

科研与开发

应用纤维素分解菌降解香蕉杆生成可发酵糖的研究

蔡燕飞¹, 赵肃清^{2,3}, 何成新², 蔡爱华², 韦记青², 黄秀明¹

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642; 2. 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006;
3. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用纤维素分解菌对香蕉杆进行快速降解并转化可发酵糖研究, 对影响纤维素水解效率的各因素进行了探讨, 结果表明最优的水解糖化条件为香蕉杆与麸皮按 6:2 的质量比添加, 1.4% 质量分数的 KNO_3 为氮源, 料水质量比 1:3, 起始培养基 pH 值 5, 培养时间 96 h, 以 0.05% 质量分数的吐温-20 为添加剂, 每克干料中微量元素添加量为 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.98 μg 、浓盐酸 1 μL 、 ZnSO_4 0.98 μg 和 FeCl_3 2.67 μg , 每天翻动一次堆料。香蕉杆水解后葡萄糖产率达 19%, 相当于香蕉杆中约 42% 的纤维素水解并转化成葡萄糖。

关键词: 纤维素分解菌; 香蕉杆; 葡萄糖

中图分类号: TQ223.122; TQ352

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2005)09-0034-03

Studies on conversion of banana plant stalk into sugar by cellulose decomposing mixing strains

CAI Yan-fei¹, ZHAO Su-qing^{2,3}, HE Cheng-xin², CAI Ai-hua², WEI Ji-qing², HUANG Xiu-ming¹

(1. College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China;

3. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006 China)

Abstract: The fast conversion of banana plant stalk into sugar, and the cultivating factors influencing on the cellulose hydrolysis by decomposing mixing strains were studied. The results show an optimal operational conditions as follows: 6:2 of the mass ratio of banana stalk to bran, 1.4% of the mass ratio of KNO_3 as nitrogen source, 1:3 of the mass ratio of solid material to water, 5 of pH value, 0.05% of Tween-20 mass concentration, and fermenting for 96 h and shaking once every day; with 0.98 μg of $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 μL of concentrated muriatic acid, 0.98 μg of ZnSO_4 and 2.67 μg of FeCl_3 in every gram sample. The banana stalk can produce glucose by a yield of 19%, which equals 42% of cellulose in the banana stalk hydrolyzed.

Key words: cellulose decomposing microorganism; banana stalk; glucose

木质纤维素是工农业废弃物中主要的可再生生物资源, 其中纤维素占植物总干质量的 30% ~ 50%, 木质素占植物总干质量的 25% 左右。随着地球上不可再生资源日益消耗, 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日益成为当前研究的热点^[1-2]。天然木质纤维素结构和成分高度复杂、难降解, 目前较成熟的技术是采用稀酸水解等化学方法, 但这些方法需要高温高压, 能耗大、副产物多、环境污染大等, 采用酶法降解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之一, 其中筛选高效功能菌株, 将纤维素类废弃物降解成为

可发酵糖是木质纤维素类废弃物进行有效利用的前提^[3]。

对稻草和玉米秸秆等废弃物降解已有大量的研究报道, 如利用其作碳源固体发酵生产纤维素酶已得到普遍应用^[4], 但香蕉杆快速降解资源化利用尚未报道。在南方香蕉产区, 每年香蕉植株茎叶废弃物产量巨大, 含有大量的纤维素, 绝大部分被焚烧或遗弃田边。笔者在分离筛选得到一组分解纤维能力较强的菌株基础上, 对香蕉杆快速降解转化可发酵糖进行了初步探讨, 并对其水解糖化条件进行研究。

收稿日期: 2005-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400274)

作者简介: 蔡燕飞(1970-), 女, 博士, 助理研究员, 从事固体废弃物生物降解研究, yanfeicai@scau.edu.cn; 赵肃清(1969-), 男, 博士, 研究员, 主要从事天然产物化学的研究, suqingz@hotmail.com。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

采用以滤纸或香蕉杆为碳源的培养基,从堆肥、污泥、朽木等自然界中筛选、富集和分离纯化得到3个具有分解纤维素功能的菌株,利用16 SrDNA序列测定鉴定菌株,结果表明这些菌株分别是克雷伯氏菌属菌(*Klebsiella* sp.)、假单胞菌属菌(*Pseudomonas* sp.)和嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.),它们的GenBank登录号分别是DQ103760、DQ103762、DQ103763。在此基础上将3个菌株按一定比例混合,构建微生物复合菌群。

培养基为马铃薯琼脂培养基(去皮马铃薯200g,蔗糖20g,琼脂16g,水1000mL,自然pH值)和发酵培养基(香蕉杆粉、麸皮、矿质养分和添加剂以一定的比例配合)。

香蕉杆采集于华南农业大学校园内,50℃烘干,切细,粉碎过40目筛,其纤维素含量为49%,麸皮的纤维素含量为18%。

1.2 实验方法

培养条件:斜面培养在30℃下培养72h后,于4℃保存;发酵培养在150mL三角瓶中装入8g培养基,30℃下培养。

称取1g成熟的固体曲,加乙酸/乙酸钠缓冲溶液20mL,在摇床摇动10min后,上层清液直接用于测定。根据3,5-二硝基水杨酸显色反应方法测定葡萄糖生成量^[5]。

2 结果与分析

2.1 香蕉杆与麸皮比例对香蕉杆水解效果的影响

表1 香蕉杆/麸皮比例对葡萄糖产量的影响

香蕉杆与麸皮的质量比	6:2	4:4	2:6	0:8
葡萄糖产量/mg·g ⁻¹	109.52 ± 1.08(a)	18.88 ± 1.40(b)	15.93 ± 0.67(bc)	14.82 ± 0.55(c)

注:表中数据为4次重复实验的平均值及标准误差。括号内具有相同字母者为经DMRT法分析在0.05水平差异不显著,后表相同。

以香蕉杆和麸皮为复合碳源时,比较香蕉杆与麸皮比例对纤维素水解的影响(见表1)。结果表明,在实验范围内,香蕉杆与麸皮质量比分别为4:4、

2:6、0:8时,葡萄糖的产量都在较低水平,而质量比为6:2时,能显著提高纤维素降解效果,使葡萄糖显著增产,说明复合碳源的组合方式对整个发酵过程有显著影响,其中最适的香蕉杆与麸皮碳源质量比为6:2。

2.2 料水比对香蕉杆水解效果的影响

在固体发酵中,料水比要适当,水多会使料粘结,不利于通气;水少则对微生物的可给性降低,甚至使细胞脱水,造成生理干燥,引起质壁分离,细胞停止生命活动,不利于菌体的生长及固料发酵。因此确定培养基的含水量是首要解决的问题。在以香蕉杆与麸皮质量比6:2,添加适量营养盐的条件下,分别按1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:3.5的质量比加水进行实验。结果表明,料水比以1:3.0为宜(见表2)。

表2 料水比对葡萄糖产量的影响

料水比	1:1.5	1:2.0	1:2.5	1:3.0	1:3.5
葡萄糖产量/mg·g ⁻¹	54.47 ± 0.86(b)	86.98 ± 6.48(ab)	88.38 ± 4.68(ab)	110.06 ± 4.57(a)	83.24 ± 21.54(ab)

2.3 培养基起始pH值对香蕉杆水解效果的影响

每种微生物都有其最适宜的外部pH值和一定的pH值适应范围。酶活力的高低与微生物的生命活动有着极其密切的关系。为了更好地促进微生物活动,提高酶活力,提高葡萄糖产量,必须先确定纤维素水解最适酸碱度。本文比较培养基起始pH值5.0、6.0、7.0、8.0、9.0对葡萄糖产量的影响,结果表明(表3),实验菌株有较广的pH值适应范围,培养基起始pH值稍微偏酸或偏碱均对香蕉杆降解有促进作用,其中pH值为5时香蕉杆生物转化为葡萄糖产量最高。

表3 pH值对葡萄糖产量的影响

pH值	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
葡萄糖产量/mg·g ⁻¹	116.01 ± 4.70(a)	115.04 ± 4.72(a)	89.69 ± 6.54(b)	109.78 ± 8.74(a)	94.95 ± 7.16(b)

2.4 表面活性剂对香蕉杆水解效果的影响

在其他培养条件一致的情况下,向反应体系分别添加不同表面活性剂吐温-20和吐温-80,结果如表4所示。吐温-80有抑制水解迹象,而吐温-20可以提高纤维素水解效率,考虑到生产成本和产量,本实验的添加剂以吐温-20添加量0.05%为最佳。

表4 添加剂对葡萄糖产量的影响

添加剂用量/%	空白	吐温-20			吐温-80		
		0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15
葡萄糖产量/mg·g ⁻¹	85.46 ± 4.93(b)	94.78 ± 3.88(a)	86.75 ± 3.37(b)	91.95 ± 1.48(a)	80.20 ± 3.55(c)	74.47 ± 3.55(d)	85.35 ± 5.19(b)

2.5 氮源种类对香蕉杆水解效果的影响

氮源对纤维素分解菌的生长和水解有重要影响。为了选择合适的氮源,在其他培养基条件一致的情况下,分别选择了 0.4% (质量分数,下同) $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、1.4% KNO_3 、1.1% NH_4HCO_3 、0.9% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源,比较它们对纤维素分解菌降解香蕉杆产葡萄糖的影响,结果如表 5。从表 5 可以看出,1.4% KNO_3 的效果最好,葡萄糖产量最高,而效果最差的是 0.4% $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 1.1% NH_4HCO_3 。

表 5 氮源种类对葡萄糖产量的比较

氮源	空白	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	KNO_3	NH_4HCO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
葡萄糖产量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	15.80 ± 0.45(b)	16.27 ± 0.52(b)	69.85 ± 8.47(a)	15.58 ± 0.38(b)	27.01 ± 7.38(b)

2.6 通气对香蕉杆水解效果的影响

通过翻动堆料来提高堆体的氧气通量,翻动次数对纤维素水解效率的影响如表 6 所示。结果表明,一天翻动一次的处理葡萄糖产量最高,对照葡萄糖产量最低;一天翻动 2、3、4 次的差异不大。权衡成本与效果,以每天翻动堆料 1 次为宜。

表 6 翻动次数对葡萄糖产量的影响

每天翻动次数	0	1	2	3	4
葡萄糖产量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	63.88 ± 1.30(b)	122.07 ± 2.27(a)	113.26 ± 12.26(a)	115.15 ± 5.79(a)	102.65 ± 7.56(a)

2.7 培养时间对香蕉杆水解效果的影响

在其他培养基条件一致的情况下,不同培养时间对葡萄糖产量的影响结果如表 7 所示。菌株在培养了 96 h 时表现出较强的活性,葡萄糖产量最高,超过 96 h 后葡萄糖产量缓慢下降。

表 7 培养时间对葡萄糖产量的比较

培养时间/d	1	2	3	4	5
葡萄糖产量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	10.98 ± 0.21(d)	40.34 ± 6.20(c)	82.22 ± 8.25(b)	111.36 ± 4.05(a)	97.99 ± 2.14a(b)

2.8 微量元素对香蕉杆水解效果的影响

微生物对微量元素的需求量不多,但适当添加微量元素对纤维素水解有一定的促进作用。本研究在其他培养基条件一致的情况下,比较了不同微量元素添加量对纤维素水解的影响。将蒸馏水 495 mL、 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.98 g、浓盐酸 1 mL、 ZnSO_4 0.98 g、 FeCl_3 2.67 g 配制成微量元素溶液,结果如表 8 所示。在加入的上述微量元素溶液 4 mL 下,即每克堆料中微量元素添加量为 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.98 μg 、浓盐酸 1 μL 、 ZnSO_4 0.98 μg 、 FeCl_3 2.67 μg 的条件下,葡萄糖

产量最高,为 138.16 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

表 8 微量元素对葡萄糖产量的比较

溶液/mL	空白	1	2	3	4
葡萄糖产量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	120.41 ± 2.53(c)	130.08 ± 1.95(b)	129.86 ± 0.87(b)	134.96 ± 1.49(ab)	138.16 ± 2.22(a)

综上所述,木质纤维素最优水解条件是:香蕉杆与麸皮质量比 6:2,1.4% (质量分数)的 KNO_3 为氮源,料水比 1:3,起始培养基 pH 值为 5,培养时间 96 h,以 0.05% (质量分数)的吐温-20 为添加剂,折合每克堆料中微量元素添加量为 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.98 μg 、浓盐酸 1 μL 、 ZnSO_4 0.98 μg 和 FeCl_3 2.67 μg ,每天翻动一次堆料。在此优化条件下葡萄糖产率达 (190.64 ± 6.52) mg/g ,相当于香蕉杆中的纤维素约 42% 被水解并转化成葡萄糖。

3 结语

采用由克雷伯氏菌属菌、假单胞菌属菌和嗜麦芽窄食单胞菌构建的微生物复合菌群,以香蕉杆为原料,对其进行水解,获得了较高的糖化率,经推算相当于香蕉杆中纤维素约 42% 被水解并转化成葡萄糖。但此结果是初步的,尚需作许多的工作。木质纤维原料具有较大的结晶性,经适当预处理可打破纤维素分子的结晶结构和保护层,使材料变得蓬松,易于被纤维素酶作用^[2]。譬如可以尝试化学预处理对香蕉杆进行处理^[5-6],从而达到更高效的香蕉杆分解效果,相关工作正在进行中。

而且该结果仅限于实验室规模,与实际的大规模发酵生产可能还有很大差距,比如在实验室下确定的最佳翻动次数,在大规模发酵中就可能不是最佳的。但毋庸置疑的是本实验构建的微生物复合菌群具有较好的降解纤维素功能,它们之间有良好的协同效应,只是在实际推广应用中还需就很多因素进行扩大实验。

参考文献

- [1] 张继泉,王瑞明,孙玉英.[J].酿酒科技,2003,115(1):39-42.
- [2] 蔡燕飞,廖宗文,王德汉,等.[J].应用生态学报,2003,14(8):1269-1272.
- [3] 沈金龙,毛爱军,王远亮,等.[J].微生物学报,2004,44(4):507-510.
- [4] 段金柱,曹淡君.[J].饲料博览,2000,2:4-6.
- [5] Charles J K, John F K.[J].Carbohydrate Polymers,2003,51:281-300.
- [6] 刘娜,石淑兰.[J].现代化工,2005,25(3):19-24. ■