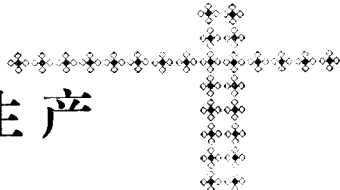


微生物酶的商业生产



程 明 译 陈祖荫 校

根据1974年纳赫(nacher)与塞姆(Jham)基于工业观点提出的一份详细说明,我们先来简单地说一下它的商业生产的主要目的。主要的商业目标有两项:即质量要达到合乎要求,成本要降低。本文认为酶的质量决定于如下因素,即:活性、稳定性、纯度与专一性。典型的第一代工业酶从广义上说的不纯的,因为污染的酶的活性一般没什么影响。反之,用于分析的酶在一般情况下是要求高纯度的。有碍某种分析的污染还需要在产品说明中列出。

1974年纳赫与塞姆曾对成本问题提出过一项公式,即:单位成本与生产成本成正比而与产量成反比。这种关系说明:产量对产品最终成本的直接影响,强调产量是决定采用什么制造法的经济标准。很多的研究与发展都倾向于较高产量的生产。要作到这一点也要考虑到生产成本的费用中包括研究费用在内。另一重要经济数据是制造的生产率,即:反应器单位容积中的平均生产率。这不但是由于高生产力加工使昂贵装备投入于某一特定程序的时间缩短,而且在生产过程中由于采用不稳定酶形成了较短的加工时间,使水解蛋白酶的变性和降解减少,因而降低。因为在各个提炼与净化过程中商业生产所需的时间远较实验室操作中所需为大。

微生物的选择

在发展一种新的商业酶时,首先要选定一种作为生产基础的微生物。正确选用菌种,使酶的性能适合于某一特定用途。表一所举各例中作了说明。其中所举最重要的现象是用喜温微生物来产生酶,因为喜温酶通常较喜寒酶更

为耐热,这在许多应用中是很有利的。另一方面选择的重要方法是通过筛分以获得需要的高产酶品种。这涉及用多种来源的微生物作试验。这方法广泛地应用于酶工业及其有关的发酵业中。在这种筛分法与变异体筛分法中需要有一种简便方法用以确定生产出来的酶的数量。为此必须将许多分离菌筛去。假如找到一种产生淀粉酶的菌种再用培养皿测定法,就可从培养皿里分离菌落,量出淀粉水解物。

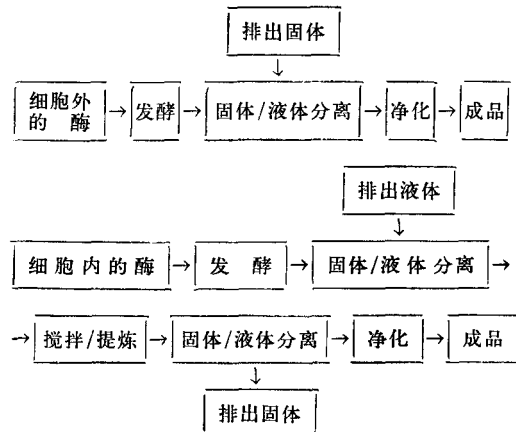
微生物的遗传控制

决定选用那一种微生物的因素主要取决于发达的遗传技术和有关生物化学情报的背景。如大肠杆菌是当前遗传工程实验所选中的微生物。由于对酶进行遗传控制比较容易,一般说来,这也就是为什么微生物优于用动植物的酶来作为商业酶来源的重要原因之一。使遗传控制易行的原因有多种,即可迅速获得许多细胞;大多数微生物为单倍体,故其变异体容易分离;同时很多有关的基础理论和应用技术一直在发展着,并有大量的研究成果。其中突出的是大肠杆菌但也有关于枯草芽孢杆菌,假单孢菌,啤酒酵母,黑曲霉等菌类。

变异体分离是改进菌株工作的开端。最老的方法是将多数在诱变中经筛分产生的有酶这样特定性状的变异体。应用这种方法可使米曲霉菌株分离,其淀粉酶产量较用原来那种菌株时要增长10倍。上述培养皿分离法在这里尤为有用。生化遗传方面的研究作为获取有用的突变体提供了省力的方法。这些方法现正日益应用于酶生产及其有关的如氨基酸与抗生素生产的一些技术中。

因此限制基因引起突变的方法已在进展着，它是一种取得重要突变的方法。另一种重要方法是设计选择性培养基，即只许可某些种类的突变体生长，但其母株则不能在它上面生长。选择这种培养基通常需要有相当的生物化学知识，而选择培养基将常常包含有新陈代谢类似物以作为抑制剂。这些选择法所持的依据在最近的一些评论中充分地作了讨论。虽然并没有多少文章谈到商业酶应用这些特殊方法，可是这些方法现正广泛地用于各种发酵菌株的改良方案中。这种改良方案为寻取突变体类型中突出的是已经提高到酶的合成水平。但有些特殊突变体也同样可用于提高产量。例如一种污染的酶，其活性会阻碍某一特定酶的应用，这就要找出不带这种污染酶的突变体。这种设想已应用于明胶的生产。在生产明胶的某些阶段中，生物碱蛋白酶是有不少价值的，蛋白酶在制造过程的后期，如发生酸性状态占优势并仍起作用时，就有可能发生不良的反应。可以说在酸性条件下使用无蛋白酶活力的突变体菌株是个适用的办法。另一个目前在商业生产上应用的更多的突变体是经改进后，使提取酶变得更容易后再去获得菌株的办法。这个方法对有的酶尤为重要。解决这个问题的办法是找到一种细胞壁容易破碎的突变体。许多为了分离这种突变体的绝妙的选择或筛分法已经设计出来。

图 1 细胞内的酶与细胞外的酶的
典型分离程序



还有一种在商业酶生产中迄今利用较少的方法就是利用遗传因子移植技术。最近得出的可喜成果是在不同的枯草芽孢杆菌分离菌间移植能较其母株产生更多的淀粉酶。在结束本文讨论微生物菌株的遗传控制时应当指出，目前在依靠遗传工程对枯草芽孢杆菌L株作扩大因子的探讨。这些技术结合在芽孢杆菌L株间进行品种间因子移植，是可对于商业化生产满怀希望的。

选择微生物来源重大影响商用酶性能的例子

表 1

酵素	微生物	性 状	应 用
淀粉酶	多粘芽孢杆菌	β 淀粉酶可转化配糖体属与植物哺乳动物的 β 淀粉酶相反是内向作用的并避过支链淀粉的1~6键。比较不耐热。	从优质淀粉中生产麦芽糖浆
	各种芽孢杆菌种	糖化耐热 α -淀粉酶，有时稍需钙离子	由淀粉制造糖浆的酿造附加物
	曲霉属菌	糖化不耐温 α -淀粉酶种	作面包及其他食品
β 半乳糖苷酶	酵母属(克氏汉逊氏酵母大型克勒克氏酵母腹壁酵母)	最适pH(6-7)，与维希氏大肠杆菌不同，接近奶及脱脂奶的天然值	乳产品发酵
蛋白酶	芽孢杆菌属	最适碱性，耐温	在高pH值处理皮革
	毛霉菌	酸性蛋白酶，有似凝乳酶的作用	
	栗原菌		干酪生产

生产方法中的工程方面

一旦选定要用的微生物菌株之后，就要保证按标准微生物学的技术来作纯种培养。从纯种里培养出足够的接种体通常要经过几个阶段才能移植到生产发酵体中去，虽然在有些制造法中还应用固体基质发酵，上述的一些接种通

常是在深发酵槽中进行的。操作规模差别很大,由主要的细胞外的酶的生产(发酵室容量 $>100\text{m}^3$)到试验工厂规模的特种酶的生产(发酵室容量由1至 15m^3)。这些发酵几乎都是间歇法,在装有搅拌器和能够保持正的溶解氧水平的充气系统中有内盘旋管或外套管控制温度,也许还具有控制功能。发酵室及其辅助设备必须使消毒能持续五日。应用于发酵的技术同抗生素工业要求一样。1977年伯曼在其论文中曾述及有些公司是同时生产微生物酶和抗生素的。在实验室中,已经广泛采用连续培养并从事研究合成微生物酶的规律,可是它并未在商业规模生产中得到推广。原因之一大概是间歇法生产对发酵工厂中的产品短期的间歇发酵有利于保持杀菌条件直到间歇法发酵终了为止,分解代谢抑制情形最小,因此在回收前就可达到高的酶浓度。如果可更新的纤维素或淀粉资源的工农业联合企业继续发展下去,那末为生产纤维酶与淀粉酶而采用的连续培养,以后可能更为普及。

分离步骤

图中所示为细胞内的酶和细胞外的酶的发酵后典型分离程序流程。由于细胞外的酶在发酵中泄入培养液,它分离的第一步就是由弃去的生物量中用离心或过滤法分离出液体物质,然后将酶浓缩以便于处理,即用一种有机溶剂或盐类沉淀或超过滤法。分离时常使用稳定剂,絮凝剂或过滤辅助物。发酵后用过滤(或)离心除掉生物量,然后从生物量中提取细胞内的蛋白质供纯化所要的酶。这一步是难以作到的,以后还要更详细的考虑。大多数用来提取蛋白质的方法能释出全部细胞内物质。在下一步除去细胞壁残渣的固体分离步骤中处理细胞壁,蛋白质,核酸的混合物是相当艰难的。为了减少加工量就必须在高的细胞浓度下工作。细胞分裂后提高了蛋白质浓度,由于核酸的存在而产生了高的粘度。这一现象加上了悬浮液和细胞与细胞壁之间以及细胞壁残渣的微小的颗粒一起使得以后的固体和液体分离困难。通常都在这一期间使用镁盐、链霉素或鱼卵精蛋

白来沉淀核酸。

最后净化阶段要使用诸如离子交换介质这样的昂贵材料,因此具有高度澄清的蛋白质溶液就很重要。通过上述条件采用遗传方法,使整个细胞蛋白质部分达到酶的浓度增长要求,可大有助于提纯。假如一个微生物细胞含有500个酶素,那末平均每个酶中就仅含有全部细胞蛋白质的0.04%。这就是说生产一个纯酶需要作相当的提纯工作。假如要将一个特定的酶提高到细胞蛋白的5%,那末经过两个谨慎的净化步骤,每次提高五倍纯度,就可获得纯态的酶。

酶分离中的单位操作

图1是细胞内的与细胞外的酶的生产流程图,其中表示在各种组合下的几种通用程序可适用于两种类型酶的分离。固液分离,破裂,沉淀与吸附是较为常用的酶分离单元操作。对细胞内的酶来说先从发酵液中固液分离,除去生物量,然后在分裂细胞后去掉细胞壁残渣及收集核酸与蛋白质沉淀物。可用过滤法或离心法进行分离。虽然费工而固体产量也较少,但有时仍要用框板过滤器来作批量分离。这种型式过滤器优于真空滚动过滤器之处是可以有较大的压降,这一性能在过滤特别难处理的溶液时是有用的。滚动真空过滤器的长处是能连续排出固态菌丝体培养物或在有予涂层的过滤器上用刀切断续排料。除少数小的间歇式净化外,离心机连续地流出液体。固体物可分批或连续地流出机器,其固体呈干稠状。可是这样作机器工作量大,每当钵满时就要停止机器,折洗干净。通常都用管形钵机器,它的性能见表2。这些机器的离心力标示出工业用机械的最大动力,但是这种机器的固体产量是少的,这种强大离心力与产量间的相互关系说明了结构上的限制。为了更多地生产固体可采用多室离心机,但其离心力却较管状钵机器为小。在要求连续排出固体酶的情况下可采用开口钵流出的圆盘钵式离心机。这种型式的离心机具有使用劳力少的优点,但这样生产的固体中所含水分较间歇排料为高。最后提一下满形排料或倾析器型离心机。这种机器离心力小,对带有

大量固体的液态流出物是有效的，能连续产生低湿度的固体物，它特别适用于澄清来自动植物体中提取的酶。所选用的设备须看操作规模和要作的分离属于何种类型。通常用过滤法或离心法分离整个微生物细胞和很好絮凝的蛋白质沉淀是不困难的。但在细胞破裂后再作上述分离，由于使用过滤的辅助剂多而流量低困难就往往大了。在适合因流出而并发的温度上升时，必须降低离心机的流出率以保持足够的分离活动。与实验室用类型的离心机比较，以上条件强调了工业用离心机离心力的相对小而造成的限制。

表3列出三种主要的提取细胞内蛋白质的技术。在最近5~10年中，由于物理破坏细胞的技术得到相当发展。在曼通高林(manton gaulin)机中加入一个刀形阀的机器已被用来从一些微生物中提取酶。在这种机器中细胞浆被迫在普遍高达68900KPa压力下通过阀座与阀片间的狭口，突然的降压而使细胞破裂。用玻璃球研碎细胞也是经常使用的办法。其它可连续用于大量的细胞分裂的物理方法是超声波与持续的 α -挤压。表4为可能作到的高压均质操作。化学分裂法缓慢，作间歇生产是难以控制和操作的，但它还在被使用着。也可用洁净剂来提取细胞膜和胞外酶，用此方法可以不过分破坏细胞而选择性地择出所需要的酶。沉

夏普管状钵离心机性能 表2

型 号	最 大 重 力	湿固体物产量
1P	60000	100毫升
2P	13000	5000毫升

细胞分裂与提取技术

- ①用物理方法分裂细胞(间歇式、持续式)
 - 高压均质法
 - 玻璃球磨白
 - 分 裂
- ②用化学方法分裂(分批法)
 - 自溶作用
 - 分解酶处理
 - 洁净剂，溶液处理
- ③用洁净剂提取

淀是细胞内的与细胞外的酶的纯化的第一步。传统的沉淀剂，如用溶液(酒精、丙酮)或盐类(硫酸)已由析出的沉淀剂(如：聚乙烯醇、聚乙烯亚胺等)加以补充。有机溶剂需要防火设备以及仔细控制温度，以防止因混合所产生的热而使蛋白质变性，这种沉淀通常是间歇进行的。

曼通高林-均质器性能 表3

机 器 型 号	生产量 (升/时)	可溶蛋白质产量 (公斤/时)	压 力 (kg/m ²)
APV-15M	54	1.2	550
APV-K ₃	280	6.4	550
APV-MC45	4500	100	550

净化程序

沉淀作用可用于除去不需要的污染物或从溶液中分离出需要的蛋白质。在大规模细胞内的酶的生产中，可借缩短生产时间及降低在连续生产初期因变性作用所损失的酶，以加快速度。固液分离步骤和用物理方法分裂细胞同样可以连续进行。如果可以连续进行沉淀便可获得沉淀的酶，它一般稳定，只需极短时间完成。使用了一个连续搅拌反应器，以接触饱和了的硫酸铵及含有酶的液体，调整两种流体进入反应器的速率，使硫酸铵在反应器中获得所要的饱和度，需要停留五分钟。样品随即或在18小时后过滤。

自反应器中立即取出样品上层液中的浓缩酶与经放置18小时后使之均衡的浓缩酶相似。这就可以设想先用遗传与环境方法提高细胞中的酶，在一开始就连续提取，即：收集细胞，细胞分裂，排除细胞残渣再继续沉淀，以降低生产细胞内的酶的成本。这种生产法的可靠性在半乳糖苷酶实验中已经证实；在一立方米体积的作为恒化器的发酵器中得到每小时10克的纯化的酶。

在脱盐沉淀后细胞内的酶的下一个纯化步骤就是用一些离子交换，凝胶或亲和力和色层分离法之类的色层分离法。这些分离法中所用的介质价值昂贵，还有不利的是其中多数是可被

压缩的。这就使得大型色层分离柱的操作变得困难,并发生拉床压降过度,因而不利于管道流通。这问题可以使用一个配备有搅拌器的、高度与直径比率少的分段柱以保证色层分离介质的流量接近于柱塞流量而加以解决。为增大拉床容量,可附加小舱,各舱的压力下降要均衡,并减少流失。大多数色层分离是间歇进行的,但有些商业系统采用了连续操作以达到自动化生产。在细胞外酶生产中,只需要这些单元操作中的少数几个来生产成品,而在细胞内酶生产中,为获得要求纯度的成品就得运用单元操作中的大多数。这点纳赫与塞姆在1974年解说从酶中纯化甘油激酶的发展中就已作了详尽的说明。早期方法是通过21个步骤才取得25%的酶的产额。经多年进展已降低到12个步骤,酶的产额达57%,并大大降低了成本。

未来发展

我们可以预期当前那种发展新的酶和新用途的趋势还要继续下去。这就还得经常筛分微生物以获得如具有稳定性、适当的pH值,不

具有副因子等更为理想性能的酶。此外,还要扩大对固定化酶的利用。稳定的,固定化的葡萄糖异构酶的发展可以说明这种趋势。现代遗传技术,如基因增殖与脱氧核糖核酸重组法还没发展到可以生产商品酶。幸而,这种情形可望能有所改变,尤其自从当代最有趣与活跃的研究之一的生化遗传已涉及到工业上占重要地位的杆菌属。应用这些技术而增加的酶的产额随着改进细胞内的与细胞外的酶的提取,可降低这些物料的成本,并为酶的催化开辟新途径。因为本地市场狭小,澳大利亚在商业微生物酶的生产上与日本、欧洲与美国比较是微小的。事实上当地制造商不论是在象淀粉酶蛋白酶或分析用酶市场上都难于和强大的海外制造商相竞争。可是如果要广泛发展以应用淀粉或纤维来作原料的工农联合企业时,那末就地生产酶以满足上述各种加工的需要,就会成为经济上的可能。

译自英文《Food Technology in Australia》Vol.31.no.6 1979

邮购食品

十年以前开始尝试的邮购食品,近五年来有很大的增长。

美国直接销售的邮购食品产品

年份	价值(千美元)
1974—75	100,000
1976	230,000
1977	237,000
1978	450,000 增长350%

具体例子是1箱170克至227克的牛肉排价值46美元,8份170克的鸡价值38.50美元。另一个公司的牛肉排,76份—198克包装,直接邮寄到顾客,共价72美元。

邮寄中99%是成功的邮寄产品,但邮到时条件不好,就会失去一个顾客。一个公司从76至78年约有74万付现钱的顾客,另一个公司统计是120万顾客,还有一个牛排公司是140万顾客。

孙时中译自美国《食品工程》
1980.3

用细菌测定方法来检测果汁的掺假

柑桔汁和其它食品的掺假可以在很短时间内用一种「驯化」的细菌来测定这是美国农业部水果蔬菜化学实验室化学师们新近研制的一个方法。胚芽乳杆菌不会在合成饮料的测定样品中生长,因为合成饮料缺乏一些次要的营养物或者是由于营养物不平衡的原因。细菌新陈代谢的一个付产品就是某一种酸类。在测定样品中的次要营养物愈多,细菌的新陈代谢愈好,因而产生的酸也愈多。就是这些最后形成的pH值的变化,可以用来决定检测样品中的天然果汁的含量百分比。管理机构可以采用这种方法发现伪装的「自然」产品出售,从而杜绝欺骗。

孙时中译自美国《食品工程》

一九八〇·三