

里氏木霉纤维素酶水解稻草的研究

顾斌涛, 黄朝, 黄国昌, 邱小忠, 吕琚, 张婷 (江西省科学院微生物研究所, 江西南昌 330096)

摘要 [目的]探讨碳氮源对里氏木霉发酵产纤维素酶的影响,以及纤维素酶水解稻草的条件。[方法]通过添加不同的碳源和不同浓度的酵母粉,探讨里氏木霉合适的发酵条件;使用不同添加量的纤维素酶对稻草进行酶解;分别利用纤维素酶、纤维素酶和木聚糖酶混合酶对稻草进行酶解反应。[结果]利用乳糖和稻草的复合碳源和12 g/L的酵母粉进行水解时,纤维素酶活性较高。酶解适宜的酶用量为每克稻草底物200 U的滤纸酶。用纤维素酶及木聚糖酶混合酶酶解稻草96 h的酶解得率为65.4%。[结论]该研究可为里氏木霉纤维素酶生产和酶解稻草的应用提供一定的依据。

关键词 纤维素酶;里氏木霉;稻草酶解

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)31-0001-02

Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw by *Trichoderma reesei* Cellulase

GU Bin-tao, HUANG Zhao, HUANG Guo-chang et al (Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi 330096)

Abstract [Objective] To investigate the effects of carbon and nitrogen sources on cellulase production by *Trichoderma reesei* and the conditions for enzymatic hydrolysis of rice straw. [Method] The fermentation conditions of *T. reesei* were studied by adding different carbon sources and yeast powder of different concentration. Enzymatic hydrolysis of rice straw was carried out using different amounts of cellulase, and the enzymatic hydrolysis reaction of rice straw was carried out by cellulase and mixed enzyme of cellulase and xylanase. [Result] Cellulase activity was high when the compound carbon source of lactose and rice straw and yeast powder concentration of 12 g/L were used. The suitable amount of enzyme was 200 U (FPA) per gram of rice straw for enzymatic hydrolysis. After 96 h enzymatic hydrolysis of rice straw, the yield of 65.4% was achieved by combination of cellulase and xylanase. [Conclusion] The study provided a certain basis of application of *T. reesei* cellulase production and enzymatic hydrolysis of rice straw.

Key words Cellulase; *Trichoderma reesei*; Enzymatic hydrolysis of rice straw

纤维素是自然界存在的最丰富的可再生资源,稻草、玉米秸秆、麦秆和甘蔗渣等都是纤维素的来源。纤维素酶是一组能够水解纤维素中 β -1,4葡萄糖苷键的复合酶,包括纤维二糖水解酶(又称外切葡聚糖酶)、内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶^[1-5]。纤维素酶的3种组分通过协同作用,将纤维素降解为葡萄糖。利用纤维素酶将含纤维素的农林副产物进行降解糖化,进而发酵生产出燃料乙醇和各类生物化工产品,这对于解决能源短缺、保护环境和促进农业可持续发展具有重要的意义。

将木质纤维素转化为燃料乙醇需要一系列复杂的工艺,主要包括原料预处理、酶解糖化和发酵等步骤^[6]。减少产酶成本和增加糖化酶解得率是该工艺中的技术难点。Li等^[7]利用纤维素酶降解甘蔗渣纤维素,当酶解量为7.5 FPIU/g时纤维素的酶解率高达82%,通过进一步发酵最终产乙醇浓度为40.6 g/L。Singhania等^[8]通过试验提高了纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶活性,能更有效水解纤维素,说明 β -葡萄糖苷酶是酶解糖化的关键组分之一。Hu等^[9]报道,增加木聚糖酶用量可以提高纤维素酶水解纤维素的酶解得率。笔者用稻草秸秆作为里氏木霉发酵产纤维素酶的碳源,并利用所产纤维素酶对稻草秸秆进行酶解糖化,旨在为稻草秸秆的生物利用和高效转化奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

基金项目 江西省科学院基础设施配套项目(20142BBA13030);江西省科学院科研开发专项(2014-YYB-01);江西省科学院协同创新专项资金普惠一类项目(2013-XTPH-29)。

作者简介 顾斌涛(1980-),男,江苏苏州人,助理研究员,博士,从事工业酶制剂的研究。

收稿日期 2016-09-09

研究所实验室保存。稻草采自江苏省苏州市吴江区黎里,烘干后密封冷藏保存。②化学试剂均为国产分析纯。③种子培养基:葡萄糖16.0 g/L、酵母粉20.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L、 MgSO_4 1.0 g/L、 CaCl_2 0.6 g/L、 KH_2PO_4 5.0 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.0 mg/L;产酶培养基:乳糖18.0 g/L、稻草20.0 g/L、酵母粉12.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g/L、 MgSO_4 1.0 g/L、 CaCl_2 0.6 g/L、 KH_2PO_4 5.0 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.0 mg/L。

1.2 试验方法

1.2.1 稻草预处理。稻草秸秆剪至2 cm左右,与2%的氢氧化钠溶液混合,常压37℃下放置24 h,再在高压105℃条件下反应50 min。反应结束后,用自来水反复冲洗,再用蒸馏水冲洗3次。

1.2.2 产酶试验。在PDA平板上培养里氏木霉120 h,转接到种子培养基中培养48 h,再按照10%的接种量接入产酶培养基(50 mL装液量),在温度28℃和转速180 r/min的条件下培养,定时取样检测酶活力。其中,产酶培养基的碳源条件分别为乳糖38.0 g/L、稻草38.0 g/L以及混合碳源(乳糖18.0 g/L、稻草20.0 g/L)。

1.2.3 酶活性测定。①内切葡聚糖酶活性(EGA)。用pH 4.8的柠檬酸缓冲液配制1%的羧甲基纤维素钠,与适当稀释的酶液在50℃水浴中反应30 min,采用DNS法测定还原糖含量。1个活力单位为1 h由底物产生1.0 mg还原糖所需酶量,用U/mL表示。②纤维二糖水解酶活性(CBHA)。底物微晶纤维素与稀释酶液在50℃水浴中反应30 min,采用DNS法测定还原糖含量。1个活力单位为1 h由底物产生

1.0 mg 还原糖所需酶量,用 U/mL 表示。③ β -葡萄糖苷酶活性(BGA)。采用葡萄糖氧化酶法测定 β -葡萄糖苷酶活性,底物为纤维二糖。1个单位的 β -葡萄糖苷酶活力为1 h产生2.0 mg葡萄糖所需的酶量,用 U/mL 表示。④滤纸酶活性(FPA)。取 Whatman 1 号滤纸与适当稀释的酶液在50℃水浴中反应30 min后,采用DNS法测定还原糖含量。1 h生成1.0 mg还原糖所需的酶量计为1个单位的滤纸酶活,用 U/mL 表示。

1.2.4 稻草酶解试验。将 pH 4.8 的柠檬酸缓冲液配制的纤维素酶与经碱处理的稻草残渣混合,放入恒温水浴振荡器,在 50℃、100 r/min 的条件下反应 48 h,采用 DNS 法测定酶解反应液中还原糖的含量。纤维素酶添加量分别为 1 g 底物 50、100、150、200、250 和 300 U (FPA) 的酶液,另外添加木聚糖酶试验的用酶量为 1 g 底物 200 U。按照以下公式计算酶解得率:酶解得率(%) = 还原糖总量(g) × 0.9 × 100%/0.658 g,其中 0.658 g 为 1 g 底物中纤维素和半纤维素的质量。

2 结果与分析

2.1 碳源对里氏木霉产酶的影响 从图 1 可以看出,乳糖对里氏木霉产纤维素酶有一定的诱导作用,酶活力在发酵初期上升很快,但由于乳糖为可溶性糖,消耗过快,发酵 48 h 后酶活不再增加。使用不溶性的稻草为碳源时,酶活力缓慢上升,最后酶活力水平不高,而且发酵时间长;使用乳糖和稻草的复合碳源纤维素酶活力高,发酵 120 h 时纤维素酶活力为 55.4 U/mL。

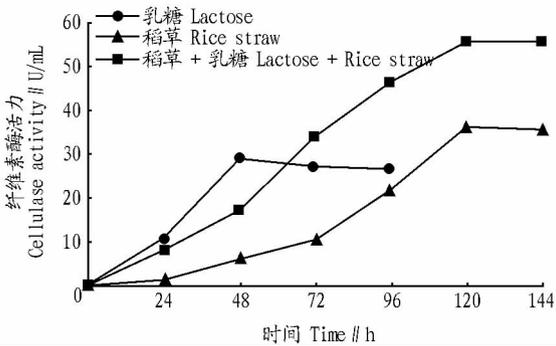


图 1 不同碳源对产纤维素酶活力的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on cellulase production

2.2 不同浓度酵母粉对里氏木霉产酶的影响 利用不同浓度的酵母粉进行发酵产酶,结果表明当酵母粉浓度为 12 g/L 时里氏木霉产纤维素酶活力最高,进一步增加酵母粉浓度并不利于纤维素酶活力的提高(表 1),这主要由于酵母粉浓度过高引起木霉菌体生长过度所致。

2.3 纤维素酶添加量对稻草酶解的影响 从图 2 可以看出,当酶液添加量从 50 U/g 增加至 200 U/g,稻草酶解得率显著增加,当酶液添加量为 200 U/g 时的酶解得率为 58%。当酶液添加量从 200 U/g 增加至 300 U/g,稻草酶解得率的增加幅度相对较少,当酶液添加量为 300 U/g 时的酶解得率为 62%。考虑到实际应用中纤维素酶的成本,选取 1 g 底物 200 U 滤纸酶活的发酵酶液酶解稻草。

表 1 不同浓度酵母粉对产纤维素酶的影响

Table 1 Effect of yeast powder at different concentration on cellulase production

酵母粉浓度 Concentration of yeast powder g/L	发酵时间 Fermentation time//h	纤维素酶活力 Cellulase activity U/mL	生产率 Productivity U/(h·mL)
3	96	27.3	0.28
6	120	42.5	0.35
9	120	48.6	0.41
12	120	55.4	0.46
15	120	53.2	0.44
18	120	50.4	0.42

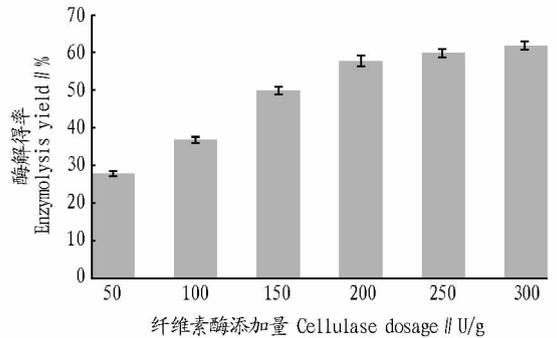


图 2 纤维素酶添加量对酶解得率的影响

Fig. 2 Effect of cellulase dosage on yield of enzymatic hydrolysis

2.4 纤维素酶和木聚糖酶酶解稻草的进程 分别利用纤维素酶、纤维素酶和木聚糖酶混合酶对稻草进行酶解反应。从图 3 可以看出,酶解反应前 24 h 酶解得率的增加幅度较大,24 h 后酶解得率增加较为缓慢。由于能够降解稻草中的木聚糖,用纤维素酶和木聚糖酶混合酶的酶解效果好于单独使用纤维素酶,混合酶酶解稻草 48 h 的酶解得率为 63%。

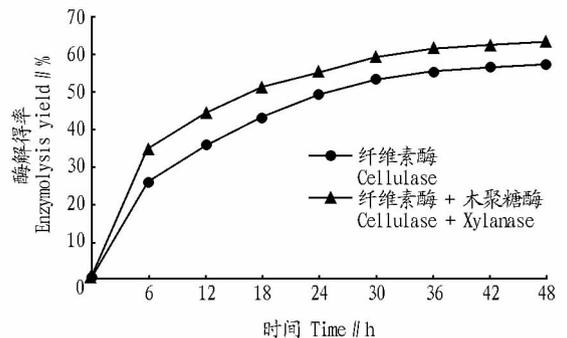


图 3 纤维素酶和木聚糖酶酶解稻草的时间进程

Fig. 3 Time courses of enzymatic hydrolysis of rice straw by cellulase and xylanase

3 结论与讨论

该研究利用乳糖和稻草为复合碳源,用 12.0 g/L 的酵母粉为氮源,发酵 120 h 里氏木霉产纤维素酶酶活为 55.4 U/mL。里氏木霉是目前重要的产纤维素酶的工业菌株,能分泌组分较为齐全、酶活力较高的木质纤维素酶系^[1,10-12]。木质纤维素转化为燃料乙醇的过程中,纤维素酶成本的降低和酶解效

表 2 不同品系冬小麦第一、二节间二氧化硅含量

Table 2 Silica content between section 1 and 2 of different lines winter wheat

g

品系 Lines	第一节间重量 Weight of section 1	第一节间二氧化硅含量 Silica content of section 1	第二节间重量 Weight of section 2	第二节间二氧化硅含量 Silica content of section 2
沧麦 2009-19 Cangmai2009-19	10	0.45 aA	10	0.39 defEF
陇中 4 号 Longzhong4	10	0.41 abAB	10	0.50 aAB
太 1305 Tai1305	10	0.40 bcABC	10	0.47 abcABCD
科遗 12-6105 Keyi12-6105	10	0.39 bcABCD	10	0.43 cdeCDE
众信 5158 Zhongxin5158	10	0.38 bedBCD	10	0.44 bedBCDE
长 7080 Chang7080	10	0.36 bcdeBCD	10	0.47 abcABCD
长麦 5823 Changmai5823	10	0.35 cdeBCDE	10	0.38 efEF
陇鉴 108 Longjian108	10	0.35 cdeBCDE	10	0.35 fF
陇育 8 号 Longyu 8	10	0.33 defCDEF	10	0.41 deCDEF
中麦 39 Zhongmai 39	10	0.30 efDEF	10	0.42 deCDEF
临早 5115 Linhan5115	10	0.29 fgEF	10	0.41 deCDEF
长 6878(CK) Chang 6878(CK)	10	0.28 fgEF	10	0.48 abABC
长 6990 Chang6990	10	0.27 gF	10	0.51 aA

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$);同列数据后大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: Data followed by different lowercases in the same column stand for significant difference($P < 0.05$); different capital letters stand for extremely significant difference($P < 0.01$).

可有效抑制茎叶伸长,并可使茎秆加粗、变短,从而减少和杜绝倒伏;②土壤水分过多,特别是长期渍水,则麦根浅、易倒伏,要求在冬小麦生长期,小水勤灌,保持土壤不干、不湿;③在冬小麦拔节始期,以 0.20%~0.30% 的矮壮素溶液喷淋植株 1~2 次,可使植株节间变短、加粗,增强抗倒伏性;④合理施用化学肥料,注意小麦对氮、磷、钾、硅等元素的需求;⑤将已经发生倒伏的植株每 50~100 株捆在一起,扶其直立,以减少霉烂、利于通风透光、增强光合作用、增加粒重,可在一定程度上挽回损失。

参考文献

[1] 张灿军. 2013 旱地小麦新品种新引技术集成与示范培训教材[Z]. 洛阳:全国农业技术推广服务中心,洛阳农林科学院,2013.

- [2] 杨文飞,潘德众,朱云林,等. “劲丰谷德”对小麦抗倒性和产量的影响[J]. 长江大学学报(自然科学版),2015,12(15):1-3,47
- [3] 仇化民,李怀德,李桂芳. 从庆阳地区的气候条件谈种草[J]. 干旱气象,1987(1):16-18.
- [4] 张谋草,赵满来,张红妮,等. 气候变化对陇东塬区冬小麦生长发育及产量的影响[J]. 干旱地区农业研究,2005,23(5):232-235.
- [5] 于欣伟,徐广惠,周英彦,等. 用稻壳、稻草、麦秸生产优质白炭黑的新技术[J]. 硅酸盐通报,1996(3):48-51.
- [6] 刘恒权,孙时知,赵国鹏,等. 利用稻壳生产优质白炭黑的新方法[R]. 鞍山钢铁学院化学工程研究中心,2002:4-8.
- [7] 徐磊. 小麦抗倒伏性状的评价与早代选择研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [8] 范平,张娟,李新平. 不同小麦品种(系)茎秆组织结构与产量潜力关系研究[J]. 河南农业大学学报,2000,34(3):216-219.
- [9] 蒲定福,周俊儒,李邦发,等. 根倒伏小麦抗倒伏评价方法研究[J]. 西北农业学报,2000,9(1):58-61.

(上接第 2 页)

率的提高是生产生物质燃料乙醇的关键。稻草秸秆在我国是价格低廉的大宗农业副产物,研究用稻草作为碳源能大大降低产纤维素酶的成本。

该研究利用里氏木霉纤维素酶对碱预处理稻草进行酶解,48 h 酶解得率为 58%。当使用添加木聚糖酶的混合酶进行酶解时,48 h 酶解得率为 63%。稻草秸秆的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,稻草碱预处理比酸预处理能去除更多的木质素,在去除木质素和获得可发酵性己糖和戊糖方面具有优势^[13-14]。在酶解稻草方面,各类木质纤维素降解酶系的组分越齐全,越能获得较好的酶解效果。该研究可为利用稻草产纤维素酶及稻草的高效转化利用奠定基础。

参考文献

- [1] LIU K M, DONG Y M, WANG F Z, et al. Regulation of cellulase expression, sporulation, and morphogenesis by velvet family proteins in *Trichoderma reesei*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(2):769-779.
- [2] JUTURU V, WU J C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications[J]. Renew and Sust Energ Rev, 2014, 33(6):188-203.
- [3] DASHTBAN M, MAKI M, LEUNG K T, et al. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison[J]. Crit Rev Biotechnol, 2010, 30(4):302-309.
- [4] 何敏超,许敬亮,袁振宏,等. 纤维素酶基因表达研究进展[J]. 林产化学与工业,2014,34(5):169-174.

- [5] ATREYA M E, STROBEL K L, CLARK D S. Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A [J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(2):330-338.
- [6] 方翎,秦玉琪,李雪芝,等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报,2010,26(7):864-869.
- [7] LI J B, ZHOU P F, LIU H M, et al. Ethanol production from xylan-removed sugarcane bagasse using low loading of commercial cellulase [J]. Bioresource technology, 2014, 163(7):390-394.
- [8] SINGHANIA R R, PATEL A K, SUKUMARAN R K, et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J]. Bioresource technology, 2013, 127(1):500-507.
- [9] HU J G, ARANTES V, SADDLER J N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? [J]. Biotechnology for biofuels, 2011, 4(1):36.
- [10] SCHUSTER A, SCHMOLL M. Biology and biotechnology of *Trichoderma* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(3):787-799.
- [11] 黄晓梅,杨谦,范金霞,等. 绿色木霉内切葡聚糖酶基因 I 的克隆表达[J]. 哈尔滨工业大学学报,2010,42(12):1921-1926.
- [12] FOREMAN P K, BROWN D, DANKMEYER L, et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. The journal of biological chemistry, 2003, 278(34):31988-31997.
- [13] 张鑫,刘岩. 木质纤维原料预处理技术的研究进展[J]. 纤维素科学与技术,2005,13(2):54-58.
- [14] 黄涛,程康华,王传槐,吐温-80 及碱预处理对饲用稻草木质素含量和纤维素酶解产糖的影响[J]. 纤维素科学与技术,2011,19(2):52-58.