

木质纤维素的混合菌发酵法

徐文玉

(华侨大学化工与生化工程系,福建泉州)

木质纤维素是地球上最丰富的天然物质,约占生物物质总量的 50%,年产量约为 50×10^9 吨^[1],是发酵工业的潜在碳源。利用木质纤维素为碳源有两条路线:一是预处理-酶解-发酵路线;二是酸解-发酵路线。这两条路线的关键阶段是酶解和酸解,是将木质纤维素水解为其组成糖(己糖和戊糖)。由于水解作用存在着一些难于克服的问题,所以这两条路线不易在发酵工业上得以实施。酶解法的难题是:酶生产的成本太高,如酶法生产乙醇工艺中酶的生产成本占总成本的 60%^[2,3];酶促转化率太低,如天然白杨木纤维素在 120 小时内只水解 70%,玉米秸秆在 24 小时转化率只有 20%^[4];酶活不稳定,在 3—7℃ 下,超过 46 小时即开始部分失活^[4];酸解法在苛刻条件下进行,生成有毒的分解产物如糠醛等^[5];对设备起腐蚀作用^[6];成本太高^[7]。为了更好地开发利用木质纤维素,人们提出了新的利用方法——木质纤维素的混合菌发酵法。

混合菌发酵法也叫做同时糖化-发酵法 (SSF Simultaneous Saccharification and Fermentation) 或水解-发酵并行法 (CHF, Combined Hydrolysis and Fermentation)。1923 年 Lynn 等^[8]首次报告混合菌发酵法。他们用嗜热菌混合培养法将亚硫酸纸浆废液发酵成乙醇。1930 年,Scott 等^[9]用混合菌发酵法将纤维素转化成乙酸。70 年代以后,混合菌发酵法研究进展较快。据报道^[9],SSF 已在发酵工业上实施,如

已设计了每天将 2000 吨木质纤维素转化成乙醇的工厂。本文介绍混合菌发酵研究取得的某些进展。

(一) 混合菌发酵法研究的意义

虽然纤维素分解菌及其酶类在发酵工业上应用已研究了数十年,但迄今还没有一种微生物或一套酶系可按传统方法用于大规模地降解纤维素,并在经济上取得效益^[10]。这主要是因为存在着下述一些问题:

1. 纤维素酶的合成受到降解物阻遏。已经证明,各种水溶性碳源和葡萄糖、纤维二糖、蔗糖、淀粉、丙酮酸、甘油、2-脱氧葡萄糖等对真菌和细菌纤维素酶的生物合成起降解物阻遏作用。各种碳源的降解物阻遏作用与其浓度有关。*Aspergillus nidulans* 的外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -1,4-葡萄糖苷酶受 5% 甘油或 5% 葡萄糖的降解物阻遏^[11]; *A. japonicus* 的内切葡聚糖酶受 3—5% 葡萄糖的降解物阻遏,1% 葡萄糖不能充分起阻遏作用^[12]; *Thermoascus aurantiacus* 的羧甲基纤维素酶受 1% 葡萄糖的降解物阻遏,当葡萄糖浓度下降到 2 mg/ml 时,就表现去阻遏作用,此时酶以组成酶水平生成^[10]。在讨论降解物阻遏概念时,一定要注意阻遏物的浓度。

2. 纤维素酶的催化功能受其酶促反应终产物的反馈抑制。已经证明,纤维二糖可抑制 *Trichoderma reesei* 的内切和外切葡聚糖酶的活性^[13],葡萄糖可抑制各种纤维素酶的活性^[14]。这种抑制作用导致纤维素

葡萄糖生成量最大；而加入葡萄糖和半乳糖的反应体系，酶活性显著降低，葡萄糖生成量很少。这就说明，纤维素酶受葡萄糖的反馈抑制，果胶酶受半乳糖的反馈抑制。

由于纤维素酶作用受到反馈抑制，所以酶解液生成的葡萄糖浓度不高。*A. terreus* UNCI-40 的纤维素酶复合物对 10% 预处理稻草淤浆酶解 24 小时，生成含糖量为 7% 的溶液。经预处理的 15% 锯末悬液用 *T. koningii* 纤维素酶复合物水解 24 小时，生成 6.5—7.5% 糖浓度的溶液。*T. reesei* 的纤维素酶对各种预处理的农业废弃物水解 24 小时，产糖率为 5—10%^[13]。从 M-41 号霉菌中分离出的高效纤维素酶对 20% 的纤维素溶液酶解 48 小时，水解 70% 纤维素，生成 12% 的葡萄糖溶液^[13]。

3. 纤维素酶在酶促反应液中不稳定，易失活，如表 1 所示^[4]。纤维素酶在溶液中工作 20 小时后开始部分失活，一般纤维素酶解需经 24—120 小时，随着时间延长，酶失活加重。

表 1 溶液中纤维素酶的转化

	外切葡聚糖酶	内切葡聚糖酶	果胶酶	β -葡萄糖苷酶
温度	55℃	55℃	50℃	55℃
20h	30%	90%	25%	90%
46h	10%	90%	10%	90%

混合菌发酵法可克服纤维素酶生成和活性存在的种种问题。在这种体系中，在一定时间间隔内，酶的生成不受降解物阻遏；酶的活性不受反馈抑制；失活的酶可以由新合成的酶加以补充。有人比较了单一 *T. reesei* 纤维素酶水解纤维素和 *T. reesei*-*Candida utilis* 混合体系水解纤维素的差别实验^[16]，两者糖化速度相同，但后者糖化率比前者高 20%，而且糖化时间延长，如图 1 所示。总之，在 SSF 体系中，酶促作用生成的糖立刻被发酵糖的微生物所利用，结果维持生成糖的低浓度，这样便消除了酶合成作用可能受到的降解物阻遏作用，使酶可以不断地合成；防止了酶促终产物对酶的反馈抑制，使酶以最大速度对底物进行水解。

(二) 混合菌发酵法的三种体系

概括地说，混合菌发酵法可总结为三种不同的工艺体系：

第一，液态菌-菌体系：本体系可生产乙醇、2,3-丁二醇、丙酮丁醇、乙酸等，在此介绍某些成功的实例。

选用 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 和 *C. thermocellum* 混合培养在含 1% Solka Flocc (一种去

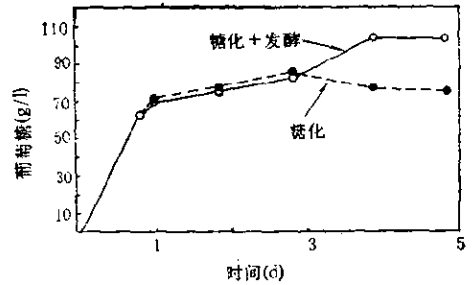


图 1 纤维素单一酶糖化和同时糖化与发酵相比较木素的纤维素) 无氧发酵液中，在 60℃ 下保温 100 小时，可生成乙醇。测定表明^[17]，混合培养比单一培养乙醇生成速率增加了 3 倍，乙酸生成量减少了 2—3 倍，有利于乙醇积累。

选用分解纤维素的 *C. thermocellum* 和 *Acetogenium Kivui* 混合培养物可将纤维素发酵成乙酸^[18]。将上述两种细菌混合接种在装有含 10% 纤维素粉(Whattman CC 31) CBBM 培养基的 1.5 立升发酵罐，控制 pH 6.8，65℃ 保温，生长良好。这两种细菌在发酵液中建立稳定的互生关系，将 1 mol 纤维素转化为 2.7 mol 乙酸。

选用 *Pichia stipitis* 和 *Trichosporon penicillatum* 混合培养法可将玉米秸秆酸性水解物(含木糖和木素等)转化为菌体蛋白、降低 COD、降解木素等^[19]。在这种混合体系中，*P. stipitis* 将木糖发酵成乙醇，*T. penicillatum* 以乙醇为生长碳源，两者建立互生关系。当 *P. stipitis*: *T. penicillatum* = 70:30 时，最适合菌体积累、木素降低、COD 降低。在此条件下，菌体积累量达 7.8 g/L，木素由 6.5 g/L 降至 1.5 g/L，COD 由 23.8 g/L 下降至 1.8 g/L。

选用 *T. fermentans* 和 *Pachysolen tannophilus* 混合培养法可将玉米秸秆稀酸水解物(200g 玉米秸秆切片，2 dm³ 1% 硫酸回流 1 小时的回流液)转化成菌体蛋白、降解木素、降低 COD^[20]。在此混合体系中，*P. tannophilus* 将木糖发酵成乙醇，*T. fermentans* 以乙醇为生长碳源，两种生物互生的结果，使培养物木素消耗 60%，其余木素呈单体存在，COD 减少 87%，生物量达 12 g/L，还原性物质减少，同时生成挥发酸。此混合体系培养物可用适应性产甲烷酵母发酵成甲烷与二氧化碳。

选用 *C. thermocellum* 和 *C. thermosaccharolyticum* 混合培养法可将木质纤维素发酵成乙醇、乙酸和乳酸等产物。在这种体系中，*C. thermocellum* 可水解半纤维素和纤维素，并能发酵己糖和纤维二糖，*C. thermosaccharolyticum* 可发酵木糖和木二糖。它们在预处理玉米秸秆酶解液中生成乙醇、乙酸和乳酸的时间进程示于图 2^[1]。这种混合培养生成乙醇最多；其

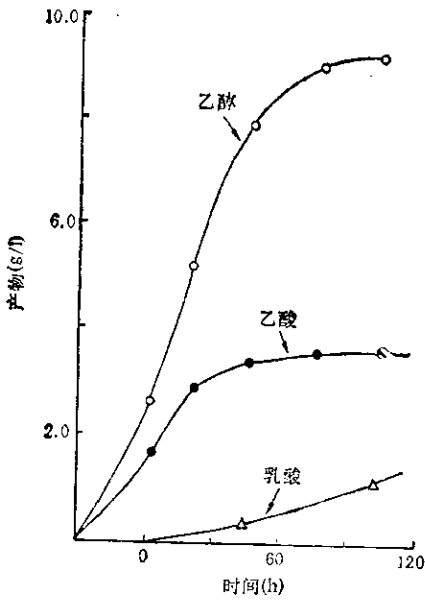


图2 *Clostridium thermocellum* S7-19 和 *Clostridium thermosaccharolyticum* HG-8 混合培养物在预处理玉米秸 (80g/L) 中生成乙醇和乙酸的时间进程

次是乙酸和乳酸。

第二, 固态菌-菌体系^[21]: 农业残体如小麦秸、甘蔗渣、玉米秸秆、厩肥纤维等, 蛋白质含量很低, 经固态菌-菌体系发酵后可较大地提高蛋白质含量, 可直接作为动物(尤其是反刍动物)饲料。选用的微生物必须是能够分解纤维素的和富含蛋白质的真菌或酵母。有人将小麦秸秆、玉米秸秆、厩肥纤维用 180℃ 蒸汽爆破处理 10 分钟, 用 Mandels 无机盐溶液^[22]调节至 25% (w/w) 干物质含量, 用 (NH₄)₂SO₄ 将 C:N 调整至 10:1, 作为实验发酵培养基。在单一发酵中, 接入 1 wt% (干基计) *Chaetomium cellulolyticum*。在混合培养中, 接入 1% *C. cellulolyticum* 和 0.33% *Candida lipolytica*。结果表明, 混合发酵比单一发酵蛋白质含量高。按细胞产量计的纤维素转化率为 50%, 接近理论产值。可见绝大部分糖被利用。然而在单一发酵中, 约有 40—50 mg 还原糖/g 纤维素(干重)未被利用。在混合培养中, 剩余的糖全部被酵母利用, 生成较多的生物量和滞后 *C. cellulolyticum* 孢子生成。最大菌体蛋白质含量达 15—17%。木质纤维素固态混合菌发酵的意义是提高蛋白质含量和减少木素含量。

第三, 液态酶-菌体系: 本体系可用来生产乙醇、柠檬酸、2,3-丁二醇、丙酮丁醇等。

选用商品木糖异构酶-*Saccharomyces cerevisiae* 体系可将亚硫酸纸浆废液(含木糖和己糖)发酵成乙醇。*S. cerevisiae* 是著名的乙醇产生菌, 它不能利用木糖, 但可以利用木酮糖。在混合体系中, 木糖异构酶

将木糖异构化成木酮糖, 酵母将木酮糖磷酸化为 5-磷酸木酮糖, 经 HMP 途径转化为 3-磷酸甘油醛, 沿 EMP 途径转化为乙醇。木糖异构酶将木糖异构化成木酮糖的平衡点向木酮糖方向低于 20%, 应用酶-酵母体系, 因木酮糖被利用, 使反应不断地投向木酮糖方向。本体系发酵未处理亚硫酸纸浆废液, 乙醇的最大理论产率为 0.5。在实验条件下, 可发酵木糖的酵母 (*C. tropicalis*, *P. stipitis*, *P. jannophilus*) 产率低, 约为 0.2, 可发酵己糖和木酮糖的酵母 (*S. cerevisiae* 和 *Saccharomyces pombe*) 产率分别为 0.4 和 0.3。*P. jannophilus* 和 *S. cerevisiae* 混合培养的产率为 0.3。这些酵母的产率差异是由于糖吸收速度和生成副产物差异造成的^[23]。*S. cerevisiae* 生成副产物最少, 所以乙醇产率最高, 对总糖产率为 0.38 g/g, 对所消耗糖的产率为 0.56 g/g, 发酵液的最大乙醇浓度为 14.1 g/L。*S. cerevisiae* 和木糖异构酶并行使用可以取代发酵戊糖的酵母发酵木质纤维素水解物, 商品木糖异构酶的成本可以同预处理如蒸汽爆破处理的成本相抵偿。

选用 *T. harzianum* E58 菌液(酶)-*Klebsiella pneumoniae* 体系可将各种农业残体半纤维素转化成 2,3-丁二醇和乙醇^[14]。前者水解半纤维素, 生成半纤维素水解糖, 后者将水解糖发酵成 2,3-丁二醇和乙醇。这种体系大约可水解 5% (W/V) 木聚糖制剂中 50—60% 木聚糖并定量地转化为 2,3-丁二醇。这种体系生成的 2,3-丁二醇的浓度比分步水解和发酵法高出 20—40%。2,3-丁二醇的产率为 0.4—0.5 g/g 还原糖。据实验, 这种体系可适用于各种蒸爆农业残体半纤维素的发酵作用。工艺模式如图 3 所示。

(三) 混合菌发酵法的优缺点

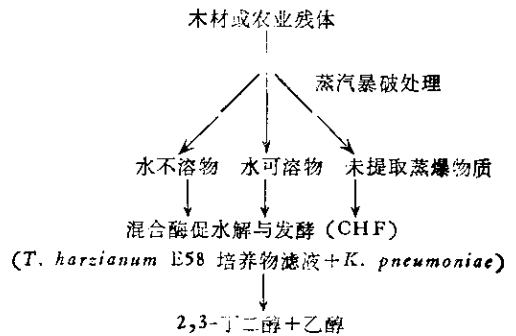


图3 CHF 法生产 2,3-丁二醇图解

木质纤维素混合菌发酵法既有优点又有缺点。

优点是: 1. 在液态酶-菌体系中, 消除了纤维素酶受葡萄糖和纤维二糖的终产物抑制, 提高纤维素酶解的效果, 消除了半纤维素酶受木糖和木二糖的反馈抑制, 提高半纤维素酶解的效果^[14]; 液态和固态菌-菌体系的优点如前所述。2. 同酶解、发酵分步法相比较, 纤

纤维素酶生产成本大大下降,分步法乙醇发酵中酶生产成本占总成本的40—60%^[2,17],混合菌发酵法酶生产成本只占14%^[9]。3.葡萄糖、木糖生成与消失速度几乎相同,增加发酵产物产率,如乙醇发酵产率增加25—40%^[24]。4.糖转化率比分步法高^[25]。5.防止细菌污染,无需加抑菌剂^[25]。6.可在同一发酵罐中实现糖化与发酵,节省设备投资^[25]。

缺点是:在混合菌乙醇发酵工艺中,表现纤维素酶活性的最佳温度为50℃,而乙醇发酵的最佳温度为30℃,因此需要确定两者的折衷温度^[11]。有人已确定了两种工艺体系的折衷温度^[24]: *Trichoderma* sp. KIST72 纤维素酶和 *S. cerevisiae* NCYC 716 体系最佳温度为40℃; *T. reesei* VTT-D-78058 纤维素酶和8种 *Zymomonas mobilis* 体系的最佳温度为37℃。在乙醇发酵混合体系中,纤维素酶活性受一定浓度的乙醇的抑制^[24];例如,固态 *T. reesei* QM 9419 和 *C. utilis* QM 8240 混合体系中,酵母利用葡萄糖,引起纤维二糖水解率增加,使得更多的纤维二糖转化成乙醇。但有实验表明,当乙醇浓度达79 g/L时,纤维素酶活性就降低,棉花和滤纸水解依次降低84%和71%,这种现象也存在于 *T. reesei* QM 9419 和 *S. cerevisiae* 混合体系中。除此之外,混合菌体系的其它生理条件如折衷 pH、折衷通气量也需要逐一加以确定。虽然近几年开始重视混合菌体系接种物中菌-菌的百分比含量,但所见的报道不多。

参 考 文 献

1. Lynch J M: *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 71S—83S, 1987.
2. 王祖农: *山大微生物*, 1: 1—14, 1986.
3. Ladish M R: *Process Biochemistry*, 14: 21—25, 1979.
4. Borchert A et al.: *Process Biochemistry*, 22(6): 173—186, 1987.
5. Araujo A et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28(10): 1503—

- 1509, 1986.
6. Vallander L et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27(5): 650—659, 1985.
7. RNDr Bohumil Sikyta Dr Sc.: *Method in Industrial Microbiology*, Ellis Horwood Limited, Chichester, P. 150, 1983.
8. Wiseman A et al.: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Vol. 7, P. 156—195, 1983.
9. Becker D K et al.: *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 24, P. 123—129, 1983.
10. Feldman K A et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 10(5): 262—272, 1988.
11. Bagga P S et al.: *Process Biochemistry*, 24(2): 41—45, 1989.
12. Sanyal A et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 10(2): 85—90, 1988.
13. Sills A M et al.: *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 26, P. 527, 1984.
14. Yu E K C et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 14, P. 341—352, 1984.
15. 刘信: *应用微生物*, 6: 64, 1981.
16. Reed G: *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th edition, P. 541—591, 1982.
17. Kosaric N et al.: *Biotechnology* (eds. H-J Rehm). Vol. 3, P. 257—286, 1983.
18. Leruyet P et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(4): 893—894, 1984.
19. Glancer M et al.: *Process Biochemistry*, 24(3): 109—113, 1989.
20. Glancer M et al.: *Process Biochemistry*, 21(6): 169—173, 1986.
21. Tengerdy R P et al.: *Biochemical Engineering*, III, P. 469—472, 1983.
22. Chahal D S: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 14, P. 425—433, 1984.
23. Linden T et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 11(9): 583—589, 1989.
24. Rolz C et al.: *Advance in Biotechnological Process* Vol. 1, P. 97—142, 1983.
25. Bisaric V S et al.: *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 3, P. 80—84, 1983.