

康氏木霉(P2) 纤维素酶转化蔗髓纤维素成糖及生产 SCP*

张发群 舒远才 郝军 张光恕 周金燕

(中国科学院成都生物研究所,成都)

摘要 在 30 升卧式酶解罐和 5 升标准发酵罐中,进行了以蔗髓纤维素为基质,用康氏木霉(*Trichoderma koningii*) P2 菌株产生的纤维素酶水解成糖生产单细胞蛋白的试验。10% 的底物浓度可以得到较高的转化率。最适搅拌速度为 10r/min,用酶量为 2.21u/g 底物,50℃ 酶促水解 24 小时,酶解液中还原糖含量为 3—4%,底物得糖率 49.5%,全纤维素转化率 73.8%。用该酶解糖生产单细胞蛋白,试验了 5 升标准罐培养酵母的最适条件。

关键词 纤维素酶;蔗髓纤维素;单细胞蛋白

目前,国内外对于用木质纤维素,如工厂废渣、农村秸秆和木材废料为原料生产单细胞蛋白(SCP),具有广阔的发展前途^[1-3]。60 年代以来,很多国家对纤维素的酶促水解进行了大量的研究工作,但多数停留在小型试验上。我们在原有工作的基础上^[3],针对放大试验中存在的某些工艺问题,进行了 30 升卧式酶反应罐及

5 升发酵罐试验,将所得结果进行了 4 000 升卧式酶解罐和 5 000 升标准发酵罐规模的中间试验。现将小试结果报道如下。

材料与 方法

1. 菌种:康氏木霉(*Trichoderma koningii*)

* 国家“七五”科技攻关项目。

P2 菌株,由中国科学院成都生物研究所提供。

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 1254 菌株,来自轻工部食品发酵研究所(引自西德)。

2. 蔗髓原料: 四川省内江糖厂提供。

3. 酶曲的制备及 CMC、FP 酶活力的测定参见文献[4,5]。

4. 纤维素酶复合物活性测定: 采用 Mandels 推荐的“滤纸测定法”^[5]。

5. 还原糖测定: 采用 DNS 法^[6]。

6. 酒精测定: 重铬酸钾比色法^[7]。

结果与讨论

(一) 蔗髓纤维素酶促水解成糖

对纤维素进行化学预处理是提高酶解效率的有效措施。迄今,国内外基本上采用氢氧化钠进行碱处理^[2-3]。我们采用 CaO 代替烧碱预处理蔗髓, CaO 的用量为底物的 10%。在 30 立升卧式酶反应罐中探索了 CaO 处理后的蔗髓酶解的部分条件。以下试验用酶量均为 2.21u/g 底物。

1. 酶解时间与底物得糖率: 24 小时内,随酶解时间增加,底物得糖率与纤维素转化率随之增高(表 1)。

表 1 酶解时间与底物得糖率及转化率的关系

酶解时间 (h)	底物得糖率 (%, W/V)	全纤维转化率 (%)
4	28.5	42.5
8	35.9	53.5
12	39.5	58.9
16	43.8	65.3
20	47.4	70.6
24	49.5	73.8

2. 底物浓度与底物酶解率的关系: 用水解 24 小时的水解液含糖量和底物得糖率表示,结果表明(表 2),在试验范围内,底物浓度增加,酶解液含糖量及底物得糖率也随之增加。

这个结果的实际意义是,能大幅度地提高水解液中还原糖的含量。还原糖含量较高,就有可能在其水解液的实际应用工艺中省掉耗能的浓缩步骤。

3. 搅拌速度与底物得糖率的关系: 在本试

表 2 蔗髓底物浓度与酶解率的关系

底物浓度 (%)	酶解液含糖量 (%, W/V)	得糖率 (%)
3.3	1.15	36.1
5.0	1.78	37.8
7.0	2.38	39.3
10.0	3.63	41.2

验条件下,搅拌速度为 10r/min 时底物得糖率最高(表 3)。这种结果与 Reece 和 Mandels^[8]报道的不尽一致。他们认为纤维素酶水解纤维素时,静止比振荡有利。笔者认为,在纤维素酶促反应系统中,底物具有水不溶性。适度的搅拌有利于酶和底物的结合,也有利于产物的扩散,以降低产物对酶的竞争性抑制^[9],从而提高了水解效率。

表 3 不同搅拌速度与底物得糖率的关系

搅拌速度 (r/min)	酶解 24 小时得糖率(%)
0	32.4
5	37.4
10	40.3
15	35.8
20	36.8

4. 酶促水解工艺的稳定性试验: 新鲜蔗髓用 10 倍的 1% 石灰乳,在 120℃ 下处理 70 分钟,底物浓度为 10%,搅拌速率 10r/min,经 6 次酶解试验,结果表明,水解 24 小时的底物得糖率最低为 45.3%,最高为 54.5%。全纤维素转化率平均为 73.8%,水解液中还原糖含量平均为 4.1%(表 4)。

表 4 酶解工艺的稳定性试验

试验批号	水解液含糖 (%W/V)	底物得糖率 (%)	纤维素转化率 (%)
38	4.6	48.6	72.5
39	3.8	48.3	72.0
42	4.2	45.3	67.5
43	3.8	54.5	81.2
44	4.0	54.4	81.1
56	4.1	45.4	68.4
平均	4.1	45.9	73.8

(二) 蔗髓酶解糖的 SCP 生产

热带假丝酵母 1254 菌株具有同化戊糖和

表5 通气量与酵母生长各参数的相关性

通气量 (l/h)	糖耗 (%)	对糖产率 (%)	比生长速度 (h ⁻¹)	倍增时间 (h)	生产效率 (g/L·h)	对数生长期 (h)	达到最高菌浓时间 (h)
180	93.6	54.97	0.24	2.9	0.43	2—8	14
270	90.37	59.43	0.28	2.5	0.56	6—10	12
360	90.73	62.91	0.54	1.37	0.87	2—6	6
450	91.13	58.99	0.32	2.16	0.91	2—10	10

己糖的生理特性。在降低培养基氮、磷用量的摇瓶试验基础上,进行了5升罐通气培养试验。

1. 通气量试验: 搅拌速度为300r/min, 装液量为3升。当通气量为360 l/h时, 酵母产率及比生长率最高, 倍增时间及达到最高菌浓所需时间最短(表5)。

2. 搅拌速率试验: 通气量固定为360 l/h, 比较了不同搅拌速度的影响。搅拌速率为500 r/min 和300r/min 的效果相差不多。从生产角度出发, 搅拌速度以300r/min 为宜。

3. 糖浓度对酵母糖代谢的影响: 当基质中糖浓度高时, 即使供氧很充足的条件下也迫使酵母进行部分发酵作用。在360 l/h 通气条件下, 多次试验结果均一致。试验中采用不同初糖浓度, 对酵母产率的关系列在表6中。初糖浓度为0.77g/ml时, 收率最高。因此为了增加菌浓, 提高收率, 同时又达到最高糖利用率, 初糖浓度控制在0.8%左右为宜。

表6 初始糖浓度对酵母产率的影响

初糖浓度 (%W/V)	终 pH	菌 量 (g/l)	产率 (%)
0.50	6.1	4.2	84
0.77	5.5	6.65	86.4
0.95	5.1	7.15	75.3
1.22	4.5	8.0	65.6
1.4	4.1	8.75	62.5
1.67	3.8	8.8	52.7
1.85	3.7	9.3	50.3

4. 碳氮比试验: 氮源为硫酸铵和尿素(比例为2:3或1:2), 此时氮含量为0.2—0.22%, 碳氮比为100:15.1—18.8, 酵母产率最高, 为47.2—59.4%。

(三) 1254 蔗髓酵母的营养成份

经检验表明, 蔗髓酵母破壁原液中辅酶

A 含量为 $3.08 \times 10^4 \mu\text{g/kg}$, 含游离硫胺素 $0.57 \mu\text{g/g}$ 。按饲料常规分析方法测定, 1254 酵母营养成分和氨基酸分析结果列于表7和表8。

表7 1254 蔗髓酵母营养分析

营养成分	含 量 (%)
水分	6.4
粗蛋白质	40—50
灰分	13
总磷	3.89
粗脂肪	9—12
粗纤维	5.86
钙	1.35
无氮浸出物	25.36

表8 1254 蔗髓酵母氨基酸含量分析

氨基酸	含量 (%)	氨基酸	含量 (%)
赖氨酸	1.74	脯氨酸	0.60
组氨酸	0.56	丙氨酸	2.27
精氨酸	1.78	胱氨酸	0.48
门冬氨酸	2.21	缬氨酸	2.02
苏氨酸	1.16	蛋氨酸	0.16
丝氨酸	1.14	异亮氨酸	1.70
谷氨酸	3.67	亮氨酸	2.10
甘氨酸	1.23	酪氨酸	0.80
苯丙氨酸	1.35		

测定结果表明, 1254 蔗髓酵母粗蛋白含量与糖蜜啤酒酵母接近, 脂肪含量高于啤酒酵母, 是一种优质饲料蛋白原料。

参 考 文 献

1. Peitersen N. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:1291, 1975.
2. Haggett K D et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6:189, 1978.
3. 中国科学院成都生物所纤维素酶组等: *微生物学通报*, 6(2): 13—15, 1979.
4. Mandels M: *Biotechnol. Bioeng.*, 18(6):21—23, 1976.
5. Summer J B: *Laboratory Experiments in Biological*

1991 年 18 (4)

微生物学通报

• 217 •

Chemistry, Acad Press, New York, p. 38, 1949.

6. 北京轻工业学院等编: 工业发酵分析, 中国财政经济出版社, 北京, 1963。

7. Reese et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**:323—333, 1980.

8. Ghose T K et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, **1**:55, 1971.

9. 舒远才等: 太阳能学报, **5**(4): 433—439, 1984。