

生物学译文选

第十集

河北省科学院生物研究所

编 者 的 话

这一期包括四篇文章，其中二篇关于异构酶的，一篇单细胞蛋白生产，一篇鸡旦的微生物学。

从玉米葡萄籽转化成果籽糖浆以代替蔗糖，国外甚为盛行。国内也有人在提倡，并且也已筛选得苗种，正在进行中间和扩大试验。因之我们翻译了异构酶的应用的二篇文章。

单细胞蛋白生产，虽然诟誉不一但作为饲料蛋白的补充还有一定价值。另外结合造纸废液的利用素等等也是个方向。因之我们翻译了单细胞蛋白生产的综述，以供有关方向参考。

商业部门提出鸡旦保鲜的课题。近年来鸡旦的贮藏虽有冷藏设备，但毕竟每年损失也很大。鸡旦败坏因素很复杂，有微生物的污染，也有其本身生理代谢问题。我们翻译了一篇国外做过研究的综述，虽然不是最新的，但对当前的课题还不失参考价值。

明年的译文选打标出四期，每季一期，由于费用大，打标略收工作费，请大家谅解。

目

录

葡萄糖异构酶生产高果糖浆	2
固相葡萄糖异构酶工业应用的发展	79
食品或饲料用单细胞蛋白的生产	109
鸡蛋微生物学	207
紫外线和可见光引起的苏芸金杆菌 (<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>) 芽孢失活作用	245
弱一元酸、二元酸和两性电解质在离子交换 树脂 XAD-2 上离子相互作用的性能液 相色谱	256

葡萄糖异构酶生产高果糖糖浆

Richard L. Antrim, William C. Dilla 和

Bern J. Schryder

一、引言

本文目的是详述从淀粉生产果糖糖浆应用葡萄糖异构酶工艺的发展。重点放在不同酶剂和所用异构化工艺的比较，而不想详细叙述任何独特的商业生产系统。

葡萄糖异构酶工艺的应用在美国已有最大的冲击力。一九七八年，玉米果糖糖浆货运量，估计干物质已过三十亿磅；美国所有的玉米果糖糖浆都是用固相型葡萄糖异构酶生产的。这表明固相酶在商业上的广泛应用。从玉米、小麦、和其他淀粉制造果糖糖浆的生产厂家都已经或正在日本、加拿大、澳大利亚、和一些欧洲国家建设起来。

淀粉水解生产的葡萄糖，转化成果糖的商业价值，由于转化增加了甜味程度。葡萄糖是蔗糖甜度的70%，而果糖的甜度比蔗糖甜20~60%。按应用和所用工艺条件，从淀粉制造的典型的果糖糖浆中，含有葡萄糖、果糖、和其他糖类，从葡萄糖到果糖的酶转化平衡的限度，正像甜度和制造成本的限制一样，导致果糖糖浆中只含干汁42%。果糖在多种食品中应用代替蔗糖。42%果糖糖浆的出售，其价格比蔗糖或蔗糖转化糖浆为低，这

，这需要制造成本明显的比生产蔗糖的成本要低。比如美国就是这样，那里价廉的玉米充分供应，正像有效的工艺技术，和有价值的副产品玉米油、旦白质等提供低成本的生产过程以经济基础。由于玉米果糖糖浆的发展，在美国糖浆的每人应用量稳步提高，一九七八年果糖糖浆折干汁每人高达12磅（Kolodny, 1978）。

在美国的甜味剂市场上，玉米果糖糖浆的销售不断增加，作为含55~95%果糖的第二代果糖制品代替蔗糖在需要更高甜度的食品中应用也正在继续发展。浓度42%的果糖糖浆，提高到55~95%的果糖含量，需要增加额外的步骤，而除掉果糖糖浆中的葡萄糖大多数是通过色谱法进行的。尽管增加了额外的成本，但有效分离技术的应用，容许55%以上的果糖糖浆仍以低于液体蔗糖或转化糖浆的价格出售。果糖糖浆产品的成功发展的基础，是葡萄糖异构酶的发展和异构化工艺的发展同时又有效应用的结晶。这是在近20年来在食品工业上和商业上出现的一个引人注目的成就。

二、历史展望

A：淀粉的酶转化

虽然，很久以前酶就被用于水解淀粉，但是应用特异酶工艺来制造高葡萄糖糖浆也适用于制造今日42%的果糖糖浆到五十年代后期还没有被商业化，那时淀粉的酶——酶水解和酸——酶水解已发展到能获得精制的92~96%右旋糖液来制得结晶的右旋

粉液未制得结晶的右旋糖。

目前制得果糖糖浆的典型方法是利用 α -淀粉酶去液化淀粉，继之再以葡萄糖苷化酶去苷化水解的淀粉，到所需要的含有94%的右旋糖再异构化为葡萄糖和果糖的混合物。这种高右旋糖浆技术的发展必须达到42%果糖加上50%右旋糖浆所需的甜度水平，在1960年后期开始上市作为甜味剂，取代蔗糖。

B. 碱性异构化

进入六十年代酶异构化工艺进行发展的时候，葡萄糖在碱性条件下进行化学异构化亦已详介。几个专利 (TSAO *et al.*, 1969; Parrish, 1970; Katz *et al.*, 1972; Barker, 1976; Vietn *et al.*, 1976) 准许发明者应用碱性异构化，但没有一个工艺能商业化，碱性异构化法遇到的主要问题是经济问题。碱性异构化难于达到40%果糖含量，形成非右旋糖和非果糖的降外产物，因而降低了产品的甜度和产生颜色和不良的气味，又不易除掉。

酶系异构化优于碱性异构化，因为葡萄糖异构酶的作用作为一种专一的催化剂对葡萄糖—果糖进行转化，而不引起果糖和右旋糖降外物的形成。

C. 葡萄糖异构酶（木糖异构酶）的工艺的发展和早期发展

葡萄糖异构酶工艺是 Rich arao, Marshall 在五十年代中期发现的。是从嗜水假单胞菌 *P. Seu ammones hyarophila* 获得的不糖异构酶能异构 D-葡萄糖为 D-果糖。美国专利 2950228 准许 Marshall 在 1960 年应用含有不糖异构酶的酶制剂异构葡萄糖为果糖 (Marshall, 1960)。在 1925, CPC 国际公司和标准品公司内战诉讼的结果, 该专利后被发现无效 (CPC International Inc V. Standard Brand, Inc. 184-USPQ 332)。由于该专利让位, 对异构葡萄糖为果糖, 没有基本专利保护, 酶制造商和果糖糖浆生产者发展了几种交错的方法生产同祖化酶制剂来制造果糖糖浆。但 Marshall 的工作在五十年代后期没有主动继续下去, 因为微生物和所需的工艺条件, 不适于商业应用。然而日本的科研人员于 1960 年中期对异构酶继续进行研究。1965 年日本科研工作者如 Tsumura, Sato 和 Takasaki 等发现一个适宜的微生物和酶系统, 有可能用于异构葡萄糖为果糖的商业生产 (Tsumura 和 Sato, 1966; Takasaki, 1966)。

卡林顿玉米加工公司, 一个标准品公司的分公司, 认识到日本的链霉菌 *Streptomyces* 菌株生产葡萄糖异构酶有商业重要性。于是他们与日本政府协议于 1966 年美国商业上发展该工艺。美国第一批酶生产的玉米果糖糖浆的商业货

这是卡林顿玉米加工公司早在1967年制成的。

①、葡萄糖异构酶工艺的近期发展

在60年代中期，应用葡萄糖异构酶工艺的最初概念，是期望有一到二个专一酶素泥和溶解酶在批反应中的应用。十年后，已经表明从早期的概念到下列重要变化：

酶 工 艺	异构化工艺
发现了12个以上产生不同的葡萄糖异构酶的微生物，其中六个已商业化，	发展了经济的固相化葡萄糖异构酶的各种技术，其中某些已应用于商业，
发展了不需要蔗糖和木聚糖作为诱导剂的微生物葡萄糖异构酶产体，	发展了用于固相葡萄糖异构酶的条件反应皿，并且已应用于商业。

虽然，在发展早期，葡萄糖异构酶工艺的研究没有从工业上主动进行，但在六十年代中期证明该工艺已在商业上实现时，研究力量就大大增加了（Casey, 1976）。应用固相酶的降低成本的优点在六十年代后期被证明时，作为一种推动力提供了葡萄糖异构酶工艺的迅速发展和商业化。从那时起，工业的和科学院的科学家们的出版物和专刊激增，主要集中在酶的生产、酶的固定化、反应动力学和异构化工艺的改进。

三、葡萄糖异构酶

A、引言

历史上四个不同的酶被称为葡萄糖异构酶。葡萄糖异构酶活性的第一篇报告发表于1957年 Marshall 和 Kooi 的文章 (1957) 中，表明从嗜水假单胞菌 *P. hydrophila* 的不构异构酶，和以前报导的相反，能转化葡萄糖为果糖。但此酶对葡萄糖的亲合力比木糖低 (K_m 分别为 0.5 和 $3 \times 10^{-3} M$)，并证明木糖异构酶 (P-木酮糖异构酶，EC. 5.3.1.5) 存在于 *P. hydrophila* (Hochster & Watson 1953, 1954) 和 *Lactobacillus pentosus* (Mitsukashi and Lanpen, 1953) 和 *Pasteurella pestis* (Slein, 1955) 的提取物中。Marshall 和 Kooi 进一步指出，在异构化过程中应用磷酸盐时观察到能更有效的转化葡萄糖为果糖。木糖异构酶的生产，决定性的取决于生长培养基中存在的木糖流。该异构酶报导的最适 pH 和温度分别为 8.5 和 $42 \sim 43^\circ C$ 。

第二个葡萄糖异构酶活性和不构异构酶活性无关，而且不需要木糖作诱导物，是 Nataka 和 Yoshimura (1963 年) 报导的。Nataka 从大肠杆菌 *Escherichia* *Intermedia* 中纯化了这个酶，并表明它是磷酸葡萄糖异构酶 (D-葡萄糖-6-磷酸乙酮醇-异构酶，E (5.3.1.9))。

。因此，澄清了一些早期的混乱概念。这个酶也需要磷酸埃形成葡萄糖磷酸埃复合物，能作为该酶的类似底物（Matake和Yoshimura, 1964），此纯化酶的最适PH和温度分别为7.0和50℃。因此，在葡萄糖异构酶的早期工作中（Marshall和Kooi, 1957）；Tshimura和Sato, 1960, 1961），科研人员对提取物中的木糖异构酶和磷酸葡萄糖异构酶可能同时进行了研究，而Marshall和Kooi（1957）对*P. hydrophila* 前酶系统的性质也进行了报导。

第三个葡萄糖异构酶的活性是Takasaki和Tanabe（1962, 1963）报导的。是从*Bacillus megaterium* A1分离得到的。该酶是一个NAD⁺ 联结酶，称为葡萄糖异构酶（D-葡萄糖-乙酮醇-异构酶，EC 5.3.1.18）。此酶对葡萄糖有特异性，最适PH为7.8，温度为35℃。

还有一个没有分类的葡萄糖异构酶活性，是Takasaki和Tanabe（1964年）从*paraclostridium aerogenoides* 分离得到的，催化葡萄糖和甘露糖异构成果糖，用NAD⁺和Mg²⁺ 作为辅助因子。最适PH和温度分别为7.5和40℃。此酶可能是D-葡萄糖-乙酮醇-异构酶的重型，但发现者相仪是一个完全不同的酶。

尽管上述四个不同的葡萄糖异构酶都可应用，但只有D-木糖异构酶对葡萄糖转化成果糖有商业重要性，其重要性

主要由于它的性质。一般情况下，D-木糖异构酶是热稳定的，在45—65℃温度范围内能反应，反应过程不需要任何再生的辅助因子，例如NAD⁺或ATP等。这二个因素提供了该酶适于商业开发的价值。没有再生辅助因子使反应单一，而高温稳定可以控制微生物的污染，因此，提供了一个潜在可行的商业生产过程。本章将只评述商业上重要的葡萄糖异构酶—D-木糖异构酶。

B. 酶 源

D-木糖异构酶广泛分布于自然界中。生长在D-木糖源上的大多数微生物都能产生。Dowd和Wiesmeyer (1970)报导了在不糖诱导反应中大肠菌 *Escherichia coli* 产生三个酶：D-木糖透性酶，D-木糖异构酶，和D-木酮糖激酶。木糖经异构酶转化成木酮糖，接着由激酶转化成木酮糖-5-磷酸。木糖透性酶容许木糖通过浓度梯度转运。木酮糖-5-磷酸再转变成核酮糖-5-磷酸，然后再通过正常的戊糖代谢途径被利用。D-木糖异构酶的一些来源列于表1。尽管大量酶可采用，但只有少数研究的比较详细。广泛研究的酶来自 *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces albus*, *Bacillus coagulans* (HV-66) 菌株等。其他也进行过很好研究的酶如链霉菌的种，*S. phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. rubigeno*.

Sus 和 *Actinoplanes*, *Artinrobacter* 和 *Bacillus* 的种是商业上重要的酶泥。有人报导植物来源的 D-木糖异构酶, 并且已从大麦浸汁 (Bartay 1960) 和小麦芽中 (Pobols et al 1963) 提取。

C. 酶分子的性质

只有少数 D-木糖异构酶被提纯并且根据它的分子特性进行了详细的研究, Yamanaka (1975) 从 *L. brevis* 和 *L. xylosus* 提纯了葡萄糖异构酶, Takasaki 对从 *S. albus* 来源的酶进行了提纯和广泛的研究。Danno 也提纯了从 *B. coagulans* 来源的酶 (1970)。这四个提纯的酶分子量非常相似如表 II 所示, 幅度从 165,000 到 191,000。从 *S. griseolus* 中得到的酶, 也被提纯 (Giovenco 等 1973)。但关于该酶的性质则报导的很不详细。

在每个研究的例子中, 葡萄糖异构酶都分成四个相同的亚基 (Danno, 1973; Yamanaka 和 Takahara, 1977)。如在 *S. albus* 的研究中, 亚基表明是在末端 -NH₂ 上含有一个甘氨酸 (Hogue-A, 1975)。提纯的 *Streptomyces* 酶, 即使在透析后, 仍含有钙和镁离子, 钙和镁的含量每个分子酶分别为 4.1 和 3.3 原子/酶克分子 (Takasaki 等 1969)。*Bacillus* 酶的等电点测定为 pH 4.9。也测定了链霉菌和芽孢杆菌酶的氨基酸组成, 数

表 1 产生葡萄糖异构酶 (D-木糖异构酶) 的微生物

属	种
链霉菌 (<i>Streptomyces</i>)	<i>bobilai</i> , <i>flavovirens</i> , <i>echinatus</i> , <i>ochromogenes</i> , <i>phaeochromogenes</i> , <i>frigidus</i> , <i>roseochromogenes</i> , <i>olivaceus</i> , <i>californicus</i> , <i>venustus</i> , <i>virginiae</i> , <i>olivochromogenes</i> , <i>venezuelae</i> , <i>wedmorensis</i> , <i>griseolus</i> , <i>glaucescens</i> , <i>bikiniensis</i> , <i>albus</i> , <i>rubiginosus</i> .
乳酸菌 (<i>Lactobacillus</i>)	<i>brevis</i> , <i>manitobaeus</i> , <i>pentosacticus</i> , <i>gagionii</i> , <i>plantarum</i> .
短杆菌 (<i>Brevibacterium</i>)	<i>pentoso-aminoacidicum</i> , <i>imperiale</i> , <i>inertum</i>
微球菌 (<i>Micrococcus</i>)	<i>agilis</i>
假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)	<i>hydrophila</i>
串珠菌 (<i>Leuconostoc</i>)	<i>mensenoides</i>
气杆菌 (<i>Aerobacter</i>)	<i>aerogenes</i> , <i>lotanicum</i>
芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i>)	<i>laugulans</i> , <i>searotermophilis</i>
大肠杆菌 (<i>Escherichia</i>)	<i>coli</i>
霉菌 (<i>Aspergillus</i>)	<i>oryzae</i>
分枝杆菌 (<i>Mycobacterium</i>)	
小单孢菌 (<i>Micromonospora</i>)	<i>roseomonitrogenes</i>
小美孢束菌 (<i>Microelllobospora</i>)	<i>flavescens</i>
奴卡氏菌 (<i>Nocardia</i>)	<i>asteroides</i> , <i>lassonvillei</i> , <i>carallia</i>
节杆菌 (<i>Arthrobacter</i>)	
游动放线菌 (<i>Actinoplanes</i>)	<i>noissouriensis</i>
高温多孢菌 (<i>Thermopolyspora</i>)	
假奴卡氏菌 (<i>Pseudonocardia</i>)	
链孢束菌 (<i>Streptosporangium</i>)	<i>albus</i> , <i>vulgare</i>
黄杆菌 (<i>Flavobacterium</i>)	<i>devorans</i>

表 II 某些 D-木糖异构酶的性质

性 质	<i>L. brevis</i> ^a	<i>L. xylosus</i> ^b	<i>S. albus</i> ^c	<i>B. coagulans</i> ^d Strain HW-68
D-木糖 体底物的特 异性(单位/mg)	6.4 (35°C)	4.39 (35°C)	4.4 (70°C)	6.1 (40°C)
PH (最正值)	6-6.5 (D-木糖, D-葡萄糖 和 D-核糖)	7.5	8-8.5 (D-葡萄糖)	8-8.5 (D-木糖) 7-7.5 (D-葡萄糖, D-核糖)
K_m	5 mM	5.3 mM	3.2 mM	1.1 mM
D-木糖	5 mM	5.3 mM	3.2 mM	1.1 mM
D-葡萄糖	0.92 M		0.16 M	90 mM
D-核糖	0.61 M			83 mM
V_{max} (mg 酮糖/mg 蛋白/分)				
D-木糖				1.1 (40°C)
D-葡萄糖			118 (70°C)	0.52 (40°C)
D-核糖			32.8 (70°C)	0.25 (40°C)
K_i (竞争性抑制)				
D-木糖				70 mM
D-山梨糖			+	29 mM
D-阿拉伯糖醇	0.13 M	—		
L-阿拉伯糖醇	0.146 M	+		
D-甘露醇			+	70 mM
D-木糖醇	2.7	7 mM		2.5 mM
金属激活剂 (K_m)	Mn^{2+} (6.1 μM)	Mn^{2+} Co^{2+} Mg^{2+}	Co^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} (0.18 mM) Mg^{2+} (1.8 mM)	Co^{2+} Mn^{2+} Mg^{2+} 167,000
分子量	191,000	183,000	165,000	167,000
参考文献	a Yamanaoka (1965, 1969), Yamanaoka and Takahara (1977)	b Takasaka and Takahara (1977)	c Takasaka 等 (1969), Hogue-Angelotti (1975)	d Danno (1970, 1970a)

值見表Ⅲ。

表Ⅲ 从 *S. albus* 和 *B. Coagulans* 获得的 D-不扩异构酶
的氨基酸组成

Streptomyces 和 *Bacillus* 酶的分子量分别为 166,000 和
160,000

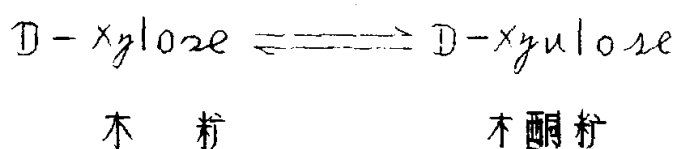
氨基酸	每克 D-不扩异构酶 (相对近似值)	
	<i>Streptomyces</i> Hogue-Angelotti (1975)	<i>Bacillus</i> (Danno, 1970)
天冬氨酸	180	182
苏氨酸	56	87
丝氨酸	36	70
谷氨酸	152	136
脯氨酸	72	44
甘氨酸	140	106
丙氨酸	180	140
半胱氨酸	4	0
缬氨酸	72	53
异亮氨酸	32	27
亮氨酸	40	51
苯丙氨酸	144	135
酪氨酸	36	58
苯丙氨酸	92	96
组氨酸	40	49
精氨酸	40	120
精氨酸	132	61
色氨酸	32	13

D-木糖异构酶是一个微酸性蛋白质，实际上是它的酸基比硷基占优势 (Danno, 1973; Hogue Angeletti, 1975)。在 *Streptomyces* 酶中半胱氨酸残基的存在是二种氨基酸组成间一个明显的差别。

自 *S. albus* 的 D-木糖异构酶的三维结构早已阐明 (Berman 等, 1974)，从 X-射线的结晶学研究的结果也支持四级结构的概念。

D、催化性质

按酶的分类法，D-木糖异构酶催化下列反应：



而且，如所共知的，D-木糖异构酶也能催化 D-葡萄糖转化成 D-果糖。一般来讲，所有的异构酶，由于它的催化作用都需要某些金属离子如 Co^{2+} ， Mn^{2+} ， Mg^{2+} ，或 Cr^{2+} 等存在。虽然这些酶十分类似，但不同来源的酶有个别的差别，D-木糖异构酶虽然其最适温度范围很大，但也认为它是一个对温度较定的酶，从自 *L. brevis* 的酶 45°C (Yamanaka 1968) 到从 *Actinoplanes missoccriciensis* (Scall et al, 1974) 酶的 90°C ，大多数 D-木糖异构酶有比 65°C 高的最适温度 (Yoshimura et al 1966; Takasaki et al 1969; Strudberg & Smiley 1971; Ottner 1974)。个别的例子