

云芝和假丝酵母对煤的溶(降)解

韩 威 杨海波 赵树昌 赵 岩 冯朴荪

(大连理工大学化工学院, 大连 116012)

摘 要 通过云芝和假丝酵母固体培养溶煤试验筛选了易于为它们溶解的煤样; 测定了这两种菌在固体和液体培养条件下对扎费诺尔及平庄硝酸氧化煤的溶煤率, 一般可达 60—80%; 对煤溶物进行了元素分析、红外光谱和核磁共振分析。分析结果初步表明, 生物溶解过程中煤的组成和结构发生了一定的变化。

关键词 云芝, 假丝酵母, 褐煤, 生物溶解

某些真菌培养液具有溶解风化褐煤的能力, 自本世纪 80 年代以来, 在美国和西德等国受到微生物学家和化学工程研究者的注意^[1-3]。他们利用典型的木腐菌^[2]和从煤矿断层中分离出来的菌类^[4], 通过固体培养, 将煤粒与菌体直接接触, 观察不同煤样受各种菌的作用所发生的溶(降)解情况, 借以筛选具有较强溶煤能力的菌种和容易受到培养菌作用而发生溶(降)解的煤种。美国研究者已经筛选出适于溶煤的数十种菌^[4], 其中包括担子菌纲的高等真菌云芝 (*Polyporus versicolor*), 粉状侧胞菌 (*Phanerochaete chrososporium*), 半知菌纲的假丝酵母 (*Candida* ML13), 青霉菌 (*Penicillium*) 和放线菌 (*Streptomyces viridosporus*, *S. setonii* 和 *S. badius*) 等。在研究这些菌的溶煤作用中发现, 溶解作用的发生与煤样的种类及氧化程度有关^[5]。煤化作用较浅的低阶煤(褐煤), 受到强风化作用的褐煤和经过强氧化剂化学处理而呈高度氧化状态的煤易受到微生物的作用而溶解。

为了掌握煤溶解过程及探索溶解过程发生的机理, 研究者们还广泛进行了菌种液体培养时溶煤作用的考察^[6-8], 并初步探讨了有关煤-微生物-水系统生物反应器开发的某些问题。对煤溶产物进行了元素分析, 红外光谱和核磁共振分析, 溶解性质及滴定分析, 分子量分布测定等研究^[9,10]。这些结果对溶煤过程机理的理解, 以及煤溶产物的进一步加工与应用提供了参考。该现象的深入研究有可能导致加工煤的新途径。本文报道用云芝和假丝酵母对几种煤溶解作用的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 实验所用云芝 (*P. versicolor*) 为本院保存菌种, 假丝酵母 (*Candida* ML13) 是美国橡树岭 (Oak Ridge) 国立实验室 Faison, B. D. 博士赠送的。

国家自然科学基金资助项目。
本文于 1992 年 6 月 8 日收到。

1.1.2 培养基: 固体培养用 Sabouraud 麦芽糖琼脂培养基 (SMA), 其组成为 (g): 麦芽糖 40, 蛋白胨 10, 琼脂 16—20, 去离子水 1000ml。液体培养用 Sabouraud 麦芽糖培养液 (SMB), 其组成为 (g): 麦芽糖 40, 蛋白胨 10, 去离子水 1000ml, pH 6—7。两种培养基在接种使用前均需经 0.1MPa 灭菌 30 分钟。

1.1.3 煤样: 试验煤样的粒度是 0.25—0.50mm, 主要来源于东北和内蒙古煤矿; Faison 博士赠送的美国 Leonardite 褐煤样和北达科他 (North Dakota) 褐煤样是美国研究者最常用的煤样。为了增强煤溶解, 大部分煤样经过硝酸氧化处理, 并用水洗致无色, pH 大于 5.5, 烘干备用。经过这样的预处理, 不仅提高了煤的氧化程度, 增加了 O/C 和 N/C (原子比), 而且改变了其孔隙结构, 使溶煤活性物更容易透入和攻击煤基质。

1.2 方法

1.2.1 固体培养菌溶煤: 在培养皿内的 SMA 培养基表面上接种, 于 25—30℃, 相对湿度大于 80% 的条件下, 培养 10 天, 待菌丝体长成之后, 加入定量煤样。由于云芝菌丝体表面比较紧密, 煤粒直接加到菌丝体上; 假丝酵母表面疏松, 要在上面放置 0.5 μ m 孔径的有机滤膜, 煤粒加到滤膜上, 以免菌丝包围煤粒, 使溶煤残渣难以与菌丝分离, 影响残渣重量测定。煤溶解过程中, 不断吸去形成的黑色液体, 回收煤溶产物。当无黑色液体形成时, 用去离子水洗去煤粒残渣。经离心过滤回收的残渣, 烘干后称重, 由原煤干重与烘干残渣重量差计算煤溶解率。回收的黑色煤溶物在 70℃ 下烘去水分, 制成固体煤溶物样品, 用于各种分析。

1.2.2 液体培养物溶煤: 在 250ml 三角烧瓶中加入 50ml SMB 培养液。每瓶用 5ml 培养 7 天并经破碎的菌丝悬浮液接种。在与固体培养相同的条件下, 以 150r/min 摇动速度进行摇瓶培养, 以保证培养液有充足的溶解氧补充。在培养过程中, 定期取出瓶样, 用多孔玻璃介质漏斗滤出菌丝, 在 95℃ 下烘干称重, 绘制生长曲线。滤液用酸度计测定 pH 值, 绘制培养液 pH 值变化曲线。培养一定时间后, 先后用多孔玻璃介质漏斗和 0.5 μ m 孔径有机滤膜过滤, 得到的无细胞滤液以 0.3g/10ml 比例加入煤粒样品。当煤溶解后, 滤液颜色变深, 测定吸光度 A_{450nm} 值, 以确定煤的溶解程度。煤溶解率的确定, 通过离心分离收集煤残渣, 烘干并称重后, 与加入煤样干重差计算得出。含有煤溶物的黑色滤液, 加酸调节至 pH 值为 2.0, 煤溶物成絮状析出, 离心分去上清液, 然后于 70℃ 烘干, 制成煤溶物酸沉淀物固体样品, 备分析用。

1.2.3 煤溶物分析: 在固体培养溶煤试验中, 煤溶物从菌丝体上回收, 受微生物污染较少, 直接经烘干后, 得到的固体用于工业分析, 元素分析, 红外光谱和核磁共振分析。

2 结果和讨论

2.1 固体培养菌溶煤试验

本试验在试管内的 SMA 斜面上, 接种云芝和假丝酵母。待菌丝长满斜面后, 放入煤样。观察由于煤样溶解, 煤粒周围黑色液体的出现, 以及煤溶物渗入培养基, 使琼脂染黑现象的发生时间和程度。其观察结果示于表 1。结果表明, 各种菌对不同煤样的溶解能力是不同的。这不仅因为不同菌种在代谢过程中分泌到胞外的活性物质不同, 也由于煤

的物理和化学结构与组成不同所造成的。

表 1 云芝和假丝酵母溶解煤的结果

Table 1 Solubilization of coal by *P. versicolor* and *Candida* ML13

Coal samples	Strains	
	<i>P. versicolor</i>	<i>Candida</i> ML13
Zalainuoer lignite	—	
Zalainuoer weathered lignite	+	+
Nitric-acid oxidized Zalainuoer lignite	+++	++++
Pingzhuang lignite	+	
Nitric-acid oxidized Pingzhuang lignite	+++	++++
Nitric-acid oxidized Huolinhe lignite	+++	+++
Nitric-acid oxidized Yiminhe lignite	++	+
Nitric-acid oxidized Shenbei lignite	+	+
Wuhai bituminous coal	—	—
Nitric-acid oxidized Wuhai bituminous coal	+	++++
North Dakota lignite	+++	—
Leonardite lignite	+++	+++

—Not discovered, +Solubilized a little, ++Solubilized partly,

+++Solubilized mostly, ++++Solubilized intensively

2.2 固体培养溶煤率

在云芝和假丝酵母菌丝体上放置煤粒, 经过 3 周后, 原来浅黄色的 SMA 培养基逐渐被染成黑色, 在煤粒周围形成的黑色液珠逐渐扩大。以一定时间间隔取出样皿, 差重法测量煤溶率, 绘制成图 1 和图 2 所示的曲线。

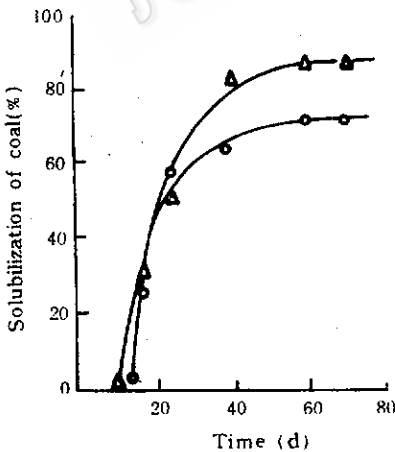


图 1 云芝对煤的溶解作用

Fig. 1 Solubilization of *P. versicolor* on lignite

△Nitric-acid oxidized Zalainuoer lignite

○Nitric-acid oxidized Pingzhuang lignite

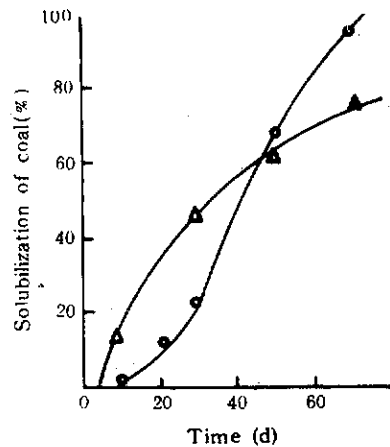


图 2 假丝酵母对煤的溶解作用

Fig. 2 Solubilization of *Candida* on lignite

(Legend is as Fig. 1)

比较图 1 和图 2 的曲线看出,假丝酵母开始溶煤的时间比云芝早得多。假丝酵母对煤的溶解程度是随时间逐渐增加的;而云芝虽然开始煤溶较迟,但溶煤率在开始溶煤后很快达到较大数值,而后随时间的延长,增加的幅度较小。这表明,云芝和假丝酵母溶煤机理上存在着某种差别。由此可认为云芝活性物分泌得较晚,但活性较强,一旦分泌出来与煤接触,便能使煤迅速溶解。

2.3 液体培养物溶煤率

2.3.1 菌丝生长及培养液性质:在摇瓶 SMB 培养液中,云芝和假丝酵母菌丝体干重的测量结果和培养液 pH 值的测量结果绘于图 3 和图 4。云芝在 2—3 周内,假丝酵母在 4 周内,菌丝体干重随培养时间增大,随后缓慢下降,这表明在实验条件下两种菌的生长有衰老期限。云芝培养液 pH 变化是由初始的 6.0 在两周的生长期内下降到 5.5 以下,此后略有回升;而假丝酵母培养液 pH 值在培养过程中变化很大,在 3 周的生长期之后,急剧增大到 8.5 以上,最终提高到接近 9.0。

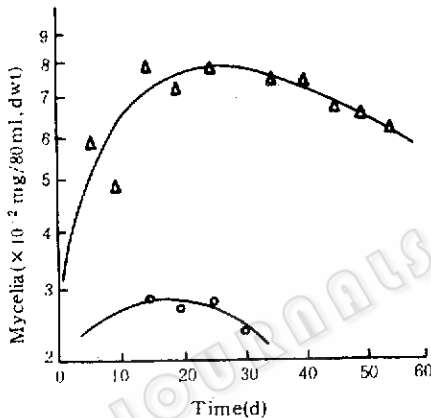


图 3 菌丝体干重的变化

Fig. 3 Varied curve of mycelia dry weight with time
(Legend is as Fig. 1)

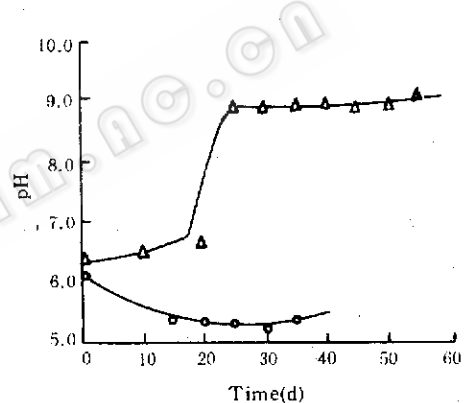


图 4 培养液 pH 的变化

Fig. 4 Varied curve of culture pH with time
(Legend is as Fig. 1)

2.3.2 煤溶产率:无细胞滤液的溶煤能力随培养时间而变化。以 0.2g/10ml 滤液的比例在云芝和假丝酵母的滤液中加入煤样。在溶解发生后,测定滤液的吸光度 A_{450nm} 值随培养时间的变化绘于图 5,以重量法测定云芝培养液溶解煤的产率绘于图 6。

假丝酵母在培养 30 天之后,滤液溶煤 A_{450nm} 值随其培养时间急剧增大,这与菌丝生长进入衰老期及滤液 pH 变为碱性的过程相对应。云芝培养滤液在培养 40 天之内溶煤很少,其滤液溶煤 A_{450nm} 值呈缓慢增加。但培养超过 60 天后,云芝滤液溶煤率却迅速增大到 60% (对硝酸氧化平庄褐煤) 和 80% (对硝酸氧化扎赉诺尔褐煤) 以上。这与固体培养溶煤结果一致。

2.3.3 煤溶产物分析:将云芝和假丝酵母固体培养的煤溶物进行元素分析,红外分析和核磁共振分析。元素分析结果列于表 2。显然,煤溶解物较煤样有更高的氢、氧和氮含量。由氢和氧含量增加,判断煤生物溶解涉及氧化水解过程。氮含量增加除含氮官能团的引

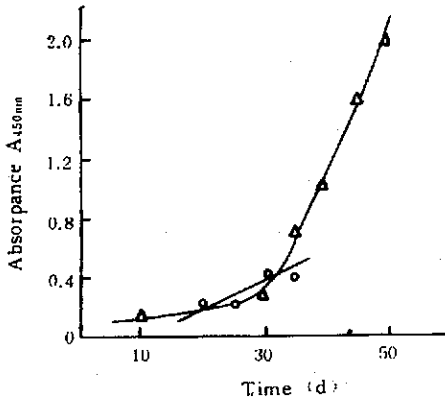


图 5 滤液溶 Leonardite 煤后的吸光度

Fig. 5 Absorbance of leonardite lignite solution solvated by cell-free filtrate (Legend is as Fig. 1)

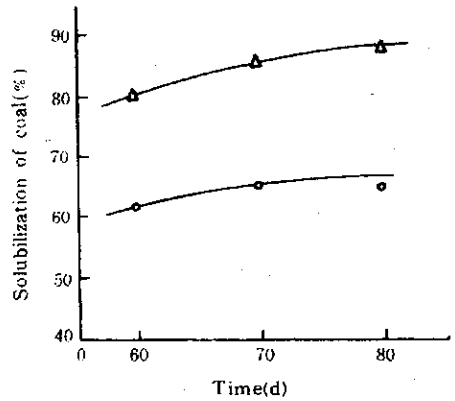


图 6 云芝滤液的溶煤率

Fig. 6 Solubilization of cell-free filtrate of *P. versicolor* on lignite (Legend is as Fig. 1)

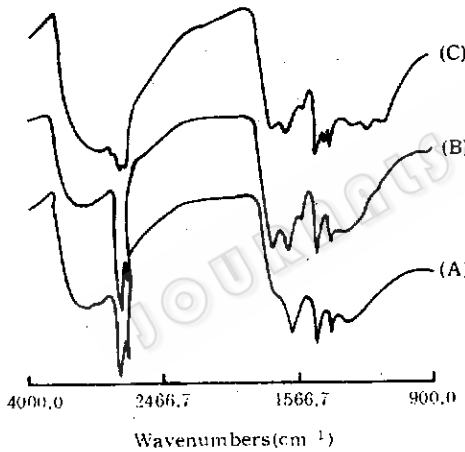


图 7 溶解煤及煤样的红外光谱

Fig. 7 Infrared spectroscopy of coal and solvated coal (A) Coal, (B) Oxidized coal, (C) Solvated coal

入外，还可能产生于回收煤溶物过程蛋白质的污染。煤溶物的 H/C、N/C (原子比) 及 (O+S) / C 值均比氧化煤高，比未经氧化处理的煤更高，表明分子内大量增加了含氧含氮官能团，这使溶解煤有可能成为有价值的化学品。假丝酵母溶解扎贵诺尔硝酸氧化煤的产物，硝酸氧化扎贵诺尔褐煤及原煤的红外光谱展示于图 7。如图所示，3 个样品谱图基本相似，表明生物溶解煤没有使煤结构发生特别显著的变化，但生物溶解煤在 1400cm^{-1} 处有一中等强度峰出现，显示了羧酸盐、胺盐及有机酸铵盐的存在，说明生物溶解过程中所发生的某些变化。用 ^1H NMR 核磁共振分析了云芝溶解的

平庄和扎贵诺尔煤产物，得出脂肪氢/芳香氢约为 2，说明产物中芳香与脂肪结构约各占一半。

本研究表明：(1) 云芝和假丝酵母都具有一定的溶解煤的能力，可用于煤溶解研究试验。但二者溶煤现象有区别，反映二种菌溶煤机理上的不同。云芝在 pH 值小于 6.0 下溶解煤，主要体现为酶的催化氧化溶解；而假丝酵母在 pH 接近于 9.0 下溶煤，主要是碱溶解机理；(2) 煤溶产物比原煤有更多含氧含氮官能团，但又保持煤的基本结构，这在作为某些化学品应用方面有意义；(3) 固体培养溶煤时，收集到的产物受生物杂质污染较少，适合于溶解煤的各种分析，而液体培养溶煤则适于对溶解机理的研究和生物溶煤反应器的开发研究。

表 2 煤样及煤溶解物的元素分析结果

Table 2 The results of elements analyses of coal and solvated coal

Coal samples	Elements					
	C	H	N	(O+S) *	H/C	N/C
Zalainuoer lignite	64.49	4.59	1.49	29.43	0.85	0.02
Nitric-acid oxidized Zalainuoer lignite	57.60	3.63	4.66	34.11	0.77	0.07
Solvated nitric-acid oxidized Zalainuoer lignite by <i>P. versicolor</i> by acid-depositing	38.62	3.80	5.93	51.62	1.18	0.13
Solvated nitric-acid oxidized Zalainuoer lignite by <i>Candida</i> by acid-depositing	36.73	3.85	5.02	54.40	1.26	0.12
Pingzhuang lignite	63.50	4.07	0.98	41.45	0.77	0.01
Nitric-acid oxidized Pingzhuang lignite	54.79	3.04	4.30	37.87	0.67	0.07
Solvated nitric-acid oxidized Pingzhuang lignite by <i>P. versicolor</i> by acid-depositing	38.16	3.75	6.26	51.83	1.18	0.14
Solvated nitric-acid oxidized Pingzhuang lignite by <i>Candida</i> by acid-depositing	35.21	3.79	4.98	56.02	1.29	0.12

* The content of ash contained is little.

致谢 赵秀琛、高峰屹、易晓宁和纪开明等同志也参加了部分工作。

参 考 文 献

- [1] Fakoussa R M. Investigation with Microbial Conversion of National Coals, Ph. D. Thesis, Friedrich Wilhelms University, Bonn, Federal Republic of Germany, 1981.
- [2] Cohen M S and Gabriele P D. Appl Environ Microbiol, 1982, 44 (1) : 23.
- [3] Scott C D et al. BioTechnology Progress, 1986, 2 (3) : 131.
- [4] Ward B. System Appl Microbiol, 1985, (6) : 236.
- [5] Strandberg G W and Lewis S N. Biotechnology and Bioengineering Symp, 1986, (17) : 153.
- [6] Quigley D R et al. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1989, (20/21) : 753.
- [7] Pyne J W et al. Resour Conserv recycl, 1988, 1 (3-4) : 185.
- [8] Cohen M S et al. Appl Environ Microbiol, 1987, 53 : 2840.
- [9] Faison B D et al. Product Characterization, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1989, (24/25) : 831.

Solubilization of Coal by *Polyporus versicolor* and *Candida* ML13

Han Wei Yang Hai-bo Zhao Shuchang Zhao Yan Fen Pusun

(School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract The coals solubilized easily by *Polyporus versicolor* and *Candida* ML13 were screened by mean of solid culture. Solubilization of above fungi on nitric-acid oxidized Zalainuoer and Pingzhung lignites was determined at solid and liquid culture condition and they can generally come to 60—80%. The biosolubilized products were analyzed by elemental analysis, infrared spectroscopy and NMR spectra. Results showed that some changes in constructure and composition of biosolubilized products were occurred by bisolubilization process.

Key words *Polyporus versicolor*, *Candida*, lignite, solubilization