

秸秆糖化复合菌系的筛选方法及糖化效果评价

刘 冰^{1,2}, 徐诚蛟^{1,3}, 王爱杰¹

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090, waj0578@hit.edu.cn;
2. 沈阳农业大学 土地与环境学院, 沈阳 110866; 3. 东北农业大学 资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 为了获得能够直接降解秸秆积累还原糖的复合菌系,并评价其产糖能力,采用连续稀释转接的方法进行复合菌系的富集筛选.同时,提出利用分室同步糖化发酵产氢培养的方法,将降解秸秆复合菌系与高效产氢菌株分室培养,以产氢所消耗还原糖量,推算复合菌系的产糖能力,以此作为评价复合菌系糖化效果的方法.实验结果表明:利用连续稀释转接法,筛选得到糖化效果较好的复合菌系 JY₆₆₅,菌体产氢量与所消耗还原糖量可拟合为二次曲线,通过计算得到复合菌系产糖能力达到 0.515 0 g/g 秸秆,秸秆降解率达到 61.06%.

关键词: 糖化;连续稀释;复合菌系;评价;同步糖化发酵;产氢;秸秆

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)06-0941-04

Method for screening of saccharide-accumulation microflora from lignocelluloses and saccharification assessment

LIU Bing^{1,2}, XU Cheng-jiao^{1,3}, WANG Ai-jie¹

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, waj0578@hit.edu.cn; 2. School of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to research the saccharification process of straw and screen efficient saccharification microflora, especially to solve the problem about the capability assessment of cellulose saccharification, a mixed strain was selected by serial dilution method. A new method is proposed, in which the mixed strain and high efficient H₂-producing strain are put in different chambers for hydrogen production culture with simultaneous saccharification and fermentation to evaluate the capability of cellulose saccharification by the amount of glucose consumed for producing hydrogen. The results show that the use of serial dilution switching methods can screen a high efficient saccharification microflora JY₆₆₅, and the bacterial hydrogen production volume and the amount of reducing sugars can be fitted as a regression curve. By calculating, the maximum reducing sugar yield can reach 0.515 0 g/g-straw for the complex strains JY, and the straw degradation rate reaches 61.06%.

Key words: saccharification; serial dilution; complex strains; evaluation; simultaneous saccharification and fermentation; hydrogen producing; straw

从 19 世纪 70 年代的石油危机开始,利用有机废物产生生物质能被认为是一个重要的产能途径^[1].我国是农业大国,每年产生大量纤维素类的农业废弃物,利用生物手段将其转化为高附加

值的生物质能成为研究热点^[2].其中,降解纤维素产糖是这项研究的核心内容之一^[3-5].在人们追求糖产量的同时,如何能更准确的将产出的糖量测定出来成为一个热点问题.由于在复合菌系内,微生物对还原糖利用的瞬时性,通过测定反应体系中残留的还原糖量,很难准确的评价其糖化能力.本试验采用分室同步糖化发酵产氢的培养模式,将从高温堆肥中筛选得到降解水稻秸秆的

收稿日期: 2010-03-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50638020;50878062).

作者简介: 刘 冰(1985—),女,硕士研究生;

王爱杰(1972—),女,教授,博士生导师.

复合菌系,与实验室原有只能代谢单糖高产氢菌株 YUAN-3 (*Ethanoligenens harbinense*)^[6] 分室同步糖化发酵培养,以单独利用葡萄糖为底物发酵时,产生氢气与所消耗葡萄糖的比例关系为对照,研究同步培养时复合菌系降解秸秆产生还原糖的能力,从而对厌氧纤维素降解菌系生物糖化效果进行评估。

1 材料与方法

1.1 菌种来源与培养基配制

复合菌系分离样品取自高温牛粪堆肥. 实验室原有菌株 YUAN-3 (*E. harbinense*), 该菌株有较强的产氢能力, 同时又具备自凝集特性, 该菌仅能利用单糖产氢. 试验所需培养基分别为: 秸秆培养基 (L^{-1}): NH_4Cl 1.0 g, K_2HPO_4 3.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, $MgCl_2$ 0.5 g, $NaCl$ 1.0 g, KCl 0.2 g, 半胱氨酸 0.5 g, 蛋白胨 2.0 g, 酵母粉 2.0 g, 秸秆 5 g, 维生素液^[7] 5 mL, 微量元素溶液^[7] 1 mL, 刃天青 1.5 mg, pH 7.0. YUAN-3 培养基^[8]. 滤纸液体培养基^[9-10]. 将各种培养基分装于血清瓶内, 全过程在氮气的保护下进行, 121 $^{\circ}C$, 20 min 高压灭菌.

1.2 产糖复合菌系的富集与筛选

1.2.1 复合菌系的富集

取高温堆肥样品 10 g, 在氮气保护下, 投入装有数颗玻璃珠的无氧无菌水中, 在振荡器中振荡 1 h, 利用玻璃珠剪切力将堆肥样品粉碎, 使微生物菌体充分分散于体系中. 再将混合体系接种于秸秆培养基中, 接种量 10%, 35 $^{\circ}C$ 静止富集培养 10 d, 连续转接两次, 使降解纤维素菌株大量富集.

1.2.2 秸秆降解效果

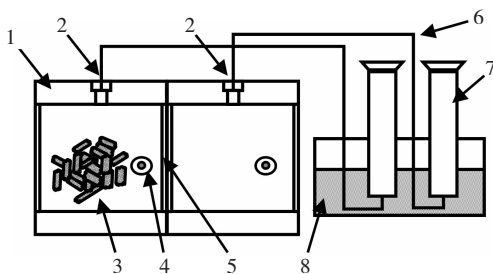
采用滤纸崩解法. 将富集得到的菌群接入到滤纸培养基中培养, 滤纸在配制培养基前需烘干恒重后称重, 接种量为 10%, 35 $^{\circ}C$ 、120 r/min 振荡培养, 7~10 d 后, 烘干称重, 测量滤纸的崩解情况. 反复转接 3 次, 比较滤纸崩解的效果.

1.2.3 连续稀释转接筛选高产糖复合菌系

将筛选得到的利用滤纸效果好的菌系用无菌水进行梯度稀释, 取稀释度为 10^{-3} ~ 10^{-9} 的溶液分别接种到水稻秸秆培养基中, 35 $^{\circ}C$ 培养箱培养. 每隔 24 h 小时取样, 采用 DNS 比色法^[11-12] 测定还原糖量. 总结数据, 当还原糖量升高, 及时将该稀释度培养体系再度稀释至 10^{-3} ~ 10^{-9} , 分别接入到新鲜秸秆培养基中液体培养, 如此连续稀释以得到高产糖复合菌系.

1.3 产糖效果评价方法及装置

为更好的研究降解纤维素复合菌系的产糖效果, 将其与已知菌株 YUAN-3 进行分室同步糖化发酵, 根据复合菌系与 YUAN-3 分别培养时, 产生单位体积 H_2 时的底物利用率, 研究分室同步培养条件下复合菌系的产糖效果. 将筛选得到产糖效果较好的复合菌系接种于如图 1 所示反应器的 A 室, B 室接种 YUAN-3, A、B 两室以 0.45 μm 细菌滤膜分隔, 单室容积 32 mL, 装液量 80%, 以添加于 A 室的水稻秸秆段为惟一碳源, 流加无碳源培养液, 采用单批培养方法, 以分别单室培养为对照, 测定反应器 A、B 室及对照产氢量变化规律, 对照的葡萄糖消耗量, 反应体系内还原糖含量残留量. 氢气测定、发酵液相末端代谢产物的测定采用美国安捷伦 7890 型气相色谱仪测定. 色谱柱: TDX-02; 柱温: 100 $^{\circ}C$; 汽化室: 80 $^{\circ}C$; 检测器 100 $^{\circ}C$.



1. 双室反应器; 2. 导气口; 3. 秸秆段; 4. 取样口; 5. 细菌滤膜; 6. 导气管; 7. 集气量桶; 8. 水槽

图 1 双室反应器装置简图

1.4 复合菌系糖化能力计算与秸秆降解率测定

分别测定复合菌系和 YUAN-3 在单室反应器中, 累积产氢量与葡萄糖消耗量, 并根据两者的比例关系拟合成回归曲线方程. 再将双室反应器中复合菌系和 YUAN-3 的产氢量分别代入方程, 求得不同时间产生一定体积的氢气, 所需消耗的还原糖量, 以此来表述复合菌系降解秸秆的产糖效果. 秸秆降解率 = (原始秸秆质量 - 残留秸秆质量) / 原始秸秆质量 $\times 100\%$.

2 结果与讨论

2.1 复合菌系的富集结果

富集得到的复合菌系 JY 在水稻秸秆培养基中能够生长, 说明具有降解纤维素能力. 分别观察其在滤纸培养基中培养 7, 9, 11 d 后的滤纸崩解程度, 通过培养观察得到, 图 2 中复合菌系 JY 在第 11 天能将滤纸完全降解成糊状, 说明其具有较好利用纤维素底物的能力.

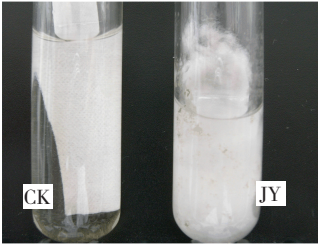


图2 滤纸崩解效果

2.2 筛选到的复合菌系及其产糖效果

将复合菌系 JY 进行梯度稀释后接种于 50 mL 秸秆培养基,每天测定反应体系内还原糖产量,当产糖量升高时,说明利用秸秆的厌氧产糖微生物活跃,及时稀释转接,如此反复,从而得到产糖量较高的复合菌系.从表 1 看出,在稀释培养后的第 2 天,所有稀释度还原糖量均有所下降,下降最快为 JY₆(JY 稀释为 10⁻⁶),而在第 3 天其还原糖量又迅速上升,达到 0.088 5 mg/mL.此时将 JY₆ 再进行梯度稀释转接,转接后的第 2 天,JY₆₆(JY₆ 稀释为 10⁻⁶)还原糖含量迅速上升达到 0.148 6 mg/mL.再将 JY₆₆ 再进行梯度稀释,同样在转接后的第 2 天,JY₆₆₅(JY₆₆ 稀释为 10⁻⁵)的还原糖含量上升达到最高值 0.165 6 mg/mL,而后还原糖量开始下降.由此可见,通过测定还原糖量并及时稀释转接,可以将复合菌系的微生物结构向产糖微生物更活跃,产糖效率更高的方向驯化.得到一个降解纤维素产糖能力较强的菌系,并且产糖量会在接种后的第 2 天达到最大值.结果还表明,稀释度 10⁻⁵ 或 10⁻⁶ 对复合菌系内的产糖类群具有较好的分离度,即产糖微生物类群占所在菌系的比例较高,而随时间推移,产生的还原糖很快会被其它微生物类群利用,还原糖含量随即下降.

表 1 连续稀释转接筛选过程中的还原糖量 mg/mL								
稀释度	第一次转接			第二次转接		第三次转接		
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
CK	0.082 7	0.089 5	0.090 9	0.089 5	0.091 2	0.094 8	0.089 5	0.091 4
10 ⁻³	0.084 6	0.072 5	0.066 4	0.098 6	0.100 3	0.093 5	0.095 2	0.092 2
10 ⁻⁴	0.081 7	0.079 8	0.075 5	0.097 4	0.104 0	0.100 3	0.093 5	0.091 8
10 ⁻⁵	0.084 7	0.078 3	0.070 1	0.087 1	0.095 2	0.098 6	0.165 6	0.148 3
10 ⁻⁶	0.086 1	0.056 2	0.088 5	0.110 5	0.148 6	0.103 7	0.091 8	0.088 3
10 ⁻⁷	0.071 4	0.064 6	0.072 7	0.092 3	0.076 5	0.105 7	0.098 6	0.082 1
10 ⁻⁸	0.070 0	0.076 8	0.071 8	0.091 3	0.090 3	0.107 1	0.088 3	0.078 3
10 ⁻⁹	0.086 1	0.076 3	0.075 0	0.090 5	0.091 0	0.098 6	0.094 5	0.085 4

2.3 复合菌系的产糖效果评价

利用 DNS 法只能测得体系中残留的少量还原糖,无法反应菌系降解秸秆过程中,产生还原糖

的量和变化动态.本研究利用同步分室培养的方法,利用反应器中氢气产量来推算菌系降解秸秆产糖能力.

将产糖效果较好的复合菌系 JY₆₆₅ 接种于双室反应器 A 室,将菌株 YUAN-3 接种于 B 室,以利用单室反应器分别培养 JY 菌系和 YUAN-3 作为对照,35 ℃ 下振荡培养 80 h.将 JY 复合菌系和 YUNA-3 对照产氢体积 (mL) 对消耗葡萄糖的质量 (g) 拟合方程,分别为 $Y = -0.000\ 5x^2 + 0.012\ 1x + 0.011\ 3$ ($R^2 = 0.934\ 3$) 和 $Y = -0.000\ 07x^2 + 0.006\ 4x + 0.001\ 3$ ($R^2 = 0.999\ 6$),且拟合度较高 (如图 3).

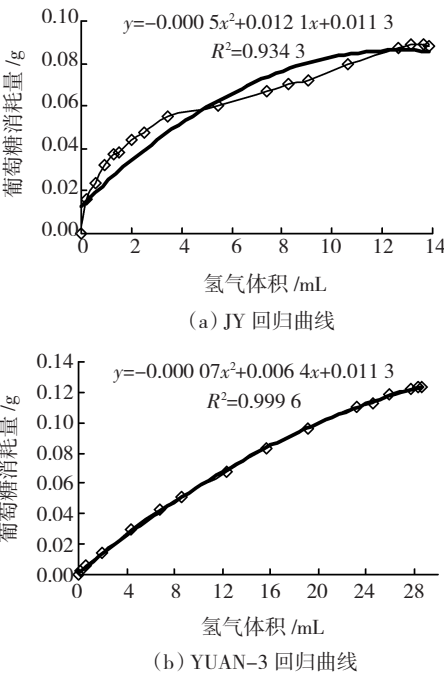


图3 产氢量对葡萄糖消耗量拟合曲线

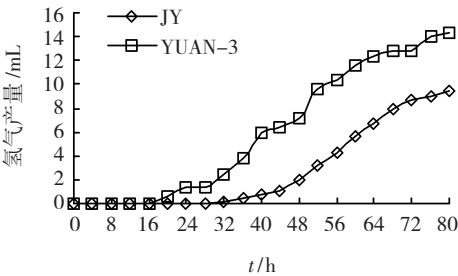


图4 反应器产氢气变化动态

双室反应器 JY 复合菌系和 YUAN-3,80 h 累积产氢气量如图所示,80 h 时产气累积量达到最大值分别为 9.45 mL 和 14.40 mL.其中 JY 复合菌系产气量稳步上升,而 YUAN-3 则呈波动上升,可能是由于还原糖透过细菌滤膜时不均匀扩散造成的.YUAN-3 的产氢起始时间为 20 h,而 JY 复合菌系为 32 h,说明由于 JY 的菌系复杂

性使还原糖被消耗而产氢起始时间滞后. 将反应器双室所产生氢气体量(图 4)代入 JY 复合菌系和 YUNA-3 对照的回归曲线方程, 得到反应体系内还原糖消耗量的变化值, 并与利用 DNS 法测得的反应器残留还原糖值进行对比.

结果(图 5)表明, JY 复合菌系和 YUAN-3 在发酵过程中所消耗的还原糖量在不断升高, 在 80 h 时达到最大值, 分别为 0.081 0 g 和 0.083 8 g, 总还原糖消耗量达到了 0.164 8 g. 水稻秸秆添加量为 0.320 0 g, 培养结束后水稻秸秆残留为 0.124 6 g, 据此 JY 复合菌系, 产糖能力达到 0.515 0 g/g 秸秆, 秸秆降解率达到 61.06%.

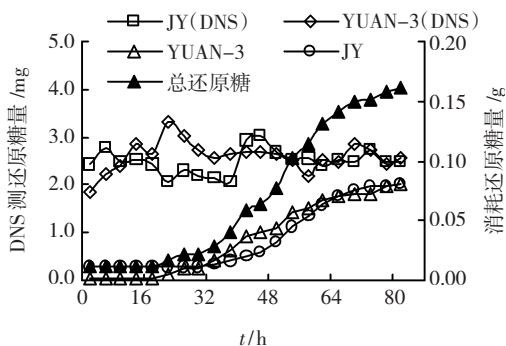


图 5 反应器产生及残留还原糖量

同时, 利用 DNS 法测定了反应体系中的残留的还原糖量, 反应器内 JY 复合菌系和 YUAN-3 还原糖含量均较低, 最高值也分别只有 3.310 mg 和 3.005 mg, 且动态变化并不规律. 结果表明, 在秸秆降解的过程中, 可能还原糖在产生后便被及时利用, 很难在反应体系发现糖的残留. 由此可见, 以产生一定体积氢气所消耗的葡萄糖量, 来表述复合菌系降解秸秆产生的还原糖量是可行和有效的.

3 结 论

1) 利用连续稀释转接法, 筛选得到能够降解水稻秸秆产糖的复合菌系 JY₆₆₅, 该菌系 35 ℃ 条件下降解纤维素产糖效果较好. 将所得菌系 JY₆₆₅ 与产氢菌 YUAN-3 分室同步糖化培养, 以单独培养时氢气产量对还原糖消耗量拟合曲线方程, 代入反应器产氢量得到复合菌系产糖能力达到 0.515 0 g/g 秸秆, 秸秆降解率达到 61.06%.

2) 通过拟合产氢体积与消耗葡萄糖量之间的曲线方程, 采用分室同步糖化发酵法, 以反应体系产氢量推知降解秸秆产生还原糖量, 建立了一套关于复合菌系产糖能力的间接评价方法, 并验证了该方法的可行性.

参考文献:

- [1] DEBABRATA D, NEJAT T V. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature[J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2001, 26: 13-28.
- [2] 黄宁珍, 赵志国, 何成新, 等. 一组降解纤维素细菌的分离筛选及产酶特性研究[J]. *广西植物*, 2009, 29(5): 683-688.
- [3] BALLESTEROS I, OLIVA J M, NEGRO M J, *et al.* Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes[J]. *Process Biochem*, 2002, 38: 187-192.
- [4] CHEN Hongzhang, LIU Liying, YANG Xuexia, *et al.* New process of maize stalk amination treatment by steam explosion[J]. *Biomass Bioenergy*, 2005, 28(4): 411-417.
- [5] LI Dongmin, CHEN Hongzhang. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 32: 1742-1748.
- [6] XING Defeng, REN Nanqi, LI Qiubo, *et al.* Ethanoli-genens harbinense gen nov, sp nov, isolated from molasses wastewater[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 755-760.
- [7] BALCH W E, FOX G E, MAGRUM I, *et al.* Methanogens: reevaluation of a unique biological group[J]. *Microbiolog and Molecular Biology Reviews*, 1979, 43(2): 260-296.
- [8] REN Nanqi, XIE Tianhui, XING Defeng. Composition of extracellular polymeric substances influences the autoaggregation capability of hydrogen-producing bacterium *Ethanologenes harbinense*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 5109-5113.
- [9] 刘东波, 陈珊, 李凡, 等. 一种新的评价好氧性细菌降解天然纤维素能力的方法[J]. *东北师大学报*, 2009, 41(3): 114-117.
- [10] 张建强, 王艳坤, 李勇. 纤维素高效降解混合菌的筛选及其发酵条件[J]. *西南交通大学学报*, 2008, 43(4): 549-554.
- [11] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 534-536.
- [12] 王俊刚, 张树珍, 杨本鹏, 等. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J]. *甘蔗糖业*, 2008, 5: 45-49.

(编辑 赵丽莹)