

混菌降解稻草纤维素产葡萄糖的条件研究

刘毅, 袁月华

(湖南机电职业技术学院生物化工系, 湖南长沙 410151)

摘要:利用从环境中筛选出的一株木霉与一株曲霉,在以稻草粉为主要碳源的液体培养基中混菌发酵,所得的粗酶液催化降解经预处理的稻草粉得到葡萄糖液。在单因素实验基础上进行正交实验,正交实验表明,粗酶液用量对稻草粉降解为葡萄糖影响最大,其次为温度,然后是pH,稻草粉浓度对降解影响最小。稻草粉最优降解条件为:粗酶液用量为降解液总体积的3%,降解液初始稻草粉浓度60g/L, pH4.8,降解温度50℃,此条件下降解率可达80%。

关键词:混菌,降解,稻草,纤维素

Study on the condition of straw cellulose degradation to produce glucose by mixed culture

LIU Yi, YUAN Yue-hua

(Biochemical Engineering Department of Hunan Mechanical & Electrical Polytechnic, Changsha 410151, China)

Abstract: In this research, a strain of *trichoderma* and *aspergillus* filtered out from the environment was used to ferment in powder-liquid medium where the main carbon source was rice straw. Along with the fermentation, the pretreated rice straw powder was catalytic degraded into glucose by enzyme. There was orthogonal test based on single factor experiment. The orthogonal experiment showed that the crude enzyme liquid dosage caused the biggest influence on the degradation of straw powder, second was temperature and followed by pH value, and the straw powder concentration caused the minimum effects on degradation. The optimal conditions of degradation of rice straw powder was: the percentage of the volume of crude enzyme liquid in total degradation liquid was 3%, initial straw powder concentration was 60g/L, the pH value was 4.8, the degradation temperature was 50℃. Under the optimal conditions, the degradation rate could be able to reach 80%.

Key words: mixed culture; degradation; rice straw; cellulose

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)19-0191-03

通过微生物降解作用使稻草中主要成分纤维素降解为可生物利用的还原糖^[1-2],然后转为有效能源,如乙醇或其它重要化工原料(乳酸、柠檬酸)等是稻草合理利用的有效途径。为了提高降解效率,人们进行了大量的研究工作^[3-5]。我们从环境中筛选出了一株木霉[*Trichoderma viride*](T1)和一株曲霉[*Jspergillus sp*](T3),在以稻草粉为主要碳源的液体发酵条件下这两株菌有较强的产纤维素酶能力,两菌混合发酵时纤维素酶活力明显增强。但是,产纤维素酶的最佳条件与纤维素酶催化糖化稻草的最佳条件并不一致,所以,本文研究解决直接利用混合菌群发酵得到的粗酶液糖化稻草粉的条件,并对条件进行优化,以提高稻草纤维素降解为葡萄糖的产率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

稻草粉 采自湖南省沅江市农村水稻田(当年

产),洗净后自然风干,粉碎过40目筛,经微波与碱联合处理后洗净干燥备用^[6];木霉[*Trichoderma viride*](T1)和曲霉[*Jspergillus sp*](T3) 本实验室筛选;液体产酶发酵培养基 40g 固形物(稻草粉:麸皮=3:2), (NH₄)₂SO₄ 2.0g, 尿素 3.0g, KH₂PO₄ 3.0g, CaCl₂ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, CoCl₂ 3.0mg, FeSO₄ · 7H₂O 7.5 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 2.0mg, MnSO₄ · H₂O 2.5mg,加水至1000mL, pH5.5。

THZ-82 恒温振荡水浴锅 常州澳华仪器有限公司;HZQ-F100 型全温度振荡培养箱 太仓市华美生化仪器厂;BS124S 电子天平 德国赛多利斯;UV-1100 紫外/可见分光光度计 上海益伦环境科技有限公司;YXQ-LS-30SII 型立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司;SW-CJ-1FD 型净化工作台 上海博迅实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 混菌粗酶液的制备 将木霉(T1)与曲霉(T3)按同浓度孢子悬液比值3:2混合后,以5.5%接种量接入液体产酶发酵培养基中,在250mL三角瓶中装液100mL,于28℃振荡培养箱(180r/min)中振荡培养144h。然后将发酵液用脱脂棉过滤除去菌体及杂质,所得清液即本实验用稻草纤维素糖化酶粗酶液。

收稿日期:2012-03-02

作者简介:刘毅(1964-),男,本科,副教授,研究方向:生物化工技术应用。

基金项目:湖南省科技厅科技计划项目(2011FJ3131)。

1.2.2 单因素实验 降解反应在 250mL 三角瓶中进行。加入适量的粗酶液和 pH4.8 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,并按 0.2g/g 稻草粉加入 Tween80^[7],混合均匀。控制总反应液体积为 100mL,在不同的粗酶液用量、稻草粉浓度、pH、糖化温度等条件下进行反应,测定滤出液中的还原糖含量。

1.2.3 条件优化实验 根据单因素实验结果,选取粗酶液用量、稻草粉浓度、pH、温度作为研究对象。按照 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 进行正交实验^[8]。考察糖化过程中各因素的影响水平大小,找出最优糖化条件。降解正交实验的因素与水平设计见表 1。

表 1 稻草粉降解正交实验因素水平表

Table 1 Factor levels of degradation of rice straw powder by orthogonal experiment

水平	因素			
	A 粗酶液用量 (降解液 总体积,%)	B 稻草粉浓度 (g/L)	C pH	D 降解 温度 (℃)
1	1	60	4.5	45
2	2	80	4.8	50
3	3	100	5.5	55

1.2.4 还原糖的测定 还原糖采用 DNS 法测定^[9]。

1.2.5 降解率(糖化率) 糖化率(%) = [降解反应产生还原糖质量(g)/稻草粉质量(g)] × 100

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 粗酶液用量对降解的影响 控制初始稻草粉浓度为 80g/L,初始 pH5.5,温度 50℃,分别加入不同体积的粗酶液,使粗酶液体积占反应液总体积的 0.5%、1%、2%、3%,降解 48h,分析不同粗酶液用量对降解效率的影响,结果见图 1。

图 1 表明,在本实验条件下,稻草降解为还原糖的得率随着粗酶液用量的增加而增加,0~24h 降解速率较快,随后逐渐减缓。粗酶液用量由 0.5% 增加到 2% 时,降解率增加十分明显,但粗酶液用量由 2% 增大到 3% 时,降解率增加幅度较小。稻草磨粉经微波与碱联合处理后,便于纤维素酶与纤维素结合,这是前 24h 水解速率较快的主要原因,但随着水解的进行及粗酶液用量的增大,能提供给酶结合的有效位点减少,因而降解率增幅减小。综合生产成本等因素,采用 2% (降解液体积比) 粗酶液较为合适。

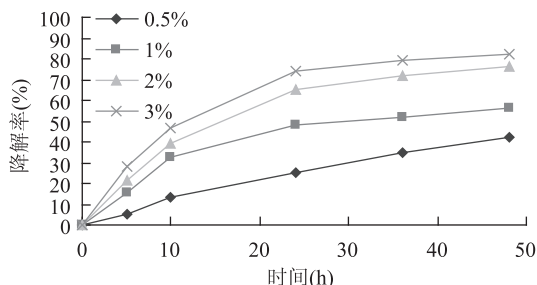


图 1 粗酶液用量对降解效率的影响

Fig.1 Effect of crude enzyme dosage on efficiency of degradation

2.1.2 稻草粉浓度对降解的影响 控制初始 pH5.5,

温度 50℃,粗酶液用量 2%,分别采用 40、60、80、100、120g/L 稻草粉进行降解实验,反应 48h,分析稻草粉浓度对降解的影响,结果如图 2。

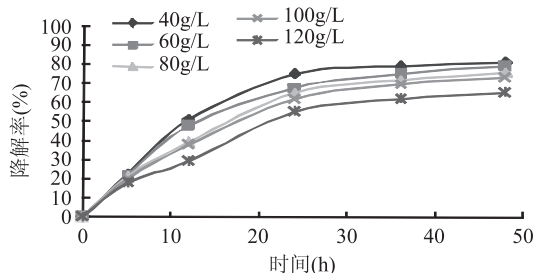


图 2 稻草粉浓度对降解的影响

Fig.2 Effect of rice straw powder concentration on degradation

由图 2 可见,随着稻草粉浓度的增加,降解速率逐渐下降。发酵至 48h 时,稻草粉浓度由 40g/L 增加至 100g/L,降解率下降幅度不大,而继续增加稻草粉浓度至 120g/L 时,降解率的降幅十分明显。发生这种现象的原因,可能是稻草粉浓度较大时,稻草粉不宜混匀,不利于纤维素酶与纤维素的充分接触;同时可能是在高稻草粉浓度下产生的降解产物对降解过程产生了抑制作用^[10]。考虑到利用稻草粉降解液发酵柠檬酸时需要较高的还原糖浓度,因而需要适当较高的稻草粉浓度^[11],所以选择实验条件下稻草粉浓度为 100g/L。

2.1.3 pH 对降解的影响 控制温度 50℃,粗酶液用量 2%,稻草粉浓度 100g/L 进行降解实验,分别采用不同的初始 pH,反应 48h,分析初始 pH 对降解的影响,结果如图 3。

从图 3 可见,pH 对稻草粉降解有显著影响,在本实验条件下,pH4.5~5.5 时,降解率可达 70% 以上,这与一般纤维素酶最适 pH 范围一致。pH 偏离此范围增大或减小时,降解率都显著下降,其中 pH4.8 时降解率可达最高。本实验用粗酶液中的纤维素酶是来源于两种霉菌混合发酵液的复合酶系,显然该酶系催化稻草粉糖化降解的最适 pH 为 4.8,当 pH 发生改变时,会改变酶系各基团的解离状态而影响酶分子活性中心的结构,影响其与稻草纤维素分子结合与催化降解的能力,pH 变化过大还会导致酶分子整体空间结构的变化而减弱催化活性。

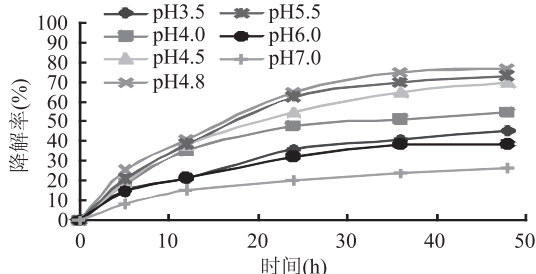


图 3 初始 pH 对稻草粉降解的影响

Fig.3 Effect of initial pH value on degradation of straw powder

2.1.4 温度对降解的影响 控制粗酶液用量 2%,稻草粉浓度 100g/L,初始 pH4.8 进行降解实验,在不同温度下反应 48h,分析温度对稻草粉降解的影响,结

果如图 4。

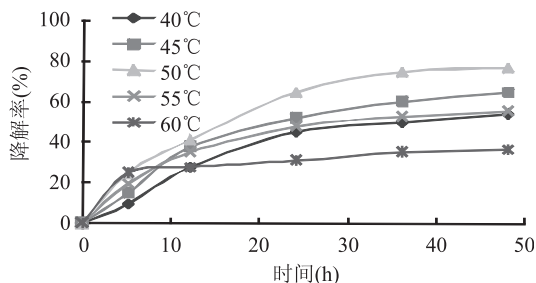


图4 温度对稻草粉降解的影响

Fig.4 Effect of temperature on degradation of straw powder

由图4可见,在反应的前5h内,较高温度(55、60℃)下降解速率较高,但在此后,40~55℃条件下降解率随时间而增大,特别是50℃时降解率增加最为明显,而60℃条件下降解率增加变得十分缓慢,显然50℃是此反应条件下的最适温度。出现这种现象的可能原因是,在最适温度以下时,随温度的升高降解反应速率加快,而当温度超过了最适温度,酶分子会大量变性而失活,使降解反应减慢,温度越高,酶变性越快,降解速率降低得也越快。在反应初始阶段,酶失活较少、而酶促反应随温度的提高而加速;而当反应进行了一段时间后,较高温度(60℃)下酶大量失活,使降解速率显著降低。

2.2 优化实验结果分析

结合单因素实验的结果,进行正交实验,结果如表 2。

表2 稻草粉降解正交实验方案与结果分析

Table 2 Scheme of rice straw powder degradation
by orthogonal test and result analysis

序号	A	B	C	D	降解率 (%)
1	1	1	1	1	56.5
2	1	2	2	2	58.7
3	1	3	3	3	47.3
4	2	1	2	3	68.4
5	2	2	3	1	65.2
6	2	3	1	2	69.8
7	3	1	3	2	79.7
8	3	2	1	3	71.6
9	3	3	2	1	76.5
K ₁	162.5	204.6	197.9	198.2	
K ₂	203.4	195.5	203.6	208.2	
K ₃	227.8	193.6	192.2	187.3	
R	65.3	11.0	11.4	20.9	

因素：主→次

优方案

ADCB

$$A_3 D_2 C_2 B_1$$

由表 2 可见,影响稻草粉降解为葡萄糖的各因素的主次顺序为:粗酶液用量 > 降解温度 > pH > 稻草粉浓度,显然粗酶液用量对稻草粉降解为葡萄糖影响最大,温度的影响也较显著,而稻草粉浓度与 pH 的重要性相近,均相对较小。经结果分析可以确定,稻草粉降解为葡萄糖的最优条件组合为:粗酶液用量为降解液总体积的 3%,降解液初始稻草粉浓度

60g/L, pH4.8, 降解温度 50℃。经验证实验测定, 在此条件下的降解率为 80%。

3 结论

本实验用混合糖化菌纤维素酶活较强,稻草经预处理后,有利于纤维素在混合菌产生的粗纤维素酶液作用下降解为葡萄糖。实验结果表明,粗酶液用量是影响稻草粉降解为葡萄糖产率大小的最重要因素,其次是降解温度, pH 和稻草粉浓度对降解率的影响相对较小。利用木霉(T1)与曲霉(T3)在合适的条件下混菌发酵制得的粗酶液降解经处理的稻草粉的优化组合为:粗酶液用量为降解液总体积的3%,降解液初始稻草粉浓度 60g/L, pH4.8,降解温度 50℃,在此条件下降解率达 80%。粗酶液用量增加,降解得率会明显提高,但过多地使用酶液会导致前期混菌发酵制备纤维素酶的工作量过大、成本增加,所以综合考虑各种因素,可采用适当较少的粗酶液用量,而适当延长降解时间,也可提高降解率并获得较高葡萄糖浓度。

参考文献

- [1] Gray K A, Zhao L H, Emptage M. Bioethanol [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2006, 10(2): 141-146.
- [2] 李十中. 生物质工程前沿领域关键技术研究进展[J]. 科技导报, 2005, 23(5): 9-11.
- [3] Selig M J, Knoshaug E P, Adney W S, et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4997-5005.
- [4] Rajeev Kumar, Wyan C E. Effect of xylanase supplementat of cellulase on digestion of corn Stover solids prepared by leading pretreatment technologies [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(18): 4203-4213.
- [5] Zhang QZ, He GF, Wang J, et al. Two-stage co-hydrolysis of rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3 and *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 [J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(10): 1464-1468.
- [6] 朱圣东, 吴元欣, 喻子牛, 等. 微波预处理稻草糖化工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(1): 112-114.
- [7] 姚日生, 邓胜松, 齐本坤, 等. Tween80 对稻草水解及同步糖化与发酵产乳酸的影响 [J]. 精细化工, 2008, 25(2): 155-158.
- [8] 李云雁, 胡传荣. 实验设计与数据处理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 79-90.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 1-3.
- [10] Gregg D J, Saddler J N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 51(4): 375-383.
- [11] Andreas Rudolf, Malek Alkasrawi, Guido Zacchi, et al. A comparison between batch and fed - batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(2): 195-204.