

# 利用能源植物斑茅纤维固态发酵产纤维素酶及其糖化的研究

张树河<sup>1,3</sup>, 谢志君<sup>2</sup>, 林一心<sup>1</sup>, 龙敏南<sup>3\*</sup>

1 福建省农科院甘蔗研究所, 福建漳州 363005

2 漳州伯能生物能源有限公司, 福建漳州 363901

3 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005

**摘要** 以能源植物斑茅(*Erianthus arundinaceus*)为材料, 对其纤维成分、产酶条件和糖化条件进行了分析。结果表明: 斑茅含有纤维素 43.77%、半纤维素 28.57%、木质素 11.01%; 对斑茅进行预处理后, 纤维中纤维素的含量提高至 72.54%, 半纤维素含量降低至 13.02%, 木质素的含量降低至 3.34%。利用预处理的斑茅纤维进行固态发酵产酶, 其最佳的产酶条件为: 茅麸比 1:3, 固液比 1:2, 氮源(脲)0.75%, 初始 pH 5.0, 32 °C 发酵培养 72 h; 相对于利用未经预处理的斑茅纤维为原料, 其 FPA 酶活提高 210.9%, 达到 20.74 U/g, CMC 酶活提高 239.1%, 达到 218.26 U/g。以纤维素酶对斑茅纤维进行糖化, 糖化率达到 40.60%。

**关键词** 能源植物; 斑茅; 纤维素酶; 固态发酵; 糖化

中图分类号 TQ352.62; TQ920.4

文献标识码 A

## Cellulase Production by Solid-state Fermentation and Saccharification Using the Fibre of the Energy Plant *Erianthus arundinaceus*

ZHANG Shuhe<sup>1,3</sup>, XIE Zhijun<sup>2</sup>, LIN Yinxin<sup>1</sup>, LONG Minnan<sup>3</sup>

1 Sugarcane Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China

2 Zhangzhou Broany Bio-energy Co. Ltd, Zhangzhou, Fujian 363901, China

3 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

**Abstract** Using energy plant *Erianthus arundinaceus* as the material, we analysed the fiber composition, enzyme production conditions and saccharification. The results showed that *Erianthus arundinaceus* consisted of 43.77% cellulose, 28.57% hemicellulose and 11.01% lignin. After pretreatment, the cellulose content increased to 72.54%, while the hemicellulose and lignin content decreased to 13.02% and 3.34%, respectively. The optimal condition for solid-state fermentation to produce cellulase was: ratio of pretreated cellulose fibre to wheat bran 1:3, ratio of solid to liquid 1:2, nitrogen source(urea)0.75%, initial pH 5.0, temperature 32 °C and fermentation time 72 h. When using the pretreated fibre as the carbon source, the FPA activity and CMC activity increased 210.9% and 239.1%, respectively. The pretreated fibre was used for saccharification under the optimal condition with a yield of 40.60%.

**Key words** Energy plant; *Erianthus arundinaceus*; Cellulase; Solid-state fermentation; Accharification

**doi** 10.3969/j.issn.1000-2561.2011.12.030

自然界拥有丰富的纤维素生物质资源, 全球每年通过植物光合作用产生的纤维素生物质高达 2 000 亿 t。我国每年农作物秸秆达 8 亿 t 以上, 其中 50% 以上在田间地头被白白烧掉, 不仅浪费资源, 而且还污染环境<sup>[1]</sup>。纤维素是一种不能被大多数动物直接利用的多糖物质, 但只要能将其降解成小分子单糖, 纤维素将成为一种有广阔应用前景的资源。纤维素可被许多真菌 (fungi)、细菌 (true bacteria) 和放线菌 (action-mycetes) 等微生物降解<sup>[2]</sup>,

其中木霉属是研究最广泛的纤维素酶产生菌, 全球纤维素酶市场中 20% 的纤维素酶来自木霉属和曲霉属<sup>[3]</sup>。目前, 世界各国已纷纷开展甘蔗渣<sup>[4]</sup>、稻秆<sup>[5]</sup>、玉米秸秆<sup>[6]</sup>、芒草<sup>[7]</sup>等纤维素资源的开发利用研究, 并在饲料、食用菌、服装、生物燃料等方面取得了很好的效果<sup>[8-12]</sup>。

斑茅 (*Erianthus arundinaceus* Retz.) 属蔗茅属 (*Erianthus Michaux.*) 植物, 是甘蔗属的近缘, 被一些国内外专家认为是未来纤维素资源研究的热点<sup>[13-14]</sup>。

收稿日期: 2011-10-26

修回日期: 2011-11-30

基金项目: 国际科技合作重点项目(No. 2009DFA60930), 国家自然科学基金(No. 31170067)资助。

作者简介: 张树河(1975年—), 男, 助理研究员。研究方向: 能源植物的选育及转化制生物燃料。\* 通讯作者: 龙敏南, E-mail: Longmn@xmu.edu.cn。

斑茅广泛分布于我国南北的山地、河滩等，具有分蘖力强、纤维素含量高、抗旱耐瘠薄能力强等突出优点，可望成为生物能源产业的重要原料资源。目前，对斑茅纤维降解的研究国内外未见报道，本研究以东方肉座菌(*Hypocrea orientalis*)EU7-22 为产纤维素酶菌株，利用斑茅纤维进行固态发酵产酶及糖化的研究，为斑茅纤维素资源的开发和利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 斑茅：由福建省农科院甘蔗研究所甘蔗种质资源圃提供，经过干燥粉碎，2% NaOH、60℃抽提 1 h，水洗至近中性，干燥和过 40 目筛等一系列预处理过程而制成。

菌种：东方肉座菌(*Hypocrea orientalis*)EU7-22，由厦门大学生命科学学院生物能源实验室筛选保存。

1.1.2 培养基 PDA 培养基：称取 200 g 去皮洗净的土豆，切成小块，于沸水中煮 30 min，用纱布过滤后取滤液，加入 10 g 葡萄糖，定容至 1 L。

固态发酵初始产酶培养基：斑茅纤维 5 g，麸皮 5 g，固液比(斑茅与麸皮质量和水的体积比，下同)1:2，蛋白胨 0.5%，混合均匀后于 121℃高温高压灭菌 20 min 备用。

固态发酵优化产酶培养基：斑茅纤维 5 g，麸皮 15 g，固液比 1:2，脲浓度(脲和培养基的质量浓度比，下同)0.75%，混合均匀后于 121℃高温高压灭菌 20 min 备用。

### 1.2 方法

1.2.1 纤维素酶制备 在固态发酵初始产酶培养基或固态发酵优化产酶培养基中，接入 10% 种子菌悬浮液，混合均匀后转移到三角瓶中，于 30℃下培养 3 d，期间每隔 12 h 对瓶内培养基进行摇匀混合 1 次。

1.2.2 斑茅纤维糖化 将制备好的曲酶与斑茅纤维按质量比 1:1 混合，加入 7 倍质量的无菌水，55℃、180 r/min 下糖化 24、26、28、30、32、34 h，测定生成的还原糖量。

1.2.3 实验设计 单因素实验：设不同的培养时

间(24、48、72、96、120、144 h)、茅麸比(4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3)、固液比(2:1、1:1、2:3、1:2、2:5、1:3)、pH(2、3、4、5、6、7)、温度(20、25、30、35、40、45℃)、氮源种类(硫酸铵、硝酸铵、脲、豆粕、蛋白胨)和脲浓度(0.25%、0.50%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5%)等单因素试验，确定产酶的最佳参数范围。

正交实验：以温度(30、32、34℃)、固液比(1:1、2:3、1:2)、茅麸比(1:1、1:2、1:3)和脲浓度(0.25%、0.50%、0.75%)作 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交实验，分析确定固态发酵的最佳产酶条件。

1.2.4 实验数据分析 纤维素成分测定委托福建省农科院中心实验室通过 Van Soest 方法进行测定。

纤维素酶活力测定：羧甲基纤维素酶活力(CMC activity)和滤纸酶活力(FPA activity)，按 DNS 法测定还原糖浓度测定<sup>[15-16]</sup>。

糖化率的测定：按 DNS 法测定还原糖生成量，再计算斑茅样品的糖化率。

数据整理分析：实验数据用 Excel 和 DPS 软件进行整理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 斑茅纤维成分分析及酶解比较

斑茅纤维成分主要包括纤维素、半纤维素和木质素，而纤维素酶主要作用于纤维素和半纤维素，不能降解木质素。斑茅纤维原料经预处理后，各组份的含量发生明显改变，纤维素含量由处理前的 43.77% 提高到 72.54%，半纤维素和木质素的含量则大大降低，其中木质素含量由处理前的 11.03% 降低到 3.34%，表明在预处理过程中半纤维素和木质素被抽提，整个纤维的结构发生明显改变，更有利于菌丝侵入到纤维，利于纤维素降解。以预处理的斑茅纤维为原料制取纤维素酶和糖化试验，其酶活性和产糖量都大幅度提高，其中 CMC 酶活性提高 239%，FPA 酶活性提高 201.9%，糖化率提高 227.3%(表 1)。后续的产酶条件及糖化研究均采用预处理过的斑茅样品。

### 2.2 斑茅纤维固态发酵产酶

2.2.1 培养时间对产酶的影响 产酶效果与产酶

表 1 斑茅纤维成分分析及酶解比较

斑茅样品	纤维素/%	半纤维素/%	木质素/%	CMC 酶/(U/g)	FPA 酶/(U/g)	糖化率/%
未处理纤维	43.77	28.57	11.01	64.36	6.67	11.50
预处理纤维	72.54	13.02	3.34	218.26	20.74	37.64

时间有关，时间不足则酶活不高；时间过长则酶活降低，且延长生产周期。培养时间对斑茅纤维产酶的影响见图 1。由图 1 可见，接种后的 24 h 为微生物生长期，此期间孢子开始萌发，产酶少，酶活较低。随着培养时间的增加，产酶量增加，CMC 酶活性和 FPA 酶活性也随之提高，72 h 后 2 种酶活均达到最高值，随后酶活开始下降，因此在后续的试验中发酵时间采用 72 h。

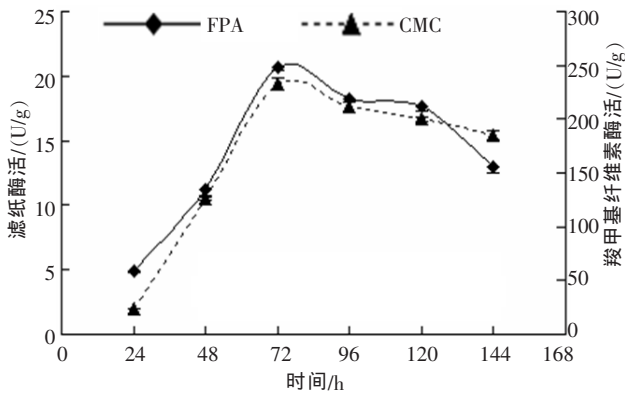


图 1 培养时间对产酶的影响

2.2.2 茅麸比对产酶的影响 麸皮是微生物比较容易利用的原料，同时麸皮中含有一些微生物生长所需的生长因子，可以促进菌体生长和产酶。在固态发酵中麸皮含量对形成菌株生产纤维素酶有一定的影响，随着麸皮比例的升高，产酶量增加，FPA 酶活性逐渐升高。考虑到实际工业生产中的成本，产酶培养基中茅麸比可选择 1:1 的比例(图 2)。

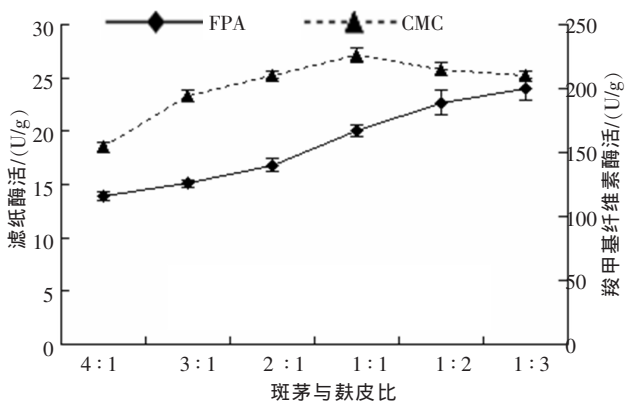


图 2 斑茅与麸皮比对产酶的影响

2.2.3 固液比对产酶的影响 孢子萌发和菌体生长需要一定水分，过干或过湿都不利于酶活性的增加。固液比对斑茅纤维产酶的影响见图 3。由图 3 可见，随着含水量增加，产酶量也发生变化，CMC、FPA 酶活性均呈现先升高后下降的趋势，固液比为 1:1 时，CMC、FPA 酶的活性均达到最高

值；当固液比低于 1:1 时，FPA、CMC 酶活性则不断下降；菌株的最适产酶固液比为 1:1。

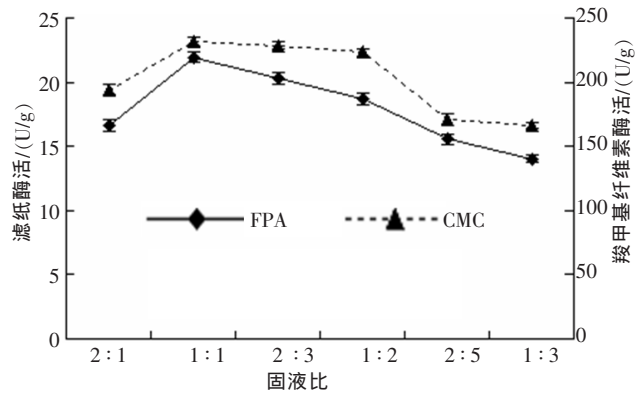


图 3 固液比对产酶的影响

2.2.4 pH 对产酶的影响 产酶与 pH 值密切相关，过酸过碱都不利于产酶。pH 对斑茅纤维产酶的影响见图 4。由图 4 可见，pH 对微生物生长和酶活性有较大的影响，CMC、FPA 酶的活性均随着 pH 的升高而呈现先升高后下降的趋势，当起始 pH 低于 5 时，FPA、CMC 酶活性随 pH 升高而上升；当 pH 高于 5 时，FPA、CMC 酶活性不断下降；菌株的最适产酶 pH 为 5.0。

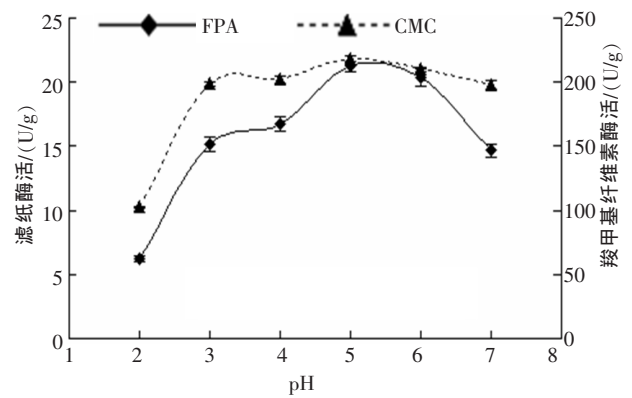


图 4 pH 对产酶的影响

2.2.5 温度对产酶的影响 每种微生物都有最适生长温度和最适产酶温度，不同的温度对微生物的生长和产酶有影响。温度对斑茅纤维产酶的影响见图 5。由图 5 可见，温度对微生物生长和产酶有很大的影响，当温度低于 30℃时，FPA、CMC 酶活性随 pH 升高而上升；当温度高于 30℃时，FPA、CMC 酶活性不断下降；菌株的最适产酶温度为 30℃。

2.2.6 氮源种类对产酶的影响 在相同氮源浓度(0.5%)下，不同氮源种类对微生物生长和产酶有较大的影响。不同种类氮源的产酶效果不同，无机氮源(硫酸铵、硝酸铵)之间差异不显著，有机氮源(脲、豆粕、蛋白胨)之间差异显著，无机氮源和有

机氮源之间差异显著，以脲作为氮源效果比较好，FPA、CMC 酶活性达到最高值(图 6)。

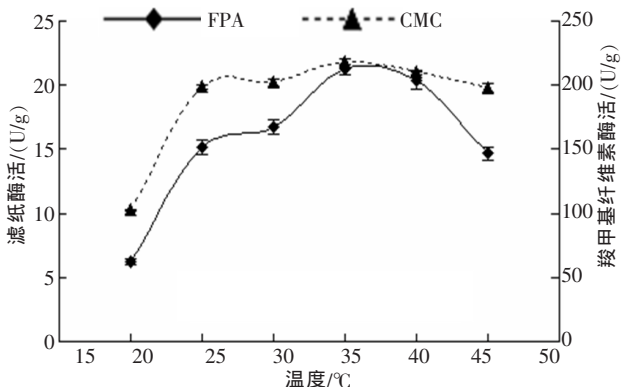


图 5 温度对产酶的影响

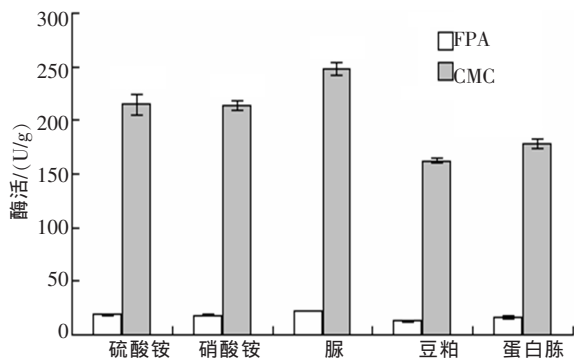


图 6 氮源种类对产酶的影响

2.2.7 脲浓度对产酶的影响 脲浓度对微生物生长和产酶有较大的影响。脲浓度对斑茅纤维产酶的影响见图 7。由图 7 可见，随着脲浓度的增加，CMC、FPA 酶活性均呈现先升高后下降的趋势，当培养基中含有 0.75% 脲时，产酶效果最好，FPA、CMC 酶活性达到最高值；当脲浓度高于 0.75% 时，FPA、CMC 酶活性不断下降。

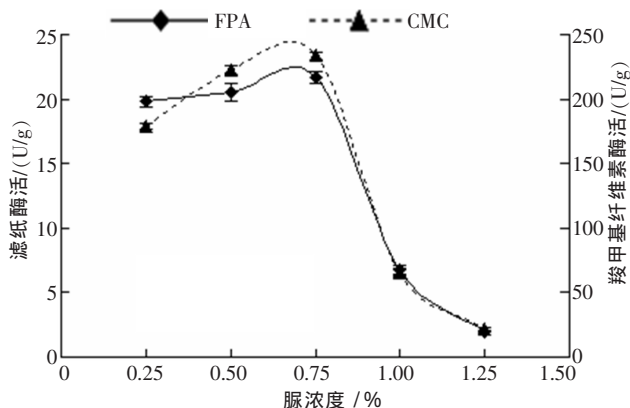


图 7 脲浓度对产酶的影响

2.2.8 斑茅纤维固态产酶条件的优化 综合上述单因子试验结果，采用正交法得出东方肉座菌 EU7-22 在固态产酶的最佳条件(表 2)。从表 2 的极差值(R)分析可知，各因素对斑茅产酶的 CMC、

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验设计及结果分析

序号	因素				CMC酶活(U/g)	FPA酶活(U/g)
	A(温度/°C)	B(固液比)	C(茅麸比)	D(脲浓度%)		
1	1(30)	1(1:1)	1(1:1)	1(0.25)	177.98	18.42
2	1(30)	2(2:3)	2(1:2)	2(0.5)	215.76	20.69
3	1(30)	3(1:2)	3(1:3)	3(0.75)	234.11	22.59
4	2(32)	1(1:1)	2(1:2)	3(0.75)	229.77	22.19
5	2(32)	2(2:3)	3(1:3)	1(0.25)	218.65	21.18
6	2(32)	3(1:2)	1(1:1)	2(0.5)	215.19	20.91
7	3(34)	1(1:1)	3(1:3)	2(0.5)	199.82	19.43
8	3(34)	2(2:3)	1(1:1)	3(0.75)	189.36	18.68
9	3(34)	3(1:2)	2(1:2)	1(0.25)	175.90	17.19
K <sub>1</sub> (CMC酶)	627.85	607.57	582.53	572.53		
K <sub>2</sub> (CMC酶)	663.61	623.77	621.43	630.77		
K <sub>3</sub> (CMC酶)	565.08	625.20	652.58	653.24		
K <sub>1</sub> (FPA酶)	61.70	60.04	58.01	56.79		
K <sub>2</sub> (FPA酶)	64.28	60.55	60.07	61.03		
K <sub>3</sub> (FPA酶)	55.30	60.69	63.20	63.46		
R(CMC酶)	98.53	17.63	70.05	80.71		
R(FPA酶)	8.98	0.65	5.19	6.67		
因素主次				A > D > C > B		
最佳组合				A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>		

FPA 酶活性影响的大小依次为 A > D > C > B, 其最佳组合为发酵温度 32 ℃、固液比 1:2、茅麸比 1:3、脲浓度 0.75%。

以最优培养基做产酶验证, FPA 酶活性可达 25.74 U/g, CMC 酶活性可达 268.91 U/g。

### 2.3 纤维素酶对斑茅纤维的糖化作用

在前期的预实验中, 采用最佳产酶条件进行糖化研究, 发现时间 30 h、曲料比 1:1、固液比 1:7、温度 55 ℃、pH5.0 等条件对斑茅纤维

素的糖化效果最好, 但这些因子中, 时间是主要的影响因子, 为此, 本研究又深入探讨不同糖化时间对产糖的影响, 结果见表 3。由表 3 可见, 随着时间的延长, 糖化效果呈现先升高后下降的趋势, 当纤维素酶糖化 24 h 时, 糖化率只有 34.18%; 糖化 30 h 时, 糖化率最高达到 40.60%。方差分析表明, 糖化时间为 30 h 的糖化率与 28、32 h 差异不显著, 与 24、26、34 h 差异达显著(极显著)水平。

表 3 纤维素酶对斑茅纤维的糖化作用

糖化率/%	重复			5%显著水平	1%极显著水平
	1	2	3		
时间 h					
24	34.15	34.78	33.60	c	C
26	36.93	35.48	37.45	b	B
28	39.06	37.88	39.25	ab	AB
30	40.60	41.04	40.16	a	A
32	38.70	39.42	38.19	ab	AB
34	37.98	36.63	38.22	b	B

说明: 表 3 数据用 Duncan 法同列比较, 不同大写字母表示差异达极显著( $p < 0.01$ ), 不同小写字母表示差异达显著( $p < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著。

## 3 讨论

斑茅具有可再生、资源丰富、分布广泛、纤维含量高特点, 本实验通过对斑茅的产量及干物质含量测定, 结果表明, 斑茅生物产量高, 每公顷产量超过 150 t/y, 干物质含量高达 33.96%, 折合每公顷干物质可达 50 t/y, 是一种理想的能源植物资源。

原料预处理的目的是改变天然纤维素的结构, 破坏纤维素-木质素-半纤维素之间的连接, 降低纤维素的结晶度, 增加原料的疏松性以增加纤维素酶系与纤维素的有效接触, 从而提高酶解效率。斑茅纤维原料具有容易处理、容易降解的特性, 斑茅经预处理后对产纤维素酶有明显的优势, CMC 酶活由处理前的 64.36 U/g 上升到 218.26 U/g, 提高 239.1%, FPA 酶活性由处理前的 6.67 U/g 上升到 20.74 U/g, 提高 210.9%。

通过东方肉座菌 EU7-22 对斑茅纤维素产酶的单因素水平及正交实验设计, 产酶水平与利用玉米秸秆、稻草秸秆和甘蔗渣等材料的研究结果相比, 效果更好。初步确定该菌株产酶的最优培养组成为: 茅麸比 1:3, 固液比 1:2, 氮源(脲)0.75%, 初始 pH5.0, 发酵温度 32 ℃, 培养时间 72 h, 在

此条件下, 斑茅纤维 FPA 酶活性达 25.74 U/g, CMC 酶活性达 268.91 U/g。

在曲料比 1:1、固液比 1:7、温度 55 ℃、糖化时间 30 h 的条件下, 对斑茅纤维进行糖化试验, 发现斑茅纤维比玉米秸秆、稻草秸秆和甘蔗渣等的糖化效果好, 糖化率达到 40.6%。研究表明, 斑茅纤维在生物能源研究与开发中具有广阔的应用前景, 可望成为生物能源研究的热点。

### 参考文献

- [1] 郭德宪, 曹健, 鲍宇茹. 利用生物技术降解纤维系的研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 82-87.
- [2] Tor-Magnus, Enari. Microbia cellulase. In: William M F (ed.). Microbial Enzymes and Biotechnology [M]. London and New York: Applied Science Publishers, 1983. 183-223.
- [3] Bhat M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. Biotechnol Adv, 2000, 18(5): 355-383.
- [4] 孟庆祥, 邬小兵, 丛一博, 等. 青霉 T24-2 降解甘蔗渣及发酵产氢的研究[J]. 石油化工高等学校学报, 2010, 23(4): 33-37.
- [5] 曾春兰, 洪玉枝, 刘子铎. 纤维素降解菌 *Gibberella fujikuroi* 产酶条件优化[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 391-393.
- [6] 王晓林, 张西玉, 白方丈, 等. 高效降解秸秆纤维素菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2011, 34(1): 105-109.

- [7] 丹 晨. 芒草: 火电厂新燃料[J]. 生态经济, 2005(12): 12-13.
- [8] 刘长河, 胡正春, 王建坤. 浅谈新型再生纤维素纤维的发展前景[J]. 天津纺织科技, 2004, 42(4): 2-5.
- [9] 袁丽环. 固体发酵玉米秸秆产纤维素酶条件的优化[J]. 陕西农业科学, 2011(2): 13-14.
- [10] 董义伟, 李大平, 田崇民, 等. 纤维素酶的固态发酵及酶学性质的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007(19): 393-395.
- [11] 孟庆祥, 鲍思龙, 王冠华, 等. 青霉T24-2和灰绿曲霉EU7-22降解甘蔗渣产糖的研究[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2009, 33(6): 733-736.
- [12] 张木明, 徐振林, 张兴秀, 等. 预处理对稻草秸秆纤维素酶解产糖及纤维素木质素含量的影响[J]. 农产品加工-学刊, 2006(3): 4-6.
- [13] 张木清, 洪 艺, 李奇伟, 等. 中国斑茅种质资源分子多态性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 1-6.
- [14] 鄢家俊, 白史且, 梁绪振, 等. 生物质能源潜力植物—斑茅种质资源考察与收集[J]. 草业与畜牧, 2009(3): 29-31.
- [15] 刘 洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶活力测定方法评述[J]. 工业微生物, 1994, 24(4): 27-32.
- [16] Wyk V, Mohulatsi M. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride* [J]. Bioresource Technology, 2003, 86(1): 21-23.

责任编辑：高 静