

居乃琥

(上海市工业微生物研究所,北京)

近年来,国外乙醇代粮发酵的研究,发展十分迅速。除抗菌素外,几乎所有用粮食发酵的产品都可以用乙醇代替粮食来发酵生成。与其它碳源相比,乙醇具有水溶性好;本身就是饮料酒中的主要成分,一般没有毒性;发酵产率和转化率高等优点。因此,随着石油化学工业的发展而合成乙醇的产量逐年增加,用乙醇作为一种新型发酵原料,显示出越来越大的可能性。本文拟综述国外乙醇代粮发酵的研究动态。

同化乙醇的微生物

自然界里,能够同化乙醇的微生物种类十分繁多。从同化糖类的微生物中,很容易筛选到很多能同化乙醇的微生物。用乙醇代替普通培养基中的糖类,也很容易从自然界里筛选到能同化乙醇的微生物。

一、同化乙醇微生物的种类^[1]

冲等^[2]利用含有2%(体积/体积)乙醇的培养基筛选过细菌和酵母菌。用于筛选的菌株包括600株典型的同化糖类的菌株,同化烃类的600株菌,以及能由糖质原料产生氨基酸的菌200株。发现有31%的细菌,60%的酵母菌能够同化乙醇。大亦等^[3]用含3%(体积/体积)乙醇的培养基培养43株酵母菌,发现有39株生长良好,1株稍有生长。秋叶等^[4]利用含有1.5—3.0%各种醇类的培养基,从土壤中分离了能同化低级醇的细菌。结果得到能同化乙醇的菌,比同化甲醇、正丙醇和正丁醇的为多。

坂口早年曾指出,同化乙醇的霉菌同样也很多。还有很多关于藻类和担子菌能同化乙醇的报道。

在自然界中,同化乙醇的微生物种类一般

以酵母菌为最多,细菌次之,霉菌最少。酵母菌中主要是假丝酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属、酵母属和球拟酵母属。细菌中主要是节杆菌属、短杆菌属、棒杆菌属和极毛杆菌属。霉菌几乎都是曲霉属。

二、同化乙醇微生物的增殖^[1]

微生物在乙醇为碳源的培养基中的增殖情况与以糖类为碳源时基本相同。不同之处是用乙醇为碳源时,要控制乙醇浓度,需氧量比较大。

一般来说,在乙醇浓度低于5%时,微生物即可生长。最适浓度是1—2%,浓度超过5%,生长即受抑制;到10%时,生长就完全停止。以往一般用2%的乙醇培养微生物,现在大多降低到1%以下。发酵过程中可用流加高浓度乙醇,或连续发酵的方法来维持乙醇浓度。

用乙醇代替粮食作原料进行发酵时,培养温度一般为25—30℃,最近利用高温酵母发酵,温度可高达38—40℃。发酵时通气量比用糖质原料时要大,但比用正构石蜡作原料时要小。

因此,有关以糖质原料发酵的大量研究资料和数据,在乙醇代粮发酵中可以灵活运用。

乙醇代粮发酵的产品

一、氨基酸

(一) 种类、产率和转化率

1967年原田等首先报道,利用乙醇为唯一碳源,可在培养基中积累O-乙基高丝氨酸。随后冲等^[2,6,7]报道,利用乙醇为碳源可以发酵生产谷氨酸。此后,有关乙醇代粮发酵生成氨基酸的报道日见增多。表1汇集了乙醇代粮发酵生成的氨基酸的种类、产率、转化率和菌种。用乙醇作原料,除能发酵生成用糖质原料发酵生

表 1 由乙醇发酵生成的氨基酸

氨基酸	产酸率 (克/升)	转化率 (%)	菌种*	文献
L-谷氨酸	59.8	66	短杆菌 (<i>Brevibacterium</i>) B 136	[2,6,7]
L-赖氨酸	2.9—15.1		谷氨酸棒杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) 巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>) 石蜡节细菌 (<i>Arthrobacterium Paraffineus</i>) 诺卡氏菌 (<i>Nocardia lynea</i>)	[8]
	41—66**	28	黄色短杆菌 (<i>Brevi. flavum</i>) 谷氨酸棒杆菌	[9]
L-精氨酸	2.2—9.6	2.0—8.2	黄色短杆菌 嗜氨微杆菌 (<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>) 谷氨酸棒杆菌	[10]
	18.4**		黄色短杆菌	[11]
L-谷氨酰胺	35.0	38.5	黄色短杆菌	[12]
L-亮氨酸	5.2—10.5	4.9—11.3	黄色短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌 (<i>Coryn. acetooacidophilum</i>)	[15]
L-组氨酸	2.6—6.2	2.1—5.3	黄色短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌 柠檬节细菌 (<i>Arthr. citreus</i>)	[13]
	7.9—8.5**		黄色短杆菌 乳糖发酵短杆菌 (<i>Brevi. lactofermentum</i>)	[14]
L-苯丙氨酸	9.3—15.3	8.1—12.4	乳糖发酵短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌 柠檬节细菌 枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) 解脂假丝酵母 (<i>Candida lipolytica</i>)	[16]
L-脯氨酸	8—10	7.1—10	黄色短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌	[17]
L-丝氨酸	3.5—3.7		乳糖发酵短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌	[18]
L-苏氨酸	30.4—33.8	22.7—25.2	黄色短杆菌 嗜乙酰乙酸棒杆菌	[19]
L-缬氨酸	22.3	14.5	嗜乙酰乙酸棒杆菌	[20]
L-瓜氨酸	4.0	23	黄色短杆菌	[21]
O-乙基高丝氨酸	0.1—0.3		短杆菌、棒杆菌、微杆菌、诺卡氏菌	[22]
	0.73		短杆菌 B136	[2,7]

* 除生成 L-谷氨酸和 O-乙基高丝氨酸的菌种是野生型外,其余均为变异菌株。

** 需添加少量葡萄糖作原料。

成的各种氨基酸外，还能生成一些特殊氨基酸和氨基化合物，如 O-乙基高丝氨酸，1,3-二氨基丙烷等。乙醇代粮发酵氨基酸的转化率一般都比用糖质原料或醋酸时高。以谷氨酸为例，用糖质原料时，产酸率为 5—10%，转化率为 50% 以上；用醋酸为原料时，产酸率为 7—10%，转化率为 50%；用乙醇为原料时，产酸率为 6%，转化率为 66%。

(二) 菌种

利用乙醇为碳源发酵生成氨基酸的细菌有短杆菌、棒杆菌、小球菌、节杆菌、小杆菌、芽孢杆菌、极毛杆菌、大肠杆菌、诺卡氏菌等，还有假丝酵母属、毕赤酵母属和酵母属的酵母菌。

(三) 乙醇发酵生成氨基酸的过程

为节省篇幅，以谷氨酸为例来介绍乙醇发酵生成氨基酸的过程。

1. 细菌和酵母菌利用乙醇的能力和生成谷氨酸的能力：冲等^[2,6,7]比较过细菌和酵母菌利用乙醇和生成谷氨酸的能力，结果发现在所试验的 1183 株细菌中，有 363 株能利用乙醇，占 30%，有 88 株利用乙醇的细菌可产生谷氨酸（占 26%）；在所试验的 217 株酵母菌中，有 130 株（占 60%）能利用乙醇，其中有 14 株能产生谷氨酸。能利用葡萄糖或醋酸生成谷氨酸的短杆菌属细菌，利用乙醇生成谷氨酸的能力很强。

2. 培养条件：耐高浓度乙醇的短杆菌 B136-P30 菌株，在含 5% 乙醇的培养基中亦生长良好。它在含乙醇的培养基中对营养物的需求，与在含葡萄糖培养基中相同，都需要生物素。培养基中乙醇的起始浓度为 1.5%（体积/体积），并在培养过程中不断流加乙醇以保持其浓度，按总加入量计，乙醇含量为 6—15%（体积/体积）。发酵温度比用糖质原料时为低，以 25℃ 为好。需要较大的通气量（500 毫升三角瓶装 20 毫升液体），对 Mg^{2+} 、有机氮源、磷酸盐的需要量也较糖质原料发酵时高。

3. 发酵过程^[2,6,7]：短杆菌 B136 在 25℃ 下，在摇瓶中以乙醇为原料进行谷氨酸发酵的全过程如图 1 所示。在旋转摇床上振荡培养 72 小时，谷氨酸产率为 59.8 克/升，对乙醇的转化率

为 66%。这样的水平，完全可以在工业生产中应用。

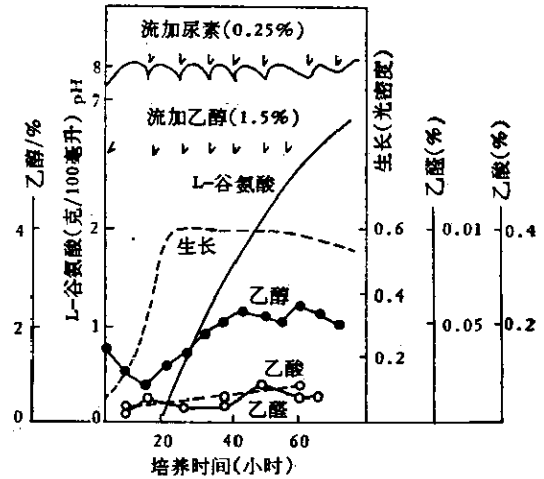


图 1 利用乙醇为原料发酵生成谷氨酸的过程

4. 副产物：短杆菌 B136 菌株在利用乙醇发酵生成谷氨酸时，还能生成甘氨酸、O-乙基高丝氨酸，丙氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、丝氨酸、赖氨酸等。

二、有机酸

以乙醇为原料发酵生成的有机酸有醋酸、L-苹果酸、柠檬酸、异柠檬酸、反丁烯二酸、曲酸、草酸等。现择要简介如下。

(一) 醋酸

用发酵法使乙醇氧化为醋酸的工艺早已有之。不久前，光石等^[23]报道了一种用变性酒精制造食用醋（含总酸 12.5%）的方法。生产规模为 10 吨发酵罐。

(二) 苹果酸

利用曲霉和担子菌等可用乙醇为原料发酵生成 L-苹果酸。立花等^[24]报道，一克分子乙醇经发酵后可生成约 0.5 克分子的 L-苹果酸，转化率约为 145%。他们发现当乙醇浓度为 2.1 克/100 毫升时，L-苹果酸的产率可达 1.83 克/100 毫升。

Tachibana 等^[25,26]报道，将裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 置于含有乙醇和碳酸钙的培养基中振荡培养，会生成显著量的 L-苹果酸和

一种粘性物质,其副产物是琥珀酸,与葡萄糖为碳源时的情况相似。用裂褶菌 IAM9006 菌株发酵,每克乙醇原料可生成 0.62 克 L-苹果酸^[27]。

(三) 柠檬酸

古川等^[28,29]报道,用木球拟酵母 (*Torulopsis xylinus*) IFO 0454 菌株,可用乙醇等醇类为原料发酵生成柠檬酸。柠檬酸产率为 5.2 克/升。

三、酶

由乙醇为原料能够生成的酶,比用糖类原料生成的要少得多。目前研究较多的有蛋白酶、葡聚糖酶、乙醇脱氢酶等。现简介如下。

(一) 蛋白酶

用乙醇为碳源可以培养某些假单胞菌来生成蛋白酶。

森原^[30]报道,在含 1% 乙醇的培养基中振荡培养铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) IFO 3455 菌株,发酵液中蛋白酶的活力约为 1.5 单位/毫升。Moriyama^[32] 报道,产粘质假单胞菌 (*P. myxogenes*) 在含 1% 乙醇的培养基中静置培养可生成蛋白酶。上山等^[33]报道,在含乙醇的培养基中振荡培养铜绿假单胞菌,5 天后发酵液中蛋白酶的活力为 50 单位/毫升,乙醇浓度以 2% (体积/体积) 为好。整个发酵过程如图 2 所示。

(二) 葡聚糖酶

Yamaguchi 等^[34]用含有葡聚糖的培养基从土壤中分离出一株棕色短杆菌解葡聚糖变种 (*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*), 它能以乙醇为碳源发酵生成葡聚糖酶。在 30 升发酵罐中所得发酵液,该酶活力为 290 单位/毫升。

(三) 乙醇脱氢酶

Schimpfessel 最先报道过,啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在以乙醇为碳源的培养基中,可以生成乙醇脱氢酶。Zink^[35] 报道,粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) 培养在以蔗糖、醋酸、乙醇为碳源的培养基中,也能生成乙醇脱氢酶。而且由于所用碳源不同,生成的乙醇脱氢酶的底物专一性和耐热性也各不相同。Tapacoba 等^[36]

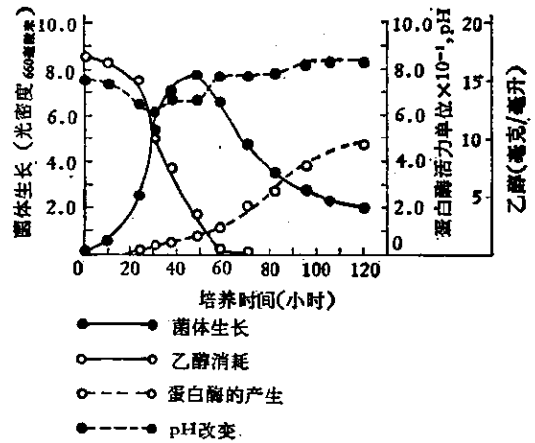


图 2 利用乙醇为原料发酵生成蛋白酶的过程

报道,把啤酒酵母、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 和克鲁斯假丝酵母 (*C. krusei*) 培养在含有葡萄糖、石蜡、乙醇或醋酸为碳源的培养基上,所生成的乙醇脱氢酶的底物专一性及其它性质都有差异。Tachibana 等^[37]用裂褶菌 IAM 9006 菌株,以乙醇为碳源培养,从菌体中分离到依赖辅酶 I 的乙醇脱氢酶。另外,上山等^[38]从用乙醇作碳源培养的假丝酵母 EY1-2 的菌体中也分离出依赖于辅酶 I 的乙醇脱氢酶。

四、单细胞蛋白^[39-42]

用乙醇作为生产单细胞蛋白的碳源有很多优点,如纯度高、没有毒性;能和水混溶;与石蜡相比,对氧的需要量较低,产生的热量也较少等。同时乙醇易于用合成法制得,容易贮存和加工。因此用乙醇生产单细胞蛋白越来越受到人们重视。

(一) 菌种

能以乙醇为碳源生产单细胞蛋白的菌种类很多,目前多用酵母菌或细菌(见表 2)。

(二) 培养条件

美国 Amoco 公司的培养方法非常简单。将乙醇、无机盐和水灭菌后装入发酵罐,再加入氮源和接种后,即可进行发酵生产。日本三菱油化公司则是在 35℃ 下连续发酵生产。

(三) 成分及其应用

以乙醇为原料发酵生产的单细胞蛋白,成

表 2 以乙醇生产单细胞蛋白的几个单位

公司名	国别	菌种	生产规模
Amoco Co.	美	产朊假丝酵母	6800 吨/年
三菱油化	日	乙醇嗜热假丝酵母	100 吨/年
Slovnaft Co.		酵母	1000 吨/年
Exxon-Nestlé Co.	美, 瑞士	乙酸钙不动细菌	实验工厂

表 3 几种单细胞蛋白和蛋白质产品的成分

种 类		粗蛋白	核 酸	赖氨酸	蛋氨酸	脂 肪	
用乙醇 制取的 单细胞 蛋白	“圆酵母蛋白”	53	9	6.6	1.4	7	
	三菱油化公司产品	56	—	3.8	1.0	7	
	Slovnaft Co. 产品	53	8	7.9	1.6	6	
	Exxon-Nestlé Co. 产品	A	78	16	6.4	2.5	6
		B	80	3	6.7	2.8	7
用正构石蜡生产的酵母		55—60	7	7.4	1.8	9	
鱼 粉		60—65	—	7.0	2.6	5	
大 豆 粉		45—50	—	6.5	1.4	2	

分和石油酵母相似,营养价值高,可供人食用。(表 3)

美国 Amoco 公司的产品叫“Torutein”(可译为“圆酵母蛋白”),其干粉和粗麦粉一样,呈黄褐色。“圆酵母蛋白”含有 53% 的蛋白质,7% 的脂肪,5% 的粗纤维、21% 的糖类,6% 的水分和 8% 的无机盐,以及较丰富的维生素,营养比较丰富。同时,所含必需氨基亦较丰富。

乙醇代粮发酵的一些特点

乙醇与葡萄糖、醋酸、石蜡等的理化性质差异很大,在它作原料进行发酵时有一些特点。

一、发酵的转化率

比较不同碳源的转化率常常是困难的。不过,用不同碳源生长的菌体成分基本相同,而且各种碳源都是通过糖代谢途径等基本途径进行代谢的。一般认为可以根据 ATP 的生成量来推算利用不同碳源得到单细胞蛋白的效率,进而比较其发酵转化率。表 4 列举了几种碳源的理化性质和用它们作原料时的发酵过程特点。

由表 4 可见,用乙醇为碳源时的菌体得率

低于用正构石蜡的,但比用葡萄糖和醋酸时要高,这表明乙醇代粮发酵的转化率较好于葡萄糖和醋酸。当发酵生成谷氨酸时,已完全证实。

二、氧的供应和发酵释热^[43]

由于乙醇分子中的含碳量比葡萄糖高,含氧量则较低,因此用乙醇为发酵原料时需要更多的氧气。据高桥等计算,用乙醇为碳源培养菌体时,所需氧气量比用葡萄糖为碳源时要高 2 倍。因此,在用乙醇进行发酵时要保证足够的氧气供应。

以乙醇为碳源的发酵过程中放出的热量——发酵热,也多于葡萄糖的。据高桥的计算,生产菌体时,用乙醇为碳源的发酵热亦比葡萄糖的高 2 倍。因此用乙醇为原料进行发酵时,必须采用有效而又经济的冷却方法。

三、挥发损失^[5]

乙醇易溶于水,在水溶液中可以有很高的蒸汽分压。在通气发酵过程中,乙醇很容易随排出的气体而散失。培养基中乙醇浓度越高,挥发损失也越大。如乙醇浓度 1% 时,损失约

表 4 几种碳源的比较

项目 \ 碳源	乙醇	葡萄糖	醋酸	正构石蜡	甲醇	甲烷
分子式	C ₂ H ₅ OH	C ₆ H ₁₂ O ₆	CH ₃ COOH	C ₁₆ H ₃₄	CH ₃ OH	CH ₄
分子量	46	180	60	226	32	16
含碳量(%)	52.2	40	40	85	37.5	75
固体得率(克细胞/克碳源)	0.88	0.50	0.43	1.40	0.67	0.88
需氧量(克分子/米 ³ ·小时)	166	56	—	193 (正十二烷)	88	—
发酵产热(千卡/米 ³ ·小时)	16000	4900	—	18000 (正十二烷)	9700	—
在水中的溶解度	无限	易溶	无限	不溶	无限	不溶
通气培养时的损失	多	无	无	多	多	—

12%，如浓度下降到0.1%，则仅损失1.2%。因此，必须控制在较低的乙醇浓度下进行发酵。这就要求在设计发酵工艺设备时考虑到流加乙醇的需要和防止乙醇的挥发。

四、乙醇的代谢途径

尽管由乙醇生成的代谢产物多种多样，但是它的代谢途径大体相同。目前一般都接受Mor等^[4]提出的代谢途径(图3)，即乙醇经过乙醛而被氧化成乙酸，再生成乙酰辅酶A，一部分

进入三羧酸循环，一部分进入乙醛酸循环，最后参与细胞的合成代谢。

展 望

与其它可用于发酵工业的原料相比，乙醇具有很多独特的优点，是一种很有发展前途的发酵原料。目前乙醇代粮发酵的研究正处在蓬勃兴起的阶段，潜力很大，前途无量。利用乙醇作原料发酵生产氨基酸和单细胞蛋白，已经或即将开始工业化生产，具有广阔的发展前途。可以预期，随着石油化学工业的发展，合成法生产乙醇的产量将会大大增加，乙醇代粮发酵的研究必将越来越引起人们的重视。

参 考 文 献

- [1] 尾崎浅一郎: 醱酵協會誌, 33:172, 1975.
- [2] 冲 俊一ら: 発酵と代謝, No. 19:73, 1969.
- [3] 大亦正次郎ら: 醱酵協會誌, 26:313, 1968.
- [4] 秋葉琥彦ら: 同上, 27:91, 1969.
- [5] 奥村信二: 同上, 33:185, 1975.
- [6] Oki, T. et al.: Agr. Biol. Chem., 32: 119, 1968.
- [7] 冲 俊一ら: 発酵と代謝, No. 19:82, 1969.
- [8] 中山 清ら: 公開特許公報, 昭48-10234, 1973.
- [9] 久保田浩二ら: 同上, 昭49-80289, 1974.
- [10] 久保田浩二ら: 同上, 昭48-8990, 1973.
- [11] 久保田浩二ら: 同上, 昭49-61388, 1974.
- [12] 吉永文弘 ら: 同上, 昭49-81587, 1974.
- [13] 久保田浩二ら: 同上, 昭47-45513, 1972.
- [14] 久保田浩二ら: 同上, 昭49-41592, 1974.
- [15] 久保田浩二ら: 同上, 昭48-72388, 1972.
- [16] 土田隆康ら: 同上, 昭48-75790, 1973.
- [17] 日本味の素株式会社: U. S. Patent, 3 818 433, 1974.
- [18] 久保田浩二ら: 公開特許公報, 昭48-87083, 1973.

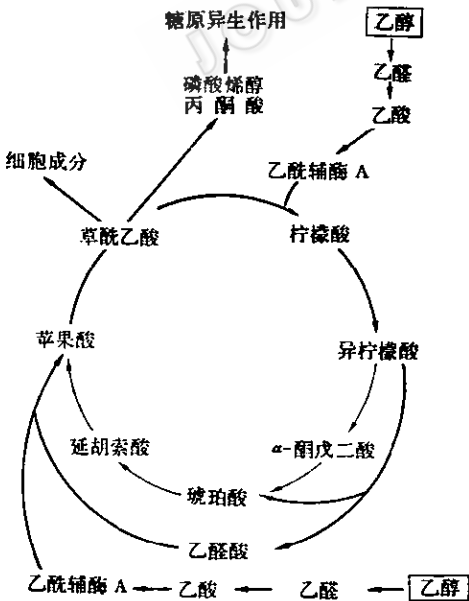


图 3 乙醇的代谢途径

- [19] 日本味の素株式会社: Brit. Patent., 1 286 208, 1972.
- [20] 久保田浩二ら: 公開特許公報, 昭 48-68794, 1973.
- [21] 久保田浩二ら: 同上, 昭 49-75784, 1974.
- [22] Murooka, Y. and T. Harada; *J. Bacteriol.*, **96**: 314, 1968.
- [23] 光石英樹ら: 日本公開特許公報, 昭 49-7493, 1973.
- [24] 立花 精ら: 醸酵工学雑誌, **44**: 588, 1966.
- [25] Tachibana, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **45**: 1130, 1967.
- [26] 立花 精: ビタミン, **43**: 161, 1971.
- [27] Tachibana, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **51**: 858, 1973.
- [28] 古川敏郎ら: 公開特許公報, 昭 48-96788, 1973.
- [29] 古川敏郎: 同上, 昭 49-25188, 1974.
- [30] 上山英夫堀越弘毅: 醸酵協会誌, **33**: 237, 1975.
- [31] 森原和之: 特許公報, 昭 40-27317, 1965.
- [32] Morihara, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**: 243, 1956.
- [33] 上山英夫ら: 醸酵工学雑誌, **50**: 787, 1972.
- [34] Yamaguchi, T. and S. Gocho: *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 2527, 1973.
- [35] Zink, M. W.: *Can. J. Microbiol.*, **15**: 265, 1969.
- [36] Тарасова, Н. В. и др.: *Приклад. Биохим. Микробиол.*, **8**: 172, 1972.
- [37] Tachibana, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **52**: 878, 1974.
- [38] 上山英夫ら: 昭和49年度日本醸酵工学会大会講演要旨集(日本大阪), p. 88, 1974.
- [39] 尾崎淺一郎: 食品工業, **17**(4): 27, 1974.
- [40] 梶田淑郎: 醸酵協会誌, **32**: 385, 1974.
- [41] 大草保司: 発酵と工業, **34**: 210, 1976.
- [42] Laskin, A. I.: Ethanol as a Substrate for Single Cell Protein Production, *Single Cell Protein from Renewable and Nonrenewable Resources* (ed. by Gaden, E. L. Jr.), John Wiley and Sons, New York, 1977, p. 91.
- [43] 高橋稔二, 醸酵協会誌, **33**: 45, 1975.
- [44] Mor, J. R. and A. Fiechter: *Biotech. Bioeng.*, **10**: 159, 1968.