

绿潮藻浒苔微生物高效降解及生物乙醇制备

王淑贤^{1,2}, 韦章良³, 贾睿^{1,2}, 张建恒⁴, 霍元子^{1,2}, 于克锋^{1,2}, 何培民^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水域环境生态上海高校工程研究中心, 上海 201306; 3. 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301; 4. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306)

摘要: 从绿潮藻暴发海域的底泥和腐烂浒苔(*Ulva prolifera*)中, 筛选出一株可高效降解浒苔纤维素的微生物菌株(F菌株), 通过刚果红染色实验以及真菌的 ITS 分析, 鉴定为曲霉属真菌。以浒苔为诱导培养基制备 F 菌株的粗酶液, 测得其滤纸纤维素酶活为 34.79 U/mL。在发酵实验中, 当酶解条件为 6% 的粗酶液添加量、反应温度为 38℃、反应时间为 60 h、pH 为 6.8 时, 浒苔纤维素降解效果最好, 酶解液发酵乙醇产量最高达到 28.98 g/L。

关键词: 浒苔(*Ulva prolifera*); 纤维素降解菌; 发酵; 生物乙醇

中图分类号: P745 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)01-0076-07

DOI: 10.11759/hyxx20160423003

随着可利用化石燃料的逐渐减少以及化石燃料燃烧时所带来的环境问题, 探索可再生、清洁无污染的绿色能源已越来越受到世界人们的广泛关注^[1]。目前研究的可再生清洁燃料主要有生物柴油、生物乙醇、生物丁醇以及生物沼气等^[2]。美国从 2007 年开始启动了多项生物燃料工程项目, 带动了藻类生物燃料开发热潮^[3]。然而以海洋藻类生物质开发生物能源在国内的研究还比较少。温顺华^[4]、蒋媛媛^[5]分别对马尾藻和铜藻制备生物乙醇有过实验探究, 但乙醇产量均不高, 仅为 9.2%和 7.8%。

第一代燃料乙醇由于使用玉米、大豆等经济作物导致粮食价格上涨而被迫放弃^[6]; 第二代燃料乙醇由于木质素处理难题, 一直止步不前; 而以海洋藻类生物质为原料的第三代燃料乙醇^[7], 因其生长周期短、生长速率快、不含木质素且生物量巨大^[8]而受到广大研究学者的关注。

自 2007 年起, 我国已连续 8 年暴发绿潮自然灾害。2008 年, 仅青岛海域打捞起的绿潮藻浒苔(*Ulva prolifera*)就近 120 万 t^[9]; 福建沿海每年的绿潮暴发量多于 10 万 t^[10], 专家认为黄海绿潮每年的总暴发量在千万吨以上^[11]。绿潮的暴发, 除了引起鱼虾死亡和水质恶化外, 更大的问题在于其巨大的生物量难以处理, 无处填埋^[12], 并且打捞起的浒苔短时间内就会腐烂发臭, 带来严重的环境问题。浒苔中纤维素和半纤维素的质量分数达到 33.7%^[13], 使其成为很好的第三代燃料乙醇的生产原料。目前, 国内对藻类

纤维素的处理方法主要有物理法^[14]和化学法^[15]以及生物酶法^[16]。物理法和化学法处理藻类纤维素对设备要求高, 反应不易控制, 并且处理后的产物容易造成环境污染。因此, 如何正确处置每年暴发的大量绿潮藻浒苔和有效降低藻类生物质发酵乙醇的生产成本已成为我国海洋科学领域的重要研究内容。本研究将化石燃料的短缺现状与我国暴发绿潮藻巨大生物量处理问题相结合, 以绿潮藻浒苔为发酵原料, 利用实验室筛选到的产纤维素酶菌株进行酶法降解浒苔, 为探究第三代燃料乙醇的生产奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 藻粉

浒苔藻样采自 2014 年 5 月江苏省大丰市沿海漂浮浒苔。将采回的新鲜浒苔, 用干净海水冲洗 3 遍,

收稿日期: 2016-04-23; 修回日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(41576163); 国家重点研发计划项目(2016YFC1402105); 国家海洋局公益性科研专项(201205010, 201105023); 科技支撑计划项目(2012BAC07B023)

[Foundation: Nation Natural Science Foundation of China, No.41576163; The National Key Research and Development Plan, No.2016YFC1402105; Public Science and Technology Research Funds Projects of the Ocean, No.201205010, No.201105023; National Science & Technology Pillar Program, No.2012BAC07B03]

作者简介: 王淑贤(1990-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为海藻资源化利用, 电话: 15800728178, Email: Wangshuxian1234567@163.com; 何培民, 通信作者, Email: pmhe@shou.edu.cn; 于克锋, 通信作者, Email: kfyu@shou.edu.cn

去除泥沙、杂质及其他杂藻，烘干粉碎后，过 80 目筛，自封袋保存于阴凉处备用。

1.2 培养基

选择培养基: 纤维素粉 8.0 g, NaNO₃ 1.0 g, KCl 0.5 g, Na₂HPO₄ 1.2 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, 酵母粉 0.5 g, 水解酪蛋白 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂粉 18.0 g, 自然 pH。

鉴别培养基: 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)5.0 g, 酵母膏 1.0 g, KH₂PO₄ 0.25 g, 土豆汁 100 mL, 琼脂粉 18.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。

浒苔纤维素诱导培养基(细菌): 浒苔粉 8.0 g, 蛋白胨 2.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。

浒苔纤维素诱导培养基(真菌): 浒苔粉 6.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 蛋白胨 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 5.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 1%孟加拉红水 3.3 mL, 3%氯霉素液 3.0 mL, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。

酵母菌活化培养基: 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。

发酵培养基: 浒苔粉 200 g, 2%硫酸 1 000 mL, 120℃处理 60 min, 调 pH 中性。

除发酵培养基外, 上述培养基均 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后使用, 为防止糊化, 酵母菌活化培养基 115℃灭菌 15 min。

1.3 纤维素分解菌株的筛选与鉴定

1.3.1 纤维素分解菌的初筛

在浒苔漂浮的海域和腐烂浒苔的底泥中, 分别采样带回实验室, 同时从采回的新鲜浒苔中, 称取 20 g 湿浒苔于 500 mL 烧杯中, 加入 200 mL 自然海水, 用纱布封口, 28℃条件下自然腐烂 10 d^[17]。

1.3.2 纤维素分解菌的分离与鉴定

将腐烂的浒苔底泥和样品液进行梯度稀释, 取稀释至 10⁻⁶ 样品液 150 μL 涂布于选择培养基平板中, 置于恒温培养箱 30℃培养 3 d, 挑取能够在选择培养基中生长的单菌落划线分离, 转接到鉴定培养基平板上。

刚果红染色初步鉴定: 在长出菌落的鉴定培养基中, 通过刚果红染色实验^[18]后水解圈的大小, 初步鉴定具有纤维素分解能力的菌株, 并挑出单菌落划线分离, 纯培养。

细菌的 16s rDNA 鉴定: 筛选到的菌株纯化后, 用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8255

提取菌株的总 DNA。使用通用引物 7F: 5'-CAGAG TTTGATCCTGGCT-3'和 1540R: 5'-AGGAGGTGATC CAGCCGCA-3'进行 PCR。PCR 反应体系为: Template (基因组 DNA 20~50 ng/μL) 0.5 μL, 5×Buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL, 酶 0.2 μL, 引物各 0.5 μL, 加双蒸水至 25 μL。PCR 循环条件: 98℃预变性 30 min, 98℃ 25 s, 55℃ 25 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 后 72℃延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收后与 pMD18-T 载体连接, 挑选阳性克隆质粒, 酶切后送上海生工公司测序, 将测序结果用 NCBI 的 Blast 程序进行序列同源性比对。

真菌的 ITS 鉴定: 筛选到的菌株纯化后, 按上海生工公司提供的 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8259 提取菌株的总 DNA。使用菌种鉴定通用引物, NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'和 NS6: 5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3', 由上海生工公司合成。PCR 反应体系为: Template(基因组 DNA 20~50 ng/μL) 0.5 μL, 10×Buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL, 酶 0.2 μL, 引物各 0.5 μL, 加双蒸水至 25 μL。PCR 循环条件: 94℃预变性 4 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 后 72℃延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收后与 pMD18-T 载体连接, 挑选阳性克隆质粒, 酶切后送上海生工公司测序, 将测序结果用 NCBI 的 Blast 程序进行序列同源性比对。

1.4 粗酶液的提取

选取 1.3.2 中筛选到的菌株, 制取粗酶液。

粗酶液 1: 常用基础 LB 培养基和马丁培养基, 培养 5 d, 转速为 170 r/min, 温度为 28℃。5 d 后, 取出菌液, 6 000 r/min 离心 8 min, 上清液为粗酶液。

粗酶液 2: 用浒苔纤维素诱导培养基, 培养 5 d, 转速为 170 r/min, 温度为 28℃。5 d 后, 取出菌液, 6 000 r/min 离心 8 min, 上清液为粗酶液。

1.5 菌株纤维素酶活性检测

取 1.4 中得到的粗酶液, 稀释 10 倍后, 按照文献^[19]对筛选到的产酶菌株进行滤纸纤维素酶活检测。酶活定义在 37℃, pH 5.5, 反应时间为 60 min 的条件下, 每分钟降解滤纸释放 1 μmol 葡萄糖所需的酶量, 定义为一个滤纸纤维素酶活单位, 以 U 表示。实验中滤纸纤维素酶活以 X 表示, 单位为酶活性单位(U/mL), 按下式计算:

$$X=(m/M\times t)\times 1000\times n \quad (1)$$

式(1)中

X ——实验中纤维素酶的活性, 单位为酶活性单位(U/mL);

m ——根据标准曲线上对应的葡萄糖的质量, 单位为毫克(mg);

M ——葡萄糖的摩尔质量, 180.2 g/mol;

t ——酶解反应时间, 单位为 min;

1 000——转化因子, 1 mmol=1 000 μ mol;

n ——实验的总稀释倍数。

1.6 菌株纤维素酶降解浒苔发酵效果探究

选取实验中筛选到的产酶活性高的菌株, 制备粗酶液, 通过粗酶液添加量, 反应温度, 反应时间和反应 pH4 方面分别探究浒苔制备乙醇的最佳效果(表 1)。其中, 发酵五碳糖的酵母菌 32868 和发酵六碳糖的酵母菌 1043, 由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供, 活化后, 各加入 5%的酵母菌种子液进行发酵, 无菌取样, 测定乙醇浓度, 同时按 DNS 法对发酵液中的还原糖进行检测, 每组 3 个平行。

表 1 不同条件下浒苔发酵实验

Tab. 1 Different conditions in *Ulva prolifera* fermentation test

组别	粗酶液添加比例(% , V/V)	温度($^{\circ}C$)	时间/h	pH
1	0	22	12	5.0
2	2	26	24	5.6
3	4	30	36	6.2
4	6	34	48	6.8
5	8	38	60	7.4
6	10	42	72	8.0
7	12	48	84	8.6

1.7 乙醇浓度的测定

乙醇浓度检测使用 SBA-40E 生物传感分析仪测定。乙醇标准液配制: 50 μ L 无水乙醇溶于 100 mL 蒸馏水中, 现配现用。

2 结果

2.1 纤维素分解菌的筛选结果

通过选择培养基初筛和刚果红染色实验初步鉴定, 共筛选到 2 株产纤维素酶菌株, 分别是浒苔漂浮海域中筛选到的菌株(H 菌)和实验室条件下腐烂浒苔中筛选到的菌株(F 菌), H 菌透明水解圈平均直径为 1.0 $cm \pm 0.2$ cm, F 菌透明水解圈平均直径 1.3 $cm \pm 0.2$ cm。从微生物形态学上观察, H 菌株为细菌, F 菌

株为真菌。如图 1 所示。

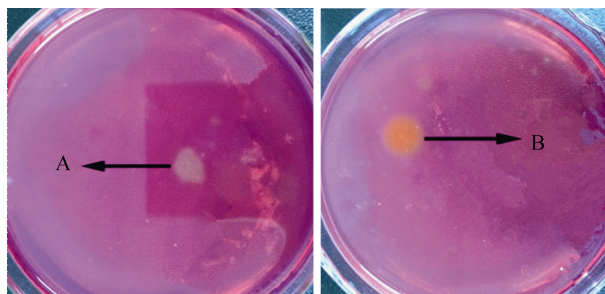


图 1 刚果红染色实验鉴别结果, A: H 菌株; B: F 菌株
Fig. 1 Staining characteristics of microbial colonies demonstrated using Congo Red. A: strain H; B: strain F

2.2 分子鉴定结果

PCR 扩增产物得到的蛋白质电泳图如下(图 2), H 菌株 PCR 扩增产物得到的目的片段长度约为 1.5kb 左右, 与 16SrDNA 序列长度一致。将得到的产物克隆后测序, 得到 1431 bp 长度的序列, 与 GenBank 库中已有的细菌 16S rDNA 序列 Blast 比对后, 发现其与芽孢杆菌属同源度高达 99%。F 菌株 PCR 产物经克隆后测序得到 1308 bp, 其在 GenBank 中的比对结果与曲霉属真菌(*Aspergillus*)高度相似, 选取最相近的 10 个序列, 用 mega4.1 构建系统进化树, 如图 3 所示系统进化树, 其与 *Aspergillaceae. Aspergillus*

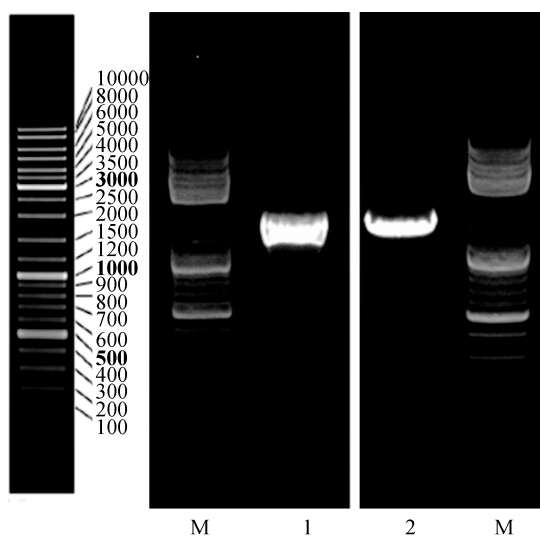


图 2 H 菌株 16S rDNA PCR 产物电泳图和 F 菌株 18S rDNA PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of the amplification products of 16S rDNA from strain H and 18S rDNA from strain F

M: DNA Marker; 1: H 菌株 PCR 产物

M: DNA marker; 1: strain H PCR product

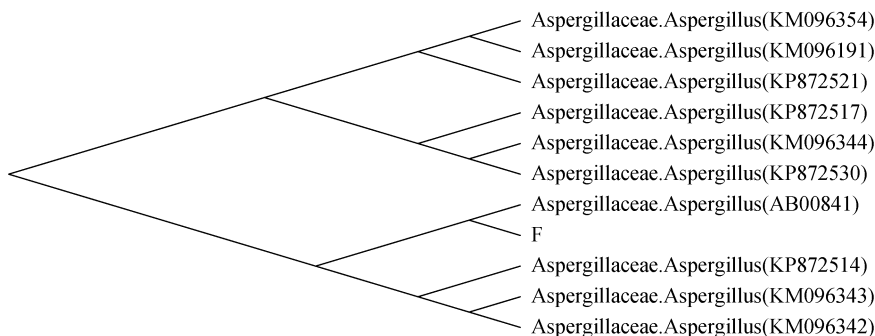


图 3 F 菌株系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain F

(AB00841.1)最为接近。该序列在 GenBank 的登录号为: KX272754。根据形态学和分子系统学鉴定, 初步得到 F 菌株为曲霉属真菌。

2.3 菌株纤维素酶活检测结果

滤纸法纤维素酶活检测实验中, 得到的葡萄糖标准曲线为 $y = 0.846x - 0.028$, $R^2 = 0.999$ 。H 菌株和 F 菌株的两种粗酶液酶活如(图 4)所示。浒苔纤维素诱导培养基制取的粗酶液, 即 H2 和 F2 酶活分别高于 H1 和 F1 酶活; 同一培养基所得到的粗酶液中, F 菌株又高于 H 菌株, F 菌株最高酶活达到 34.79 U/mL。这与刚果红染色实验中水解圈大小的结果是一致的。F 菌株现保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号: CGMCC NO.11767。

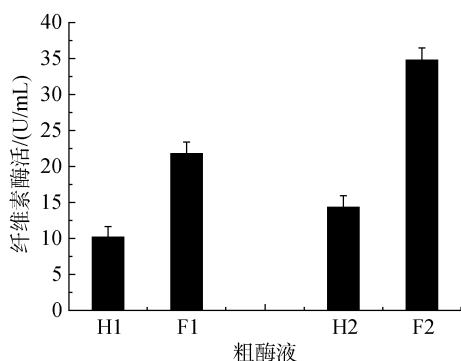


图 4 纤维素酶活性测定结果

Fig. 4 Cellulase activity of different strains

2.4 不同条件下浒苔发酵实验结果

纤维素酶活实验证明 F 菌株的产酶能力较强, 因此在浒苔发酵实验中选用 F 菌株粗酶液对浒苔降解发酵, 从图 5A 中可以看到, 对照组中没有添加粗酶液, 仍检测到乙醇, 但乙醇含量非常低。随着粗酶的增加, 还原糖含量增加, 同时乙醇产量也上升。当

粗酶液的添加量达到 6%时, 还原糖含量不再增加, 但是乙醇产量继续升高。由实验结果(图 5 B)可知, 在温度低于 38℃时, 随着温度的升高, 乙醇产量逐步上升。当温度达到 38℃时, 乙醇产量达到最高, 为 28.98 g/L, 后温度继续升高, 乙醇产量反而下降。在发酵时间达到 60 h 时(图 5 C), 乙醇产量不再随着酶解时间的增加而提高, 发酵后期, 乙醇浓度不再变化, 还原糖含量仍在继续下降, 但下降并不剧烈。pH 为 6.8 时, 乙醇产量达到最高, 但还原糖浓度并不升高(图 5 D)。

3 讨论

海洋藻类作为第三代燃料乙醇的生产原料, 具有非常强大的市场潜力^[20], 但是藻体中存在的纤维素、半纤维素是阻碍藻类生物质进行规模化发酵生产乙醇的瓶颈。纤维素是 D-葡萄糖以 β -1, 4 糖苷键为基环组成的大分子多糖^[21], 通常与半纤维、木质素形成结构复杂稳定的大分子物质^[22]。自然界中产纤维素酶微生物包括真菌, 细菌和放线菌。不同微生物所产纤维素酶的结构和功能也相差很大, 纤维素酶根据其催化反应功能的不同可分为内切葡聚糖酶(1, 4- β -D-glucan glucohydrolase)、外切葡聚糖酶(1, 4- β -D-glucan cellobilhydrolase)和 β -葡聚糖苷酶(β -1, 4- glucosidase)。大多数的细菌和放线菌产酶能力较低, 所产酶多数都是胞内酶, 很难分泌到细胞外对纤维素的降解起作用。20 世纪 90 年代末, 学者们发现曲霉属真菌产生的多为胞外酶, 并且产酶能力也高于细菌和放线菌^[23]。本研究从自然界中筛选到的 F 菌株是曲霉属的一种, 根据水解圈的大小, 可以初步判断出 F 菌分解纤维素的能力比 H 菌稍强, 在酶活检测的实验中, F 菌株最高酶活达到 34.79 U/mL, 也验证了这一点。用 F 菌株所产纤维素酶进行浒苔

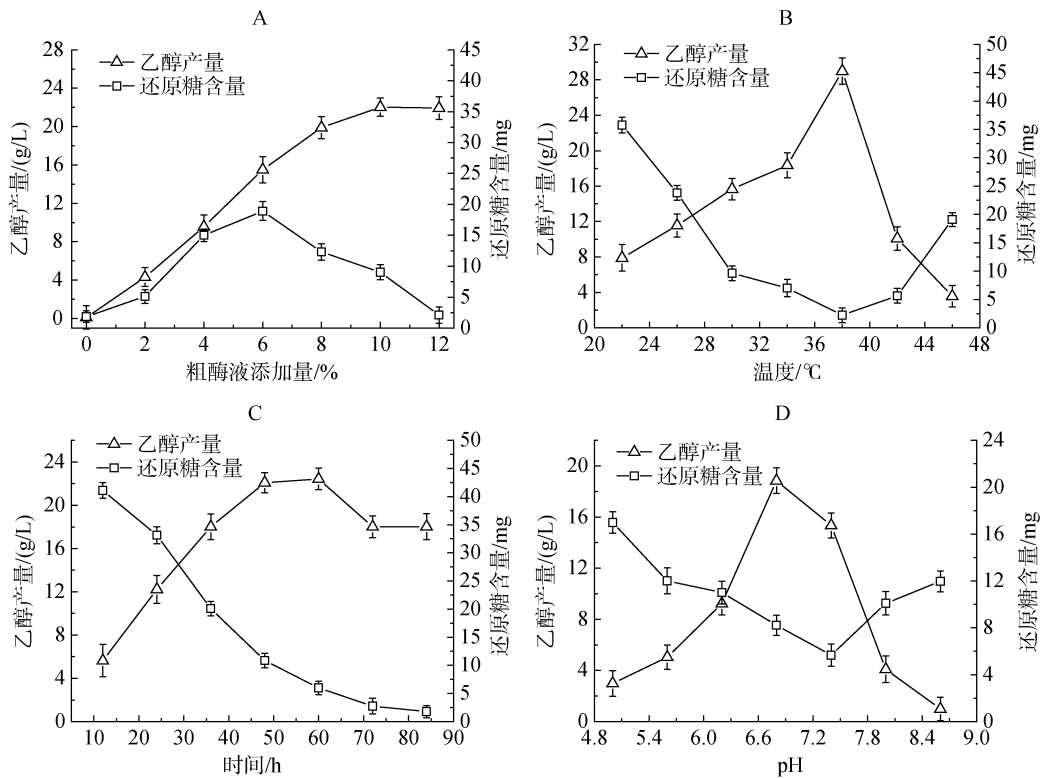


图5 不同条件下浒苔的发酵效果

Fig. 5 Effects of different conditions on *Ulva prolifera* fermentation

的降解发酵,一方面避免了因产胞内酶而降低降解效果;另一方面,由于F菌株所产纤维素酶为胞外酶,所以粗酶液的制备用过滤、离心等简单方法就可以获得,操作简便。与此同时,传统的物理法和化学法在降解纤维素过程中会形成大量的副产物,对后续的发酵也有很强的抑制作用,使乙醇发酵产率偏低,并伴有环境污染,而使用菌株所产纤维素酶降解浒苔,不仅降低了对反应设备的要求,而且反应温和,对环境无污染,同时不形成副产物,可避免乙醇产率偏低等问题。

本研究中用筛选到的F菌自产纤维素酶对浒苔进行降解,并优化了其酶解液发酵乙醇的最佳条件,使乙醇最高产量达到28.98 g/L,比刘正坤^[24]实验中的乙醇产量(13.2 g/L)高15.78 g/L。Song-Mok Lee^[25]等在用微生物同步糖化发酵海带的研究中指出,乙醇最高产量为2.59 g/L,其研究中乙醇产量偏低的原因在于微生物所产酶为胞内酶,因此降解效果不明显,导致乙醇产量较低。而本实验中的F菌株属曲霉属真菌,其所产纤维素酶可经低温离心快速获得,保证了酶的活性,能够高效率降解纤维素,获得较高含量的还原糖类,因此在后续的发酵试验中,酵母菌可利用的还原性糖含量较高,发酵产物乙醇产量也继而提高。本实验中乙醇产量高于其他研究结果的另一个

原因在于,实验中用稀酸前处理浒苔,即用2%的硫酸120°C、1h处理后再进行粗酶液降解,稀酸和高温对纤维素本身结构就有一定的破坏,之后再使用粗酶液进行降解,使得降解效果比单一直接使用粗酶液效果更好,因此,乙醇的最高产量可达28.98 g/L。

海洋藻类生物质产量巨大,以海洋藻类生物质为原料发酵生产乙醇是未来能源探索的有效途径^[26]。但是从藻类转变生物乙醇的过程,还存在一系列尚待完善的地方,仅仅依赖筛选自然界中的野生型菌株产酶进行海洋藻类生物质的降解还远远不够。美国藻醇(Algenol)公司利用蓝藻光合产物在细胞内直接转化产出乙醇已进入室外产业化论证阶段^[27]。根据这项研究结果,未来在大型绿藻浒苔的发酵研究中,同样可以通过开发产酶活性高的基因工程菌进行浒苔纤维素的高效降解,同时选择高效发酵菌种以及优化发酵工艺流程,可更大程度地提高发酵产量,使藻类资源得到更充分的利用。

参考文献:

[1] Bai Y. Global development status of biomass fuel[J]. Sino-Global Energy, 2008, 13(5): 23-30.
 [2] Liu ZY. The new features of the development of the

- world biofuel industry and the common problems[J]. Agricultural Engineering Technology, 2009, 11: 8-12.
- [3] 张海龙. 中国新能源发展研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
Zhang Hailong. Research on the new energy development in China[D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [4] 温顺华, 陈姗姗, 李锋, 等. 马尾藻发酵生产生物乙醇的两步法糖化预处理[J]. 食品与发酵工业, 2013, 01: 112-117.
Wen Shunhua, Chen Shanshan, Li Feng, et al. Two-stage hydrolysis of *Sargassum fulvellum* for bioethanol fermentation[J]. Food and Fermentation Industries Editorial Staff, 2013, 01: 112-117.
- [5] 蒋媛媛, 包海军, 曾淦宁, 等. 稀酸预处理铜藻制备生物乙醇工艺[J]. 环境科学研究, 2014, 7: 804-812.
Jang Yuanyuan, Bao Haijun, Zeng Ganning, et al. Optimization of *Sargassum homeri* pretreatment process using diluted acid for bioethanol[J]. Research of Environmental Sciences, 2014, 7: 804-812.
- [6] Jang JS, Cho Y K, Jeong G T, et al. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*[J]. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2006, 49(4): 557-564.
- [7] Noraini M Y, Ong H C, Badrul M J, et al. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2014, 39(6): 24-34.
- [8] Miranda J R, Passarinho P C, Gouveia L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production[J]. Bioresource Technology, 2012, 104(1): 342-348.
- [9] 张维特, 时旭, 欧杰, 等. 酸法水解绿潮藻生物质及发酵制乙醇的效果[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 01: 131-136.
Zhang Weite, Shi Xu, Ou Jie, et al. Effect of preparing alcohol with green tide algae biomass by acid hydrolysis[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 1: 131-136.
- [10] 薛丁萍, 魏玉西, 刘淇, 等. 浒苔多糖对羟自由基的清除作用研究[J]. 海洋科学, 2010, 1: 44-47.
Xue Dingping, Wei Yuxi, Liu Qi, et al. Study on the scavenging activity of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* to hydroxyl radical[J]. Marine Sciences, 2010, 1: 44-47.
- [11] 姚东瑞. 浒苔资源化利用研究进展及其发展战略思考[J]. 江苏农业科学, 2011, 2: 473-475.
Yao Dongrui. The research progress and development strategy of *Enteromorpha prolifera* for resource utilization[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2011, 2: 473-475.
- [12] 吴玲娟, 曹丛华, 高松, 等. 我国绿潮发生发展机理研究进展[J]. 海洋科学, 2013, 12: 118-121.
Wu Lingjuan, Cao Conghua, Gao Song, et al. A review on the development mechanism of Green Tide in China[J]. Marine Sciences, 2013, 12: 118-121.
- [13] 衣丹, 高春蕾, 王能飞, 等. 稀酸水解绿潮藻及发酵制生物丁醇研究[J]. 海洋科学进展, 2013, 4: 559-565.
Yi Dan, Gao Chunlei, Wang Nengfei, et al. Study on hydrolysis of *Enteromorpha prolifera* and fermentation for butanol production[J]. Advances in Marine Science, 2013, 4: 559-565.
- [14] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresource Technology 2010, 101(13): 4744-4753.
- [15] 谢文化, 祝智胜, 朱明军. 温和碱法预处理甘蔗渣分步糖化乙醇发酵的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 8: 169-174.
Xie Wenhua, Zhu Zhisheng, Zhu Mingjun. Bioethanol production by stepwise saccharification and fermentation of sugarcane bagasse by using mild alkali pretreatment[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 8: 169-174.
- [16] Miranda JR, Passarinho PC, Gouveia L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. Bioresource Technology, 2012, 104: 342-348.
- [17] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版, 1998.
Sheng Ping, Fan Xiurong, Li Guangwu. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Publishing, 1998.
- [18] 张超, 李艳宾, 张磊, 等. 纤维素—刚果红培养基鉴定产纤维素酶真菌的机理研究[J]. 纤维素科学与技术, 2007, 2: 39-44.
Zhang Chao, Li Yanbin, Zhang Lei, et al. Study on mechanism of cellulose-Congo-Red medium in identifying cellulose-producing fungi[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2007, 2: 39-44.
- [19] 何凤琴, 黄婷, 钱昉, 等. 滤纸法测定饲用纤维素酶酶活的研究[J]. 中国饲料, 2009, 13: 37-41.
He Fengqin, Huang Ting, Qian Fang, et al. Filter paper method for determining the research of forage cellulase enzyme activity[J]. China Feed, 2009, 13: 37-41.
- [20] Dong HK, Sang BL, Gwi TJ. Production of reducing sugar from *Enteromorpha intestinalis* by hydrothermal and enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology, 2014, 3(165): 348-353.
- [21] 杨官品, 李斐斐. 工程微生物发酵褐藻碳水化合物生产乙醇: 生物乙醇开发新方向[J]. 海洋科学, 2014, 4: 88-95.
Yang Guanpin, Li Feifei. Fermenting brown algal carbohydrates into ethanol with engineered microor-

- ganism: A new horizon for bioethanol production[J]. Marine Sciences, 2014, 4: 88-95.
- [22] 方志锋, 刘昆仑, 陈复生, 等. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展[J]. 现代化工, 2013, 1: 30-33. Fang Zhifeng, Liu Kunlun, Chen Fusheng, et al. Research development of bioethanol preparation from lignocellulosic biomass[J]. ModernChemicalIndustry, 2013, 1: 30-33.
- [23] 张欢. 产纤维素酶菌株选育、优化培养及酶纯化工艺研究[D]. 沈阳航空航天大学, 2013. Zhang Huan. Screening of high yield cellulose-producing strains, optimization of culture medium and the study on purification technology[D]. ShenyangAerospace-University, 2013.
- [24] 刘政坤. 低值海藻浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生物乙醇转化工艺的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011. Liu Zhengkun. The research on transformed craft of biological ethanol of *Enteromorpha prolifera*[D]. Qingdao: OceanUniversityofChina, 2011.
- [25] Sung-Mok L, Jae-Hwa L. The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for Laminaria japonica utilization. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5962-5967.
- [26] Trivedi N, Gupta V, CRK Reddy, et al. Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. Biore-source Technology. 2013, 10(150): 106-112.
- [27] Ueda R, Hiraya MS, Sugata K, et al. Process for the production of ethanol from microalgae: US, 5578472. 1996-11-26.

Screening and characterization of a newly isolated strain for microbiological degradation of *Ulva prolifera* and bioethanol production

WANG Shu-xian^{1, 2}, WEI Zhang-liang³, JIA Rui^{1, 2}, ZHANG Jian-heng⁴, HUO Yuan-zi^{1, 2}, YU Ke-feng^{1, 2}, HE Pei-min^{1, 2}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Water Environment and Ecology Engineering Center of Shanghai Institute of Higher Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Apr. 23, 2016

Key words: *Ulva prolifera*; cellulose-decomposing microorganisms; fermentation; bioethanol

Abstract: *Ulva prolifera* has been the dominant species in the huge annual biomass accumulation during green algae bloom in Yellow Sea since 2007. This species can be used for energy utilization by fermentation under certain conditions. In this study, we identified a highly efficient cellulose-decomposing microorganism by screening the rotten algae and employed it as a raw material to manufacture bioethanol. We studied its cellulose activity and the ability to decompose *U. prolifera* at different reaction temperatures, times, pH, and dosages of crude enzyme. We identified the strain with highest efficiency in cellulose-decomposition using Congo red staining method and ITS and termed it as the F strain (34.79U/mL). We also found that the optimum conditions for the fermentation of *U. prolifera* were as follows: crude enzyme, 6%; treating temperature, 38°C; treating time, 60 h; and pH, 6.8. Under these optimum conditions bioethanol yield of up to 28.98g/L was achieved.

(本文编辑: 康亦兼)