第 28 卷 第 4 期
2007 年 4 月

太 阳 能 学 报
ACTA ENERGIAE SOLARIS SINICA

Vol. 28, No. 4
Apr., 2007

文章编号：0254-0096(2007)04-0375-05

混合菌群用于纤维素糖化和燃料酒精发酵的试验研究

冯玉杰，李冬梅，任南琪
(哈尔滨工业大学市政环境工程学院，哈尔滨 150090)

摘 要：采用刚果红纤维素平板法分别从田间腐烂的秸秆、潮湿地中的腐烂落叶内筛选出 12 株分解纤维素的菌株，分别进行了在不同温度、pH 和时间条件下的羧甲基纤维素酶活(CMC)和滤纸酶活(FPA)的检测，筛选出了 4 株分解效率较高的菌株。采用正交实验研究了 2 株菌活性的主要影响因素，最终筛选出了 2 株产酶稳定的纤维素分解菌。采用扫描电镜，对菌株形貌进行了分析。应用 2 株纤维素分解菌和酵母菌混合菌种发酵的同时糖化发酵工艺，分别进行了单菌株和混合菌株的玉米秸秆糖化及燃料酒精发酵的试验研究，研究表明，混合菌群发酵后酒精产量为 16g 酒精/100g 秸秆。

关键词：燃料酒精；木质纤维素；纤维素分解菌；混合菌群
中图分类号：TK512^{+}.3　　**文献标识码**：A

0 引 言

作为化石燃料的替代品，燃料乙醇便于储存、输送，并可在不改变现有加油站设施和发动机形式的情况下作为车用动力燃料使用。此外，用酒精作发动机燃料具有优良的环境效益，可以显著减少排入大气中的温室气体量[1]。因此，全世界车用乙醇的应用量和应用范围正逐渐扩大[2]。

燃料酒精作为生物燃料的研究重点，在美国、巴西、澳大利亚等国得到了长足发展。2004 年美国的燃料酒精产量为 600 万吨[3]，巴西和澳大利亚也有大规模的生产。我国于 2001 年 4 月 2 日公布了《变性染料乙醇》和《车用乙醇汽油》两项国家标准，并在部分地区开展“汽油醇”试点。

目前，工业上主要是通过酿酒酵母利用己糖进行燃料酒精的生产[4]，其生产原料主要是糖蜜和谷物[5]，但现行的生产方法成本高、对环境污染大[6]。纤维素是最丰富、廉价的可再生资源[7]，植物每年通过光合作用能产生高达 1550 亿吨纤维素类物质，其中纤维素、半纤维素的总量为 600 亿吨。而每年用于工业过程或燃烧的纤维素仅占 2% 左右，还有很大一部分未被利用[8]。目前利用纤维素类物质生产酒精的技术路线和原理已基本清楚，但是由于纤维素酶的成本太高（占整个生产成本的 20%左右[9]）、生产过程中酶用量偏大，导致纤维素酒精的价格无法与粮食酒精相竞争[10]，这是目前纤维素燃料酒精应用受限的原因之一。本论文探讨了利用人工构建混合菌群进行纤维素糖化以及燃料酒精发酵的新方法和工艺，以期降低生产成本。

1 试验及方法

1.1 纤维素分解菌的分离与纯化[11]

按照文献[11]的方法，称取 10g 腐烂的秸秆或腐烂的落叶于 100mL 装有玻璃珠的无菌水中，振荡 1h 后采用倍比稀释法将样品稀释至 10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}，分别涂布于刚果红纤维素琼脂平板上[12]，在 35 ℃培养 4d。挑选水解圈较大的单独菌落进行分离纯化。

1.2 纤维素分解菌最适糖化条件的确定

将筛选分离出的纤维素分解菌经扩培后按 10% 的比例分别接种于不同培养温度(30、40、50 ℃)，不同 pH 值(4.0、5.0、6.0)的秸秆液体培养基中，分别培养 3、4 和 5d，摇床转速为 130r/min。之后分别测定 CMC 酶活和 FPA 酶活[13]，以确定纤维素分解菌的最适条件，并应用正交分析的方法[14]确定影响酶活的主要因素。

收稿日期：2005-12-29
基金项目：新世纪优秀人才支持项目

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

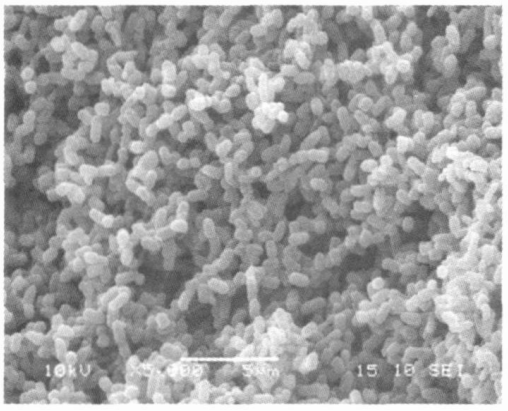
1.3 纤维素降解菌群构建及 SSF 法燃料酒精生产

取已平衡水分的玉米秸秆,首先进行"酸化气爆"预处理[15],之后以纤维素糖化和酵母发酵同步进行的"同步工艺"进行纤维素分解和酒精生产。纤维素分解菌(分别进行单菌种和混合菌种)和酿酒酵母菌按 1∶1、1∶2 和 2∶1 的比例组合,按 10%的比例接种于已经预处理的秸秆液体培养基中,在 40 ℃下分别培养 24、36、48h 后用气相色谱检测酒精含量,来确定同时糖化发酵法的最适工艺条件。

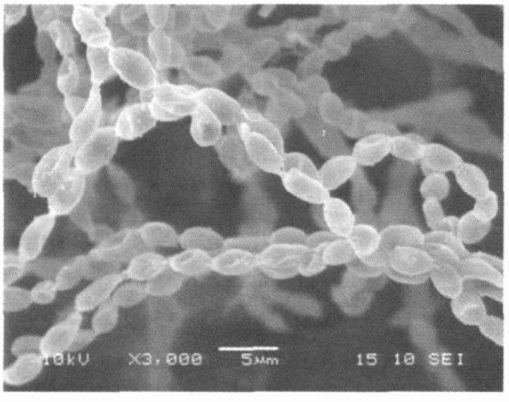
2 试验结果与分析

2.1 纤维素分解菌酶活测定及形态分析

按 1.1 的方法,共筛选出纤维素分解菌 12 株。经测定 12 株菌的纤维素降解的 CMC 酶活和 FPA 酶活,筛选出其中酶活较高的 4 株菌。考虑到环境与后续酵母发酵的环境条件的适应性和产酶的稳定性,挑选了其中 2 株菌作为研究菌株,分别标记为 FLZ6 和 FLZ10。图 1 是两株菌的电镜照片。经生理生化特性研究,确定两株菌分别为 FLZ6 为芽孢杆菌目芽孢杆菌科短小芽孢杆菌属;FLZ10 为放线菌目链霉菌科链轮丝菌属。



a. FLZ6



b. FLZ10

图 1 纤维素降解菌的电镜照片

Fig. 1 SEM of cellulolytic strain

2.2 酶活影响因素分析

分别对 2.1 中所述的 2 株菌进行正交实验分析,以确定影响 CMC 酶活和 FPA 酶活的主要因素,分析数据见表 1～表 3。

表 1 实验因素和水平

Table 1 Factors and levels design

水平	因素		
	温度/℃	pH	时间/d
1	30	4	3
2	40	5	4
3	50	6	5

表 2 纤维素分解菌 FLZ6 和 FLZ10 的 $L_9(3^4)$ 的正交实验结果

Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal array and experimental result of FLZ6 and FLZ10

实验号	A	B	C	D	实验结果			
	1	2	3	4	FLZ6		FLZ10	
					CMC	FPA	CMC	FPA
1	1	1	1	1	1.80	1.66	1.70	1.35
2	1	2	2	2	1.73	1.68	1.29	0.65
3	1	3	3	3	1.21	0.72	1.33	0.66
4	2	1	2	3	1.73	2.24	1.74	1.58
5	2	2	3	1	1.63	2.04	1.42	2.17
6	2	3	1	2	1.30	1.18	1.36	1.45
7	3	1	3	2	2.25	2.20	1.95	2.08
8	3	2	1	3	1.69	2.06	1.43	1.86
9	3	3	2	1	1.85	1.80	2.39	2.40
T					15.19	15.58	14.61	14.20
	FLZ6CMC				FLZ6FPA			
T_1	4.74	5.78	4.79	5.28	4.06	4.10	4.90	5.50
T_2	4.66	5.05	5.31	5.28	5.46	5.78	5.72	5.06
T_3	5.79	4.36	5.09	4.63	6.06	3.70	4.96	5.02
	FLZ10CMC				FLZ10FPA			
T_1	4.32	5.39	4.49	5.51	2.66	5.01	4.66	5.92
T_2	4.52	4.14	5.42	4.60	5.20	4.68	4.63	4.18
T_3	5.77	5.08	4.70	4.50	6.34	4.51	4.91	4.10

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　纤维素分解菌株 FLZ6 和 FLZ10 的方差分析表

Table 3　Variance analysis of of FLZ6 and FLZ10

	SS_A	SS_B	SS_C	SS_E	MS_A	MS_B	MS_C	MS_E	F_A	F_B	F_C
FLZ6 CMC	0.72	0.38	0.03	0.0434	0.360	0.190	0.015	0.02170	16.59	8.75	0.69
FLZ6 FPA	-4.47	-6.96	-5.35	-5.7950	-2.235	-3.480	-2.675	-1.11750	2.00	3.11	2.39
FLZ10 CMC	0.41	0.28	0.15	0.2033	0.205	0.140	0.075	0.10165	2.02	1.38	0.74
FLZ10 FPA	2.37	0.05	0.02	0.7096	1.185	0.025	0.010	0.35480	3.34	0.07	0.03

由表 3,FLZ6 和 FLZ10 的 CMC 酶活和 FPA 酶活受温度、pH 和时间的影响较小,FLZ6CMC 的 F_A 和 F_B 均比 FLZ10CMC 大,且接近 $F_{0.1}$ (2.2) 和 $F_{0.05}$ (2.2)。这说明 FLZ6 的 CMC 酶活受温度和 pH 的影响比 FLZ10 的大,同样 FLZ6 的 FPA 酶活受 pH 和时间的影响比 FLZ10 的大,因此从以上分析可知,这 2 株纤维素分解菌的纤维素酶活在反应体系中受温度、pH 和时间的影响较小,其中 FLZ10 的 CMC 酶活和 FPA 酶活受温度、pH 和时间的影响最小。因此在后面的研究中,我们重点考察这 2 株菌在同时糖化、酵母发酵生产燃料乙醇的工艺特征。

2.3　纤维素分解混合菌群用于同时糖化、酵母发酵生产燃料酒精

考虑到酵母的生理特性,在同时糖化、发酵生产酒精的整个工艺中,反应温度控制在 40 ℃,2 株纤维素分解菌在 40 ℃时,CMC 酶活和 FPA 酶活均可达到 2U/(min·mL) 酶液;pH 在反应初期约为 6,随着反应的进行,由于在发酵过程中产生酸类物质 pH 将降低,到反应结束反应体系中的 pH 将降至 4 左右。分别在发酵进行 24、36 和 48h 后测定发酵液中酒精含量,表 4 是混合菌群 FLZ6 和 FLZ10 用于纤维素糖化和酒精发酵的结果。

表 4　同时糖化发酵生产燃料酒精,发酵液中酒精含量

Table 4　Alcohol content of SSF

(单位:g/100g 秸秆)

时间/h	1∶1	1∶2	2∶1
24	10.4	3.5	7.9
36	16.1	12.9	9.9
48	10.7	6.6	9.8

2.3.1　纤维素菌和酵母菌的比例对酒精产量的影响

在 3 种发酵时间下,研究 3 种纤维素菌和酵母菌比例,可以看出:当纤维素菌与酵母菌为 1∶1 时,发酵结束后酒精产率最大,说明此时纤维素菌的水解速度与酵母菌的发酵速度相协调,而且由于发酵液中保持一定的糖分,可以有效阻止纤维素菌和酵母利用发酵产物-酒精为碳源来维持自身的生长和繁殖,以保证酒精的产量相对较高。纤维素菌与酵母菌为 1∶2 时,由于酵母菌的发酵速度大于纤维素菌的水解速度,使发酵液中糖分的不足以增加酵母菌对酒精的同化作用。当纤维素菌与酵母菌为 2∶1 时,由于发酵液中糖分的抑制而降低了纤维素菌的酶活,进而降低酒精产量。

2.3.2　反应时间对酒精产量的影响

纤维素菌水解和酵母发酵均需要一定时间,反应时间直接影响酒精的产率。由表 5 可看出:反应时间为 36h 时,酒精产率最高,可以达到 16g 酒精/100g 秸秆这一较高水平。在反应初期,纤维素菌的水解和酵母的发酵相协调,对各自的活力均有所促进,随着反应时间的延长,一方面由于反应液中的糖分逐渐减少,纤维素菌和酵母菌对发酵产物-酒精的利用以维持自身的生长和繁殖,另一方面由于酒精的氧化、转化等原因导致酒精产率的降低。表 5 是按照纤维素降解菌:酵母菌 = 1∶1 的比例,所进行的 FLZ10 和 FLZ6 单菌株糖化试验研究。

表 5　不同反应时间的酒精含量

Table 5　Alcohol content at different reaction time

(单位:g/100g 秸秆)

反应时间/h	反应条件	酒精产量
24	反应温度 40 ℃,初始 pH = 6.0,	10.4
36	纤维素菌与酿酒酵母的比例为	16.1
48	1∶1,反应时间 36h	10.7

由表 6 可看出,菌株的复配作用效果好于单独作用效果。一般认为,纤维素物质是通过 3 种纤维

表 6　FLZ6 和 FLZ10 的酒精含量

Table 6　Alcohol content of FLZ6 and FLZ10

(单位:g/100g 秸秆)

纤维素菌	反应条件	酒精产量
FLZ6	反应温度 40 ℃,初始 pH = 6.0,纤维素菌与酿酒酵母的比例为 1∶1,反应时间 36h	7.68
FLZ10		8.21

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

素水解酶的协同作用完成水解糖化产生葡萄糖的过程[16~17],这 3 种水解酶包括葡聚糖内切酶(EC 3.2.1.4)、葡聚糖外切酶(EC 3.2.1.74)和β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)。首先,由葡聚糖内切酶作用于微纤维的非结晶区,使其露出许多非还原性末端,随后葡聚糖外切酶从非还原性末端依次分解产生纤维二糖,然后部分降解的纤维素进一步由内切葡聚糖酶和葡聚糖外切酶协同作用,分解生成纤维二糖、三糖等低聚糖,最后由β-葡聚糖苷酶作用分解成葡萄糖[18]。另外,据文献[19],好氧微生物如真菌 Trichoderma longibrachiatum = T. reesei 或者细菌 Thermobifida fusca 在降解纤维素的过程中产生很多的具有单一酶成分的胞外酶,通过这些胞外酶的协同作用降解纤维素。

芽孢杆菌科的菌种属于革兰氏阳性内生孢子好氧或兼性厌氧细菌,可以在温度、pH 和盐度较大的条件下生长[20]。该类菌种在偏酸性的 pH 值范围内的葡聚糖内切酶和β-葡萄糖苷酶的酶活相对较高[21]。链霉菌科的菌种属于革兰氏阳性形成菌丝体的土壤细菌,是重要的生产纤维素水解酶的菌种[22],该类菌种在偏酸性的 pH 值范围内葡聚糖内切酶和葡聚糖外切酶的酶活较高[23],但是β-葡萄糖苷酶的最适 pH 为 7 左右偏中性[24]。本论文筛选的 FLZ6 和 FLZ10 分别属于芽孢杆菌和链霉菌科,在同时糖化发酵工艺中的 pH 控制在 5.5 左右,因此在该条件下,纤维素降解菌 FLZ6 的葡聚糖内切酶和β-葡萄糖苷酶的酶活相对较高,FLZ10 的葡聚糖内切酶和葡聚糖外切酶的酶活较高。经复配后,复配菌株具有比单独作用时更为丰富且酶活较高的纤维素酶系,同时由于 FLZ6 和 FLZ10 的葡聚糖内切酶的酶活均较高,可以快速作用纤维素物质产生大量的非还原性末端,更好的诱导葡聚糖外切酶的活性,产生纤维二糖,进而诱导产生β-葡萄糖苷酶,将纤维素物质水解为葡萄糖。因此在同步糖化发酵体系中复配菌株的水解效果优于单株纤维素降解菌的使用,可以比较快速的分解纤维素,达到较高的可发酵糖含量。

在同时糖化发酵体系中,纤维素菌和酵母菌存在相互促进的作用,对于纤维素降解菌,其糖化最终产物葡萄糖是β-葡萄糖苷酶的抑制物质[24],酵母菌具有较强的发酵葡萄糖的能力[25],可快速发酵产生的可发酵糖,使糖浓度维持在不发生反馈抑制的水平上,维持纤维素降解和产酒精两个过程的代谢平衡。

3 结 论

1)应用筛选出的纤维素降解菌,构建出了混合菌群,其糖化效果优于单菌株糖化;

2)纤维素降解菌与酵母菌比例为 1∶1、发酵 36h,其酒精产量最高,酒精产量为 16g 酒精/100g 秸秆;

3)根据筛选纤维素降解菌 FLZ6 和 FLZ10 本身的产酶特性,经过复配后的纤维素降解菌群具有更丰富的纤维素水解酶系和较高的纤维素降解酶活,可以实现依次诱导 3 种纤维素酶的活性,快速水解纤维素生成可发酵性糖。同时酵母菌发酵可发酵糖产酒精,移出对纤维素酶产生抑制作用糖类,进一步促进纤维素降解菌群的纤维素水解作用。因此在该反应体系中,通过纤维素降解菌群和酵母菌的联合作用,将纤维素物质水解为可发酵糖后,进一步发酵为酒精,实现纤维素类物质较高水平的利用。

[参考文献]

[1] Carlos Martin. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising Saccharomyces cerevisiae[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 274—282.

[2] Beatriz Palmarola-Adrados, Pavla Chote borska, Mats Galbe. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran[J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 843—850.

[3] 刘英楠. 前景广阔的生物酒精[N]. 科学时报, 2005 年 11 月 4 日.

[4] Kotter P, Ciriacy M. Xylose fermentation by saccharomyces cerevisiae[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38 (6): 776—783.

[5] Wright J D, Wyman C E, Grohman K. Evaluation of bioethanol production from lignocellulose[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1998, (57/58): 741—761.

[6] Kaylen Michael. Economic feasibility of producing ethanol from lignocellulosic feedstocks[J]. Bioresource Technology, 2000, 72: 19—32.

[7] Sues Anna, Millati Ria, Edebo Lars. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by Mucor indicus[J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5: 669—676.

[8] Sun Ye, Cheng Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. Bioresource Technology, 2002, 83: 1—11.

[9] Tengerdy R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

solid substrate fermentation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13:169—179.

[10] Kaylen Michael, Donald L, Dyne Van. Economic feasibility of producing ethanol from lignocellulosic feedstocks [J]. Bioresource Technology, 2000, 72: 19—32.

[11] 冯玉杰, 等. 纤维素分解菌的筛选及用于燃料酒精发酵的试验研究[A]. 第九届海峡两岸环境保护学术研讨会[C], 西安:2004, 1985—1989.

[12] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251—252.

[13] Gianni Panagiotou, Dimitris Kekos, Basil J. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by Fusarium oxysporum grown on corn stover in solid state fermentation[J]. Industrial Crops and Products, 2003, 18: 37—45.

[14] 杨运清, 等. 生物统计学[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1996, 99—101.

[15] 李冬梅, 等. 纤维素类物质生产燃料酒精的研究进展[A]. 第八次全国环境微生物学术研讨会[C], 北京: 2005, 40—47.

[16] HumpHeg A E. The hydrolysis of cellulosic material to uletrl products[J]. Adv Chem Sel, 1979, 181: 25—53.

[17] Wood T M, Maccpae S I. In bioconversion of cellulose substance into energy [J]. Chemicals and Microbial Protein, 1978, 111—141.

[18] 谢占玲, 吴　润. 纤维素酶的研究进展[J]. 草业科学, 2004, 21(4): 72—76.

[19] Schwarz W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 634—649.

[20] Petre M, Zarnea G, Adrian P. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels[J]. Resources Conservation and Recycling, 1999, 27: 309—332.

[21] Srivastava K K, Verma P K, Srivastava1 R. A recombinant cellulolytic Escherichia coli: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulose[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 293—297.

[22] Jan H D, Chen K S. Production and characterization of thermostable cellulases from Streptomyces transformant T3-1[J]. Microbiol Biotechnol, 2003, 19: 3—8.

[23] Andre Luiz, Grigorevski de Lima. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37: 272—277.

[24] Schremp f H, Walter S. The cellulolytic system of Streptomyces reticuli[J]. Biol Macromol, 1995, 17: 3—5.

[25] Jesus Zaldivar, ChristopHe Rocaa, Caroline Le Foll. Ethanolic fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by recombinant Saccharomyces cerevisiae strains[J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 1670—1676.

STUDY ON SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSE TO ETHANOL USING MIXED MICROBIAL SPECIES

Feng Yujie, Li Dongmei, Ren Nanqi

(*Department of Environmental Science & Engineering, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin* 150090, *China*)

Abstract: Twelve microbial strains for cellulose degradation were screened out from rotten corn straw and leaves by congo red cellulose medium. CMC Enzyme Activity and Filter Paper Activity were detected at different temperature, pH and fermentation time. Four strains were considered more capable of decomposing cellulose. The main factors which affect the activities were investigated with orthogonal test method., and two of them were chosen based on the stable enzyme activity. The micrographs of two species were analyzed with SEM(Scanning Electronic Microscope). Saccharification of corn straw and fuel alcohol production were carried out by single strains and mixed strains, respectively, by introducing the simultaneous saccharification and fermentation technology. A high production rate of 16g alcohol per 100g corn straw was got by mixed strains fermentation.

Keywords: fuel ethanol; lignocellulose; cellulolytic strain; mixed microbial species

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net