

半纤维素蒸汽爆碎水解物生产 菌体蛋白的菌种选育及发酵条件*

陈洪章 曲音波 高培基 施宏杰

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

半纤维素通常占天然纤维性材料的 10—40%, 通过蒸汽爆碎处理^[1] 半纤维素可发生自水解作用, 生成以木寡糖为主的水解产物。如能有效地将这些水解产物转化成有用产品, 将明显改善纤维素微生物转化工艺的经济效益, 并减少可能造成的二次污染。目前, 木糖酒精发酵仍有一定困难^[2]。根据我国蛋白质饲料短缺的现状, 我们开展了利用纤维性废料的蒸汽爆碎水解物发酵生产菌体蛋白饲料的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

本所收藏的 18 株酵母, 7 株丝状真菌。

(二) 汽爆水提液培养基及培养方法

山东平邑造纸厂麦秸备料废渣经汽爆处理(罐压 1.0MPa, 20 分钟)后, 加水煮沸, 过滤得水提液^[1], 添加 4g/L 硫酸铵和 1g/L 尿素作为培养基。接种后, 30℃ 振荡培养 16—18 小时。

(三) 高蛋白含量突变株诱变选育

离心收集培养 15 小时的菌体, 经紫外线和亚硝酸处理^[3], 经高浓度抑制物富集培养^[4]后, 在 2% 木糖培养基平板上单胞分离, 用碘染色^[5]或苏丹黑染色法^[6], 挑选染色较浅的菌落(多糖或脂肪含量低变株)。

(四) 分析测定方法

菌体生物量采用叠集细胞体积法或菌体干重法测定。DNS 法测还原糖, 酚-硫酸法测总糖。蛋白质测定和氨基酸分析采用常规方法。木聚糖酶和 β -木糖苷酶活力测定见文献^[7]。

结 果 和 讨 论

(一) 菌种筛选

将收集到的 25 株真菌接种在平板上培养后, 选出 14 株生长较快的菌株。经液体摇瓶复筛后。再选出三株真菌菌体生物量大、残糖低的菌株: 皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 851、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 426A 和斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) 114-2。进一步比较的结果见表 1。

同二株丝状真菌相比, 皮状丝孢酵母 851 发酵周期短, 生产率较高, 虽然菌体量低些, 但菌体蛋白质含量相对较高。而且 851 菌株已经过毒性检测, 证明无毒性反应, 适于生产饲料。

本文于 1991 年 7 月 12 日收到。

* 国家教委优秀青年教师基金和轻工部科技发展基金项目。

本所马桂荣提供了出发菌株, 李丽莉进行了氨基酸分析, 特此致谢。

表 1 不同菌株在汽爆水提液培养基中生长情况的比较

菌 株	菌体量 (g/L)	发酵周期 (h)	生产率 (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	菌体蛋白质含量 (%)
皮状丝孢酵母 851	7.4	15	0.49	35.0
黑曲霉 426A	12.1	40	0.30	28.3
斜卧青霉 114-2	12.3	40	0.31	27.5

(二) 高蛋白质含量突变株的诱变选育

作为蛋白质饲料，851 菌株的菌体蛋白含量仍不够高。我们试图通过诱变来提高其蛋白质的含量。考虑到突变株细胞中贮藏的多糖和脂类物质的减少，会使其它组分含量相应增多。我们先后用紫外线或紫外线-亚硝酸复合处理并经富集后，在 2% 木糖平板上挑选出碘液染色或苏丹黑染色后着色较浅的菌落，进行了摇瓶复筛。选出的 851S 菌株菌体蛋白含量达到了 47.0%，比出发菌株 851 提高了 34.1%。

851S 菌株发酵周期略长，培养 16—18 小时菌体浓度可到最大值 (10.5g/L)，并合成一定量的胞外木聚糖酶 (3.2Iu/ml) 和 β -木糖苷酶 (0.05 Iu/ml)。

851S 菌株的风干菌体含水份 6.81%，灰分 6.2%，粗蛋白 47.4%。菌体氨基酸齐全，其中蛋氨酸达 27.7mg/g 菌体。明显高于一般饲料酵母 (8.8mg/g)。

(三) 851S 培养条件优化

1. 糖浓度的影响：由表 2 可见，水提液总糖浓度大于 14.5g/L，生长就受到抑制，但总糖消耗继续增加。而使用纯木糖培养时，木糖浓度大于 25g/L 才表现底物抑制。在水提液中培养时，得率可到 0.7g 菌体 /g 总糖，显示 851S 菌株还能利用除糖份外的其它有机物。

表 2 糖浓度对 851S 生长的影响

培养基	糖浓度 (g/L)	菌体浓度 (g/L)	残糖 (g/L)	耗糖量 (g/L)	菌体得率 (g/g)
水提液	7.0	4.8	1.8	5.2	0.93
	11.9	7.5	2.4	9.5	0.79
	14.5	8.5	3.2	11.3	0.75
	16.6	7.8	4.3	12.3	0.64
	21.0	6.9	5.1	15.9	0.43
	26.8	5.9	5.4	21.4	0.22
木糖	15.0	8.7	0.7	14.3	0.61
	20.0	8.9	1.1	18.9	0.47
	25.0	9.5	2.8	22.2	0.43
	30.0	8.9	10.4	19.6	0.45
	35.0	7.2	14.6	20.4	0.35

2. 氮源和 pH 的影响：表 3 的结果显示，851S 能同化硫酸铵和尿素，对硝酸盐利用较差或不能利用。851S 菌株的最适生长 pH 在 5.4 左右。混合氮源 (硫酸铵和尿素以 4:1 混合) 有利于控制 pH 值，使其稳定在最适 pH 周围。

表 3 氮源对 851S 生长的影响

氮 源	浓 度 (g/L)	最终 pH	菌体浓度 (g/L)
硫酸铵	5	3.9	7.0
尿 素	5	7.0	6.9
硝酸钠	5	6.3	3.8
硫酸铵 + 尿素	4+1	5.4	8.3
	3+2	5.9	8.1
	2+3	6.0	7.3
	1+4	6.8	7.1

3. 其它: 851S 的最适生长温度为 30 ℃。向水提液中分别添加磷酸二氢钾、硫酸镁和酵母粉, 对生长无明显影响。菌体具有一定的凝集性, 利于菌体收集。

总之, 皮状丝孢酵母 851S 是一株较理想的利用半纤维素的产蛋白菌株, 有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 陈洪章等: 林产化学与工业, 12(3):217, 1992。
- [2] Olsson, L. et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34/35: 359, 1992.
- [3] 章铭春: 工业微生物诱变育种, 第 138 页, 科学出版社, 北京, 1984 年。
- [4] 胡立勇等: 中国抗生素杂志, 13(6):389, 1988。
- [5] Chester, V. E.: *J. Gen. Microbiol.*, 51:49, 1968.
- [6] Schelegal, H. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, 71:283, 1970.
- [7] Robert, F. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25:1127, 1983.

SCP PRODUCTION FROM STEAM-EXPLODED HEMICELLULOSE HYDROLYSATE: STRAINS AND FERMENTATION CONDITIONS

Chen Hongzhang Qu Yinbo Gao Peiji Shi Hongjie

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

The cellulosic waste of paper mill was pretreated by steam explosion. Hemicellulose hydrolysate was washed out by hot water. *Trichosporon cutaneum* 851 was selected for SCP production from the water extract. After mutation, a higher protein content (47.0%) mutant, *T. cutaneum* 851S, was obtained by selecting negative mutants of glycogen and lipid content. Effects of total sugar concentration, nitrogen sources, pH and temperature on the growth of 851S were investigated. After cultivation for 16 h, biomass concentration became 10.5 g/L with a yield of 0.75 g/g total sugar.

Key words Hemicellulose; *Trichosporon cutaneum*; Single cell protein (SCP)