

固态发酵中纤维素基质降解过程初步研究

周晓宏, 陈洪章, 李佐虎

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:利用斜卧青霉(*Penicillium decumbens* JUA10)对汽爆麦草和淀粉质的混合基质进行固态发酵,通过分析各种成份及酶活力变化,研究了各成份的降解速率,并探讨了纤维素、半纤维素降解与纤维素酶、半纤维素酶活力的关系.纤维素基质固态发酵中木质纤维素的降解过程实际是同步糖化发酵过程,还原糖不会积累形成对纤维素酶、半纤维素酶的反馈抑制;纤维素降解与纤维素酶的酶活性、半纤维素的降解与半纤维素的酶活性不成正比.木质纤维素的降解难主要是木质纤维素结构造成的.半纤维素的降解甚至比纤维素降解更慢,淀粉容易降解,木质素几乎不降解.

关键词:纤维素;半纤维素;纤维素酶;半纤维素酶;固态发酵

中图分类号:TQ920.1;TQ925

文献标识码:A

文章编号:1009-606X(2003)05-0447-06

1 前言

地球上每年都有几百亿吨木质纤维素类生物质产生,能够利用的只有十分之一左右,大部分在自然界降解了.利用丰富而廉价的纤维素类生物质将是人类解决未来粮食、能源和化工原料问题的途径之一,意义深远.固态发酵具有设备投资少、能耗低、单位体积反应密度高、三废排放少等优点^[1],特别适用于纤维素酶的发酵和纤维素的生物利用,有关这方面的研究报道已经很多,但多数侧重于纤维素酶的固态发酵和生物转化工艺条件研究^[2-5].由于木质纤维素的固态发酵培养基成份复杂,测定分析极其繁琐,工作量大,多数研究只集中在木质纤维素的三大成份和纤维素酶活力的变化上^[4-8],对固态发酵进行全面分析的并不多,对诸如半纤维素酶、可溶性糖、可溶性还原糖、可溶性糖的组成等很少有详细的报道.对纤维素固态发酵过程中各成份和酶活力进行全面分析,有助于分析各成份的变化与相应酶系变化的相互关系、半纤维素降解与纤维素降解的关系、可溶性糖的利用与纤维素的降解关系、单糖的利用与寡糖的利用的比较.通过分析,不仅对纤维素酶的固态发酵及纤维素的生物转化,而且对纤维素的生物降解具有理论和应用上的指导意义.事实上,绝大部分纤维素是在固体状态下被微生物降解的,所以,从固态发酵研究纤维素的降解具有代表性.汽爆麦草由于其木质素、半纤维素结构被部分破坏,所以其既保留了原木质纤维素的部分结构,又产生了微生物易于利用的半纤维素降解产物.通过对该降解产物利用的研究,能够更好地从纤维素结构上理解木质纤维素的降解.另外,为了比较纤维素降解与同为葡萄糖链构成的淀粉降解的差别,木质纤维素基质中同时加入了含有淀粉的麸皮.本文通过木质纤维素固态发酵过程研究,对纤维素降解的现象和机理进行了初步探讨,发现了一些新的现象,提供了一些新的见解.

2 材料与方法

2.1 菌种及培养基

菌种:斜卧青霉(*Penicillium decumbens* JUA10).汽爆小麦麦草(汽爆时间2001年4月)、未汽

爆小麦(*T. aestivum*)麦草(收割时间 2000 年 6 月)取自山东济南郊区. 汽爆条件:罐压 1.523 MPa, 维压时间 4.51 min. 斜面培养基: 10%麸皮浸出汁培养基. 固态发酵培养基(无机盐按干料质量比计): 汽爆麦草/麸皮(8/2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6%, KH_2PO_4 0.3%, 固液比为 1:2.5.

2.2 实验方法

斜面培养: 斜卧青霉接种至麸皮斜面培养基上, 30°C 培养 3 d.

斜面孢子液的制备: 吸取 5 ml 蒸馏水于斜面试管中, 接种环刮洗孢子, 孢子浓度 5.2×10^8 个/ml.

固态发酵: 250 ml 三角瓶中装入 10 g 固态产酶培养基(风干料, 含水 7.5%), 加水搅匀, 塞上棉塞; 用表压 101.3 kPa 的高压蒸汽灭菌 20 min; 接种 5 ml 斜面孢子悬浮液, 搅匀, 32°C 培养箱培养 7 d.

纤维素、半纤维素、木质素、淀粉、戊糖的测定见文献[9,10], 滤纸酶活(FPA)测定方法见文献[11], β -葡萄糖苷酶活测定方法见文献[12], 半纤维素酶活(或木聚糖酶活)测定方法见文献[13]. 酶活力的测定均在 50°C 和 pH 4.8 条件下进行. 还原糖测定见 DNS 法^[14]. 酶活单位: 产生 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 葡萄糖的酶量作为一个酶国际单位 IU.

斜卧青霉菌体中半纤维素的测定: 取察氏培养基^[15]25 ml 于 250 ml 三角瓶中, 于 30°C 下 150 r/min 摇瓶培养 48 h, 离心得菌体, 烘干测半纤维素含量.

固形物含量、干曲质量、含水量: 将样品在 100~105°C 烘干 4 h, 称重得干重^[16]; 干曲质量即发酵料的干重; 干重与物料烘干前质量之比即为固形物含量; 物料烘干前后质量之差即为含水量.

可溶性还原糖测定: 用热水浸提样品并用 DNS 法测定.

可溶性糖含量及组成: 用热水浸提样品, 用 2 mol/L HCl 水解、NaOH 中和、DNS 测还原糖.

可溶性糖的聚合度为可溶性糖含量除还原糖含量. 已糖含量为可溶性糖含量减戊糖含量.

可溶性糖含量、可溶性还原糖含量按发酵料中水的质量百分比计, 已糖含量按葡萄糖计, 戊糖含量按木糖计.

3 结果与讨论

3.1 原料分析

对用于固态发酵的汽爆麦草、麸皮的成份及未汽爆麦草进行了分析对照. 由表 1 可知小麦秸秆经过汽爆后, 主要是半纤维素发生了变化, 有 45.8%分解为可溶性糖, 24.3%仍为半纤维素, 32.3%则损失了. 而 DNS 法测汽爆麦草可溶性糖含量为 4.78%. 将汽爆麦草可溶性糖用 2 mol/L 盐酸水解, NaOH 中和, DNS 测得还原糖为 9.80%, 则可溶性糖的平均聚合度为 $9.80\%/4.78\%=2.05$. 而 DNS 法测得麸皮可溶性糖的含量为 1.05%. 经 2 mol/L 盐酸水解后, 用 DNS 法测得还原糖为 5.93%, 所以麸皮中可溶性糖的平均聚合度为 $5.93\%/1.05\%=5.65$, 其中木糖的含量用地衣酚法测定, 可溶性糖中戊糖含量为 37.6%.

表 1 各种原料的分析结果

Table 1 Composition of raw materials (%)

	Water	Cellulose	Hemicellulose	SRS ¹⁾	Soluble sugar	Lignin	Starch
Wheat straw	12.2	39.4	21.4	—	2.00	19.8	—
SEWS ²⁾	7.50	37.6	5.20	4.87	9.80	18.4	—
Wheat bran	10.5	10.7	22.3	1.05	6.15	—	12.0

Note: 1) SRS—soluble reducing sugar; 2) SEWS—steam exploded wheat straw.

3.2 纤维素固态发酵过程中各种酶活力的变化

由图 1 可见, 第 1 d 只产生很低的半纤维素酶, 在第 1 d 结束时酶活仅有 24.0 IU/g, 第 2 d 起

则开始大量产生半纤维素酶, 而且酶活一直在升高, 至第 7 d 时已达 1650 IU/g. 从底物的利用来看, 尽管可溶性糖、淀粉和半纤维素在第 1 和第 2 d 首先被利用, 仍然有纤维素酶(FPA)和 β -葡萄糖苷酶产生, 可能由于 *Penicillium decumbens* JUA10 是经诱变的抗阻遏突变株, 与产纤维素酶的野生菌株相比, 当存在易于利用的其它碳源时, 仍然有纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶产生. 纤维素酶在第 5 d 时酶活最高, 而 β -葡萄糖苷酶在培养第 7 d 时仍然在增加. 以分解纤维素最重要的滤纸酶活为主要指标, 发酵 5 d 为纤维素酶产酶的最佳时间, 此时酶的组成中 β -葡萄糖苷酶的酶活为滤纸酶活的 2 倍多, 半纤维素酶酶活则远远高于滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶活, 半纤维素酶活、滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶活分别为 1373, 19.9 和 42.9 IU/g.

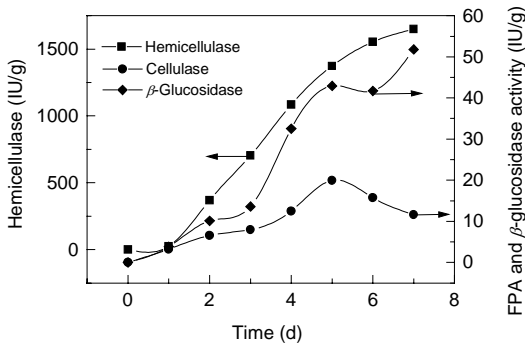


图 1 纤维素固态发酵过程中各种酶活力的变化
Fig.1 Enzyme activities in cellulosic solid state fermentation

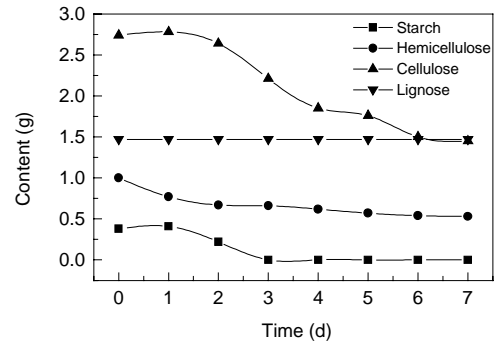


图 2 纤维素固态发酵过程中各主要成份的变化
Fig.2 Change of composition in cellulosic solid state fermentation

3.3 纤维素固态发酵过程中各成份的变化

10 g 培养基接种斜卧青霉, 发酵 7 d, 各成份变化曲线如图 2. 在纤维素酶的发酵过程中, 培养基各主要成份的变化速率不同. 淀粉降解速度很快, 第 3 d 就可降解完全; 半纤维素在 2 d 内降解较快, 2 d 后则降解缓慢, 此时培养基中仍有约 0.67 g 半纤维素未降解, 降解的仅有 33%. 一般认为, 半纤维素较之纤维素很容易降解, 但这种情况仅出现在半纤维素酶作用于提取的半纤维素, 当半纤维素存在于完整的木质纤维素结构中, 则很难降解. 大量文献资料表明, 半纤维素的降解是很慢的, 且很难降解完全^[3-7]. 图 1 表明, 在第 2 d 结束时半纤维素酶酶活已达 37 IU/g, 而从图 6 可知, 发酵基质中可溶性糖中戊糖(主要为木糖)的含量总共也不超过 0.54%(按基质中水份计), 其中一部分还以寡糖的形式存在, 这些戊糖及其寡糖应当不会对半纤维素酶形成很强的抑制作用, 因为第 1 和第 2 d 时培养基中半纤维素的含量更高, 戊糖及寡糖浓度也更高, 半纤维素酶活更低, 但半纤维素的分解却很快, 所以, 后期半纤维素降解缓慢很难解释为半纤维素酶受到可溶性糖的反馈抑制或半纤维素酶酶活低.

以察氏培养基培养斜卧青霉, 摇瓶培养 2 d 后, 测定菌体中的半纤维素含量, 发现菌体中含有半纤维素, 但含量仅为 10%, 即使假设将消耗的可溶性糖、半纤维素、淀粉、纤维素全部转化为菌体, 菌体中半纤维素也不会超过 0.4 g, 说明培养基中还有部分半纤维素没有降解. 所以推测由于纤维素高度紧密的结构, 半纤维素难与半纤维素酶接触, 因而降解缓慢. 第 1, 2 d 可及性高的半纤维素首先降解, 即使半纤维素酶酶活很低, 半纤维素的降解还是很快的, 说明木质纤维素结构对半纤维素降解的影响是很大的. 纤维素在第 1, 2 d 几乎未降解, 第 3, 4 d 降解较快, 第 5 d 以后降解减慢, 至第 7 d, 仍然有 50%的纤维素未降解. 同样, 纤维素酶酶活力低和纤维素的降解产

物纤维二糖和葡萄糖对纤维素的酶的反馈抑制也不是纤维素降解慢的主要原因,纤维素的降解也与木质纤维素的结构密切相关.图2似乎表明,半纤维素比纤维素更难降解,但由于斜卧青霉中会形成半纤维素,可能半纤维素的降解与形成达到平衡,作这样的结论就不恰当了.作者倾向于认为,纤维素与半纤维素一样难降解,这一结论在其它文献中得到体现^[4-8],至今尚未有人提出这样的解释.木质素在此过程中则不降解.

3.4 纤维素固态发酵过程中的水含量的变化

从图3可知,水份第1d下降,第2~4d则明显上升,第5d天以后则又缓慢下降.显然第1d由于干物质含量几乎无变化,失去的主要是水,所以含水量下降.第2~4d,由于淀粉、半纤维素和纤维素酶解为糖,并最终分解产生大量的CO₂和H₂O,一方面总固形物在减少,另一方面水又在产生,所以尽管培养基中的水在蒸发,但水含量仍然在增加.第4d后微生物开始进入衰亡期,底物的分解速度减慢,固形物的降低速度减慢,产生的水不如蒸发的多,所以水含量开始下降.

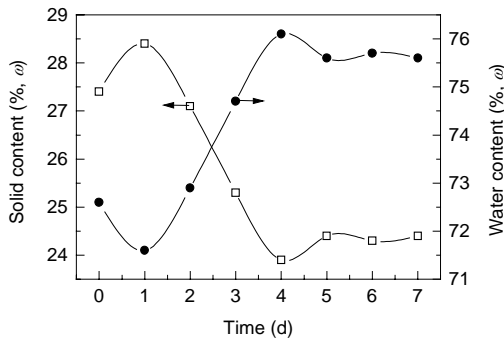


图3 纤维素固态发酵过程中水份的变化

Fig.3 Water content in cellulosic solid state fermentation

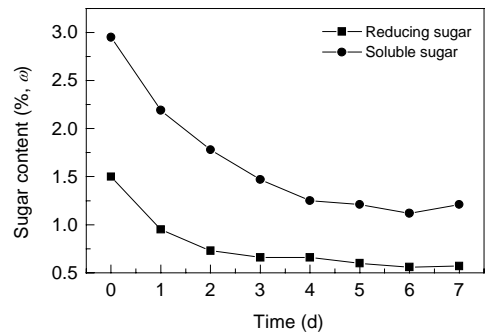


图4 还原糖和可溶性糖的含量变化

Fig.4 Soluble reducing sugar and soluble sugar contents

3.5 纤维素固态发酵过程中还原糖和可溶性糖的变化

纤维素固态降解过程中还原糖和可溶性糖的变化是研究纤维素及半纤维素降解的重要方面,可以反映纤维素与半纤维素的酶解、酶解产物对纤维素酶与半纤维素酶的反馈抑制以及酶解产物的分布.如图4所示,汽爆麦草中半纤维素分解产物可溶性寡糖和单糖以及麸皮中的可溶性糖,形成了最初培养基中可溶性糖和还原糖,按照单位水份可溶性糖和还原糖计,分别为2.95%和1.5%,2d后,还原糖降低至0.73%,并基本稳定,而可溶性糖的含量在4d后方才稳定.由图5可知,可溶性糖的聚合度在第1,2d上升,第3,4d下降,以后的平均聚合度为2左右,这说明原来培养基中的可溶性单糖首先被利用,然后可溶性寡糖才被利用,4d之内,培养基中的可溶性糖利用完毕,预示着半纤维素的汽爆产物—可溶性糖比未汽爆的天然半纤维素容易降解得多.至第4d,底物的分解和分解产物的利用达到平衡.实际上纤维素的降解过程本身就是同步糖化发酵过程,纤维素、半纤维素在酶解为糖的同时,糖又被微生物吸收利用,所以没有高浓度的糖积累,因而不会形成对纤维素酶、半纤维素酶的反馈抑制.

3.6 纤维素固态发酵过程中戊糖和葡萄糖的变化

将培养基中可溶性糖进行水解,再测定葡萄糖和戊糖,结果表明(图6),纤维素固态发酵起始阶段,由于汽爆麦草中可溶性糖含有较多的可溶性戊糖和五碳糖寡糖,可溶性糖中戊糖比例较高,以后戊糖比例逐渐减少,并接近稳定值.

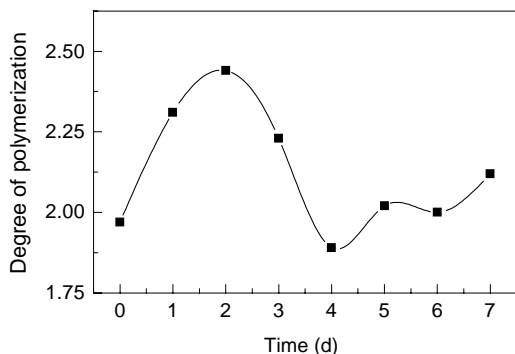


图 5 可溶性糖聚合度变化

Fig.5 Polymerization degree of soluble sugar

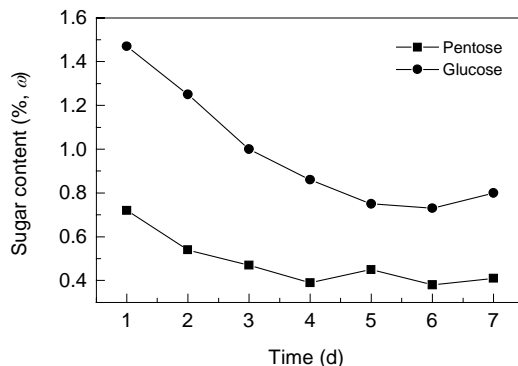


图 6 可溶性糖中葡萄糖和戊糖的组成变化

Fig.6 Glucose and pentose in soluble sugar

4 结论

(1) 在纤维素基质的固态发酵中,木质纤维素的降解过程实际上是同步糖化发酵过程,产生的还原糖很快被降解纤维素的微生物吸收利用,因而还原糖不会积累形成对纤维素酶、半纤维素酶的反馈抑制;纤维素、半纤维素的降解与纤维素酶、半纤维素酶的酶活力不成正比,发酵前期,酶活力低而降解快,发酵后期,酶活力高而降解慢.因此终产物的反馈抑制及酶活力低不是纤维素降解的主要原因,木质纤维素的紧密而复杂的结构才是纤维素降解的主要原因.

(2) 在纤维素混合基质的固态发酵中,半纤维素的降解甚至比纤维素的降解还慢,纤维素降解菌本身也能形成半纤维素,淀粉容易降解,木质素几乎不降解.

(3) 汽爆后半纤维素的降解产物可溶性糖比天然半纤维素容易降解.可溶性糖中,单糖更易被利用,而寡糖的利用则要慢一些.

参考文献:

- [1] Cen P L, Xia L M. Production of Cellulase by Solid-state Fermentation [J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1999, 65: 68-92.
- [2] Ghahal D S. Solid-state Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production [J]. Appl. Envir. Microbiol., 1985, 39(2): 194-196.
- [3] Tsao G T. Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics [M]. Heidelberg, New York, Berlin: Springer, 1999. 68-92.
- [4] Karunanandaa K, Fales S L, Varga G A, et al. Chemical Composition and Biodegradability of Crop Residues Colonized by White-rot Fungi [J]. J. Sci. Food Agric., 1992, 60: 105-112.
- [5] Singh K, Rai S N, Flegel T W, et al. Solid Substrate Fermentation of Ground and Un-ground Wheat Straw with *Pleurotus ostreatus* [J]. Ind. J. Anim. Sci., 1990, 60 (10): 1230-1234.
- [6] Han Y W, Lee J S, Anderson A W. Chemical Composition and Digestibility of Ryegrass Straw [J]. J. Agric. Food Chem., 1975, 23 (5): 928-931.
- [7] 贾新成, 李喜梅, 李磊, 等. 紫孢侧耳栽培期基质中纤维素类的降解和有关酶活变化 [J]. 微生物通报, 1994, 21(3): 148-152.
- [8] Moyson E, Verachttert H. Growth of Higher Fungi on Wheat Straw and Their Impact on the Digestibility of the Substrate [J]. Appl. Microbiol. & Biotechnol., 1991, 36: 421-424.
- [9] 波钦诺克 X H. 植物生物化学分析方法 [M]. 荆家海, 丁钟荣, 译. 北京: 科学出版社, 1981. 158-181.
- [10] Van Soest P J. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds — II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin [J]. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1963, 46: 829-835.
- [11] Mandels M, Sterberg D. Recent advances in Cellulose Technology [J]. J. Ferment. Technol., 1976, 54: 267-272.
- [12] Kubicek C P. β -glucosidase Excretion by *Trichoderma pseudokoningii* Correlation with Cell Wall Bound β -1,3-Glucanase Activities [J]. Arch. Microbiol., 1982, 132: 349-354.

- [13] Tan L U L, Yu E K C, Louis-Seize G W, et al. Inexpensive, Rapid Procedure for Bulk Purification of Cellulose-free β -1,4-D-Xylanase for High Specific Activity [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, 30: 96–106.
- [14] Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar [J]. *Anal. Chem.*, 1959, 31: 426–428.
- [15] 诸葛健, 王正祥. 微生物学实验手册 [M]. 北京: 轻工出版社, 1997. 110.
- [16] 天津轻工学院, 大连轻工学院, 无锡轻工学院, 等. 工业发酵分析 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1979. 3.

Experimental Observation on Cellulosic Biodegradation in Solid State Fermentation

ZHOU Xiao-hong, CHEN Hong-zhang, LI Zuo-huo

(*State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Proc. Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: A mixed medium of steam exploded wheat straw (SEWS) and wheat bran was fermented in solid state by *Penicillium decumbens* JUA10. Various degraded constituents and activities of enzymes were analyzed. The process of biodegradation of cellulose is actually simultaneous saccharification and fermentation, and feedback inhibition of reducing sugar on cellulose or hemicelluloses may not heavily occur. Biodegradation of cellulose, hemicellulose was not proportional to activities of cellulase and hemicellulase. The compact structure of lignocellulose was the major cause for the low degradation rate of cellulose and hemicellulose. Hemicellulose was degraded even more slowly than cellulose. Starch was degraded easily while lignin was not degraded.

Key words: cellulose; hemicellulose; cellulase; hemicellulase; solid state fermentation (SSF)