

白腐菌预处理木屑产漆酶条件的优化及其糖化评价

罗少华 程金花 龚大春

(三峡大学化学与生命科学学院,湖北 宜昌 443002)

摘要: 对白腐菌固态发酵预处理木屑的工艺条件进行了优化,并对经过白腐菌预处理木屑的糖化效果进行了评价。结果表明,白腐菌固态发酵产漆酶的工艺条件为:1 kg 木屑中需添加麦麸 120 g,氮源石炭酸铵 60 g,料水比 0.28,微量元素的用量为 7 mL/L,培养时间为 3 d,白腐菌产漆酶的酶活最高。在最佳工艺条件下,经白腐菌生物预处理的木屑的糖化率可以提高 1 倍,生物预处理木屑具有一定的应用前景。

关键词: 微生物; 白腐菌; 漆酶; 优化; 预处理; 糖化

中图分类号:Q93-3;Q936

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)10-0017-04

Optimization of Laccase-producing Conditions of Wood Chips Pretreated by White-rot fungi and Evaluation of Its Saccharification

LUO Shaohua, CHENG Jinhua and GONG Dachun

(College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: The technical conditions of wood chips pretreated by white-rot fungi solid fermentation had been optimized as follows: 120g wheat bran added in per kg wood chips as carbon source and 60 g tartaric acid ammonium added as nitrogen source, the ratio of raw materials and water was 0.28, the use level of trace elements was 7 ml/L, and culture time was 3 d. Besides, the saccharifying effects of wood chips were evaluated. Under the above conditions, the activity of the produced laccase was the highest and the saccharifying rate of wood chips increased by one time. Accordingly, wood chips pretreated by biological measures had bright application prospects.

Key words: microbe; white-rot fungi; laccase; optimization; pretreatment; saccharification

随着能源危机、粮食危机和环境污染问题日益突出,全球能源的发展正步入一个崭新的阶段,全球能源结构正经历以黑色能源为主向可再生能源为主的转变^[1]。生物燃料乙醇作为石油的替代品和可再生能源,在解决阶段性和结构性粮食深加工转化,稳定粮价和农民收入,减少环境污染,保持生态平衡等诸多方面问题上具有重要的战略意义。但是依靠陈化粮生产燃料乙醇已经远远不能满足现代能源的需求,因此,开发以木质纤维素为原料的第二代燃料乙醇是可持续发展的大势所趋^[2]。

由于自然界丰富的可再生木质纤维素资源的结构较为复杂,导致在利用过程中比淀粉质的所用酶成本要高。研究表明,木质素的存在阻碍了纤维素对酶的可及性,致使木质纤维素类生物资源难以水解。木质素的预处理过程是利用木质纤维素原料生产燃料乙醇的关键限制性步骤之一。目前,木质素原料预处理的方法主要有物理法、化学法和生物法等。物理法和化学法的缺点是能耗大、成本高或者污染很严重。相比较而言,生物预处理的优点是

能耗低,所需环境条件温和,但是水解率相对较低^[3]。

本试验利用白腐菌对木屑进行预处理,然后再将经过预处理的木屑进行糖化,期望能得到有效处理木质纤维素的方法,为酵母产乙醇提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大白栓(*Trametes lactinea* (Berk) Pat):三峡大学艾伦麦克德尔米德再生能源研究所保藏。

木屑(宜昌周边),麦麸(市场采购),稻草秸秆(宜昌周边),蒸汽爆破秸秆(安琪公司),商品纤维素酶。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养基及特殊营养物质

1.2.1.1 斜面培养基

马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 1 g,水 100 mL。

基金项目:湖北省教育厅重点项目(CXY2009B008),国家自然科学基金项目(21076114)。

收稿日期:2011-07-25

作者简介:罗少华(1967-),男,讲师,目前主要从事生物工程教学与研究工作。

1.2.1.2 种子培养基

玉米粉 5 g, 葡萄糖 3 g, 磷酸二氢钾 0.1 g, 七水硫酸镁 0.075 g, V_{B1} 0.1 mg, 水 100 mL。

1.2.1.3 白腐菌发酵营养液

酒石酸铵水溶液 2 mmol/L, Tween 80 0.1 % (v/v), 磷酸二氢钾 2 g/L, 七水硫酸镁 3 g/L, 二水氯化钙 0.1 g/L, 氯化钠 1 g/L, 微量元素, 其余为无菌水。

1.2.1.4 白腐菌发酵用微量元素

七水硫酸亚铁 0.1 g/L, 氯化钴 0.1 g/L, 七水硫酸锌 0.1 g/L, 五水硫酸铜 0.01 g/L, 一水硫酸锰 0.1 g/L, V_{B1} 1 mg/L。

1.2.1.5 固体培养基

1 kg 木屑加碳源 100 g, 氮源 20 g, 适量营养液, 微量元素溶液。

1.2.2 漆酶酶活测定

1.2.2.1 漆酶酶活定义

酶的活力定义为: 在室温, pH4.5 条件下 1 min 内反应的酶液在 420 nm 波长下吸光值的增加量, 每增加 0.01 为 1 个酶活单位^[4]。

1.2.2.2 漆酶酶活测定方法

Lac 活力测定, 苯二胺 ($\lambda_{\max}=495$ nm)、愈创木酚 ($\lambda_{\max}=485$ nm)、邻苯二酚 ($\lambda_{\max}=400$ nm) 和漆酚 ($\lambda_{\max}=420$ nm) 都曾用作漆酶活力测定的底物。以 ABTS 为底物, 测定漆酶酶活是目前国外最为常见的方法之一。

漆酶酶活力, 按下式计算:

$$X1 = A1 \times 3.5 \times 10 / 3 / 0.01$$

式中: $X1$ ——漆酶酶活, U/g;

$A1$ ——3 支样品管中样液的吸光度在 3 min 内的变化的平均值;

3.5——酶液最终的稀释倍数;

3——时间换算成每 min, min^{-1} ;

10——将液体残糖换算为固体残糖的系数 (洗涤酶液时, 缓冲液与固体培养基干重之比), mL/g;

0.01——换算成每增长 0.01 为 1 个酶活单位。

1.3 5 种单因子实验固体培养基配方及正交试验设计

1.3.1 不同碳源种类对产酶的影响

在基本培养基的基础上, 分别选用稻草粉、麸皮、秸秆和爆破秸秆作为碳源, 用量均为 100 g/kg 木屑, 进行试验, 测定漆酶酶活, 研究不同碳源种类对产酶的影响。

1.3.2 不同氮源种类对产酶的影响

以麸皮为碳源, 分别选用蛋白胨、酒石酸铵、酵母抽提物和硫酸铵为氮源, 总氮用量为 20 g/kg 木屑, 进行试验, 研究不同氮源种类对产酶的影响。

1.3.3 料水比对产酶的影响

以 0.5、0.4、0.33、0.25、0.15 5 种不同料水比进行试验, 测定酶活, 研究不同料水比对产酶的影响。

1.3.4 微量元素用量对产酶的影响

分别改变微量元素的用量为 7 mL/L、14 mL/L、21 mL/L、28 mL/L, 进行试验, 测定漆酶酶活, 研究微量元素的用量对产酶的影响。

1.3.5 培养时间对产酶的影响

分别以不同的培养时间 2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d 进行白腐菌处理, 测定酶活, 研究不同培养时间对产酶的影响。

1.3.6 正交实验优化白腐菌产酶条件

在上述单因素实验基础上, 以麸皮、氮源、酒石酸铵微量元素和料水比进行 4 因素 3 水平正交实验。正交表见表 1, 以酶活为指标, 优化白腐菌产酶条件。

表 1 白腐菌处理木屑的 4 因素 3 水平实验设计表

水平	因素			
	A 麸皮 (g/kg 木屑)	B 氮源 (g/kg 木屑)	C 微量元素 混合液 (mL/L)	D 料水比
1	80	20	7	1 : 2.5
2	120	40	14	1 : 3
3	140	60	21	1 : 3.5

1.4 糖化实验评价白腐菌预处理木屑的效果

糖化过程按参考文献^[5]进行, 在 50 °C, pH4.8 条件下, 1000 g 木屑, 加入 45 U/g 纤维素, 64 U/g 纤维素的黑曲霉酶液, 加入一定量缓冲液, 分别对木屑进行未处理, 白腐菌处理 3 d、6 d、9 d 和爆破预处理 5 个样品进行糖化实验, 采用 DNS 还原糖测定方法, 进行测定, 计算糖化率。

2 结果与讨论

2.1 碳源种类对产酶的影响

以不同碳源种类对产酶结果的影响进行分析, 结果见图 1。

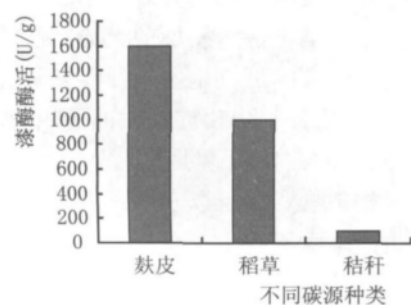


图 1 不同碳源对白腐菌产漆酶的影响

由图 1 可知, 当其他条件一定, 在木屑中添加的碳源为麸皮时, 白腐菌产漆酶酶活最高, 最高酶活为 1516.67 U/g。推测原因主要有二: 其一, 麸皮富含多糖、蛋

白质、维生素和矿物质等,营养物质要比稻草秸秆丰富,有利于白腐菌的生长;其二,有报道指出,麸皮中含有一种称为“阿魏酸”的成分,这是一种天然的漆酶诱导物,可高效地诱导白腐菌产生漆酶,而稻草和秸秆基质中的组成成分可能对白腐菌的漆酶诱导作用较小。所以,以麸皮为碳源时的酶活高于以稻草和秸秆为碳源时的酶活。

2.2 氮源种类对产酶的影响

以不同氮源种类对产酶结果的影响进行分析,结果见图2。

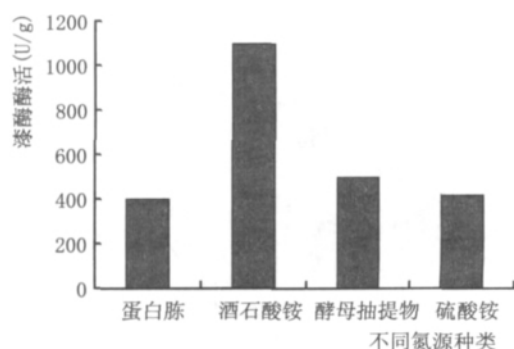


图2 不同氮源对白腐菌产酶的影响

由图2可知,当其他条件一定,固态发酵3 d时,以酒石酸铵为氮源时白腐菌所产漆酶酶活最高。因此,确定酒石酸铵是最佳氮源。结果表明,无氧阴离子铵盐对漆酶产生有较好的作用。

2.3 不同料水比对产酶的影响

以不同料水比对产酶结果的影响进行分析,结果见图3。

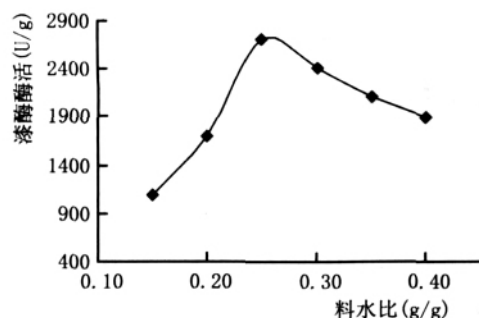


图3 料水比对白腐菌产漆酶酶活的影响

由图3可知,其他条件一定时,当固体与营养液的比例为7:25时,漆酶的酶活最高。白腐菌的生长对水分的要求比较高,高的水分环境更有益于它的生长,但过高的水分也不能满足白腐菌生长和产酶对氧的需求。

2.4 微量元素用量对产酶的影响

以不同微量元素用量对产酶结果的影响进行分析,结果见图4。

由图4可以看出,当微量元素的浓度为14 mL/L时,漆酶酶活的最高值为2790 U/g。推测原因可能是,较低浓

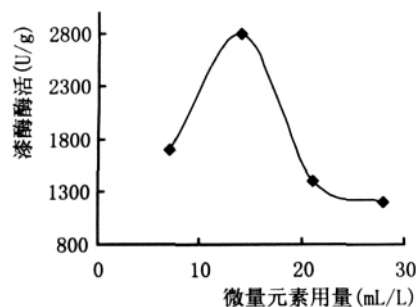


图4 微量元素用量对漆酶酶活的影响

度的微量元素可以促进产酶,并且在一定范围内,随着微量元素浓度的增加,漆酶酶活也相应增加;而当微量元素的浓度过高时,对白腐菌的代谢产生一定毒性,因此会抑制漆酶的产生及其酶活。

2.5 培养时间对产酶的影响

以不同培养时间对产酶结果的影响进行分析,结果见图5。

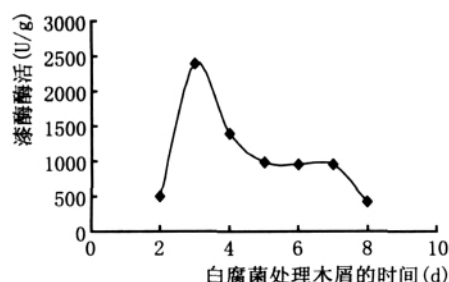


图5 不同的培养时间漆酶酶活

从图5可以看出,漆酶的产酶高峰在第3天,到后期酶活降低。因此,可以选择第3天进行后续的处理。

2.6 正交试验考察不同因素对白腐菌产酶的影响

在上述单因素实验基础上,按照1.3.6,正交实验因素见表1,结果见表2。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

因素	A(碳源)	B	C	D	漆酶酶活 (U/g)
实验1	1	1	1	1	843
实验2	1	2	2	2	1493
实验3	1	3	3	3	2727
实验4	2	1	2	3	2768
实验5	2	2	3	1	1557
实验6	2	3	1	2	3256
实验7	3	1	3	2	543
实验8	3	2	1	3	821
实验9	3	3	2	1	728
均值1	1687.67	1384.67	1640.0	1042.67	
均值2	2527.0	1290.33	1663.0	1764.00	
均值3	697.30	2237.00	1609.00	2105.33	
极差	1829.7	946.67	54.0	1062.67	
最佳组合	A2	B3	C2	D3	

由表2结果分析可知,各因素对产酶影响的强弱

依次为 $A > D > B > C$, 其中碳源的种类为最主要的影响因素。正交分析的最佳组合为 $A_2B_3C_2D_3$ 。通过方差分析, 麸皮、微量元素用量和料水比均为显著因素。最佳条件是, 在 1 kg 木屑中添加麸皮 120 g, 酒石酸铵 60 g, 微量元素混合液浓度为 7 mL/L, 料水比为 1:3.5, 可获得最大漆酶酶活 3425 U/g。

2.7 白腐菌预处理效果评价

按照 2.4 糖化实验的方法, 测糖化率, 结果见图 6。

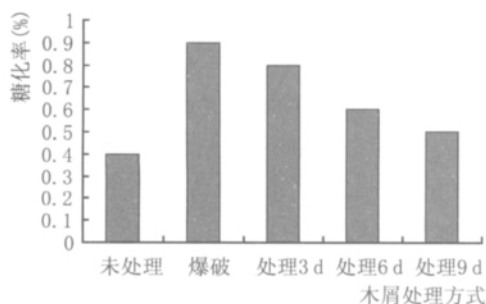


图 6 白腐菌处理木屑的效果评价

由图 6 可知, 白腐菌预处理 3 d 的木屑糖化效果较好, 可达 80 %, 但与爆破料的糖化率(90 %)相比还有一定差距。经过白腐菌预处理之后的原料的糖化率普遍高于未经预处理的原料。原因是白腐菌的预处理降解了原料中的木质素^[6], 进而促进了纤维素酶对原料的降解, 所以糖化效果会更好, 糖化率更高。蒸汽爆破过程中, 高压热蒸汽进入纤维原料中, 并渗入纤维内部的空隙, 纤维聚合度下降, 在高压蒸汽释放时, 已渗入纤维内部热蒸汽分

子以气流的方式从较封闭的孔隙中高速瞬间释放出来, 纤维内部及周围热蒸汽的高速瞬间流动, 使纤维发生一定程度上的机械断裂。

3 结论

通过一序列试验对白腐菌产漆酶的条件进行了研究, 通过单因素试验和正交试验得出, 比较适合大白栓固态发酵产漆酶的工艺条件: 1 kg 木屑中需添加麦麸 120 g, 氮酒石酸铵 60 g, 料水比 0.28, 微量元素的用量为 7 mL/L, 培养时间为 3 d 时, 白腐菌产漆酶的酶活最高。在最佳工艺条件下, 用白腐菌进行生物预处理木屑可以大幅度提高木屑的糖化率, 但比爆破料的糖化效果稍差。如何提高白腐菌生物预处理效率还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙智谋, 周旭, 刘丽萍. 粮食危机与生物质能的发展动态[J]. 酿酒科技, 2009(1): 102-104.
- [2] 李志军. 生物燃料乙醇发展现状、问题与政策建议[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(7): 139-142.
- [3] 王联结, 陈建华, 等. 木质纤维原料预处理技术的研究现状[J]. 新能源产业, 2007(2): 46-51.
- [4] 魏华丽, 石淑兰, 裴继诚, 等. 漆酶处理木素功能基变化及其光谱分析[J]. 中国造纸学报, 2003, 18(2): 56-59.
- [5] 汤金婷, 董玲玲, 李志军, 曾晶, 龚大春. 木质纤维素酶解糖化发酵研究[J]. 酿酒科技, 2009(3): 125-128.
- [6] 董玲玲, 汤金婷, 李德莹, 曾晶, 田毅红, 龚大春. 半纤维素和木质素的去除对纤维素糖化过程的影响[J]. 农产品加工: 学刊, 2009(4): 31-34.

第三届中国酒类品牌价值评议揭晓

本刊讯 据《华夏酒报》报道 2011 年 9 月 16 日, 由中国酒类流通协会和中华品牌战略研究院联合举办的“华樽杯”第三届中国酒类品牌价值评议在北京举行, 揭晓了酒类品牌价值 200 强企业名单和新中国白酒八大品牌。

品牌价值评议组委会秘书长陈刚告诉记者, 新的白酒八大品牌分别为: 茅台、五粮液、洋河、泸州老窖、郎酒、西凤、稻花香和古井贡, 品牌价值分别为 595.28 亿元、584.03 亿元、210.89 亿元、152.06 亿元、142.82 亿元、141.48 亿元、140.71 亿元、140.68 亿元。新八大品牌的名单与 1963 年第二届全国评酒会的八大白酒相比, 洋河、郎酒和稻花香是新入榜品牌, 38% 的变化率显示了中国白酒市场的新动向。

据介绍, 第三届中国酒类品牌价值评议, 采用了中华品牌战略研究院独创的全面因素测算法, 从经济指标、品牌实力和品牌状况三个方面进行评测, 让消费者、投资者了解中国主流酒类品牌的特点和发展进程。会议期间, 还向茅台集团董事长季克良等企业家和企业颁发了“2011 年度华樽杯十大品牌建设功勋企业家”、“2011 年度华樽杯中国酒类品牌价值第一名”、“2011 年度华樽杯中国酒类十大最具全球竞争力品牌”、“2011 年度华樽杯中国酒类富国强军十大突出贡献品牌”等奖项, 并同时揭晓了从中国 3 万多家酒类生产和流通企业中评测出的品牌价值 200 强, 并分白酒、啤酒、葡萄酒、保健酒、黄酒、流通等六大类, 分别公布了品牌价值。六大类别的品牌价值第一名分别为: 茅台, 品牌价值 595.28 亿元; 青岛, 品牌价值 344.47 亿元; 中粮长城, 品牌价值 96.68 亿元; 海南椰岛, 品牌价值 55.91 亿元; 古越龙山, 品牌价值 50.06 亿元; 朝批, 品牌价值 37.95 亿元。(衣大鹏 文 小小荐)

来源: 华夏酒报 2011-9-19