

白腐真菌 *Pleurotus sajor-caju* 预处理对红麻秸秆发酵乙醇的影响

阮奇城^{1,2}, 祁建民^{1,2}, 胡开辉², 方平平¹, 林海红^{1,2}, 徐建堂¹, 陶爱芬¹,
林国龙³, 易利福³

1 福建农林大学 教育部作物遗传育种与综合利用重点实验室, 福州 350002

2 福建农林大学 能源植物研究中心, 福州 350002

3 福建省曲斗香酒业有限公司, 泉州 362400

摘要: 为研究微生物法预处理对红麻秸秆中木质素的降解及后续的红麻纤维素酶促糖化和发酵效率的影响, 将白腐真菌 *Pleurotus sajor-caju* 接种在红麻秸秆培养基上固态培养, 对红麻秸秆进行预处理。经 *P. sajor-caju* 培养 25~35 d 后, 有效转化红麻秸秆中的木质素, 转化率最高可达 50.20%, 并提高红麻纤维素的酶促水解效率, 糖化率达 69.33%~78.64%, 与对照组相比提高了 3.5~4.1 倍。以微生物法预处理后的红麻秸秆样品为底物的同步糖化发酵实验表明, 发酵 72 h, 发酵液中乙醇浓度达到 18.35~18.90 mg/mL, 最高乙醇产率达到理论产率的 68.31%。

关键词: 红麻秸秆, 白腐真菌, 微生物预处理, 木质素降解, 同步糖化发酵, 纤维素乙醇

Effects of microbial pretreatment of kenaf stalk by the white-rot fungus *Pleurotus sajor-caju* on bioconversion of fuel ethanol production

Qicheng Ruan^{1,2}, Jianmin Qi^{1,2}, Kaihui Hu², Pingping Fang¹, Haihong Lin^{1,2}, Jiantang Xu¹,
Aifen Tao¹, Guolong Lin³, and Lifu Yi³

1 Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Research Center of Energy Plant, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 Qudouxiang Wine Co. Ltd. of Fujian Province, Quanzhou 362400, China

Received: March 15, 2011; **Accepted:** July 27, 2011

Supported by: Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. nycyt-x-19-E05), Earmarked Fund for Public Welfare Industry (agro-industry) Research System from the Ministry of Agriculture (No. nyhyzx-018(3)), Major Science and Technology Projects of Quanzhou City (No. 2008ZD12-6).

Corresponding author: Jianmin Qi. Tel/Fax: +86-591-87644898; E-mail: qijm863@163.com

现代农业产业技术体系建设专项 (No. nycyt-x-19-E05), 国家农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (No. nyhyzx-018(3)), 泉州市科技重大项目 (No. 2008ZD12-6) 资助。

Abstract: Kenaf stalk was pretreated by the white-rot fungus *Pleurotus sajor-caju* incubated in solid-state kenaf stalk cultivation medium. Delignification and subsequent enzymatic saccharification and fermentation of kenaf stalk were investigated in order to evaluate effects of microbial pretreatment on bioconversion of kenaf lignocellulose to fuel ethanol production. The highest delignification rate of 50.20% was obtained after 25–35 days cultivation by *P. sajor-caju*, which could improve subsequent enzymatic hydrolysis efficiency of kenaf cellulose. And the saccharification rate of pretreated kenaf stalk reached 69.33 to 78.64%, 4.5–5.1 times higher than the control. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with microbial-pretreatment kenaf stalk as substrate was performed. The highest overall ethanol yield of 68.31% with 18.35 to 18.90 mg/mL was achieved after 72 h of SSF.

Keywords: kenaf stalk, *Pleurotus sajor-caju*, microbial pretreatment, delignification, simultaneous saccharification and fermentation, cellulosic ethanol

近 30 年来, 由于温室效应、石油日渐枯竭等原因, 人们日益重视开发可再生能源^[1]。燃料乙醇是其中的佼佼者, 在多个国家已开始大力发展, 如美国、巴西、中国等。但现阶段生产燃料乙醇的原料主要是甘蔗、玉米、木薯等糖料作物或粮食作物^[2], 易危及粮食安全。2007 年 6 月 7 日, 国务院可再生能源会议明确指出, 在不得占用耕地, 不得消耗粮食, 不得破坏生态环境的原则下, 坚持发展非粮燃料乙醇。木质纤维素原料中富含纤维素和半纤维素, 可降解成发酵性的葡萄糖和木糖等, 而且在地球上储量极其丰富, 有望成为生产燃料乙醇的新一代原料。而与化石燃料和粮食乙醇相比较, 也只有纤维素燃料乙醇才能够达到大量减少温室气体排放的目的^[1]。近年来全球发达国家都将利用农作物秸秆转化成燃料乙醇的研究作为研发重点。

在纤维素乙醇生产中, 酶水解工艺被认为是纤维素降解生成葡萄糖的所有方法中最有发展前景的一种^[3]。但是, 秸秆中木质素与半纤维素通过共价键纵横交错地联结成网络结构, 纤维素镶嵌在其中^[4], 这种致密复杂的结构, 阻碍了纤维素酶对纤维素水解糖化的催化作用, 导致纤维素转化率极低。通过对秸秆原料的预处理, 可以破坏木质纤维素的致密构造, 增加纤维素酶与纤维素的接触面积, 提高纤维素的转化率^[5]。现已发展出多种预处理方法, 包括稀酸水解、碱法蒸煮、蒸汽爆破或高温高压水相处理等, 但都存在耗能高、对设备腐蚀强、二次污染或易产生发酵抑制物等不足之处^[6]。

自然界中存在能够降解木质纤维素原料的微生物, 如白腐真菌, 能在一定条件下将木质纤维素的主要成分 (木质素、纤维素和半纤维素) 全部降解为 CO_2 和 H_2O , 相对于纤维素成分而言更偏爱分解木质素^[7]。利用白腐真菌预处理木质纤维素原料, 条件温和, 是一个环境友好型的工艺路线, 但所用菌株大多集中在模式菌株黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*, 食用菌应用于预处理木质纤维素的研究很少。

红麻 *Hibiscus cannabinus* L. 是属于锦葵科木槿属的一种速生高产生物质能源植物, 其生物产量是树木的 3~4 倍, CO_2 同化能力是植物的 4~5 倍, 生物质产量可达 30 t/hm^2 , 已成为我国栽培面积最大、总产量最高的麻类纤维作物之一, 其纤维单产居世界首位^[8]。但是, 以红麻秸秆为原料转化制备燃料乙醇的相关技术未见诸报道。因此, 在筛选、评价多种食用菌的木质素降解酶活力的研究基础上, 本研究拟以红麻秸秆为培养料, 采用 *P. sajor-caju* 预处理红麻秸秆, 研究 *P. sajor-caju* 对红麻秸秆的预处理效果及环境友好型红麻秸秆发酵产乙醇的绿色技术路线, 为红麻多用途综合开发及红麻秸秆高附加值深加工提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红麻秸秆来自福建农林大学红麻种植基地。利用红麻韧皮纤维收割后的麻秆芯副产品, 晒干、粉

碎, 置样品袋中储存备用。

1.2 培养基

微生物预处理用营养液: 蛋白胨 20.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 蒸馏水 1 000 mL;

PDA 培养基: 马铃薯汁 1 000 mL, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g。不加琼脂的液态培养基 (自然 pH), 用作酵母种子培养基;

10×YP 培养基 (液态): 酵母膏 100 g, 蛋白胨 200 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 菌种制备

P. sajor-caju 由福建农林大学微生物工程实验室保藏。该菌株以 PDA 斜面保藏于 4 °C 冰箱, 在微生物法预处理红麻秸秆前, 接种到 PDA 平板上, 置于 24 °C 培养 7 d, 菌丝长满平板, 再以相同方法培养 1 次。预处理时, 将长满菌丝的平板切割成约 1 cm² 的正方形小块, 每个样接种 1 块。

酿酒酵母 *S. cerevisiae*, 利用安琪酿酒高活性干酵母 (安琪酵母股份有限公司, 湖北宜昌) 纯化培养, 以 PDA 斜面保存于 4 °C。从斜面上取 1 环酵母菌种接种于装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 然后取 2 mL 培养物再次转接培养 24 h。将培养液 3 500 r/min 离心 10 min 收集菌体细胞, 用无菌生理盐水离心洗涤菌体 2 次, 尽可能除去杂质, 最后用无菌生理盐水稀释成 10⁷ cells/mL 的菌悬液 (比浊法)。

1.4 红麻秸秆的生物预处理

每个 250 mL 三角瓶中加入 15 g 红麻秸秆粉和 85 mL 营养液, 混合均匀成固态培养基, 于 121 °C 灭菌 60 min。然后接种 *P. sajor-caju* 菌丝块 (约 1 cm²), 24 °C 分别培养 15 d、25 d 和 35 d。培养结束后, 加入 60 mL 柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 4.8), 4 °C 振荡培养 4 h, 接着用双层纱布过滤。滤液部分于 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 混合即成 *P. sajor-caju* 红麻秸秆培养物粗提酶液, 4 °C

保存备用。固体残渣与上述离心沉淀物混合, 用蒸馏水洗涤, 风干, 4 °C 保存备用。对照样除不加入菌丝块外, 其余操作相同。

精确称取红麻秸秆原料 1 g (精确至 0.000 1 g), 加入 15 mL 上述粗提酶液对原料进行预处理, 分别置于 25 °C 或 50 °C、160 r/min 条件反应 6、12、24 h。过滤取固体残余物, 水洗后以纤维素酶催化水解 (见 1.5)。

1.5 红麻秸秆的酶促水解

精确称取红麻秸秆样品 1 g (精确至 0.000 1 g, 同时取样测定样品的水分含量), 加到 100 mL 三角瓶中, 加入 0.5 mL 纤维素酶 (Celluclast 1.5 L, Novozyme Co., 酶活: 60 FPU/mL)、0.5 mL β -葡萄糖苷酶 (Novozyyme 188, Novozyme Co., 酶活: 约 15 000 U/mL)、 NaN_3 溶液 (抑菌剂) 和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (0.05 mol/L, pH 4.8), 构成 25 mL 反应体系, 其中抑菌剂 NaN_3 的终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。将三角瓶置于水浴摇床中以 50 °C、160 r/min 的条件进行反应 72 h, 取样以 DNS 法测定还原糖含量。空白组除了相应样品在加酶后沸水浴 10 min 使酶失活外, 其余操作相同。

1.6 红麻秸秆的同步糖化发酵

将 10 g 红麻秸秆样品加到 250 mL 三角瓶中, 121 °C 灭菌 30 min。冷却后, 以无菌操作方式加入酵母菌悬液 10 mL (10⁷ cells/mL)、已预先除菌的 10×YP 培养基 10 mL、纤维素酶 (Celluclast 1.5 L) 5 mL、 β -葡萄糖苷酶 (Novozyyme 188) 5 mL 和适量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 构成 100 mL 发酵体系, 在气浴摇床中以 37 °C、130 r/min 条件发酵 72 h。取样检测乙醇含量。

1.7 分析方法

1.7.1 秸秆成分分析^[9]

纤维素含量: 硝酸乙醇法; 半纤维素 (聚戊糖) 含量: GB/T 745-2003; 酸不溶木素含量: GB/T 2677.8-1994; 酸溶木素含量: GB/T 10337-1989; 水分含量: GB/T 2677.2-1993。

1.7.2 还原糖的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法测定还原糖。将酶促水解液离心 (3 000 r/min, 10 min), 适当稀释。取稀释液 0.5 mL 和 3 mL DNS 试剂混合, 沸水浴 5 min, 冷却后定容至 20 mL, 于波长 540 nm 处测量吸光度, 根据葡萄糖标准曲线计算还原糖浓度:

$$\text{转化率} = \frac{RS \times 0.9}{Wo \times c} \times 100\%。$$

1.7.3 乙醇含量测定: 重铬酸钾比色法^[10]

将发酵三角瓶静置数分钟, 从中准确量取发酵液 50 mL, 加入 50 mL 蒸馏水, 加热蒸馏, 馏出液收集于 50 mL 容量瓶中 (冰浴), 待接近刻度时, 定容至刻度, 混匀。取 3 mL 馏出液于 50 mL 容量瓶中, 加入 15 mL 重铬酸钾溶液, 混匀放置 5 min, 加水定容至刻度, 于波长 610 nm 处测定吸光度, 根据乙醇标准曲线计算乙醇浓度:

$$\text{乙醇产率} = \frac{[Ethanol] \times V}{Wo \times c \times 0.568} \times 100\%。$$

1.7.4 酶活测定

漆酶: 通过底物 2, 2'-连氮-双 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS) 的氧化进行测定^[11-12]。酶活单位 (U): 在上述反应条件下, 反应体系中每分钟使吸光度增加 0.1 所需的酶量。

木质素过氧化物酶: 采用以藜芦醇 (VA) 为底物的测定方法^[13]。酶活单位 (U): 在上述反应条件下, 每分钟催化 1 μmol VA 转化所需的酶量。

锰依赖过氧化物酶: 采用以 2,6-二甲基苯酚 (2,6-DMP) 为底物的测定方法^[13]。酶活单位 (U): 在上述反应条件下, 每分钟催化 1 μmol 2, 6-DMP 转化所需的酶量。

纤维素酶: 测定纤维素酶的滤纸酶活力表示^[14]。酶活单位 (U): 在上述条件下, 每小时由底物生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量。

半纤维素酶: 同上述滤纸酶活的测定, 但底物由滤纸改成木聚糖。酶活单位: 在上述条件下, 每小时由底物生成 1 μmol 木糖所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 微生物法预处理对红麻秸秆成分的影响

木质纤维素原料的主要有机成分包括 3 种: 纤维素、半纤维素和木质素, 未处理红麻样品含纤维素 42.31%、半纤维素 22.58%, 木质素 23.79% (含酸不溶木素和酸溶木素)。接种白腐菌 *P. sajor-caju* 培养后, 红麻秸秆的组分发生改变, 其变化情况见表 1 和图 1。表 1 显示了 *P. sajor-caju* 生长 15 d、25 d 及 35 d 后, 红麻秸秆化学成分的相对质量分数。图 1 则揭示了经处理后, 基于绝干原料计算的红麻秸秆样品各组分质量分数的变化情况。

与未处理原料相比, 对照样品因受灭菌过程及水洗的影响有所损失, 固体回收率为 93.8%, 但纤维素、半纤维素及木质素等成分的质量变化并不明显 ($P > 0.05$), 说明干物质损失主要是体现在秸秆的

表 1 红麻秸秆样品组分的相对质量分数

Table 1 Relative content of kenaf stalk components

Sample	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Untreated	42.31 \pm 1.22 ^b	22.58 \pm 1.39	23.79 \pm 1.08
Control	44.74 \pm 1.12	23.56 \pm 0.98	25.13 \pm 1.28
15 d ^a	49.97 \pm 0.83	22.46 \pm 1.24	21.50 \pm 0.97
25 d	52.85 \pm 0.56	19.91 \pm 1.49	20.66 \pm 1.22
35 d	57.65 \pm 0.96	16.79 \pm 1.37	19.37 \pm 1.05

^a Kenaf stalk samples pretreated by *P. sajor-caju* for 15, 25, or 35 d; ^b Data are mean values \pm standard deviation of three replicates.

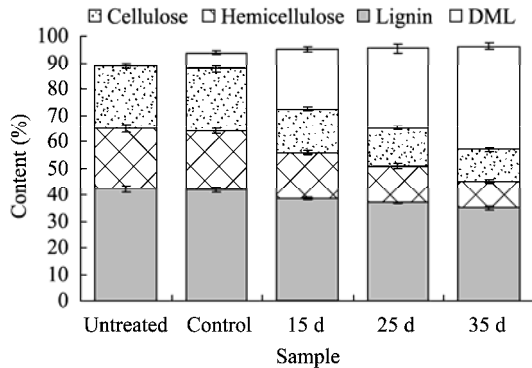


图1 绝干红麻秸秆样品的组分质量分数的变化

Fig. 1 Variation in component content of kenaf stalk samples based on dry matter (DML: dry mass loss).

其他成分上,如淀粉和果胶等,也因此对照样品中纤维素、半纤维素及木质素的相对质量分数有所变化。

接菌后,由于菌丝的生长需求,秸秆干物质逐渐被消耗,培养时间越长,干物质损失越多。接菌培养 15 d,秸秆质量损失约 22.9%,回收 77.1%;培养时间延长至 25 d 或 35 d 后,秸秆质量损失更多,分别回收 69.7% 和 60.6%。在此处理期间,秸秆样品中木质素的去除效果极其明显 ($P < 0.01$),木质素的相对质量分数从对照样品的 25.13% 不断降低,木质素去除率可达 50.20% (35 d)。

同时,随着 *P. sajor-caju* 培养时间的延长,红麻秸秆原料中纤维素和半纤维素的质量也逐渐减少。培养 35 d 后,纤维素损失约 16.75%,半纤维素损失达 53.96%,这可能是由于 *P. sajor-caju* 在培养生长过程中,可表达一定量的纤维素酶和半纤维素酶,能有效转化利用这两种多糖^[15]。

2.2 微生物法预处理对红麻秸秆的酶促水解的影响

纤维素酶在红麻秸秆纤维素转化为葡萄糖,乃至发酵生成燃料乙醇的过程中起着关键作用。在纤维素水解产生葡萄糖的过程中,底物的结构特点决定了整个水解过程所需要的纤维素酶的数量和催化效率。因此,需要探讨微生物法处理红麻秸秆对后续的纤维素酶催化秸秆纤维素水解的影响。

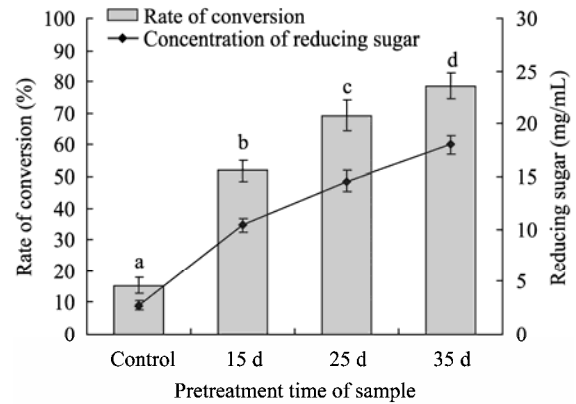


图2 微生物法预处理对红麻秸秆的酶促水解效率的影响

Fig. 2 Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis of kenaf stalk.

通过纤维素酶催化水解产生还原糖,研究上述微生物处理后的红麻秸秆样品的酶促水解效率的变化。图 2 显示了酶促反应体系中加入纤维素酶 30 FPU/g 底物,在 50 °C、160 r/min 的条件下反应 3 d 后,处理样品与对照样品中纤维素转化率的变化情况。在酶解反应体系中,对照样品经酶解后,糖转化率仅为 15.37%。而处理时间为 15 d、25 d、35 d 的红麻秸秆样品在酶解反应后,酶解液中还原糖浓度分别为 (10.38±0.67) mg/mL、(14.59±1.03) mg/mL 和 (18.00±0.92) mg/mL,糖转化率提高至 51.82%、69.33% 和 78.64%,从中可以看出,经 *P. sajor-caju* 菌丝培养一定时间后,纤维素酶对红麻秸秆样品的酶解效率较之对照样品有显著提高 ($P < 0.01$)。

2.3 *P. sajor-caju* 培养物粗提酶液对红麻秸秆的预处理效果

测定上述经 *P. sajor-caju* 生长 15 d、25 d 及 35 d 的红麻秸秆培养物粗提酶液的相关酶活,包括漆酶 (Lac)、木质素过氧化物酶 (LiP)、锰依赖过氧化物酶 (MnP)、木聚糖酶 (Xyl) 和纤维素酶 (Cel) 等,结果显示 (图 3),在不同生长阶段, *P. sajor-caju* 在红麻秸秆培养基里分泌的胞外酶活性不同。在 3 个生长期间,均未检测到 MnP 的活性。培养 15 d,胞

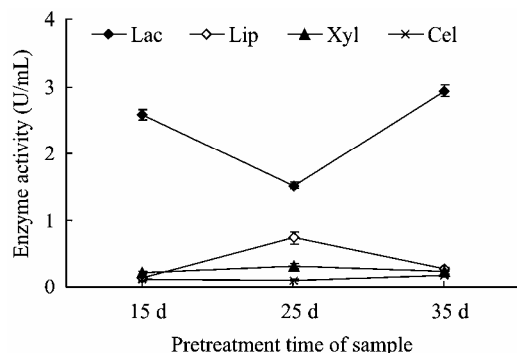


图3 *P. sajor-caju* 红麻培养物粗提酶液的酶活
Fig. 3 Activity of enzyme extraction on 15 d-, 25 d-, or 35 d-kenaf culture by *P. sajor-caju*.

外酶活力主要以 *Lac* (2.59 U/mL) 为主, *LiP* 活性极弱, 尔后 *LiP* 活性提高, 生长至 25 d 时, 木质素的降解由 *Lac* 和 *LiP* 共同起作用, 此时 *Lac* 和 *LiP* 的酶活分别是 1.52 和 0.73 U/mL。在生长后期, 培养时间达到 35 d 时, 胞外酶中 *Lac* 活力提升而 *LiP* 活力降低, 此时 *Lac* 的酶活达 2.94 U/mL, 木质素的降解主要由 *Lac* 起催化作用。在 *P. sajor-caju* 的整个生长过程中, 均表达一定量的木聚糖酶和纤维素酶, 但表达量比较稳定, 在 3 个生长期间其酶活没有显著差异 ($P>0.05$)。

利用 *P. sajor-caju* 粗提酶液处理红麻秸秆原料一定时间后, 红麻秸秆的纤维素酶促水解效果如图 4 所示。红麻秸秆原料经 *P. sajor-caju* 粗酶液预处理后, 以纤维素酶催化水解, 约转化产生还原糖 (56.41 ± 10.02) mg/g 底物, 较之未处理对照样品 ((51.39 ± 8.62) mg/g 底物) 提高 9.77%。但以粗酶液处理红麻秸秆时的时间和温度为因素, 对酶促水解后还原糖的转化结果进行方差分析, 结果表明, 是否以该粗提酶液对红麻秸秆进行预处理, 后续的酶促水解效果并无显著提高 ($P>0.05$)。

2.4 红麻秸秆同步糖化发酵制备乙醇

以上述微生物法预处理的红麻秸秆样品和对照样品为底物, 添加纤维素酶 30 FPU/g 底物, 在 37 °C 利用安琪酵母进行同步糖化发酵, 结果如图 5 所示。发酵 72 h 后, 对照样品产乙醇极少, 在试验

中未检出乙醇含量。经 *P. sajor-caju* 培养生长的预处理样品, 在发酵过程中, 发酵液中乙醇浓度分别达到 13.71、18.35 及 18.90 mg/mL, 较之对照样品, 乙醇产率有显著提高 ($P<0.05$), 分别达到 53.54% (15 d)、68.31% (25 d) 和 64.62% (35 d)。经方差分析, 微生物预处理时间对红麻秸秆的乙醇产率有显著影响 ($P<0.05$), 25 d 和 35 d 预处理样品的乙醇产率较之 15 d 预处理样品有显著提高 ($P<0.05$), 但二者之间无显著差异。

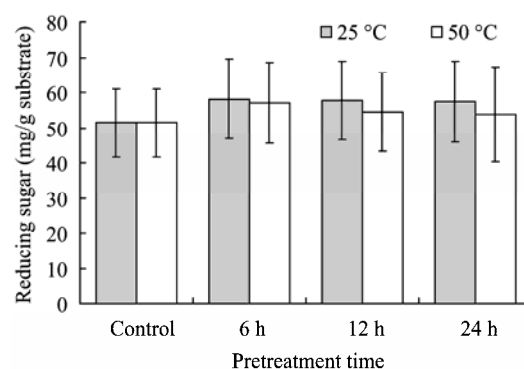


图4 *P. sajor-caju* 粗酶液预处理对纤维素酶催化红麻秸秆水解的影响

Fig. 4 Effect of cellulase catalytic hydrolyzation of kenaf stalk pretreated by enzyme extraction on kenaf culture by *P. sajor-caju*.

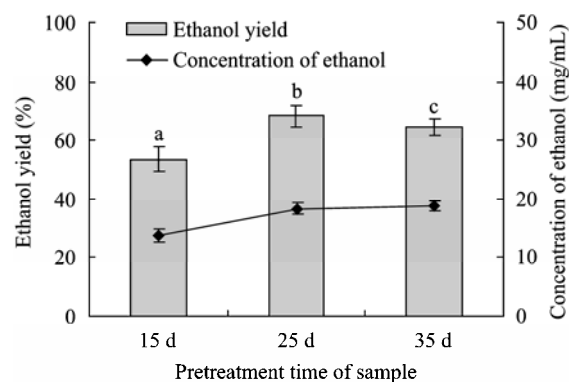


图5 微生物预处理样品同步糖化发酵 72 h 的乙醇产率
Fig. 5 Ethanol yields after 72 h-SSF for microbial-pretreated kenaf stalk samples.

3 讨论

木质素是木质纤维素的重要成分,起到加强植物体茎秆硬度、抵挡微生物侵袭的作用。在纤维素乙醇生产的酶水解工艺中,需要克服木质素对纤维素的保护,以提高糖转化率。白腐真菌 *P. sajor-caju* 在红麻秸秆培养基上的生长过程中,诱导木质素降解酶表达,如漆酶和木质素过氧化物酶,能有效去除木质素和半纤维素。经 *P. sajor-caju* 35 d 的降解作用,红麻秸秆中木质素和半纤维素的去除率分别达到 50.20% 和 53.96%,有效减少了秸秆的木质素和半纤维素的含量,破坏木质纤维素的致密结构,从而达到预处理的目的,显著提高红麻秸秆的还原糖转化率。

在红麻秸秆的微生物法预处理过程中, *P. sajor-caju* 能诱导一定量的纤维素酶和半纤维素酶表达,以致部分纤维素和半纤维素被降解,这可能是由于木质素降解过程中 *P. sajor-caju* 新陈代谢的物质和能量需求所致。纤维素和半纤维素是木质纤维素转化生成可发酵还原性糖的主体,但它们在微生物法预处理过程中出现一定程度的消耗,预示着可能需要对微生物菌种进行改造,使之不产生纤维素酶和半纤维素酶而只产生专一性的木质素降解酶,从而既可以有效去除木质素又可以最大程度地保留糖分,提高乙醇的转化率。另外,通过补充营养液,可满足微生物生长过程中对其他营养物质的需求,促进菌丝生长,提高预处理效率。

在分析 *P. sajor-caju* 培养物粗提酶液对红麻秸秆的预处理效果时发现,如果去除微生物的生长活动,单纯利用木质素降解酶进行处理,后续的纤维素酶促水解效率较之对照并无显著提高,说明木质纤维素原料的致密结构也可能阻碍木质素酶对木质素的降解,仅仅依靠胞外酶中漆酶和木质素过氧化物酶的活力,不能高效地对原料进行预处理,必须借助菌丝的生长活动深入纤维内部,才能有效降解木质素,提高预处理效率。

微生物法预处理能在常温、常压和 pH 近于中性

的条件下进行,降解的最终产物是 CO_2 和 H_2O ,与其他理化预处理法相比,具有能耗低、无污染、条件温和等特点,但耗时较长。*P. sajor-caju* 对红麻秸秆的处理时间长达 25~35 d,才能有效提高红麻秸秆的酶促水解效率和发酵效率。曾有研究人员采用黄孢原毛平革菌 *P. chrysosporium*、虫拟蜡菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 预处理玉米秸秆^[16]、棉花秸秆^[17]、Bermuda (一种牧草)^[18]等,处理时间长达 42 d。鉴于微生物法预处理速度太慢,该预处理法单独应用的实际意义不大,需要跟其他预处理方法结合或提高预处理过程中的经济效益。*P. sajor-caju* 是一种食用菌,有利于提高纤维素乙醇生产中预处理环节的附加值,相应降低纤维素乙醇的生产成本。因此,可以选择食用菌或药用真菌等经济价值高的微生物对木质纤维素进行辅助预处理。

4 结论

采用 *P. sajor-caju* 培养的预处理方法处理红麻秸秆 25~35 d,木质素去除率最高可达 50.20%,后续的纤维素酶催化水解时,纤维素的糖转化率为 69.33~78.64%,同步糖化发酵时乙醇产率可达 68.31%,说明红麻秸秆经 *P. sajor-caju* 预处理后,能有效去除木质素,提高纤维素的转化率和乙醇产率,但是单一的胞外酶提取液不能有效预处理红麻秸秆。微生物预处理法是一种环境友好型的预处理工艺,但耗时较长,预处理速度偏慢,需要结合其他方法,并选择经济价值高的微生物菌种,提高预处理环节的经济效益。

附 录

RS: 反应体系中产生的还原糖总质量, mg;

Wo: 反应体系中加入的红麻秸秆样品的绝干质量, mg;

c: 红麻秸秆样品的纤维素质量分数, %;

[Ethanol]: 发酵体系中发酵液的质量分数, mg/mL;

V: 发酵体系中发酵液的体积数, 100 mL;

W_0 : 发酵体系中加入的红麻秸秆样品的绝干重, mg;

c: 红麻秸秆样品的纤维素含量, %;

0.568: 纤维素转化为乙醇的理论系数。

REFERENCES

- [1] Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 2006, 311(5760): 506–508.
- [2] Gray KA, Zhao LS, Emptage M. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(2): 141–146.
- [3] Wooley R, Ruth M, Glassner D, et al. Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnol Prog*, 1999, 15(5): 794–803.
- [4] Akin DE. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol*, 1988, 21(2/4): 295–310.
- [5] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2005, 96(6): 673–686.
- [6] Sun Y, Cheng JY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 2002, 83(1): 1–11.
- [7] Li HR. *Biology and Biotechnology of the White Fungi*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 12–14.
李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2005: 12–14.
- [8] Qi JM, Li WM, Wu WR, et al. Theories and practices of kenaf germplasm resource innovation. *Plant Fiber Prod*, 1999, 21(1): 43–44.
祁建民, 李维明, 吴为人, 等. 红麻种质资源创新的理论与实践. 中国麻作, 1999, 21(1): 43–44.
- [9] Liu SC. *Analysis and Detection of Pulp and Paper Making*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 22–51.
刘书钗. 制浆造纸分析与检测. 北京: 化学工业出版社, 2004: 22–51.
- [10] Wang FR. *Analysis and Detection of Brewing*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 121–126.
王福荣. 酿酒分析与检测. 北京: 化学工业出版社, 2005: 121–126.
- [11] Rasera K, Ferla J, Dillon AJP, et al. Immobilization of laccase from *Pleurotus sajor-caju* in polyamide membranes. *Desalination*, 2009, 245(1/3): 657–661.
- [12] Zhu HX, Huang GY, Wang L, et al. The studies on characterization and application of edible fungi *Pleurotus eryngii*. *Fujian J Agric Sci*, 2008, 23(1): 48–52.
朱海潇, 黄桂英, 王霖, 等. 凤尾菇漆酶性质及应用的研究. 福建农业学报, 2008, 23(1): 48–52.
- [13] Chi YJ, Yan HB. Detection on laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in ligninolytic enzymes of *Pleurotus djamor*. *Sci Silv Sin*, 2009, 45(12): 154–158.
池玉杰, 闫洪波. 红平菇木质素降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的检测. 林业科学, 2009, 45(12): 154–158.
- [14] Jiang LK, Luo M. *Designment and Practice of Biochemical Experiment*. Beijing: Higher Education Press, 2007: 201–206.
蒋立科, 罗曼. 生物化学实验设计与实践. 北京: 高等教育出版社, 2007: 201–206.
- [15] Reddy GV, Ravindra BP, Komaraiah P, et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem*, 2003, 38(10): 1457–1462.
- [16] Wan CX, Li YB. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresour Technol*, 2010, 101(6): 6398–6403.
- [17] Shi J, Sharma-Shivappa RR, Chinn M, et al. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. *Biomass Bioenergy*, 2009, 33(1): 88–96.
- [18] Akin DE, Rigsby LL, Sethuraman A, et al. Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1591–1598.