

复合菌群降解玉米秸秆协同产氢特性

包红旭^{1,2}, 任南琪², 王爱杰²

(1. 辽宁大学 环境学院, 沈阳 110036, baohongxu@lnu.edu.cn

2 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090)

摘 要: 为加快生物制氢工业化进程, 利用玉米秸秆这类来源广泛、储量巨大和价格低廉的可再生生物质纤维素资源作为发酵产氢的原料, 从连续流发酵产氢反应器 (ZL92114474. 1) 中新分离筛选出一株高效纤维素降解产氢细菌 *Clostridium* sp. X9 (NCBI 注册号: EU434651) 和一株高效产乙醇发酵产氢细菌 *Ethanoigenens harbinense* B2 (NCBI 注册号: EU639425), 通过构建高效降解纤维素发酵产氢复合菌群进行同步降解玉米秸秆发酵产氢. 结果表明, 对玉米秸秆进行酸化汽爆预处理后可以显著提高复合菌群的产氢能力. 复合菌群 X9 和 B2 比单一菌种具有更理想的降解玉米秸秆发酵产氢的能力, 两菌种间存在协同产氢效应. 复合菌群 X9 和 B2 降解玉米秸秆发酵产氢获得的最大产氢率和玉米秸秆降解率分别为 8.7 mmol/g 和 74%. 液相代谢末端产物主要为乙醇、乙酸和 酸. 这说明复合菌群 X9 和 B2 在以木质纤维素为发酵底物的工业化生物制氢领域中具有很好的应用发展前景.

关键词: 生物制氢; 复合菌群; 降解; 预处理; 玉米秸秆; 协同作用

中图分类号: S216 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2009)08-0069-05

Synergistic pretreated corn stalk degradation and biohydrogen production by co-culture bacteria

BAO Hong-xu^{1,2}, REN Nan-qi², WANG Ai-jie²

(1. School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China, baohongxu@lnu.edu.cn; 2. The State Key Lab of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract In order to use corn stalks as ideal raw materials for fermentative biohydrogen production, two new strains were isolated from a continuous-flow H₂ producing reactor (ZL92114474. 1). One is *Clostridium* sp. X9 (NCBI EU434651), a bacterium for anaerobic high-efficient cellulose degradation and hydrogen production, the other is *Ethanoigenens harbinense* B2 (NCBI EU639425), a bacterium for anaerobic high-efficient ethanol fermentation and hydrogen production. Experimental results show that H₂ production from corn stalks fermentation following with steam explosion pretreatment is higher than that directly from corn stalks by co-culture bacteria X9 and B2, and the co-culture bacteria are more preponderant than X9 or B2 individually for fermentative biohydrogen production. Co-culture bacteria X9 and B2 have high H₂ production rate of 8.7 mmol/g and corn stalk degradation degree of 74% feeding with corn stalk pretreated by steam explosion. The liquid end-products are mostly ethanol, butyrate and acetate. The study indicates that the biohydrogen production from corn stalk by co-culture bacteria X9 and B2 has good foreground.

Key words biohydrogen production; co-culture bacteria; degradation; pretreatment; corn stalks; synergistic effect

收稿日期: 2008-02-29.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000026402); 国家自然科学基金资助项目 (30470054).

作者简介: 包红旭 (1976-), 男, 讲师;

任南琪 (1959-), 男, 特聘教授, 博士生导师;

王爱杰 (1972-), 女, 教授, 博士生导师.

氢气是一种理想的可替代传统化石能源的新型能源物质, 其中发酵生物制氢技术以其反应条件温和、能耗低和环保等特点越来越引起人们的关注, 尤其是利用农业废弃物木质纤维素为发酵产氢底物方面, 不但减少了焚烧对环境的污染同

时也大大降低了生物制氢工业化应用的原料成本,这已经成为可再生能源领域的一个新兴研究热点^[1~3]. 目前研究主集中在活性污泥和堆肥上^[4~6], 本试验从连续流发酵产氢反应器(ZL92114474.1)中筛选分离得到一株高效纤维素降解产氢细菌 *Clostridium* sp. X9 和一株高效产乙醇发酵产氢细菌 *Ethanoigenens harbinense* B2 并对玉米秸秆采用酸化汽爆方式进行预处理,主要研究复合菌群 X9 和 B2 利用预处理玉米秸秆发酵产氢的特性.

1 材料与方法

1.1 菌种来源和培养基配制

试验用菌株 *Clostridium* sp. X9 (NCBI注册号: EU434651) 和 *Ethanoigenens harbinense* B2 (NCBI注册号: EU639425). 都是从本实验室连续流发酵产氢反应器 (ZL92114474.1) 中分离、筛选和纯化得到的新菌. X9 发酵类型为丁酸型, B2 发酵类型为乙醇型. 表 1 为两株细菌以葡萄糖为基质发酵产氢的主要液相末端产物分析^[7].

菌株 X9 为革兰氏阳性, 无芽孢, 规则杆状 (5.0~8.0 μm × 0.3~0.4 μm), 无鞭毛, 严格厌氧. 通过形态特征及 16S DNA 测序, X9 与丙酮丁醇梭杆菌 (*Clostridium acetobutylicum*, AE001437) 序列相似性仅为 96%, 其有可能是一个新种, 暂将其命名为 *Clostridium* sp. X9 菌株 B2 为哈尔滨产乙醇杆菌 (*Ethanoigenens harbinense*), 革兰氏阳性, 无芽孢, 规则杆状 (3.0~8.0 μm × 0.5~0.8 μm), 周生鞭毛, 严格厌氧.

表 1 X9 和 B2 发酵产氢的主要液相末端产物

细菌	液相末端产物 mg·L ⁻¹			
	乙醇	乙酸	丙酸	丁酸
X9	-	1759.36	-	3265.45
B2	4826.23	2456.25	-	-

两株细菌培养基的制备和实验操作采用改进的 Hungate 厌氧液管技术^[8], 以高纯氮气为气相, 35℃ 常规培养. 液体培养基成分为^[9]: 葡萄糖 10.0 蛋白胨 4.0 酵母汁 1.0 MgCl₂ 0.15 FeSO₄ 0.15 NaCl 1.0 K₂HPO₄ 1.5 牛肉膏 2.0 L-半胱氨酸 0.5 维生素液和微量元素液各 10 ml 刃天青 0.25 ml 蒸馏水 1000 ml 培养基 121℃ 灭菌 20 min

1.2 玉米秸秆来源和预处理方法

玉米秸秆取自哈尔滨双城市农田. 在预处理之前, 先将玉米秸秆切成 3~5 cm 的小段, 然后利

用微型植物粉碎机将这些小段粉碎成 30~60 目的粉末, 而后再进行预处理.

称取 15 g 秸秆粉末置于 500 ml 瓶中, 并以 1 g 秸秆粉末 /10 ml 硫酸水溶液的比例, 向瓶中加入 1% 的硫酸水溶液 (V: V), 混匀. 将瓶口密封, 置于高压锅内 121℃, 汽爆 2 h. 汽爆完成后, 高压锅温度降至 90℃ 时, 降压, 取出后冷却至室温, 处理后的玉米秸秆用水冲洗至 pH = 6.5~7.0 然后于 80℃ 烘干至恒重, 得到酸化汽爆玉米秸秆 SECS (Steam Exploded Cornstalk Stover).

1.3 试验装置

发酵产氢实验装置如图 1 所示.

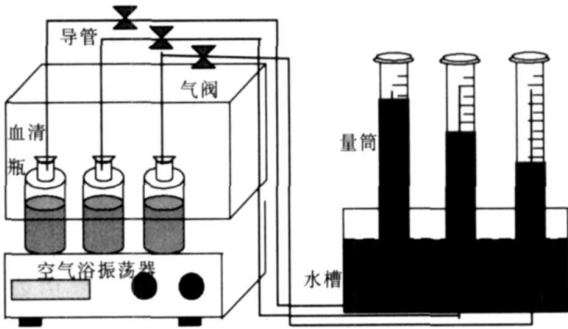


图 1 间歇发酵产氢实验装置示意图

1.4 氢气和液相代谢末端产物的分析方法

氢气采用 SC II 型气相色谱仪测定, 柱长 2 m, 担体为 TDS 01, 60~80 目, 热导池检测器, 氮气作载气, 流速为 70 ml/min, 柱和检测室 150℃.

发酵液相末端产物中挥发酸和醇类采用 GC122 型气相色谱仪分析, 取 1 ml 培养液, 离心转速为 4000 r/min, 取上清液进样, 柱长 2 m, 担体 GDX103, 60~80 目, 氢火焰检测器, 氮气作载气, 流速 60 ml/min, 氢气流速为 50 ml/min, 空气流速为 490 ml/min, 汽化室 210℃, 柱和检测室 190℃.

1.5 产氢能力的计算和玉米秸秆降解率的测定

最大单位质量产氢量 (产氢率): 最大累计产氢量 / 底物质量, mmol H₂ / g. 用减重法测定玉米秸秆的降解率. 准确称取发酵前后玉米秸秆的质量, 质量损失的部分即是被细菌利用降解产氢的玉米秸秆量, 通过发酵产氢前后玉米秸秆质量的差值来表征玉米秸秆的降解率.

2 结果与讨论

2.1 预处理玉米秸秆产氢能力的比较

首先对秸秆原料进行预处理, 这是提高纤维素酶解效率的一个重要途径. 预处理的目的是改变天然纤维素的结构, 破坏纤维素-木质素-半纤维素之间的连接, 降低纤维素的结晶度, 脱除木

质素和半纤维素, 增加原料的疏松性以增加纤维素酶系与纤维素的有效接触, 从而提高酶解效率通过预处理技术, 使木质纤维素分解成简单成分, 从而有利于随后的纤维素降解糖化过程, 生成易于被微生物利用的小分子糖类. 进而提高复合菌群协同降解纤维素分解产氢的能力. 预处理技术能够使秸秆应用于大规模实际氢气生产, 使秸秆物尽其用, 有效的对秸秆资源进行开发和氢能产业化生产^[10 11]. 试验以未经预处理的玉米秸秆和经过酸化汽爆的玉米秸秆做比较, 考察对产氢能力的影响. 复合菌群 X9 和 B2 以 1: 1 复配, 接种量为 6% (0.04 g/L), 分别接种到以上两种玉米秸秆基质中, 基质的底物浓度均为 15 g/L, 然后置于恒温振荡器中培养.

图 2 所示为玉米秸秆经过酸化汽爆预处理后对复合菌群发酵产氢的产氢率和玉米秸秆降解率影响的情况. 可以看出酸化汽爆预处理条件下复合菌群降解玉米秸秆产氢的能力较强, 其产氢率和玉米秸秆降解率分别达到 8.6 mmol/g 和 72%, 而没有经过预处理的玉米秸秆中纤维素的结晶程度高, 木质素与细胞多糖之间紧密的物理化学结合, 限制了复合菌群细菌纤维素降解酶与细胞壁多糖的接触, 导致玉米秸秆的降解和发酵产氢过程比较缓慢并且产氢率和降解率都很低, 从实验中看出不经过预处理的玉米秸秆的产氢率和降解率分别只有 1.1 mmol/g 和 8.8%. 并且发酵产氢的启动时间也由复合菌群的 12 h 延长到 20 h 而发酵产氢结束的时间则由复合菌群的 40 h 提前到了 36 h 这样也使得未经预处理的玉米秸秆有效的发酵产氢时间缩短, 降低了对玉米秸秆的利用率, 从而直接影响了发酵产氢的能力. 这说明复合菌群在利用玉米秸秆发酵产氢时为了提高玉米秸秆的利用率和产氢能力必须对玉米秸秆进行预处理, 而试验证明酸化汽爆预处理是一种较为适合的预处理方法, 复合菌群降解预处理玉米秸秆

的产氢率和玉米秸秆降解率分别比未经过预处理玉米秸秆的提高 7.8 倍和 8.2 倍.

2.2 复合菌群降解玉米秸秆协同产氢能力分析
复合菌群 X9 和 B2 以 1: 1 复配, 接种量为 6% (0.04 g/L), 单一菌种产氢试验的接种量分别为 6% (0.04 g/L), 接种到经过酸化汽爆预处理的玉米秸秆基质中, 底物质量浓度为 15 g/L, 置于恒温振荡器中振荡培养, X9 B2 和复合菌群降解玉米秸秆发酵产氢能力如图 3 所示.

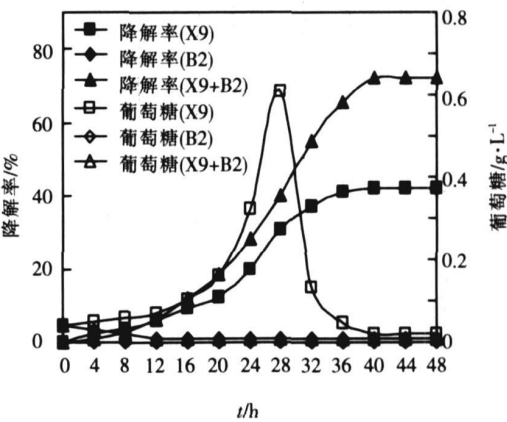


图 3 降解玉米秸秆的产氢率和生物量

从图 3 和图 4 中可以看到单一菌株 X9 和复合菌群都能利用纤维素发酵产氢, 并且其产氢率、玉米秸秆降解率和生物量的变化随发酵产氢时间都有类似的趋势. 但是从这些产氢能力的指标来看, 复合菌群的发酵产氢能力明显要高于单一菌株 X9, 复合菌群获得的最大产氢率可以达到 8.7 mmol/g 这比单一菌株 X9 的最大值为 4.3 mmol/g 提高了 4.4 mmol/g 复合菌群此时的最大生物量达到 0.61 g/L 是单一菌株 X9 最大值 0.32 g/L 的近 2 倍, 纤维素的降解率复合菌群的最大值 74% 也比单一菌株 X9 的最大值 41% 相应的提高了近 80%. 说明了在利用纤维素发酵产氢时, 复合菌群的协同产氢作用具有比单一菌株明显的优势. 菌株 B2 在图 3 中反应出各项指标基本均无变化. 并且复合菌群的发酵产氢时间比单一菌株 X9 的延长了近 5 h 这有利于复合菌群加大纤维素降解程度, 进而促进发酵产氢的产量. 值得注意的是, 在还原糖含量变化曲线图 4 中, 可以看到, 在单一菌株 X9 的发酵产氢体系中在发酵产氢的加速期出现一个还原糖积累的峰值, 在 28 h 时葡萄糖累积最大值的含量为 0.6 g/L 而在复合菌群中还原糖的含量在整个发酵产氢过程都几乎为零, 没有出现还原糖的积累, 说明复合菌群对纤维素酶解产生的糖的利用很充分和及时. 而对于单一菌株 X9 这个峰值的出现一方面说明在发酵

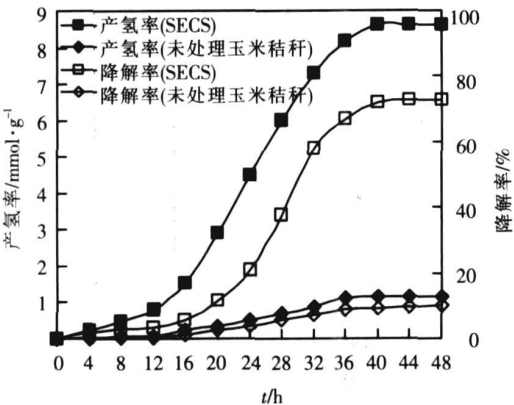


图 2 预处理玉米秸秆产氢能力的比较

产氢加速期对纤维素的酶解糖化作用积极, 酶解效率高, 具有很理想的纤维素降解糖化能力. 另一方面从代谢产物抑制原理来说, 糖作为菌株 X9 降解纤维素的代谢产物, 当其大量出现并累积到一定量时便会对菌体细胞产生抑制作用, 使得菌体细胞代谢减缓, 生长变慢和酶系失活. 从而影响到其对纤维素进一步的降解过程, 降低玉米秸秆降解率, 提前结束发酵产氢进程, 进而很大程度的影响产氢能力, 致使产氢率下降. 这些在图 3 中得到了证明, 与复合菌群相比, 其发酵产氢时间在进行到 35 h 基本结束, 比复合菌群的提前 5 h 发酵产氢过程结束时间提前, 降低了其对纤维素的降解率, 其最大玉米秸秆降解率只有复合菌群的 55%. 此时的生物量由于受到抑制作用的影响最大的生物量只有复合菌群的 52%, 与之对应其最大产氢率也只有复合菌群的 49%.

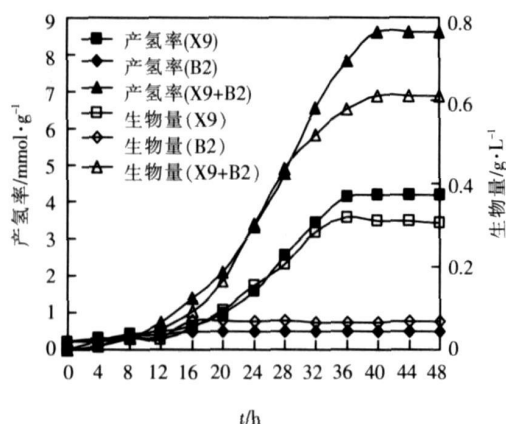


图 4 产氢体系玉米秸秆的降解率和还原糖含量

在微生物降解纤维素的过程中, 糖的积累和对微生物的抑制作用是普遍存在的, 也是困扰微生物降解纤维素发展的问题之一^[12, 13]. 在现有的技术中一般采用下列方法克服: 增加酶浓度、用外源 β -葡萄糖苷酶活性增补纤维素酶作用、用超过滤法移除水解液产生的糖、同时糖化和发酵底物, 使生成的糖直接发酵进而降低浓度. 但这些无疑都会增加处理成本, 使操作工艺复杂. 文中采用的复合菌群协同降解纤维素发酵产氢工艺, 是利用复合菌群的协同代谢原理, 菌株 X9 降解纤维素酶解糖化的产物纤维二糖和葡萄糖是高效产乙醇产氢细菌 B2 容易利用的发酵产氢底营养物. 通过这种协同代谢作用, 不但可以去除产物纤维二糖和葡萄糖对 X9 的抑制作用, 降低处理成本, 简化操作和减少设备, 还可以有效的提高综合利用纤维素的程度, 获得理想的产氢能力^[14, 15].

2.3 复合菌群降解玉米秸秆协同产氢代谢能力分析

从图 5 中看出, 单一菌株 X9 的主要液相代

谢末端产物为丁酸和乙酸, 而复合菌群的主要液相代谢末端产物为乙醇、丁酸和乙酸. 随着发酵产氢时间的增加, 单一菌株 X9 和复合菌群的液相代谢末端产物的含量都随之增加, 从而导致发酵产氢反应体系的 pH 迅速下降. 从图 5 中看出, 对于单一菌株 X9 当发酵产氢体系的液相代谢末端产物乙酸和丁酸的质量浓度分别为最大值 1603 mg/L 和 1042 mg/L 时, 与之对应的 pH 也由于酸化率的增大, 而下降到最低值 4.7 左右, 此时发酵产氢进程也基本结束. 这反过来也说明体系的 pH 也是液相单一菌株 X9 促进产氢能力的一个关键生态因子, 当 pH 低于菌株 X9 最佳生态位的范围时, 会对菌株的随之和代谢活性带来影响, 从而影响其发酵产氢的能力. 这是由于当 pH < 5.0 时, 细菌内酸性末端产物的积累成为控制发酵产物组成的限制性因素. 细菌内外有机酸达到动态平衡时, 随生境中 pH 的降低, 细胞内总有机酸积累倍数增加. 此时, $[HACT]_{内}/[HACT]_{外}$ 迅速增加, 这将严重影响生物正常代谢进程. 进而影响了其发酵产氢的能力.

在复合菌群中随着液相代谢末端产物乙醇、丁酸和乙酸的增加, 乙醇的含量也在总挥发酸中比例逐步升高, 说明了此时菌株 B2 的代谢活性提高. 而乙醇作为一种中型的溶剂对反应体系的 pH 变化起到一定的缓冲作用, 在发酵产氢 0~25 h 阶段混合酸中的丁酸所占的比例要高于乙醇, 说明丁酸型发酵降解纤维素发酵产氢细菌 X9 的代谢比较旺盛, 生长代谢有优势, 有利于纤维素的酶解糖化过程. 随后, 乙醇的比例逐渐增大, 这个阶段 X9 酶解纤维素产生的葡萄糖被菌株 B2 充分利用发酵产氢, 表现出乙醇含量的增加, 由于菌株 X9 比菌株 B2 更能高效利用葡萄糖产氢, 所以菌株 B2 开始逐渐占有优势, 这样有利于高效、充分的利用葡萄糖产氢, 提高产氢率. 在 40 h 时乙醇的含量为 2103 mg/L 是丁酸含量 1275 mg/L 的 1.6 倍. 同时乙醇的含量和比例的提高能够很好地避免酸性末端产物对微生物细菌正常代谢过程的影响, 从图 5 中可以看到在复合菌群中相代谢末端产物总量达到 5138 mg/L 时, 虽然 VFAs 的总量比单一菌株 X9 高出 2538 mg/L, 但此时体系中的 pH 才降到最低值的 4.2 仅比单一菌株 X9 低 0.5 这样就可以使微生物在平稳的 pH 变动范围内保持在高活性状态, 发酵产氢周期得到延长. 而且 B2 乙醇型发酵产氢代谢过程可以很大程度上调节 $NADH/NAD^+$ 平衡, 从而提供了更多的还原力, 提高了氢气的转化率.

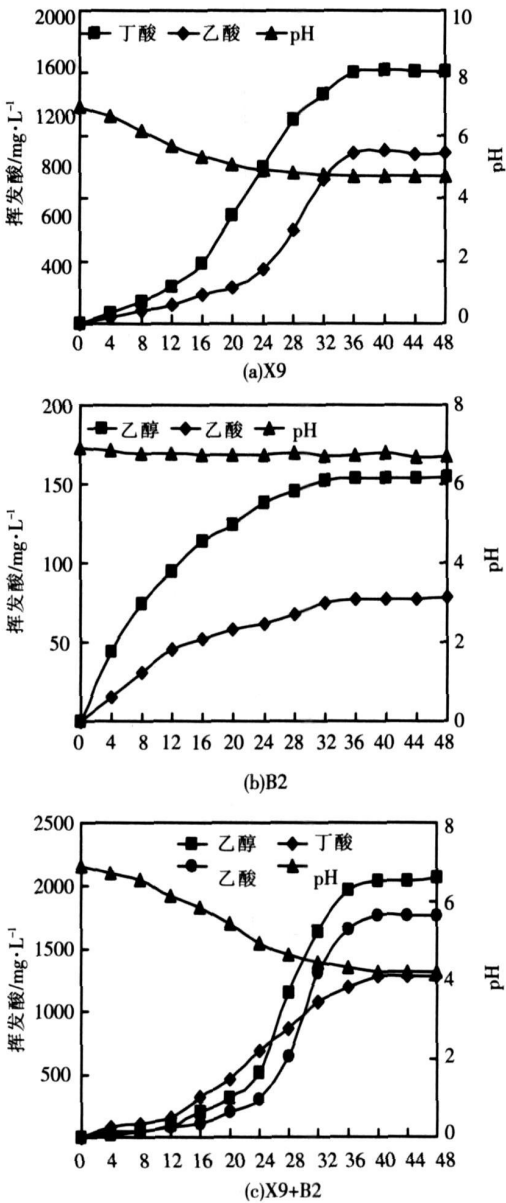


图 5 产氢过程中液物末端产物和 pH 的变化

3 结 论

1) 复合菌群降解酸化汽爆预处理玉米秸秆发酵产氢的最大产氢率和玉米秸秆降解率分别为 8.6 mmol/g 和 72%，比未经过预处理玉米秸秆最大值 1.1 mmol/g 和 8.8% 分别提高了 7.8 倍和 8.2 倍。

2) 复合菌种 *Clostridium* sp. X9 和 *Ethanoigenens harbinense* B2 较单一菌种 *Clostridium* sp. X9 在降解玉米秸秆产氢过程中表现出明显优势，其最大产氢率和玉米秸秆降解率分别为 8.7 mmol/g 和 74%，分别比单一菌株 X9 的最大值 4.3 mmol/g 和 41% 提高 4.4 mmol/g 和 33%。

3) 复合菌种 X9 和 B2 在降解玉米秸秆产氢过程中存在协同发酵产氢共代谢作用，其主要液

相代谢末端产物乙醇、丁酸和乙酸含量的增加和比例的变化对复合菌群发酵产氢能力起着重要的调节和促进作用。

参考文献:

[1] BOCKRIS J O' M. The origin of ideas on a hydrogen economy and its solution to the decay of the environment [J]. Int J Hydrogen Energy 2002, 27(7-8): 731-740.

[2] GOLTISOV V A, VEZIROGLU T N. From hydrogen economy to hydrogen civilization [J]. Int J Hydrogen Energy 2001, 26(9): 909-915.

[3] BARRETO L, MAKHIRA A, RIAHI K. The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario [J]. Int J Hydrogen Energy 2003, 28(3): 267-284.

[4] GLAZER A, NAKAIDO H. Microbial biotechnology: fundamental and applied microbiology [M]. New York: New York and Basingstoke Copyright 2002.

[5] ZHANG M L, FAN Y T, YAN X. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures [J]. Biomass Bioenergy 2007, 31(4): 250-254.

[6] SONG J X, REN N Q, XING D F. Prospect for inverting cellulose into hydrogen by biological technology [J]. Acta Energetica Sinica 2007, 28(1): 97-101.

[7] 任南琪, 王爱杰. 厌氧生物技术原理与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

[8] HUNGATE R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes [C] // New York: Academic Press 1969: 117-132.

[9] 林明. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士论文, 2002.

[10] LIX, WEIX Y, DONG R J. A study of degradation efficiency of corn straw pretreated with different methods [J]. Transactions of the CSAE 2006, 22(1): 110-116.

[11] TAE H K, JUN S K, SUNWOO C S, et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia [J]. Bioresource Technology 2003, 90(1): 39-47.

[12] 赵越, 武彬, 阎伯旭. 纤维二糖抑制外切纤维素酶水解作用机理的分析 [J]. 中国科学 (C 辑), 2003, 33(5): 454-460.

[13] TOMME P, WARREN R A J, GILLKES N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi [J]. Adv Microb Physiol 1995(37): 1-81.

[14] 刘波, 王海岩, 赵静玫. 几株产氢微生物的产氢能力及协同作用 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 23-16.

[15] 林明, 任南琪. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用 [J]. 环境科学, 2003, 24(2): 54-59.

(编辑 张红)