

灰绿曲霉突变株降解稻草秸秆及联合产氢的研究*

杜娟, 林颢勤, 徐昶, 邬小兵, 徐惠娟, 龙敏南

(厦门大学生命科学学院, 厦门大学生物能源中心, 福建厦门, 361005)

摘要 对灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)突变株 EU7-22 进行单因子和正交实验, 确定菌株利用稻草产纤维素酶的液态发酵优化组合条件为: 稻草粉 3%、蛋白胨 0.5%、温度 35℃、起始 pH 5。在优化条件下培养 4~5 d 可达到产酶高峰。利用优化培养后的酶液水解稻草粉产糖, 在最适条件下, 稻草粉酶解反应 24 h 后, 糖化率可达 49%。利用稻草粉做底物, EU7-22 和产氢克雷伯氏菌 HP1 联合发酵, 1 g 稻草粉可产氢 23.7 mL。

关键词 灰绿曲霉, 突变株, 纤维素酶, 秸秆糖化, 生物制氢

纤维素类物质是地球上最为丰富的可再生资源, 每年由光合作用产生的植物中, 以干质量计, 纤维素约占 50%^[1]。我国的纤维素资源也极为丰富, 每年仅农作物秸秆的产量就达 5.7 亿 t^[2]。因此, 将纤维素物质转化为乙醇和氢等生物能源, 对解决人类目前所面临的能源短缺与环境污染等问题有重要意义。

选育高效产酶菌株, 发展高效纤维素酶的制备和水解技术是纤维素资源得以转化, 纤维素酶充分利用的关键。本实验室以灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)XC9 为出发菌株, 通过诱变选育得到 1 株产纤维素酶活性显著提高的突变株 EU7-22^[3]。在本实验中, 优化了突变株 EU7-22 液体发酵产酶的培养条件, 初步探讨了稻草糖化和产氢效果, 为进一步利用纤维素类生物质发酵制氢和产乙醇打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

突变株 EU7-22, 由灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)XC9 经 EMS、LiCl、紫外线复合诱变获得。

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)HP1, 本实验室筛选保存。

1.2 稻草

来源于福建漳州, 粉碎后过 40 目筛, 用 1% NaOH 浸泡处理 2~3 d 后, 自来水冲洗至中性, 烘干备用。

1.3 培养基

试管斜面培养基: 马铃薯琼脂(PDA)培养基^[4]。

液态发酵产酶培养基: 加浓的 Mandel's 营养盐

溶液^[5]中加入 2% 的稻草粉, 0.1% 蛋白胨, 每 50 mL 装 300 mL 的三角瓶, 121℃ 高压灭菌 20 min。

联合发酵产氢培养基: 加浓的 Mandel's 营养盐溶液中加入 3% 稻草粉, 0.5% 蛋白胨。

1.4 实验方法

1.4.1 斜面种子培养

在 PDA 斜面上接种孢子后, 30℃ 恒温静置培养, 即用或 4℃ 冰箱保存。

1.4.2 液态发酵产酶培养

在斜面上取 1 环孢子(3~5 d)接种于液态发酵培养基, 置摇床上恒温振荡(150 r/min, 30℃)培养 4 d。

研究发酵条件对产酶影响时, 在上述液态发酵基础上改变相应的培养条件, 测酶活, 比较相对酶活力。

1.4.3 酶活的测定

(1) 酶液的制备: 液态发酵培养后, 取上层发酵液 5 000 g 离心 10 min, 稀释到合适倍数。

(2) CMC 酶活的测定: 在具塞比色管中加入 0.5 mL 稀释后酶液, 加 1 mL 醋酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 4.8)配制的 1% 羧甲基纤维素钠, 50℃ 酶解 30 min, DNS 法测定还原糖含量。

(3) 滤纸酶活(FPA)的测定: 比色管底部放入 1×6 cm(50±1 mg)的滤纸条, 加 0.5 mL 的稀释酶液, 1 mL 醋酸缓冲液(pH 4.8)混匀后, 50℃ 水浴 60 min, DNS 法测定还原糖含量。

(4) 酶活单位定义: 在上述反应体系中(50℃, pH 4.8), 稀释酶液每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖的能力定义为 1 个酶活单位(IU)。

1.4.4 纤维素酶粗酶液水解稻草产糖

粗酶液的制取: EU7-22 优化培养所得发酵液, 5 000 g 离心 15 min, 取上清液。

稻草粉糖化发酵: 300 mL 三角瓶中加入稻草粉 3 g, 自来水 100 mL, 调 pH 至定值。在给定的纤维

第一作者: 硕士研究生(龙敏南教授为通讯作者)。

* 国家“863”计划项目(2001AA515040), 福建省重点科技项目(2005I016), 厦门市科技项目(3502Z20041070)

收稿日期: 2006-07-05, 改回日期: 2006-09-05

素粗酶液用量、水浴温度条件下,搅拌,定时取样测还原糖生成量,并计算稻草粉糖化率。

$$\text{稻草粉糖化率}/\% = \frac{\text{还原糖生成量}}{\text{反应体系中稻草粉总量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 突变株 EU7-22 利用稻草粉产纤维素酶

2.1.1 培养基中稻草粉含量对 EU7-22 发酵产酶的影响

在液态发酵培养基中,加入不同质量的稻草粉,摇瓶培养(30℃,150 r/min)4 d后测产酶活性并计算相对酶活力。图1表明,底物的浓度对发酵产酶有较大影响。培养基中稻草粉含量为2%时,产酶活力最高;当稻草粉含量大于或小于2%时,产酶活力较低。

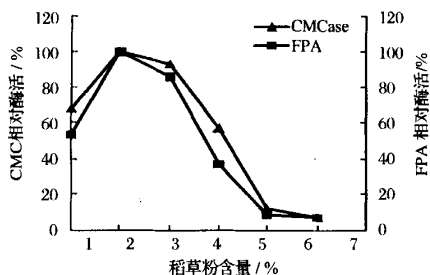


图1 稻草粉含量对突变株 EU7-22 产酶的影响

2.1.2 有机氮源对突变株 EU7-22 产酶的影响

不同有机氮源的添加实验表明,在发酵液中添加有机氮源对产酶有促进作用,其中蛋白胨效果最明显。改变发酵培养基中蛋白胨的浓度,观察其对产酶的影响,结果见图2。在发酵液中添加一定量的蛋白胨有利于菌株产酶,浓度为0.1%较理想,当添加量大于0.3%时,反而对产酶有抑制作用。

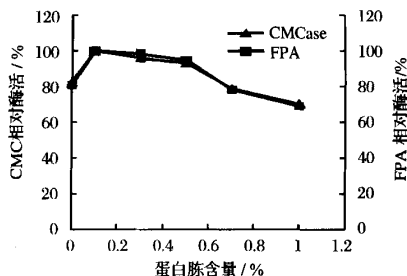


图2 蛋白胨对突变株 EU7-22 产酶的影响

2.1.3 温度对突变株 EU7-22 产酶的影响

选择6个不同的温度梯度,以孢子接种,进行发酵实验,结果如图3。实验表明,35℃是发酵产酶的最佳温度,突变株 EU7-22 在35℃液态发酵培养后,

CMC 和 FPA 酶活力皆达到高峰。

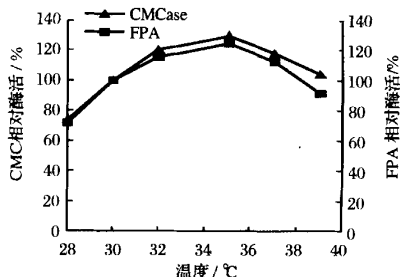


图3 温度对突变株 EU7-22 产酶的影响

2.1.4 起始 pH 值对突变株 EU7-22 发酵产酶的影响

在其他培养条件一定的情况下,将 EU7-22 孢子接种起始 pH 不同的发酵培养基,测其产酶活性。由图4可以看到,当起始 pH < 6 时,EU7-22 酶活呈上升趋势;当起始 pH 值为6~7 时,CMC 和 FPA 酶活较高,有利于菌株产酶;pH > 7 时,产酶能力明显下降。

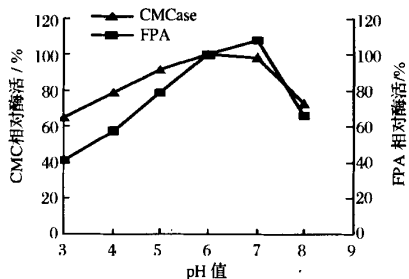


图4 起始 pH 值对突变株 EU7-22 产酶的影响

2.1.5 接种龄对菌株发酵产酶的影响

将不同种龄的种子接种液体发酵培养基,恒温振荡培养,4 d后测产酶活性,结果如图5所示。种龄对 EU7-22 液体发酵产酶的影响不显著,在种龄为3 d时,产滤纸酶活力相对较高。一般来说,在实际应用中,可选择种龄3~5 d时接种。

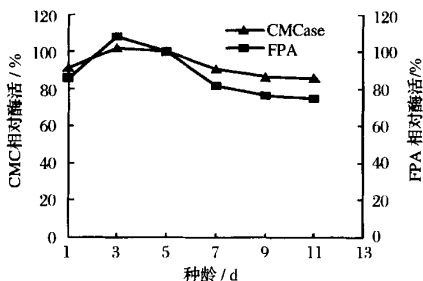


图5 种龄对突变株 EU7-22 产酶活力的影响

2.1.6 正交实验及液态发酵产酶条件的优化

以上单因子实验表明,不同培养条件对突变株

EU7-22 发酵产酶的影响不同。选取影响最为明显的 4 个因素设计正交因素水平表(表 1),采用 $L_9(3)^4$ 方案进行正交试验。

表 1 正交实验因素和水平设计

水平	A(稻草粉) /%	B(蛋白胨) /%	C(温度) /℃	D (起始 pH)
1	1	0.1	32	5
2	2	0.3	35	6
3	3	0.5	37	7

由表 2 的结果(R =极差值)可以看到,稻草粉含量对滤纸酶活影响最大,温度次之。 $A_3B_3C_2D_1$ 是最优化的组合,当稻草粉含量 3%,蛋白胨含量 0.5%,发酵温度为 35℃,起始 pH 值为 5 时,滤纸酶活力最高。EU7-22 在优化条件下发酵培养 4~5 d, CM-Case 活力可达 110 IU/mL, FPA 酶活力达到 2.8 IU/mL,相对于出发菌株增加了 3 倍以上。

表 2 正交实验设计及结果分析

实验 序号	因 素				FPA 酶活力 /IU · mL ⁻¹
	A (稻草粉)	B (蛋白胨)	C (温度)	D (起始 pH)	
1	1	1	1	1	1.17
2	1	2	2	2	0.83
3	1	3	3	3	0.67
4	2	1	2	3	2.4
5	2	2	3	1	2.2
6	2	3	1	2	2.0
7	3	1	3	2	1.88
8	3	2	1	3	2.2
9	3	3	2	1	2.8
K_1	0.890	1.817	1.790	2.057	
K_2	2.200	1.743	2.010	1.570	
K_3	2.293	1.823	1.583	1.757	
R	1.403	0.080	0.427	0.487	

2.2 突变株 EU7-22 纤维素酶水解稻草粉产糖

2.2.1 酶液用量对稻草粉产糖的影响

在 pH 为 5 的酶解体系中加入不同体积的 EU7-22 优化培养粗酶液(滤纸酶活:2.8 IU/mL), 50℃ 下水浴搅拌,定时取样,测产生的还原糖量。实验结果(图 6)表明,随着酶液用量的增加,糖浓度升高,当酶液用量为 8 mL 时,产糖效果最好。

2.2.2 温度对稻草粉酶解产糖的影响

在 pH 为 5 的水解反应体系中,加入 8 mL 的 EU7-22 粗酶液,分别在不同温度下水浴,测还原糖含量。图 7 表明,温度对稻草粉水解有显著的影响。开始随温度的上升,酶解得糖率明显升高,产糖的最适温度为 50℃。当高于 50℃ 时,产糖迅速下降。

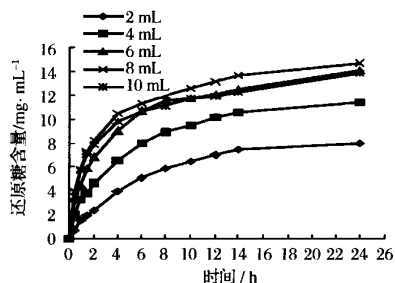


图 6 酶液用量对稻草粉糖化的影响

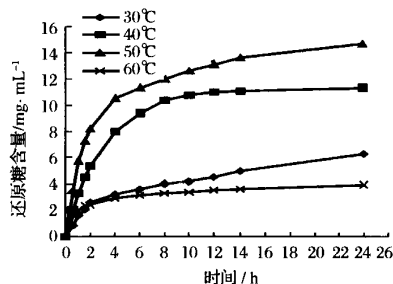


图 7 温度对稻草粉糖化的影响

2.2.3 pH 值对稻草粉酶解产糖的影响

将水解反应体系的 pH 值分别调整到 3, 4, 5, 6, 7, 水浴搅拌反应,测还原糖浓度。实验结果(图 8)表明, pH 值对还原糖产生影响比较明显。在 pH 为 5 时,糖浓度最高,当 $pH > 6$ 或 $pH < 4$ 时,产糖量较低。

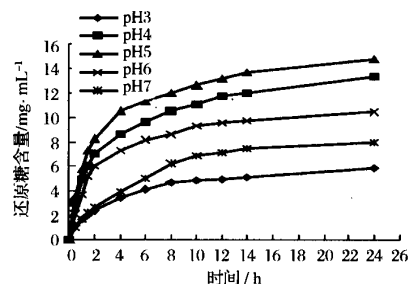


图 8 水解反应液 pH 值对稻草粉糖化的影响

由图 8 可知,在上述水解体系中,EU7-22 纤维素酶水解稻草粉产糖的最适条件为温度 50℃,水解液 pH 5,酶液用量为 8 mL。0~4 h 内,还原糖浓度升高较快,酶解仅 4 h,稻草粉糖化率就达 35%,之后还原糖量增长缓慢。发酵 24 h 后,所产还原糖浓度达 14.7 mg/mL,此时糖化率为 49%。

2.3 突变株 EU7-22 与克雷伯氏菌联合发酵产氢

在总容积为 140 mL 的血清瓶中,加入以稻草粉为底物的联合发酵培养基 20 mL,灭菌后取 EU7-22 孢子接种,35℃,150 r/min 摇床恒温振荡培养。

发酵培养 4 d 后,实验①:将培养至对数期的产

酸克雷伯氏菌 HP1 菌液以 1% 的量接种;实验②:在血清瓶中加入 5 mL 5 倍浓缩的 pH7.0 磷酸缓冲液 (0.2 mol/L) 后,同①;实验③:发酵液平均分装作 2 瓶后,每瓶加入 10 mL pH7.0 磷酸缓冲液 (0.2 mol/L),同①。上述发酵液接种后,充氮密闭,继续振荡培养。定时取气样,气相层析仪测氢气含量(%),并计算稻草粉产氢量 (mL/g)。

$$\text{氢产量} = \frac{\text{H}_2\% \times \frac{V}{1 - \text{H}_2\%}}{\text{稻草粉总量}}$$

$V = \text{血清瓶总容积} - \text{发酵液体积}$

结果如表 3,3 个实验皆在前 24 h 内,氢生成速率较快,此后产氢增长缓慢。EU7-22 和 HP1 以稻草粉为底物分期发酵,反应 48 h 后,1 g 稻草粉产氢 13.5 mL。改变发酵液的 pH 和前期发酵液稀释扩大利用对产氢有一定促进作用。经 pH7.0 缓冲液 (HP1 适合产氢 pH 值为 7.0 左右^[7]) 稀释后扩大培养,发酵 48h 产氢量可达 23.7 mL/g。

表 3 突变株 EU7-22 与产氢菌 HP1 联合发酵的产氢 mL/g

时间/h	4	8	12	24	36	48
产 ①	1.5	4.1	5.7	9.8	11	13.5
氢 ②	4.3	6.8	12.2	13.8	16.7	17.6
率 ③	2.9	5.3	11.1	17	21	23.7

3 讨 论

研究表明,灰绿曲霉突变株 EU7-22 产酶性能良好,利用其纤维素酶水解稻草粉产糖,酶液用量低,短时间内可达到较好的糖化效果。酶解后产生的还原糖可以直接用于制取氢和乙醇等生物燃料。

随着近年来纤维素酶水解生物质产糖成为研究

的热点,如:郭德宪等^[8]利用里氏木霉纤维素酶降解小麦秸秆获得了较高的转化率,直接采用微生物对纤维素进行降解也已有不少研究^[9~10]。但利用秸秆水解联合产氢迄今在国内外鲜有报道。文中以稻草粉为底物,EU7-22 和产氢菌联合发酵可以将产酶、产糖和产氢一体化,缩短了发酵流程,有较好效果。此外还可进一步通过调节两步发酵的实验条件来提高产氢效率。

参 考 文 献

- Kubicek C P, Messner R, Gruber F, et al. The *Trichoderma cellulase* regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15(2): 90~99
- 高凤菊,李 春. 真菌与细菌纤维素酶研究进展[J]. 唐山师范学院学报, 2005, 27(2): 7~10
- 杜 娟,曲音波,林勤勤,等. 灰绿曲霉高产纤维素酶突变株的选育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(增刊): 23~26
- Pasarelli L, McGinnis M R. Viability of fungal cultures maintained at -70°C[J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(4): 1 000~1 004
- 曲音波,高培基,王祖农. 青霉的纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育[J]. 真菌学报, 1984, 3(4): 238~234
- 李冬玲,李 敏,宋 杰,等. 利用固态发酵法生产纤维素酶及其应用的探讨[J]. 酿酒, 2002, 29(4): 38~39
- Minnan L, Jinli H, Xiaobin W, et al. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring[J]. *Res Microbiol*, 2005, 156(2): 76~81
- 郭德宪,曹 健,曾 实,等. 里氏木霉纤维素酶降解小麦秸秆的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2003(3): 25~27
- 蔡燕飞,赵肃清,何成新,等. 应用纤维素分解菌降解香蕉杆生成可发酵糖的研究[J]. 现代化工, 2005, 25(9): 34~36
- 金钟跃,包怡红,王振宇,等. 植物纤维素微生物降解条件[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(3): 44~45

Degradation of Rice Straw by *Aspergillus glaucus* Mutant and integration with Biohydrogen Production

Du Juan, Lin Jinqin, Xu Chang

Wu Xiaobing, Xu Huijuan, Long Minnan

(School of Life Sciences, Bio-Energy Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT The optimal conditions for cellulase production of *Aspergillus glaucus* mutant strain EU7-22 was achieved as follows: rice straw powder quantity 3%, peptone quantity 0.5%, original pH 5, and temperature 35°C, by orthogonal experiments. The strain reached its maximum cellulase activity after 4~5 days fermentation. When the cellulase was applied for saccharification of rice straw, a saccharification rate of 49% was obtained after 24h hydrolysis. The saccharification liquid was subsequently used for hydrogen production. A yield of 23.7 mL H₂/g rice powder was acquired when using *Klebsiella oxytoca* HP1 as the hydrogen producer.

Key words *Aspergillus glaucus*, mutant strain, cellulase, straw saccharification, biohydrogen production