



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104024399 B

(45)授权公告日 2016.10.19

(21)申请号 201280050395.5

(72)发明人 F.邦沙巴纳 B.肖斯皮耶

(22)申请日 2012.09.26

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104024399 A

代理人 杜艳玲 权陆军

(43)申请公布日 2014.09.03

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 9/42(2006.01)

1103149 2011.10.14 FR

C12N 1/38(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 9/24(2006.01)

2014.04.14

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据

CN 101809151 A, 2010.08.18,

PCT/FR2012/000381 2012.09.26

CN 1036792 A, 1989.11.01,

(87)PCT国际申请的公布数据

CN 1063895 A, 1992.08.26,

W02013/054005 FR 2013.04.18

审查员 周茂新

(73)专利权人 IFP 新能源公司

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

地址 法国吕埃一马迈松

(54)发明名称

使用从酸预处理获得的碳底物由丝状真菌

连续生产纤维素酶的方法

(57)摘要

本发明涉及在搅拌和通气的生物反应器中使用属于丝状真菌的菌株生产纤维素酶和半纤维素酶的方法，其包括至少两个阶段：用于在封闭反应器中在至少一种碳质生长底物存在的情况下使所述菌株生长的阶段a)，所述生长阶段以10–90 g/L范围的碳质生长底物浓度实施；用于连续生产纤维素酶的阶段b)，其中在至少超过200h的期间内以恒定的供给速率供给至少一种碳质诱导物底物，所述碳质底物是从木质纤维素底物的酸预处理获得的至少一种半纤维素水解物水溶液，所述半纤维素水解物水溶液不进行预灭菌也不进行pH校正，所述水溶液的pH范围为0.5–3，反应体积量通过取出一部分所述反应体积而保持恒定，所述阶段b)以范围为0.001–0.02 h⁻¹的稀释速率进行操作。

B
104024399

CN

1. 用于在搅拌和通气的生物反应器中使用里氏木霉菌株生产纤维素酶和半纤维素酶的方法,其包括至少两个阶段:

• 用于在封闭反应器中在至少一种碳质生长底物存在的情况下使所述菌株生长的阶段a),所述阶段a)在范围为 $0.3\text{--}1.5 \text{ min}^{-1}$ 的vvm,即,表示为正常温度和压力条件下的空气体积每体积反应介质每分钟的通气度下以10–90 g/L范围的碳质生长底物浓度实施;

• 用于连续生产纤维素酶的阶段b),其中在至少200h的期间内以恒定的供给速率供给至少一种碳质诱导物底物,所述碳质诱导物底物是从木质纤维素底物的酸预处理获得的至少一种半纤维素水解物水溶液,所述半纤维素水解物水溶液不进行预先灭菌也不进行pH校正,所述水溶液的pH范围为0.5–3,反应体积量通过取出一部分所述反应体积而保持恒定,所述阶段b)以 $0.002\text{--}0.008 \text{ h}^{-1}$ 范围的稀释速率并且在范围为20%–60%的氧分压下进行操作。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述里氏木霉菌株是通过突变、选择或遗传重组而修饰的。

3. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中所述阶段a)中使用的碳质生长底物选自葡萄糖;乳糖;木糖;木质纤维素底物的酶水解物的单体糖的乙醇发酵后获得的残留物;和源自预处理的木质纤维素底物的单体形式的半纤维素级分的提取物,所述碳质生长底物单独使用或作为混合物使用。

4. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中酸预处理是预先用硫酸水溶液浸渍所述木质纤维素底物,然后酸水解、酸烹煮或蒸汽爆破。

5. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中阶段b)中使用的碳质诱导物底物是作为从木质纤维素底物的酸预处理获得的半纤维素水解物水溶液与至少一种选自诱导物糖或非诱导物糖的其它碳质底物的混合物。

6. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中用于连续生产纤维素酶的阶段b)的持续时间是至少300 h。

7. 根据权利要求6的方法,其中用于连续生产纤维素酶的阶段b)的持续时间是至少400 h。

8. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中所述碳质诱导物底物的供给速率范围为35–140 mg的碳质诱导物底物每克干重菌株每小时。

9. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中在阶段b)中所述供给速率逐渐增加。

10. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中在阶段a)和阶段b)之间实施连续供给至少一种碳质诱导物底物的用于在反应器中生长和生产的任选阶段a'),在所述阶段a')过程中,不发生从发酵罐的连续取出。

11. 根据权利要求10的方法,其中阶段a')中使用的所述碳质诱导物底物与阶段b)中使用的碳质诱导物底物是相同的。

12. 根据权利要求10的方法,其中阶段a')在范围为50–150 h的期间实施。

使用从酸预处理获得的碳底物由丝状真菌连续生产纤维素酶的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及生产纤维素酶和半纤维素酶,特别是在从木质纤维素材料生产乙醇的背景下生产纤维素酶和半纤维素酶。特别地,本发明涉及从丝状真菌开始连续生产纤维素酶的方法。

现有技术

[0002] 开发用于生产第二代生物燃料的经济上可行的方法目前是一个“热点”。这些燃料从木质纤维素生物量生产,并且与从甘蔗、玉米、小麦或甜菜生产的“第一代”生物燃料相比,在关于与用于食物的农业用地的使用竞争方面产生更少的问题。

[0003] 木质纤维素生物量的特征在于由三个主要级分组成的复杂结构:纤维素、半纤维素和木质素。将其转化成乙醇的常规方法包括一些步骤。预处理可以使纤维素能与酶,即纤维素酶接触。酶水解步骤可以用于将纤维素转化成葡萄糖,其然后在发酵步骤过程中转化成乙醇,所述发酵通常使用酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。最后,蒸馏步骤可以从发酵液(fermentation must)中分离并回收乙醇。

[0004] 各种技术-经济的研究已证明,减少纤维素酶的成本是在从木质纤维素物质开始的生物乙醇生产方法中的关键点之一。目前,工业纤维素酶主要是由丝状真菌,里氏木霉(*Trichoderma reesei*)生产,因为其具有高纤维素酶分泌能力。

[0005] 里氏木霉是最广泛用于生产纤维素酶的微生物。野生型菌株具有分泌纤维素(例如,在诱导物底物存在的情况下)的能力,考虑中的酶鸡尾酒(cocktail)对于纤维素的水解是最合适的。酶鸡尾酒的酶类包含三种主要活性类型:内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和纤维二糖酶。具有对木质纤维素材料的水解至关重要的性质的其它蛋白也由里氏木霉产生,例如木聚糖酶。诱导物底物的存在对纤维素分解和/或半纤维素分解酶的表达是至关重要的。

[0006] 对针对各种碳源的纤维素酶基因的调控已经进行了详细研究。它们在纤维素、其水解产物(例如:纤维二糖)或某些低聚糖,诸如乳糖或槐糖存在的情况下被诱导(IImén 等人,1997; Appl Environ Microbiol 63: 1298-1306)。

[0007] 常规突变基因技术已经能够选择高产纤维素酶的里氏木霉菌株,诸如株MCG77(Gallo -专利US 4 275 167)、MCG80(Allen, A.L. 和 Andreotti, R.E., Biotechnol-Bioengi 1982, 12, 451-459 1982)、RUT C30(Montenecourt, B.S. 和 Eveleigh, D.E., Appl Environ Microbiol 1977, 34, 777-782)和CL847(Durand等人, 1984, Proc Colloque SFM "Génétique des microorganismes industriels" [Genetics of industrial microorganisms]. Paris. H. HESLOT Ed, pp 39-50)。

[0008] 从工业规模放大的观点来看,里氏木霉生产纤维素酶的方法已经是非常多的改进的目标。工业上采用的策略是在被称为真菌的生长阶段的步骤中使所述真菌快速生长至给定浓度,然后从所述真菌开始诱导生产纤维素酶,以便在被称为生产阶段的步骤中最大限度地提高生产率和产率。所述生长阶段通常在封闭的反应器中(即,以分批模式)实施。所述

生产阶段通常在连续补料的反应器中实施,该期间不从反应器内容物中取出任何物质,即,它是分批补料模式。

[0009] 为了获得良好的酶的生产率,有必要提供可以被快速吸收用于里氏木霉在生长阶段生长的碳源,和在生产阶段允许纤维素酶表达并在培养基中分泌的诱导物底物。纤维素可以起双重作用;然而,它在工业规模上难以使用,并已经被可用于表达纤维素酶的可溶性碳源诸如乳糖所替代。也已经描述了作为诱导物底物的其它可溶性糖诸如纤维二糖或槐糖,但是它们太昂贵而不能在工业规模上使用。然而,里氏木霉使用可溶性底物的纤维素酶生产远不如以分批模式基于纤维素所获得的生产率。这是由于糖的阻遏作用在高浓度很容易被吸收。

[0010] 在分批补料模式中连续供给可溶性碳质诱导物底物意味着,通过限制培养物中的碳质底物的残留浓度并通过优化糖的数量已经能够解除代谢阻遏,以便获得更好的产率和更好的酶生产率。作为实例,专利FR-B-2 881 753描述了生产纤维素酶的方法,包括两个步骤:

[0011] • “分批”模式的生长阶段,其中供给可快速吸收用于里氏木霉生长的碳源是必需的,然后

[0012] • “分批补料”生产阶段,使用诱导物底物诸如乳糖,例如,其允许纤维素酶的表达和分泌到培养基中。以特定优化的流速连续供给可溶性碳质底物,所述流速以mg底物每克丝状真菌的干重每小时表示,范围为35至45 mg.g⁻¹. h⁻¹。

[0013] 在该专利中,蛋白生产步骤的实施不多于约170 h。该方案意味着可以获得35-40 g/L量级的蛋白浓度和0.2 g/L/h量级的生产率。

[0014] 然而,反应器必须进行清洁,且必须实施新的接种顺序。该操作方式的缺点是生产率太低,这意味着,酶生产发酵罐的数量的初始投资必须增加。获得的蛋白浓度也低,而且经常在过滤菌丝体后需要浓缩步骤。所有这些都促使第二代乙醇生产方法缺乏竞争力。

[0015] 本发明的一个目的是提供使用从木质纤维素底物的酸预处理获得的至少一种特定碳质诱导物底物生产纤维素酶和半纤维素酶,以便与现有技术方法相比增加或甚至加倍增加生产的纤维素酶和半纤维素酶的生产率和浓度,并且在增加期间内连续生产这些纤维素酶的方法。本发明的方法可以用来增加或者甚至加倍增加生产的纤维素酶和半纤维素酶的生产率和浓度,同时与现有技术方法中使用的碳质底物相比使纤维素酶的生产产率保持恒定。

[0016] 发明概述和优点

[0017] 本发明涉及在搅拌和通气的生物反应器中使用丝状真菌菌株生产纤维素酶和半纤维素酶的方法,其包括至少两个阶段:

[0018] • 用于在封闭反应器中在至少一种碳质生长底物存在的情况下使所述菌株生长的阶段a),所述生长阶段以范围为10-90 g/L的碳质生长底物浓度实施;

[0019] • 用于连续生产纤维素酶的阶段b),其中在至少多于200h的期间内以恒定的供给速率供给至少一种碳质诱导物底物,所述碳质诱导物底物是从木质纤维素底物的酸预处理获得的至少一种半纤维素水解物水溶液,所述半纤维素水解物水溶液不进行预先灭菌也不进行pH校正,所述水溶液的pH范围为0.5-3,反应体积量通过取出一部分所述反应体积而保持恒定,所述阶段b)以范围为0.001-0.02 h⁻¹的稀释速率进行操作。

[0020] 发明优点

[0021] 本发明的一个优点在于,其可以用来在增加的操作期间内提高生产的蛋白的生产率和浓度。特别地,本发明的方法可以用来获得多于100 g/L的蛋白浓度。这些表现在实验上以连续模式保持多于400 h。

[0022] 获得的高生产率意味着生物反应器投资成本可以降低。延长期间意味着专门用于清洁生物反应器和接种顺序的时间可以减少。高浓度的纤维素酶意味着后处理的成本可以降低。

[0023] 本发明的连续方法的另一个优点在于,其必然具有低k_{La},这既因为在连续生产阶段b)中应用低稀释速率,还因为在所述阶段b)中使用特定碳质诱导物底物溶液,这意味着反应介质可保持低粘度。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明的方法优选在范围为3-6的pH,范围为20 °C-35 °C的温度,在范围为0.3-1.5 min⁻¹、优选范围为0.3-1 min⁻¹的vvm(即,表示为正常温度和压力条件下的空气体积每体积反应介质每分钟的通气度),在可产生范围为20%-60%、优选范围为20%-40%的反应介质中的氧分压的搅拌条件下进行操作。

[0026] 优选地,本发明的方法在0.5 min⁻¹的vvm 和意味着氧分压可被设定在30%的搅拌条件下进行操作。

[0027] 根据本发明的方法,所述方法包括用于在封闭反应器中在至少一种碳质生长底物存在的情况下使丝状真菌优选真菌里氏木霉的菌株生长的阶段a),所述生长阶段以范围为10-90 g/L的碳质生长底物浓度实施。

[0028] 本方法的方法中使用的所述菌株是优选地属于木霉属(*Trichoderma*),曲霉属(*Aspergillus*),青霉属(*Penicillium*)或裂褶菌属(*Schizophyllum*)的丝状真菌菌株,且优选地,所述菌株属于里氏木霉种。

[0029] 使用的优选来自里氏木酶菌种的菌株可以有利地通过突变选择方法进行修饰,以改进纤维素分解和/或半纤维素分解酶,诸如,例如菌株IPF CL847。也可以使用通过基因重组技术改进的菌株。所述菌株在搅拌、通气的反应器中在与它们生长和与纤维素酶生产相容的条件下培养。可以使用与对于木霉使用的方法类似的方法生产纤维素酶的其它微生物菌株。

[0030] 更优选地,所用菌株是通过基因突变、选择或重组修饰的里氏木酶菌株。

[0031] 所述菌株可以有利地选自菌株CL847、RutC30、MCG77、或MCG80。

[0032] 所述生长阶段中使用的碳质生长底物有利地选自可溶性工业糖,且优选选自葡萄糖、乳糖、木糖、木质纤维素底物的酶水解物的单体糖的乙醇发酵后获得的残留物和源自预处理的木质纤维素底物的单体形式的半纤维素级分的提取物,上述物质可单独使用或作为混合物使用。

[0033] 取决于其性质,所述反应器灭菌前,将所述碳质底物有利地导入反应器中,或者将其单独灭菌并导入预先灭菌的反应器中。

[0034] 优选地,碳质生长底物浓度范围为30-70 g/L。

[0035] 优选地,所述生长阶段a)在30-70 h的范围、优选40-60 h的范围的期间实施。

[0036] 优选地,所述生长阶段a)在pH 4.8和27 °C温度下操作。

[0037] 根据本发明，所述方法包括用于连续生产纤维素酶的阶段b)，其中在至少多于200h的期间内以恒定的供给速率供给至少一种碳质诱导物底物，所述碳质诱导物底物是从木质纤维素底物的酸预处理获得的至少一种半纤维素水解物水溶液，所述半纤维素水解物水溶液不进行预先灭菌也不进行pH校正，所述水溶液的pH范围为0.5-3，反应体积量通过取出一部分所述反应体积而保持恒定，所述阶段b)以0.001-0.02 h⁻¹范围的稀释速率进行操作。

[0038] 所述连续阶段有利地在连续补料反应器中实施，该过程中，取出一部分反应体积以便使反应体积量保持恒定。所述连续阶段被称为“化学恒定(chemostat)”模式。

[0039] 可用于获得本发明方法的步骤b)中使用的半纤维素水解物水溶液的木质纤维素底物是由三种主要成分构成的碳水化合物来源：纤维素(35%-50%)、半纤维素(20%-30%)，它们是主要由戊糖和己糖构成的多糖，和木质素(15%-25%)，其是具有复杂结构和高分子量且由经由醚键连接的芳族醇构成的大分子。所述底物有利地选自稻草、木材、森林培养物、产醇糖(alcohologenic sugar)和谷类植物的残留物、来自造纸业的残留物和木质纤维素材料的转化产物。

[0040] 根据技术人员已知的酸预处理实施木质纤维素底物经受的酸预处理。优选地，酸预处理是预先用硫酸水溶液浸渍所述木质纤维素底物，然后酸水解、酸烹煮或蒸汽爆破。

[0041] 获得的半纤维素水解物水溶液的pH范围为0.5-3，并且无需灭菌步骤和pH校正步骤的情况下即可使用。

[0042] 优选地，所述半纤维素水解物水溶液的pH范围为0.5-2。

[0043] 本发明方法的阶段b)中使用的碳质诱导物底物有利地是单独的从木质纤维素底物的酸预处理获得的半纤维素水解物水溶液，或从木质纤维素底物的酸预处理获得的半纤维素水解物水溶液与至少一种未经历灭菌的其它碳质底物的混合物。

[0044] 优选地，所述碳质底物选自诱导物糖类或非诱导物糖类，优选选自乳糖、葡萄糖、纤维二糖和木糖，其单独使用或作为混合物使用。

[0045] 将所述底物溶解在所述半纤维素水解物水溶液中。

[0046] 在其中碳质诱导物底物是从木质纤维素底物的酸预处理获得的半纤维素水解物水溶液与至少一种未经历灭菌的其它碳质底物的混合物的情况下，根据使用的碳质底物的溶解度程度，所述碳质诱导物底物的浓度范围为200-600 g/L。

[0047] 在其中碳质诱导物底物是单独的从木质纤维素底物的酸预处理获得的半纤维素水解物水溶液的情况下，所述碳质诱导物底物的可能已经浓缩后的浓度范围为40-400 g/L。

[0048] 使用所述从木质纤维素底物的酸预处理获得的特定碳质诱导物底物意味着，与现有技术的方法相比，用于生产纤维素酶的阶段b)可以实施增加的期间，优选多于200 h。

[0049] 根据本发明，所述碳质诱导物底物以至少恒定的供给流速进行供给。优选地，所述碳质诱导物底物的供给流速为范围35-140 mg的碳质诱导物底物每克干菌株每小时，优选为范围35-60 mg的碳质诱导物底物每克干菌株每小时。

[0050] 优选地，供给流速在阶段b)中逐渐增加，更优选逐渐增加，直到其在阶段b)的前面操作小时中、优选在操作阶段b)的至少24 h后、更优选在操作阶段b)的至少48 h后加倍。

[0051] 根据本发明，用于连续生产纤维素酶的阶段b)的持续时间至少多于200 h，优选至

少多于300 h,更优选至少多于400 h。

[0052] 在阶段b)中,通过取出一部分所述反应体积使反应体积量保持恒定。

[0053] 优选地,取出使用技术人员已知的取出方法实施,诸如,例如,借助调节系统和可编程的排液泵。

[0054] 优选地,取出速率至少等于向阶段b)的供给速率。

[0055] 根据本发明,稀释速率(其定义为连续生产阶段b)过程中取出流速与反应器的反应体积的比率)有利地为范围 0.001 h^{-1} - 0.02 h^{-1} ,优选为范围 0.002 - 0.008 h^{-1} 。高度优选的稀释速率为 0.004 h^{-1} 。

[0056] 优选地,阶段b)在范围为3-5.5的pH和范围为20°C-30°C的温度进行操作。

[0057] 在连续供给至少一种碳质诱导物底物的反应器中实施的任选生产阶段a')(在该过程中不实施发酵罐内容物的取出,即分批补料模式)有利地在阶段a)和阶段b)之间实施。

[0058] 实施所述阶段a')意味着含有丝状真菌菌株的反应体积级分没有被取出,同时生产的蛋白的浓度仍然低。

[0059] 阶段a')中使用的所述碳质诱导物底物与阶段b)中使用的碳质诱导物底物是相同的。

[0060] 优选地,所述碳质诱导物底物的供给流速为范围35-140 mg的碳质诱导物底物每克干菌株每小时,优选为范围35-60 mg的碳质诱导物底物每克干菌株每小时。所述供给流速在阶段a')的持续时间始终保持恒定。

[0061] 优选地,阶段a')实施范围为50-150 h、优选范围为70-130 h的期间。

[0062] 优选地,阶段a')在范围为3-5.5的pH和范围为20°C-30°C的温度进行操作。

[0063] 本发明的方法意味着,与现有技术方法相比,可以增强或甚至加倍增加生产率连同生产的纤维素酶和半纤维素酶的浓度,并且这些纤维素酶可以连续生产较长时间。

实施例

[0064] 实施例1:不根据本发明

[0065] 实施例1展示了使用专利FR-B-2 881 753的参考条件的培养。实施例1说明以分批补料方式实施167 h的包括生长阶段和生产阶段的生产纤维素酶和半纤维素酶的方法。

[0066] 在机械搅拌的3 L反应器中进行纤维素酶和半生产纤维素酶的生产。矿物质培养基具有下列组成:KOH 1.66 g/L、85% H₃PO₄ 2 mL/L、(NH₄)₂SO₄ 2.8 g/L、MgSO₄·7 H₂O 0.6 g/L、CaCl₂ 0.6 g/L、MnSO₄ 3.2 mg/L、ZnSO₄·7 H₂O 2.8 mg/L、CoCl₂ 10-4.0 mg/L、FeSO₄·7 H₂O 10 mg/L、玉米浸出物(Corn Steep) 1.2 g/L、消泡剂0.5 mL/L。

[0067] 产生里氏木酶CL847菌株的液体预培养物。预培养的矿物质培养基与反应器的培养基相同,除了添加5 g/L邻苯二甲酸钾以缓冲pH。使用在30 g/L浓度的葡萄糖作为碳质底物进行在预培养期间的真菌的生长。接种物的生长持续2至3天并在28°C在搅拌的培养器中在大气压下进行。

[0068] 包含矿物质培养基的反应器在120°C灭菌20分钟;葡萄糖碳质底物从120°C灭菌20分钟然后以无菌方式添加到反应器以产生30 g/L终浓度。一旦预培养物中的残留葡萄糖浓度小于15 g/L,反应器就用里氏木酶CL847菌株的所述液体预培养物接种至10%(v/v)。

[0069] 在生物反应器中进行的实验包括两个阶段:

[0070] • 生长阶段,在碳质葡萄糖底物(初始浓度=30 g/L)上,在27°C的温度和pH 4.8(使用5.5 M氨性溶液设置)下。通气在0.5 vvm并且搅拌增加到200和800 rpm之间作为p_{O₂}(溶氧的压力)的函数,其设置在30%。

[0071] • 以分批补料模式的蛋白生产阶段。30小时后,250 g/L碳质乳糖溶液以4 mL/h的流速,即35 mg乳糖每g里氏木霉CL847菌株每小时连续注射长达167小时。温度下降到25°C并且pH下降到4,直至培养结束。通过添加5.5 M氨性溶液设置pH,所述氨性溶液提供对于分泌纤维素酶和半生产纤维素酶合成必需的氮。通过搅拌动作将溶氧的量保持高于30%。

[0072] 纤维素酶生产随后是使用Lowry法和标准BSA测定细胞外蛋白,其在通过过滤或离心分离菌丝体之后进行。确定的纤维素分解活性是:

[0073] - 滤纸活性(FPU:滤纸单位),其可以用于测定内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶混合物(pool)的总体活性;

[0074] - 对于比活性的β-葡萄糖苷酶活性。

[0075] FPU活性使用IUPAC生物技术委员会推荐的程序以50 g/L的初始浓度在Whatman N°1纸上测量;确定待分析的酶溶液的测试样品在60分钟内释放2 g/L葡萄糖的等价物(比色法测定)。滤纸活性的原理是通过二硝基水杨酸(DNS)测定来确定从Whatman N°1纸获得的还原糖的量。

[0076] 用于确定β-葡萄糖苷酶活性的底物为对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)。它被β-葡萄糖苷酶切割,其释放对硝基苯酚。

[0077] β-葡萄糖苷酶活性单位定义为每分钟从PNPG产生1 μmole对硝基苯酚所需要的酶的量,并表示为IU/mL。

[0078] 通过将表示为IU/mL的活性除以纤维素酶浓度获得比活性。它们表示为IU/mg。

[0079] 使用在生产阶段过程中生产的纤维素酶和半纤维素酶(包括样品)的总质量,并将其除以生产阶段的持续时间和反应器的有效体积而计算最终生产率。

[0080] 术语“生物量”表征里氏木霉(*Trichoderma reesei*)CL847菌株。

[0081] 术语“蛋白”被定义为获得的包含生产的纤维素酶和半纤维素酶的酶鸡尾酒。

[0082] 对实施例1的最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0083] 生物量, g/L = 14.4

[0084] 蛋白, g/L = 35.7

[0085] 生产率 = 0.21 g/L/h

[0086] FPU = 22.1 IU/mL

[0087] β-葡萄糖苷酶比活性= 0.8 IU/mg。

[0088] 实施例2:不根据本发明

[0089] 实施例2表示类似于实施例1的培养,除了用相同的供给底物继续分批补料模式多于200 h。据观察,纤维素酶和半纤维素酶的生产在200 h后停止。它们实际上开始降解,因为浓度从37 g/L下降至35 g/L。生物量本身在该期间过程中上升以达到20.9 g/L的浓度。测定显示,疏是缺乏的。

[0090] 生物量和蛋白浓度(g/L)的变化显示于图1。

[0091] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0092] 生物量, g/L = 20.9

[0093] 蛋白, g/L = 35.1

[0094] 生产率= 0.13 g/L/h (在216 h后其为0.17 g/L/h)

[0095] FPU = 16.1 IU/mL

[0096] β -葡萄糖苷酶比活性= 0.7 IU/mg。

[0097] 实施例3:根据本发明

[0098] 实施例3在与实施例1的条件下开始,但包括3个阶段:

[0099] • 在与实施例1的条件下以分批模式的阶段a),但葡萄糖浓度为60 g/L。该阶段持续50 h;

[0100] • 以分批补料模式的第二阶段a')。一旦碳质诱导物底物被耗尽就开始用从预先用H₂SO₄浸渍然后通过蒸汽爆破预处理的稻草获得的半纤维素水解物溶液(其中葡萄糖和乳糖已经被溶解以获得500 g/L的碳质底物总浓度)分批补料。该溶液没有灭菌,其pH没有升高且等于1。应用4 mL/h的流速(即,35 mg糖每克里氏木霉CL847菌株每小时的流速)。该阶段持续100 h;

[0101] • 然后开始用于连续生产纤维素酶和半纤维素酶的阶段b)。在整个实验过程中使供给流速保持恒定在4 mL/h。通过使用调节系统和可编程的泵连续取出发酵液而使反应器保持在恒定重量。稀释速率为0.002 h⁻¹。

[0102] 400 h后,我们连续生产浓度多于100 g/L的酶溶液,并且具有生产率多于0.2 g/L/h。

[0103] 因此,这意味着,蛋白浓度已经是3倍,并且生产率比实施例1的生产率更高(+20%)。

[0104] 实施例3(其中连续阶段在150 h后开始,且流速为4 mL/h)中生物量和蛋白浓度(g/L)随时间的变化显示于图2。

[0105] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0106] 生物量, g/L = 36.7

[0107] 蛋白, g/L = 107.2

[0108] 最终生产率= 0.26 g/L/h

[0109] FPU = 76.8 IU/mL

[0110] β -葡萄糖苷酶比活性= 1.2 IU/mg。

[0111] 实施例4:根据本发明

[0112] 实施例4类似于实施例3 ,除了连续生产阶段直接在分批模式生长阶段a)后开始,连续生产阶段b)中碳质诱导物底物的供给流速从4 mL/h逐渐增加至8 mL/h,即开始所述步骤b)后每12 h增加1 mL。使用的碳质诱导物底物与实施例3中的碳质诱导物底物相同,即从预先用H₂SO₄浸渍然后通过蒸汽爆破预处理的稻草获得的半纤维素水解物的溶液(其中葡萄糖和乳糖已经被溶解)。该溶液没有灭菌,其pH没有升高且等于1。阶段a)和b)中使用的操作条件与实施例3中使用的操作条件是相同的。当碳质诱导物底物的供给流速增加完成后,稀释率为0.004 h⁻¹。使反应体积量保持恒定。

[0113] 实验的最终生产率为0.39 g/L/h。这几乎是实施例1的生产率的两倍。这意味着投资成本可以降低。最终的蛋白浓度几乎是三倍。这意味着,后处理成本可以降低,尤其是,如果合适,生产的蛋白的浓缩。培养不需要高k_{la} (约75 h⁻¹),因为应用低稀释率,因此这意味

着与搅拌和通气相关的运行成本低。

[0114] 实施例4(其中连续阶段在150 h后开始,且分批补料流速从4增加至8 mL/h)的纤维素酶的生产率(r_p)和里氏木霉菌株和纤维素酶的浓度的变化显示于图3。

[0115] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0116] 生物量, g/L = 58.1

[0117] 蛋白, g/L = 102.9

[0118] 最终生产率= 0.39 g/L/h

[0119] FPU = 77.6 IU/mL

[0120] β -葡萄糖苷酶比活性= 1.3 IU/mg

[0121] 生产率几乎是实施例1的生产率的两倍,并且蛋白浓度几乎是三倍。所述浓度维持多于300 h。

[0122] 实施例5:不根据本发明

[0123] 实施例5能够显示未灭菌预先用H₂SO₄浸渍、然后通过蒸汽爆破预处理的稻草获得的半纤维素水解物溶液对方法性能的影响。

[0124] 实施例5在与实施例4同样的条件下开始,除了在使用前将水解物溶液灭菌。所述溶液的浓度为250 g/L。培养导致里氏木霉菌株的强烈聚集和纤维素酶的低生产率。在培养结束时氧气需求非常高,其中必需k_{La}多于170 h⁻¹。

[0125] 与碳质底物相比的蛋白产率小于0.1 g/g,而其对于实施例1-4为0.3 g/g。

[0126] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0127] 生物量, g/L = 99.8

[0128] 蛋白, g/L = 24.2

[0129] FPU = 14.5 IU/mL

[0130] β -葡萄糖苷酶比活性= 1.1 IU/mg。

[0131] 实施例6:不根据本发明

[0132] 实施例6说明在高稀释速率的连续阶段中操作的缺点,其导致产生粘性介质和由于真菌在生长阶段时真菌的形态导致的排液泵的堵塞的问题。k_{La}和因此与介质的搅拌和通气相关的操作成本较高。

[0133] 实施例6在与实施例4同样的条件下实施,其具有持续50 h且用于以分批模式生长的第一阶段a)和用于生产纤维素酶和半纤维素酶的连续阶段b)。生产阶段供给的溶液是没有灭菌且乳糖已经溶解至250 g/L的浓度的半纤维素水解物溶液。碳质诱导物底物的供给流速为13 mL/h,其对应于54 mg糖每g里氏木霉CL847菌株每小时。使反应体积量保持恒定,且应用的稀释速率为0.025 h⁻¹。

[0134] 实验非常难以实施,其中排液泵反复堵塞,这是因为当真菌生长时介质非常粘。真菌产量高,且pO₂指数值不能维持高于0%。无法达成静止状态。生物反应器的k_{La}不足以提供必需氧,这意味着所有供给的糖流量都被消耗。然而,用该反应器在水上测量到700 h⁻¹的k_{La}值。

[0135] 实施例7:不根据本发明

[0136] 在与实施例3的条件相同的条件下实施实施例7,唯一的差异在于用65 g/L的葡萄糖浓度实施分批模式的阶段。分批补料模式的阶段a')和用于以连续模式生产的阶段b)在

相同的条件下实施,唯一的差异在于,阶段a')和b)供给的溶液是通过添加硫酸H₂SO₄从而使得所述溶液具有1.5 的pH而酸化的250 g/L乳糖溶液。细胞生物量和蛋白浓度的变化显示于图4。图4还显示了非限制性的硫酸盐和铵离子浓度的变化。该实验不能获得多于50 g/L的蛋白转化。400小时后,蛋白浓度稳定在50 g/L。

[0137] 获得的结果表明了在连续生产阶段中使用半纤维素水解物的溶液的重要性,以及获得的性能不是由于克服硫和氮的不足导致的。

[0138] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0139] 生物量, g/L = 23

[0140] 蛋白, g/L = 48.3

[0141] FPU = 31.2

[0142] β-葡萄糖苷酶比活性 = 1.1。

[0143] 实施例8:不根据本发明

[0144] 在与实施例3相同的条件下实施实施例8,唯一的例外在于,从预先用H₂SO₄浸渍然后通过蒸汽爆破预处理的稻草获得的半纤维素水解物的溶液(其中葡萄糖和乳糖已经被溶解)未经灭菌,但通过添加NaOH而进行其pH的校正。其pH上升至4。

[0145] 蛋白生产在160 h后没有停止,并在接近20 g/L的浓度保持稳定。

[0146] 对最终发酵液(must)的分析确定产生下列结果:

[0147] 生物量, g/L = 25.1

[0148] 蛋白, g/L = 19.8

[0149] FPU = 15.8 IU/mL

[0150] β-葡萄糖苷酶比活性 = 1.2 IU/mg。

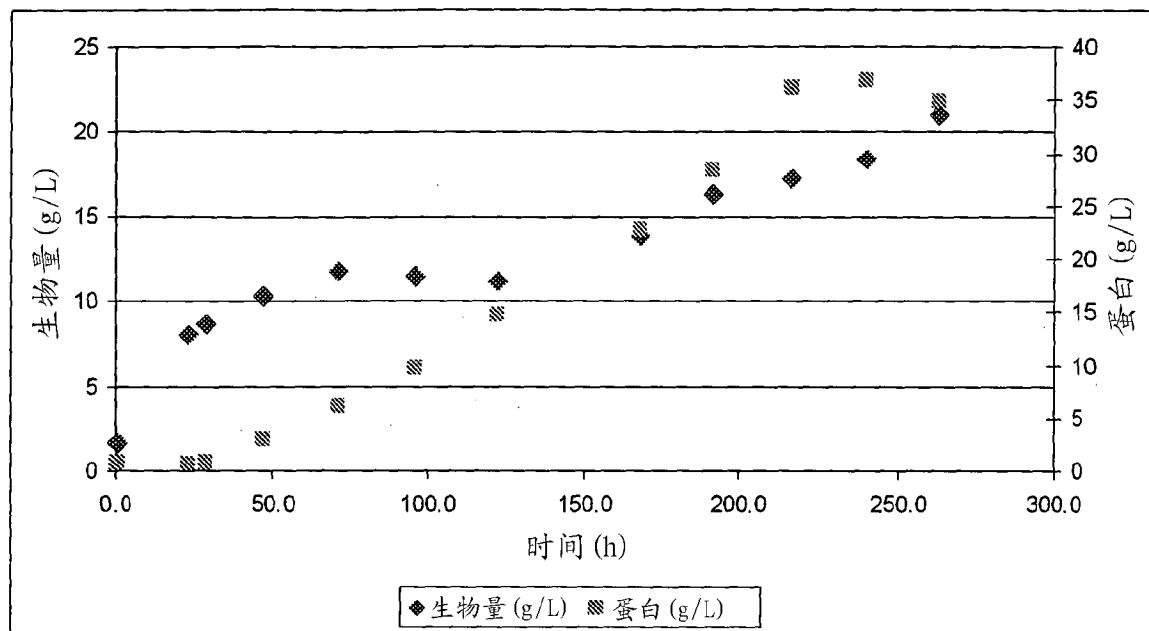


图 1

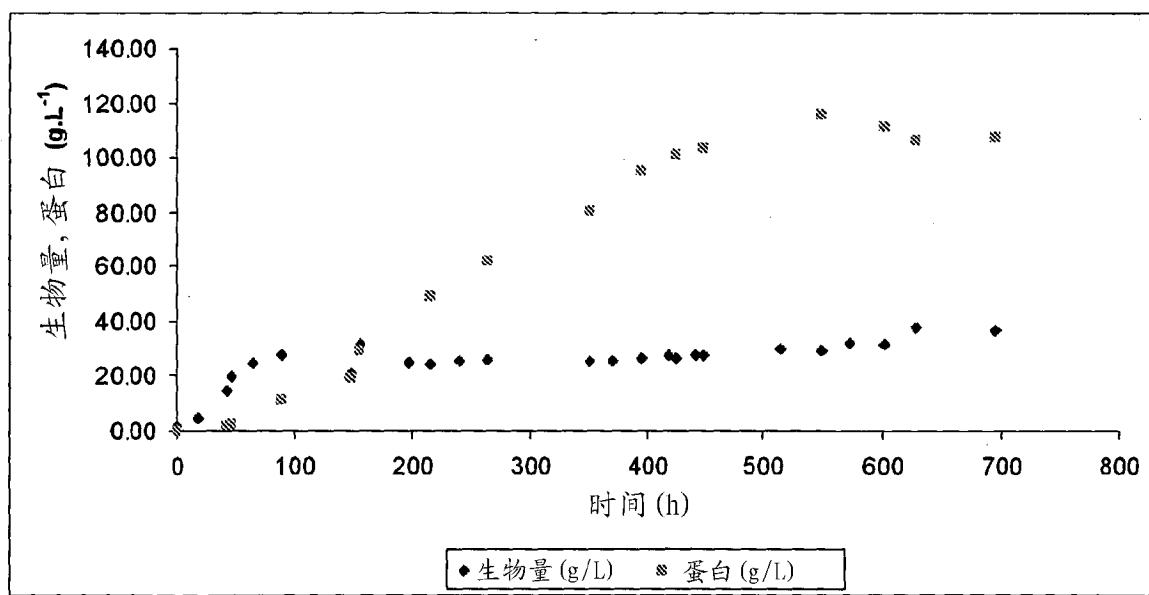


图 2

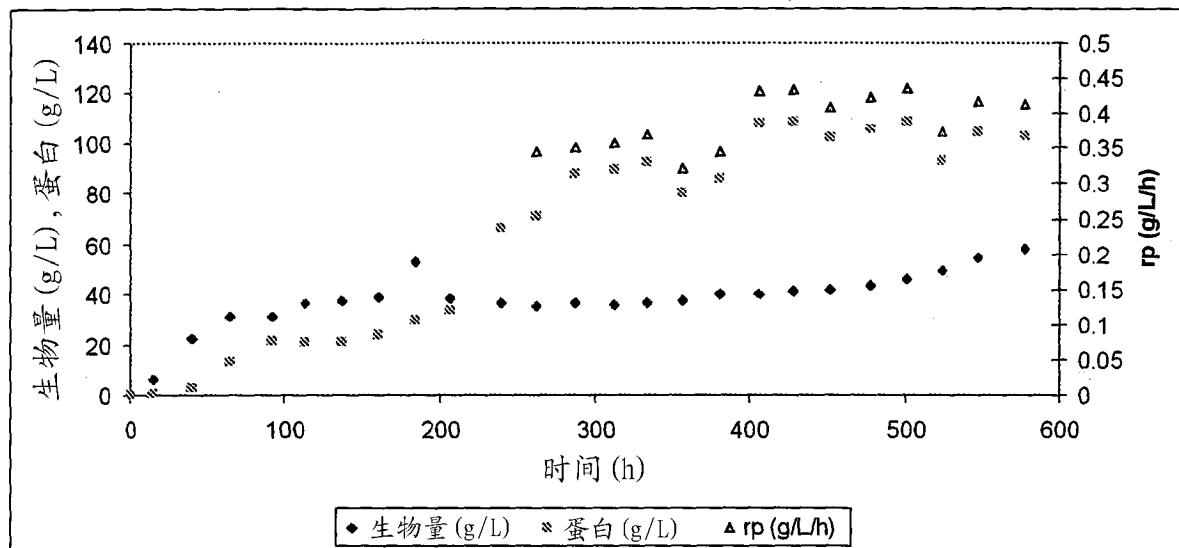


图 3

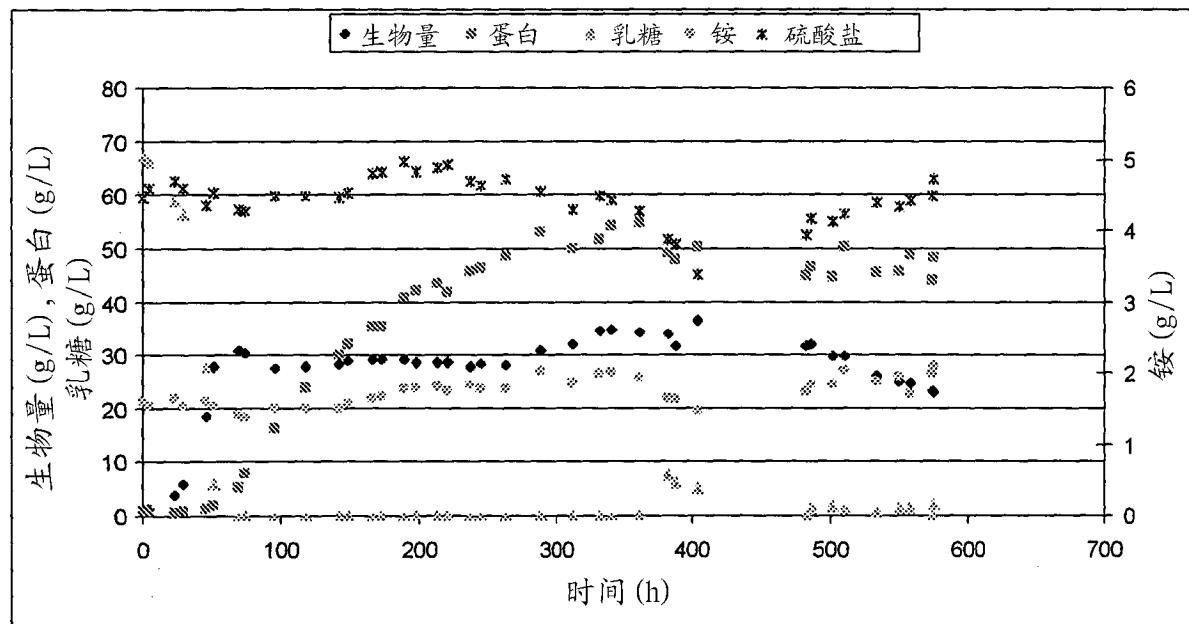


图 4