

国外应用微生物

(第二辑——石油发酵)

国外应用微生物编译组 编
上海有机化学研究所

上海科学技术情报研究所

毛主席语录

独立自主、自力更生、艰苦奋斗、勤俭建国。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

对于外国文化，排外主义的方针是错误的，应当尽量吸收进步的外国文化，以为发展中国新文化的借镜；盲目搬用的方针也是错误的，应当以中国人民的实际需要为基础，批判地吸收外国文化。

打破洋框框，走自己工业发展道路。

目 录

1. 国外石油蛋白的生产概况.....	1
2. 英国如何从烃类生产蛋白质.....	11
3. 法国如何用石油制造食用酵母.....	15
4. 从正构烷烃到蛋白质.....	17
5. 蛋白质胶粘剂及其制备方法.....	22
6. 用生长在十三烷为主的石油正构烷烃馏份物中的假丝酵母生产脂肪酸 及类脂.....	30
7. 烃类发酵设备.....	39
8. 用表面活性剂乳化烃类发酵液.....	44
9. 柴油中培养酵母.....	48
10. 硫磺细菌在石油培养基中对硫的同化性.....	51

国外石油蛋白的生产概况

〔编者按〕蛋白质是人和动物必需的营养物质，以往主要由动、植物提供，其中动物蛋白的生成又依赖着植物作饲料。这些蛋白的生产受气候条件，耕地面积及动、植物生长速度等影响，因此，要在工业上生产蛋白，一直是人们生产斗争和科学实验中的重要内容。

在本世纪初就有人知道有些微生物能利用石油进行生长，后来，随着石油开采量的增加又发现了有些微生物能以石油为原料生产蛋白质。由于微生物繁殖迅速和只要建立工厂就可生产，所以石油生产蛋白作为开辟食物资源的工作已受到了世界各国有关方面的重视。根据毛主席“知己知彼，百战不殆”的伟大教导，现将国外研究和生产石油蛋白的情况作一概述。

生产石油蛋白的菌株

能利用石油烃作碳源和能源的微生物种类很多，约有二十八个属。这些菌除了存在于油田、炼油厂等沾有石油的土壤中外，还存在于一般的菜园、阴沟污泥等处。目前，世界上作为生产石油蛋白的微生物主要是酵母和细菌(表1)，其中利用烃类较好的是假丝酵母属和假单孢菌属的菌株(表2)。

表1 生产石油蛋白的主要菌种^{〔2〕}

菌	名
(1) 酵母类:	
假丝酵母属	
热带假丝酵母	(<i>Candida tropicalis</i>)
解脂假丝酵母	(<i>C. lipolytica</i>)
中型假丝酵母	(<i>C. intermedia</i>)
石油假丝酵母	(<i>C. petrophilum</i>)
白假丝酵母	(<i>C. albicans</i>)
阴沟假丝酵母	(<i>C. cloacae</i>)
皱折假丝酵母	(<i>C. rugosa</i>)
克柔氏假丝酵母	(<i>C. krusei</i>)
季也蒙氏假丝酵母	(<i>C. guilliermondii</i>)
树木假丝酵母	(<i>C. arborea</i>)
强健假丝酵母	(<i>C. robusta</i>)
产膜假丝酵母	(<i>C. pelliculosa</i>)
飞机型假丝酵母	(<i>C. reukaufii</i>)
	<i>C. pulcherrima</i>
	<i>C. maltosa</i>
	<i>C. parapsilosis</i> .
酒香酵母属	

菌	名
	石油酒香酵母 (<i>Brettanomyces petrophilum</i>)
	汉逊氏酵母属
	异常汉逊氏酵母 (<i>Hansenula anomala</i>)
	Mycotorula 属
	<i>Mycotorula japonica</i>
	毕赤氏酵母属
	<i>Pichia</i> sp.
	红酵母属
	深红酵母 ((<i>Rhodotorula rubra</i>))
	丝孢酵母属
	日本丝孢酵母 (<i>Trichosporon japonicum</i>)
	圆酵母属
	石油圆酵母 (<i>Torulopsis petrophilum</i>)
	无名球拟酵母 (<i>T. famata</i>)
	松球拟酵母 (<i>T. pinus</i>)
(2) 细菌类:	
假单孢菌属	
	铜绿色极毛杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	萤光极毛杆菌 (<i>Ps. fluorescens</i>)
	<i>Ps. methanica</i>
	<i>Ps. desmolytica</i>
诺卡氏菌属	
	不透明诺卡氏菌 (<i>Nocardia opaca</i>)
	红色诺卡氏菌 (<i>N. rubra</i>)
	珊瑚色诺卡氏菌 (<i>N. corallina</i>)
小球菌属	
	<i>Micrococcus cerificans</i>
棒状杆菌属	
	石油棒状杆菌 (<i>Corynebacterium petrophilum</i>)
小杆菌属	
	草分枝杆菌 (<i>Mycobacterium phlei</i>)
芽孢杆菌属	
	<i>Bacillus</i> sp.
甲烷极毛杆菌属	
	甲烷极毛杆菌 (<i>Methanomonas methanica</i>)
Methylococcus 属	
	<i>Methylococcus capsulatus</i>

表 2 烃类氧化菌的性质^[3]

菌 株	基 质	菌体收率 (%)	增殖速度 (小时)	蛋白含量 (%)
假丝酵母属				
树木假丝酵母	正构烷烃	109.5	3.8	47.9
季也蒙氏假丝酵母	正构烷烃	84.6	3.1	53.5
中型假丝酵母	正构烷烃	89.1	4.3	51
解脂假丝酵母	正构烷烃	101.7	3.8	47.6
产膜假丝酵母		103.0	3.5	55
石油假丝酵母	正十四~ 正十八烷	100 以上	—	55~60
飞机型假丝酵母	正构烷烃	91.0	3.8	45.3
强壮假丝酵母	正构烷烃	85.0	3.1	53.4
皱折假丝酵母	正构烷烃	98.5	3.5	47.2
热带假丝酵母	正构烷烃	94.4	3.5	58.8
圆酵母属				
无名球拟酵母	正构烷烃	97.3	4.3	50
红酵母属				
深红酵母	正构烷烃	97.6	3.8	52.5
诺卡氏菌属				
不透明诺卡氏菌	正十四~ 正十七烷	132	5	50
小球菌属				
小球菌	正十六烷	89	0.5~1.0	72.1
假单胞菌属				
极毛杆菌	正十八烷	107	2.2	—
极毛杆菌	甲 烷	58	3~3.5	62

为了廉价地进行菌体蛋白的生产，必需选择具备以下条件的菌株：①菌体繁殖速度快，可缩短生产周期，节约动力，降低成本。②菌体要求的培养基组成简单。③菌体对基质石油烃的乳化力强，可以不用乳化剂。④菌体利用烃类完全，菌体收率高。⑤菌体含有的蛋白质(必需氨基酸)和维生素丰富，并且容易消化。⑥菌体培养适温广，细菌能适应 50~60℃；酵母能适应 38~40℃。这样可以节省因发酵热所需的冷却装置。⑦菌体生长所适应的 pH 值范围广，特别是要能适应低 pH 值，以防止杂菌的污染。⑧菌体个体大，以便油菌水的分离。⑨菌体无病原性及毒性，并有相对稳定性，不易发生变异。

生产石油蛋白的原料

生产石油蛋白的原料可分为四类(表 3)。

表 3 石油蛋白发酵原料的比较^[3]

	柴 油	正构烷烃	天然气甲烷 (90~92%)	石油化工 产品
正构烷烃含量	10~20%	约 98%	—	—
菌体收率	8~18%	80~140%	50~60%	50~80%
增殖速度	稍 慢	较 快	慢	较 快
菌体分离	困 难	比较容易	容 易	容 易
菌体的精制	有机溶剂洗净	温水洗	水洗	水洗
发 酵 热	大	大	特大	较小
生物试验	必需长期试验	短期良好	短期良好	短期良好
原料供应量	大	小	大	小

馏份油生产蛋白

馏份油生产菌体蛋白，就是一般说的石油发酵脱蜡。它是将油品加入培养基，微生物转化其中的正构烷烃，这样，油品的脱蜡和菌体蛋白的生产同时进行(表 4)。微生物能利用 180~400℃ 范围的石油馏份油(包括煤油、轻柴油、重柴油和轻质润滑油)，含正构烷烃的碳链数是 C₁₀~C₂₂(表 5)。但该法所得菌体量较小，在后处理时，油菌分离比较困难，得到的菌体要用表面活性剂和有机溶剂洗脱。此外，柴油等油品中还含有芳烃化合物，因而生产的菌体蛋白用作动物饲料，必需进行长期的试验，证明没有毒性才能食用。

表 4 石油发酵脱蜡效果

油 品 来 源		扎禾宰丁	伊 拉 克		科威特	哈西-达沙乌德
馏 程 (°C)		305~351	223~400	244~371	198~400	235~394
含蜡量(%)	脱蜡前	13.3	14	7.65	8.8	3.2
	脱蜡后	0.2	1.4	0.4	0.9	0.6
凝固点(°C)	脱蜡前	+8	+22	-1	+19	-1
	脱蜡后	-25	-16	-25	-20	-37
菌体收率(%)		12.5	7.8	15.2	8.1	8.5

表5 石油馏份的组成^[4]

煤 油 馏 份 180~230°C	轻 柴 油 馏 份 230~305°C	重柴油及轻质润滑油馏份 305~405°C
烷 烃 系 (%) { 正构烷烃(C ₁₀ ~C ₁₆) 23.6 } 38.9 { 异构烷烃 15.3 }	(C ₁₃ ~C ₁₈) 23.1 } 35.5 12.4 }	(C ₁₆ ~C ₂₂) 17.6 } 27.4 9.8 }
环烷烃系 (%) { 单环烷烃 33.1 } { 双环烷烃 12.9 } 46.0 { 多环烷烃 — }	27.2 13.9 } 44.5 3.4 }	22.2 14.4 } 46.1 9.5 }
芳香烃系 (%) { 单环芳烃 14.6 } { 双环芳烃 0.5 } 15.1 { 多环芳烃 — }	12.3 7.7 } 20.0 — }	12.1 7.9 } 25.1 5.1 }

正构烷烃生产蛋白

在石油化工中,从石油馏份油分离正构烷烃一般有两种方法:分子筛法和尿素络合法(表6)。分离所得正构烷烃的纯度一般为98%左右,其余部分含有异构烷烃、环烷烃、芳香烃,其中可能混有致癌的多环芳烃化合物,如3,4-苯并芘,1,2-5,6-二苯蒽等,现正在研究其容许限度(一般要在0.5 ppb.以下),但还未确定可靠的分析方法。因此在作为原料以前,最好用浓硫酸进行洗脱除去芳香烃^[6]。正构烷烃虽然价格较贵(占蛋白生产费用的30~40%),但它转化率大,几乎可以达到100%,并且容易分离,菌体不需精制,只要用热水洗净,干燥后就成了制品。它的发酵工艺流程简单,世界上石油发酵工厂多数用其作原料。

表6 两种方法分离正构烷烃的比较^[6]

方 法	分 子 筛 法	尿 素 络 合 法
原 理	正构烷烃由分子筛(硅铝化合物)吸着,其它成分自由通过,再用脱吸剂(N ₂ 、NH ₄ 、低分子烃)或用减压法,使正构烷烃脱洗下来。	尿素在乙醇或丙酮等溶剂活化下,改变晶体构造,与正构烷烃络合,这样就与其它烃类分离,再用热溶剂,使正构烷烃分离出来,尿素回收,循环使用。
正构烷烃纯度	98% 以上	90~98%
碳 链 数	C ₄ ~C ₂₂ 一般 C ₁₀ ~C ₁₄	碳链范围较广 C ₁₀ ~C ₄₀

气态烃生产蛋白^[7]

自1906年发现利用甲烷的甲烷氧化菌后,就陆续有人发现乙烷、丙烷氧化菌,但当时对它们进行研究主要是为了石油勘探。从气态烃制取蛋白,还只是近十年来提出的课题。

气态烃制取蛋白的优点是:气态烃(石油裂化气和天然气-沼气)的来源广;价格低廉(仅是正构烷烃的1/10~1/15);后处理只有菌和水,分离简单;不象石油制取蛋白那样因残油不能除尽而存在毒性问题。缺点是:菌体生长慢、转化率低、耗氧量大和发酵热大;另外,甲烷是易燃气体,工作时必须防止燃烧和爆炸。

利用气态烃的一般细菌是假单孢菌属和分枝杆菌属等。最近有报道:当培养基中加入维生素B₁及生物素时,某些假丝酵母、圆酵母以及红酵母也能氧化甲烷和丙烷。

石油化工产品生产菌体蛋白

随着石油化工工业的发展,将大量产生石油裂解合成的二次产品,如脂肪醇和脂肪酸等,这些产品都可用来繁殖细菌和酵母生产蛋白。

酵母和细菌利用石油化工产品的情况示于表7。其中利用甲烷作碳源生长的细菌几乎都能利用甲醇,其生长速度在甲醇中要比在甲烷中快,在甲烷中生长的世代时间为3.5小时,在甲醇中只要2小时^[8]。酵母和细菌中,除了表中所列利用甲醇、乙醇、醋酸的

菌种外,还有利用正丙醇、正丁醇、乙二醇、丙二醇等化合物的菌种。

表 7 酵母和细菌在石油化工产品中的产率

菌 名	基 质 (浓 度)	细胞产率(克/升)
细 菌 ^[9]	甲醇或甲烷	4.5
酵 母 ^[10]	甲 醇(3%)	4.6
汉逊酵母 ^[11]	乙 醇(6%)	34
假丝酵母 ^[3]	乙 醇(6%)	35
产朊圆酵母 ^[12]	醋 酸	13

石油发酵生产蛋白的生化和工艺

基质烃的乳化分散

烃类发酵与以往碳水化合物的发酵有明显的不同。烃类几乎不溶解于水,而菌体对烃类的吸收要靠两者的直接接触,因此为使菌体能很好地吸收基质,必需使烃类充分乳化分散在水溶液中成为极细的乳状液,通常可用通风搅拌和加无毒性的乳化剂来解决。

通风搅拌是机械分散方法。搅拌的形式和搅拌速度对分散效果有明显的影响(表 8)。

表 8 搅拌型式和速度对菌体产量的影响^[13]

发 酵 罐 型 式	搅拌速度 (转/分钟)	通气速率 (升/分钟)	细胞产量 (克)
标准型有挡板搅拌	1520	5	9
		10	9
标准型无挡板搅拌	715	4	3.1
		5	3.6
	1520	5	13.5
		10	13.5

菌种:假丝酵母属(*Candida*) 基质:煤油
培养基体积:5升

添加的乳化剂是无毒的非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇系,吐温系,Span 系等。浓度范围是 $10^{-3} \sim 10^{-2}$ (重量/体积)。但大多数烃类氧化菌自身有乳化分散烃类的能力,为了节约成本,也可以不加表面活性剂。

细胞构造和烃类的氧化

研究烃类氧化和微生物细胞构造的关系,特别是研究烃类怎样进入菌体,是阐明烃类氧化菌的本质及烃类代谢机制的重要途径

径。Volfora^[14]在电子显微镜下观察解脂假丝酵母体内烃类氧化酶的分布,发现在细胞膜处有烃类的蓄积,并推定此细胞膜上有某种氧化酶系。将酵母菌制成原生质体,分别氧化葡萄糖和正构烷烃,发现原生质体已丧失对正构烷烃的氧化能力(图 1),这说明细胞膜表面构造已变化,它上面的氧化酶已变性,原生质体丧失了向细胞体内移送烃类的能力。Bos^[15]等用葡萄糖和正十六烷分别培养阴沟假丝酵母,再用电子显微镜比较两者的细胞构造,发现用烃类培养的细胞壁周围有一层类脂物,一般能溶解烃类;用葡萄糖培养的就沒有。Mnuk 等^[2]发现用烃类培养的解脂假丝酵母细胞壁比用葡萄糖培养的薄,而且细胞体内含有较多的脂肪体。图 2 是酵母细胞壁构造的模式图。Spencer^[17]等分离到细胞壁的最表层成份是甘露糖胶,测定甘露糖胶的核磁共振时发现,不同种类的酵母,核磁共振谱不同,对烃类的氧化性能也不一样,这说明烃类氧化和菌体细胞壁构造有重要的关系。

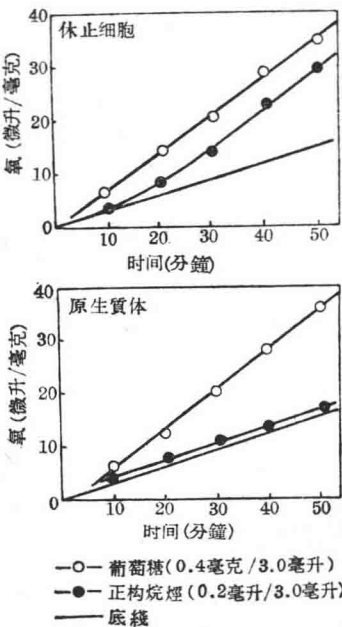


图 1 解脂假丝酵母的休止细胞和原生质体对葡萄糖和正构烷烃的氧化

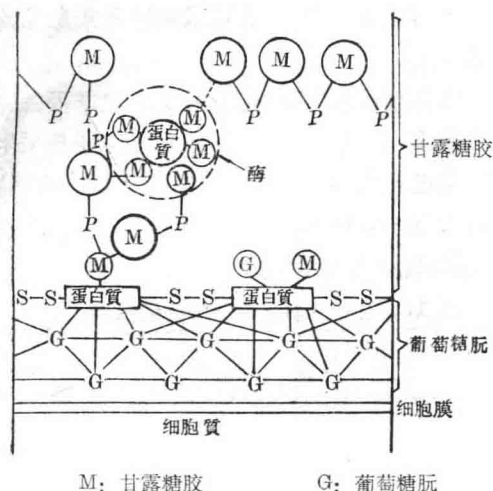


图2 酵母细胞壁构造^[16]
(*Sacch. Cerevisiae* 对数期细胞)

氧的供给

烃类发酵是好气性的。在用碳水化合物 $[(CH_2O)_n]$ 培养微生物时，由于它本身含有氧，所以供给的氧实际上不用于构成细胞物质，仅提供细胞生长所需要的能量，用来生成二氧化碳和水。而用烃类 $[(CH_2)_n]$ 培养微生物时，要生成碳水化合物 $[(CH_2O)_n]$ 构成细

胞物质，每个 CH_2 基就需添加一个氧原子。因此，烃类发酵比糖类发酵需更多的氧。不同碳源的耗氧量见表9。

表9 不同碳源的耗氧量及细胞产量的关系^[18]

微生物	碳 源	细胞产量 (克)	耗 氧 量 (克/100克 细胞)	放 热 量 (仟卡/100 克细胞)
酵 母	糖 类	0.50	67	383
酵 母	正构烷烃	0.85	242	985
酵 母	正构烷烃	1.00	192	780
酵 母	正构烷烃	1.15	152	632
细 菌	正构烷烃	1.00	172	780
细 菌	甲 烷	0.60	410	1860
细 菌	甲 烷	1.00	253	964

Darlington^[19]算出了烃类连续发酵的菌体生产速度和要求供氧速度之间的关系(表10)。

在烃类发酵中，Klbss测出微生物的需氧量随着烷烃碳原子数增加而相对减少，放出的二氧化碳相应增加(图3)，这说明了微生物在烷烃中氧化甲烷要比氧化其它烃类消耗更多的氧，释放较少的二氧化碳。甲烷和氧在水中的溶解度较低，但如在培养过程中

表10 连续发酵的菌体生产速度和要求供氧速度的关系

基 质	平均滞留时间 (小时)	菌体生产速度 (克/升·小时)	要求供氧速度 (克/升·小时)	K_a 值 ^a 的 推 定	
				氧分压 (0.2 大气压)	氧分压 (1 大气压)
正 构 烷 烃	2	10	21	克分子/分钟·毫升·大气压 5.5×10^{-5}	克分子/分钟·毫升·大气压 11×10^{-6}
	4	5	10.5	2.7×10^{-5}	5.5×10^{-6}
	6	3.33	7.0	1.8×10^{-5}	3.6×10^{-6}
	8	1.25	5.3	1.4×10^{-5}	2.8×10^{-6}
葡 萄 糖	2	10	8.0	2.1×10^{-5}	4.2×10^{-6}
	4	5	4.0	1.0×10^{-5}	2.1×10^{-6}
	6	3.33	2.7	0.7×10^{-5}	0.14×10^{-6}
	8	1.25	2.0	0.5×10^{-5}	0.1×10^{-6}

a. 氧气吸收速度系数。

增加压力则可增加溶解度,据计算,如压力增加至6个大气压,细胞产量可由3.2克/升增至20克/升。

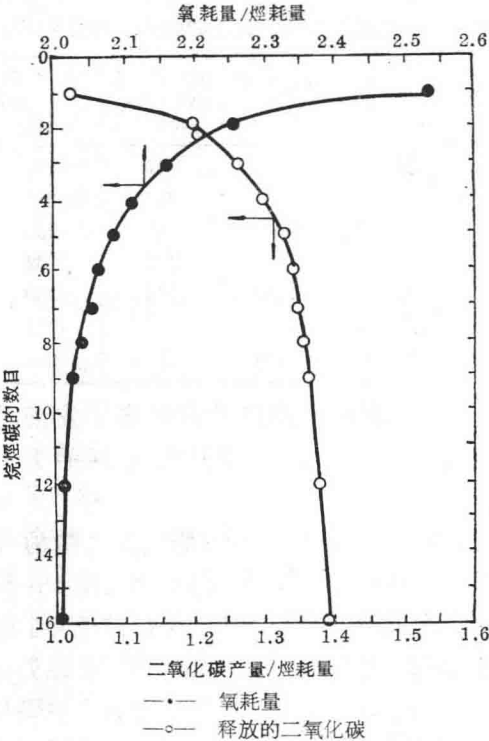


图3 不同碳链烃的氧化与氧耗量及二氧化碳释放的关系

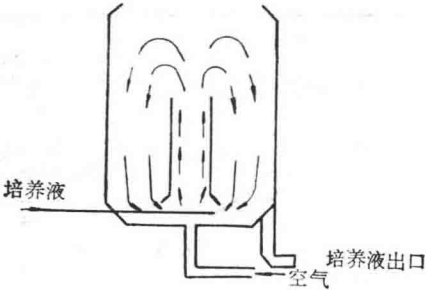


图4 Lefrancais-Mariller 发酵罐

发酵热和冷却

从表9可看出,烃类发酵生产100克菌体所放出的热量,大约是糖类发酵所放出热量的2~3倍^[18,20]。而一般维持菌体正常生长的温度,酵母为30℃,细菌为32~34℃,故需进行冷却。通常是采用16℃左右的地下水冷却,也有用冷冻机冷却的。但在甲烷发酵中(见表11),用一般的冷却旋管是远不

能满足解热要求的,则要采用减压式急骤冷却器。

冷却解决发酵热其费用要占生产蛋白的制品的15~20%,因此最好的方法还是采用高温菌进行发酵(酵母生长温度为38~40℃,细菌为55~60℃),这样不仅能省去冷却设备,而且能防止杂菌污染。

表11 各种基质生产菌体的发热量^[21]

基 质	菌体相对于基质的产量 (克菌体/克基质)	发 酵 热 (仟卡/100克菌体)	发热的速度 (仟卡/升·小时)
糖 类	0.5	380	13.2
正 构 烷 烃	1.0	780	27.0
甲 烷	0.6	1860	64.3

发酵罐类型

在烃类发酵中,需要通气和解决发酵中产生的热量,为了缩短发酵周期和节省动力,发酵罐的设计就显得很重要。现在世界上石油发酵一般采用四种类型的发酵罐:(1)标准带搅拌发酵罐,(2)Waldhof型发酵罐,(3)空气提升式发酵罐,(4)Lefrancais-Mariller型发酵罐。前三种发酵罐见本刊第一辑。

英国和法国生产蛋白采用Lefrancais-Mariller型发酵罐^[22],它的通气搅拌系统如图4所示,空气由底部中央套筒吹入,培养液也由中央套筒上升,并由空气带着进行循环,这样,供给的氧和烃类就能充分混合。该装置的优点是:结构简单,不需机械搅拌,因而可节约动力。

用于石油发酵的发酵罐除上述四种外,目前正在试验的有:塔式发酵罐,多孔板段塔式发酵罐和Venturi型发酵罐等^[2]。

混合培养和透析培养

混合培养

烃类氧化菌(细菌或酵母)对各种烃类的氧化具有选择性,因此要一种菌对各种不同碳链的烃类都能氧化是困难的。当基质是混合烃时,为了充分利用各种不同碳链的烃,应将二种或二种以上不同性质的菌株同时接种

培养,即所谓混合培养。

Johnson^[23]用中型假丝酵母和解脂假丝酵母混合培养,发现有时可缩短菌体生长的世代时间,同时也提高了菌体收率和菌体的含氮量(见表12)。

透析培养

在微生物代谢中,常常会分泌出一些代谢产物,要抑制菌体进一步生长,称生长抑制

因子。但此因子能从醋酸纤维、玻璃纸或聚四氟乙烯玻璃等做成的半透膜中透析出来,从而使菌体更好的生长,这种培养,就是透析培养。

相田等^[24]发现用C₈~C₁₈的正构烷烃培养 *Mycotorula Japonica*, 代谢产物中的十二烷酸、十四烷酸、十六烷酸等要抑制菌体进一步生长,而用透析培养能排除这些抑制因素。

表 12 中型假丝酵母单独培养和混合培养的比较

基 质	中 型 假 丝 酵 母			混 合 培 养 ^a		
	世 代 时 间 (小时)	菌 体 收 率 (%)	菌 体 含 氮 量 (%)	世 代 时 间 (小时)	菌 体 收 率 (%)	菌 体 含 氮 量 (%)
正 十 六 烷	6.5	81.7	7.21	4.5	78.0	7.25
正 十 七 烷	5.0	72.9	7.26	5.5	74.2	7.42
正 十 八 烷	4.5	82.5	6.85	5.0	83.9	6.75
正 廿 二 烷 ^b	6.5	88.8	6.70	7.0	89.5	8.48
正 廿 八 烷 ^b	13.0	83.0	6.81	8.0	88.4	8.19
煤 油 ^c	7.0	11.1	8.01	4.0	11.5	9.17

- a. 混合培养: 中型假丝酵母和解脂假丝酵母, 在 30°C, pH 为 5.5 下培养。
b. 廿二烷, 廿八烷(固态烃)溶于 2,6,10,14-四甲基十五烷。
c. 含 13.2% 正构烷烃的煤油。

石油蛋白的营养价值

石油蛋白的化学组成^[2,3]

从各国石油蛋白的化学分析来看, 菌体蛋白含量都高达 50~70%。氨基酸组成与动、植物蛋白相比, 以人体所必须的赖氨酸和苏氨酸含量较高; 而含硫氨基的胱氨酸和色氨酸的量较小(见后文)。现在还需寻找一株

氨基酸组成理想的变种。

维生素是蛋白质、碳水化合物和脂肪等营养物质进行代谢的必要辅助因素。石油酵母与其它酵母相似, 它不含有维生素 A 和维生素 C, 而含有丰富的 B 族维生素。在甲烷氧化菌中, 每公斤菌体 B₁₂ 含量能达 10 毫克。此外, 在石油酵母体内, 还含维生素 D 的前体麦角固醇约 78~315 毫克/100 克菌体(表 13)。

表 13 石油菌体的维生素含量(毫克/100 克菌体)^[3]

维 生 素	英国石油公司酵母	钟渊化学公司酵母	美国 Esso 公司细菌	甲 烷 细 菌
B ₁	0.34~0.47	0.85	0.12	2.0
B ₂	11.7~14.2	6.98	12	5.16
B ₆	0.95~1.5	0.57	0.60	15.9
B ₁₂	0.0007~0.005	0.00301	0.0014	1.04
菸 酸	27.5~40.0	45.0	18.0	17.7
泛 酸 钙	10.0~16.0	—	1.8	2.7
氨基安息香酸	—	—	0.34	—
生 物 素	—	0.0119	0.013	—
叶 酸	—	0.10	—	—
胆 硷	134~700	740	15.0	1076
麦 角 固 醇	78.0~315.0	—	—	—

石油蛋白的安全性

石油蛋白用作动物饲料前，必须进行毒性检查。日本卫生部食品卫生调查会在1970年已通过了石油蛋白安全性准则^[31]。

引起石油蛋白毒性的因素有：(1)生产菌株，有感染性和产生内毒素等。(2)原料，以正构烷烃作碳源时，含有多环芳烃类；以柴油作原料时，残油没有洗脱干净；在其它培养基成份中重金属元素砷、铅等含量在1p.p.m.以上。(3)发酵时产生了有毒的代谢产物。

英国石油公司以正构烷烃为原料的石油蛋白产品由荷兰做了下列安全试验：用石油蛋白喂养小鼠，观察其体重变化、进行血液分析及内脏(肝、脾、肾等)病理解剖。经六周到十三周饲养后，测得的平均体重和脏器重量与对照组没有什么差异，病理解剖也无异常(表14)。十二周后的血液分析，血红蛋白、红血球和白血球都正常，因此确认此石油蛋白是无毒害的。

日本已有两家癌症研究所进行石油蛋白的安全性试验^[1]。在用鼠作为期半年的毒性试验表明，均无异常。但为了安全起见，还必须进行至少几代遗传的安全试验。对于柴油作原料所得菌株，更应作长期试验。

表 14 小鼠的脏器重量(与对照组为100的比较)^[41]

脏 器	饲 料 中 石 油 酵 母 含 量					
	10%		20%		30%	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
肝	99	98	97	105	96	103.5
肾	105.5	101.5	100	103	100	100
脾	104	103.5	97	108	99.5	105
心 脏	106	104.5	103	105.5	106	105
脑	100	99	101.5	99	101.5	101
肺	102	95	100	109.5	89	107
甲 状 腺	92	108	96	19	112	109

石油蛋白饲料化试验

石油酵母含50%蛋白质，消化率又可达

80~90%，因此许多国家都在试验用石油蛋白代替鱼粉和大豆粉等作为饲料中的主要蛋白质。

饲养小鸡的试验^[2]

用石油酵母代替鱼粉，饲养九十只(雌、雄各四十五只)小鸡，结果示于表15。在九周后，解剖小鸡，未发现异常病变。

表 15 石油酵母饲养小鸡的试验^[2]

饲 料 组	3 周 令	5 周 令	
	平均体重 (相对对照)	平均体重 (相对对照)	死亡数
对照组(鱼粉10%)	100	100	1
7.5%酵母 ^a +2.5%鱼粉	103.8	101.2	3
10%酵母 ^a	100.3	98.8	1
15%酵母 ^a	99.7	96.8	4
7.5%酵母 ^b +2.5%鱼粉	101.6	100.4	4
15% ^b 酵母	100.3	96.6	3

a. 柴油为原料生产的酵母。
b. 正构烷烃为原料生产的酵母。

饲养产卵鸡的试验

用石油酵母代替大豆粉和鱼粉饲养产卵鸡，观察鸡之产卵率、卵重及饲料转换率，结果示于表16。

养猪试验

用石油酵母代替大豆粉饲养猪，经十六周后，猪的体重增重、饲料效率、健康状况、屠体形态和肉味等均与对照组没有什么差异(表17)，猪平均每天增重650克，饲料转换率是1/3。

表 16 石油酵母饲养产卵鸡试验(三十二周)^[2]

饲 料 组	产卵量(与对照组之比)	卵重(与对照之比)	饲 料 转 换率 ^a
对照组(15%大豆粉+6%鱼粉)	100	100	2.38
5%石油酵母+11%大豆粉+5%鱼粉	103	103	2.17
10%石油酵母+7%大豆粉+4%鱼粉	101	100	2.30
15%石油酵母+3%大豆粉+3%鱼粉	101	101	2.27

a. 得1克卵需用饲料克数。

表 17. 石油酵母饲养猪试验(十六周)^[4]

饲 料 组	体 重 (与对照之比)	饲 料 效 率 (与对照之比)
对照组 (7.5% 大豆粉)	100	100
7.5% 石油酵母	101.6	99.0
对照组 (15 %大豆粉)	100	100
15% 石油酵母	103.4	97.4

石油蛋白食用化

石油酵母供作人类食用还需经过饲养动物的长期试验,但为了提高其消化率(图 5)和驱除一些臭味,必须抽出其中蛋白质以便添加调味料,作成人造肉和人造火腿等。

从菌体中抽提蛋白质,必须破碎细胞体,一般破坏方法有,化学方法和物理方法两种。

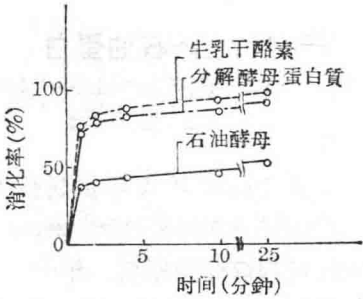


图 5 胃蛋白酶消化试验^[25]

化学方法

碱或盐抽提法^[26]: 用一定浓度的碱液或盐液,在适当温度进行适当时间的抽提(表 18),然后离心,除去细胞壁等残渣,再进行中和,加蛋白沉淀剂,控制等电点,回收蛋白。

表 18 用碱或盐法从酵母体抽提蛋白的效果^a

条 件	抽 出 率 (N%) ^b			
	抽 出 液		残 渣	
水	20°C	3 小时	17.4 (大部分非蛋白态)	82.6
温水	60°C	3 小时	19.2 (大部分非蛋白态)	80.5
1% NaCl	28°C	3 小时	22.2 (大部分非蛋白态)	77.8
2.5% NaCl	28°C	3 小时	19.8 (大部分非蛋白态)	80.2
1% KCl	28°C	3 小时	23.4 (大部分非蛋白态)	76.6
0.1% 磷酸缓冲液 pH 7.0	20°C	3 小时	24.5 (大部分非蛋白态)	75.6
0.1% 磷酸缓冲液 pH 11	20°C	3 小时	27.3 (大部分非蛋白态)	72.7
0.1% NaOH	20°C	2 小时	24.1 (大部分非蛋白态)	75.9
0.5% NaOH	20°C	2 小时	42.0 {蛋白态 16.0 非蛋白态 26.0}	58.0
1% NaOH	20°C	2 小时	56.0 {蛋白态 26.3 非蛋白态 29.7}	44.0
4% NaOH	20°C	2 小时	63.0 {蛋白态 32.8 非蛋白态 30.2}	37.0

a. 每 100 毫升抽出液含 10 克酵母。 b. 相对于酵母体含氮量。

尿素抽提法^[27]: 用 6~12 克分子浓度的尿素进行抽提。步骤如下: 抽提→离心分离→透析(除去小分子)→沉降→离心→干燥。影响抽提效率的是尿素浓度、处理温度和时间。用此法抽提圆酵母,蛋白收率可达 50% 以上。

酶法抽提: 利用分解酵母细胞壁的酶(葡聚糖酶,纤维素酶等)来破裂细胞抽出蛋

白。其中酶的纯度和处理时间等是影响抽提效率的因素。远藤^[28]用菌核菌分泌的葡聚糖酶从酵母体得到 78~80% 的粗蛋白。满田^[26]用纤维素酶加 0.1% NaOH 进行处理,从酵母体得到 56% 的蛋白态氮。

物理方法

用冻结加压法使酵母细胞壁和细胞膜破裂^[29]。也可用玻璃球进行磨碎^[30]。

研究和生产石油蛋白

的简况^{[1],[32],[33],[34],[35],[36]}

英 国

英国石油公司自 1962 年试制石油蛋白, 现在苏格兰的格兰茨茅斯(Gronzemouth)已建立了利用正构烷烃为原料, 年产 4,000 吨蛋白质的工厂(1971 年初完工)。在法国马赛附近拉瓦腊建立了利用柴油为原料年产 16,000 吨的工厂(在 1971 年 6 月投产)。还计划在 1974 年筹建用正构烷烃为原料年产 10 万吨的工厂。

卜内门公司计划从天然气生产蛋白。

帝国化学公司也正计划研究天然气制蛋白的技术。

法 国

法国石油研究所研究了用正构烷烃为原料生产蛋白质的技术, 并在印度和尼日利亚建立中间实验工厂。

美 国

美国有八家主要的石油公司已从事了生产石油蛋白的研究, 多数还是在实验阶段, 也有进入中间试验阶段的, 如 Esso 和 Sun 等。他们主要偏向用石蜡或柴油为原料生产蛋白, 也有以甲烷为原料生产蛋白。

用气态烃制取蛋白, 芝加哥瓦斯工艺研究所在 1960 年就开始了研究, 据 1967 年报道, 他们已初步培养出在氨基酸和维生素含量上与酵母和鱼粉都不差上下的微生物细胞。壳牌石油公司已建立了中型扩大车间。Nonthern 煤气公司还准备在 1975 年建成年产 2,000 万磅的工厂^[7]。

日 本

日本有八家公司宣布建造了生产石油蛋白的工厂, 并计划 1975 年全国年产 100 万吨。

日本油墨化学公司计划 1971 年年产石油蛋白 6 万吨, 1972 年年产 9 万吨, 1973 年年产 12 万吨。

日本协和发酵工业公司已购买英国石油公司专利, 计划 1973 年年产 10 万吨。

三井东庄化学公司计划建立年产 6 万吨的工厂。

旭化成工业公司计划在 1973 年完成年产 3 万吨的工厂。

苏 联

有一个采用柴油为原料生产石油蛋白年产量达 5 万吨的工厂。

捷 克

1968 年已建造了一个用正构烷烃为原料年产 5 千吨石油蛋白的实验工厂, 现已有一座年产 2 万吨的工厂投入了生产。

加 拿 大

在最近四年中, 开展了气态烃制取蛋白的研究, 并企图在通气、移热和细胞收率三方面突破, 还设计了日产 50 磅规模的中型工厂, 但大规模生产至少要在四年到六年以后。

参 考 文 献

- [1] 日本食品工业学会誌. 17(2): 80 (1970)
- [2] 石油醱酵 1970 年版。
- [3] 化学 25(12): 1220 (1970)
- [4] 燃料协会誌 49(515): 139 (1970)
- [5] 石油と石油化学 14(6): 26 (1970)
- [6] 化学工业 20: 477 (1969)
- [7] Chem. Eng. 77(12): 66 (1970)
- [8] Appl. Microbiol. 15: 1473 (1967)
- [9] Biotech. Bioeng. 11: 1043 (1969)
- [10] 醱酵工学雑誌 48: 470 (1970)
- [11] Agri. Biol. Chem. 32: 1175 (1968)
- [12] 醱酵工学雑誌 48: 478 (1970)
- [13] Biotechnol. Bioeng. 9: 77 (1967)
- [14] Experientia. 23: 1005 (1967)
- [15] Antonie Van Leenwenhoek. 34: 241 (1968)
- [16] ibid. 34: 1 (1968)
- [17] ibid. 35: 33 (1969)
- [18] Chem. Ind. 1532 (1964)
- [19] Biotechnol. Bioeng. 6: 241 (1964)
- [20] Hydrocarbon Processing 48: 104 (1969)
- [21] Chem. Eng. 15: 99 (1968)
- [22] 醱酵协会誌 24: 34 (1966) 27: 110 (1969)
- [23] Biotechnol. Bioeng. 8: 549~567 (1966)

(下转第 21 页)

英国如何从烃类生产蛋白质

〔摘要〕 英国石油公司(BP)在苏格兰的格兰茨茅斯用正构烷烃、在法国的马赛用柴油生产含氨基酸丰富的蛋白质浓缩物,可作补充饲料。

烃类发酵

许多年来科学家们已经知道某些微生物可以在烃类物质中生长。英国石油公司用酵母研究表明,在烃类加必需的矿质养料的培养基中培养酵母所产生的大量生物体,其组成和质量与用相同的或非常接近的微生物在更为传统的碳水化合物基质,如残糖废水(甜菜和蔗糖的下脚糖蜜及造纸厂的亚硫酸废液)中培养所产生的生物体大致相同。这两种基质的根本区别在于:碳水化合物可以在水溶液中供给细胞生长所需要的碳、氢和氧;用烃类培养细胞时,实际上只能以不溶于水形式提供碳和氢,培养过程中需要的氧必需靠吹入大量空气来提供。对于这两种基质都必须添加其它营养料如阳离子: NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{+2} 、 Fe^{+2} 、 Zn^{+2} , 阴离子: SO_4^{+2} 、 PO_4^{+3} 。同时还要添加其他特殊的生长因素或生物活素类的因素以维持生长速率。

烃类的代谢转化是通过氧化来进行的,所产生的最终产物为细胞蛋白质,碳水化合物以及类脂物,并释出 CO_2 和 H_2O , 全程的化学反应可以大体写成如下千克分子式:

$2n\text{CH}_2 + 2n\text{O}_2 + 0.19n\text{NH}_4^+ + \text{其他必需元素(P, K, S等)}$

$\rightarrow n(\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.19} \text{灰份}) + n\text{CO}_2 + 1.5n\text{H}_2\text{O} + 200,000n \text{ 仟卡}$

可以用同样的化学反应式与碳水化合物作底物得到生物体产物的反应作比较:

$1.8n\text{CH}_2\text{O} + 0.8n\text{O}_2 + 0.19n\text{NH}_4^+ + \text{其他必需元素(P, K, S等)}$

$\rightarrow n(\text{CH}_{1.7}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.19} \text{灰份}) + 0.8n\text{CO}_2 + 1.3n\text{H}_2\text{O} + 80,000n \text{ 仟卡}$

两种代谢产生每公斤干重生物体释放的分子热分别相当于7,600仟卡和3,000仟卡。

用烃类代替碳水化合物作为底物进行培养其基本差别为需要多供应两倍半的大气氧,而在反应中释放的热量,为碳水化合物培养所释放热量的两倍以上。另外由于两个液态反应相是不能互溶的,还必须提供足够的搅拌使小体积的烃类分散到大体积的水相中去。

流程原料

在格兰茨茅斯装置中,是用英国石油公司所生产的一种高纯度 C_{18} 的液态正构烷烃。在发酵过程中正构烷烃几乎可以全部耗尽。

在拉瓦腊装置中,以标准精制柴油为原料,其中可供消耗的正构烷烃含碳数的范围与高纯度正构烷烃原料相当。该条件下原油中仅约10%可被转化,留下油的倾点与浊点均已下降,可回收作为一般精制产品原料。

流程概述

用正构烷烃和柴油生产蛋白的区别在于以下两个主要方面:

(1) 在正构烷烃流程中,发酵是在严格灭菌条件下进行的,所以除了接种菌外无它种微生物存在。在柴油流程中则采用正确选择的操作温度和pH值,使选用的菌种在发酵中占支配地位。

(2) 价值较高的正构烷烃原料在发酵过

程中几乎被耗尽，这就简化了将细胞从发酵液中分离出来的步骤，并可免除后一步菌体的溶剂净化。柴油原料虽较便宜，但它不能被全部用光，必须从细胞分离残油，所以要用溶剂处理才能得到令人满意的产品。

所述两个流程皆为连续化的，其操作顺序为：(1) 液态与固态原料的进货与贮存；(2) 配制培养基；(3) 空气与培养液的灭菌(只用于正构烷烃流程)；(4) 发酵；(5) 细胞的收集，

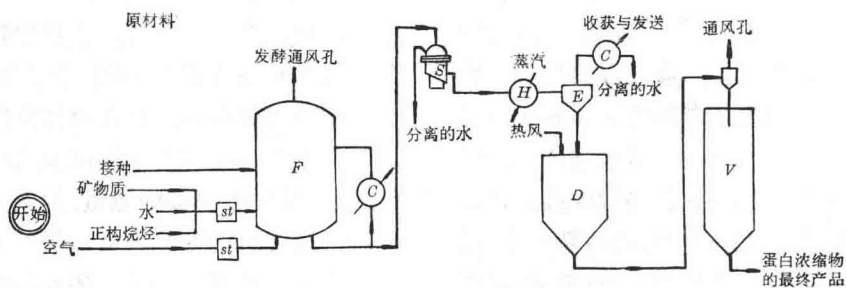
对于柴油流程，还要回收未代谢的柴油；(6) 细胞的脱水。

在正构烷烃的流程中，就得到蛋白质浓缩物。

在柴油流程中，对蛋白质浓缩物还要另加两步操作：(1) 溶剂的浸洗；(2) 溶剂的除去与回收。

正构烷烃为原料的流程

图 1 是格兰茨茅斯工厂以正构烷烃为原



St. 灭菌器 F. 发酵罐 C. 冷却管或冷凝器 S. 分离器
H. 加热器 E. 蒸发器 D. 干燥器 V. 贮藏罐

图 1 用正构烷烃作原料生产蛋白浓缩物的流程。

料年产 4,000 吨蛋白浓缩物的流程图。生产用单一的发醇罐，产品的分离与回收也将是一条流水线中完成。

发酵罐必须保持在灭菌条件下，其他方面只要一般防备即可，象普通食品工业那样保持一个高标准的洁净。工厂的大多数设备是不锈钢结构，使得清洁工作易于进行并保证产品合格。

发酵

将细胞繁殖所必须的矿物养料及生长因素配成水溶液，按控制速度连续输入发酵罐。一个有计量的正构烷烃液流与该水溶液在进入培养液灭菌系统之前接通。混合的培养液在高温中保持足够的时间以保证“杀死”全部微生物。在进入的冷料与灭菌的热料之间进行热交换，以达到热量的经济使用。要获得灭菌温度所需的额外热量，由加入的新鲜蒸汽来提供。已灭菌冷料可直接输入发酵罐。

细胞生长所需的全部氧气由连续吹入发酵罐的空气流供给。空气经过过滤灭菌。多余的空气及发酵产生的二氧化碳在放到大气之前再经过一个灭菌过滤器。设置后一个过滤器的目的，在于防止因空气流速太低或短时间停止而引起的任何空气倒流污染。细胞生长所必需的氮一般是由连续进入空气中的氨气来提供的。氨还可维持发酵罐内物料所要求的 pH，其添加速度按 pH 自动控制。

发酵罐内的烃类、矿物质以及氧的转移到细胞体是依靠机械搅拌将四个相密切混合来完成的。经过试验搅拌器的类型和位置以及空气喷入的速度使得流程中这一步操作更加经济。

发酵过程中释出大量热，而发酵要维持在约 30℃ 这样比较低的温度，所以必须外加冷却。发酵温度的控制通过调节流入交换器的冷水而实现。从这个冷却循环中连续抽出发酵产物，以维持发酵罐中装料量的恒定。

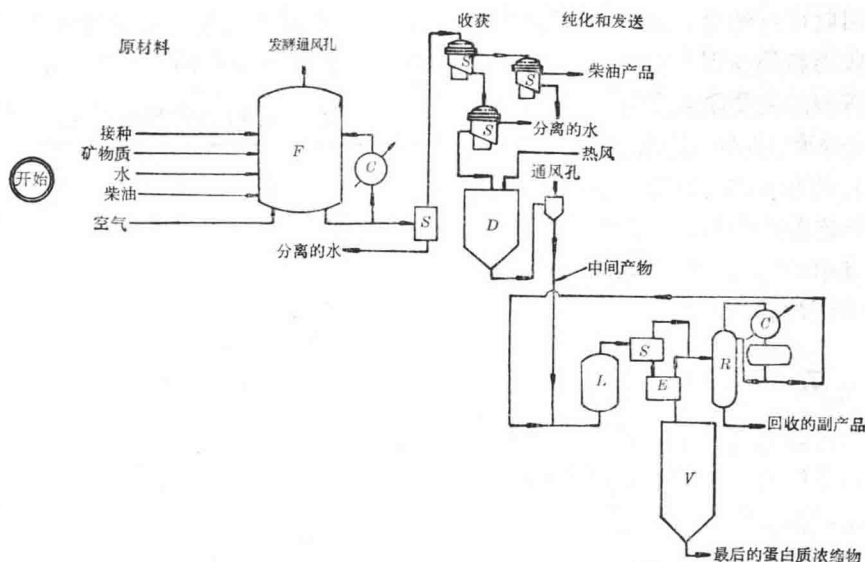
收获

发酵产物用一个酵母离心机分离得到水相和浓缩的酵母浆。这种酵母浆约含 15% 干物质,进一步在一个高效蒸发器中浓缩。这个蒸发器由于中间蒸汽再压缩取得高的热经济效果。蒸发器的冷凝水可重复使用。浓缩的酵母浆于是进入最后的喷雾干燥过程。喷雾干粉含有 5~6% 的水份,从干燥室及

旋风分离器中卸出,进入一个气动输送系统。干粉在其中冷却并送至一个大贮存漏斗中。最后蛋白质浓缩物进行装袋,或直接从漏斗以大包装载外运。

柴油为原料的流程

在拉瓦腊炼油厂建立的装置是用柴油为原料,年产蛋白浓缩物 16,000 吨。图 2 为该装置的流程图。生产将用四只发酵罐,虽然



F. 发酵罐 C. 冷却管或冷凝器 S. 分离器 D. 干燥器
L. 溶剂浸洗 E. 蒸发器 V. 贮藏罐 R. 回收柱

图2 用柴油为原料生产蛋白质浓缩物的流程。

发酵罐操作过程不要求完全的灭菌手续,但在此也适用前面所论述的清洁要求。

该流程路线除了没有灭菌部份以外,与前一流程相似,但产物纯化工段需另加溶剂洗涤。

发酵

发酵是在很大的罐内进行的,其中吹入高速空气以提供生物体代谢合成所必需的氧气,并供给剧烈搅拌所需的能量。发酵的混合物即培养液,含有空气、水及微细分散的油滴,细胞悬浮其中。这种混合物可以比拟为一个连续搅拌的、稳定的和复杂的反应系统。

同前法一样,利用发酵液循环与冷水进行热交换,把发酵温度控制在 30°C 左右, pH 用注氨法自动控制。

收获

产物浆料在自动控制下从发酵罐出口连续流出,并转入一只沉清罐,在此大部份水相被分离并可重新利用。剩下浮在表面的泡沫内含细胞、柴油和水再进行除气。

所得浆料再泵送进行机械分离,使用离心机回收分离的柴油、水相和含有 15% 干重的细胞浓缩浆。这个细胞浆中还含有某些未代谢的柴油,所以先喷雾干燥制得细胞干粉,以便进一步纯化。

纯化

将上面得到的干粉送入一台溶剂连续逆流的洗涤装置，将柴油除到只残留非常低的含量，同时大部份的细胞类脂物也可除去。完成本操作必须精确地控制处理细胞的物理状态以及洗涤方法，使用的溶剂是经过仔细挑选的。

最后，在合适的干燥设备里，从细胞中除去溶剂，细胞粉产物输送至贮存处。用过的溶剂以蒸馏回收可再使用。这步操作可同时得到一批回收的脂类物副产品。

除了该流程的主要阶段之外，工厂还有制备菌种、培养液、供气、冷水、蒸汽等等设备，以及收料、贮存、包装、发送(包括原材料、中间产品及最终蛋白浓缩物)部门。已经准备用计算机集中地记录工厂的基本数据，再进一步用计算机控制工厂生产。

工 程 设 计

早期的经济研究已经十分清楚地表明，从烃生产蛋白浓缩物，工厂的年产量要比一般酵母发酵工厂高得多。因此操作过程必须连续化，同时工厂的各个部份可采用适当设备或配套装置。

对于发酵本身，研究了两种显著不同的搅拌方式：(a)带缓冲板的机械搅拌。(b)用一个内部导向筒的空气提升式搅拌。另外还考虑设计和试验过介于(a)和(b)之间的几种系统。对于工业生产发酵罐的放大计算，根据实验工厂的操作容积的比例分别为1:10:100。正常的发酵温度约30℃，其控制方法为排除前面化学反应式所示释放出的热量。内部冷却面用普通温度的冷水已不够，冷却系统又因价高而不宜采用。外部压送已脱除气泡的培养液费用不大，因此发展了一个脱气的培养液通过外部热交换器循环的系统。

正构烷烃为原料的流程采用灭菌发酵操作，因此要求：选择合适的合金材料制造培养液灭菌器；试验大量通气灭菌用的有效过滤

材料。

对于柴油流程生产蛋白质的最后纯化(脱除未作用的柴油)，进行了大量的研究。试验过多种接触、分离和溶剂收集设备，进而设计和安装了一具特别适合本流程的固态物洗涤、接触和分离的设备，现已投入生产。

产品质量评定及使用

从正构烷烃生产的蛋白浓缩物含有粗蛋白63~65% (干重)，而从柴油生产的则含68~70%。更详细的分析列于下表：

表 从烃类生产蛋白浓缩物的分析

分 析	正构烷烃流程	柴油流程
水分 % (重量)	4.2	5.0
氮 % (干重)	10.4	11.0
粗蛋白 (N×6.25) % (干重)	65.0	68.5
类脂物 % (干重)	8.1	1.5
灰份 % (干重)	6.0	7.9
氨 基 酸	(克数/16克 N)	
	正构烷烃流程	柴油流程
异亮氨酸	4.5	5.3
亮氨酸	7.0	7.8
赖氨酸	7.0	7.8
苯丙氨酸	4.4	4.8
酪氨酸	3.5	4.0
胱氨酸	1.1	0.9
甲硫氨酸	1.8	1.6
苏氨酸	4.9	5.4
色氨酸	1.4	1.3
缬氨酸	5.4	5.8
丙氨酸	7.4	5.8
精氨酸	4.8	5.0
门冬氨酸	9.2	10.0
谷氨酸	11.3	12.1
甘氨酸	4.8	4.5
组氨酸	2.0	2.1
脯氨酸	4.4	3.7
丝氨酸	4.8	5.1
葡萄糖胺	1.8	2.0

它的氨基酸组成与豆粉和鱼粉相似，但甲硫氨酸含量较低，这是一般酵母的特征。

(下转第53页)