

应用固定化里氏木霉糖化玉米秆纤维素的研究*

夏黎明 代淑梅** 岑沛霖

(浙江大学化工系, 杭州 310027)

摘 要 采用多孔聚酯材料固定里氏木霉(*Trichoderma reesei* Rut C30)菌丝细胞, 将固定化细胞在生长限制条件下重复分批培养, 使纤维酶的合成与玉米秆纤维原料的酶解糖化耦合在一个反应器中同时进行。在 30℃、初始 pH4.8、摇瓶转速 150r/min 的条件下, 连续重复进行 12 次分批培养试验。每批玉米秆用量为 60g/L, 培养周期 4.5d, 共 54d。培养液中含滤纸酶活力平均为 0.70IU/ml, 还原糖 26.41g/L, 糖化率达到理论值的 89.11%。固定化菌丝形态正常, 菌量保持在 10g/L 左右。在间歇添料条件下, 玉米秆原料的总量可提高到 120g/L, 7d 后还原糖浓度达 52.81g/L, 糖化率为 89.20%。利用固定化里氏木霉同时产酶和糖化植物纤维原料, 工艺简便、成本低廉、易于连续自动化操作, 是一条有效利用可再生纤维素资源的新途径。

关键词 固定化细胞, 纤维素酶, 玉米秸秆, 糖化

分类号 TQ920.1

随着世界人口的激增, 粮食和能源的短缺将日趋严重, 可再生植物纤维资源的开发利用已引起全世界的普遍关注。利用纤维素酶将纤维素原料转化为可利用的单糖, 进一步生产酒精、单细胞蛋白或其他发酵产品, 其经济价值和社会效益都十分巨大。在纤维素原料的酶解糖化工艺中, 纤维素酶的生产和酶水解通常是在各自不同的工艺条件和设备中进行的。多年来, 国内外已在这些方面开展了大量的研究工作, 虽然取得了一些可喜的进展, 但目前离实际应用尚有一定距离。存在的主要问题是纤维素原料糖化过程中酶的耗量过大, 而纤维素酶的生产成本仍然偏高^[1]。近年来, 我们发现在重复培养固定化里氏木霉菌丝细胞的过程中, 若控制适宜的培养条件, 可以使纤维素酶的合成与玉米秸秆的酶解糖化耦合在一个反应器中同时进行, 这样有利于简化工艺、减少设备投资和生产成本。本文主要报道有关这方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

采用的菌种为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的优良突变株 Rut C30, 来自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection)。将菌种移接在马铃薯、葡萄糖、琼脂斜面上, 在 30℃ 条件下培养 7d 后, 于冰箱中保存备用。

* 曹光彪高科技发展基金资助项目。

** 目前工作单位: 唐山市冀东制药厂。

收稿日期: 1996-10-21

1.2 培养基

里氏木霉生长及固定化的液体培养基按照 Mandels 等报道的营养液^[2]配制。

固定化里氏木霉糖化玉米秸秆的培养液(糖化培养基)中,除玉米秸秆原料外,每升培养基中含: KH_2PO_4 2.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 吐温 80 1.0 g, 以及 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.0 mg, CoCl_2 10 mg。pH 用柠檬酸缓冲液调至 4.8。

上述培养基在 121℃ 下湿热灭菌 30 min, 冷却后使用。

1.3 里氏木霉菌丝细胞的固定化^[3]

在 250 ml 三角瓶中加入 50 ml 生长培养基, 接入斜面菌种后, 于 28℃、150r/min 条件下培养 48 h, 制成液体菌种。

以多孔聚酯泡沫(孔隙率大于 90%, 由南京塑料厂生产)为载体, 吸附固定里氏木霉的菌丝细胞。将载体切成一定大小(4 × 2 × 1 cm), 每升生长培养基中放入 8 g 多孔载体, 在 121℃ 下灭菌 30 min, 冷却后接入 10% 的液体菌种; 于 30℃ 恒温条件下培养 3d 后, 移去剩余培养液, 留下吸附固定在载体上的菌丝细胞备用。

1.4 固定化里氏木霉的扫描电镜样品制备

样品先用 4% 戊二醛预固定, 1% 锇酸后固定, 再经酒精系列脱水, CO_2 临界点干燥等步骤后, 采用真空喷镀仪镀膜, 置于扫描电子显微镜下观察、摄影。

1.5 玉米秸秆的预处理

河北产玉米秸秆粉碎至 30 目左右, 加 2% 的 NaOH 至固液重量比为 1:4, 在 85℃ 下处理 1h 后, 水洗至 pH 中性, 100 g 玉米秸秆(干重)经过预处理后, 所得残渣中含综纤维素 49.9 g, 木质素 6.4 g(已脱去 62.4%)。

1.6 玉米秸秆的糖化

本试验在 250 ml 的三角瓶或 1000 ml 的三角瓶中进行。当菌丝体吸附固定完成后, 倾去原有生长培养液, 换糖化培养基。纤维素底物(经过预处理的玉米秸秆)按照批式工艺或间歇添料的方法加入。将三角瓶置于 30℃、150r/min 的摇床上振荡培养, 定时取样测定培养液中的还原糖、滤纸酶活力、pH 值等参数。当一批试验结束后, 收取糖液, 加入新的糖化培养基和玉米秸秆原料, 重复上述过程。玉米秸秆的糖化率按下式计算:

$$\text{糖化率}(\%) = \frac{\text{还原糖总量} \times 0.9 \times 100}{\text{底物中综纤维素含量}}$$

1.7 分析测定方法

纤维素酶活力按国际理论和应用化学协会推荐的国际标准方法测定^[4], 一个滤纸酶活力(FPA)国际单位等于酶水解反应中每分钟生成 1 μmol 葡萄糖的酶量。

还原糖用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定。玉米秸秆酶解液的成分(葡萄糖、木糖和纤维二糖等)采用 B_{10} -Rad HPX-87P 高效液相色谱糖柱分析检测。

2 结果和讨论

2.1 里氏木霉菌丝的固定化

里氏木霉菌丝细胞能够被多孔载体有效地吸附固定。当液体菌种刚接入时, 培养

液中充满了细小的菌丝体, 5 h后这些菌丝全部被载体所吸附, 培养液由混浊变清。初期被固定的菌丝在载体上呈零星小点状分布, 然后进一步扩展蔓延, 逐步布满整块载体(图 1-A)。经 72h 培养后每克载体上所固定的菌量可达到 1.2 g(干重), 此后由于培

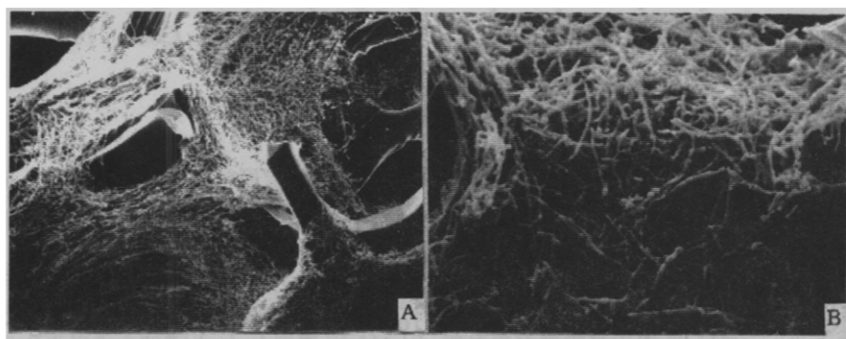


图 1 固定化里氏木霉的扫描电镜照片

Fig.1 SEM photographs of immobilized *Trichoderma reesei* Rut C30

A($\times 93$): 分布多孔载体上的固定化菌丝 The immobilized hyphae on the porous supporter;

B($\times 406$): 连续使用 54 天后的固定化菌丝 The immobilized hyphae after used for 54 days.

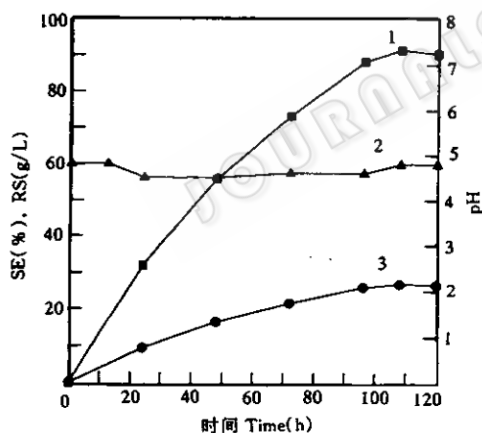


图 2 玉米秸秆的批式糖化过程

Fig.2 Time course of corn stover saccharification in batch process

1. 糖化率(SE) Saccharification efficiency; 2. pH 值 pH value; 3. 还原糖浓度(RS) Concentration of reducing sugar.

108 h 还原糖浓度达 27.1 g/L, 为理论糖化率的 91.4%(图 2)。

在通常的纤维素酶生产过程中, 大部分碳源用于菌体的生长与代谢, 培养液中还原糖浓度很低。我们曾采用固定化里氏木霉生产纤维素酶, 培养液中还原糖浓度一般在 0.5g/L 左右^[3]。在本试验中, 由于采用了氮源限制的糖化培养基, 固定化菌丝细胞的营养生

培养基中的养料已基本耗尽, 菌量不再增加。

采用扫描电镜观察发现, 在分批培养条件下重复使用 54 d 后, 载体上的菌丝与载体网络之间依然牢固地纠缠在一起。固定化菌丝形态正常, 密集如初(图 1-B)。实验^[3]证明, 这种通过多孔载体吸附固定的菌丝细胞在整个使用过程中进行着缓慢、持续的更新交替, 部分细胞的死亡裂解与适量的增殖生长相伴在一起, 使得固定化细胞总量保持一定的动态平衡, 从而显示了长时间连续使用的可行性。

2.2 玉米秸秆的批式糖化过程

在含有固定化里氏木霉和糖化培养基的摇瓶中一批加入 60 g/L 的玉米秸秆(指原始干重, 实际综纤维素含量为 29.64 g/L)。培养 48 h 后, 大部分固体纤维底物已经消失, 培养液由稠变稀, 同时还原糖浓度逐渐升高, 到

长十分微弱。这样，一方面作为次生代谢产物的纤维素酶可继续产生^[5]，同时糖化过程中形成的还原糖能得以累积，实际上这是一种产酶和糖化的耦合过程。

在批式工艺条件下，采用固定化里氏木霉重复进行玉米秸秆(60g / L)的糖化试验。每批 4.5 d, 重复 12 批, 共 54 d。从表 1 中可以看出, 各批试验的结果比较一致, 糖化率平均为理论值的 89.11%, PFA 平均为 0.70IU / mL, 载体上的固定化菌量(干重)基本保持在 10 g / L 左右。由于采用了生长限制培养基, 培养过程中 pH 保持在 4.5~4.8 之间, 加上里氏木霉抗杂菌的能力较强, 试验过程中未发现微生物污染现象。

将纤维素酶的合成和纤维原料的酶解糖化耦合在同一反应器中进行, 既可简化工艺、减少设备投资、缩短生产周期; 同时, 由于固定化菌丝处于生长限制的稳定状态, 用于菌丝营养生长的纤维素底物极为有限, 而且不必外加蛋白胨等氮源, 所以成本可大为降低。

表1 重复分批培养试验结果

Table 1 The results of repeated batch processes using immobilized *Trichoderma reesei* cells

批 次 Batch	FPA (IU/ml)	固定化细胞(g/ L) Immobilized cells	还原糖(g/ L) Reducing sugar	糖化率(%) Saccharification efficiency
1	0.62	9.12	24.40	82.32
2	0.75	9.62	27.09	91.40
3	0.71	10.44	27.24	91.90
4	0.65	10.81	28.26	95.34
5	0.48	10.88	27.71	93.49
6	0.55	10.25	26.85	90.60
7	0.82	10.55	25.03	84.45
8	1.02	10.03	24.59	82.96
9	0.66	9.66	25.52	86.10
10	0.85	9.23	26.23	88.49
11	0.60	9.56	27.18	91.70
12	0.73	10.28	26.84	90.55

2.3 批式糖化过程中纤维素酶活力的变化特征

在批式工艺条件下, 纤维素酶的活力起初上升较快(图 3), 培养 12 h 后 PFA 达到 0.43IU/ml。这是由于固定化里氏木霉的菌量已达到约 10 g/L 的稳定水平, 省去了通常所必须的前期菌种生长阶段, 所以产酶的滞后期很短。然而值得注意的是 12 h 后, 培养液中的 FPA 不但没有提高, 反而出现下降。这主要是由于部分纤维素酶被固体纤维素底物吸附所致。据 Lars Vallander 和 Karl-Erik Eriksson 报道^[6], 在木质纤维素原料的酶解过程中, 约有半数以上的纤维素酶被固体底物所吸附, 这一结果与本试验的情况很相似。在培养 12h~60 h 这段时间内, 虽然液相中能测到的 FPA 很小, 但固体玉米秆原料已大部分消失, 所以可以断定纤维素酶降解作用的存在。通常认为纤维素酶的水解反应是从底物吸附酶开始的^[7], 一旦纤维素底物被水解, 纤维素酶又可返回液相中。从图 3 看出, 培养 60h 后, 培养液中 FPA 开始升高。此时固体纤维底物已基本消失, 部分纤维素酶被解附; 同时由于纤维素水解的一些中间产物仍对纤维素酶的产生有诱导作用, 所以 96h 后培养液中的 FPA 达到了 0.75IU / ml。在本试验条件下, 玉米秆纤维原料与固定化菌丝细胞接触频

繁,有些纤维原料会被吸附到载体网格中,与固定化菌丝细胞交错在一起,这种状态有利于诱导纤维素酶产生,也有利于纤维素酶被底物迅速、有效地吸附,从而使糖化效率提高。

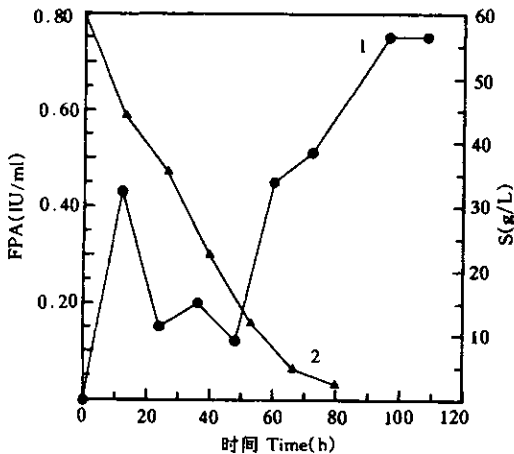


图3 批式糖化过程中纤维素酶活力的变化

Fig.3 The time course of cellulase activity changing in batch processes

1. 纤维素酶(FPA) Cellulase; 2. 玉米秸秆浓度(S)
Concentration of corn stover.

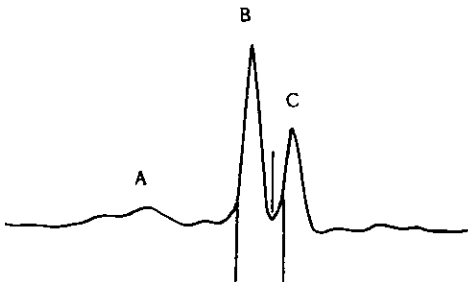


图4 玉米秸秆水解液的高效液相色谱图

Fig.4 High performance liquid chromatogram of hydrolysate derived from corn stover

A. 纤维二糖 Cellobiose; B. 葡萄糖 Glucose;
C. 木糖 Xylose.

2.4 玉米秸秆糖化液的成分分析

采用高效液相色谱仪对固定化里氏木霉糖化玉米秸秆的终产物液进行分析检测,总糖中葡萄糖占54.4%,木糖35.7%,纤维二糖7.5%,其他成分2.4%(图4)。由于单糖的比例高达90.1%,所以可用于生产单细胞蛋白、酒精、丙酮-丁醇等发酵产品。

2.5 间歇添料试验

批式工艺中,玉米秆原料在培养起始一次性加入。由于固体底物的比容较大,加上固定化载体需占据一定空间,致使纤维底物的浓度受到限制。为了提高终产物中糖的含量,我们进行了间歇加料试验。在加入玉米秸秆总量一致的前提下(120g/L,实际含综纤维素59.2g/L),采用不同的添料方式,培养7d后测定糖化结果(表2)。

试验结果表明:在添料总量相同时,增加添料次数及同时补加营养盐可以提高糖化效

表2 间歇添料试验结果

Table 2 The results of fed-batch process using immobilized *Trichoderma reesei* cells

添料方式	Feeding Manner	I ¹	I ²	II ¹	II ²	III ¹	III ²
葡萄糖	Glucose(g/L)	18.08	25.51	21.66	29.02	25.60	30.13
木糖	Xylose(g/L)	17.82	18.05	17.94	18.28	18.01	18.32
还原糖	Reducing Sugar(g/L)	42.83	48.32	46.95	51.82	47.40	52.81
糖化率	Saccharification						
	Efficiency(%)	72.34	81.62	79.30	87.54	80.06	89.20

Note: I. Feeding in two times(60g/L×2); II. Feeding in three times(40g/L×3); III. Feeding in four times (30g/L×4).

1.Not adding nutrient salts; 2. Adding nutrient salts.

率。表2中Ⅲ²的糖化率达到了89.20%,与批式工艺条件下糖化率的平均值相似(表1)。在批式工艺中,每批试验的纤维底物用量为60 g/L,周期4.5d;而采用Ⅲ²的间歇添料方式,纤维底物的总用量可提高到120 g/L,周期7d;这样不仅增加了终产物的糖浓度,而且提高了设备的利用率。

利用固定化里氏木霉培养过程中形成的纤维素酶,实现植物纤维原料的同时糖化,在可再生资源的转化利用上是一种新的探索。这方面的深入研究具有重要的学术价值和广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 高培基. 生物工程学报, 1989, 5(1): 6~7.
- [2] Mandels M, Medeiros J E, Andreotti R E *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1981, 23: 2009~2026.
- [3] 夏黎明, 余世袁, 程 芝. 南京林业大学学报, 1993, 17(2): 1~6.
- [4] Ghose T K. *Pure & Appl Chem*, 1987, 59: 257~268.
- [5] Turker M, Mavituna F. *Enzyme Microb Technol*, 1987, 9: 739~743.
- [6] Vallander L, Kriksson K E. *Enzyme Microb Technol*, 1987, 9: 714~720.
- [7] Yu A H C, Lee D, Saddler J N. *Biotechnol Appl Biochem*, 1995, 21: 203~216.

SACCHARIFICATION OF CORN STOVER BY IMMOBILIZED *TRICHODERMA REESEI* CELLS

Xia Liming Dai Shumei Cen Peilin

(Department of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The mycelia of *Trichoderma reesei* Rut C30 were adsorbed and immobilized within the porous polyurethane supporter. It was found that the synthesis of cellulase by the immobilized cells and the enzymatic hydrolysis of corn stover were able to be carried out in a nitrogen source-limiting medium. Under repeated batch processes with 60 g/L corn stover pretreated by 2% NaOH at 85°C, the average cellulase activity (FPA) was 0.70IU/ml, the concentration and yield of the reducing sugar were 26.41g/L and 89.11% respectively after shaking culture at 150 r/min, 30°C, pH4.8 for 108h. Total of 12 repeated batches were performed in 54 days. The immobilized cells kept the weight around 10 g/L. The fed-batch process was also studied with the same immobilized cells. Total of 120 g/L corn stover was added in different feeding manners. The reducing sugar of 52.8 g/L was produced after 7 days and the saccharification efficiency (89.2%) was almost the same as the batch process. The results indicated that the cellulase production and cellulosic material saccharification in situ by the immobilized *Trichoderma reesei* cells is an convenient and effective process for conversion and utilization of renewable biomass.

Key words Immobilized cells, Cellulase, Corn stover, Saccharification