

Pleurotus ostreatus BP 连续开放预处理玉米秸秆的研究*

徐春燕,章毅君,余洪波,许 杨,张晓昱

(华中科技大学 生命科学与技术学院,湖北 武汉, 430074)

摘 要 通过筛选开放性菌株以及对开放状态下玉米秸秆糖化率随预处理时间变化规律的研究,建立了菌株 *Pleurotus ostreatus* BP 连续开放预处理玉米秸秆体系,并进一步对该体系的稳定性进行了评价。从 14 株白腐菌中筛选出 5 株在秸秆上萌发时间短、生长速率快的菌株,其中只有 *P. ostreatus* BP 能在玉米秸秆上开放培养,预处理 15 d 时糖化率最高。由此建立了 *P. ostreatus* BP 开放预处理玉米秸秆 15 d 的连续体系并预处理 5 批。结果表明,前 3 批的预处理效果较稳定,糖化率均比对照提高了 20% 以上。在连续的第 4、5 批次中,糖化率提高很少,这主要是由于开放体系中的杂菌数量急剧增多造成的。

关键词 白腐菌,生物预处理,连续开放体系,玉米秸秆,燃料乙醇

现阶段纤维质乙醇预处理技术已成为研究热点^[1~3],其中生物预处理因其处理条件温和、环境友好而备受关注^[4]。目前生物预处理所采用的菌种主要有白腐菌、褐腐菌和软腐菌^[4],尤其是白腐菌因能够彻底降解和矿化木质素而受到青睐。有报道,利用担子菌预处理山毛榉木结合醇解和 SSF 工艺可以提高山毛榉木发酵乙醇的转化率^[5]。

但是,生物预处理也有其限制因素,其中预处理过程中发酵模式的选择非常关键。从成本上讲,常规的液态发酵罐模式并不适合以大批量固体基质为发酵底物及产物,而常规的固态发酵也会因培养基灭菌和不断制种而提高预处理成本。因此,我们提出了连续开放预处理的模式,以期降低生物预处理的运行成本。本研究从白腐菌菌株选择、预处理时间确定等方面展开研究,建立了菌株 *Pleurotus ostreatus* BP 连续开放预处理玉米秸秆的体系并对该体系的稳定性进行了评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

玉米秸秆:来自武汉市郊区,粉碎过 80 目,烘干,备用。

1.1.2 菌株

菌株 *Coriolus versicolor* B1、*Irpex lacteus* CD、*Flammulina velutipes* FW、*Phellius* sp. 5879、*Fomes fomentarius* 9.24.8、*Antrodiaella zonata* 5893、

Ganoderma japonicum En、*Hericius erinaceum* B5、*Echinodontium taxodii* 2538、*Pleurotus ostreatus* BP、S9.26.23、S117、S150、S163,均为华中科技大学生命科学与技术学院分子生物物理教育部重点实验室筛选保存。菌株 *E. taxodii* 2538 的种属为分子生物学鉴定的结果;菌株 S9.26.23、S117、S150、S163 未鉴定,种属未知;其它菌株的种属均为子实体鉴定。

1.1.3 培养基

PDB(potato dextrose broth)培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,pH 自然。

PDA(potato dextrose agar)培养基:同 PDB 培养基,另外再加 2% 的琼脂。

玉米秸秆培养基:按照玉米秸秆粉:水(g:mL)=1:3 的比例配制,pH 自然。

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 3,NaCl 5,琼脂 20,pH 7.4~7.6。

察氏固体培养基(g/L):NaNO₃ 3,KCl 0.5,K₂HPO₄ 4,MgSO₄·7H₂O 0.5,FeSO₄·7H₂O 0.01,琼脂 20,蔗糖 30,pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化与菌种制备

菌种活化:挑保存于 4℃ 冰箱的菌种于 PDA 平板上,25℃ 培养 5~7 d。

PDB 液体种:挑取 7~8 块活化的菌种,在 PDB 培养基中 150 r/min 25℃ 培养 5 d。

玉米秸秆固体种:从活化的 PDA 平板上挑取 1 块菌种,转接到装有无菌的玉米秸秆培养基上 25℃ 培养 5~7 d,待菌丝长满玉米秸秆基质。

玉米秸秆液体种:挑玉米秸秆固体种 4~5 块,于 PDB 培养基中 150 r/min 25℃ 培养 5 d。

第一作者:博士研究生(张晓昱教授为通讯作者)。

* 国家 973 项目(2007CB210200)

收稿日期:2007-12-12,改回日期:2008-02-26

1.2.2 温和碱处理

按 $V(\text{样品}) : V(\text{碱液}) = 1 : 50$ 的比例进行碱处理,其中 NaOH 浓度为 0.04 M , H_2O_2 浓度为 1% 。碱处理时间 16 h ,转速 150 r/min ,温度为室温。碱处理后离心,用蒸馏水洗至中性,弃上清液,固体样品烘干后粉碎用于纤维素酶酶解。

1.2.3 纤维素酶水解糖化

纤维素酶以 $\text{pH } 4.8$ 的醋酸-醋酸钠缓冲液溶解,酶解温度为 50°C ,转速 200 r/min ,酶解时间为 48 h ,样品与酶液的比例为 $1 : 50 (\text{w/v})$ 。所用纤维素酶为天冠提供的粗酶粉,按 1% 浓度配制,其滤纸酶活(FPA)为 1.6 IU/mL ,内切酶活(EG)为 4.6 IU/mL ,外切酶活(CBH)为 0.3 IU/mL , β -葡萄糖苷酶活为 0.8 IU/mL ,木聚糖活为 24.3 IU/mL 。

酶解后过滤,DNS法测定滤液中还原糖含量,按以下公式计算糖化率,所有糖化率的计算都考虑预处理造成的质量损失。每个样品做3个平行样,计算其均值与方差。

$$\text{糖化率}/\% = \frac{\text{预处理后酶解的还原糖质量}}{\text{预处理前(纤维素+半纤维素)质量}} \times 100$$

1.2.4 纤维素与木质素含量的测定

参考文献^[6]以重量法测定样品中木质素和纤维素含量。以纤维素和木质素质量的绝对损失比例计算纤维素和木质素的降解率,以木质素和纤维素的降解率之比作为木质素降解选择性系数。

1.2.5 连续开放预处理方法

向置于三角瓶中制备好的玉米秸秆粉固体种中加入未灭菌的玉米秸秆粉,加入量为制种所用玉米秸秆粉质量的2倍,玉米秸秆粉:水($\text{g} : \text{mL}$)= $1 : 3$ 。培养 15 d 后,取出 $2/3$ 烘干作为连续开放预处理的第1批样品,余下的 $1/3$ 做为下1批的种子,然后再按比例加入新1批的玉米秸秆粉和水。如此循环,依次获得第2、3、4、5批的样品。除第1批的玉米秸秆粉固体种外其余培养均在开放条件下进行。

1.2.6 开放体系中杂菌计数

每批下样时,取一定量的样品制成悬液分别在牛肉膏蛋白胨培养基与察氏培养基的平板上稀释涂布、培养计菌落数,温度分别为 37°C 和 28°C 。

2 结果与讨论

2.1 白腐菌菌株的筛选

表1 不同菌株萌发时间、生长速率及性状比较

菌株种属及编号	萌发时间/d	菌丝铺满 9 cm	
		秸秆平板所需时间/d	玉米秸秆平板上菌丝生长状况
<i>C. versicolor</i> B1	2	8	菌丝洁白浓密,粗壮整齐,边缘形成根状菌索
<i>P. ostreatus</i> BP	1	6	菌丝洁白浓密,粗壮整齐,前端呈羽毛状,气生菌丝少,不分泌色素
<i>I. lacteus</i> CD	1	7	菌丝白色,稀疏,生长弱,无菌索,无色素
<i>E. taxodii</i> 2538	2	10	菌丝灰白色,生长稀疏
<i>F. velutipes</i> FW	1	8	菌丝呈白色绒毛状,生长旺盛
<i>Phellius</i> sp. 5879	2	12	菌丝浅褐色,较细,松软近棉絮状
<i>F. fomentarius</i> 9.24.8	5	17	菌丝灰色,较细,生长稀疏
<i>A. zonata</i> 5893	2	6	菌丝灰白色,较粗,生长茁壮
<i>G. japonicum</i> En	4	15	菌丝白色,粗壮结实,后期分泌少量黄色素
<i>H. erinaceum</i> B5	5	18	菌丝稀疏,呈散射状
S9.26.23	2	9	菌丝白色稀疏,生长弱
S117	4	13	菌丝白色,生长稀薄
S150	2	8	菌丝灰黄色,较细,绒毛状气生菌丝多
S163	1	7	菌丝白色,生长旺盛

菌种能否在固体基质中迅速萌发和快速生长对于白腐菌菌株占领优势生态位实现开放培养尤其重要。从表1可以看出,14个菌株在玉米秸秆固体培养基上的萌发时间及生长速度存在较大差异,其中 *P. ostreatus* BP、*I. lacteus* CD、*F. velutipes* FW 和 S163 四个菌株容易适应玉米秸秆固体基质,只需 1 d 即可萌发,生长速度快,菌丝每天延伸 $0.6 \sim 0.9 \text{ cm}$ 。

进一步选择这4株萌发快的菌株进行开放体系

筛选,采用了PDB液体种、玉米秸秆液体种及玉米秸秆固体种3种接种方式,分别接种到未灭菌的玉米秸秆培养基上,开放培养,观察其生长情况。 10 d 内只有 *P. ostreatus* BP 在接种秸秆固体种后能在 2 d 内萌发并生长,且生长良好,菌丝粗壮有力,穿透玉米秸秆的能力强,能较快长满固体基质,其它菌株接种后则长出较多的霉菌,结果见表2。因此选定 *P. ostreatus* BP 作为下一步研究的菌株。

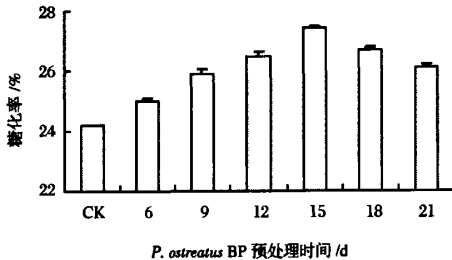
表2 开放状态不同接种方式下菌株的生长状况

接种方式	<i>I. lacteus</i> CD	<i>P. ostreatus</i> BP	<i>F. velutipes</i> FW	SI63
PDB 液体种	+-	+-	-	-
秸秆液体种	+-	+-	-	-
秸秆固体种	-	+	+-	+-

注：“-”表示前期感染霉菌，接种体不能萌发和生长；“+”表示可以较快萌发和生长；“+-”能够萌发但因霉菌等杂菌占领主要生态位死掉。

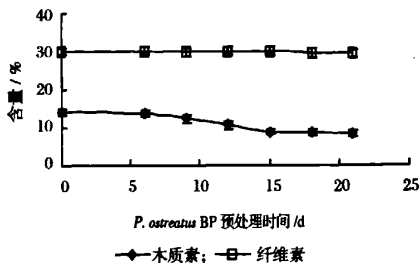
2.2 *P. ostreatus* BP 开放预处理时间的确定

按 1.2.5 所述方法，在玉米秸秆固体培养基中接种 *P. ostreatus* BP 固体种，塑料薄膜封口，于 25℃ 处理不同时间后下样测糖化率，结果见图 1，CK 表示未经生物处理的玉米秸秆。

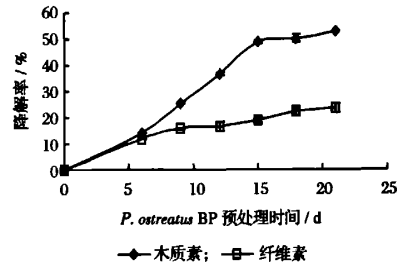
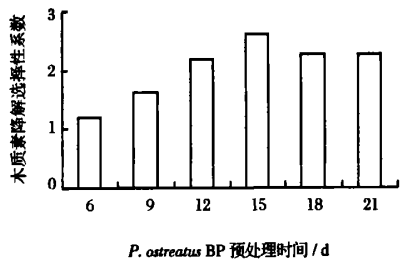
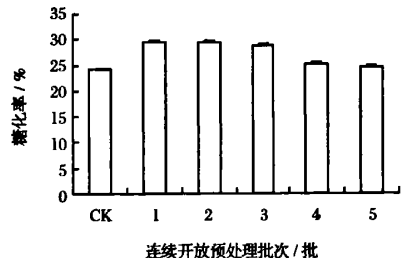
图1 *P. ostreatus* BP 预处理不同时间的糖化率

从图 1 可以看出，白腐菌预处理不同时间后的糖化率均高于对照，且随着培养时间的延长，糖化率呈现先升高再降低的趋势，预处理 15 d 时糖化率最高，比对照提高 13.2%。因此，在后续连续开放预处理研究中生物预处理的时间固定为 15 d。

进一步测定了 *P. ostreatus* BP 处理前后玉米秸秆中木质素和纤维素含量及其降解率，结果见图 2 和图 3。从中可以发现，*P. ostreatus* BP 的预处理效果与纤维素、木质素的含量及降解率有着紧密的关系。从图 2 可以看出，预处理过程中随着培养时间的延长纤维素含量基本维持不变，木质素含量 6 d 之后迅速下降，15 d 之后维持不变。图 3 表明纤维素的降解率随着培养时间的延长呈现缓慢上升状况，而木质素在前 15 d 被 *P. ostreatus* BP 迅速降解，15 d 之后降解

图2 *P. ostreatus* BP 预处理不同时间玉米秸秆中纤维素和木质素含量

缓慢。对比图 1 和图 4 可以发现，*P. ostreatus* BP 预处理的效果与木质素降解选择性存在对应关系，预处理 15 d 时木质素降解选择性系数最大，此时糖化率最高。因此，提高 *P. ostreatus* BP 的木质素降解选择性是增强预处理效果的有效手段。

图3 *P. ostreatus* BP 预处理不同时间玉米秸秆的纤维素和木质素降解率图4 *P. ostreatus* BP 预处理不同时间木质素降解选择性系数图5 *P. ostreatus* BP 开放预处理连续 5 批次的糖化率

2.3 *P. ostreatus* BP 连续开放预处理效果评价

图 5 显示了白腐菌 *P. ostreatus* BP 开放预处理玉米秸秆连续 5 批的酶解结果。从中可以看出，在 5 批连续过程中，随着批次增加糖化率逐渐下降，其中

前3批相对较稳定且显著高于对照,而第4批和第5批的糖化率降低较多,比对照稍高。

2.4 *P. ostreatus* BP 连续开放培养中杂菌生长状况

进一步对连续开放预处理不同批次中杂菌情况进行了评价,结果见表3。从中可以看出,随着连续批次增加,开放体系中杂菌数量显著增加,其中感染的霉菌主要是青霉、木霉、毛霉、曲霉。这可能是因为连续预处理过程中,加入未灭菌玉米秸秆粉生料及自来水时会带入一定量杂菌。开放体系下生长的这几类霉菌降解纤维素或半纤维素的能力都较强,目前常用这几类霉菌发酵获取纤维素酶或者木聚糖酶^[7]。因此,这些竞争性杂菌的数量增加一方面严重影响白腐菌 *P. ostreatus* BP 占据生态位,使其不能迅速萌发和生长;另一方面也会降解和利用纤维素造成可发酵底物流失。因此,连续开放预处理过程中杂菌数量是影响连续处理效果的关键因素,应在连续处理中采取措施抑制杂菌生长。

表3 *P. ostreatus* BP 连续开放培养中
杂菌计数表 (个/g 固体基质)

杂菌种类	第1批	第2批	第3批	第4批	第5批
细菌(含酵母)	1×10^5	2×10^5	5×10^5	4×10^6	2×10^7
霉菌	400	10^3	5×10^3	2×10^4	2×10^5

3 结 论

(1) 通过对14株白腐菌的萌发时间、生长速度、生长状况及开放体系下的综合评价筛选出菌株 *P. ostreatus* BP,且在开放体系下要使用固体秸秆接种。

(2) *P. ostreatus* BP 预处理后糖化率随着预处理时间的延长呈现先升高再降低的变化,预处理15 d

糖化效果最佳;进一步测定预处理过程中纤维素与木质素的含量、降解率及木质素降解选择性系数发现,木质素降解选择性与糖化效果存在一定的对应关系。

(3) *P. ostreatus* BP 可以实现连续开放预处理玉米秸秆,连续的前3批糖化效果保持较好,3批之后糖化率下降较快,接近于对照的糖化率。

(4) 开放体系中杂菌数量迅速上升是影响连续预处理效果的关键因素。

参 考 文 献

- 1 Kaar W E, Holtzapple M T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover [J]. Biomass and Bioenergy, 2000, 18: 189~199
- 2 Sun Y, Cheng J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1~11
- 3 Saha B C, Iten L B, Cotta M A, et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 3 693~3 700
- 4 Mosier N J, Manzanares P, Oliva J M, et al. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment [J]. Biomass and Bioenergy, 2003, 25: 301~308
- 5 Mosier N J, Wyman C E, Dale B E, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 673~686
- 6 Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 1 959~1 966
- 7 Hiromichi I, Masanori W, Yoichi H, et al. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 8 (5): 273~280
- 8 杜甫佑, 张晓昱, 王宏勋. 木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 46~48
- 9 胡奎娟, 吴克, 潘仁瑞, 等. 固态混合发酵提高木聚糖酶和纤维素酶活力的研究[J]. 菌物学报, 2007, 26(2): 273~278

Continuous Pretreatments of Corn Stalk with *Pleurotus ostreatus* BP under Non-sterile Condition

Xu Chunyan, Zhang Yijun, Yu Hongbo, Xu Yang, Zhang Xiaoyu

(College of Life Science and Technology, HUST, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT A continuous and non-sterile pretreatment system was constructed by screening for an anti-contaminated white-rot fungus and determining the saccharification rate of corn stalk after pretreatment with the fungus for different time length, and the stability of this system was farther evaluated. 5 strains were screened from 14 white-rot fungi by comparing the germination time and growth speed, and strain *Pleurotus ostreatus* BP was repeated screened for its ability of fast growth on corn stalk under non-sterile condition. Further study suggested that the saccharification rate was the highest after pretreatment with *P. ostreatus* BP for 15 days. Therefore, a continuous system of non-sterile pretreatment with *P. ostreatus* BP for 15 days was constructed and five batches of pretreatment were carried out. The pretreatment effect of the first three batches was stable and the saccharification rates were enhanced by more than 20% than that of the untreated corn stalk. However, the improvements of saccharification rates of the fourth and fifth pretreated batches was less noticeable, which could be caused mainly by the speeded increase of contaminated bacteria, yeast and molds under non-sterile condition.

Key words white-rot fungi, biological pretreatment, continuous and non-sterile system, corn stalk, fuel ethanol