

# 水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的研究

沈进军<sup>1,2,3</sup>, 赵剑锋<sup>1,2,3</sup>, 张顺萍<sup>3,4</sup>, 曹晓华<sup>3</sup>, 杨志坚<sup>1,2</sup>, 许明

(1.农业部海峡两岸农业技术合作中心,福建 福州 350002;2.福建农林大学农产品品质研究所,福建 福州 350002;  
3.福建农林大学生命科学学院,福建 福州 350002;4.福建农林大学菌物研究中心,福建 福州 350002)

**摘要:** 研究了培养基起始 pH、发酵时间、发酵温度、酵母接种量和吐温 80 对水稻秸秆同步糖化发酵产乙醇的影响。结果表明,酵母接种量能有效地提高发酵液中乙醇的产率。水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的适宜发酵工艺条件为:起始 pH 值为 4.0~4.5,培养温度为 32 ℃,接种量为 12%,发酵时间 12~24 h。在此条件下,生成乙醇的浓度为 1.4 mg/mL,水稻秸秆原料的乙醇转化率达 7.02%。

**关键词:** 燃料乙醇; 水稻秸秆; 同步糖化发酵; 哈茨木霉

中图分类号:TS262.2;TS261.4;TS261.2 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2010)02-0023-04

## Research on the Production of Fuel Ethanol by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Rice Straw

SHEN Jin-jun<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Jian-feng<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Shun-ping<sup>3,4</sup>, CAO Xiao-hua<sup>3</sup>, YANG Zhi-jian<sup>1,2</sup> and XU Ming

(1. Cross-Strait Agricultural Technology Cooperation Center, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Agricultural Product Quality Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 3. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 4. Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** The effects of different conditions including initial pH value of culture medium, fermentation time, fermentation temperature, and yeast inoculation quantity and Tween-80 on simultaneous saccharification and fermentation of rice straw to produce fuel ethanol were investigated. The results showed that yeast inoculation quantity could effectively increase ethanol yield in fermenting liquid. Under the optimum fermentation conditions (initial pH as 4.0~4.5, fermentation temperature at 32 ℃, and yeast inoculation quantity was 12%, and fermentation time was 12~24 h), the produced ethanol content was 1.4 mg/mL and the conversion rate from rice straw to ethanol was 7.02%.

**Key words:** fuel ethanol; rice straw; simultaneous saccharification and fermentation; *Harzianum Trichoderma*

以非粮食与经济作物为纤维素原料的生物燃料乙醇生产是决定未来大规模替代石油的关键。我国是农业大国,每年可产生秸秆 7 亿多 t,相当于 315 亿 t 标准煤,但目前大量秸秆就地焚烧既污染环境又浪费能源。因此,在我国开发利用秸秆生产燃料乙醇更具有现实意义。而水稻秸秆是我国三大农作物秸秆之一,约占全国秸秆总量的 25.10%。因此,研究利用水稻秸秆产乙醇是解决人类粮食、能源、环境三大危机的重中之重,有利于解决秸秆就地焚烧造成的污染和浪费,并可增加农民收入,这符合我国“三农问题”的需求,也符合我国农业可持续发展与生态农业发展的需求。

### 1 材料与方法

#### 1.1 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g、去

皮,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,用水定容至 1 L。

基础固体产酶培养基:稻草粉 4 g,麸皮 1 g,无机盐培养液 15 mL ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  16 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L)<sup>[1]</sup>。

一级种子培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 3 g/L,自然 pH。

二级种子培养基:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 3 g/L,自然 pH。

乙醇发酵培养基:稻草粉 2 g,纤维素酶液按 20 IU/g 稻草粉加入,酵母菌以 10%接种量加入。

#### 1.2 菌种

哈茨木霉(*Harzianum Trichoderma*);葡萄牙假丝酵母(*Candida lusitanae*)。

#### 1.3 发酵试验操作

250 mL 三角瓶中装入水稻秸秆 2 g,纤维素酶液按

基金项目:省科技创新平台建设计划项目“福建省特种稻创新平台建设”(2007S1001);省科技重大专项专题项目“特种稻育种与综合利用技术研究”(2008NZ0001-4)。

收稿日期:2009-12-17

作者简介:沈进军(1983-),男,硕士研究生,研究方向:应用微生物。

通讯作者:许明(1978-),男,博士,主要从事特种稻育种与利用研究。

20 IU/g 稻草粉加入,酵母菌以 10% 接种量加入,瓶口塞橡皮塞(插有针头,以排出生成的 CO<sub>2</sub>)以控制厌氧条件,在不同温度、不同时间、不同接种量、不同起始 pH 值等条件下进行燃料乙醇发酵的单因子影响试验和正交试验,测定发酵醪液中燃料乙醇的浓度、糖分含量。

#### 1.4 酶活力测定方法

滤纸酶(FPA)活力:通常以滤纸酶活力(FPA)代表纤维素酶的总活力,按照国际理论和应用化学协会(IUPAC)推荐的国际标准方法测定<sup>[2]</sup>,以国际单位 IU 表示。试管中放入 1×6 cm whatmanNo.1 滤纸(约 50 mg)一条,加入 0.5 mL 适当稀释的纤维素酶液和 1.5 mL 柠檬酸缓冲液(pH4.8),于 50 °C 水浴 60 min。空白试验中除酶液事先灭活外,其余条件不变。反应结束后用 DNS 法测定所得的还原糖含量。

一个滤纸酶活力国际单位(FPIU)等于酶促反应中每分钟生成 1.0 μmol 葡萄糖(以还原糖表示)所需的酶量。则有:

滤纸酶活力(FPIU/mL)

$$= \frac{\text{糖量}(\text{mg}) \times 1(\text{min}) \times 1000(\mu\text{mol}/\text{mmol})}{180(\text{mg}/\text{mmol}) \times 60(\text{min}) \times 0.5(\text{mL})} \times \text{稀释倍数}$$

β-葡萄糖苷酶的测定方法有多种<sup>[3]</sup>。根据高培基<sup>[4]</sup>(1988)的方法改进,取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液,加入 1.5 mL pH4.8、0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液配制的 1% 的水杨苷,50 °C 恒温水浴中酶解 30 min,立即加入 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴煮沸 10 min,定容至 25 mL,于 540 nm 测 OD 值,并以加热失活的酶液按照同样的方式处理做空白对照。

在上述条件下,1 min 水解产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位(IU)。

β-葡萄糖苷酶活力(IU/mL)

$$= \frac{\text{糖量}(\text{mg}) \times 1(\text{min}) \times 1000(\mu\text{mol}/\text{mmol})}{180(\text{mg}/\text{mmol}) \times 30(\text{min}) \times 0.5(\text{mL})} \times \text{稀释倍数}$$

#### 1.5 乙醇浓度和葡萄糖含量的测定方法

同步糖化发酵过程中,每隔一定时间取发酵液适量,适度稀释后用生化分析仪分析其乙醇浓度和葡萄糖含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维素酶活力

于 28 °C,固体培养 72 h 后,经测定,滤纸酶活力为 3.6 IU/g,β-葡萄糖苷酶活力为 3.2 IU/g。

### 2.2 发酵条件

#### 2.2.1 发酵时间对发酵结果的影响

将种子液按 10% 接种量接种于固体发酵培养基,起始 pH4.8,纤维素酶用量 20 FPIU/g,于 30 °C 培养,每隔一定时间测还原糖浓度和乙醇产量。

图 1 结果表明,在发酵的初期,纤维素酶作用于底物中纤维素成分所生成的葡萄糖只有少量被酵母利用生成乙醇,发酵液中游离的葡萄糖比较高。这可能是由于所

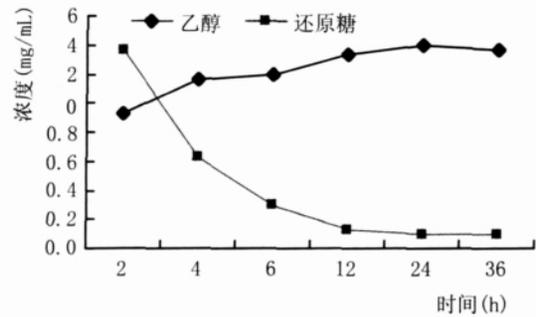


图1 时间对同步糖化发酵的影响

接种的酵母数量有限,总代谢速度低于较高的酶解产糖速度所致。另外,采用的酵母对于底物中复杂的成分可能需要一定的适应过程才可以发挥作用。在发酵中后期,发酵液中几乎没有明显的葡萄糖残余。在起初的 24 h 内,乙醇浓度一直上升,当培养到 24 h,乙醇浓度达到最大,乙醇浓度达 1.400 mg/mL,36 h 后,乙醇浓度开始下降,因此,发酵时间以 24 h 为宜。

#### 2.2.2 酵母用量对发酵结果的影响

在 pH 值 4.8、温度为 30 °C、纤维素酶用量为 20 FPIU/g、不同的接种量条件下,48 h 内发酵醪液中燃料乙醇浓度见图 2。

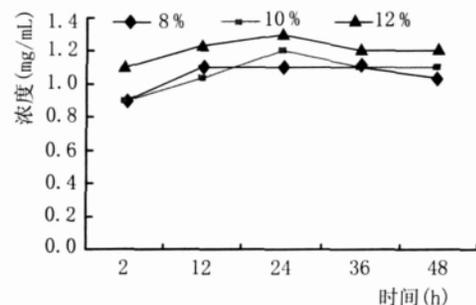


图2 不同酵母用量下水稻秸秆的同步糖化发酵

图 2 表明,不同的接种量对水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇有很大的影响,其中在接种量为 12% 时,燃料乙醇浓度最大,为 1.3 mg/mL,此时水稻秸秆原料乙醇转化率为 6.52%。

#### 2.2.3 温度对发酵结果的影响

在 pH 值 4.8、接种量为 10%、纤维素酶用量为 20 FPIU/g 和不同温度条件下,经过 48 h 发酵,发酵醪液中燃料乙醇的浓度见图 3(A、B、C、D、E、F)。

图 3 表明,葡萄牙假丝酵母作用于水稻秸秆产燃料乙醇具有广温性,在 30~37 °C 之间燃料乙醇浓度相差不大;30 °C 时,乙醇浓度最大,达 1.3 mg/mL,只是在 48 h 才达到这一最高值;32 °C 时,乙醇浓度在 24 h 就达到最大值,为 1.267 mg/mL;37 °C 时,乙醇浓度在 24 h 达到最大值,为 1.267 mg/mL;40 °C 时,乙醇浓度明显开始降低;50 °C 时,乙醇浓度仅有 0.7 mg/mL,为二级种子液带入的乙醇所致,葡萄糖浓度随时间的延长呈一直上升趋势。

#### 2.2.4 培养基起始 pH 值对发酵结果的影响

在温度为 30 °C、接种量为 10%、纤维素酶用量为

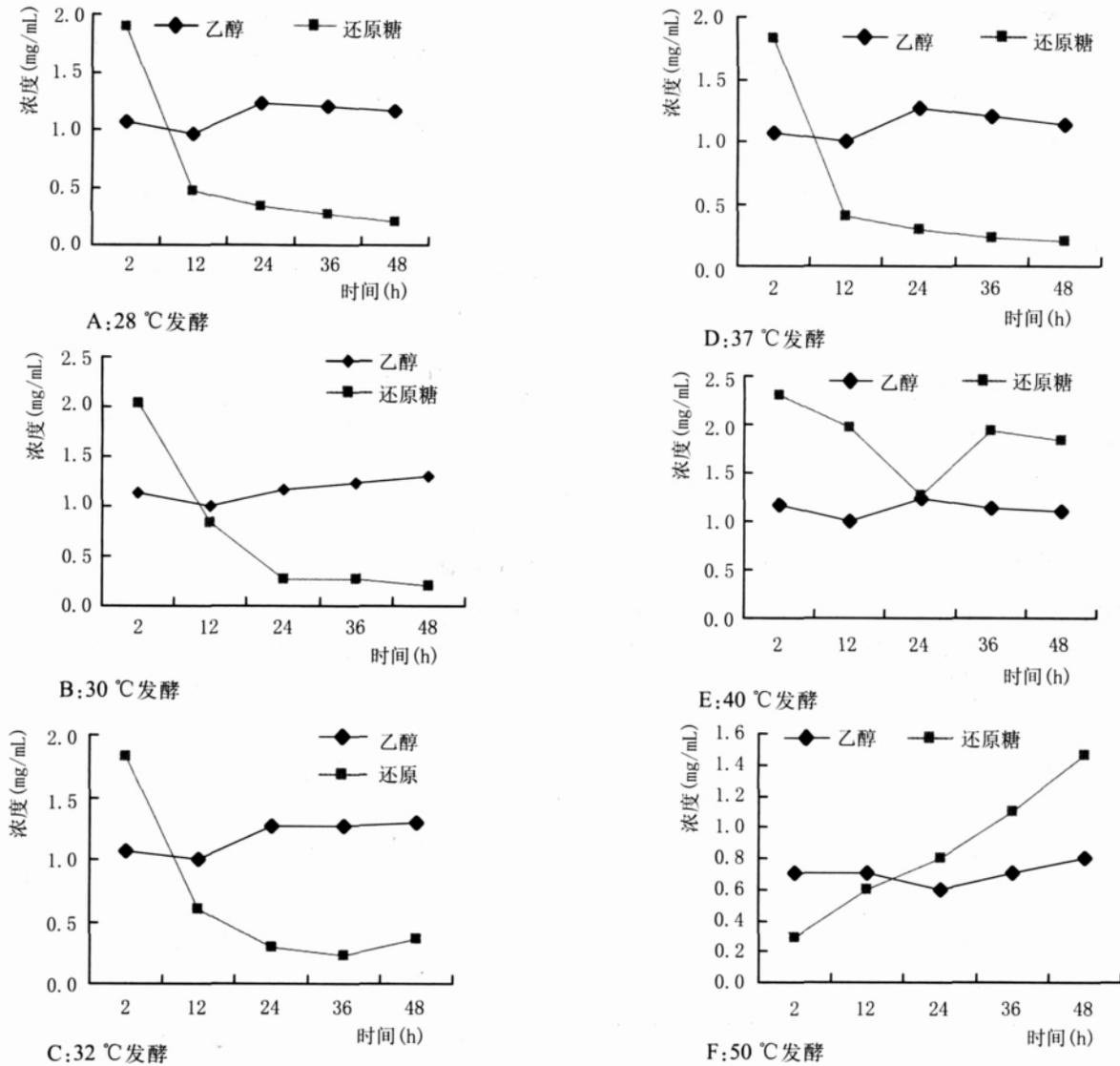


图3 不同温度下水稻秸秆的同步糖化发酵

20 FPIU/g,不同 pH 值条件下,经过 48 h 发酵,发酵醪液中燃料乙醇的浓度见图 4。

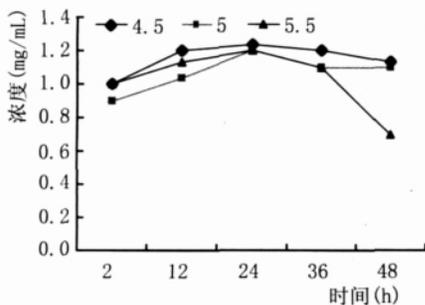


图4 不同 pH 下水稻秸秆的同步糖化发酵

图 4 表明,发酵液在不同的 pH(4.5~5.5)下对水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的影响不大,说明水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇在这一 pH 范围内具有广适性,其中在 pH 值 4.5 时发酵醪液中燃料乙醇浓度达最大,为 1.233 mg/mL。

### 2.2.5 Tween-80 对 SSF 的影响

沈加成<sup>[5]</sup>的研究表明,0.2%的 Tween-80 对于以木糖渣为底物的 SSF 有一定的促进作用。早期和最近的研究表明,添加表面活性剂能够提高纤维素到葡萄糖的转化率<sup>[6]</sup>。Castanon 等<sup>[7]</sup>研究表明,添加 Tween-80 后,48 h 的报纸酶解率提高了 14%。但也有在添加表面活性剂后作用相反的报道<sup>[7-9]</sup>。本实验添加 Tween-80 对水稻秸秆同步糖化发酵的影响结果见图 5。

图 5 结果表明,Tween-80 对于 SSF 作用不明显,总体而言,Tween-80 对于水稻秸秆的 SSF 没有促进作用,仅在发酵的 24 h,添加 0.05%和 0.50%的 Tween-80 对于水稻秸秆的 SSF 有一定的促进作用,比对照分别提高 17.90%和 28.62%。

### 2.3 发酵条件的正交试验结果

在以上单因子试验的基础上,基本确定水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的工艺条件为:pH 值为 4.5、温度为 37 °C、接种量为 12%、发酵周期为 24 h。为了获得最佳的发酵条件,需要对影响燃料乙醇产率的因素进行

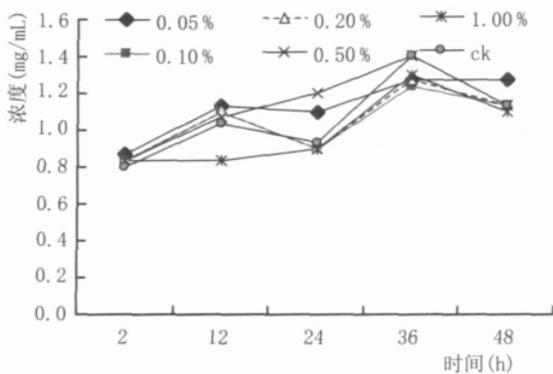


图5 Tween-80对水稻秸秆同步糖化发酵的影响

优化组合试验。对发酵条件中的时间、温度、pH值和接种量等4个因素进行了正交试验,试验设计及试验结果见表1。

表1  $L_9(3^4)$ 正交实验结果及分析

| 实验号 | 因素       |           |        |           | 乙醇浓度<br>(mg/mL) |
|-----|----------|-----------|--------|-----------|-----------------|
|     | A(时间, h) | B(温度, °C) | C(pH)  | D(接种量, %) |                 |
| 1   | 1(12)    | 1(32)     | 1(3.5) | 1(8)      | 1.1             |
| 2   | 1(12)    | 2(37)     | 2(4.0) | 2(10)     | 1.3             |
| 3   | 1(12)    | 3(40)     | 3(4.5) | 3(12)     | 1.3             |
| 4   | 2(24)    | 1(32)     | 2(4.0) | 3(12)     | 1.4             |
| 5   | 2(24)    | 2(37)     | 3(4.5) | 1(8)      | 1.1             |
| 6   | 2(24)    | 3(40)     | 1(3.5) | 2(10)     | 1.2             |
| 7   | 3(36)    | 1(32)     | 3(4.5) | 2(10)     | 1.3             |
| 8   | 3(36)    | 2(37)     | 1(3.5) | 3(12)     | 1.3             |
| 9   | 3(36)    | 3(40)     | 2(4.0) | 1(8)      | 1.0             |
| K1  | 12.333   | 12.667    | 12.000 | 10.667    |                 |
| K2  | 12.333   | 12.333    | 12.333 | 12.667    |                 |
| K3  | 12.000   | 11.667    | 12.333 | 13.333    |                 |
| R   | 0.333    | 1.000     | 0.333  | 2.666     |                 |

由表1结果可以看出:

①在9个处理的直观分析中,第4个组合条件下燃料乙醇浓度最高,为1.4 mg/mL。从而可以确定第4个组合  $A_2B_1C_2D_3$  为最佳条件组合。

②从各个因子不同水平条件对燃料乙醇浓度的影

响来看,各个因子影响燃料乙醇浓度的顺序分别是  $A_1=A_2 > A_3, B_1 > B_2 > B_3, C_2=C_3 > C_1, D_3 > D_2 > D_1$ , 因此可以确定最佳条件组合为  $A_1B_1C_2D_3, A_1B_1C_3D_3, A_2B_1C_2D_3, A_2B_1C_3D_3$ , 即时间为12 h或24 h、温度32 °C、pH4.0或4.5、接种量12%。

③从各因子的极差大小  $RD > RB > RA = RC$  可知,在发酵条件中,对乙醇浓度影响最大的是酵母用量,其次是温度,而时间和pH的影响是最小的。

### 3 结论

水稻秸秆同步糖化发酵生产燃料乙醇的适宜的发酵工艺条件为:起始pH值为4.0~4.5,培养温度为32 °C,接种量为12%,发酵时间12~24 h。在此条件下,生成乙醇的浓度为1.4 mg/mL,水稻秸秆原料的乙醇转化率为7.02%。

### 参考文献:

- [1] 徐昶,龙敏南,邬小兵,等.高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2005,44(1):107.
- [2] Ghose T K.Measurement of cellulase activities[J].Pure Appl Chem,1987,59(2):257-268.
- [3] 李华,高丽.β-葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J].食品与生物技术学报,2007,26(2):107-114.
- [4] 高培基,曲音波,王祖农.纤维素酶解过程的分析和测定[J].生物工程学报,1988,4(4):321-325.
- [5] 沈加成.酶解工业纤维废渣生成乙醇技术的研究[D].济南:山东大学微生物技术国家重点实验室,2008.
- [6] Helle SS,Duss SJB,Cooper DG.Effect of surfactants on cellulose hydrolysis[J].Biotechnol Bioeng 1993;42(5):611-7.
- [7] Castanon M,Wilke CR.Effects of the surfactant Tween-80 on enzymatic hydrolysis of newspaper[J].Biotechnol Bioeng,1981, XXIII:1365-72.
- [8] Kurakake M,Ooshima H,Kato J,Harano Y.Pretreatment of becase by nonionic surfactant for the enzymatic hydrolysis[J]. Bioresour Technol 1994,49:247-51.
- [9] Kaar WE,Holtzapple M.Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover[J].Biotechnol Bioeng 1998,59:419-27.

(上接第22页)

缩短为36 h,酒精度达到了4.7 %vol。

### 参考文献:

- [1] Siso, M. I. Gonzá lez. The biotechnological utilization of cheese whey: A review[J]. Bioresource Technology, 1996, 57(1): 1-11.
- [2] P. Gunasekaran, N. R. Kamini, High ethanol productivity from lactose by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991,7(5):551-556.
- [3] Ozmihci, S., Kargi, F., Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP)[J].Enzyme and Microbial Technology, 2007,41: 876-880.
- [4] Kargi, F., Ozmihci, S., Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating param-

eters[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38 (5): 711-718.

- [5] Ozmihci, S., Kargi, F., Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(6): 602-606.
- [6] 周琨,肖冬光,郭学武,王艳.混菌固定化发酵乳清生产燃料乙醇的研究[J].酿酒科技,2008,1(163):42-44.
- [7] 周琨,郭学武,王瑞生,肖冬光,岳瑞雪,固定化酵母发酵乳清生产燃料酒精的研究,酿酒,2007,34(5):35-37.
- [8] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [9] 王亚楠,等.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,29(6):84-86.