烃 C₁₀₋₁₅ 10, KH₂PO₄ 0.8, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCl₂·2H₂O 0.01, FeSO₄·7H₂O 0.05, 吐温 60 0.5, 大豆油 0.5, CaCO₃ 1, 用 200 升发酵罐装 20 升培养基, 培养温度 24℃, 通气 20 升/分钟, 搅拌 230 转/分钟。

(3) 镰刀菌的变异株:

① 抗性菌株筛选: 用紫外线照射镰刀菌 S-19-5 菌株, 选择能够抗多烯抗菌素 Kabicidin 的突变菌株。在该种抗性菌株中蛋白酶活力比亲株提高七倍以上。抗性突变菌株蛋白酶合成增高的机理还不清楚, 不过早已知道, 多烯类抗菌素能与细胞质膜中甾醇类物质结合, 使膜产生一定程度的损伤, 造成通透性变化, 促使细胞内离子及某些中间代谢物透过, 因而能抑制某些霉菌的正常生长^[1]。由此估计抗多烯类抗菌素的突变种的膜透性改变, 使细胞内蛋白酶分子趋于向培养基分泌, 是造成增产的原因。最近 Suzuki 等^[2]分析了 Kabicidin 的抗性菌株与其亲株细胞壁中氨基酸、糖、脂肪等化学成份的数量, 发现两个菌株之间并无明显差异。但是它们向细胞外分泌代谢产物的数量差别很大。抗性菌株分泌的碱性蛋白酶、淀粉酶、核糖核酸酶以及麦角固醇等的数量都比原始菌株大。说明该抗性突变株的细胞透性确有很大的改变。

② 镰刀菌抗性突变株 No. 5-128B 发酵条件选择: 有人认为, 该突变株氮源仍然以脱核酸的干酵母为最好, 豆饼粉次之(见表 3)。碳源以 C₁₂₋₁₄ 的正构烷烃为最好, C₁₀₋₁₃ 正构烷烃次之。而更长链的正构烷烃(C₁₅₋₂₂)由于对其生长不利, 产酶较低(表 4)。磷酸盐以含钾的磷酸盐如 K₂HPO₄, KH₂PO₄ 等比含

表 3 氮源对镰刀菌 No. 5-128 B 突变株产碱性蛋白酶的影响

氮源种类	添加量(%)	酶活力(单位/毫升)
豆饼粉	6.0	30,500
玉米粉	6.0	5,200
玉米浆	6.0	8,600
棉子饼粉	6.0	1,500
酵母浸汁	6.0	11,800
干酵母	6.0	21,000
脱核酸干酵母	6.0	33,000
酪蛋白	4.0	1,700
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.4	0
NH ₄ Cl	2.8	0
NH ₄ NO ₃	2.0	0
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.5	0

钠的磷酸盐如 Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ 等为好。而且当 K₂HPO₄: KH₂PO₄ 为 1:4 时对产酶最有利, 这可能是钾离子使菌丝体断裂或是抑制了菌丝的伸长, 发酵液粘度降低, 通气条件得到改善所致。此外, 其它条件如溶解氧供应最适速度为 47.2 × 10⁻⁷ 克分子/毫升·分, 最适 pH 在 6.0, 最适温度以 24℃ 比 28℃ 的产酶要高四倍。产酶高峰在 120 小时(图 1), 亲本菌株产酶为 4000 单位/毫升, 突变菌株为 40000 单位/毫升, 提高十倍。

表 4 碳源对镰刀菌 No. 5-128 B 突变株产碱性蛋白酶的影响

碳源种类	pH	生长(DNA 微克/毫升)	酶活力 (单位/毫升)
正烷烃 C ₁₀₋₁₃	5.4	489	38669
正烷烃 C ₁₂₋₁₄	5.4	635	40829
正烷烃 C ₁₅₋₂₂	6.8	124	430
正癸烷	6.0	326	30318
正十一烷	5.0	348	32280
正十二烷	5.0	636	35777
正十三烷	5.0	495	38467
正十四烷	5.0	697	33625
正十五烷	5.0	618	23134
正十六烷	5.4	624	20124
原油	8.0	141	503
重瓦斯油	7.4	185	871
轻瓦斯油	8.0	168	503
煤油	7.4	157	235
葡萄糖	5.6	635	18189
蔗糖	5.0	760	19544

(4) 镰刀菌碱性蛋白酶提取方法: 矶野正雄等^[3]对镰刀菌 S-19-5 产生的碱性蛋白酶进行分离纯化。将酶活力为 2540 单位/毫升的发酵液过滤, 反复经过 (NH₄)₂SO₄ 盐析, 并用活性碳脱色后, 用氨基乙基纤维素柱层析以及葡聚糖凝胶 G-100 柱层析, 得到 6500

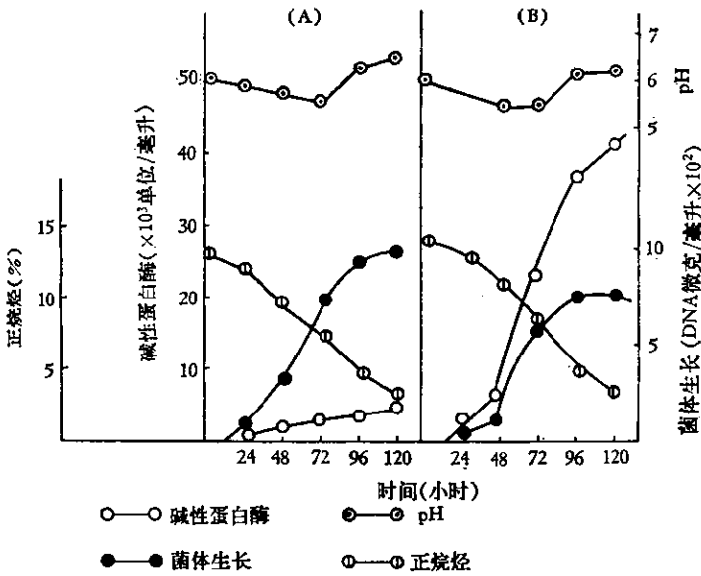


图1 原始菌株和突变菌株产酶时间

注: 1. (A): 原始菌株 (B): 突变菌株

2. ○—○ 碱性蛋白酶 ○—○ pH ●—● 菌体生长 ◇—◇ 正构烷烃

3. 培养基成分 (%): 正构烷烃 C₁₀₋₁₄ 12.7, 脱核酸酵母 7%, CaCl₂ · 2H₂O 0.01, 豆油 0.5, 吐温 60 0.5, KH₂PO₄ 0.8, K₂HPO₄ 0.2, FeSO₄ · 7H₂O 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, CaCO₃ 1.

单位/毫克的精制酶粉。

(5) 镰刀菌碱性蛋白酶的化学性质: 上述精制的蛋白酶为白色粉末, 它的基本化学性质如下:

元素分析值: C46.72%, H6.59%, N15.03%

沉降常数: 3.19S

分子量: 2.65 × 10⁴

等电点: pH11 附近

最适 pH: 11

最适温度: 50℃

酶稳定 pH 范围: 在 37℃ 处理一小时, pH 在 5 以下酶显著失活, pH11.5 酶失活 10%。

酶稳定温度范围: 在 pH5 条件下处理 10 分钟, 55℃ 开始失活, 65℃ 失活 20%, 70℃ 失活 80%。

2. 细菌发酵

(1) 菌种: 能够用正构烷烃合成蛋白酶的菌株有铜绿色极毛杆菌 IFO 3080 和 IFO 3455^[4], 铜绿色极毛杆菌^[7]以及嗜石油无色杆菌 (*Achromobacter petrophilum*)^[1] 等。

(2) 培养条件:

① 铜绿色极毛杆菌用 70% 正构烷烃、0.5% (NH₄)₂ · HPO₄、0.25% KH₂PO₄、0.1% MgSO₄ · 7H₂O、0.2% CaCO₃、0.05% 吐温 200 的培养基发酵, 对菌体生长和产酶的合适碳源进行了比较, 发现重油对菌体生长与产酶最有利, 煤油次之, 汽油最差 (表 5)。在 C₁₀ 以下的正构烷烃中, 不能生长。在 C₁₂、C₁₄、C₁₆ 正构烷烃中 IFO 3455

菌株生长最好, 产酶最多。但 IFO 3080 菌株在 C₁₂ 正构烷烃上生长较差, 在 C₁₄ 和 C₁₆ 正构烷烃上完全不能生长。

② 嗜石油无色杆菌发酵培养基用轻柴油 (沸程 250℃—350℃) 2.5% (体积/体积)、硫酸铵 0.5%、尿素 0.5%、磷酸氢二钾 0.2%、硫酸镁 0.2%、硫酸亚铁 0.05%、磷酸钙 1.0%。将培养基 pH 调至 7。种子培养基采用肉汁 1%、蛋白胨 1%、食盐 0.5%, 培养 20 小时后接入发酵培养基, 在 30℃ 培养 72 小时产酶达到高峰。

(3) 酶分离提纯方法: 以铜绿色极毛杆菌为生产菌种, 用石油发酵产生的酶同糖质原料发酵产生的酶分离提纯方法基本相似。要得到酶的粗制品可用丙酮、异丙醇或乙醇等沉淀^[9]。要将酶完全提纯, 发酵液中应先加入 CaCl₂ 浓溶液沉淀磷酸钙。然后反复过滤使滤液澄清, 再用 0.6 饱和度的硫酸铵盐析。在 0.02 M 磷酸缓冲液中 (pH8) 透析, 如此获得含蛋白酶的溶液, 取 2 毫升, 上 DEAE-纤维素柱

进行层析, 收集洗脱液时第 1—10 毫升用 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH8) 冲洗。第 11—30 毫升用 0.05 M NaCl (0.02 M 磷酸缓冲液, pH7) 冲洗。第 31—50 毫升用 0.2 M NaCl (0.02 M 磷酸缓冲液, pH 7) 冲洗。用此法分离 IFO 3455 菌株可得到三个蛋白酶组分, 也就是相应为中性、半碱性和碱性蛋白酶^[10]的组分 I、II、III。而 IFO 3080 菌株仅有 I、III 二种组分。两菌株中虽然都有组分 I, 但含量较低。三种组分中半碱性蛋白酶是弹性硬蛋白酶。I 和 III 是蛋白分解酶。

表 5 重油、煤油、汽油对菌体生长和产酶的影响

菌株	碳源	菌体生长	pH	酶活力 (×10 ³ 单位/毫升)
IFO3455 菌株 (产弹性蛋白酶菌株)	重油	+++	6	1.5
	煤油	++	6.8	0.5
	汽油	—		
IFO3080 菌株 (不产弹性蛋白酶菌株)	重油	+++	5.8	0.9 ^a
	煤油	+	7.2	0.1
	汽油	—		

(4) 碱性蛋白分解酶结晶^[13]与化学性质: 纯化后的酶液 (组分 III) 溶于 0.01 M CaCl₂ 溶液, 蛋白质浓度调节到 2% 以上, 弃去不溶物。一边搅拌, 一边滴入丙酮, 直至出现轻微浑浊, 贮藏过夜, 便形成针状结晶。然后再加入丙酮, 使浓度达到 40%—50%, 再贮存一天, 85% 以上的蛋白分解酶便形成结晶。

该酶稳定范围 pH5—9 (30°C 条件下), 温度 50°C 以下(中性溶液), 等电点略低于 pH 4.08, 紫外最大吸收峰在 280 毫微米, 最低在 250 毫微米。分子量 48400。

该酶分解酪蛋白时最适 pH 8—9, 分解清蛋白与血红蛋白最适 pH 在 7—9。最适作用温度是 60°C。

(5) 弹性硬蛋白酶(elastase) 结晶和化学性质^[13]: 将纯化的弹性蛋白酶液(组分II)在 40°C 下浓缩 10—20 倍, 加入 0.6 饱和度 (NH₄)₂SO₄, 过夜后离心收集沉淀, 重溶于蒸馏水, 除去不溶物。再滴入饱和 (NH₄)₂SO₄, 直到透明溶液变为稍呈浑浊为止。置室温下 12 小时内便出现结晶, 结晶为针状。该酶分解酪蛋白最适 pH 8.0 (0.03M Tris 缓冲液), 酶稳定范围是 pH 6—10, 酶稳定温度 65°C, 最高能忍耐 70°C。酶作用的抑制剂有金属螯合剂如 EDTA, 二巯杂菲, 高浓度柠檬酸钠或草酸铵及重金属离子如镍、钴、钒、汞等。

(二) 用醋酸及醇类发酵蛋白酶

1. 醋酸发酵: 由于石油化工的发展, 醋酸也是比较廉价而又易于得到的一种碳源, 已经成功地用于谷氨酸工业生产。近年来也开始用于发酵蛋白酶的研究^[14, 15], 从糖质原料发酵蛋白酶已了解到发酵液的 pH 对产酶及孢子形成都有很大影响。因此在发酵期间, 特别是产酶期, 不断流加酸液, 维持一定的 pH, 可以保持较高的产酶水平。若流加醋酸非但能维持发酵液 pH, 而且还可供作碳源。通过小型试验已得到较好的结果。

(1) 菌种: 目前用于醋酸发酵的菌种仍然是糖质原料发酵所使用的菌种, 有枯草杆菌 AJ 3266 等。

(2) 培养条件: 培养基成份(克/升): 酪蛋白 15, KH₂PO₄ 2.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ · 2H₂O 2, Ajpron 60(黄豆饼粉热水浸出汁, 每 100 克中含蛋白质 60 克) 20, 豆饼水解液 20 (毫升/升), pH 7.0。发酵液

pH 控制, 不同菌种最适 pH 略有差异, 对于枯草杆菌 AJ 3266 是 pH 6.7, 产酶时最适 pH 可维持在 7.0。

由于高浓度醋酸对微生物有害作用, 因此要求加入的醋酸数量应是多次而少量的添加。

若以酪蛋白作氮源, 则随着酪蛋白浓度增加, 醋酸消耗增加, 蛋白酶的生成也升高(表 6)。但是醋酸消耗与蛋白酶生成之间的比值并不改变。

表 6 酪蛋白和醋酸浓度对蛋白酶产生的影响

酪蛋白(克/升)	总氮(克/升)	醋酸(克/升)	酶活力 (单位/毫升)
15	2.76	124	8,000
30	5.04	184	14,100
45	7.32	222	19,100
60	9.60	295	19,800

发酵液中 pH 控制对蛋白酶发酵的影响如图 2 所示, 发酵液的 pH, 虽然对菌的生长影响不大, 但是对于蛋白酶形成、孢子形成以及醋酸消耗都有较大影响。蛋白酶产生的最适 pH 是 7.0, 随着发酵液 pH 升高, 孢子形成增加而醋酸消耗降低。

(3) 醋酸调 pH 时发酵蛋白酶的过程: 以醋酸控制发酵液 pH 在 7.0 左右, 经过 49 小时, 蛋白酶活力可达到 1.4×10^4 单位/毫升。醋酸不仅可控制发酵液 pH, 也可作为发酵基质(图 3)。

2. 醇类发酵: 某些细菌能在醇类化合物上生长并形成少量的蛋白酶。

(1) 菌种: 能够发酵醇化合物产生蛋白酶的菌种有铜绿色极毛杆菌^[14]和粘性极毛杆菌(*P. myxogenes*)^[17]。

(2) 培养条件: 铜绿色极毛杆菌能在许多种醇类及二醇类化合物上生长, 但是能够产酶的化合物仅有乙醇、丙醇、十一烷醇、十二烷醇、1,2-丙二醇、2,3-丁二醇等, 其中以乙醇为最好。若以乙醇为主要碳源,

发酵液的初始 pH 以 8.02 为最好。培养基成份(%)除乙醇外, 还有 (NH₄)₂SO₄ 0.5, (NH₄)₂CO₃ 0.15, KH₂PO₄ 0.3, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄ · 7H₂O 0.03, CaCl₂ · 2H₂O 0.001, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, ZnSO₄ 0.0001, NaCl 0.05, pH 8.0。使用乙醇量最好是 2% (体积/体积)。

(3) 发酵过程: 摇瓶发酵在 30°C 条件下培养过程见图 4。大约培养 50 小时比较显著出现溶菌作用, 同时蛋白酶活性明显上升。在含有 2% 乙醇的无机盐培养基中, 培养 5 天酶活力大约为 50 单位/毫升。

(4) 醇类发酵蛋白酶的化学性质: 铜绿色极毛杆菌产生的蛋白酶尚未完全提纯, 该粗酶作用的最适 pH 8.0, 作用最适温度 50°C, 酶的稳定 pH 范围 7.0—

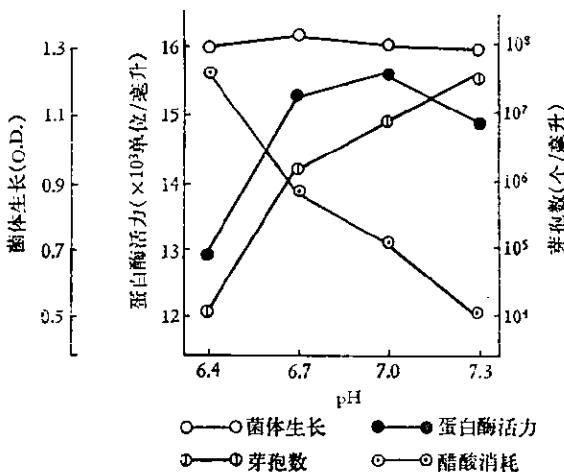


图 2 pH 对发酵蛋白酶的影响

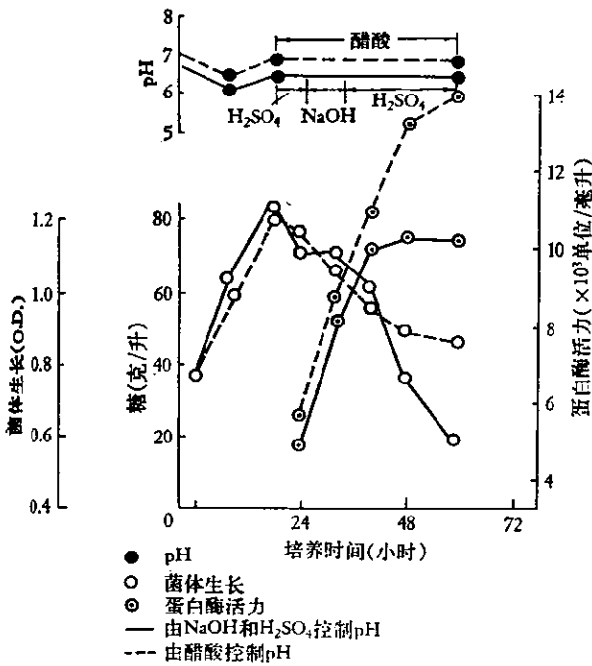


图3 醋酸调 pH 时发酵蛋白酶的过程

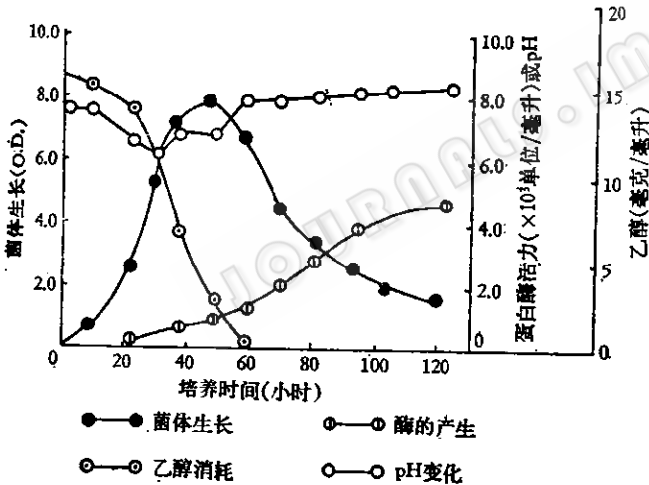


图4 乙醇发酵蛋白酶培养过程

9.0。对热的稳定性在 50℃ 以内，50℃ 以上酶活力便显著失活。

(三) 石油酵母菌体发酵蛋白酶

由于石油原料生产菌体蛋白和发酵柠檬酸已经可能工业化生产，因此可以利用酵母菌体作为碳源和氮源，培养蛋白酶生产菌，生产蛋白酶^[18, 19]。

1. 正构烷烃培养的酵母菌体作原料发酵生产蛋白酶时^[19]，发酵过程分为两个阶段。第一阶段是培养石油酵母，菌种用解脂假丝酵母。培养基含有 10 克正构

烷烃 C₁₂₋₁₈、2.9 克酸式磷酸铵、0.9 克硫酸镁、1.32 克氯化钾、0.03 克酵母浸出汁、300 克水（含无机离子），700 克蒸馏水。加入氨水将 pH 调至 4，温度维持 30℃ 以培养酵母菌。随着酵母菌体增加，正构烷烃浓度下降至 0.2 克/升，结束第一阶段发酵。

第二阶段，将上述培养液升温至 37℃，使解脂假丝酵母不再生长，并加入氢氧化钾溶液调节 pH 至 7.2，同时加入少量葡萄糖（1 克/升）以及 Ca(OH)₂、MnCl₂、FeCl₂、CuSO₄、ZnSO₄ 等无机盐。然后接种枯草杆菌（含菌浓度 10⁷ 个/毫升），大约每升发酵液加入 25 毫升菌液。发酵 37 小时后细菌浓度大约为 10⁷ 个/毫升，随着酵母蛋白完全消耗，细菌开始形成芽孢，同时产生蛋白酶。发酵结束后将发酵液离心过滤，在 35—40℃ 下减压浓缩至原来体积的 10%，加入丙酮可将 80% 的酶沉淀，最后喷雾干燥得到粗酶粉。大约 10 克正构烷烃可得到 3 克粗酶粉（14000 单位/克）。

2. 石油发酵柠檬酸的菌体蛋白生产碱性蛋白酶：石油发酵柠檬酸生产中约有 2—3% 的酵母菌体产生。这些酵母菌体往往当作废渣处理。开展综合利用可用酵母菌体作为碳源和氮源发酵生产碱性蛋白酶。发酵前菌体应自溶并加入适量碳酸钙除去柠檬酸。生产菌种用地衣芽孢杆菌 2709 (*Bacillus licheniformis* 2709)。酵母菌体浓度用 25%，加入适当钾离子，初始 pH 7.0—8.0，保温 30℃，通气培养 72 小时，酶活力可达到 4000 单位/毫升以上。

二、脂肪酶

1963 年 Takahashi 等报道^[20]，由 26 株菌株中分离到 5 株能利用烃产生胞外脂肪酶的菌。

(一) 菌种

能产生脂肪酶的 5 株菌中有 4 株类似霉菌、一株是酵母，该菌株经鉴定认为是郎比克酒香酵母 (*Brettanomyces lambicus*)^[21]。

(二) 培养条件

1. 培养基成份(%)：煤油 2.5，尿素 0.2 (或 NH₃NO₃ 0.3)，MgSO₄·7H₂O 0.1，K₂HPO₄ 0.1，Na₂HPO₄·12H₂O 0.05，KH₂PO₄ 0.05，FeSO₄ 0.002，MnSO₄ 0.002。调 pH 至 6.5，接种后置 26.5℃ 往复式摇床振荡培养。各菌株产生的酶活力见表 7。

2. 吐温 20 及橄榄油对酶形成的影响：0.005% 的吐温 20 加入培养基中可促进脂肪酶生成，但是 0.05% 的吐温 20 和 0.05% 的橄榄油却不利于酶的生成，见

表 7 产脂肪酶菌株及其产酶活力

菌 株	培养 天数	氮 源	酶活力 (单位/毫升)
S 169 M1 (类似霉菌)	7	尿素	0.4
S 190 M3 (类似霉菌)	7	尿素	0.35
S 192yl (郎比克酒香酵母)	2	NH ₄ NO ₃	0.6
S 200 M1 (类似霉菌)	3	NH ₄ NO ₃	0.3
S 209 M1 (类似霉菌)	7	尿素	0.85

注: 脂肪酶单位以脂肪酸毫克当量数表示。

表 8 吐温 20 和橄榄油对 *S. cerevisiae* 菌株生成脂肪酶的影响

培 养 基 种 类	脂肪酶活力(单位/毫升)	
	培养 2 天	培养 3 天
基本培养基	0.55	0.4
基本培养基 + 0.005% 吐温 20	0.95	0.4
基本培养基 + 0.05% 吐温 20	0.4	0.25
基本培养基 + 0.05% 橄榄油	0.3	0.05

(三) 脂肪酶提取方法^[22]

将上清液减压浓缩至原体积的1/10(30℃)。加入乙醇至60%浓度,通过离心分离出沉淀。再用95%乙醇洗涤一次,在减压条件下干燥,得到白色粉末,酶活力为1单位/毫克。

三、淀粉酶

1970年报道^[23]六株芽孢杆菌培养在含有烃类、碳酸盐、氮源和无机盐的培养基中,可以合成碱性淀粉酶。

1973年也有人提到在石油发酵碱性蛋白酶的镰刀菌突变株中也检测到少量 α -淀粉酶,其活力为19.0单位/毫升^[24]。

四、过氧化氢酶

1973年 Suzuki, Yahiko 等报道,用正构烷烃发酵生产过氧化氢酶^[25, 26]。

菌种采用米索毕赤酵母 IFO 0193、IFO 0604 (*Pichia* miso IFO 0193、IFO 0604)。培养 IFO 0193 菌株的培养基是正构烷烃(15 碳烷为主)20 克, (NH₄)₂HPO₄ 4 克, KCl 1 克, MgSO₄·7H₂O 1 克, FeSO₄·7H₂O 0.2 克, CaCl₂·2H₂O 0.1 克, NaCl 0.1 克、水一升, 调 pH 至 40, 于 32℃ 培养。在对数期后期当细胞产量达到正构烷烃的 70% 时, 酶活力可达 22.5 × 10⁵ 单位/升。

过氧化氢酶浓缩时应先将酵母细胞自溶做成匀浆, 然后用乙醇、异丙醇、丙酮、(NH₄)₂SO₄ 或用等电点法进行盐析或沉淀。酶的分离是用凝胶过滤、离子交换、透析或电泳等进行。

酵母 IFO 0604 菌株, 采用类似的培养基(正构烷烃为 40 克/升, 其余成份与上述相同, 在 32℃、pH 4.0 条件下培养 30 小时, 可得到 450 克湿细胞。将 100 克酵母细胞在 20℃ 下自溶 40 小时, 然后将自溶上清液冷到 5℃, 加入 60 毫升丙酮, 搅拌 10 分钟, 再冷到 -10℃。用丙酮洗涤, 烘干便得到 8 克粗酶、活力为 60,000 单位/克。

此外, Teranishi Y. 等^[27]认为几种假丝酵母例如白色假丝酵母 (*C. albicans*)、季也蒙假丝酵母 (*C. guilliermondii*)、中型假丝酵母 (*C. intermedia*)、解脂假丝酵母 (*C. lipolytica*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 等, 在正构烷烃培养基中都能在细胞内合成过氧化氢酶。特别是热带假丝酵母酶活力最高。通过电子显微镜观察和组织化学测定, 证明正构烷烃培养的细胞原生质内大量出现的微体中 (microbody) 有明显的过氧化氢酶活性。而且认为过氧化氢酶活性与酵母细胞内烃基代谢有关, 该酶出现受到烃的强烈诱导作用。而其他基质如葡萄糖、乳糖、乙醇乙酸或者月桂醇醇都无诱导能力。

五、乙醇脱氢酶

用正构烷烃或醇类作为碳源发酵生产乙醇脱氢酶已有不少报道^[28]。1968 年 Schimptessel 报道啤酒酵母培养在乙醇为碳源的培养基中可以产生乙醇脱氢酶。其后 Lebeault 等^[29] 1970 年报道热带假丝酵母利用烃类作唯一碳源可以产生乙醇脱氢酶。1972 年有人曾报道啤酒酵母和热带假丝酵母等培养在葡萄糖、C₁₁₋₂₂ 正构烷烃、乙醇或醋酸作为碳源的培养基中也可以产生乙醇脱氢酶。由于培养基质不同, 酶的耐热性以及酶作用的基质特异性都有差异。

Zink^[30] 报道将粗糙链孢菌培养在以蔗糖、醋酸盐、乙醇等为碳源的培养基中能产生乙醇脱氢酶。培养基碳源不同, 酶作用的基质特异性以及对温度的耐热性也各异。

最近上山等^[31]报道假丝酵母 EY1-2 菌株培养在含有乙醇 20 毫升、NH₄H₂PO₄ 1.0 克、Na₂HPO₄ 1.0 克 MgSO₄·7H₂O 0.5 克、FeCl₃·6H₂O 0.01 克、酵母浸出汁 0.1 克, 加水至 1000 毫升的培养基中 (pH 5.3), 可以从菌体中得到乙醇脱氢酶。该酶的最适 pH 8, 稳定 pH 范围: 25℃ 处理 1 小时用 pH 7.5—12 范围内稳定。最适作用温度 50℃, 稳定温度范围: 在 pH 8.3 时处理 10 分钟, 在 50℃ 范围内都表现稳定。

1974 年 Tachibana 等^[32]报道 *Schizophyllum commune* IAM No. 9006, 培养在乙醇为碳源的培养基中, 可以从菌体内分离到乙醇脱氢酶。该酶最适作用 pH 在 7 左右。

六、葡聚糖酶 (Dextranase)

Yamaguchi 等^[33]从土壤中分离到一株黑色短杆菌

葡聚糖变异株 (*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*) 能产生葡聚糖酶。该菌株发酵培养基是乙醇 20 克、葡聚糖 10 克、 K_2HPO_4 1 克、 KH_2PO_4 1 克、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 克、 $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.05 克、 $CaCl_2$ 0.02 克、多聚蛋白胨 10 克、酵母浸出汁 0.5 克，加水总体积达到 1000 毫升 (pH 8.5)。培养基中含有的糖类成份对酶生成影响较大，其中葡聚糖效果最好。

该酶的物理化学性质：酶作用最适 pH 在 8 左右，稳定 pH 范围，以 37℃ 处理 24 小时在 pH 5—11 范围内稳定。酶作用的最适温度 55℃。稳定温度范围，以 pH 7.5 在不同温度下处理 10 分钟，在 60℃ 以内酶活力稳定。

七、石油发酵酶制剂的特点

石油原料与糖质原料不同，因此在发酵工艺上也带来一些新的问题。

(一) 原料供应问题

目前用于石油发酵酶制剂的发酵原料主要是液体烃。这种与水不互溶的基质，如何被微生物细胞吸收是石油发酵中引人注意的问题。目前有两种看法。1. 强调物理因素^[10]，认为只有使烃水乳化，才有利于菌对烃的利用，有利于菌的繁殖。目前增加烃的分散度常用以下两种方法，一是增加搅拌速度；一是加入表面活性剂，常用的表面活性剂是对菌无毒的非离子性表面活性剂，如聚乙二醇、斯盘、吐温类。由于菌种不同，可能某些表面活性剂有促进生长的能力，另一些则无促进生长的作用，也无阻碍作用，而有一些可能有抑制生长的作用，因此选择合适的表面活性剂需经过具体试验研究。2. 强调微生物的生理作用，认为能利用烃的微生物细胞表面可以分泌某种特别的物质，例如铜绿色极毛杆菌 *S. B.* 菌株在含有正烷烃的培养基中培养时，菌体可分泌出鼠李糖脂 (rhamnolipiol)^[10]，它能促使烃的乳化，有利于菌的生长^[11]。微生物的生理作用是菌体能够利用烃的内因，发酵时的物理作用是促使微生物易于吸收烃的外界条件，研究这两个方面的本质和条件，可以加速菌在烃类基质中的生长能力，提高酶的产量。

(二) 氧供应及发酵热问题

由于石油发酵中，充作碳源的烃类物质分子中不含氧，发酵时比糖质原料要求更多的氧气，因此氧气供给是个重要问题。

以生产菌体为例，在烃为发酵基质时，氧的需要量比糖质发酵时多三倍。也就是说如果用糖和烃为基质时的生长速度完全相同的话，则后者在单位时间内须增加约三倍的供氧量。因此有效的供氧十分重要。

从发酵时发出的发酵热来看，以烃为原料的发酵

热是糖为基质时发热量的两倍。因此石油发酵时，应用合适而经济的冷却方法是值得注意的。

(三) 安全性问题

石油发酵中另一个重要问题是产品的毒性问题。它关系着人民健康，必须引起重视。一般说石油发酵产品的毒性主要由二个方面的原因所造成。一是发酵原料中含有有毒成份，目前石油发酵采用的原料主要是正构烷烃。未经精制的正构烷烃中混有微量能致痛的多环芳香类化合物。这类物质主要是 3, 4-苯并比以及 1, 2, 5, 6-二苯并萘等。其中以 3, 4-苯并比的量为最多。因此正构烷烃与石油发酵产品中有毒物质数量多少是以 3, 4-苯并比的量作为指标。

现在国际上认为经过严格处理的正构烷烃可以少带或不带有毒成份。有人提出石油精制时取 320℃ 以前馏分作为发酵原料为好。因为 3, 4-苯并比等沸点是在 470℃。还有人提出精制正构烷烃只用分子筛分离，然后再用硫酸处理，如此几乎能完全除去有致癌性的多环芳香烃化合物。目前国内外对石油酵母作过大量分析和动物实验，认为不会引起动物致病。二是生产菌种的毒性，作为生产菌种应经过严格检查避免用致病菌株，例如能发酵生产蛋白酶的细菌——铜绿色极毛杆菌就是条件致病菌，这一类菌株的应用要慎重或确实去除致病性。当然这也是整个发酵工业中选择菌种应注意的共同问题。

总之，对于毒性问题要采取积极慎重态度，要进行科学分析，至今各方面资料都充分证明石油发酵产品中的毒性是较低的，尤其国内现在大规模生产的酶制剂中，相当多是只用于工业生产，并未用于食品制造，因此毒性问题可能不是主要的限制因素。

八、结束语

石油发酵酶制剂的研究，目前正处于蓬勃兴起的阶段。它与其它代谢产物的石油发酵如氨基酸、有机酸、维生素等相比较，研究的深度和广度尚有很大的差距，但潜力很大，特别象利用正构烷烃或醋酸发酵生产蛋白酶，可能不久会正式工业化生产。从石油发酵酶制剂的品种也一定会不断增多。

参 考 资 料

- [1] Suzuki, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38 (1): 135, 1974.
- [2] 中尾义雄等: 特许公报, 昭 48—77086.
- [3] Harold, F. M.: *Adv. microbiol. physiol.*, 4: 45, 1970.
- [4] Suzuki, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 38 (3): 657, 1974.
- [5] 磯野正雄等: 特许公报, 昭 46—5038.
- [6] 森原和之: *Appl. microbiol.*, 13 (5): 793, 1965.

- [7] Колчинська, И. Д. и др.: *Микробиол. Ж.* **34** (2): 147, 1972.
- [8] 早川司郎等: 特许公报, 昭44—26909。
- [9] Колчинская, И. Д. и др.: *Прикладная Биохимия и Микробиология*, **10** (4): 508, 1974.
- [10] Morihara, K.: *J. Bacteriol.*, **88** (3): 745—757, 1964.
- [11] Morihara, K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**(1): 113, 1963.
- [12] Inove, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **73** (1): 125, 1963.
- [13] Morihara, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **240** (8): 3295, 1965.
- [14] 池田等: 昭和47年度日本农艺化学大会讲演要旨集, 172.
- [15] Ikeda, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **38** (12): 2317, 1974.
- [16] 上山英夫等: 发酵工学杂志, **50** (11): 787, 1972.
- [17] Morihara, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**: 243, 1956.
- [18] De. Baynast, Q.: U. S. Patent, 3,772,152, 1973.
- [19] Inst Francais du Petrole des Carburants & Lubrifiants: Ger. offen, 2, 142, 916, 1972.
- [20] Takahashi, J. et al.: *Nature*, **200**: 1208, 1963.
- [21] Takahashi, J. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **27** (5): 396, 1963.
- [22] 高桥穰二等: 特许公报, 昭40—2879。
- [23] Kenkyusho, R.: Nied Patent, 7,013,396, 1970.
- [24] Naka0, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37** (5): 1223, 1973.
- [25] Suzuki, Y. et al.: 公开特许公报, 昭48—75,787, 1973.
- [26] Suzuki, Y. et al.: 公开特许公报, 昭48—58,190, 1973.
- [27] Teranishi, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **38** (6): 1213, 1974.
- [28] Teranishi, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **38** (6): 1221, 1974.
- [29] 山田浩一, 中原忠笃: 石油蛋白的生产, 天津工业微生物研究所资料组译, 科学出版社, 第38页, 1973。
- [30] Hisatsuka, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **135**: 686, 1971.
- [31] Itoh, S. and Suzuki, J.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 2233, 1972.
- [32] Kazuo, Hoshiai: *Chemical Economy & Engineering Review (Japan)*, **4** (3): 7, 1972.
- [33] 上山英夫, 堀越弘毅: 发酵协会志, **33**: 1—11, 1975.
- [34] Lebeault, J. M. et al.: *Biolchem. Biophys. Acta, Enzymology*, **220**: 373, 1970.
- [35] Zink, M. W.: *Can. J. Microbiol.*, **15**: 265, 1969.
- [36] Tachibana, S. et al.: 发酵工学杂志, **52**: 878, 1974.
- [37] Yamaguchi, T. and Gocho, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 2527, 1973.
- [38] Suzuki, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **40** (2): 365, 1976.