

纤维素酶在木质纤维素生物质转化中的应用研究

沈金龙 毛爱军 王远亮 江 宁 董志扬*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 选育得到纤维素酶高产菌株里氏木霉突变菌株(*Trichoderma reesei*) 813A,优化了其发酵产酶条件。利用该菌株所产纤维素酶对天然木质纤维素的水解糖化过程进行研究,确定了实验条件下最优的糖化条件(温度 50℃, pH 4.5 酶浓度 6~8 FPU/mL 底物浓度 2%)。以玉米叶和杨树叶为天然纤维素原料,水解糖化率分别达到 86.2% 和 56.0%。通过酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)将糖化液转化为酒精,产乙醇浓度达到 5%~5.8%,转化率为 79.4%~92.1%。

关键词 木质纤维素 纤维素酶 生物转化

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0507-04

植物纤维素是世界上最丰富的碳水化合物资源。随着地球上不可再生资源日益耗竭,利用生物技术将木质纤维素进行生物转化具有重大意义。与酸水解等化学方法相比较,酶催化水解具有反应条件温和、无副产物和污染少等优势。由于天然木质纤维素结构的复杂性^[1],进行生物转化的难点在于如何高效将它降解成为可发酵糖。结合预处理方法,消除木质素的阻碍作用,是提高纤维素被纤维素酶水解的有效步骤。将纤维素酶的产生、纤维素的水解及酒精发酵过程有效组合,可提高生物转化效率,降低转化成本^[2~5]。本研究是以里氏木霉作为纤维素酶产生菌株,通过优化产纤维素酶条件、秸秆纤维素的酶水解技术及酒精发酵,较高效率地将天然秸秆转化成酒精。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)突变菌株 813A,由本实验室分离得到。康宁木霉(*Trichoderma koningii*),里氏木霉 QM-9414,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)均由本实验室保存。

1.1.2 培养基 麦芽汁培养基,YPD 培养基:每升含还原糖 20g,酵母提取物 10g,蛋白胨 20g;产酶培养基:每升含稻草粉 60g,麦麸 36g,酵母膏 10g,调节 pH 至 4.8;酒精发酵培养基:每升含还原糖 100g,(NH₄)₂SO₄ 2g,KH₂PO₄ 1g,pH5.0。

1.1.3 木质纤维素材料 玉米叶系采集于中国农业科学院,杨树叶系采集中科院微生物研究所实验楼前。

1.2 选择产酶菌株

里氏木霉经紫外线和亚硝基胍复合诱变后,用无菌水分散,涂布在麦芽汁培养基上,培养(30℃,6d),挑选单菌落,接种在产酶培养基中,摇床培养 5d(30℃,220r/min),取样分析纤维素酶活力。

1.3 纤维素酶的生产

在麦芽汁斜面上培养 813A 菌株 6d(30℃),然后接种在产酶培养基中,摇床培养 5d(30℃,220r/min),收集发酵液,4℃离心(10000r/min,10min),取上清液,4℃保存。

1.4 秸秆纤维的前期预处理

将玉米叶等材料用自来水洗净,自然晾干,在 Tekmar 分析磨上粉碎,所得粉末在蒸馏水中浸泡 4h,以除去可溶物质,离心(5000r/min,10min)后,收集、干燥,并保存于玻璃容器中。按照每 100mL 溶液加入 2g 秸秆纤维的比例,将秸秆纤维素浸泡在 1% H₂O₂(用蒸馏水配置)中,用 NaOH 调节 pH 至 11.5,室温轻柔搅拌过夜(16h),离心(3000r/min,5min),丢弃上清,用蒸馏水反复洗涤不溶的秸秆纤维素,直至上清 pH 值为中性。将所得秸秆纤维在 50℃干燥箱内干燥、备用。

1.5 酶催化水解

标准的水解实验在大试管中进行。反应体系为

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(2001AA214151) 中国科学院知识创新方向性课题(KJ CX2-SW-206-1)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62551206; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介 沈金龙(1976-)男,江苏人,硕士研究生,主要从事纤维素酶及生物质转化研究。

收稿日期 2003-05-15,修回日期 2004-03-26

总体积为 10ml(必要时加入 0.01% NaN_3),含有 2% 预处理的底物,用 0.05mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调节 pH 值至 4.8,里氏木霉纤维素酶用量为 8FPU/mL。试管在水浴摇床上温浴 48h(50℃, 150r/min),收集样品,离心(5000r/min, 10min)。取上清,分析还原糖含量。收集上清液,蒸发浓缩备用。纤维素水解效率表示如下^[6]:

$$\text{Cellulose Hydrolysis} = \frac{\text{Reducing Sugars} \times 0.9}{\text{Total Cellulose}} \times 100\%$$

1.6 生物转化

用水解液浓缩液配制 YPD 和发酵培养基。将酿酒酵母接种在 YPD 培养基中,培养过夜(37℃, 200r/min)。按 1:5(V/V)比例,将菌液加入发酵培养基中,37℃静置 36h。离心(5000r/min, 10min),取上清液常压蒸馏,分析酒精含量。

1.7 分析方法

根据 3,5-二硝基水杨酸显色反应方法^[7]测定还原糖。根据 Mandels 等^[8]的方法测定纤维素酶活力,一个滤纸酶活力单位(FPU)定义为:在 50℃ 每小时产生 1mg 还原糖(以葡萄糖计)的纤维素酶量。酒精含量用气相色谱法测定。酒精转化率按照 100g 葡萄糖生成 51.11g 乙醇的转化率为 100% 计算实际酒精转化率。

2 结果

2.1 纤维素酶生产

木霉菌是优良的产胞外纤维素酶生产菌株^[8]。挑取 48 个诱变产生的里氏木霉菌单菌落,在产酶培养基中培养(30℃, pH 4.8, 220r/min) 5d,取样分析纤维素酶水平。菌株 813A 具有最高的产纤维素酶活性。其产纤维素酶能力高于里氏木霉 QM-9414 和康宁木霉。在产酶培养基上培养 *T. reesei* 813A (30℃, 220r/min),结果表明:培养基初始 pH 值为 4.8,连续培养 5d,纤维素酶水平达到最大值,为 39 FPU/mL。接种量对产酶水平无显著影响,鼠李糖等无明显诱导效应。

2.2 酶催化水解

在纤维素酶水解过程中,除了纤维素酶活力大小对水解有较大影响外,许多其它因素也会影响纤维素水解和糖化的产率,包括木质纤维素预处理、温度或降解产物对酶的抑制作用、酶与底物的浓度比、纤维素对酶的吸附作用、搅拌等因素。优化这些因素对改进水解工艺的成本具有重要意义。为了利用化学预处理底物获得最大的还原糖产率,本研究

对水解参数(温度、pH、酶与底物浓度等)进行了优化。

2.2.1 底物预处理对纤维素水解效率的影响:利用木质纤维素材料(玉米叶和杨树叶)进行实验,底物用 Tekmar 分析磨粉碎后,用碱性过氧化氢预处理后,进行酶催化水解(底物 2%,纤维素酶 8 FPU/mL, 50℃, pH 4.8, 2d),单位量纤维素酶的水解木质纤维素的能力显著提高(图 1)。

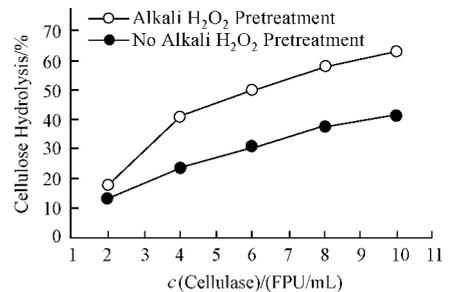


图 1 碱性过氧化氢预处理显著提高纤维素酶水解效率
Fig. 1 Pretreatment of the poplar leaves materials with alkali hydroperoxide increased cellulose hydrolysis

2.2.2 温度和缓冲液 pH 值对纤维素水解效率的影响:玉米叶和杨树叶经过粉碎和碱性过氧化氢预处理后,在不同温度下进行酶催化水解(底物 2%,纤维素酶 8FPU/mL, pH 4.8, 150r/min, 2d),纤维素水解效率随着温度增加而缓慢增加,在 50℃ 时达到最高,超过 50℃ 纤维素水解效率迅速下降。将预处理的玉米叶和杨树叶在不同 pH 值下进行酶催化水解(底物 2%,纤维素酶 8FPU/mL, 50℃, 2d),发现纤维素水解效率在 pH 4.5 达到最大值, pH 值超过 pH 4.5 后,纤维素水解效率逐渐下降,在 pH 6.0 时下降到 20% 以下。

2.2.3 纤维素酶量对纤维素水解效率的影响:使用不同的纤维素酶量,对预处理的玉米叶和杨树叶进行催化水解(底物 2%, 50℃, pH 4.5, 2d),发现纤维素水解效率随着纤维素酶量的增加而增加,当酶活力达到 20FPU/mL 时,纤维素水解效率最高(图 2)。

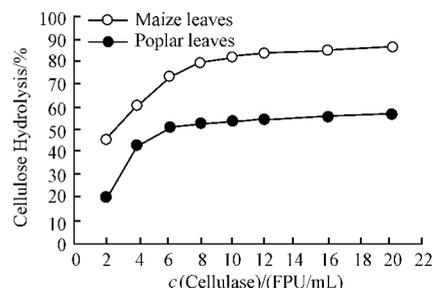


图 2 纤维素酶浓度对纤维素水解效率的影响

Fig. 2 Effect of cellulase concentration on cellulose hydrolysis

尽管 20FPU/mL 是最优的酶量,但是使用如此高活力的纤维素酶,在经济上是不合算的。当纤维素酶活力从 6~8FPU/mL 增加到 20FPU/mL,纤维素酶利用木质纤维素产生的还原糖的量增加甚微,因此选用 6~8FPU/mL 纤维素酶浓度较为合适。

2.2.4 表面活性剂对纤维素水解效率的影响:玉米叶和杨树叶经预处理后,进行酶催化水解(底物 2% 纤维素酶 8 FPU/mL, 50°C, pH4.5, 2d),反应体系添加不同表面活性剂(终浓度均为 2.5g/L)。结果表明在相同的条件下添加表面活性剂如吐温-20、吐温-80 或 Triton X-100 可增加纤维素水解效率(表 1)。水解时间从 48h 延长至 72h,还原糖产率无明显提高。

表 1 表面活性剂对纤维素水解效率的影响(%)

Table 1 Effect of surfactants on cellulose hydrolysis(%)

Samples	No surfactants	Tween 20	Tween 80	Triton X-100
Poplar leaves	51.0	53.8	56.0	54.5
Maize leaves	73.3	80.5	86.2	80.3

2.2.5 底物浓度对纤维素水解效率的影响:对预处理后的杨树叶和玉米叶底物分别使用 6FPU/mL 和 8FPU/mL 的酶量,并添加 2.5g/L 吐温-80 进行酶催化水解(50°C, pH4.5, 2d)。结果表明将底物浓度从 2% 提高到 25%,纤维素水解效率逐渐下降(图 3)。这可能是由于产物对水解具有抑制作用。因此最优的底物浓度是 2% (以干重计)。

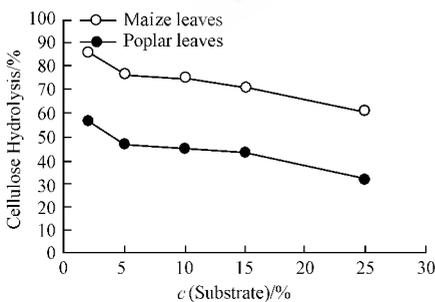


图 3 底物浓度对纤维素水解效率的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on cellulose hydrolysis

由上所述,木质纤维素最优水解条件分别是:50°C, pH4.5, 纤维素酶量 6~8FPU/mL, 底物浓度 2.0%, 并加入一定量的表面活性剂。在此优化条件下,天然木质纤维素材料玉米叶和杨树叶的水解糖化率分别达到 86.2%和 56.0%(图 3)。

2.3 酵母利用还原糖产生酒精

利用纤维素酶分别水解来源于玉米叶和杨树叶的木质纤维素底物(50°C, pH4.5, 8FPU/mL 纤维素酶, 2% 底物),收集反应液,离心(5000r/min, 5min),

收集上清液,50°C 蒸发浓缩后,以浓缩糖化液作为碳源配制 YPD 培养基,酿酒酵母可以在此培养基上生长。在含 10% 还原糖的发酵培养基中,加入酿酒酵母菌体(*Saccharomyces cerevisiae*),37°C 静置 36h,测定培养基中酒精含量分别为 5.8%~5%(V/V),酒精转化率为 79.4%~92.1%。

3 讨论

将天然木质纤维素如秸秆等通过生物转化得到酒精等能源物质是当前国际研究的热点^[9-13]。鉴于天然木质纤维素的结构和成分的高度复杂性,如何有效降解纤维素使其成为可发酵糖-葡萄糖,又是其关键问题。目前较成熟的是采用稀酸水解等化学方法,但这些方法往往需要高温高压等,能耗大,副产物多,对环境生态有危害等,而采用酶法降解秸秆等天然纤维素来生产燃料酒精将是未来生物质转化最佳途径。目前这方面的研究大都集中在如何有效地利用纤维素酶降解天然纤维素产生可发酵糖,如 Hari 等^[6]利用模式菌种里氏木霉(*Trichoderma reesei* QM-9414)产生的纤维素酶对香蕉叶子进行降解,获得了较高的糖化率。然而在如何利用酵母进一步将可发酵糖发酵产生酒精等方面,还研究甚少,而且缺乏确切的实验数据。

本文对里氏木霉 183A 产纤维素酶、天然纤维素的预处理和酶对纤维素的水解糖化过程进行了研究,以玉米叶和杨树叶为材料,经过过氧化氢预处理,可有效提高纤维素酶水解率,进一步优化水解条件,使得纤维素酶对玉米叶和杨树叶的水解率分别达到 86.2%和 56%。利用该两种水解糖化液进行酒精发酵研究,发现酒精转化率达到 79.4%~92.1%,表明利用里氏木霉所产纤维素酶通过本技术能够有效水解糖化天然纤维素,得到可为酿酒酵母利用的单糖,将其转化为乙醇,本研究将为生物质高效转化应用奠定基础,相关工作我们将作进一步报道。

参 考 文 献

- [1] Chose T K, Ghosh P. Bioconversion of cellulosic substances. *J Appl Chem Biotechnol*, 1978, **28**: 309-320.
- [2] Han Y W, Callihan C D. Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Appl Microb*, 1974, **27**: 159-165.
- [3] Updegraff D M. Utilization of cellulose from waste paper by *Mycrothecium verrucaria*. *Biotechnol Bioeng*, 1971, **13**: 77-97.
- [4] Ghose T K. Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of *Trichoderma virida* QM 6a. *Biotechnol Bioeng*, 1969, **11**: 239-261.

- [5] Mandels M , Hintz L , Nystrom J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol Bioeng* , 1974 , **16** :1471 - 1493.
- [6] Krishna S. H , Sekhar R , Suresh B , *et al.* Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM - 9414. *Bioprocess Engineering* , 2000 , **22** :467 - 470.
- [7] Miler G L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* , 1959 , **31** :426 - 428.
- [8] Mandels M , Andreotti R , Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp* , 1976 , **6** :21 - 23.
- [9] Tolan J S. Logen 's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Techn Environ Policy* , 2002 , **3** :339 - 345.
- [10] Mielenz J R. Ethanol production from biomass : technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology* , 2001 : **4** :324 - 329.
- [11] Ratto M , Ritschkoof A C , Viikari L. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1997 , **48** :53 - 57.
- [12] Eriksson T , Borjesson J , Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* , 2002 , **31** :353 - 364.
- [13] Sun Y , Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology* , 2002 , **83** :1 - 11.

Production and Application of Cellulase from *Trichoderma reesei* 813A for Conversion of Lignocellulose into Ethanol

SHEN Jin-Long MAO Ai-Jun WANG Yuan-Liang JIANG Ning DONG Zhi-Yang*
(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : High yielding mutant strain *Trichoderma reesei* 813A was isolated and employed for cellulase enzyme production. Enzyme production conditions were primarily studied. Enzymatic hydrolysis conditions (temperature , pH , enzyme concentration , and substrate concentration) were optimized. Temperature 50°C , pH4.5 , 6 ~ 8FPU cellulase/mL , and substrate concentration of 2% were found to yield the highest level of cellulose hydrolysis. To the maize leaves and poplar leaves , the hydrolysis efficiency could reach to 86.2% and 56.0% , respectively. *Saccharomyces cerevisiae* could grow on saccharified liquid and converted reducing sugars into 5% ~ 5.8% of ethanol (V/V) , with a conversion efficiency of 79.4% ~ 92.1% , respectively.

Key words : Lignocellulose , Cellulase , Bioconversion

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214161) ; The Knowledge Innovation Project (KIP) of Chinese Academy of Sciences (KJCX2-SW-206-1)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62551206 ; E-mail : dongzy@sun.im.ac.cn

Received date : 05-15-2003

第五届世界食用菌生物学及产品大会将于 2005 年在上海召开

“世界食用菌生物学及产品大会”(以下简称大会)是由世界食用菌生物学及产品学会(简称WSMBMP)组办的世界食用菌大会,内容涉及食用菌生理生化、分子生物学、遗传育种、分类、病虫害防治、栽培技术、菌种制备、营养及药用成分的研发、食品安全及质量控制、产品开发、市场贸易等各个领域。每三年召开一次,前四届已分别在香港、美国、澳大利亚和墨西哥举行。第五届世界食用菌生物学及产品大会将在我国召开,这也是世界食用菌大会首次在中国举行。

第五届大会由WSMBMP和上海市农业科学院主办,中国食用菌协会、中国菌物学会、中国农学会食用菌分会、上海对外科技交流中心协办。大会拟定于2005年4月8日至12日在上海召开,历时5天,有专题演讲、学术讨论、海报展示、产品展览、参观考察等多项内容。欢迎国内外对食用菌生产、研究、开发、贸易有兴趣的单位或个人参加本届大会。

欲知详情,请与大会组委会秘书处联系。

电话 86-21-52630034、86-21-52630137、86-21-62201337,或登录 www.sh-mushroom.com。