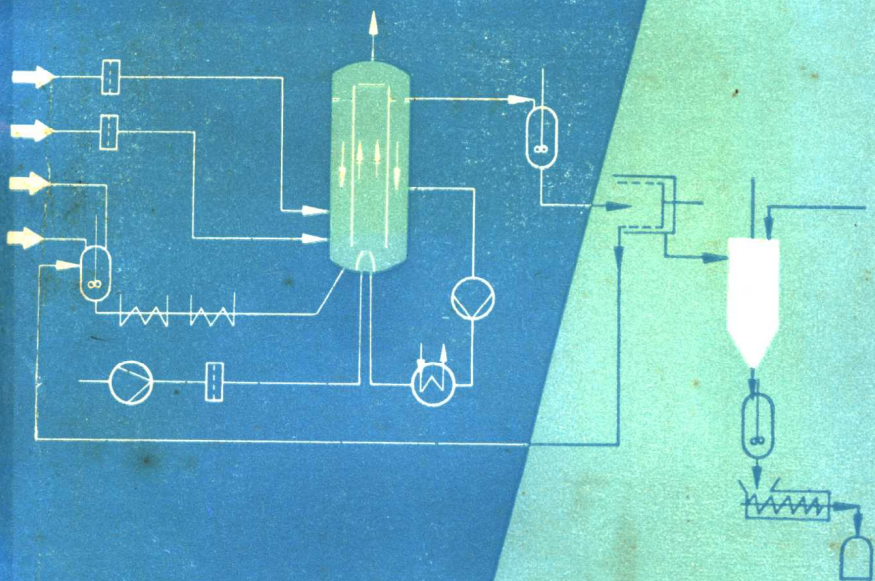


甲醇蛋白

——微生物学与工程技术



科学技术文献出版社

甲 醇 蛋 白

——微生物学与工程技术

北京饲料研究所编译

科学技术文献出版社

1982

内 容 简 介

本译文集汇集了世界各国研究甲醇蛋白的代表性论文共三十六篇,概括了自1969年以来国际上甲醇蛋白迅速发展的情况。

可供微生物学工作者、生化工程、营养学工作者与研究人员以及大专院校有关专业的师生参考。

甲 醇 蛋 白

——微生物学与工程技术

北京饲料研究所编译

科学技术文献出版社出版

中国科学技术情报研究所印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本: $787 \times 1092^{1/32}$ 印张: 12.125 字数: 324千字

1982年4月北京第一版第一次印刷

印数: 1—2,590册

科技新书目: 19—37

统一书号: 13176·131 定价: 1.10 元

编 者 的 话

开辟蛋白质资源和应用技术的研究是当前世界各国都十分重视的，并且已取得了很大的进展。其中工业化发展最快的是嗜甲基微生物，已经获得了实用性的成就。利用能同化甲醇的酵母或细菌来生产甲醇蛋白，这已成为解决人类蛋白质资源匮乏的途径之一。

英国帝国化学公司 (I.C.I)，西德的赫斯特-伍德公司 (Hoechst-Uhde)，美国的菲利浦石油公司 (Phillips)，法国的石油研究院与泰克尼伯公司 (IFP-Technip)，瑞典的奥普劳特 Norprotein 公司等，于七十年代，相继建成了不同规模的试验生产装置，有的达到年产千吨级的规模。英国的ICI 正在兴建一座年产五万至七万五千吨的大型生产厂。

为了发展我国的甲醇蛋白技术，我所甲醇蛋白组的同志，较系统、全面地查阅了各国的有关文献及资料，并将其中较实用的一部分编译成这本译文集。这里汇集了研究甲醇蛋白有代表性的论文36篇，概括了自1969年以来，国际上甲醇蛋白迅速发展的情况。按其内容共分八个部分。从微生物学和生化工程的角度阐述了甲醇蛋白研究的基础理论，生产工艺，营养性与安全性等，可供有关科技人员参考。

由于我们水平有限，编译中可能有不妥及差错，希读者予以指正。

北京饲料研究所 1980年

目 录

一、甲醇微生物的分离及筛选

- 好热高产甲醇酵母的筛选方法.....
.....〔日〕Kiyoshi Minami (1)
耐高温甲醇酵母的分离及筛选.....
.....〔美〕D.W. Levine等 (10)
甲醇细菌的分离和最适培养基成分.....
.....〔日〕Shinyi Goto (25)

二、甲醇微生物的分类与鉴定

- Kloeckera属甲醇酵母的分离及特性.....
.....〔日〕绪方浩一 (37)
甲醇酵母Candida methanophilum sp. nov. 的分
离及特性.....〔日〕Akio Mimura (60)
Candida属和Torulopsis属甲醇酵母的分离及特性
.....〔日〕Toshikazu Oki等 (71)
Pichia属甲醇酵母的分离及特性——一株新的高产耐
热甲醇酵母.....〔日〕Kiyoshi Minami等 (79)
甲醇酵母微体的亚细胞结构.....〔日〕Jiro Tsubochi (85)
新的嗜甲基细菌Methylomonas Clara的特性.....
.....〔西德〕W. Hohnloser等 (91)
革兰氏阳性甲醇细菌的分离和特性.....
.....〔日〕秋雄实村 (100)
甲醇氧化细菌的研究.....〔瑞典〕Lena Häggström (111)
海洋甲醇细菌的生长特性.....
.....〔日〕Masao Yamamoto等 (121)

一株同化甲醇的放线菌……………〔日〕Nobuo Kato(130)

三、甲醇微生物的代谢

酵母的甲醇代谢……………〔西德〕H. Sahm(134)

微生物菌体对甲醇和甲烷收率的理论研究……………

……………〔荷兰〕J. P. Van Dizken等(161)

四、甲醇蛋白的生产与环境条件

甲醇蛋白的最佳生产条件……………

……………〔瑞典〕Milan Dostalck等(174)

富集及分离甲醇酵母的最适条件……………

……………〔荷兰〕J. P. Van Dijken(182)

在以甲醇为唯一碳源的基质上酵母的生长……………

……………〔美〕H. Asthana (185)

甲醇细菌的好热混合培养……………

……………〔美〕Dradleg Snedecor (189)

五、甲醇微生物的代谢产物

甲醇的发酵产品……………〔日〕T. Oki等(199)

用甲醇细菌生产维生素B₁₂的研究(1)……………

……………〔日〕Naomichi Nishio等(204)

用甲醇细菌生产维生素B₁₂的研究(2)……………

……………〔日〕Naomichi Nishio等(217)

用Pseudomonas N 842生产辅酶Q₁₀……………

……………〔日〕Yohei Natori等(229)

用甲醇细菌Arthrobacter globiformis SK-200生产

L-丝氨酸……………〔日〕Yoshiki Tani等(231)

用利用碳氢化物的放线菌生产抗菌素……………

……………〔日〕Noboru Yoshida等(239)

六、甲醇蛋白的工艺

用甲醇生产单细胞蛋白: 细菌……………〔英〕J. S. Gow等(241)

日本三菱瓦斯的甲醇蛋白技术……………

-日本三菱瓦斯化学公司新潟研究所(251)
 用甲醇生产单细胞蛋白——Norprotein工艺.....
〔瑞典〕Håkan Mogren, DSc(263)

七、甲醇蛋白工程理论的研究

- 甲醇单细胞蛋白的研究与发展.....〔日〕永井一郎(272)
 甲醇同化菌发酵工程的各种问题.....〔日〕三村 精男(277)
 对生长抑制性较小的甲醇供给方法及装置.....
〔日〕Kiyosih Minami等(301)
 耶耳球拟酵母(T.ernobii)在甲醇上生长的动力学
〔委内瑞拉〕H. Elmayergi等(310)
 甲醇蛋白生产中空气提升式发酵罐内部结构设计的研
 究.....〔日〕Michio Kuraishi等(317)
 甲醇单细胞蛋白生产得率因素.....Goldberg (326)

八、甲醇蛋白的营养性与安全性

- 甲醇蛋白安全性试验的准则——IUPAC推荐的关于
 以SCP作为饲料蛋白的试验准则Ⅱ(修定稿).....(345)
 单细胞蛋白(SCP)的组成与营养价值.....
〔西德〕E. Schulz等(367)

一、甲醇微生物的分离及筛选

好热高产甲醇酵母的筛选方法

〔日〕 Kiyoshi Minami 等

自从Ogata等首先发现甲醇酵母以来,近来又报道了许多利用甲醇的酵母,并论述了许多有关用甲醇生产单细胞蛋白的工程问题。

单细胞蛋白生产的成本显然取决于所使用微生物的特性:如生长温度、生长率、得率、蛋白含量和对营养的需求等。在所测定的酵母中,从最高比增殖速度和生长温度来看Hansenula polymorpha DL-1被认为是最好的酵母之一。这株酵母是采用连续富集培养的方法分离出来的。

为了分离象Hansenula polymorpha DL-1那样生长率高而好热的酵母,我们从热带和亚热带采集了一些土样,选出了同化能力突出的酵母,它们在40℃下生长时,稀释率高于0.25/小时。也进行了一些筛选程序的试验。

本文论述其所用的分离和筛选方法,并提出了获得好热高生长率甲醇酵母的有效程序。

材 料 和 方 法

菌种的分离

为了得到好热酵母并寻找有效程序,从日本的五个地区共采集

了13,803个土样, 保藏于 5 °C 冰箱中。用普通富集培养和连续富集培养方法分离。

普通富集培养方法如下: 把少量土样投入 5 毫升含有 0.5% (体积/体积) 甲醇的 M-1 培养基 (见表 1) 的试管内。在 40°C 下, 于 280 次/分钟的往复式摇床上培养 4 天。在相同培养基上富集培养两次以后, 再用单菌落分离法纯化两次。

表 1 甲醇培养基的成分

成 分	M-1(克/升)	M-2(克/升)	M-3(克/升)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0	4.0	4.0
KH_2PO_4	2.0	2.0	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	0.5	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.01	0.01
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.05	0.05
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	—	0.5	0.5
酵母提取物	0.5	—	0.5
氯霉素	0.1	—	—
维生素混合液*	—	1毫升/升	—
pH	4.5—5.2	6.0—6.2	6.0—6.2

* 维生素混合液: 在 1 升蒸馏水中含有维生素 B₁ HCl 400 毫克, 生物素 2 毫克, 维生素 B₁₂ 200 毫克, 维生素 B₆ · HCl 400 毫克, 肌醇 2000 毫克, 烟酸 400 毫克, 叶酸 2 毫克, 维生素 B₁₂ 10 毫克, 泛酸钙 400 毫克, 对氨基苯甲酸 200 毫克。

除此之外, 还有一些同化甲醇的微生物是用 Levine 和 Cooney 所描述的方法分离的。方法如下: 把少量土样投入 500 毫升发酵瓶中, 瓶内含 0.5% 甲醇的 M-1 培养基。在 40°C 下通气搅拌培养。培养 20 小时之后, 由间歇培养改为连续培养, 按 0.115/小时的稀释率连续加培养基, 再培养 4 天。每次间歇培养的投样数由用普通富集培养法分得的菌数而定。从 Ishigaki 岛上采的土样都用此法进行了

分离并用单菌落法进行了纯化。

分离菌株同化甲醇的能力是在1.5%甲醇的M-2培养基测定的。

分离菌的筛选方法

每个分离菌都培养在烧瓶和恒化器中，比较其比增殖速度或稀释率，于40℃下，选择生长率高的酵母。在培养基中甲醇保持低浓度，以防细胞生长受抑制。在500毫升烧瓶内装100毫升的M-3培养基上，接种1毫升培养液，在40℃下培养于转速为每分钟110次的往复式摇床上。甲醇由挂在瓶子上部的5毫升小瓶以气体形式连续供应。

为了测定最高稀释率，在一个带有磁力搅拌器的500毫升发酵罐中进行恒化器培养的研究，结果见图1。在350毫升含有1%甲醇的M-3培养基中接种5毫升培养液。在间歇培养进行16小时之后，开始进行连续培养，以60毫升/小时的速度添加含有0.2%甲醇的新鲜M-3培养基。培养基的饲加速度逐渐增加到85毫升/小时。发酵罐内培养基用溢流的方法总保持为300毫升的体积，见图1。温度保持40℃，通气量为3升/分钟。开始的pH为4.0，在连续培养时允许降为3.0。

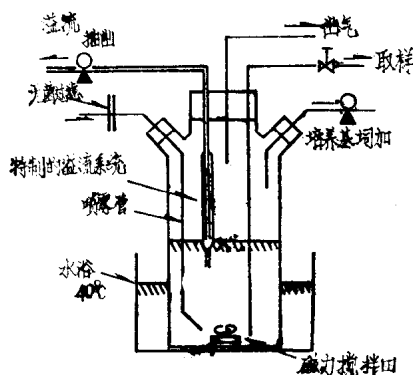


图1 恒化器培养用的发酵罐

最适生长温度

最适生长温度是用TN-3型温度梯度仪测定的。在一个含0.8%甲醇的5毫升M-3培养基的L形试管中，接种0.1毫升培养液，在18—54℃下，振荡培养16小时。

细胞浓度和生长特性

细胞浓度用培养液在610nm的光密度和细胞干重所制的校准曲

线来估算, 在本试验中OD和细胞干重(克/升)间的关系约为2:1。

平均比增殖速度(μ)由下列公式计算:

$$\mu = (I_n X_2 / X_1) / (t_2 - t_1),$$
 X_2 和 X_1 是培养 t_2 和 t_1 时间的OD值。

在连续培养中稀释率 D 由以下公式决定: $D = F/V$, F 是连续增加培养基的流速(毫升/小时), V 是培养液的体积(毫升)。

生长率(DX)的计算是稀释率(D)乘以光密度(X)。

甲醇浓度的分析: 甲醇浓度是用Hitachi气相色谱分析的, 用一个3米×3毫米的不锈钢圆柱, 柱内装满外层为5% Reoplex 400和5% OV17 Chromosorb T。探测器是热电偶型的。圆柱温度为80℃, 携带气体(He)的流速为25毫升/分钟。测定时将1毫升发酵液样品直接注入柱中。

结 果

好热酵母的分离

在单细胞蛋白的商品生产上, 生产率高就降低了投资额和运转费用, 但每单位培养液散发的热和生产率成正比。因此要选能在高温下生长的酵母。

为了分离好热甲醇酵母, 从热带和亚热带采集了一些土样。从这些样品用普通间歇富集培养的方法分离出来256个生长于40℃下的菌株。如图2所示。就现有试验结果来看, 好热酵母的分布和地区的气候有关。

除普通间歇富集培养外, 还采用了连续富集培养法从Ishigaki岛的土样中分得58个酵母菌株。此法比间歇富集培养法分得的菌少。

把分得的314个菌株在1.5%甲醇M-2培养基上, 于40℃下培养两天。其中生长好的(OD值超过2的)有243个菌株。再进一步筛选。

表 2 土壤样品数和分得数

采集地区	土壤样品数	分得数	分得率*	得到菌株**
普通富集培养				
日本Main岛	394	0	0	0
Okinawa岛	5744	2	0.03	2
Miyako岛	1853	3	0.16	3
Ishigaki岛	2088	78	3.75	68
Thailand	3724	173	4.65	157
连续富集培养				
Ishigaki岛	2088	58		13
总 数	13803	314	2.27	243

* 分得率: 采集数/土样数 $\times 100$ 。

** 得到菌株: 为在40℃下, 在甲醇液体培养基 M-2 (含甲醇1.5%) 上生长良好的菌株。

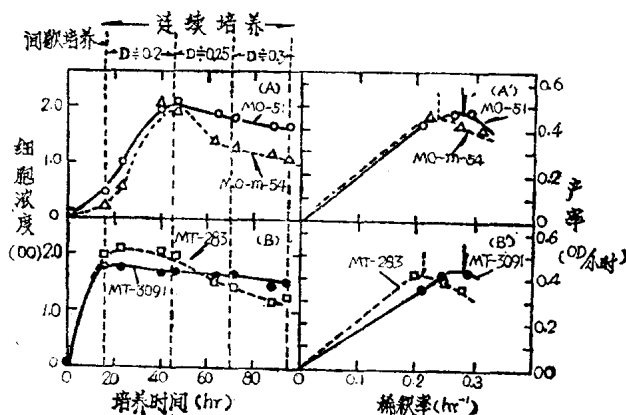


图 2 在连续培养中的生长特性

本图所表示的是 4 个典型菌株 Mo-51, Mo-m-54, MT-283 和 MT-3091 在间歇培养 16 小时之后, 开始进行添加 M-3 培养基的连续培养。在连续培养中, 稀释率以每小时增加 0.05 的速度由 0.2 增高到 0.3。细胞浓度和时间的关系见 (A) 和 (B), 其生产率见 (A') 和 (B')。OD 值和细胞干重的关系约为 2:1。

烧瓶培养筛选

在40℃下，用烧瓶培养法测定上述 243 个菌株的生长。甲醇继续用气体形式供应以防由于甲醇浓度高而造成菌株滞留期的延长。

为了被试菌株菌龄的一致，接种量应尽量小，而且在22小时内不同时期接种，要求种子液的 OD 值基本上一致。烧瓶培养重复 4 次，其中每个重复的培养时期为14, 16, 19和 20 小时。结果从343 个菌株中选出了平均比增殖速度高于0.24/小时的59个菌株。

恒化器培养筛选

将上述59个菌株在0.2%甲醇培养基上,于 40℃下,用连续培养进行比较。稀释率由 0.2/小时以 0.05/小时的速度逐渐增加到0.3/小时。一些典型菌株的连续培养见图 2。Mo-m-54的生长率在前述间歇培养中是最低的,但其在最高生产率时的稀释率高于MT-283 菌株。在间歇培养中 MT-283 的生长率高于 Mo-51,但相反的,在恒化器中MT-283在最高生产率时的稀释率低于 Mo-51。MT-3091 菌株在间歇培养中生长率高,而在连续培养时,在最高生长率时的稀释率也高。

根据这个结果发现间歇培养的生长率不是总和连续培养的最高稀释率正相关。现在试验的菌株可分做三种类型。第一种在间歇培养中生长率高,而且在连续培养中最高生产率时的稀释率也高,第二种生长率低但稀释率高,第三种生长率高但稀释率低。

将59个菌株最高生产率时的稀释率进行了测定,绘于图 3。由此选出

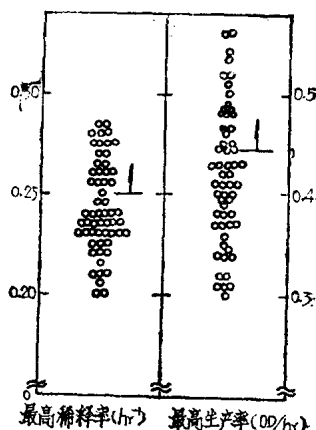


图 3 用烧瓶培养筛选出的 59 个菌株的最高稀释率和最高生产率分布

59个菌株的最高稀释率和最高生产率是从恒化器中测得的。根据此图选出了优良酵母21个菌株。这21个菌株的生长率高于0.25/小时,最高生产率高于0.445OD/小时。

了在最高生长率时，稀释率高于 0.25/小时，而且其最高生长率高于 0.445OD/小时的 21 个菌株。

21 个菌株生长最适温度的测定

将所选出的 21 个菌株用温度梯度仪进行了最适生长温度的测定。证明这些菌株在 25—45℃ 可以生长但在 37—42℃ 更为合适。

筛选程序的比较

表 3 所选出的 21 个菌株的几种生长特性

菌 株 号	稀 释 率*	最高生长率 OD/升·小时	最适温度℃
MT-3672	0.285	0.45	38—41
MT-3722	0.285	0.46	37—41
*Mo-132	0.280	0.445	38—41
*Mo-128	0.280	0.52	39—42.5
MT-3687	0.275	0.45	35—42
MT-3159	0.275	0.445	35—41
*Mo-110	0.275	0.56	37—40
*Mo-104	0.270	0.56	37—40
MT-3091	0.270	0.445	36—41
*Mo-68	0.265	0.54	37—41
Mo-51	0.275	0.48	38—42
MT-3037	0.265	0.48	36—41
MT-3040	0.265	0.535	38—42.5
*Mo-95	0.260	0.50	38—41
*Mo-m-45	0.260	0.485	37.5—41
*Mo-94	0.260	0.53	38—41
MT-3088	0.260	0.48	37—42
Mo-53	0.255	0.49	36—40.5
MT-3150	0.255	0.465	36—40
MT-3310	0.255	0.51	38—41
MT-3650	0.255	0.485	35—40

* 表示在最高生产率的稀释率。

表3概括了所选出的21个菌株的生长情况。在这些材料中，MT系的菌株是从Okinawa岛的土样中得到的，有*号的是从Ishigaka岛的土样中得到的。Mo-m系是用连续富集培养法分离得到的。

用间歇富集培养法从Ishigaki岛的样品中选出7个菌株，而用连续富集培养法从相同样品中只选出了1个菌株。说明连续富集培养法效力虽高但丢失了很多可以达到高稀释率的酵母。

讨 论

从经济上看，成本主要决定于发酵罐的规模、热的散发、通气及搅拌的效率。选择高温下生长率高的菌种可降低成本。

当细胞得率是甲醇消耗量的40%，而蛋白含量占干重的50%时，用Mateles公式可以算出热的散出为8100千卡/公斤细胞。当生产率达到5公斤细胞干重/立方米·小时，散的热为40,500千卡/升·小时。散出的热这样大，所以需要采用好热菌株。

通过寻找分离和筛选的有效方法，我们得到了好热而生长率高的酵母，并弄清了以下问题。

1. 从热带地区采的土样中好热酵母多。
2. 从两种富集培养方法来看，间歇培养法看来麻烦而实际有效，因为从Ishigaki岛的土样中通过连续富集培养丢掉很多突出的菌株。

3. 图4表示在烧瓶培养的光密度和平均比增殖速度的典型分布图。所选出的59个菌株在图4中分布很集中。而在恒化器中培养时却分布的很分散如图3所示。两种培养法中只发现少数菌株是相应的。因而只从烧瓶间歇培养很难筛选出好菌株。

459个菌株的生长率可分做三个类型，第一种在间歇培养中生长率高在恒化器培养中也能达到高的稀释率。第二种在间歇培养中生长率低但稀释率高。第三种在间歇培养中生长率高但稀释率低。

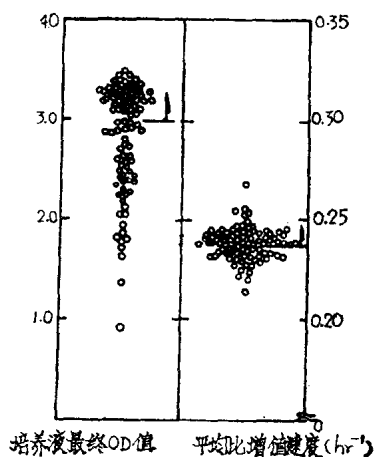


图4 在烧瓶培养中最终OD值和比增殖速度的典型分布

此图表示在烧瓶培养中生长率的第二次比较。培养时间为19个小时。根据这个生长率的比较，选出了最后OD值高于0.3而其平均比增殖速度高于0.24/小时的菌株。这个分布比第一次比较培养（14小时）更集中，但比第三次比较培养（16小时）和第4次比较培养（20小时）要分散。

而在这些类型之外，在分离中还有第四种类型，在间歇培养中表现生长率低的酵母。可能这种类型通过在烧瓶中的筛选丢掉了。第二种类型可能也和第四种类型一起丢失了。因为它们在间歇培养中不表现高生长率。在这些试验中，在最后选出的21个酵母中，第二种类型的酵母只有1个（Mo-m-45）。

（林伯荃译自 J. Gen. Appl. Microbio.
24:155, 1978）

耐高温甲醇酵母的分离及筛选

(美) D. W. Levine C. L. Cooney

从土壤样品中分离出一株可以甲醇为其生长的唯一碳源及能源的菌株，此菌株经鉴定为多形汉逊酵母。采用简单的无机盐培养基在37℃下进行连续富集培养来选择菌株。此菌株命名为DL-1，它在含有甲醇（0.5%）、生物素及维生素 B₁ 的无机盐培养基中，于 pH 为 5.5；温度为 37—42℃ 的条件下培养，具有最大的比增殖速度为 0.22 小时⁻¹。在恒化器中培养温度达到 50℃ 仍能生长，45℃ 生长最旺盛。此酵母在甲醇培养基中生长的最高得率为 0.36 克干细胞重/克甲醇，对氧的收率为 0.37 克干细胞重/克氧分子。分离出的菌株蛋白质含量为 46%，核酸总含量在生长率由 0.08 小时⁻¹ 升到 0.20 小时⁻¹ 由 5.0% 升为 7.0%。酵母蛋白质中氨基酸组成表明，它可以作为极佳的食用蛋白的来源。用大白鼠作的饲养研究表明，此酵母无毒性影响。

微生物利用甲醇作为唯一碳源的能力已充分加以肯定。这方面大量工作是有关细菌方面的；最近几年，Ogata, Asthara, Sahm, Wagner 及 Hayeu 等及其同事用甲醇酵母进行了一些工作。然而，在这些资料中有关酵母利用甲醇的资料数量仍很少。本研究的目的是分离并研究在一定量的无机盐培养液中，温度高于 35℃ 的情况下，利用甲醇为唯一碳源及能源酵母的生长特性。我们这样选择是由于以下的原因。

1. 通过离心或过滤，收获酵母明显地比细菌要容易而且省钱。酵母个体比细菌大。