

木质纤维素来源发酵抑制物的生物降解以及光合发酵制氢

摘要

木质纤维素在预处理过程产生的糠醛、羟甲基糠醛、乙酸、甲酸、乙酰丙酸等降解产物对后续的酶水解和发酵过程产生了强烈的抑制。这些抑制物的脱除即所谓的“脱毒”步骤是进行正常发酵的前提条件。通过微生物降解的方法进行生物脱毒是最为有效的方法之一。本文通过合成培养基初筛和预处理秸秆复筛, 筛出三株能够降解预处理木质纤维素中抑制物的真菌: *Amorphotheca resinae* ZN1、*Penicillium polonicum* ZN2、*Penicillium turbatum* ZN3, 并用 16sDNA 的方法对菌种属性进行了初步鉴定。生长特性实验结果表明, 在抑制物浓度不高的条件下, *A. resinae* ZN1 能够在 pH 3-8, 温度 20-32℃ 下正常生长, 并对氧需求不严格。该菌对各种抑制物单独存在时的最大降解浓度为乙酸 8g/l, 甲酸 9g/l, 糠醛 4g/l, 羟甲基糠醛 5g/l。对于典型稀酸预处理条件下处理的玉米秸秆, 在 30% 固含量酶水解后的水解液主要成分为: 葡萄糖 65g/l, 木糖 34g/l, 乙酸 9.0g/l, 甲酸 2.7g/l, 糠醛和羟甲基糠醛 0.8g/l。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 在 37℃ 下不能在未经任何脱毒处理的水解液正常生长, 而经过 *A. resinae* ZN1 脱毒 4 天后, *S. cerevisiae* DQ1 在同样条件下可以进行正常的同步糖化与发酵, 最终乙醇浓度可达 43g/l。本论文的另一部分内容是利用木质纤维素来源发酵抑制物中的有机酸以及发酵过程产生的有机酸进行光合发酵产氢。选用 *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 菌种, 用于木质纤维素油脂发酵后水解液的有机酸光合发酵制氢。实验结果表明, 在 30℃, 4500lux 光照强度下, *R. sphaeroides* ZX-5 可将发酵废液中的有机酸和残糖完全降解, 氢气得率 8ml H₂/ml effluent。将有机酸利用起来光合发酵制氢, 不仅可以解决生物燃料工业废水处理, 而且可生产洁净并具有经济性的氢能源。

关键词: 木质纤维素; 预处理; 抑制物; 生物脱毒; 生物制氢

Biodegradation of the lignocellulose derived inhibitor substances in the pretreatment process and its photo-fermentation for hydrogen production

Abstract

The degradation products from lignocellulose pretreatment, such as furfural, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), acetic acid, formic acid, levulinic acid etc. are the typical inhibitors for the cellulase enzymes and ethanol fermentation strains. Efficient degradation of these inhibitors (“biodegradation”) is required for the following fermentation process. Biodegradation by microorganism is one of the most effective ways for inhibitors degradation. In this thesis, we isolated three fungi with the degradation capacity for the inhibitors by the two screening procedures in both the synthetic medium and on the pretreated corn stovers. The strains were identified as *Amorphotheca resinae* ZN1, *Penicillium polonicum* ZN2, and *Penicillium turbatum* ZN3 using the 16sDNA molecular identification method. *A. resinae* ZN1 grows well at the pH 3-8, 20-32°C, with or without oxygen when the inhibitors concentrations are not very high. The maximum concentrations degraded by the *A. resinae* ZN1 strain were acetic acid 8g/l; formic acid 9g/l; furfural 4g/l; 5-HMF 5g/l. The hydrolysate at 30% solid loading using the typical dilute acid pretreated corn stover contains glucose 65g/l, xylose 34g/l, acetic acid 9.0g/l, formic acid 2.7g/l, levulinic acid 3.2g/l, furfural and 5-HMF 0.8 g/l. The *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 could not grow in this hydrolysate at 37 °C without detoxification. After the pretreated corn stover was detoxified by *A. resinae* ZN1 for 4 days, the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *S. cerevisiae* DQ1 at the same condition could be carried out and 43g/l of ethanol was obtained. In the second section of the thesis, organic acids (acetic acid, formic acid, levulinic acid) derived from the lignocellulose are not only produced during the pretreatment but also fermentation process. Using these organic acids for hydrogen production can combine the treatment of waste water and hydrogen production. In our study, we choose the *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 for the photo-fermentation using the effluent from lipid fermentation based on lignocellulose. The study show that: under 30 °C and 4500lux light intensity, *R. sphaeroides* ZX-5 could degrade the all residual sugar and organic acids with hydrogen yield 8ml H₂/ml effluent.

Key words: lignocellulose; pretreatment; inhibitor; biodegradation; biohydrogen

目录

前言.....	1
第一章 文献综述.....	2
1.1 研究木质纤维素生物燃料的意义.....	2
1.1.1 生物质燃料概述.....	2
1.1.2 生物质燃料的种类和特点.....	2
1.1.3 国内生物质燃料发展现状.....	3
1.2 木质纤维素生物发酵制取燃料乙醇.....	3
1.2.1 什么是木质纤维素.....	3
1.2.2 木质纤维素发酵生产燃料乙醇的关键技术.....	4
1.3 木质纤维素来源的抑制物.....	5
1.3.1 糖分解产物.....	5
1.3.2 木质素的降解产物.....	6
1.3.3 来自木质纤维结构的衍生物.....	6
1.3.4 重金属离子.....	6
1.3.5 几种抑制物的协同毒性“协同效应”.....	8
1.4 抑制物的脱除方法.....	8
1.4.1 物理方法.....	8
1.4.2 化学方法.....	8
1.4.3 物理化学联合方法.....	9
1.4.4 生物法.....	9
1.5 木质纤维素来源有机酸光合发酵制氢.....	10
1.5.1 生物制氢的概述.....	10
1.5.2 光合菌生物制氢技术.....	10

1.6 本课题的研究意义.....	11
1.6.1 木质纤维素来源的有机酸生物降解.....	11
1.6.2 以木质纤维素来源的有机酸，光合发酵制氢.....	11
第二章 木质纤维素来源抑制物的生物降解.....	12
2.1 前言.....	12
2.2 实验材料与仪器.....	13
2.2.1 实验试剂.....	13
2.2.2 实验仪器.....	13
2.2.3 原料.....	14
2.2.4 培养基.....	14
2.3 研究方法.....	15
2.3.1 生物脱毒的真菌筛选.....	15
2.3.2 表征型特征鉴定.....	16
2.3.3 分子生物学鉴定.....	16
2.3.4 三种菌降解抑制物效果的比较.....	17
2.3.5 <i>A. resinae</i> ZN1 在预处理秸秆中生长特性.....	17
2.3.6 秸秆脱毒前后纤维素含量测定.....	17
2.3.7 <i>A. resinae</i> ZN1 对各种抑制物的降解.....	18
2.3.8 不同稀酸预处理条件下的秸秆抑制物降解.....	19
2.3.9 抑制物降解后玉米秸秆高固体含量同步糖化发酵.....	19
2.4 实验结果与讨论.....	19
2.4.1 初筛结果.....	19
2.4.2 复筛结果.....	20
2.4.3 表型特征鉴定结果.....	21
2.4.4 分子生物学鉴定结果.....	22

2.4.5	三种菌降解抑制物效果的比较.....	25
2.4.6	<i>A. resinae</i> ZN1 在秸秆中生长特性.....	27
2.4.7	脱毒前后秸秆纤维素的含量变化.....	28
2.4.8	<i>A. resinae</i> ZN1 对各种抑制物的降解.....	29
2.4.9	抑制物降解的秸秆高固体含量同步糖化发酵.....	35
第三章 木质纤维素来源有机酸光合发酵制氢.....		37
3.1	前言.....	37
3.2	实验材料和仪器.....	38
3.2.1	试剂和仪器.....	38
3.2.2	培养基与菌种.....	39
3.3	实验方法.....	40
3.3.1	油脂酵母发酵后废液的制备.....	40
3.3.2	光合细菌 <i>R. sphaeroides</i> ZX-5 种子培养.....	40
3.3.3	光合反应器.....	40
3.3.4	油脂发酵和光合发酵培养基中成分分析.....	40
3.3.5	RCVB 中光合菌利用有机酸发酵产氢.....	41
3.4	实验结果和讨论.....	42
3.4.1	在 RCVB 中各种有机酸发酵产氢.....	42
3.4.2	油脂发酵后的水解液光合产氢.....	43
3.4.3	油脂发酵后水解液光合产氢 pH 优化.....	44
第四章 结论与展望.....		45
4.1	总结.....	45
4.2	展望.....	45
参考文献.....		46

致谢.....50

前言

随着世界经济的快速发展,各国对能源的依赖性越来越强.而人类所面对的一个不争的事实就是化石资源的枯竭^[1-2]。寻找可替代化石燃料的新能源已成为大家的共同目标。以木质纤维素为原料来生产包括燃料乙醇,生物柴油,氢气,沼气等生物燃料受到世界各国的广泛关注。不仅是因为木质纤维素原料来源廉价、广泛且可再生,而且生物燃料相对化石燃料,是一种清洁能源,对环境污染小。

目前由木质纤维素转化为乙醇的研究非常活跃,这一领域已取得许多新的进展。从木质纤维素生产乙醇转化工艺主要包括预处理,酶水解,微生物发酵,乙醇蒸馏-精馏-脱水。虽然已经有规模化利用木质纤维素生产燃料乙醇,但离真正的工业化生产还有距离,这其中存在很多技术难题。木质纤维素的预处理步骤是整个燃料乙醇生产最为关键的一步,并且占生产成本的 20% 以上。而且预处理过程形成的各种副产物,对酶水解,微生物生长和代谢都有着重要的影响。如何有效的降解这些抑制物,并应用于木质纤维素燃料乙醇的生产是亟待解决的。本课题的研究目的在于,利用生物法将各种预处理过程中形成的抑制物降解,从而实现燃料乙醇的高浓度生产,减小成本。

氢气和乙醇一样,可以通过木质纤维素来生产,而且是最洁净的能源。但直接利用木质纤维素酶解产物己糖或戊糖来生产氢气,最大问题是经济成本高而难以工业化。利用有机废水中有机物来光合发酵制氢气,可以减少成本而且联合污水处理工程。本课题的第二个目的就是对油脂发酵后废液中一些有机酸抑制物,光合发酵制氢,从而避免生物燃料工业生产可能带来的环境问题,也能形成附加经济,减少成本。

第一章 文献综述

1.1 研究木质纤维素生物燃料的意义

1.1.1 生物质燃料概述

生物燃料是生物能源的一种，它是太阳能以化学能的形式储存的能量，是以生物体为载体，来源于植物光合作用的一种能源。与传统的化石燃料相比，主要具有可持续发展性，无毒性，可降解性和环境无害性，而且它的来源十分丰富，既可以从粮食，油料作物，糖料作物和其他一些植物中提取，也可以从一些生活垃圾，工业废物中加工处理得到。不仅如此，生物燃料的生产可以为区域经济提供发展机会。

生物燃料的载体是有机物，它原料分布广泛，不受天气和自然条件的限制，只要有生命的地方既有生物质存在。从利用形式上看，生物燃料与煤，石油内部结构和特性相似，可采用相同或相近的技术进行处理和利用，采用技术的开发与推广难度比较低。另外，生物燃料可通过一定的先进技术进行转换，除了转化为电力外，还可生成油料，燃气或固体燃料，直接应用于运输机械或可用于柴油机，燃气轮机，锅炉等常规热力设备。它几乎可以应用于目前人类工业生产和社会的各个方面，所以在所有新能源中，生物燃料与现代的工业化技术以及目前的现代化生活有最大的兼容性。它在不需对已有的工业技术做任何的改进前提下即可以替代常规能源。这些都是今后生物燃料发挥重要作用的依据。

1.1.2 生物质燃料的种类和特点

当前生物燃料的主要形式有四种：沼气，生物制氢，生物柴油和生物乙醇^[3]。

(1) 沼气是由作物秸秆，树木落叶，人畜粪便，工业有机废物和废水等有机物质在厌氧环境中，经过微生物发酵作用生成的一种可燃气体。每立方米沼气完全燃烧后的发热量约相当于 3.3kg 原煤产生的热量，是一种清洁，高效的可再生能源。

(2) 生物制氢技术，也为发展新能源提供技术储备。目前，各国正在竞相开发氢燃料电池，尤其是氢燃料电池驱动的汽车。生物制氢主要有厌氧发酵和光合发酵两种方式。前者是底物在氢化酶的作用下，通过发酵细菌代谢释放氢分子的形式平衡电子来保证体内的代谢过程正常进行。后者是藻类和光合细菌直接将太阳能转化为氢能。

(3) 燃料乙醇是国内外公认的生物能源产品，能够以一定比例与汽油或柴油等成品油混和后供车辆直接使用。生物乙醇主要包括粮食乙醇和纤维乙醇，它是在酶的水解作用下，将有机底物分解成为可发酵性糖，从而进一步被微生物发酵成乙醇和二氧化碳。

(4) 生物柴油也是近年来发展迅速并规模化使用的化石替代能源。生物柴油是以植物油如大豆油、菜籽油、其他丰富的非食用油和动物油脂，如猪油、牛油、鱼油等，以及废弃的食用油为原料生产出的清洁可再生能源，是柴油优良的代用品。

1.1.3 国内生物质燃料发展现状

我国政府为解决能源节约替代和绿色环保等问题制定了一系列政策和措施,一些学者和专家已致力于生物液体燃料的研究倡导工作。我们在技术上具有一定的支撑能力,并开始进行小规模生产,但是,与国外相比,我国还有相当大的差距,未能形成生物液体燃料的产业规模化,政府尚未提出一套完整的扶植和鼓励的政策办法^[4]。因此,我国加入 WTO 之后,在如何面对经济高速发展和环境保护的双重压力下,加快高效清洁的生物燃料产业化进程就显得更为迫切了。我国发展燃料乙醇起步较晚,先后在河南,安徽,黑龙江,吉林和辽宁五省进行了试点,生产的原料主要为玉米等陈化粮。我国吉林燃料乙醇有限公司,河南天冠集团,安徽丰原集团及黑龙江华润实业有限公司都生产燃料乙醇,年产量分别达到 30 万 t, 30 万 t, 32 万 t 和 10 万 t。中国开发生物燃料乙醇的热潮在骤然升温。2005 年,中国生产燃料乙醇 125 万 t, 2006 年增长到 133 万 t。中国燃料乙醇的消费量已占汽油消费量的 20% 左右,成为继巴西、美国之后第三大生物燃料乙醇生产国和消费国^[5]。

1.2 木质纤维素生物发酵制取燃料乙醇

1.2.1 什么是木质纤维素

木质纤维素生物质主要由三类聚合物形成:纤维素(一种线性大分子同聚合物,由 D 葡萄糖单元以 1, 4 糖苷键连接起来的),半纤维素(由低分子量的多糖形成的不均匀聚合物)和木质素(一种复杂的主要由酚类化合物聚集而成的生物聚合物)。可以在表 1.1 中看到各种木质纤维素原料中纤维素,半纤维素,木质素的含量。

纤维素在木质纤维生物质中含量在 20-60%。纤维素性质稳定,不溶于水,无还原性,在常温下不发生水解,在高温下水解很慢。只能在较高温度和无机酸催化下进行水解。水解产物为葡萄糖。每千克纤维素理论上可得到 1.11 千克葡萄糖。

半纤维素在木质纤维素生物质中含量 20-35%,并且它的主要由戊糖(D-木糖, L-阿拉伯糖),己糖(D-葡萄糖, D-甘露糖和 D-半乳糖)和糖醛酸组成。半纤维素中最为丰富的是木聚糖。木聚糖是由木糖由 1, 4 糖苷键连接起来的。

木质素是构成植物细胞壁的成分之一,具有使细胞相连的作用。它主要由苯基丙烷结构单体通过 C-C 键构成的三维空间高分子化合物,分子通式为 $(C_6H_{11}O_2)_n$ 。木质素不能被水解成单糖,而且会在纤维素周围形成保护层,影响纤维素水解。

表 1.1 各种纤维素原料中纤维素，半纤维素，木质素的含量

Table 1.1 Contents of cellulose, hemicellulose and lignin in lignocellulose raw material

木质纤维素材料	纤维素 (%)	半纤维素 (%)	木质素 (%)
硬木	40-55	24-40	18-25
软木	45-50	25-35	25-35
坚果壳	25-30	25-30	30-40
玉米芯	45	35	15
草	25-40	35-50	10-30
纸张	85-99	0	0-15
小麦秆	30	50	20
树叶	15-20	80-85	0
棉花籽	80-95	5-20	0
报纸	40-55	25-40	18-30
化学浆中的废纸	60-70	10-20	5-10
废水中的颗粒	8-15	NA ^b	24-29
猪粪	6.0	28	NA ^b
牛粪	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
沿海百慕达草	25	35.7	6.4
柳枝稷	45	31.4	12.0

以上信息来源：^[6-9];

NA^b：无法获得

1.2.2 木质纤维素发酵生产燃料乙醇的关键技术

木质纤维素原料通过微生物发酵制取燃料乙醇，关键技术包括下面几个：

- 预处理：分解木质纤维素的结晶结构；
- 酶水解：通过各种纤维素酶将纤维素去聚合为葡萄糖；
- 发酵：微生物以糖为底物发酵生产燃料乙醇；

1.2.2.1 预处理

由于植物木质纤维素的复杂结构，使其形成保护屏障以阻止细菌和真菌对细胞的破坏。预处理木质纤维素生物质的目的在于通过改变木质纤维素细胞壁结构从而使纤维素更容易被酶水解。

预处理方法主要有：蒸汽膨爆，液化热水（LHW），氨纤维膨胀（AFEX），酸煮，石灰石，有机溶剂提取等^[10]。其中研究最为透彻并且应用最为广泛的是稀酸预处理和蒸汽膨爆两种方式。

稀酸预处理：是木质纤维素预处理的传统方式，Bracconet 在 1819 年第一次用硫酸处理木头并得到葡萄糖^[11]。稀酸预处理一般先采用稀硫酸(0.5%~3.0%)预浸原料，然后在 130~200℃条件下在预处理反应器中处理原料数分钟。稀酸预处理的优点：糖得

率高；催化剂成本低；易于中和。缺点：因为需要在高压和酸性环境，对设备要求比较高；副产物的形成也明显。

蒸汽膨爆预处理：蒸汽膨爆预处理方法是 1925 年由 W. H. Mason 首先提出^[12]。一般是在反应器中，高温（200-300℃）条件下，高压使水分很快渗透到木质纤维素的内部，形成种“湿”的生物物质。通过蒸汽加热，以水分膨胀的剪切力快速爆破木质纤维素，从而破坏木质纤维素的复杂结构。处理的时间根据温度不同，一般在 1-4 分钟。该工艺相对稀酸预处理，优点是抑制物形成相对少。但也需要在高压高温条件，对设备要求高。

1.2.2.2 水解

经过预处理，木质纤维素去除了木质素和部分半纤维素，减少了纤维素的结晶状态，增加了酶和纤维素的接触空间。但纤维素和半纤维素必须进一步水解成相应的单体（糖）才能被微生物利用。酶水解的目标是，将预处理后仍然存在的水不溶性固体颗粒中的多糖解聚。大部分预处理后，这些存在的多糖颗粒是纤维素。三种酶协同作用于纤维素的水解：1, 4-葡萄糖内切酶（EG, EC 3.1.2.4）作用于纤维素长链中的内部；纤维二糖水解酶（CBH, EC 3.2.1.91）作用于聚合物的末端，并且释放出纤维二糖最终被葡萄糖（BG, EC 3.2.1.21）分成两分子的葡萄糖分子^[13]。在预处理过的木质纤维素的水解过程中，酶较高的生产成本和使用量通常被认为是木质纤维素乙醇商业化的主要瓶颈。

1.2.2.3 木质纤维素发酵

木质纤维素水解液发酵产燃料乙醇要求微生物能够利用己糖，包括葡萄糖，甘露糖，半乳糖和戊糖包括木糖，阿拉伯糖，而且是存在弱酸类、呋喃类以及酚类等抑制物的条件下。因此糖和抑制物浓度是影响发酵效果的两个重要因素。

1.3 木质纤维素来源的抑制物

1.3.1 糖分解产物

糠醛是戊糖在水解过程被分解形成。它对细胞的抑制取决于它在培养基中的浓度。它主要影响细胞生长速率和每分子 ATP 可以生成的生物量^[14]。Roberto 等曾经研究过，当糠醛的浓度低于 0.5g/l 的时候，对细胞的生长有促进作用的；而当浓度高于 2g/l 的时候，将完全抑制细胞的生长^[15]。Delgenes 报道糠醛浓度为 0.5g/l、1.0g/l、2.0g/l 的时候将分别降低 *P. stipitis* 细胞生长达 25%、47%、99%^[16]。Nigam 发现当发酵培养基中糠醛浓度为 0.25g/l 时，并不能够减少乙醇得率和产率；当浓度为 1.5g/l 时，将影响微生物的生长，乙醇得率和产率分别被减少了 90.4% 和 85.1%^[17]。

羟甲基糠醛，是己糖分解产物。Palmqvist 和 Hahn-Heagerdal 报道它的抑制作用和糠醛相似。但是羟甲基糠醛毒性比糠醛弱。而且它在纤维素水解液中的浓度一般比较低，主要原因有三：（1）纤维素中己糖的含量低；（2）水解条件下，一般很少量的己糖被分解；（3）这种物质有比较高的活性^[14]。Delgenes 发现，当羟甲基糠醛在水解液中的浓度分别为 0.5g/l、0.75g/l、1.5g/l 时，*P. stipitis* 细胞量的减少将达 43%，70% 和 100%^[16]。Martinez 等发现利用甘蔗渣水解液发酵产乙醇过程中，当呋喃（糠醛和羟甲基糠醛）化

合物浓度达 0.9g/l 时, *E. coli* 受影响^[18]。这些抑制物对水解液毒性都有各自的影响, 但是当这两种抑制物与其他几种抑制物, 例如来自木质素降解的酚类和芳香族化合物以及几种酸(乙酸, 甲酸和乙酰丙酸)共同存在时, 之间就会有协同毒性。Vogel-Lowmeier 等报道: 在木糖发酵过程中, 来自于酸水解液中的糠醛, 羟甲基糠醛和乙酸对 *Pachysolen tannophilus* 和 *P. stipitis* 的细胞生长有抑制作用, 尤其是后者。他们也发现, 这些抑制物对木糖发酵菌种的抑制作用是极其复杂的, 并证明发酵抑制是因为这些抑制物之间的协同效应^[19]。

1.3.2 木质素的降解产物

大量的化合物(芳香族, 多糖, 酚类和醛类)在木质纤维素水解过程中从木质素中释放出来。酚类化合物对微生物在木质纤维素水解液的发酵过程有明显抑制效应, 并且这类物质具有最高的毒性。酚类造成生物膜完整性破坏和分解, 因此影响生物膜作为选择性屏障和酶作用载体的能力。结果, 细胞生长和糖代谢都被降低^[14]。Parajo 报道木质素的降解产物, 即使在很低浓度下, 对微生物的毒害作用比糠醛和羟甲基糠醛大。他们也报道在木头水解液中, 当香兰素浓度在 5 或 3.7g/l, *S. cerevisiae* 代谢木糖的能力被完全抑制^[20]。利用木糖到木糖醇生物转化过程中, Villa 发现酚类化合物浓度低到 0.1g/l 时, 既不影响木糖的消耗也不影响细胞生长和木糖醇的生成。但是当浓度高于这个值(0.2 到 4g/l)时, 它将严重抑制这些过程^[21]。

1.3.3 来自木质纤维结构的衍生物

酸基、丹宁酸、萜烯酸以及存在于纤维素中乙酰基生成的乙酸, 都在水解过程中释放出来而存在于水解液中。McMillan 发现这些物质比木质素衍生物对微生物的生长抑制作用要弱^[22]。Lawford 和 Rousseau 发现, 当培养基中 pH 比较低, 乙酸($pK=4.75$)以未解离的形式存在, 是脂溶性的, 并且能够透过细胞质膜。在细胞内部, pH 是 7.4, 乙酸以解离的形式存在, 并且在在细胞质中积累, 释放出质子。结果, 细胞内部 pH 下降, 抑制了细胞活性, 甚至造成细胞死亡^[23]。乙酸的毒性因微生物发酵条件而不同。Van Zyl 等使用 *P. stipitis* 利用甘蔗渣半纤维素水解液来发酵产乙醇, 发现乙酸的抑制作用不仅因其浓度不同而不同, 而且受氧浓度和培养基 pH 的影响。在 pH6.5 时, 乙酸浓度 4.5g/l, 乙醇生成开始减少。当乙酸浓度达 15g/l 时, 减少到 50%。而在 pH 为 5.1 条件下, 当乙酸浓度仅仅为 1g/l 的时候就会使乙醇的产量下降到 50%。当乙酸浓度为 10g/l 时, 没有乙醇生成^[24]。Felipe 等研究发现, 乙酸浓度为 1g/l 时将增加木糖到木糖醇的生物转化, 但当浓度上升到 3g/l 时, 对发酵过程将有抑制作用^[25]。另外一方面, 当培养基中乙酸浓度 10g/l, 而没有其他抑制物时, 乙酸促进乙醇的生成^[26]。

1.3.4 重金属离子

重金属离子(铁离子, 铬离子, 镍离子, 铜离子)在水解液腐蚀水解设备过程中形成, 并且这些离子对微生物代谢途径中酶是有抑制作用的。Watson 等分析金属阳离子对参与木糖代谢途径中酶的活性影响以及对 *P. tannophilus* 细胞生长的影响。他们使用含有金属阳离子, 同样存在于水解液中的, 合成培养基。微生物活性在铜, 镍, 铬, 铁离

子在培养基中的浓度分别为 4、5、100 和 150mg/l 时被稍微减少。另一方面，当镍离子浓度为 100mg/l 时，活性减少了 60%^[27]。我们可以从表 1.3 列看到上述来源的各种抑制物在相应浓度对发酵菌株生长和代谢的影响。

表 1.2 抑制物对发酵过程的影响

Table 1.2 Effect of inhibitors on fermentation

抑制物形成	抑制物种类	浓 度 (g/l)	发酵菌种	抑制生长 (g) % 抑制发酵 (f) %	参考 文献
预处理过程中	乙酸	1.4	酿酒酵母	50(f), pH4.5	28
	乙酸	4.3	酿酒酵母	50(f), pH5.5	28
	乙酸	8.0	毕赤酵母	98(f), pH5.1	24
	乙酸	8.0	毕赤酵母	25(f), pH6.5	24
糖的降解产物	糠醛	1.0	毕赤酵母	47(f), 71(g)	29
	5-羟甲基糠醛	3.0	毕赤酵母	69(f), 90(g)	29
木质素降解产物	肉桂醛	1.0	酿酒酵母	100(f)	30
	p-羟基苯甲醛	0.4	酿酒酵母	68(g)	31
	p-羟基苯甲醛	1.0	克雷伯氏菌	48(f)	30
	丁香醛	0.5	毕赤酵母	40(g)	31
	丁香醛	0.22	酿酒酵母	72(f)	32
发酵产物	乙醛	5.0	酿酒酵母	80(g)	33
	乙醇	120	酿酒酵母	100(g)	34
	甲酸	2.7	酿酒酵母	80(g)	33

	乳酸	38	酿酒酵母	80(g)	3
					3
其他	铬	0.1	管囊酵母	95(f)	3
					5
	铜	0.04	管囊酵母	29(f)	3
					5
	铁	0.5	管囊酵母	45(f)	3
					5
	镍	0.05	管囊酵母	92(f)	3
					5

1.3.5 几种抑制物的协同毒性“协同效用”

微生物能够耐受的每种抑制物的最大浓度是无法检测的，这是因为抑制作用取决于因子包括微生物种类，发酵过程条件，出现在培养基中的抑制物种类，以及他们的协同效应。Palmqvist 等发现，乙醇的生成会被培养基中乙酸(10g/l)促进，此时没有糠醛的存在。相同在没有乙酸存在时，乙醇的生成也被糠醛(2g/l)而促进。然而，这两种抑制物同时存在时会严重影响细胞生长速率，细胞量，以及乙醇得率^[26]。Zaldivar 等研究证明：半纤维素水解液的毒性来自于各种抑制物(醇，醛和酸)的协同而不是某一种化合物^[36]。Nigam 曾经以小麦纤维素水解液发酵获得乙醇，也曾从模拟的，具有相同乙酸、糠醛、木质素衍生物浓度的合成培养基中获得乙醇^[17]。在合成培养基中，乙醇得率和产率分别比水解液中的低 74.4% 和 83%。

1.4 抑制物的脱除方法

很多种抑制物脱除方法，包括物理，化学和生物，已经应用于脱除木质纤维素来源的抑制物。一种脱毒方法是否有效取决于木质纤维素的水解以及后续所使用的发酵微生物种类。因为每种水解液含有不同的抑制物成分，并且每种微生物对抑制物的耐受能力不同^[37]。

1.4.1 物理方法

通过真空蒸发方法来减少水解液中挥发性抑制物，例如乙酸，糠醛，以及香兰素等是一种常用物理脱毒方法。然而这种方法也在某种程度上增加了非挥发性抑制物的浓度(木质素衍生物)，继而增加了发酵的抑制程度。Silva 和 Roberto 利用真空蒸发的方法脱除水稻秆水解液的抑制物，用以木糖发酵产木糖醇，他们发现木糖醇发酵过程因非挥发性抑制物浓度的升高而受阻碍，这些非挥发性抑制物对微生物的毒害非常强^[38]。

1.4.2 化学方法

化学方法是在一定 pH 下，利用沉淀使抑制物浓度降低，然后再将 pH 调整到后续发酵需要的值。还有一种是用活性碳或者离子交换树脂吸附。Marthinez 等报道使用 Ca(OH)₂ 将甘蔗渣水解液 pH 调节到 9.0，是一种非常有效的脱毒方法。在他们的试验

中，将水解液加热到 25-60℃，后一温度更适合这种脱毒。因为它脱除了 51% 的呋喃类抑制物和 41% 的苯酚类抑制物，与之同时有 8.7% 的糖损失^[39]。在这些化学脱毒方法中，离子交换树脂的成本比较高不适合工业化。唯有活性炭成本较低，并且具有较高的抑制物吸附能力。

1.4.3 物理化学联合方法

许多物理和化学方法应用于木质纤维素水解液的脱毒。Converti 等在利用几种酵母来产木糖醇。他们发现因为木质素降解产物和乙酸的存在，阻碍了发酵过程的进行。为了纯化水解液以提高发酵，他们采用不同方法的联合：最初，pH 被用 Ca(OH)₂ 调节到 10.0，然后用 H₂SO₄ 将 pH 调解到 5.5。接着，活性炭被加入到水解液中，最后进行蒸发。这里，联合了 pH 调节和活性炭吸附，对脱除木质素衍生物非常有效。活性炭降低了木质素衍生物的 95.4%，而蒸发的过程将乙酸降低到 3g/l。乙酸在这个浓度下，基本不对微生物造成抑制。这个脱毒过程对于木糖到木糖醇的转化能够正常进行，并获得 0.41g/h 生成速率和 0.63 g/g 得率^[40]。

1.4.4 生物法

微生物脱毒方法涉及使用一种专门的酶或一种微生物，使其作用于水解液中的抑制物。用 *Trametes versicolor* 产的漆酶和过氧化物酶共同作用于木头水解液，使糖耗和乙醇得率都增加。这主要是由于这两种酶对弱酸和苯酚类化合物的降解^[42]。这些酶的脱毒机理很可能是低分子量苯酚化合物的氧化聚合反应。使用微生物来降解水解液中的抑制物是具有选择性的脱除抑制物。Schneider 报道使用一种诱变的 *S. cerevisiae*。就将水解液中乙酸浓度从 6.8g/l 降低为 0.4g/l^[42]。事实上，生物脱毒法相对化学或物理脱毒法，条件温和，对设备要求不高，而且不会使其他物质损失或部分抑制物浓度增高。并且采用生物脱毒，可以使后续发酵连续。图 1.3 列出了常见的物理化学脱毒方法的应用。

表 1.3 脱毒方法以及脱毒效果

Table 1.3 Detoxification procedures and their effects

脱毒过程	脱毒效果	参考文献
蒸汽分离	脱除挥发成分（糠醛，苯酚，乙酸）	43, 44
用 CaO, NaOH, KOH 等中和， 活性炭过滤	减少乙酸浓度	43
用 Ca(OH) ₂ , CaO 或 KOH 中和 到 pH6.5 或直接调节到 pH10， 去除沉淀后用 H ₂ SO ₄ 再调节回 6.5	沉淀乙酸，重金属，糠醛，单宁酸， 萜烯，苯酚	43, 44, 45, 46
阳离子交换树脂	脱除芳香族	47
乙醚萃取	脱除芳香族单体及二聚体	48
真空蒸发	脱除糠醛	49
乙酸乙酯萃取	脱除乙酸	49

分子筛	脱除木质素降解产物	50
混合床离子树脂	部分脱除乙酸, 糠醛, 可溶性木质素	50
阴离子/阳离子交换树脂	部分脱除乙酸, 金属离子	32
漆酶或过氧化物酶	苯酚类化合物	32
真菌	呋喃类, 苯酚类, 有机酸化合物	35

1.5 木质纤维素来源有机酸光合发酵制氢

1.5.1 生物制氢的概述

在可再生清洁能源中, 原料来源广泛存在于自然界的有氢气, 甲烷, 乙醇, 甲醇和生物柴油等。其中, 氢能源是最清洁的能源, 燃烧产物只有水, 因而极具发展潜力。美国能源部, 国际氢经济联合会, 以及欧洲氢联盟都认为氢经济是一种清洁有效取代汽油经济的方式。氢作为一种能源载体, 在发电以及许多其他领域得到应用。氢气可以作为化学品的生产原料, 在石油精炼过程用以去除杂质, 或则将重油部分转为轻油部分或其他有价值的产品。汽车也可以使用氢电池, 氢电池发电机的效率是汽油发动机的 3 倍。

1.5.2 光合菌生物制氢技术

1.5.2.1 光合菌种类

光和细菌是一类能进行不产氧光和作用的一类原核生物的总称, 这类生物主要有红色硫细菌属 (*chromatium*), 红色非硫细菌红螺菌属 (*rhodospirillum*), 红微菌属 (*rhodomicrobium*), 红假单胞菌属 (*rhodopseudomonas*), 绿硫细菌属 (*chlorobium*) 等。

1.5.2.2 光合发酵制氢的机理

光合细菌在有合适的底物和一定的环境条件下, 都能进行光照放氢反应。光合细菌的固氮酶利用光合作用中产生的 ATP 为能源, 利用 NAD(P)H 提供 H^+ 和 e^- , 还原 N_2 , 生成 NH_3 , 并在氢酶的协同作用下将 H^+ 还原为 H_2 。因而, 光合细菌在光照和有机物条件下同时进行了生物固氮和光照放氢。因而光照放氢是光合细菌以有机物为电子供体, 以光源为能源, 以固氮酶和氢酶产生氢气的一种代谢反应。光合细菌产氢主要是固氮酶的作用, 固氮酶遇氧失活, 故产氢作用需要在厌氧条件下进行, 因而成为光发酵产氢。氢酶的作用是吸氢。

pH 是影响产氢菌在发酵过程性能的重要因子。不仅因为它影响产氢相关酶的酶活, 而且会影响光合菌的代谢途径。已经被报道, 在一个合适的范围内, 在发酵产氢过程中增加 pH 会使光和菌的产氢性能增加, 但是 pH 过高会导致产氢性能减弱。对于大多数批发酵模式, 只是研究发酵初始 pH 对产氢的影响。对于不同的发酵底物, 发酵菌种, 以及接菌量, 合适的 pH 是不同的。例如, Mu 在他们的研究中报道, 最佳的发酵 pH 是 4.2, 而 Zhao 和 Yu 等发现 pH7.0 才是最佳的值^[51,52]。

温度是影响菌体发酵产氢的另外一个重要因素。它对产氢性能的影响也如 pH 一样在合适的范围内呈现钟罩型。一般可以分为适温菌 (25-37°C) 和高温菌 (45°C 以上)。每种菌株, 在不同的发酵条件下, 最适温度也不一样。

光照度和光照时间影响着光合细菌所捕获的光能量与形成的ATP (Adenosine Triphosphate 腺苷三磷酸)及质子梯度。光合细菌产氢对光照度的依赖性说明直接从光源中吸收能量在光合细菌内部的氧化还原过程或电子传递过程中发挥了重要作用。光和菌发酵产氢都是在光反应器中进行,一个优化的光反应器必须能够使光源有效的被菌体吸收,从而转化为细胞体内的生物能和化学能。

光合细菌在产氢过程中还会受到其他因素影响,如有机物的种类,铵盐,氧气和一氧化碳。其中有机物的种类以及每种有机物的浓度对产氢的性能影响也是研究的热点。

1.6 本课题的研究意义

1.6.1 木质纤维素来源的有机酸生物降解

以木质纤维素为原料生产燃料乙醇,不仅可以进一步满足燃料乙醇生产的发展,而且可以解决粮食安全和能源需求之间的矛盾。木质纤维素来源广泛。可谓当今人类所拥有的最丰富的可再生能源物质^[5]。但木质纤维素发酵生产乙醇过程中,纤维素酶水解,酵母生长代谢都受抑制物的影响。有效脱毒是降低燃料乙醇工业成本经济的必经途径。生物降解木质纤维素来源的抑制物,相对其他脱毒方法有着条件温和,对抑制物降解彻底,并不影响水解液有效成分的损失等优势。该课题选择一种固体方式生物脱毒,相对已经报道的生物脱毒方法(漆酶或微生物在水解液中脱毒),能更好的保证同步糖化发酵的连续性。

1.6.2 以木质纤维素来源的有机酸,光合发酵制氢

城市废弃物、乳制品工业废水、以及以葡萄糖和淀粉发酵产生物燃料后的尾液中均含有大量的低分子挥发性有机酸。随着木质纤维素生物燃料的技术成熟,以及工业化进程提速。这个工业过程中,所产生的含有各种有机酸的废水是巨大的。生物燃料发酵废液中主要含有乙酸,甲酸,乳酸,部分残糖。这些有机酸一部分来自预处理过程,并且这些有机酸不能被发酵微生物完全利用;另外一部分来自微生物发酵过程中菌体自身代谢糖而形成的。迄今为止对光合细菌利用有机酸产氢的研究多以乳酸和乙酸为主^[53,54]。而本课题集中研究中木质纤维素来源的乙酸,甲酸,乙酰丙酸来发酵制氢,是一个新的亮点。利用木质纤维素水解液发酵制取生物燃料,并用光合细菌分解木质纤维素来源有机酸来制取氢气是具有经济价值和发展潜力的,因为它联合了生物燃料工业废水处理和氢能源的生产。

第二章 木质纤维素来源抑制物的生物降解

2.1 前言

经过各种物理，化学，或物理化学相结合方式处理后的木质纤维素，经纤维素酶进一步水解成可以被酿酒酵母利用的水解液，其中含有各种弱酸类，呋喃类，苯酚类抑制物。这些抑制物对纤维素酶活性，乙醇发酵菌株的生长和代谢都有明显的抑制作用。目前常用于抑制物脱除的方法有活性炭或离子交换树脂吸附脱除，强碱调节 pH 并沉淀抑制物，真空蒸发，以及生物降解。与其他脱毒方法相比，生物脱毒方法条件温和，不形成新的抑制物，脱毒后可以直接进入乙醇发酵过程等优势。

因此筛选一种能够快速有效降解各种抑制物的微生物，是基于木质纤维素生物燃料的生产经济性的关键技术。本章内容是从秸秆样本中通过初筛和复筛得到 3 株能有效降解各种抑制物的真菌，并对其进行分子生物学鉴定。最后选择一株生长占优势的菌株，详细研究其生长特性。选出的目标菌株用于对不同浓度下抑制物的降解，以及降解后同步糖化发酵试验。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验试剂

所有本部分实验使用的试剂如表 2.1 所示。

2.2.2 实验仪器

所有本部分实验使用的仪器如表 2.2 所示。

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	CR	上海菲达工贸有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
YEAST EXTRACT	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
D-葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
琼脂	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
糠醛	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	美国Johnson Matthey
糠醛	AR	比利时Acros
羟甲基糠醛	AR	比利时Acros
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海美兴化工有限公司
纤维素酶	AR	Genencor Internal, Rochester, NY, USA
纤维二糖酶	AR	Novo Industri A/S, Denmark
Taq酶	AR	Takara公司
(ITS)通用引物		Takara公司

表 2.2 仪器

Table 2.2 Experimental equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
高速冷冻离心机	J-25	Beckman 公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
恒温恒湿箱	LHS-150HC	上海一恒科技
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
洁净工作台	100 级 SW-CJ-IBU	上海博迅公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
气相色谱	Agilent6820	安捷伦
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
5L 发酵罐	Biotech-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司
PCR 仪	Mastercycler	Eppendorf

2.2.3 原料

2.2.3.1 预处理玉米秸秆

蒸汽膨爆预处理：在 160~240℃，0.3~2.0MPa 条件下，在蒸汽爆破装置中对粉碎烘干的秸秆处理 4 min，处理后的秸秆放置在 4℃冰箱中保存；

高温稀酸预处理：用稀硫酸预浸粉碎后的秸秆，搅拌均匀放置过夜后放入反应器进行反应，稀酸浓度 1~5%w/w，预处理时间 1~15min，预处理温度为 160~240℃，得到预处理强度不同的各种秸秆；获得的秸秆放置于 4℃冰箱中保存以备后用；

2.2.3.2 酶水解制备水解液

将预处理的玉米秸秆分批加入到 5l 反应器中。根据原料的质量和含水量，加入相应量的纤维素酶和无菌水，使糖化条件为 30%固体含量，15FPU/gDM。在 50℃，150rpm 条件水解 48 小时。水解液离心后取上清液放置冰箱中备用。

2.2.4 培养基

PDA 培养基：取去皮马铃薯 200g，切成小块，加水 1000ml。煮沸 1h，用 8 层纱布

过滤，然后补足失水至 1000ml，并添加葡萄糖 20g，琼脂粉 20g。115℃灭菌 20 min。贮存备用。该培养基用于分离各种微生物，以及目标菌株的保存。

初筛培养基：在不添加葡萄糖的 PDA 培养基上添加乙酸 6g/l；糠醛 1g/l；羟甲基糠醛 1.5g/l；

酵母种子培养基：KH₂PO₄ 2g/L；MgSO₄·7H₂O 1g/L；(NH₄)SO₄ 1g/L；Yeast extract 1g/L；glucose 60g/L；

酵母种子驯化培养基：

25%的水解液：酵母种子培养基体积/水解液体积=4/1 制取。水解液中营养盐成分和酵母种子培养基中保持一致。

50%的水解液：酵母种子培养基体积/水解液体积=2/1 制取。水解液中营养盐成分和酵母种子培养基中保持一致。

柠檬酸缓冲溶液：0.05M/L 的柠檬酸溶液(A)，0.05M/L 的柠檬酸钠溶液 (B)，A 和 B 按照体积 2:1 混匀，并用 pH 电极微调使溶液 pH 为 4.8。

2.3 研究方法

2.3.1 生物脱毒的真菌筛选

分离菌落：

(1) 称量样品秸秆 10g，加入 250ml 摇瓶中。其中摇瓶里装有 90g 无菌水。最后放入 150rpm, 30℃摇床中混匀 2h，即得 10⁻¹ 菌悬液。

(2) 以 100μml 菌悬液+900μml 无菌水的方法进行稀释分别得到以下几个梯度的菌液：10⁻² 10⁻³，10⁻⁴，10⁻⁵，10⁻⁶，10⁻⁷，10⁻⁸。每个梯度的菌液涂布 PDA 平板 3 个。将平板放入 25℃培养箱中进行培养。

(3) 培养 5 天后选择单菌落分布均匀并且浓度合适的平板，根据菌落形态以及颜色差别，用接种针挑取单菌落进行划线分离。每种同形态的菌落划 5 块平板。放入 25℃恒温箱中进行培养。

(4) 将已经分离出的菌落，在新的 PDA 平板中，连续传代 5 次以保证得到纯的单菌落。将分离的单菌落放置到 4℃冰箱中保存。

初筛

将分离的单菌落，一一接种到初筛培养基中，放置于 25℃恒温箱中培养。两种对照：抑制物和葡萄糖都不含的 PDA 培养基；另一种是没有抑制物，但有葡萄糖的 PDA 培养基。观察菌落生长的速度，和菌落大小的差异。挑选能在筛选培养基平板上生长速度快，并且菌落形状大的菌株。将挑选的菌株划线接种于 PDA 试管斜面中，放置于 25℃培养 5 天，菌落布满整个试管时放置到 4℃冰箱中保存。

复筛

(1) 制备种子液

用无菌水，将经过初筛，保存于 PDA 试管斜面中的菌株洗脱下来，以获得菌悬液。

取 1ml 菌悬液，稀释后在血球计数板上用显微镜计数，并根据计数结果对原来菌悬液进行适当稀释，使菌落浓度为 $10^6 \sim 10^7$ cell/ml。

(2) 在预处理秸秆中脱毒

称量 10g 含水量 50% 的蒸汽膨爆秸秆放入到 250ml 摇瓶，将 1ml 稀释好的菌悬液均匀接入其中，瓶口用棉塞封闭。将摇瓶放置于 25℃ 恒温箱培养 3 天。以没有接菌的装有同样秸秆的摇瓶做对照。

(3) 脱毒后秸秆同步糖化发酵生产乙醇

每个摇瓶（包括对照样）中加入柠檬酸缓冲溶液 39ml，纤维素酶 1.25ml(固含量 10%，酶活 15FPU/gDM)。在 50℃，200rpm 的条件下，水浴摇床中糖化 12 小时。同时酵母种子在种子培养基中，37℃，150rpm 条件下活化 20 小时。秸秆糖化 12 小时后，每个摇瓶接入酵母种子液 5ml(接种量 10%)。在 37℃，150rpm 条件下发酵 24 小时。用超纯水将糖化 12 小时的水解液和发酵 24 小时的发酵液稀释 10 倍，经 0.2um 膜过滤后，高效液相分析其中抑制物和乙醇浓度。

2.3.2 表征型特征鉴定

用接种环将通过复筛的菌株，从相应的 PDA 平板中挑取少量新鲜的菌丝在干净玻片上。玻片上已经点有少量无菌水。风干后固定，用光学显微镜观察各菌株的形态特征。

2.3.3 分子生物学鉴定

2.3.3.1 菌丝基因组 DNA 提取

(1) 0.008g 菌丝样品，石英砂研钵研磨，移至 1.5mL 管，加 25μl 20%SDS，加 700μl 尿素提取液（7 mol/L Urea、50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、62.5mmol/L NaCl、1%SDS），50μl 溶菌酶，旋涡混匀；

(2) 37℃ 水浴 30min，加 700μl 氯仿：异戊醇(24:1)，小心混合，12000rpm 离心 5min；

(3) 取上清液，加等体积的氯仿：异戊醇(24:1)，小心混合，12000rpm 离心 5min；

(4) 取上清液，加等体积的异戊醇，10% 体积的 NaAc(pH5.2) 溶液，-20℃ 沉淀 20min；

(5) 12000rpm 离心 5min，弃上清液，用 70% 乙醇洗沉淀 3 次，干燥后加 100μl TE 充分溶解，-20℃ 保存。

2.3.3.2 真菌核糖体 rDNA ITS 的 PCR 扩增及测序

采用真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)通用引物

ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAG ATA TGC-3')

在 PCR 仪上扩增 ITS1/5.8S/ITS2 区域。

反应程序为：

94℃ 预变性 5 min，进入循环，94℃ 变性 45 S，55℃ 退火 30 S，72℃ 延伸 1 min，共 32 个循环，最后 72℃ 延伸 7 min。反应结束后，取 8 μl 样品在 1.0% 的琼脂糖凝胶于 1×TAE 中电泳，并用 Bio-rad 凝胶成像系统照相。扩增产物由上海生工测序。

PCR 的反应混合液的总体积为 25 μl：

2.5 μl 10 \times PCR 反应缓冲液, 2 μl 2.5 mM Mg^{2+} , 2 \times 0.25 μl 20 μM 的引物, 4 \times 1 μl 2.5 mM 的 dNTP, 1.25 单位 Taq 酶, 模板 DNA 若干, 离心后加 1 滴石蜡油。

2.3.3.3 序列分析

用Bioedit软件对本研究中所测定的ITS序列分析其同源性, 在NCBI对上述种的ITS进行BLAST比对, 再利用Mega4软件中邻接法(neighbour-joining methods, NJ)构建聚类分析树状图。

2.3.4 三种菌降解抑制物效果的比较

用无菌水从三种菌株的试管斜面中洗脱孢子, 并进行相应的稀释, 分别获得 $10^6\sim 10^7$ 的孢子悬液。各取 1ml 悬液加入到装有 10g 含水量为 50% 的蒸汽膨爆秸秆的 250ml 摇瓶中。每种菌都接 5 个同样的摇瓶。将摇瓶放置到 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养。每天培养有每种菌的摇瓶各取一个, 加入柠檬酸缓冲溶液 45ml。在水浴摇床中, 50 $^{\circ}\text{C}$, 200rpm 条件下糖化, 12 小时每个摇瓶取样。

2.3.5 A. resinae ZN1 在预处理秸秆中生长特性

pH: 用氢氧化钠和稀硫酸溶液, 将蒸汽膨爆预处理秸秆的 pH 调节到 7 个梯度(3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0)。将上述含水量 50%, 10g 各种 pH 的秸秆装入到 250ml 摇瓶, 高温灭菌后接入 1ml (10^6 个/ml) 菌悬液到秸秆中。摇瓶统一放置 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天后, 加入无菌水 90ml 进行摇匀 2 小时 (180rpm), 稀释涂布 PDA 平板, 放置到 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱继续培养, 计算菌落数。

温度: 10g 含水量 50% 秸秆装入 250ml 摇瓶中, 高温灭菌后向摇瓶中接入 1ml (10^6 个/ml) 菌悬液后分别放置到 (15、20、25、28、32、37 $^{\circ}\text{C}$) 恒温箱中培养 3 天, 加入无菌水 90ml, 摇匀 2 小时 (180rpm), 稀释后涂布 PDA 平板, 放置到 25 $^{\circ}\text{C}$ 中培养, 以计算菌落数。

溶氧: 10g 含水量 50% 秸秆装入 250ml 摇瓶中, 高温灭菌后向摇瓶中接入 1ml (10^6 个/ml) 菌悬液。一种摇瓶充氮气, 用橡胶塞封闭; 另外一种摇瓶直接用棉塞封闭。两种都放置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 3 天。加入无菌水 90ml, 摇匀 2 小时 (180rpm), 稀释后涂布 PDA 平板, 放置到 25 $^{\circ}\text{C}$ 中培养, 以计算菌落数。

2.3.6 秸秆脱毒前后纤维素含量测定

物料中纤维素和半纤维素(木聚糖)含量的测定根据 NREL 生物质结构组成成分测定方法^[59]并稍作修改, 主要步骤为: 准确称取未脱毒的秸秆和脱毒后的秸秆 100mg, 在 115 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重的。洗涤烘干后的滤渣装入 30mL 具塞压力管中, 然后加入 1mL 72% H_2SO_4 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 60min, 并用玻璃棒每隔 5-10min 搅拌一次, 待达到反应时间后向压力管中加入去离子水 28mL 将 H_2SO_4 浓度调至 4%, 然后将塞子塞紧并用纱布扎紧, 置于高温自动灭菌锅中于 121 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1h, 待反应完成并冷却至室温后加入 CaCO_3 调节 pH 至 5-6 后通过 HPLC 测定。

此实验需同时用已知浓度的葡萄糖和木糖溶液进行相同处理, 并计算其糖得率绘制标准曲线加以校正。

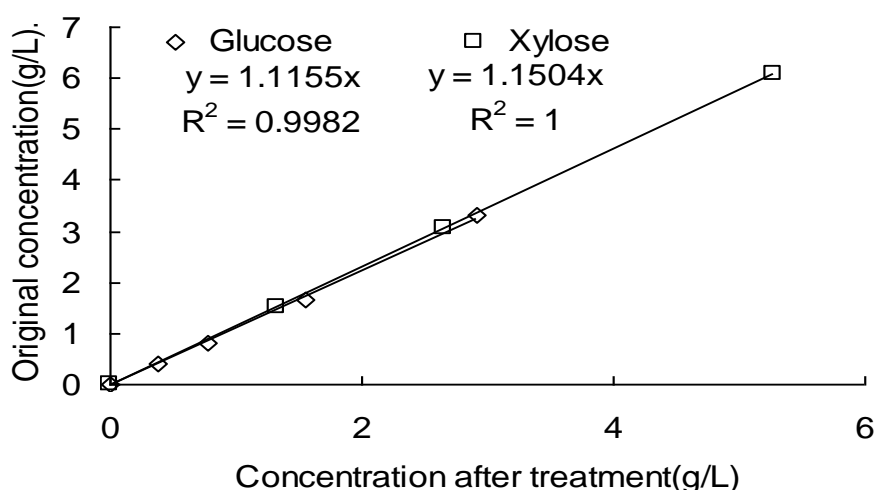


图 2.1 纤维素和半纤维素含量测定中葡萄糖和木糖校正标准曲线

Figure 2.1 Calibration curve for detection of glucose and xylose in cellulose and hemicellulose.

2.3.7 *A. resiniae* ZN1 对各种抑制物的降解

2.3.7.1 种子培养

用无菌水从试管斜面中洗脱孢子，并进行相应的稀释，分别获得 $10^6 \sim 10^7$ 的孢子悬液。以 10% 的接种量接入到含水量为 50% 的蒸汽膨爆秸秆中。放置到 25℃ 恒温箱中培养到有菌丝在秸秆表面生长，以作为后面实验的种子秸秆。

2.3.7.2 单独抑制物的降解

称量 5g 干的蒸汽膨爆秸秆放入 250ml 摇瓶中。高温灭菌，每个摇瓶中加入 8g 含有乙酸的无菌水（使 10% 固含量的水解液中，乙酸浓度分别为 2g/l, 6g/l, 8g/l），然后接入已经长好菌体的种子秸秆 1.3g，混均匀，放置 25℃ 培养 5 天。

摇瓶糖化与发酵试验过程：每个摇瓶加入 37ml, pH4.8 的柠檬酸缓冲溶液，1.15ml 纤维素酶。在 50℃, 200rpm 条件下，糖化 12 小时。接入 25% 水解液驯化的酵母种子液。10% 酵母种子接种量。放置 37℃, 150rpm 条件下发酵 24 小时。检测糖化 12 小时水解液和发酵 24 小时的发酵液中各种抑制物，葡萄糖，乙醇的浓度。

同样方法，向秸秆中分别单独添加甲酸，乙酰丙酸，糠醛，羟甲基糠醛。使秸秆在 10% 固含量，15FPU 条件下水解后水解液中，甲酸，乙酰丙酸，糠醛，羟甲基糠醛的浓度分别为 (0g/l, 7g/l, 13g/l)；(2g/l, 7g/l, 13g/l)；(0g/l, 1g/l, 5g/l)；(0g/l, 2g/l, 5g/l) 进行脱毒后同步糖化发酵产乙醇。

2.3.5.3 混合抑制物的降解

称量 5g 干的蒸汽膨爆秸秆放入 250ml 摇瓶中，高温灭菌后每个摇瓶中加入 8g 含有混合抑制物的无菌水，接入种子秸秆 1.3g，混均匀，放置 25℃ 连续培养 5 天。每天取培养相应天数的摇瓶放置 -20℃ 冰箱以终止 *A. resiniae* ZN1 的生长。5 天后，没有接菌脱毒对照摇瓶和连续脱毒处理的摇瓶一起糖化与发酵。糖化与发酵的操作如同单独抑制物的降解后同步糖化操作。

2.3.8 不同稀酸预处理条件下的秸秆抑制物降解

2.3.8.1 不同强度的稀酸预处理

轻度处理的条件为：1.5%稀硫酸，预处理时间为 3 分钟，温度为 180℃；

中度处理的条件为：2%稀硫酸，预处理时间为 4 分钟，温度为 190℃；

高强度处理的条件为：4%稀硫酸，预处理时间为 9 分钟，温度为 200℃。

2.3.8.2 抑制物降解后的秸秆同步糖化发酵

用氢氧化钠溶液调节三种强度稀酸处理条件下的秸秆，使其含水量和 pH 分别为 60%和 5.0。分别称量 10g 秸秆，放入到 250ml 摇瓶中，并接入 1g 长有菌丝的秸秆，搅拌均匀。放置于 25℃恒温箱中培养 4 天。统一摇瓶同步糖化发酵。检测糖化 12 小时水解液中抑制物和 24 小时发酵液中乙醇浓度。

2.3.9 抑制物降解后玉米秸秆高固体含量同步糖化发酵

2.3.9.1 种子培养

用无菌水从试管斜面中洗脱孢子，并进行相应的稀释，分别获得 $10^6 \sim 10^7$ 的孢子悬液。以 10%的接种量接入到含水量为 50%的蒸汽膨爆秸秆中。放置到 25℃恒温箱中培养到有菌丝在秸秆表面生长。

2.3.9.2 抑制物生物降解

将已经培养好的一级种子秸秆接入到新鲜秸秆中（10%接种量，含水量 60%，稀酸处理的秸秆先用氢氧化钠调节 pH 到 5~6），放置到 25℃条件下培养。根据预处理方式不同，脱毒时间不同。以秸秆上均匀长有菌丝为处理合适时间。

2.3.9.3 酵母种子驯化

将-80℃保存的酵母冻存管(2ml)接入 100ml 摇瓶，摇瓶里装有 20ml 酵母种子培养基。在 37℃，150rpm 条件下使用不同浓度的水解液进行两级驯化。根据所需种子体积不同，50%水解液体积和摇瓶体积不一样，始终保持 10%的接种量，1/5 的装液量。

2.3.9.4 5L 发酵罐高固体含量同步糖化发酵

把经过 *A. resinae* 脱毒的秸秆加入到 5L 发酵罐中。在 30%固含量，15FPU/gDM 酶活条件下进行糖化 12h，再接入 10%已驯化的酵母菌种子液。37℃，150rpm 条件下发酵 60 小时。糖化和发酵过程定时取样，样品进行稀释膜过滤后高效液相分析其中各种抑制物浓度和乙醇浓度。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 初筛结果

经过在 PDA 上传代分离，总共从样本中分得 14 株菌，依次命名为：ZN1、ZN2、ZN3、ZN4、ZN5、ZN6、ZN7、ZN8、ZN9、ZN10、ZN11、ZN12、ZN13、ZN14。PDA（含葡萄糖）培养基上添加乙酸 6g/l、糠醛 1g/l、羟甲基糠醛 1.5g/l 作为初筛培养基（Y）。因为大多数条件下，木质纤维素水解液中这三种抑制物是主要的，对酿酒酵母的影响也是最为明显的。选择两种对照：一种不含葡萄糖和抑制物的 PDA 培

培养基 (C1), 一种不含抑制物但含葡萄糖的 PDA 培养基(C2)。筛选结果如下表:

表 2.3 分离的 14 株菌在筛选培养基和对照培养基上的生长状态

Table 2.3 Growth performance on the isolation and control plates for the 14 separated strains

菌种	对照培养基 C1	对照培养基 C2	筛选培养基
ZN1	+++	+++	+++
ZN2	++	+++	++
ZN3	+++	+++	+++
ZN4	+	+++	+
ZN5	0	+++	0
ZN6	+	+++	0
ZN7	++	++	0
ZN8	0	++	+
ZN9	+	+++	0
ZN10	+	++	0
ZN11	+++	+++	0
ZN12	++	+++	+
ZN13	++	+++	+
ZN14	++	++	0

+++菌落个数很多且形态大; ++菌落数和形态居中; +菌落数很少; 0 没有菌落。

含抑制物的 PDA 培养基作为初筛培养基 (Y); 不含葡萄糖和抑制物的 PDA 培养基 (C1); 不含抑制物但含葡萄糖的 PDA 培养基(C2)。

从上表可以看出: ZN1、ZN2、ZN3 都能在筛选培养基生长, 而且状态良好, 但 ZN2、ZN3 在 C1 培养基中的生长要稍弱于 ZN1, 说明它们对葡萄糖的依赖比 ZN1 要强。

2.4.2 复筛结果

将初筛出的三株菌 (ZN1、ZN2、ZN3) 直接用于蒸汽膨爆预处理的玉米秸秆脱毒, 并用摇瓶同步糖化发酵生产乙醇来检验脱毒效果, 实验结果如图 2.2 和 2.3 所示。

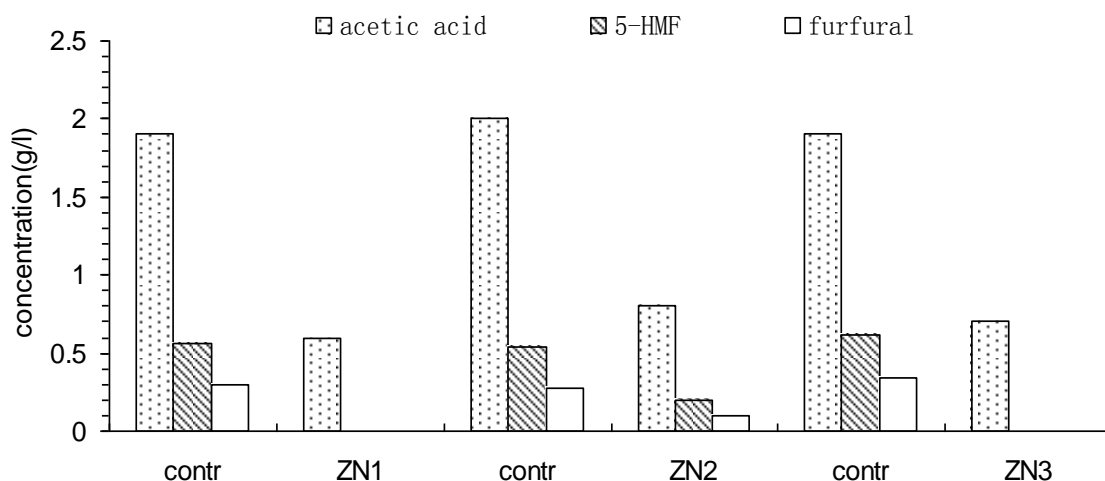


图 2.2 蒸汽膨爆秸秆经过脱毒前后，水解液中抑制物变化

Figure 2.2 Changes of inhibitors in hydrolysates after pretreated stover was detoxified

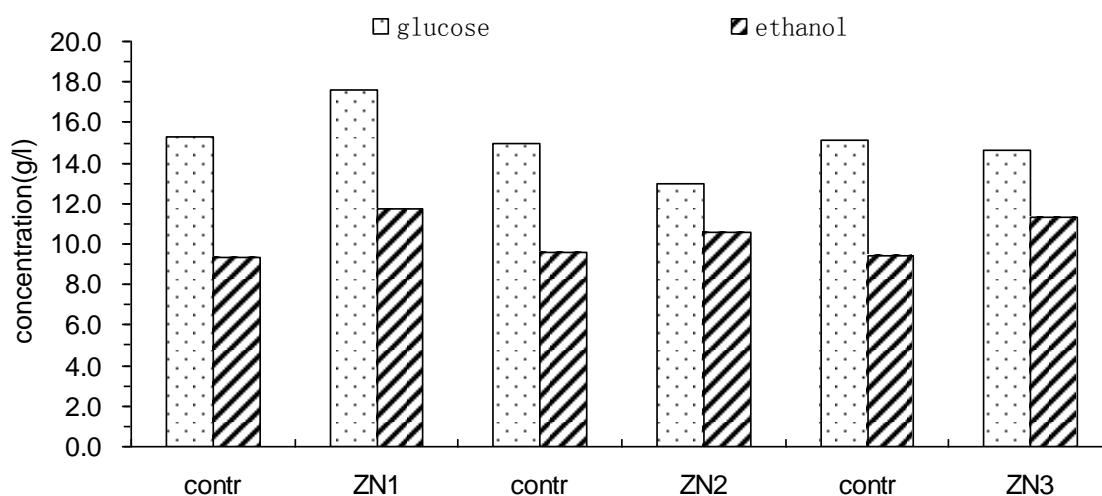


图 2.3 蒸汽膨爆秸秆脱毒前后，水解液中葡萄糖和乙醇的变化

Figure 2.3 Changes of glucose and ethanol in hydrolysate after pretreated stover detoxified

contr: 秸秆没有经过生物脱毒直接糖化和发酵的结果;

ZN1: 秸秆经 ZN1 脱毒后糖化和发酵的结果;

ZN2: 秸秆经 ZN2 脱毒后糖化和发酵的结果;

ZN3: 秸秆经 ZN3 脱毒后糖化和发酵的结果;

从图 2.2 和 2.3 可以看出: ZN1、ZN2 和 ZN3 都对乙酸, 糠醛, 羟甲基糠醛有明显降解。脱毒效果最好的是 ZN1, 不仅降解抑制物, 而且糖化后糖含量比没有脱毒前高。对照组的发酵液中乙醇浓度在 9g/l 左右, 而经过 ZN1、ZN2 和 ZN3 脱毒后的发酵液中, 乙醇浓度分别为 11.5g/l、10.6g/l 和 11.2g/l。ZN2 和 ZN3 并没有使脱毒后的糖浓度升高, 但脱毒后的乙醇浓度比脱毒前乙醇浓度高。

2.4.3 表型特征鉴定

在 PDA 培养基中 ZN1、ZN2 和 ZN3 的生长生长状态分别如下图:



图 2.4 三种菌在 PDA 上生长状态

Figure 2.4 Growth performance of the three strains on PDA plates

ZN1 的形态特征: 在 25℃ 培养一周, 菌落直径为 1 cm。正面是咖啡色, 绒毛状, 反面是墨绿色。在显微镜下可以看到菌丝有隔, 并且产囊体呈现螺旋式卷曲, 产囊体下部菌丝包围形成子囊果, 具有不整子囊菌纲真菌的形态特征。

ZN2 的形态特征: 在 25℃ 培养 3 天开始出现菌落, 最初是白色, 一周后菌落中心出现绿色, 并且越来越深, 布满整个菌落。菌落比较规则整齐, 中心外凸。在显微镜下观察: 菌丝有横隔, 分生孢子梗也有横隔, 具有青霉的形态特征。

ZN3 的形态特征: 在 25℃ 培养, 第五天开始出现菌落, 最初颜色比较淡, 透明, 菌落薄。颜色逐渐加深, 在菌落反面可以看见绿色斑点, 褶皱, 而表面是粉末状。在显微镜下可以观察到: 菌丝中有梗, 梗上紧密连接的成串的青色分生孢子, 孢子囊的形状像扫帚, 具有霉菌形态特征。

2.4.4 分子生物学鉴定结果

2.4.4.1 DNA 扩增结果

ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对三株菌基因组 DNA 扩增后, 扩增出大概 550bp 左右条带。结果如下图

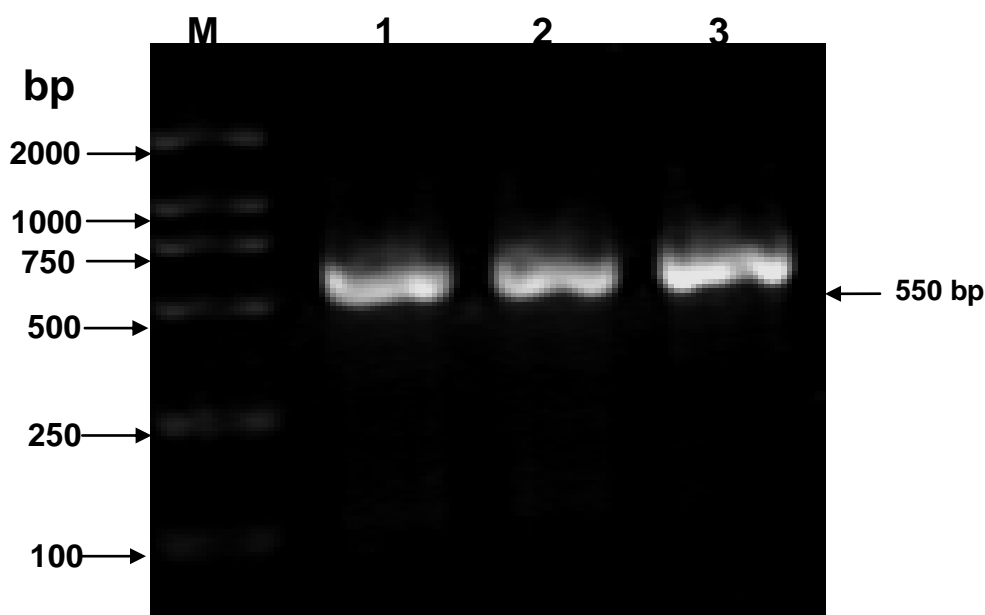


图 2.5 引物 ITS1/ITS4 对真菌的扩增图

Figure 2.5 Primer amplification of fungi ITS1/ITS4 map

M: DL2000 的 Marker; 1: ZN3; 2: ZN1; 3: ZN2

2.4.4.2 真菌序列分析及系统进化树

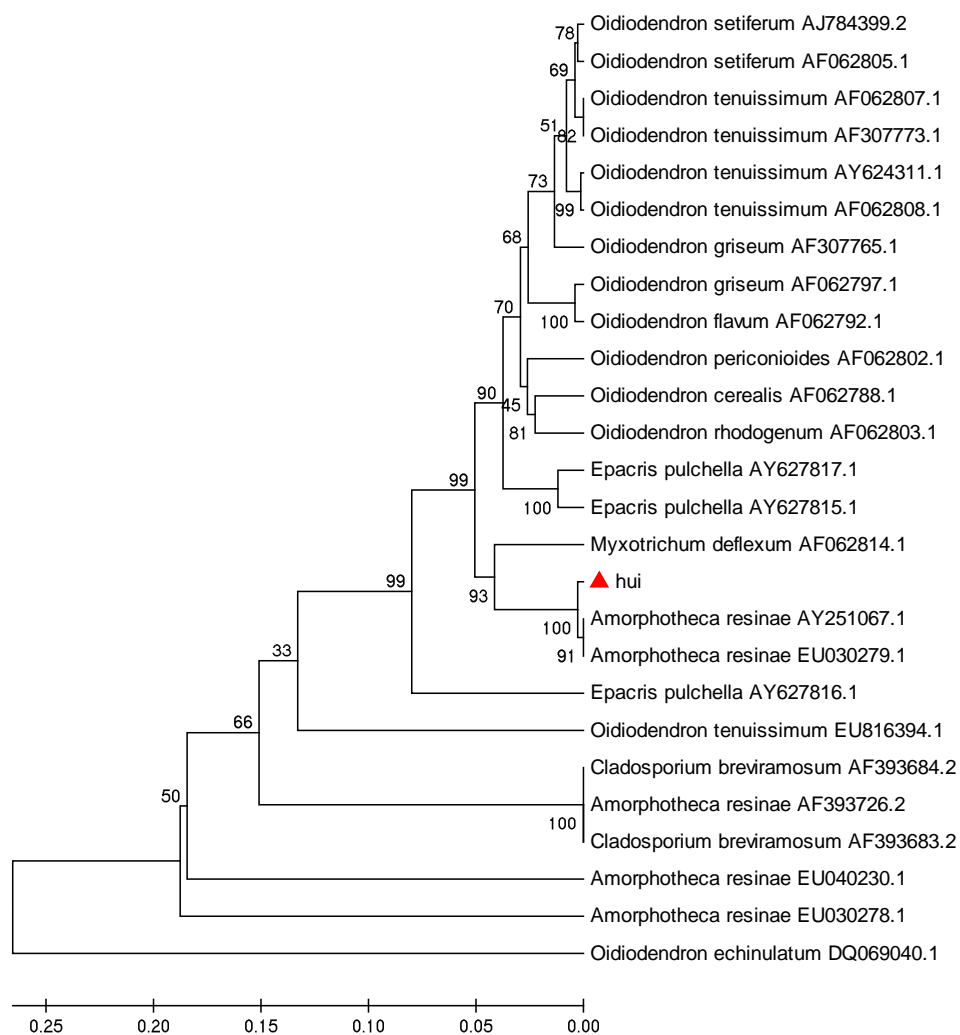


图 2.6 ZN1 菌株的系统进化树

Figure 2.6 Phylogenetic tree for strain ZN1

比对结果表明，ZN1 菌株的 ITS 序列和 *A. resinae* 最为相似（相似度 98%），选取其近似种的 ITS 比对并构建系统进化树（图 2.6）。通过对该菌 ITS 序列分析，选取近似种序列构建系统进化树。

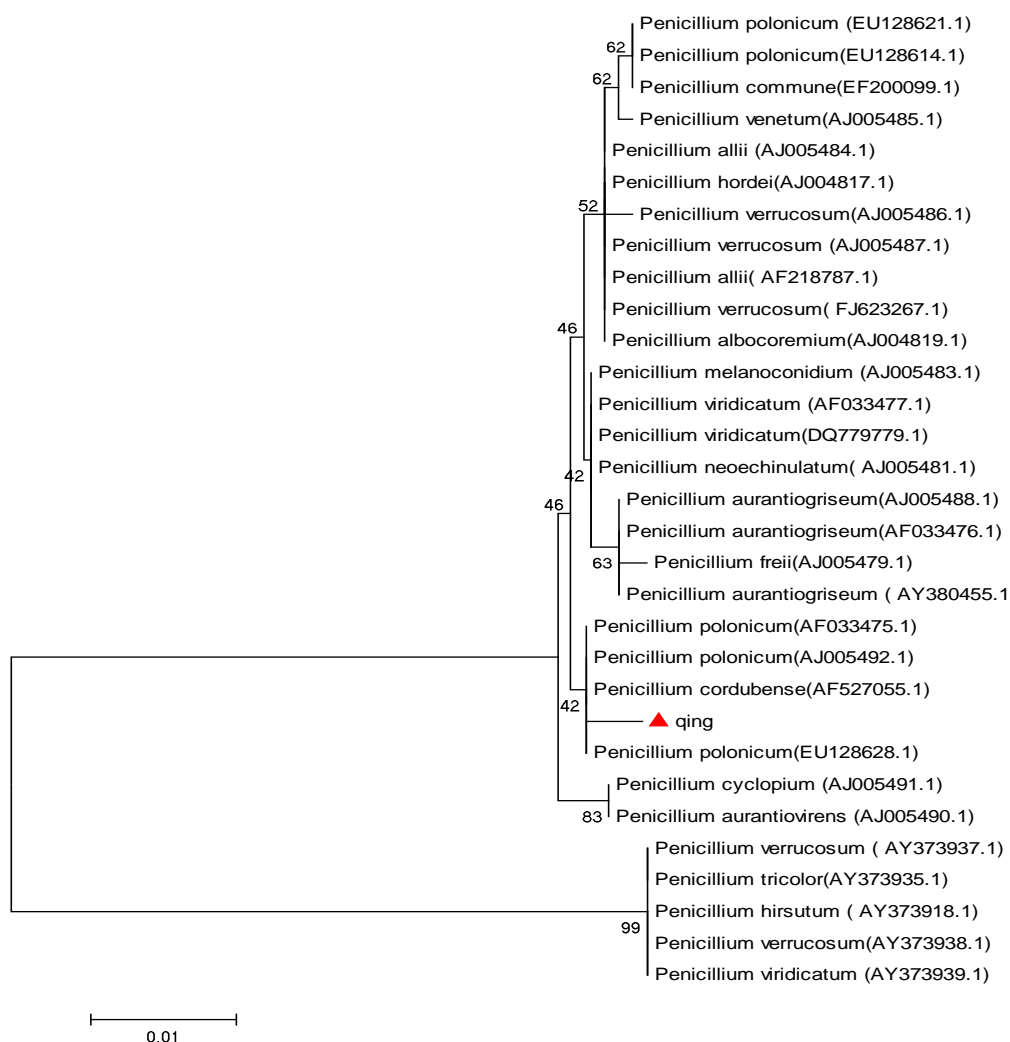


图 2.7 ZN2 菌株的系统进化树

Figure 2.7 Phylogenetic tree for strain ZN2

比对结果表明，ZN2 菌株的 ITS 序列和 *Penicillium polonicum* 最为相似（相似度 98%），选取其近似种的 ITS 比对并构建系统进化树（图 2.7）。

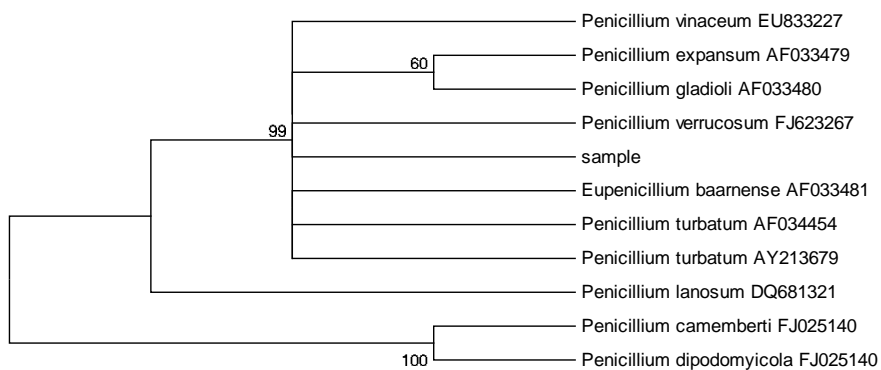


图 2.8 ZN3 菌株的系统发育树

Figure 2.8 Phylogenetic tree for strain ZN2

对 ZN3 菌株的 ITS 序列分析,选取其近似种的 ITS 比对并构建系统进化树(图 2.8)。

结果表明样品与两个种非常相似，相似度达到 99%，三个种分别为 *Penicillium turbatum* 不整青霉, *Eupenicillium baarnense* 巴恩真青霉。这两个种在一些分类上被归为同一个种，而且它们的序列也几乎完全一样，只是青霉是无性生长，而真青霉是有性生长，由此判断该菌种是 *Penicillium turbatum* (*Eupenicillium baarnense* 有性)。

2.4.5 三种菌降解抑制物效果的比较

ZN1、ZN2 和 ZN3 都能降解蒸汽膨爆秸秆中的抑制物，并使发酵液中乙醇的浓度增加。但生物脱毒法的广实用性要求：既需要对不同预处理方法和条件下的木质纤维素脱毒，还需要应用于不同的木质纤维素生物产品的生产工艺中。目标微生物要适应于比较广泛的生长条件，而且对抑制物的降解速度也必须快速。在这部分实验，比较三种菌对蒸汽膨爆秸秆中各种抑制物降解效果和葡萄糖的生成的影响，如下图 2.9-2.11

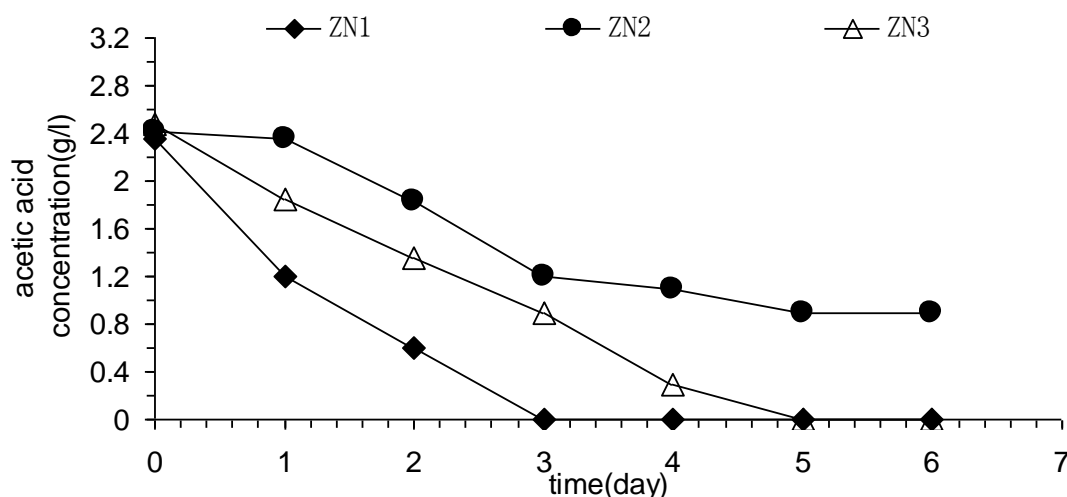


图 2.9 三种菌对蒸汽膨爆秸秆中乙酸的脱毒比较

Figure 2.9 Comparing detoxification of acetic acid by the three strains on steam-explosion stove

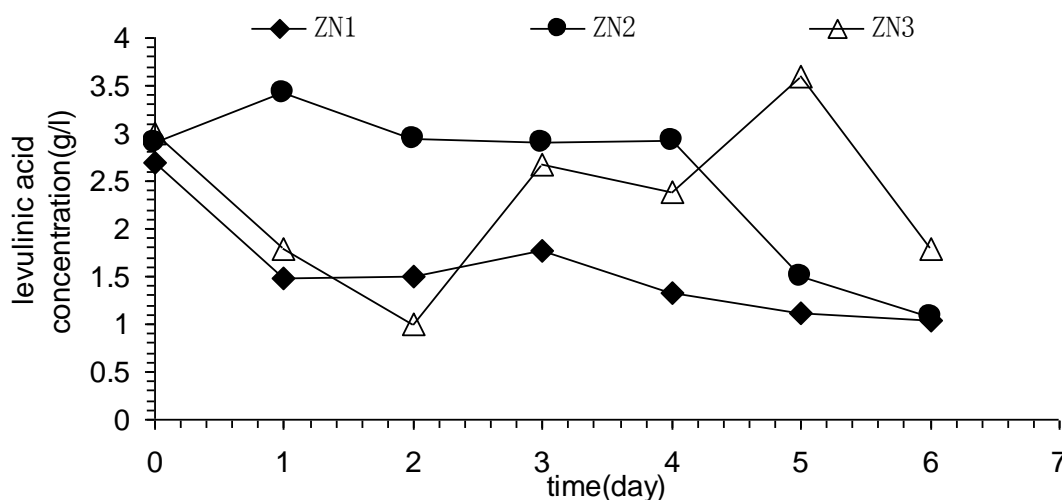


图 2.10 三种菌对蒸汽膨爆秸秆中乙酰丙酸的脱毒比较

Figure 2.10 Comparing detoxification of levulinic acid by the three strains on steam-explosion stove

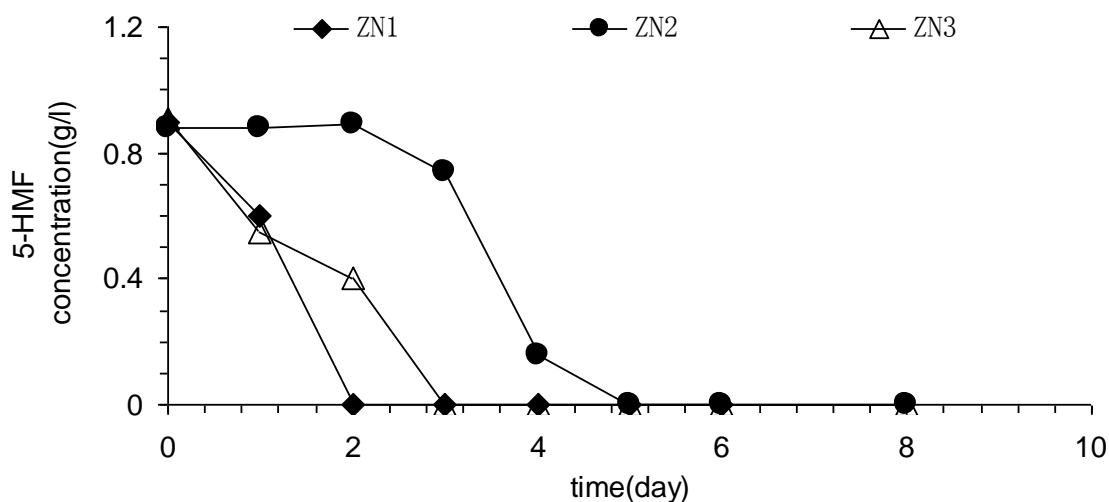


图 2.11 三种菌对蒸汽膨爆秸秆中 5-HMF 的脱毒比较

Figure 2.11 Comparing detoxification of 5-HMF by the three strains on steam-explosion stover

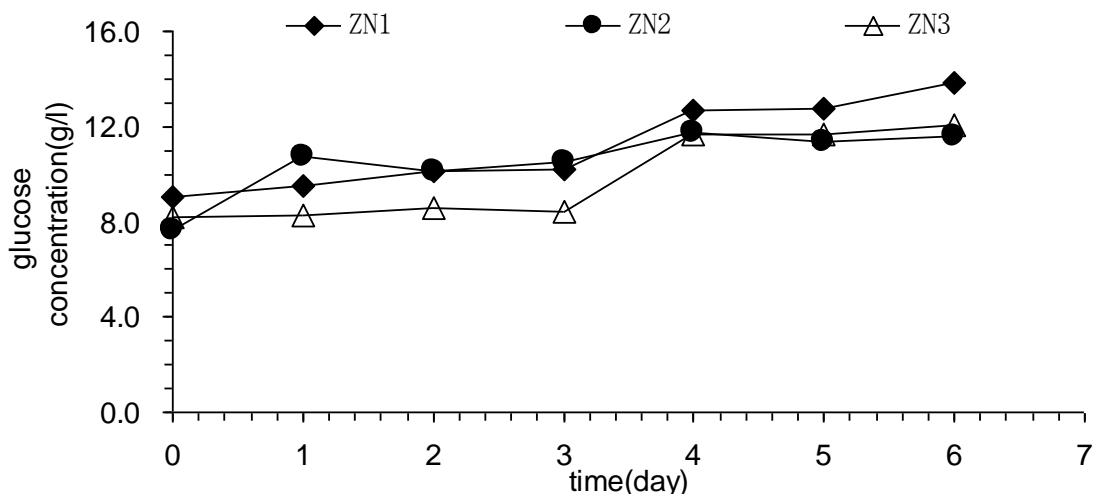


图 2.12 三种菌对蒸汽膨爆秸秆连续脱毒 6 天, 10%水解液中葡萄糖的浓度比较

Figure 2.12 Comparing glucose concentration in 10% solid loading hydrolysate after detoxification by three strains for 6 days

ZN1: *Amorphotheca resinae* ZN1;

ZN2: *Penicillium polonicum* ZN2;

ZN3: *Penicillium turbatum* ZN3;

从图 2.9 和 2.11 中可以看出:对乙酸和 5-HMF 的降解,降解速度按照 *A. resinae* ZN1、*P. turbatum* ZN3、*P. polonicum* ZN2 依次减慢。*P. polonicum* ZN2 脱毒 6 天不能将乙酸完全降解掉,而前两者基本能在 3 天时间内将 2g/l 的乙酸, 1g/l 的羟甲基糠醛完全降解掉。图 2.10 表明对乙酰丙酸,降解最为明显的是 *A. resinae* ZN1,而其他两种菌基本无明显降解。

从图 2.12 可以看出,三种菌对葡萄糖的生成影响趋势分别是:*A. resinae* ZN1 和 *P. turbatum* ZN3 随着脱毒时间的增加,葡萄糖有增加,前者增加更多。而 *P. polonicum* ZN2

葡萄糖处于波动状态。这也许跟它本身消耗葡萄糖有关。

综上所述, *A. resinae* ZN1 在对抑制物的降解速度和对葡萄糖生成的影响上都比其他两种有优势。在脱毒过程中, 摇瓶里秸秆中最早出现 *A. resinae* ZN1 菌丝。另外, 将 *A. resinae* ZN1 和 *P. turbatum* ZN3 联合培养脱毒时, 用无菌水从已有菌丝秸秆中洗脱孢子获得菌悬液后, 涂布 PDA 平板发现: 最初以 1: 1 接种于秸秆中的两种菌, 最后只有 *A. resinae* ZN1 存在。

2.4.6 *A. resinae* ZN1 在秸秆中生长特性

通过 2.4.5 实验结果可以得出, *A. resinae* ZN1 是比较理想用于生物脱毒的微生物。而在这部分实验中, 将对 *A. resinae* ZN1 在蒸汽膨爆秸秆中生长特性 (pH, 温度, 溶氧) 研究以优化 *A. resinae* ZN1 在脱毒广泛应用的条件。

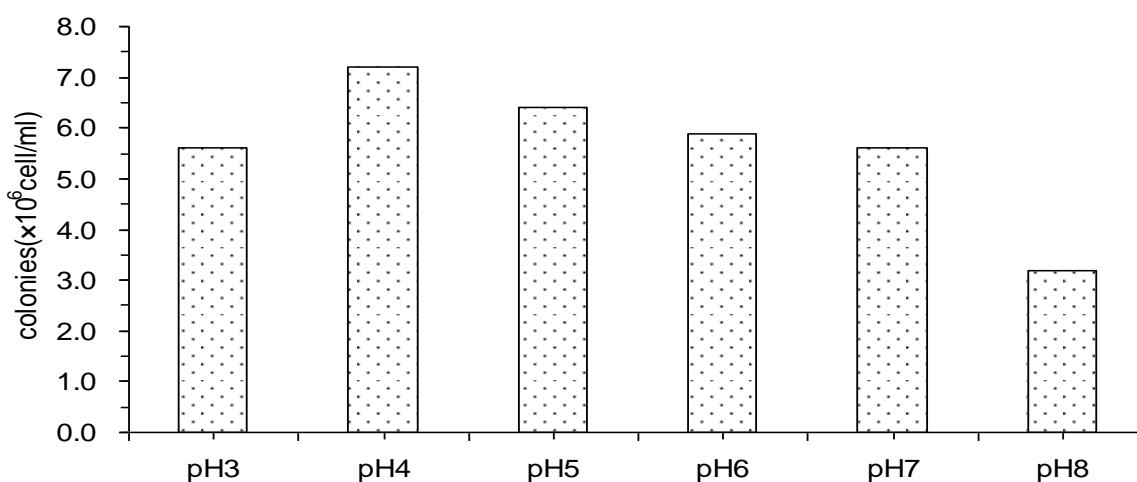


图 2.13 蒸汽膨爆秸秆初始 pH 对 *A. resinae* ZN1 生长的影响

Figure 2.13 Effect of initial pH to *A. resinae* ZN1 growth on the steam-explosion stover.

在蒸汽膨爆秸秆中, *A. resinae* ZN1 对 pH 不敏感。从 3 到 8 都能很好的生长, 最适合的 pH 是 4~6。这可能是蒸汽膨炸秸秆中抑制物浓度不高, 对 *A. resinae* ZN1 的影响不大。但是在用中等强度稀酸预处理的秸秆, 分别在 pH 从 3 到 8 这个区间研究发现: 在 3 和 8 两个区域不生长, 而 4, 5, 6 之间基本无差异。这表明当抑制物浓度比较高时, *A. resinae* ZN1 不能在偏酸或偏碱环境生长。所以稀酸预处理的秸秆, 必须先用氢氧化钠溶液调节秸秆的含水量和 pH, 使其在 4~6 之间。

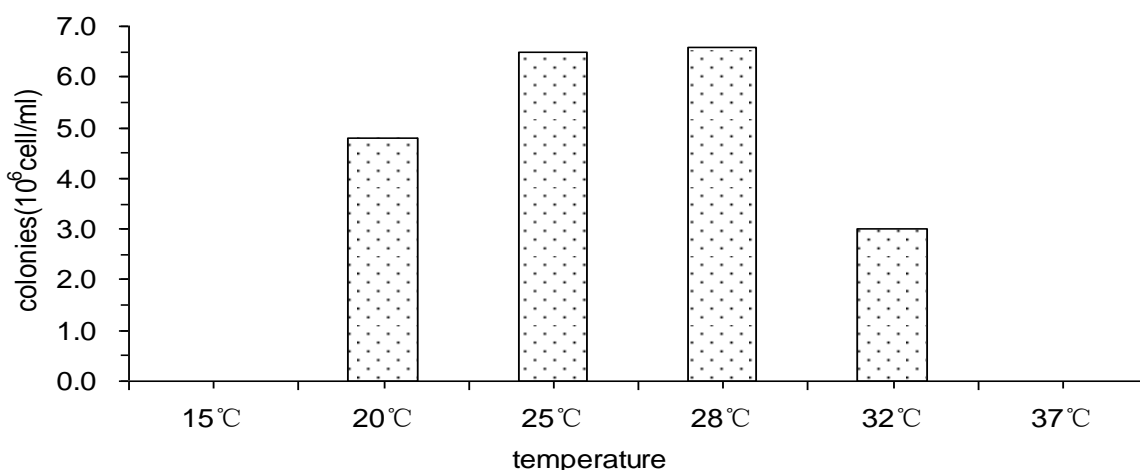


图 2.14 在蒸汽膨爆秸秆中，温度对 *A. resinae* ZN1 生长的影响

Figure 2.14 Effect of temperature to *A. resinae* ZN1 growth on the steam-explosion stover.

如图 2.14 表示：温度对 *A. resinae* ZN1 的影响要明显于 pH。在 20°C 以下和 32°C 以上，*A. resinae* ZN1 的生长都受限制。但在室温条件下，该菌都能生长而且生长状态差异不大。

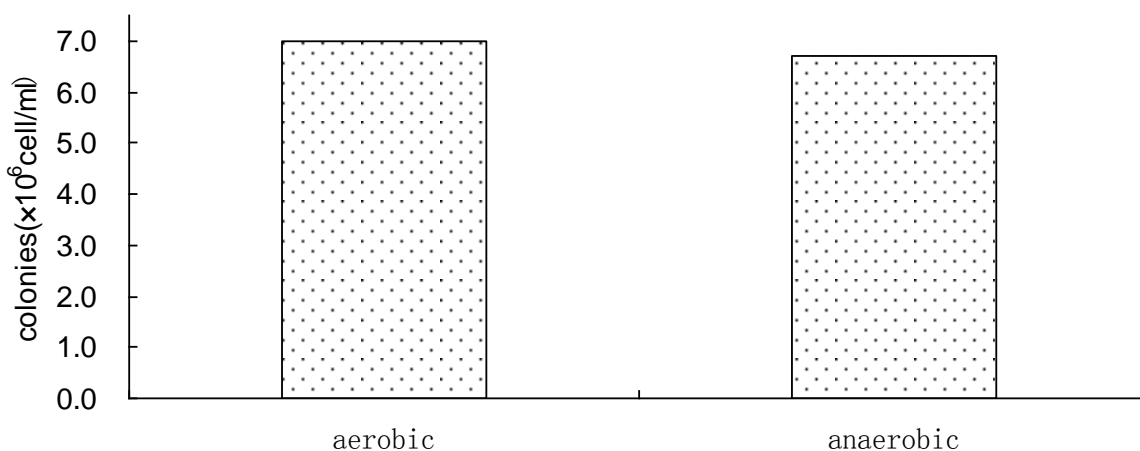


图 2.15 在蒸汽膨爆秸秆中，氧气对 *A. resinae* ZN1 生长的影响

Figure 2.15 Effect of O₂ to *A. resinae* ZN1 growth on the steam-explosion stover.

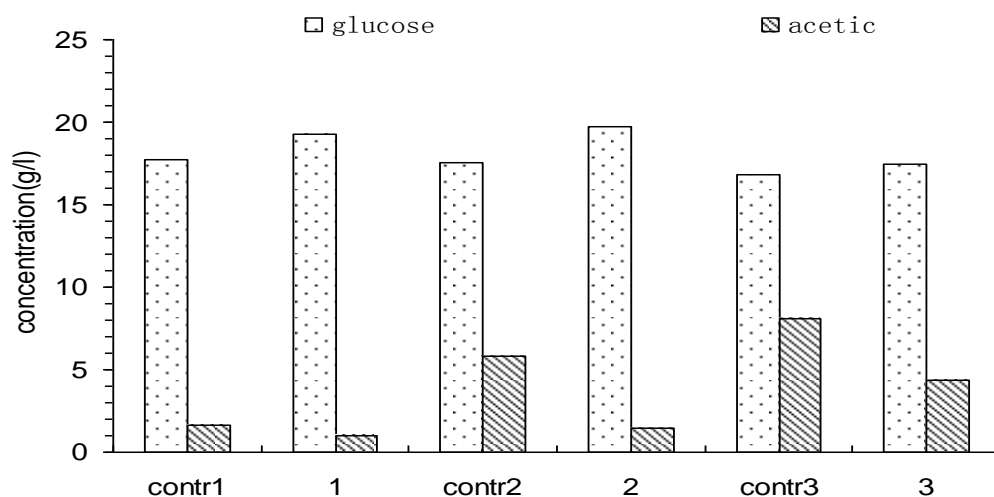
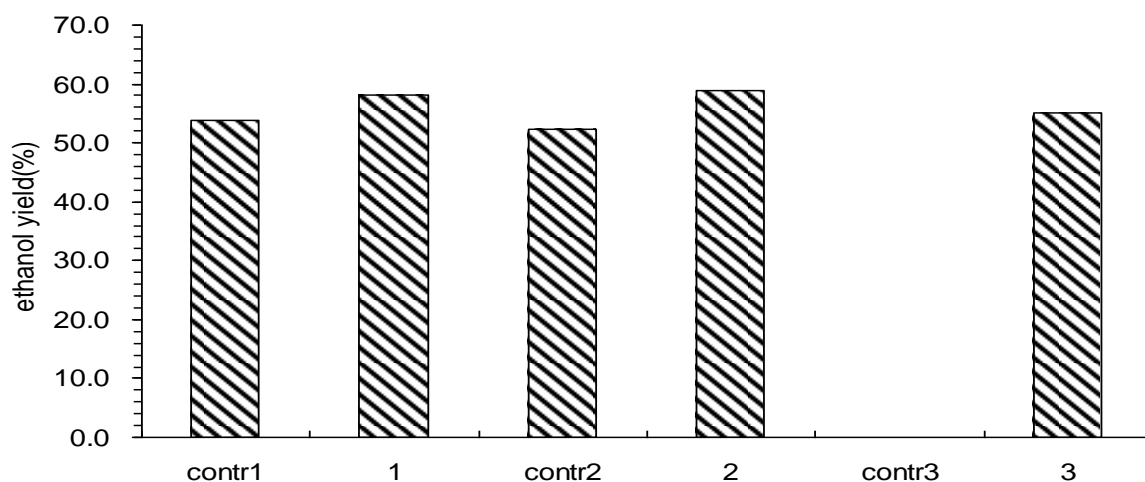
从图 2.15 结果得出：*A. resinae* ZN1 对氧气的的需求不严格，可以在厌氧和有氧的状态下良好生长，所以适应范围比较广。

2.4.7 脱毒前后秸秆纤维素的含量变化

脱毒前后蒸汽膨爆秸秆中的纤维素含量基本不变。这说明，虽然 *A. resinae* ZN1 在脱毒过程中消耗糖。但这部分糖相对于糖化后水解液中的糖总量可以忽略。而且 *A. resinae* ZN1 并能直接利用纤维素。*A. resinae* ZN1 在 3~4 天内可以将主要抑制物（乙酸，糠醛，羟甲基糠醛）降解掉。而对预处理秸秆脱毒前后纤维素含量的测定在在样品脱毒 7 天后，并没有发现纤维素有减少（都是 34%），说明它在脱毒过程不降解纤维素等有用成分。

2.4.8 *A. resinae* ZN1 对各种抑制物的降解

木质纤维素水解液中抑制物主要有甲酸、乙酸、乙酰丙酸、糠醛、羟甲基糠醛。单独研究各自被 *A. resinae* ZN1 降解速度、降解后对乙醇得率的影响。所有的抑制物浓度都是 10% 固体含量水解液中的值。

图 2.16a *A. resinae* ZN1 对不同浓度的乙酸降解Figure 2.16a Detoxification of acetic acid at different concentration by *A. resinae* ZN1图 2.16b 乙酸被 *A. resinae* ZN1 降解前后, 乙醇得率的比较Figure 2.16b Comparing of ethanol yield after acetic acid degraded by *A. resinae* ZN1

1、2、3 分别代表含有不同浓度乙酸的秸秆; contr1、contr2、contr3 表示没有脱毒的对照样;

从图 2.16a 和 2.16b 可以看出, 在 10% 固含量条件下, 乙酸浓度从 2g/l、6g/l 到 8g/l, *A. resinae* ZN1 都能降解, 并且使酿酒酵母发酵的乙醇得率有增加。当乙酸浓度到达 8g/l 时, 酵母不能发酵产乙醇, 而脱毒后乙醇得率可达 50% 以上。*A. resinae* ZN1 对单独乙酸的降解能力, 包括速度和浓度, 都远远高于其他报道的生物脱毒菌^[57,58]。*A. resinae* ZN1 能够降解乙酸可能跟本身可以形成黑色素有关。B. Qi 等报道 *Cladosporium resinae* (*A. resinae* 无性生长状态) 可以利用多种短链脂肪酸为唯一碳源进行生长^[60]。Gioconda

也研究过 *C. resinae*, 他们指出 *C. resinae* 直接利用两分子的乙酸, 从头开始合成真菌黑色素, 由此增加自身对恶劣外界环境的抵抗, 保护自己^[61]。

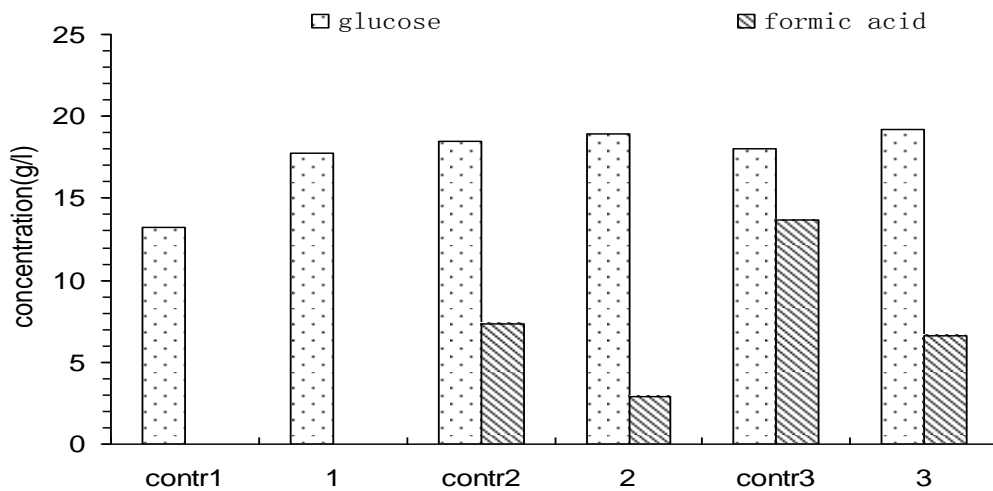


图 2.17a *A. resinae* ZN1 对不同浓度甲酸的降解

Figure 2.17a Detoxification of different concentration of formic acid by *A. resinae* ZN1

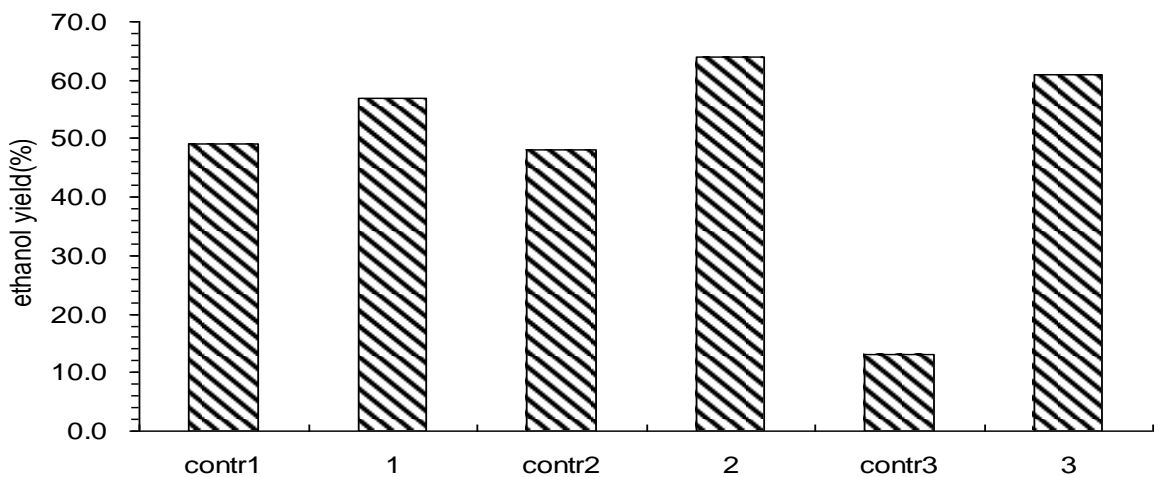


图 2.17b 甲酸被 *A. resinae* ZN1 降解前后, 乙醇得率的比较

Figure 2.17b Comparing of ethanol yield after formic acid degraded by *A. resinae* ZN1

1、2、3 分别代表添加不同量乙酸的秸秆; contr1、contr2、contr3 表示没有脱毒的对照样;

从图 2.17a 和 2.17b 可以看出, 在 10% 固含量条件下, 当甲酸浓度高达 12g/l 的时, *A. resinae* ZN1 依旧能将其降解约 50%。当甲酸浓度为 12g/l 时, 酿酒酵母发酵受到明显抑制。脱毒后, 乙醇得率上升 40% 以上。

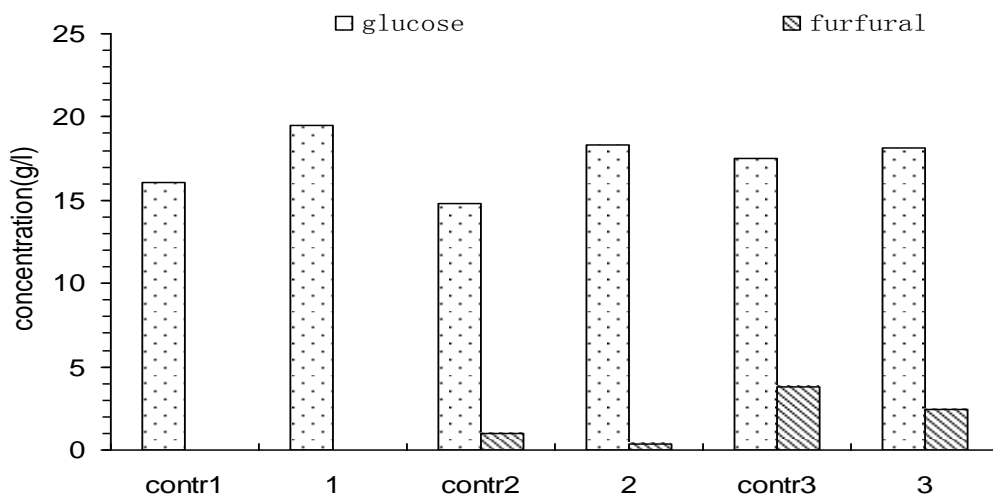


图 2.18a *A. resinae* ZN1 对不同浓度糠醛的降解

Figure 2.18a Detoxification of formic acid at different concentration by *A. resinae* ZN1

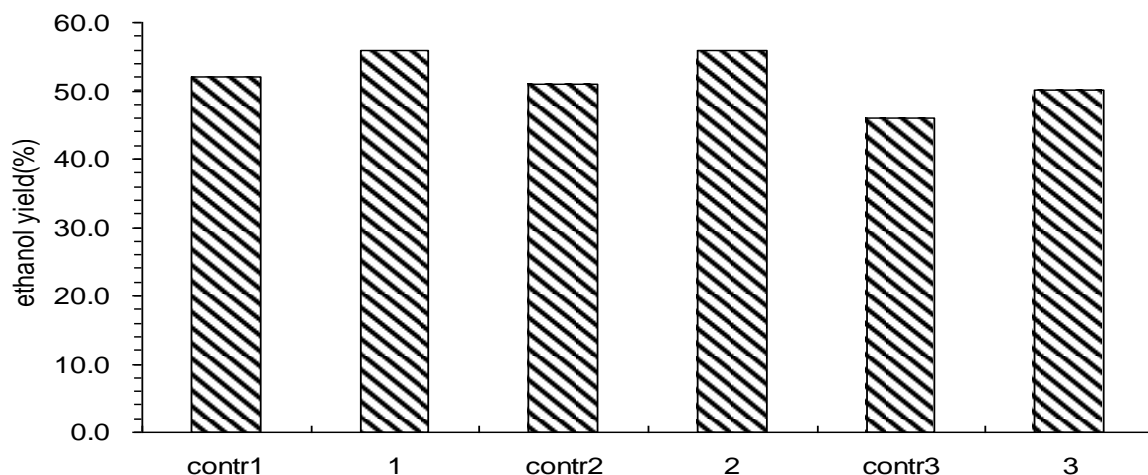


图 2.18b 糠醛被 *A. resinae* ZN1 降解前后, 乙醇得率的比较

Figure 2.18b Comparing of ethanol yield after furfural degraded by *A. resinae* ZN1

1、2、3 分别代表添加不同量乙酸的秸秆; contr1、contr2、contr3 表示没有脱毒的对照样;

从图 2.18a 和 2.18b 可以看出, 当糠醛浓度为 5g/l 时, *A. resinae* ZN1 依旧可以降解糠醛, 但是并没有完全降解掉。从乙醇的得率可以看出。糠醛单独存在, 即使浓度高达 5g/l, 酵母还可以正常发酵, 只是得率不高。这和其他文献报道的一致。酿酒酵母在单一抑制物存在时, 耐受的抑制物浓度远比多种抑制物混合的情况。

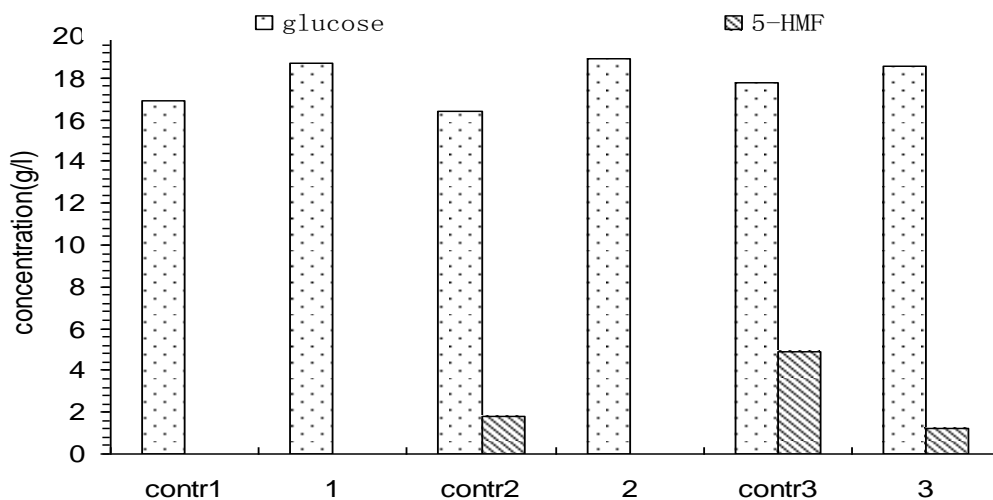


图 2.19a *A. resinae* ZN1 对不同浓度 5-HMF 的降解

Figure 2.19a Detoxification of different concentration of 5-HMF by *A. resinae* ZN1

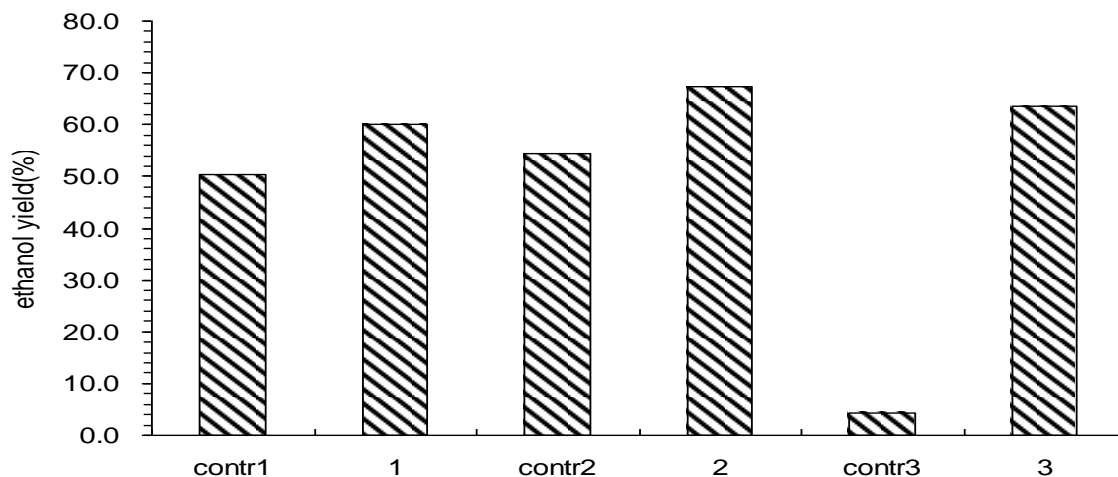


图 2.19b 5-HMF 被 *A. resinae* ZN1 降解前后，乙醇得率的比较

Figure 2.19b Comparing of ethanol yield before and after 5-HMF degraded by *A. resinae* ZN1

1、2、3 分别代表添加不同量乙酸的秸秆；contr1、contr2、contr3 表示没有脱毒的对照样；

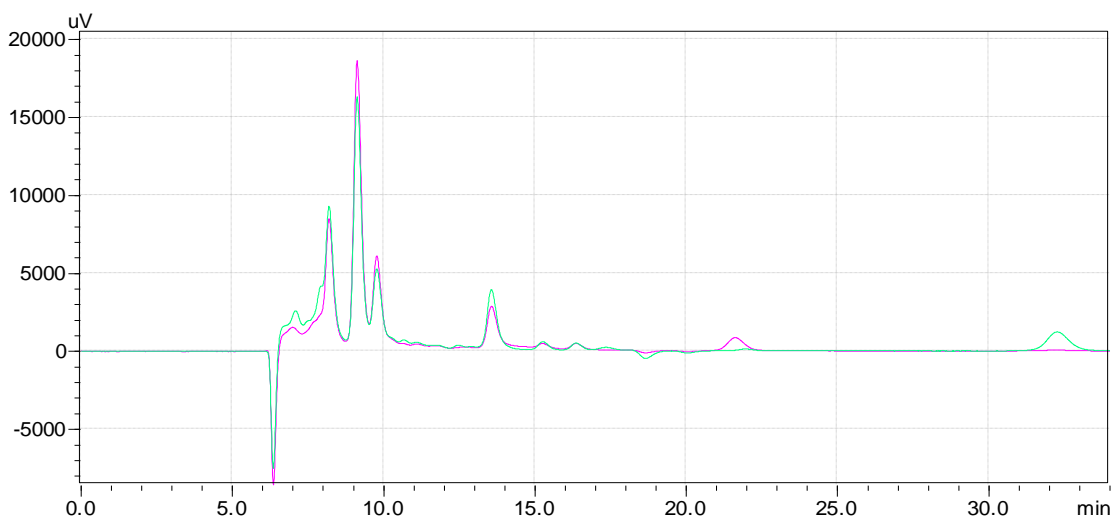


图 2.20 5-HMF 被 *A. resinae* ZN1 脱毒前后, 水解液中成分变化 (HPLC)

Figure 2.20 The changes of components in hydrolysate after detoxification showed in HPLC map 5-HMF 的峰从有 (绿色) 到无 (红色), 而在大约 21 分钟的位置 (红色) 出现新的峰。经过气质联用测定, 该物质很可能是丙酮。

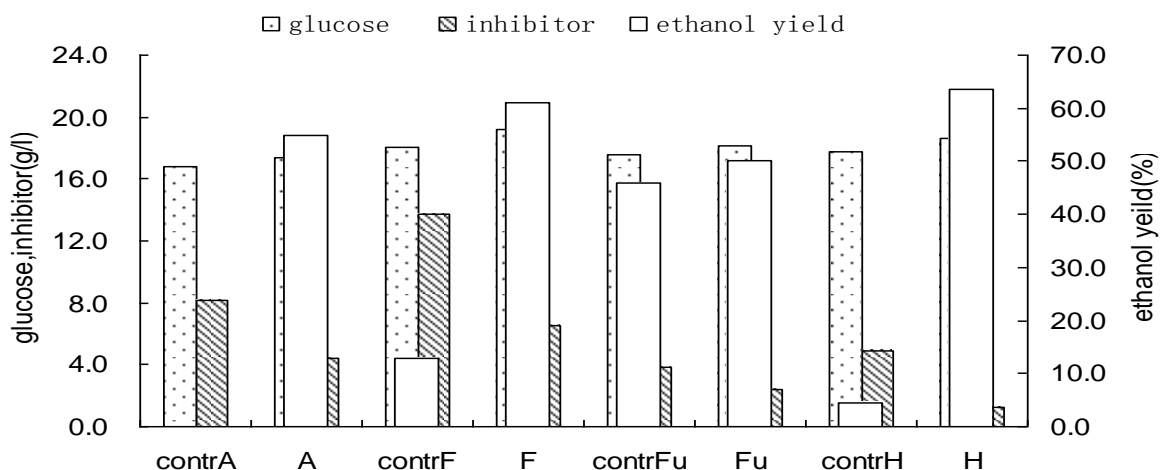


图 2.21 每种抑制物对酿酒酵母完全抑制的浓度下脱毒效果比较

Figure 2.21 Comparing detoxification performance in high concentration of each inhibitors
 contr: 表示对照 (没有脱毒);
 A: 乙酸 (acetic); F: 甲酸 (formic); Fu: 糠醛 (furfural); H: 5 羟甲基糠醛 (5-HMF);
 Inhibitor: 对应的每种抑制物。

从图 2.21 看, *A. resinae* ZN1 对乙酸、甲酸、5-HMF 的降解比较明显, 并都提高了乙醇得率。但对糠醛的降解并不明显。

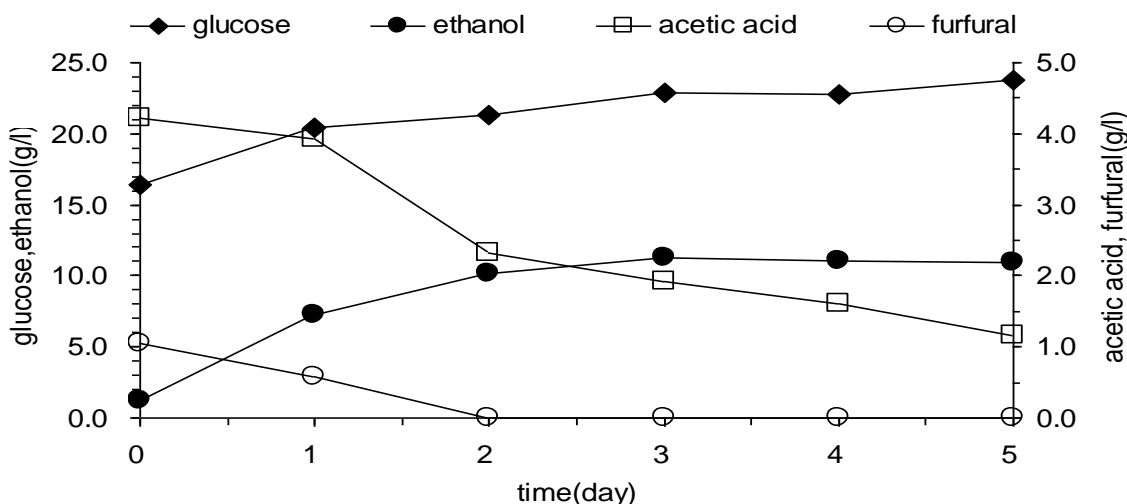


图 2.22 *A. resinae* Z1 对乙酸(4g/l)和糠醛(1g/l)混合的降解

Figure 2.22 Detoxification of acetic acid(4g/l) and fufural(1g/l) simultaneously *A. resinae* ZN1
 如我们看到, 在 10% 固含量的水解液中, 乙酸 4g/l 和糠醛 1g/l 是完全可以被 *A. resinae* ZN1 降解掉的。而且它优先降解糠醛, 直到糠醛被完全消耗完, 才开始出现乙酸减少。

而葡萄糖和乙醇浓度是在糠醛完全被降解后达到最高，这说明糠醛对纤维素酶有抑制作用。

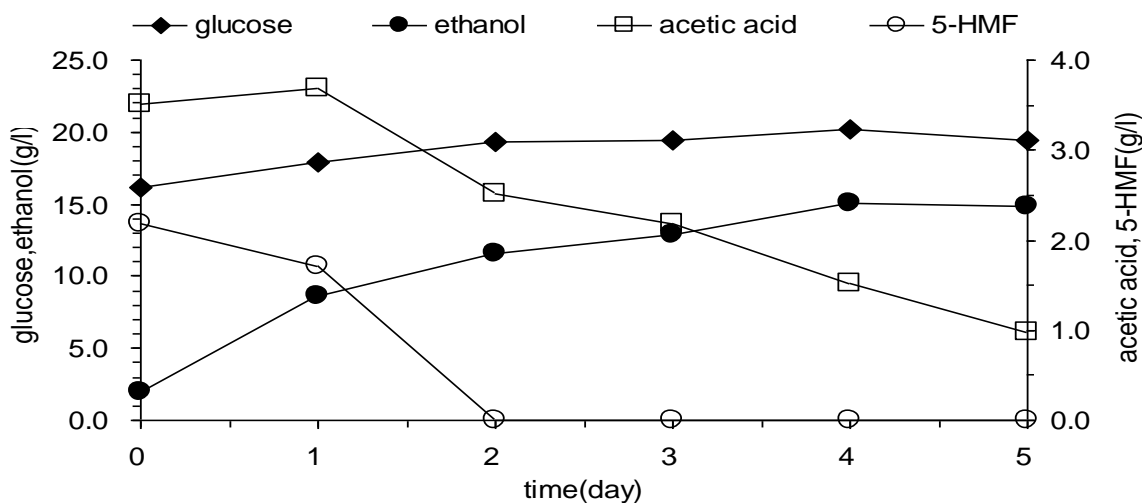


图 2.23 *A. resinae* ZN1 对乙酸(4g/l)和 5-HMF (2g/l)混合的降解

Figure 2.23 Detoxification of acetic acid(4g/l) and 5-HMF(2g/l) simultaneously by *A.resinae* ZN1

从图 2.23 中可以看出，当乙酸 4g/l 和糠醛 2g/l 时，*A. resinae* ZN1 优先降解 5-HM 葡萄糖和乙醇在没有脱毒的秸秆中，最初浓度比较低。脱毒后，乙醇由不到 2g/l 上升到 15g/l。

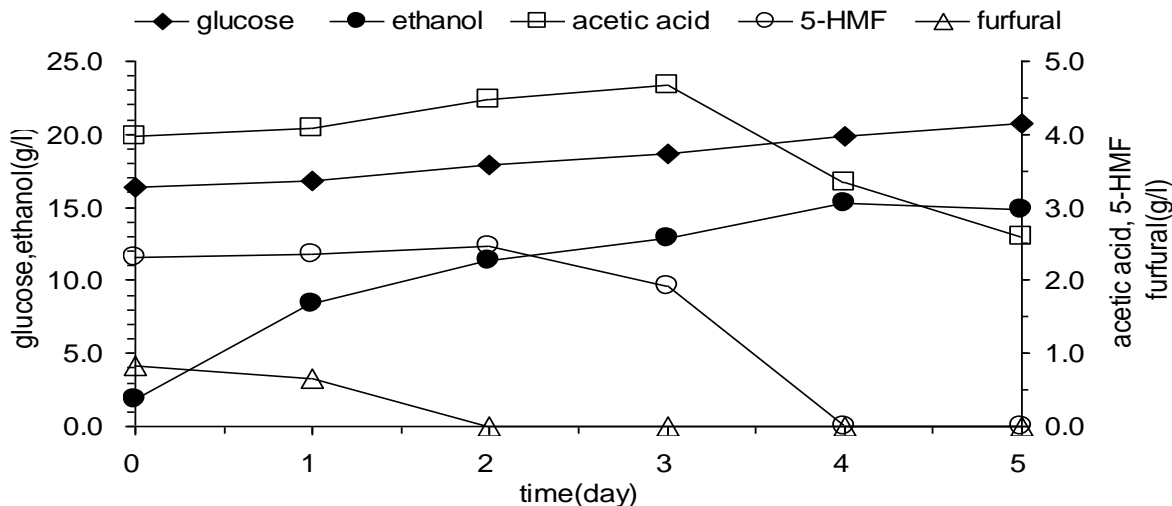


图 2.24 *A. resinae* ZN1 对乙酸(4g/l)、5-HMF (2g/l)和糠醛 (1g/l) 混合降解

Figure 2.24 Detoxification of acetic acid, 5-HMF and furfural simultaneously by *A. resinae* ZN1

从图 2.24 中可以看出，当乙酸 4g/l 和糠醛 2g/l 时，*A. resinae* ZN1 优先降解 5HMF，另外葡萄糖和乙醇在没有脱毒的秸秆中，最初产量比较低。脱毒后，乙醇由不到 2% 上升到 15g/l。

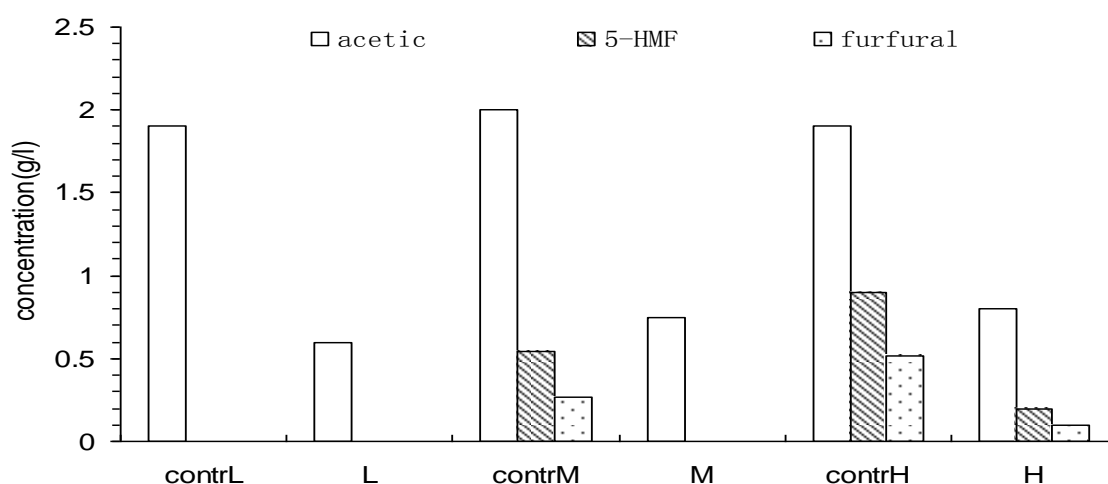


图 2.25a 三种不同强度稀酸预处理的秸秆脱毒

Figure 2.25a Detoxification of stover pretreated in three dilute acid pretreatment conditions

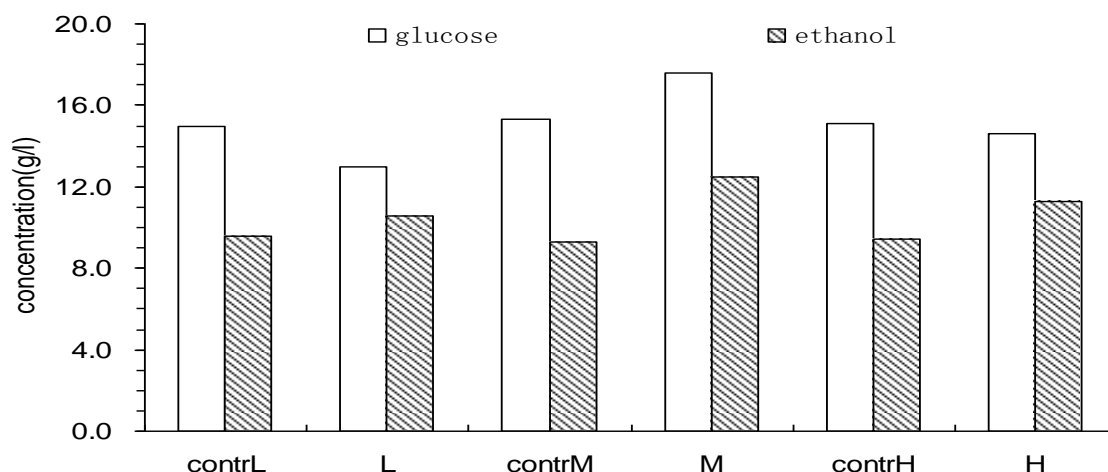


图 2.25b 三种不同强度稀酸预处理秸秆脱毒前后葡萄糖和乙醇的变化

Figure 2.25b Comparing the glucose and ethanol concentration after detoxification of stover pretreated in three dilute acid pretreatment conditions

从图 2.25a 和 2.25b 可以看出：低度稀硫酸处理的秸秆，脱毒前抑制物只用乙酸，脱毒后还有 0.6g/l。中度预处理条件下，脱毒前抑制物有乙酸、糠醛和 5-HMF，脱毒后除乙酸还剩 50%，其他两种均被降解掉。高强度条件下的抑制物明显高于前面两者。降解效果不理想。对应于三种条件下的发酵，中等强度因初始葡萄糖含量多，抑制物也被降解充分，所以最终乙醇得率高于其他两组。

2.4.9 抑制物降解秸秆高固体含量同步糖化发酵

将脱毒后的秸秆在 5L 发酵罐中，以 30% 固含量，15FPU 酶活条件下，水解 12 小时（50℃，150rpm，pH=4.8），接入已经驯化好三次的酵母种子液，在发酵 60 小时。两种原料，一种是蒸汽膨爆预处理的秸秆，一种是稀硫酸处理的秸秆。在没有经过脱毒时，酿酒酵母无法再这样的条件生长发酵。未脱毒的原始样品中，抑制物主要有乙酸 9g/l，糠

醛 1.05g/l, 5-HMF 是 1.7g/ml(蒸汽膨爆秸秆)。以蒸汽膨爆的秸秆为例。下图是同步糖化发酵过程有葡萄糖的消耗, 乙醇的生成, 抑制物的变化。

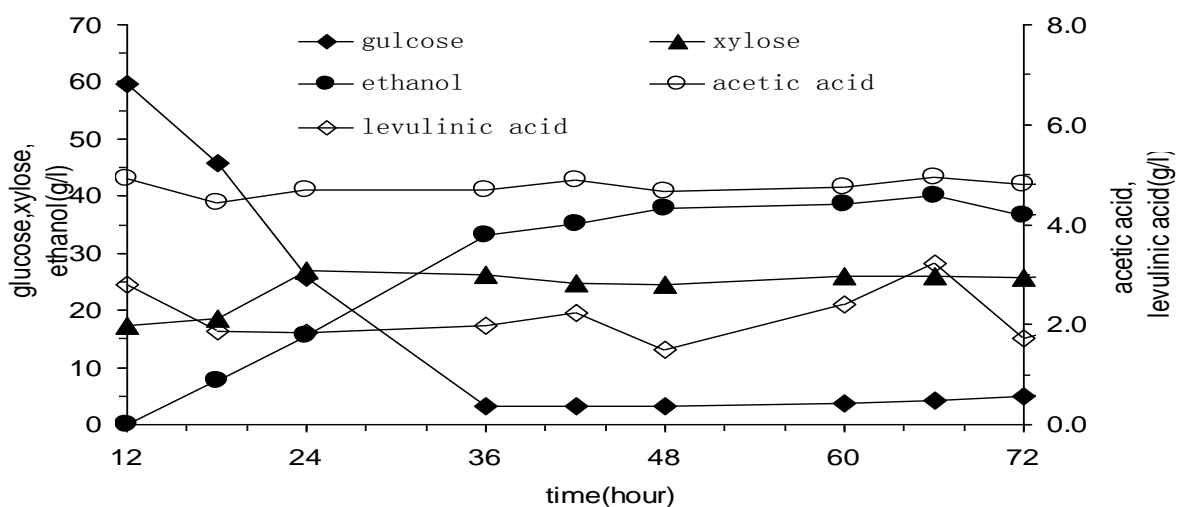


图 2.26 生物脱毒秸秆用于 5L 发酵罐同步糖化发酵 (30%固含量, 15FPU/gDM)

Figure 2.26 SSF in 5L reactor with pretreated stover after detoxification (30% solid loading, 15FPU/gDM)

从图 2.26 可以看出酿酒酵母在 30%固含量的体系里是正常生长发酵的。葡萄糖 12 小时浓度达 61g/l, 乙醇在整个过程逐渐升高。乙醇浓度最终达 41g/l。而主要抑制物乙酸维持在低水平 (4g/l), 乙酰丙酸也基本在 3g/l。

第三章 木质纤维素来源有机酸光合发酵制氢

3.1 前言

预处理木质纤维素经过酶水解，微生物发酵制取例如乙醇，油脂，丁醇等物质后，发酵废液中含有丰富的各种有机酸和残糖。这些有机酸一部分来自预处理过程的木质纤维素结构的降解，另外一部分来自乙醇或油脂发酵过程中。残糖存在于发酵液体中一般是因为酿酒酵母或油脂酵母并不能利用所有的糖，或者可利用的糖没能完全消耗。因此，随着生物燃料工业的发展，发酵废水中这些有机酸和残糖量是很大的，排放到环境中，不仅会引起例如海华等现象，更重要的是一种资源浪费。

光合细菌，是一种兼性自养细菌。不仅能够利用淀粉，葡萄糖等物质，也能够利用废水中的有机短链分子。这就为联合油脂（或乙醇）发酵，利用油脂发酵废液生物制氢提供了可能。

本研究选择油脂发酵后的水解液作为光合发酵产氢的原料，主要是考虑到：只需通过离心将油脂细胞去除，发酵废液就可以直接应用于生物制氢。而乙醇发酵液，必须先将乙醇从废液中经过稍复杂的工艺分离出来，才能应用于生物制氢。作为一种尝试性研究课题，选择油脂发酵联合更方便。事实上，在乙醇工艺生产中，发酵废液必然是将目的产品乙醇分离了，完全可以采用本研究结论的。

3.2 实验材料和仪器

3.2.1 试剂和仪器

表 3.1 试剂

Table 3.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	CR	上海菲达工贸有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
YEAST EXTRACT	AR	OXOIDLID BASINGSTOKE HAMPSHIRE ENGLAND
D-葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
琼脂	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
糠醛	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司生产
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酰丙酸	AR	美国Johnson Matthey
糠醛	AR	比利时Acros
羟甲基糠醛	AR	比利时Acros
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海美兴化工有限公司
纤维素酶	AR	Genencor Internal, Rochester, NY, USA
纤维二糖酶	AR	Novo Industri A/S, Denmark

表 3.2 仪器

Table 3.2 Equipment

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
高速冷冻离心机	J-25	Beckman 公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
恒温恒湿箱	LHS-150HC	上海一恒科技
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
洁净工作台	100 级 SW-CJ-IBU	上海博迅公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
气相色谱	Agilent6820	安捷伦
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
5L 发酵罐	Biotech-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

3.2.2 培养基与菌种

3.2.2.1 培养基

光和细菌培养基(RCVB 培养基): 微量元素 (1L): 0.75 g K_2HPO_4 , 0.85 g KH_2PO_4 , 2.8 mg H_3BO_3 , 0.75 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.24 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.1 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.04 mg $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, 0.75mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.0mg EDTA, 0.2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 11.8mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg 维生素 B1, 0.1 mg 生物素和 10 mg 烟碱酰胺。碳源: 苹果酸 4g/l。氮源: NH_4Cl 1g/l(种子培养基), 谷氨酸 1g/l(发酵培养基)

活化油脂酵母的YPD培养基: 葡萄糖20 g/L; 酵母粉10 g/L; 蛋白胨10 g/L(国药集团化学试剂有限公司); 琼脂粉10 g/L。pH值为5.8~6.0, 115 °C下灭菌20 min。

油脂酵母种子培养基: 葡萄糖 20 g/L; 酵母粉 0.5 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g/L; KH_2PO_4 1.0 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L; pH 值为 5.8~6.0, 115 °C 下灭菌 20 min。

3.2.2.2 菌种

油脂发酵菌: 皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* CX2 本实验室诱变筛选

光合细菌: 红假单胞菌 *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 由上海中科院植生所提供。

3.3 实验方法

3.3.1 油脂酵母发酵后废液的制备

酶水解液用于油脂酵母发酵：从冻存管中取出酵母菌接种于 50/250mL YPD 培养基中，30℃，180rpm 培养 24h 后，划斜面保存菌种。从斜面上挑取单菌落接种于液体种子培养基中，30℃，180rpm，培养 24h。再转入油脂酵母培养基在同样条件下培养 24 小时。在 5L 罐中进行油脂发酵。发酵工艺参看^[62]。发酵结束后，离心去除油脂酵母，并用 2% 的活性炭在 60℃，中脱出颜色 30 分钟，并用膜过滤除菌，以被光合发酵所用。

3.3.2 光合细菌 *R. sphaeroides* ZX-5 种子培养

RCVB 培养基，4g/l 的 D-苹果酸为碳源，1g/l 的 NH_4Cl 为氮源。培养基的初始 pH 为 7.0。50ml 种子培养基装入 250ml 摇瓶中。用接种针从 RCVB 平板中挑取单菌落接入灭菌后的种子培养基中。在 30℃，180rpm 条件下培养到 OD=1.5。将菌悬液和 60% 的甘油以 1:1 的比例混匀。取 2ml 混合液放入到冻存管中，放置 -80 冰箱保存。每次取一支冻存管接入到 RCVB 种子培养基中培养 20 小时作为种子液。

3.3.3 光合反应器

在一个 30℃ 的恒温箱中，放置如图的试管架和试管。在试管架前后相等的位置安装灯泡。使照射到试管处的光密度达 45000lux。气体的收集是通过推动注射器的活塞实现。其中试管的体积为 40ml 发酵培养基的体积为 34ml 种子液的体积为 1ml(OD=1.5 左右)。在每批发酵过程需要定时统计气体体积并排气。



图 3.1 光合反应器

Figure 3.1 Photo-reactor

3.3.4 油脂发酵和光合发酵培养基中成分分析

3.3.4.1 高效液相色谱法

(1) 标准曲线测定

采用日本岛津的 LC-20AD 高效液相色谱仪，RID-10A 示差检测器，Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱，柱温 65℃，流动相 0.005M 硫酸，流速 0.6 mL/min。梯度稀释精确浓度的葡萄糖(木糖)和各种抑制物标准液，经 0.22 μm 滤纸过滤，通过进样器加入，进样体

积 50 μL ，根据液相色谱谱图得到出峰时间，同时通过峰面积计算出标准曲线。

(2) 样品分析

样品通过稀释，在分析前均经 0.22 μm 微孔滤膜(上海迪清过滤技术有限公司)过滤，得到之前标准品对应位置的峰面积，通过与标准曲线比对，计算得到浓度。

在 RCVB 培养基和油脂发酵废液中，光合发酵产氢前后，溶液中各种有机酸，残糖的含量都是通过高效液相色谱来分析。

3.3.4.2 光合发酵产气成分分析

气相色谱,内热检测器参数为 2 m \times 3 mm。 不锈钢 5 \AA 分子筛填充柱 (60-80 目)。柱温,进样器温度,检测器温度,分别为: 60、100 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 。20 ml min^{-1} 流速的氮气最为载气。

3.3.4.3 菌体生长测定

菌体浓度采用吸光度间接法测量,每隔一定时间(12h 或 24h)从发酵液中取出 1mL,在 600nm 的波长下测量其吸光度(OD)。

3.3.5 RCVB 中光合菌利用有机酸发酵产氢

3.3.5.1 在 RCVB 中,单独有机酸作为碳源发酵产氢

在 RCVB 培养基的基础上分别用不同浓度的乙酸,甲酸,乙酰丙酸,乳酸取代苹果酸作为发酵培养基。初始发酵培养基的 pH 用氢氧化钠和盐酸调节到 7.0。为了使发酵过程中的 pH 保持稳定,磷酸盐浓度增加 10 倍。34ml 的发酵培养加入到总体积 40ml 的试管中。再接入种子液 1ml。在光合反应器中发酵产氢。比较每种有机酸在各自不同浓度产气的比较,以及不同有机酸之间的产气比较。以苹果酸作为发酵培养基碳源的产气效果作为对照基础。测定发酵培养基中各种有机酸的消耗情况, pH 的变化,以及产气的成分分析。

3.3.5.2 在 RCVB 中,混合有机酸作为碳源发酵产氢

将甲酸,乙酸,乙酰丙酸按照不同的比例混合以取代苹果酸作为发酵碳源。其他操作过程如 4.2.3.1。以模拟油脂发酵后的废液中各种有机酸的利用和产氢情况。

3.3.5.3 油脂发酵后的废液中光合发酵产氢

将油脂发酵后的水解液离心去除油脂细胞,并用活性炭脱色后,作为光合细菌的发酵培养基。按照 RCVB 培养基中的比例加入微量元素,碳源,氮源以及磷酸盐都不要添加。初始 pH 调节到 7.0 膜过滤后加入到光合反应的试管中发酵产氢。定时测定发酵过程中各种有机酸,残糖, pH, OD 的变化。

3.3.5.4 油脂发酵后废液光合产氢的 pH 优化

用氢氧化钠和盐酸,将用于光合发酵的油脂发酵后水解液初始 pH 调节到 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。其他操作如 3.3.5 以研究在水解液中不同的发酵初始 pH 对产氢的影响。

3.4 实验结果和讨论

3.4.1 在 RCVB 中各种有机酸发酵产氢

表 3.3 单独有机酸作为碳源发酵产氢

Table 3.3 Sole organic acid as the carbon source for photohydrogen production

	Concentration (g/L)	Final OD ₆₆₀	Final pH	Conversion efficiency (%)	H ₂ accumulation (ml/ml)	H ₂ production rate (ml/ml/h)
Malic acid	4.0	1.82	7.1	83	3.03±0.16	0.042
Acetic acid	1.0	1.14	8.5	7	0.09±0.00	0.001
	3.0	1.46	7.6	35	1.43±0.06	0.018
	4.0	1.54	7.7	31	1.57±0.07	0.020
	5.0	3.72	9.7	13	0.29±0.00	0.004
Formic acid	1.0	0.73	9.4	0	0.00±0.00	0.000
	3.0	1.57	8.8	33	0.31±0.01	0.003
	5.0	1.85	8.7	41	0.80±0.04	0.008
	7.0	3.14	10.0	7	0.09±0.00	0.001
Levulinic acid	1.0	1.22	8.7	0	0.00±0.00	0.000

如文献综述里提到的, 预处理过程, 酶水解过程, 乙醇或油脂发酵过程都会产生有机酸。大部分酸不能被酿酒酵母或油脂酵母所利用, 最终以废水的形式排放到自然界中。事实上, 这些有机酸是完全可以被利用来产氢^[63,64]。上表也说明, 乙酸, 甲酸, 不仅能够作为碳源供菌种生长, 可以作为产气的碳源。而乙酰丙酸就没有这么一个优势。经过发酵, 试管 pH 普遍上升。pH 偏离初始 7.0 越远, 产氢的速率越小。这可能是因为 pH 不在中性, 氢化酶活性就会受影响的。由于在中性发酵培养基中, 有机酸盐(A⁻)比有机酸(AH)更稳定, 所有有机酸大部分都以有机盐的形式存在, 而有机盐在中性溶液中发生如下的水解过程: A⁻+H₂O→AH+OH⁻, 反应过程中 pH 增加, 表示上述方程式在向右不断进行, 也说明光合细菌代谢有机酸和有机酸盐以有机分子的形式进行的。游离的 OH⁻随着有机酸的消耗而逐渐增加, 从而使培养基的 pH 值上升^[65]。

表 3.4 混合酸作为产氢的发酵碳源,光合产氢气

Table 3.4 Photo-fermentation for hydrogen production from RCVB culture including mix acid as carbon source

Concentration (g/L)			Consumption (%)			Final OD ₆₆₀ and pH		Conversion efficiency (%)	H ₂ accumulation (ml/ml)	H ₂ production rate (ml/ml/h)
Ace	For	Lev	Ace	For	Lev	OD ₆₆	pH			
<u>0.0</u>	5.0	1.0	0.0	65.87	0.0	2.17	8.3	9	0.14±0.00	0.002
<u>1.0</u>	5.0	1.0	99.59	60.04	11.98	2.24	8.2	52	1.54±0.07	0.014
<u>3.0</u>	5.0	1.0	96.85	68.47	18.2	2.72	7.0	56	3.37±0.16	0.030
<u>5.0</u>	5.0	1.0	13.96	62.45	11.98	2.85	9.6	11	0.29±0.00	0.003
4.0	<u>0.0</u>	1.0	99.94	0.0	8.26	1.52	7.8	20	1.20±0.06	0.013
4.0	<u>3.0</u>	1.0	99.99	37.13	12.66	2.35	7.3	26	1.71±0.10	0.014
4.0	<u>5.0</u>	1.0	99.97	55.85	21.35	3.74	8.2	43	3.21±0.13	0.023
4.0	<u>7.0</u>	1.0	99.00	1.27	0.0	2.37	9.3	7	0.43±0.02	0.003
4.0	5.0	<u>0.0</u>	95.01	9.47	0.0	2.34	7.5	29	1.74±0.09	0.023
4.0	5.0	<u>1.0</u>	99.85	59.62	18.70	3.27	7.8	43	3.16±0.20	0.021
4.0	5.0	<u>3.0</u>	99.94	70.03	64.65	3.18	8.3	17	1.20±0.01	0.009
Malic acid 4.0			99.82			1.82	7.2	86	3.43±0.13	0.036

以水解液中有有机酸成分为基础，模拟混合酸的混合比例光合发酵产氢。从上表中可发现，混合酸的氢气产率远远高于单一一种酸。更为有意思的是，乙酰丙酸单独作为碳源时并不能产氢，当参与到混合酸发酵条件时，它的利用率大大提高，而且还促进其他两种酸的利用。

3.4.2 油脂发酵后的水解液光合产氢

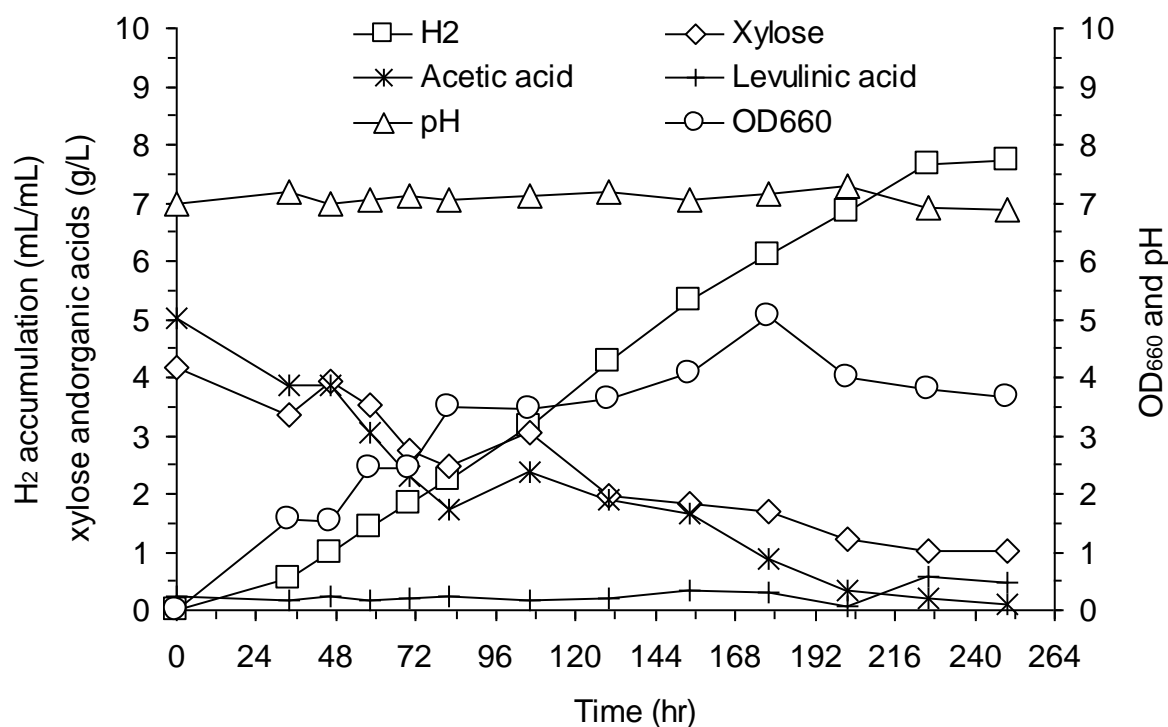


图 3.2 油脂发酵后水解液作为光合发酵产氢的基质

Figure 3.2 Photo-fermentation in hydrolysate after lipid fermentation as the substrate for hydrogen production

在整个氢气发酵过程中，溶液的 pH 基本维持在 7.0 左右。OD 值在前 72 小时处于指数生长期，在 72-240 小时基本平衡。有机酸（乙酸）和残糖（木糖）都在发酵结束时完全消耗。最后氢气得率为 8ml/ml(H_2 /substrate)这个值比所有有机酸发酵产气都好。

3.4.3 油脂发酵后水解液光合产氢 pH 优化

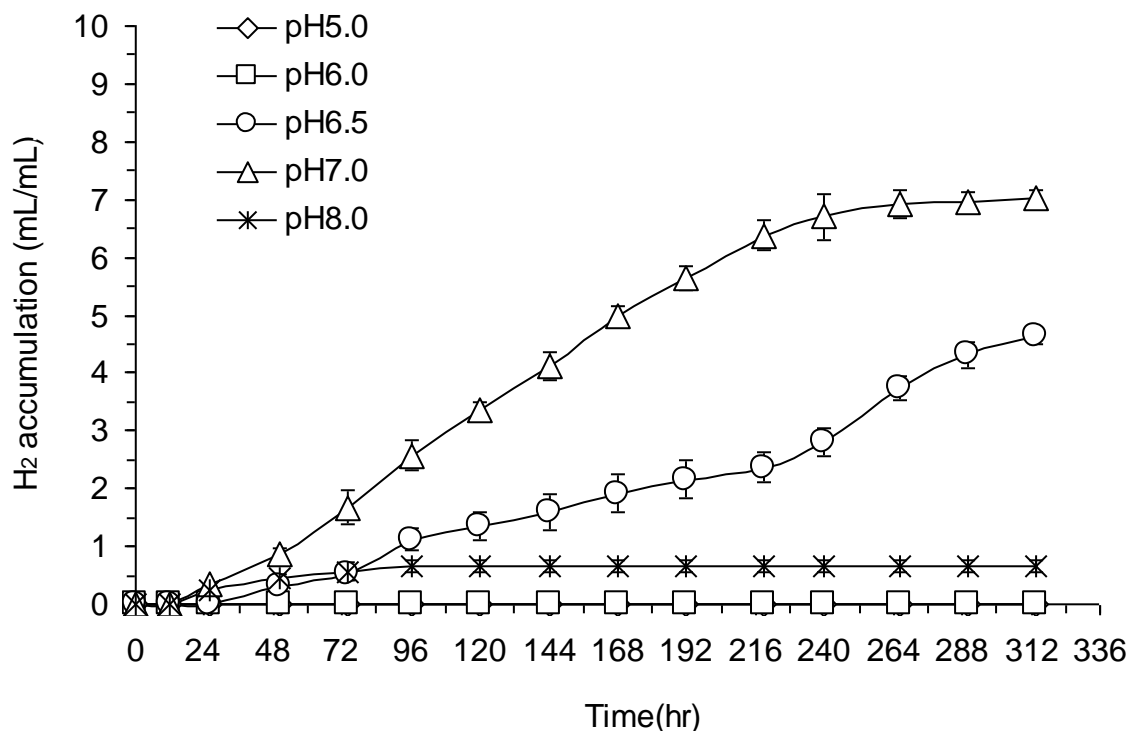


图 3.3 油脂发酵后水解液发酵产氢，PH 优化

Figure 3.3 Optimizing the pH for the photo-fermentation after lipid production

水解液光合发酵产氢的过程，pH 相对合成培养基要稳定。而且在 pH6.5-7.0 都可以进行正常发酵。

第四章 结论与展望

4.1 总结

1 通过初筛和复筛, 有三株菌可以降解预处理木质纤维素中的主要抑制物。通过表面显微镜观察和分子生物学的 16sDNA 扩增产物的测序比对, 它们分别属于 *Amorphotheca resinae*、*Penicillium polonicum*、*Penicillium turbatum*。其中 *A. resinae* ZN1 生长速度和脱毒效果都具有优势, 作为目标菌株。

2 *A. resinae* ZN1 在蒸汽膨爆秸秆中的生长特性为: pH3、pH4、pH5、pH6、pH7、pH8 条件下都能生长, 除 pH8 外, 其他生长状态没差别; 能够生长的温度为 20~32℃; 对氧气的需要不是很严格。但是抑制物浓度高的情况下, 生长范围有所缩减。

3 *A. resinae* ZN1 能够降解单独乙酸, 甲酸, 糠醛, 羟甲基糠醛的最高浓度分别为 (10%固含量的水解液中) 8g/l、9g/l、4g/l、5g/l, 折算为固体干秸秆中抑制物含量为: 乙酸 0.064g/g; 甲酸 0.073g/g; 糠醛 0.036g/g; 羟甲基糠醛 0.048g/g。并且相对没有脱毒状态下, 乙醇得率都有明显提高。混合抑制物添加发现: *A. resinae* ZN1 优先降解是糠醛, 然后依次为 5-HMF, 乙酸。在混合抑制物存在的条件下, 所能承受的抑制物浓度与单独一种抑制物情况不同, 浓度减少。

4 对脱毒前后的纤维素含量测定结果表明: 虽然 *A. resinae* ZN1 菌在脱毒时耗糖, 但仅是产生于预处理过程少量的糖, 而纤维素含量并没有发生变化。

5 37℃时, *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 不能在无脱毒的秸秆经过 30%固体含量, 15FPU/gDM 条件下水解得到的水解液中正常生长。该水解液中各种抑制物的浓度为乙酸 9g/l、糠醛 1g/l、羟甲基糠醛 1.2g/l, 预处理秸秆经过 *A. resinae* ZN1 脱毒后并水解后, 酵母能够正常生长和发酵。乙醇浓度最终达到 43g/l。

6 利用油脂发酵后水解液中的有机酸进行光合发酵产氢是可能的。这不仅解决了生物燃料工业中的废水处理, 更能提供洁净的氢能源。其中乙酸, 甲酸, 乙酰丙酸都可以被红假单胞菌生长所用, 但只有乙酸和甲酸才能被发酵使用。当三种酸按照模拟水解液中的成分混合时, 酸之间有协同效应, 促进氢气的产生。

7 油脂发酵后的水解液用来光合发酵产氢, 其 pH 稳定, 水解液中的有机酸和残糖 (木糖) 都被降解掉。产气最高达 8H₂ml/ml substrate, 而且光合细菌利用水解液发酵制氢的过程中, 初始 pH 范围在 6-7.5 之间。

4.2 展望

以木质纤维素为原料的生物燃料研究, 尤其是乙醇和生物柴油, 具有十分广阔的发展潜力。因而, 生物脱毒法也应该扩大应用范围, 并将这种方法应用于不同种类的木质纤维素脱毒。另外深入研究对每种抑制物的降解机理, 可以提高其降解抑制物的速度

和范围。这样才能广适性。木质纤维素燃料和化学品工业将是一个网状结构的工业。包括抑制物的脱掉和抑制物的有利转化都需要更深入研究。

参考文献

- [1] Campbell, CJ, Laherrere, JH. The end of cheap oil[J]. *Sci. Am*, 1998, 3; 78—83.
- [2] Pimental D, Patzek TW. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower[J]. *Nat. Resour. Res*, 2005, 14; 65—76.
- [3] 杨冠池. 生物能源-永不衰竭的能源[M].北京: 中国社会出版社, 2009; 94-95.
- [4] 刘宇刚. 关于利用生物质能源技术的思考[J]. 佳木斯大学学报, 2005; 12-15
- [5] 程备久. 生物质能学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008, 166-167
- [6] Reshamwala, S., Shawky, B.T., Dale, B.E. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995, 51/52, 43–55
- [7] Cheung, S.W., Anderson, B.C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. *Bioresour.Technol.* 1997, 59, 81–96.
- [8] Boopathy, R. Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors. *Bioresour. Technol.* 1998, 64, 1–6.
- [9] Dewes, T., H€uunsche, E., Composition and Microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms[J]. *Biol. Agric. Hortic.* 1998, 16, 251–268.
- [10] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 78:211-220.
- [11] Goldstein, I. S. Acid Processes for Cellulose Hydrolysis and Their Mechanisms. In E. J. Soltes (Ed.) *Wood and Agricultural Residues* New York, NY: Academic Press, Inc. 1983, (pp. 315-328)
- [12] Mason, W. H. 1926. U.S. Patent #1,578,609.
- [13] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66:506.
- [14] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification[J]. *Biosource Technology* 2000, 74,17-24
- [15] Roberto IC, de Mancilha IM, Sato S. Influence of k(L)a on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol[J]. *Bioprocess Engineering* 1999, 21, 505-508
- [16] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on

- ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 1996,19: 220–225.
- [17] Nigam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*[J]. *Journal of Biotechnology.* 2001, 87, 17-27
- [18] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates[J]. *Biotechnology and bioengineering* 2000, 69; 526-536
- [19] Vogel-Lowmeier, E.M., Sopher, C.R., Lee, H., Intracellular acidification as a mechanism for the inhibitors of xylose fermentation by yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 20, 75–81.
- [20] Parajo, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates.[J]. *Bioresource Technol.* 1998, 66, 25–40.
- [21] Villa, P., Felipe, M.G.A., Rodriguez, R.C.L., Vitolo, M., Luis dos Reis, E., Silva, S.S., Napoles, A.I., Mancilha, I.M., 1998. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: *Esbes-2 European Symposium On[R]. Biochemical Engineering Science, 2. Porto-Portugal, 1998.*
- [22] McMillan, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol.* American Chemical Society Symposium, Washington, DC, 1994, pp. 292–324
- [23] Lawford, H.G., Rousseau, J.D. Improving fermentation performance of Recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 70–72, 161–172.
- [24] Van Zyl, C., Prior, B.A., du Preez, J.C., Acetic acid inhibition of DD-xylose fermentation by *Pichia stipitis*[J]. *Enzyme Microb. Technol.* 1991,13, 82–86
- [25] Felipe, M.G.A., Veira, M.V., Vitolo, M., Mancilha, I.M., Roberto, I.C., Silva, S.S., Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*[J] *Basic Microb.* 1995. 35, 171–177.
- [26] Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N.Q., Hahn-Heagerdal, B., Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts[J]. *Biotechnol. Bioeng.* 1999,63, 46–55.
- [27] Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M., Lussi, M., Factors an acid treated bagasse inhibiting ethanol production from DD-xylose by *Pachysolen tannophilus*[J]. *Enzyme Microb Technol.* 1984, 6, 451–456
- [28] Pampulha, M.E. and Loureiro, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on

- inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 1989, 11, 269-274
- [29] Martin, M., Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. Biomass degradation products affecting xylose fermentation by *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. In: *Biomass Energy, Ind. Environ., E. C. Conf.*, 1992, 1332-1336
- [30] Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., and Hanai, S. Identification of aro-matic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 1986, 64, 567-570
- [31] Nishikawa, N. K., Sutcliffe, R., and Saddler, J. N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella 115. pneumoniae*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 1988, 27, 549-552
- [32] Tran, A. V. and Chambers, R. P. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme Microb. Technol.* 1986, 8, 439-444
- [33] Maiorella, B., Blanch, H. W., and Wilke, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 1983, 25, 103-121
- [34] Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D. E. F., and Righelato, R. C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1981, 11, 151-155
- [35] Watson, N. E., Prior, B. A., Lategan, P. M., and Lussi, M. Factors an acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D--xylose by *Paehysolen tannophilus*[J]. *Enzyme Microb. Technol.* 1984, 6, 451-456
- [36] Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L.O., Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 68, 524-530.
- [37] Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N., Jönsson, L.J., Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999, 77-79, 91-103.
- [38] Silva, C.J.S.M., Roberto, I.C., Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotechnol.Tech.* 1999, 13, 743-747.
- [39] Martinez, A., Rodriguez, M.E., Wells, M.L., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Progr.* 2001, 17, 287-293.
- [40] Converti, A., Perego, P., Dominguez, J.M., Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolyzates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999, 82, 141-151.

- [41] Jeonsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O., Hahn-H€agerdal, B., Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 49, 691–697.
- [42] Schneider, H., Selective removal of acetic acid from hard woodspent sulfite liquor using a mutant yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 19, 94–98.
- [43] Roberto, I. C., Lacin, L. S., Barbosa, M. F. S., and de Mancilha, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Proc. Biochem.* 1991, 26, 15-21
- [44] Perego, P., Converti, A., Palazzi, E., Del Borghi, M., and Ferraiolo, G. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, and *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microbiol.* 1990, 6, 157-164
- [45] van Zyl, C., Prior, B. A., and du Preez, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1988, 17, 357-369
- [46] Lawford, H. G. and Rousseau, J. D. Fuel ethanol from hardwood hemicellulose hydrolysate by genetically engineered *Escherichia coli* B carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 1991, 13, 191-196
- [47] Buchert, J., Niemelä, K., Puls, J., and Poutanen, K. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion [J]. *Proc. Biochem.* 1990, 25, 176-180
- [48] Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. *Proc. Biochem.* 1990, 25, 132-135
- [50] Wilson, J. J., Deschatelets, L., and Nishikawa, N. K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989, 31, 592-596
- [51] Zhao QB, Yu HQ. Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresour Technol* 2008; 99: 1353–8.
- [52] Mu Y, Yu HQ, Wang Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere* 2006;64:350–8.
- [53] Kars G, Gündüz U, Yücel M, Rakhely G, Kovacs KL, Eroğlu I. Evaluation of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and its *hupSL* deficient mutant using acetate and malate as carbon sources. *Int J Hydrogen Energy* 2009; 34:2185-2190
- [54] Tao Y, He Y, Wu Y, Liu F, Li X, Zong W, Zhou Z. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33:963-973.

- [55] Miguel Jurado, Alicia Prieto, Ángeles Mart ínez-Alcal á Ángel T. Mart ínez, Mar á Jes ús Martínez. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol[J]. *Bioresource Technology* 2009, 100; 6378–6384
- [56] Dae Haeng Cho & Yun Jie Lee & Youngsoon Um & Byoung-In Sang & Yong Hwan Kim. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, 83:1035–1043
- [57] Zhang HR, Qin XX, Silvio SS, Boutros F. Sarrouh, Cai AH , Zhou YH ,Jin K, Xiang Q. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* .2009,152:199–212
- [58] López, M. J., Nichols, N. N., Deien, B. B., Moreno, J., & Bothast, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64, 125–131.
- [59] National Renewable Energy Laboratory(NREL). Determination of structural carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden, CO, USA, 2004.
- [60] B. Qi ·W.M. Moe ·K.A. Kinney. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species[J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 58:684–689
- [61] Gioconda San-Blas,1 Omaira Guanipa,1* Belisario Moreno,1 Sara Pekerar,2 Felipe San-Blas1. *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resiniae* (C. *resinae*): Cell Wall and Melanin Studies[J]. *Current Microbiology* 1996, 32, 11-16
- [62] Chen X, Li ZH, Zhang X, Hu F, Ryu DDY, Bao J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;
- [63] Tao Y, He Y, Wu Y, Liu F, Li X, Zong W, Zhou Z. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 963-973.
- [64] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 7405-7412.
- [65] 陈 明, 周俊虎, 张立宏, 程 军, 刘建忠, 岑可法。固定化光合细菌利用低分子有机酸的产氢特性[J]。太阳能学报, 2008, 29, 738–743。

致谢

感谢鲍杰导师、王永红和王伟老师对课题的指导,使课题能够成功的完成。也感谢张建,王楠,王晓凤以及本实验室其他同学对实验过程中的支持和帮助。