

玉米秸秆的二相生物转化法降解 及其优化条件的研究

高明军, 林 聪, 张世湘, 江正强, 高茹英, 钱靖华

(中国农业大学水利与土木工程学院, 北京 100083)

摘要:采用二相生物转化法研究了玉米秸秆的降解,并对生物转化过程中秸秆的成分变化进行了跟踪测试分析。结果表明,二相生物转化玉米秸秆,有效地控制了固相(秸秆)中还原糖的浓度,在一定程度上减轻了纤维素与半纤维素的降解产物——还原糖对纤维素酶与半纤维素酶的反馈抑制作用,秸秆中纤维素和半纤维素的降解率相比传统固体发酵法提高了15%~30%,秸秆粗蛋白(SCP)含量提高1.8倍以上。

关键词:二相生物转化; 玉米秸秆; 降解

中图分类号:X712 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2004)03-0594-05

Biodegradation of Cornstalk by Two - Phase Biotransformation and Its Optimized Conditions

GAO Ming-jun, LIN Cong, ZHANG Shi-xiang, JIANG Zheng-qiang, GAO Ru-ying, QIAN Jing-hua

(China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: We tested decomposition of cornstalk using two - phase biotransformation in the present study. Microbial consortia such strains as microzyme S218, bacteria B186, epiphyte F174, *Trichoderma reesi* TR - 1, *Trichoderma koningii* TK - 2 and fiber pseudomonas CB - 3 have been used either separately or together to bio - transform cornstalk. During the transformation course, the diversifications of cornstalk ingredients have been tested and analyzed. The results of the experiment indicated that degradation of cornstalk by the approach of two - phase biotransformation were able effectively to control concentration of deoxidization sugar in solid - phase cornstalk, which could mitigate the feedback inhibiting effect of deoxidization sugar, the production of degrading cellulose and hemicellulose, on cellulose enzyme and Hemicellulase. The degradable rates of cellulose and hemicellulose in cornstalk enhanced by 15% ~ 30%. And the content of cornstalk crude protein (SCP) were enhanced by 1.8 times compared to the control.

Keywords: two - phase biotransformation; cornstalk; decomposing

随着现代科技的飞速发展,玉米已成为一种重要的工业原料,近年来种植面积一再扩大。根据农业部统计,仅我国每年产生的玉米秸秆就有约3亿t。玉米秸秆的总纤维含量高达70%(干重)以上^[1],其中纤维素35%、半纤维素23%、木质素15%(干重)。从理论上讲纤维素和半纤维素可以全部降解为单糖,因此玉米秸秆是一种颇具开发潜力的废弃物资源。如何更有效地利用好这些秸秆类纤维原料,依据废弃物处理与再利用的高效化、减量化、无害化原则,众多的国内外科研工作者从降低生产条件和成本、提高经济效益和资源利用率、缩短生产周期和避免造成环境二次污染等诸多方面对秸秆资源的开发利用做了大量的探索^[2,3],并取得了一些有价值的研究成果,但是与实际

生产应用还有些差距。由于秸秆中的木质素镶嵌于纤维素和半纤维素之中,使之不易被降解。因此提高秸秆中纤维素、半纤维素的降解率是秸秆资源开发利用的关键。二相生物转化玉米秸秆的试验,即利用含有纤维素与半纤维素降解菌的循环液(液相)定时喷淋玉米秸秆,淋洗下秸秆(固相)中的还原糖,消除还原糖对纤维素酶的反馈抑制。在多菌共降解的试验组中加入酒精酵母菌S218,分别控制固相仓和液相仓的反应条件,酒精酵母菌S218能利用还原糖及时发酵生成酒精,使反应体系中的纤维素酶保持较高的酶活,促进秸秆纤维素的降解,提高玉米秸秆生物转化率。此处理流程简单易行,秸秆纤维素、半纤维素的降解率较高,且对环境无二次污染。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种来源与培养

收稿日期: 2003-12-23

作者简介: 高明军(1970—),男,工程师,硕士研究生,主要从事农业废弃物资源处理与再利用领域的研究。

试验所用微生物菌种来源与编号见表 1。微生物菌种的培养方法如下：绿色木霉 TR-1、康宁木霉 TK-2、酵母 S218 和真菌 (F174) 采用马铃薯琼脂斜面种子培养基：马铃薯提取液 1.0 L，葡萄糖 20.0 g，琼脂 15.0 g，制成斜面种子培养基。接种后，放入生化培养箱中，设定温度 28 ℃ 培养。为提高种子活力，接种培养 3 d 以后转接一次斜面继续培养备用。

纤维单胞菌 CB-3 和细菌 B186 采用肉膏蛋白胨斜面培养基：蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，麦芽提取物 5.0 g，酪蛋白氨基酸 5.0 g，牛肉提取物 2.0 g，甘油 2.0 g，Tween80 50.0 mg， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1.0 L，pH7.2，制成斜面种子培养基。接种后，放入生化培养箱中，设定温度 30℃ 培养。为提高种子活力，接种培养 1 d 以后转接一次斜面继续培养备用。

液体种子培养基的制备：每 100 mL 马铃薯汁加葡萄糖 2 g，Yeast extract 0.1 g， $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g，玉米秸秆粉 20 g。分装于 250 mL 三角瓶中，每瓶装 100 mL。然后调整培养基的 pH：纤维单胞菌 CB-3 和细菌 B186 的培养基 pH 7.0，其余菌种培养基的 pH 5.0。将培养基于 121 ℃ 灭菌 20 min。接种后于 28 ℃， $120 r \cdot min^{-1}$ 摇床培养。

1.2 原料

试验中所用玉米秸秆均来自北京郊区采集，用秸秆揉搓机粉碎成长约 2~3 cm 的细丝，添加 1% $(NH_4)_2SO_4$ 拌匀备用。

1.3 试验装置

试验装置如图 1 所示。固相仓装有接种菌种的玉米秸秆原料，淋洗液由循环泵推动经喷头均匀地喷淋在秸秆上，然后透过滤层，经缓存仓回到液相仓，完成液相的闭路循环。每次喷淋结束时打开固相仓和缓存仓的气孔阀门，固相仓处于兼性好氧状态，液相仓处于兼性厌氧状态。图中所示气孔有透气封口膜阻止杂菌污染。

表 1 菌种来源与编号

Table 1 The source and serial number of the microorganisms used in the test

菌种	编号	来源
绿色木霉	TR-1	中国科学院微生物研究所
纤维单胞菌	CB-3	中国科学院微生物研究所
康宁木霉	TK-2	中国农业大学食品科学院
真菌	F174	中国农业大学食品科学院
细菌	B186	中国农业大学食品科学院
酵母	S218	本室保藏

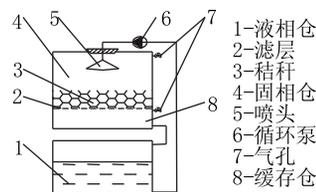


图 1 二相生物转化装置示意图

Figure 1 The device sketch diagram of two-phase biotransformation

1.4 试验方法

试验分为两批进行，A1~A5， $V_{A1} \sim V_{A5}$ 组试验，分析了单菌种对秸秆降解的影响；B1~B8， V_{B2} ， V_{B3} 和 V_{B4} 组试验，分析了菌种组合对秸秆降解的影响。B1~B8 组试验按 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交化设计方案进行，详情见表 2 和表 3。

A1~A5、B1~B8 组试验采用二相生物转化处理流程，见图 2。具体做法是取 2 000 g 秸秆原料，接种相应菌种的孢子悬液（菌种孢子浓度约在 $10^8 \sim 10^9$ 个 $\cdot mL^{-1}$ ），拌匀后，装入二相生物转化装置（不灭菌）。由于纤维素降解菌产生的纤维素酶一般在接种 72 h 后才具备较高的酶活，所以共降解试验时，S218 菌在纤维素降解菌接种 48 h 后接种。整个反应装置在设定温度下进行。接种 72 h 以后，向液相仓添加无菌水 1 000 mL，用液相仓中的循环液喷淋固相仓中的秸秆，喷淋量为每次约 5 000 mL，每间隔 24 h 喷淋 1 次。以后酌情适量添加无菌水。

对照组试验是依照传统固体发酵方法进行的。其中，对 A1~A5 组试验安排了 $V_{A1} \sim V_{A5}$ 组试验作对照，而 B1~B8 组试验是 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交试验，主要目的在于分析试验因素对秸秆生物转化的影响，因此仅对 B2, B3, B4 组试验安排了对照试验组： V_{B2} , V_{B3} 和 V_{B4} ，用以分析菌种 CB-3 与 TR-1 或 TK-2 组合转化秸秆时因处理流程不同而产生的差异。具体试验方法：将 600 g 秸秆原料接种菌种后置于 2 000 mL 的三角瓶中，并用 12 cm \times 12 cm 的透气性封口膜封住瓶口（这样即可为微生物降解秸秆提供一种兼性好氧的生物环境，又能防止大气中杂菌的污染）。所有对照组试验除了不进行液体喷淋以外，接种菌种、接种量、接种时间、反应持续时间和反应温度等条件均与采用二

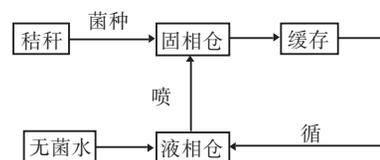


图 2 二相生物转化处理流程

Figure 2 The flow chart of two-phase biotransformation

表 2 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交化实验设计的因素及水平Table 2 Factors and levels $L_8(4 \times 2^4)$ in the experiments plan

因素水平	1	2	3	4
菌种组合	TR - 1, CB - 3, S218	TK - 2, CB - 3, S218	CB - 3, S218	TR - 1, TK - 2, CB - 3, S218
反应时间/d	10	8		
温度/°C	30	28		
接种量% /mL · g ⁻¹	12	8		

表 3 各组实验的实施方案

Table 3 Schedule of each team experiment

各组实 验序号	对照组 序号	反应时间 /d	温度 /°C	接种量% /mL · g ⁻¹	菌种
A1	V _{A1}	15	30	12	B186
A2	V _{A2}	15	30	12	F174
A3	V _{A3}	15	30	12	TR - 1
A4	V _{A4}	15	30	12	TK - 2
A5	V _{A5}	15	30	12	CB - 3
B1	—	8	30	8	CB - 3, S218
B2	V _{B2}	15	30	8	TR - 1, TK - 2, CB - 3, S218
B3	V _{B3}	8	30	12	TK - 2, CB - 3, S218
B4	V _{B4}	15	30	12	TR - 1, CB - 3, S218
B5	—	15	30	12	CB - 3, S218
B6	—	15	30	8	TK - 2, CB - 3, S218
B7	—	8	30	8	TR - 1, CB - 3, S218
B8	—	8	30	12	TR - 1, TK - 2, CB - 3, S218

性糖转化成酒精,降低液相的还原糖浓度,促进纤维素以及半纤维素的降解。

从 A1 ~ A5 组与 B1 ~ B8 组试验结果看,尽管后者反应时间缩短,但纤维素以及半纤维素的降解率普遍提高,可见多菌种的共降解优于单菌种。这是由于纤维素的降解是在纤维素酶系作用下进行的。而纤维素酶系是由外切-β-纤维二糖分解酶(CBHs)、内切-β-葡聚糖酶(EGs)和β-葡萄糖苷酶或称纤维二糖酶(βG)组成^[5]。3类酶协同作用,才能加速纤维素的降解。单菌种产生的纤维素酶比较单一,因此对纤维素的降解

相生物转化流程的对应试验组一致。

1.5 分析方法

样品采集与制备:各组试验均从接种后第3d开始采集样品,首先将样品置于烘干箱中,保持温度70℃烘干至恒重,然后将样品移入干燥器冷却至室温,再用样品粉碎机粉碎,最后移入40目样品筛,收集筛下的粉末作为测试分析的样品。

样品分析方法:纤维素、半纤维素的测定方法采用范氏法(Van Soest)^[4]。粗蛋白质的测定采用凯氏定氮的方法^[4]。

2 试验结果与分析

2.1 纤维素与半纤维素的变化分析

2.1.1 所选菌种对纤维素、半纤维素降解能力的分析

从表4可见,细菌B186(A1组)、真菌F174(A2组)对半纤维素的降解能力较强,对纤维素的降解能力较弱;绿色木霉TR-1(A3组)、康宁木霉TK-2(A4组)、纤维单胞菌CB-2(A5组)对纤维素、半纤维素降解能力均较强。因此选用TR-1,TK-2,CB-3和S218作为 $L_8(4 \times 2^4)$ 的试验菌种。S218不能降解纤维素、半纤维素,但能将包括木糖在内的多种可溶

率较低。多菌种共降解虽可提高秸秆的降解率,但多菌种共降解不等同于单菌种作用的简单相加。菌种组合的效果优劣是决定共降解效果的关键。通过 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交化试验对4种菌种的组合进行试验分析,结果表明TR-1, CB-3, S218菌种组合取得了较优的共降解效果,使玉米秸秆的纤维素及半纤维素的降解率分别达到70.5%和69.2%。

2.1.2 二相生物转化相对于对比试验的显著性分析

以X代表:A1、A2、A3、A4、A5、B2、B3、B4组试验的纤维素降解率值见表4。

以Y代表:V_{A1}、V_{A2}、V_{A3}、V_{A4}、V_{A5}、V_{B2}、V_{B3}、V_{B4}组试验的纤维素降解率值见表4。

则有^[6]: $T = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{S_w} \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} \sim t(n_x + n_y - 2)$, 其中:

$$X = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} X_i, \quad S_x^2 = \frac{1}{n_x - 1} \sum_{i=1}^{n_x} (X_i - \bar{X})^2,$$

$$Y = \frac{1}{n_y} \sum_{i=1}^{n_y} Y_i, \quad S_y^2 = \frac{1}{n_y - 1} \sum_{i=1}^{n_y} (Y_i - \bar{Y})^2,$$

$$S_w = \sqrt{\frac{(n_x - 1)S_x^2 + (n_y - 1)S_y^2}{n_x + n_y - 2}}, \quad n_x = n_y = 8$$

经计算得 $T(14) = 2.06$, 取显著水平 $\alpha = 0.05$,

表 4 纤维素、半纤维素降解率(%)

Table 4 The degradable rates of cellulose and hemicellulose (%)

实验组别	纤维素	半纤维素
A1	11.8	
V _{A1}	7.9	40.9
A2	16.6	51.4
V _{A2}	14.5	46.1
A3	58.8	37.6
V _{A3}	35.2	28.3
A4	54.1	53.7
V _{A4}	37.9	27.8
A5	44.2	57.8
V _{A5}	30.5	49.8
B1	29.2	69.6
B2	67.1	54
V _{B2}	39.3	46.1
B3	68.5	65.2
V _{B3}	35.8	54.2
B ₄	70.5	69.2
V _{B4}	38.4	53.7
B5	52.9	65.4
B6	64.9	68.7
B7	63.5	66.1
B8	51.4	66.3

表 5 纤维素降解率的方差分析

Table 5 The VAR analysis of cellulose - degradable rates

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值
菌种组合	889.11	3	296.37	350.7
反应时间	228.98	1	228.98	270.9
温度	162.00	1	162.00	191.7
接种量	43.25	1	43.25	51.2
误差	0.85	1	0.85	—

图 3 绘出了 A3、A5 和 B4 组试验的纤维素降解率的变化情况,微生物对纤维素的降解呈现 3 个阶段。即接种后 0~4 d 为第一阶段,该阶段纤维素的降解率很低,反应体系中的菌种在该阶段进行自身调整以便更好地适应新环境,然后由适应环境迅速过渡到利用秸秆中现存的单糖和蛋白质等养分进行自身物质的积累,而后进入对数生长期阶段,大量繁殖形成菌群。对秸秆榨出液的含糖量进行测定分析,结果显示接种前秸秆的含糖量为 8%,接种后仅 3 d 含糖量就下降至 3% 左右。可见该阶段菌群活动很剧烈,纤维素的降解率较低只是一种表面现象。接种后 5~9 d 为第二阶段,该阶段纤维素的降解率迅速升高,该阶段反应体系中菌群趋向成熟,新陈代谢旺盛,产生大量的纤维素降解酶。此时反应体系中抑制纤维素酶活的产物如纤维二糖、葡萄糖等浓度低,因而纤维素酶活较高。因为不定形纤维素易于降解,所以首先是秸秆中的不定形纤维素被迅速降解,然后才开始降解结晶纤维素。因此该阶段降解率曲线斜率最大,纤维素降解很快。接种后第 10 d 至试验结束为第三阶段,该阶段纤维素降解较缓慢,究其原因:一是纤维素降解产物在反应体系中的积累,抑制了纤维素酶活;二是秸秆中剩余的结晶纤维素被木质素及硅酸盐缠裹,使纤维素酶难于接触到纤维素分子。可见,提高此阶段的纤维素降解率可以从两个层面上着手解决:一是利用液相的循环设法即时分离出秸秆的降解产物如还原糖等,以消除其对纤维素酶的抑制,维持较高的纤维素酶活;二是对玉米秸秆采取一些预处理手段,如汽爆,以破坏玉米秸秆的理化结构,解除木质素及硅酸盐对结晶纤维素的缠裹,增大纤维酶与纤维素分子的接触面积。这两个层面问题有待于今后的试验中作进一步的探讨。

2.2 粗蛋白含量变化的分析

2.2.1 菌种对提高秸秆蛋白质含量的影响

图 4 绘出二相生物转化秸秆试验及其对照试验的蛋白质含量。秸秆经生物转化之后,蛋白质含量都比原秸秆有所提高,二相生物转化试验处理的秸秆蛋

而 $t_{0.05}(14) = 1.76, T(14) > t_{0.05}(14)$

同理,用半纤维素降解率的值代入上式,

经计算得 $T(14) = 2.24$, 取显著水平 $\alpha = 0.05$,

而 $t_{0.05}(14) = 1.76, T(14) > t_{0.05}(14)$

由上分析可见:二相生物转化处理秸秆的试验效果是显著的。秸秆纤维素或半纤维素降解率提高了 15%~30%。秸秆的生物降解主要依靠微生物产生的酶的作用,而酶的活性受到其降解产物的反馈抑制作用,降解产物的浓度越高,酶活就越低。其中纤维二糖是强抑制剂,葡萄糖次之。采用二相生物转化法对固相仓内的秸秆进行定时液体喷淋,可以在一定程度上降低秸秆中纤维二糖和葡萄糖的浓度,使纤维素酶保持较高的活性,因此可以促进秸秆的降解转化。

2.1.3 反应条件对纤维素降解率的影响

对 B1~B8 组试验的纤维素降解率进行方差分析,结果见表 5。查 F 分布表知, $F_{0.95}(3, 1) = 216$, $F_{0.90}(1, 1) = 39.9$, $F_{0.95}(1, 1) = 161$ 。由表 5 可见,菌种组合、反应时间和温度显著,而接种量较显著。诸因素的主次是:菌种组合 > 反应时间 > 温度 > 接种量。诸因素较优水平组合是 B4 组试验,即:采用 TR-1、CB-3、S218 菌种组合,反应时间为 10 d,温度 30 °C,接种量为 12% mL·g⁻¹。

2.1.4 纤维素降解的规律分析

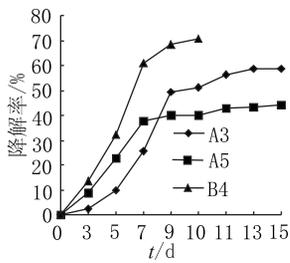


图3 纤维素降解率变化

Figure 3 The change of cellulose-degradable rates

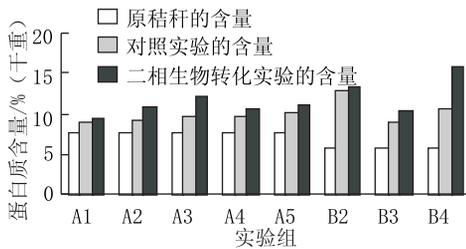


图4 秸秆蛋白质含量

Figure 4 The contents of the cornstalk proteins

蛋白质含量普遍高于对照试验处理的秸秆。A1 ~ A5 组试验表明在相同反应条件下不同菌种对提高秸秆蛋白质含量有较大的差异。其中 A3 组和 A5 组对秸秆蛋白质含量提高幅度较大, 这表明 TR-1 菌和 CB-3 菌具备利用秸秆发酵优质饲料的潜力。

图5 绘出了各组试验处理的秸秆蛋白质增加率, 即秸秆蛋白质增加量与原秸秆蛋白质含量的百分比。B1 ~ B8 组试验处理的秸秆蛋白质增加率明显高于 A1 ~ A5 组试验。其中 B4 组试验的秸秆蛋白质含量达到 15.87% (干重), 比原秸秆提高了 184.9%。这表明多菌共降解对提高秸秆蛋白质的含量优于单菌降解。

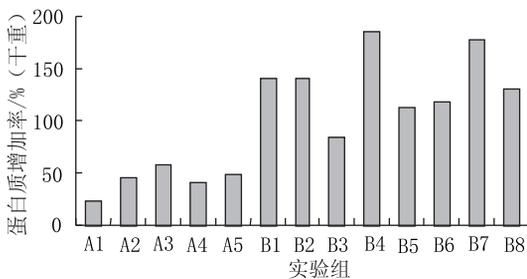


图5 秸秆蛋白质增加率

Figure 5 Increase rates of the cornstalk proteins

2.2.2 二相生物转化秸秆过程中蛋白质含量的变化特点

图6 表明秸秆在微生物降解过程中粗蛋白的含量出现一个峰值, 粗蛋白含量的峰值在接种菌种后

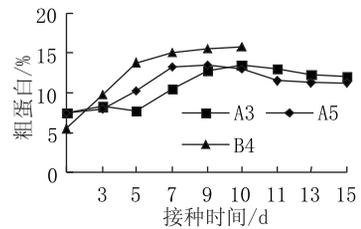


图6 秸秆蛋白质含量变化

Figure 6 The change of the cornstalk protein contents

7 ~ 10 d 出现, 峰值的出现说明反应体系中微生物达到鼎盛时期的外在标志, 而峰值的高低又可间接反映出微生物转化秸秆的能力及菌群之间协调性的优劣。试验结束时, 粗蛋白含量稍低于峰值, 有下降趋势, 这是由于在玉米秸秆降解的后期营养不足而引起微生物内源消耗的结果。可见将试验时间控制在 10 d 以内有利于提高粗蛋白质的含量。

3 结论

二相生物转化处理秸秆流程能有效地控制固相(秸秆)中还原糖的浓度, 在一定程度上减轻了纤维素与半纤维素的降解产物——还原糖对纤维素酶与半纤维素酶的反馈抑制作用, 相比传统固体发酵法, 提高了秸秆纤维素和半纤维素的降解率 15% ~ 30%。

通过 $L_8(4 \times 2^4)$ 正交化试验设计对二相生物转化秸秆的试验参数进行优化分析, 结果表明采用 TR-1、CB-3、S218 菌种组合, 反应时间为 10 d, 温度 30 °C, 接种量为 12% $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 取得了较优的共降解效果, 使玉米秸秆的纤维素及半纤维素的降解率分别达到 70.5% 和 69.2%, 蛋白质增加率为 184.9%。

参考文献:

- [1] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 21 - 22.
- [2] 王明瑞, 关凤梅, 等. 玉米秸秆水解与木糖酒精发酵的初步研究[J]. 酿酒, 2002, 29(1): 56 - 58.
- [3] Robert Eklund and Guido Zacchi. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-pretreated Willow[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17: 255 - 259.
- [4] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 农业大学出版社, 1993.
- [5] Focher B, et al. Structural Features of Cellulose and Cellulose Derivatives and Their Effects on Enzymatic Hydrolysis[A]. In: Haigler C H, et al. Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose[C]. New York: New York, 1991. 297 - 306.
- [6] 王明慈, 沈恒范. 概率论与数理统计[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 2003. 222 - 223.