

文章编号: 0254-0096(2008)07-0775-06

一株纤维素降解新菌种发酵玉米 秸秆的生物产氢特性研究

包红旭, 任南琪, 王爱杰

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘 要: 试验从连续流发酵产氢反应器(ZL92114474.1)中分离筛选出一株高效纤维素降解产氢细菌 *Clostridium* sp. X9。X9 利用微晶纤维素(MC)作为发酵产氢底物, 得到最大单位体积产氢量(Y_{H_2})、比产氢率(Y_{H_2}/s)和纤维素降解率分别为 780 mL H_2 /L-culture、5.1 mmol H_2 /g-cellulose 和 69.6%。采用酸、碱、氨水和酸化汽爆方式预处理玉米秸秆, 结果表明, 酸化汽爆方式可以获得最佳的预处理效果。X9 利用酸化汽爆玉米秸秆(cSES)发酵产氢的 Y_{H_2} 、 Y_{H_2}/s 和纤维素降解率分别达到 730 mL H_2 /L-culture、4.3 mmol H_2 /g-cellulose 和 64%。这说明新菌种 X9 在利用玉米秸秆类生物质纤维素发酵产氢方面具有很好的应用潜力。

关键词: 生物制氢; 产氢细菌; 玉米秸秆; 预处理; 纤维素降解

中图分类号: S216 **文献标识码:** A

0 引言

目前利用秸秆类木质纤维素等生物质发酵产氢研究主要集中在活性污泥发酵和堆肥上, 且存在现有的微生物发酵秸秆类木质纤维素产氢的纤维素降解率低、产氢速率慢和产氢量低的缺陷, 这严重制约了降低生物制氢工艺成本, 实现生物制氢产业化的进程^[1,2]。

目前能够有效利用玉米秸秆类纤维素发酵产氢的高效纤维素降解产氢细菌的分离和如何提高发酵产氢能力这方面的研究报道还非常少。因此, 分离能够在常温条件下高效降解玉米秸秆类纤维素产氢细菌的研究就显得十分迫切^[3-5]。我们筛选分离得到一株高效纤维素降解产氢细菌 X9。X9 能以微晶纤维素(MC)、羧甲基纤维素钠(CMC)和玉米秸秆类纤维素作为发酵产氢底物并表现出很高的产氢能力。

1 试验材料与方法

1.1 菌种来源及分离筛选方法

分离筛选产氢菌的厌氧活性污泥取自本实验室连续流发酵产氢反应器(ZL92114474.1)。采用改进

的 Hungate 厌氧滚管技术^[6]和培养瓶平板法^[7]分离筛选细菌。

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。试验对玉米秸秆分别采用酸(H_2SO_4)、碱(NaOH)、氨水($NH_3 \cdot H_2O$)和酸化汽爆 4 种预处理方法。

1.3 分析及计算方法

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^[8]。葡萄糖采用葡萄糖氧化法试剂盒(GOD-PAP)测定。细胞生长量采用分光光度计测定, 在 600 nm 处测定吸光度值, 一个单位的光密度相对于 0.45g/L 干物质(细胞干重)。用碳平衡来度量纤维素的降解程度:

$$\text{纤维素降解率}(\%) = \frac{C(CO_2) + C(\text{乙醇}) + C(\text{丁酸}) + C(\text{还原糖})}{C(\text{纤维素})}$$

2 结果与讨论

2.1 纤维素降解菌株 X9 的获得和鉴定

以微晶纤维素(MC)为发酵产氢底物, 进行纤维素降解产氢细菌的筛选。得到一株能够利用纤维素

收稿日期: 2008-02-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G2000026402); 国家自然科学基金(30470054)

通讯作者: 任南琪(1959—), 男, 博士、教授、博士生导师, 主要从事环境微生物学、废水处理等领域的研究。mg@hit.edu.cn

降解产氢的细菌 X9,其液相代谢末端产物挥发酸主要是乙酸和丁酸,是典型的丁酸型发酵产氢细菌。

X9 为革兰氏阳性,不形成芽孢,规则杆状,大小为 $(5.0 \sim 8.0) \mu\text{m} \times (0.3 \sim 0.4) \mu\text{m}$,无鞭毛,形成的菌落呈现乳白色,菌落边缘整齐,圆形,光滑,不透明,严格厌氧。X9 通过形态特征(见图 1)及 16S rDNA 测序。X9 与丙酮丁醇梭杆菌(*Clostridium acetobutylicum*, AE001437)序列相似性仅为 96%,与其他菌种相比其相似性更低。根据细菌分类学规定 X9 的 16S rDNA 序列同源性低于 97%,其很有可能被确定是一个新种,将其命名为 *Clostridium* sp. X9。

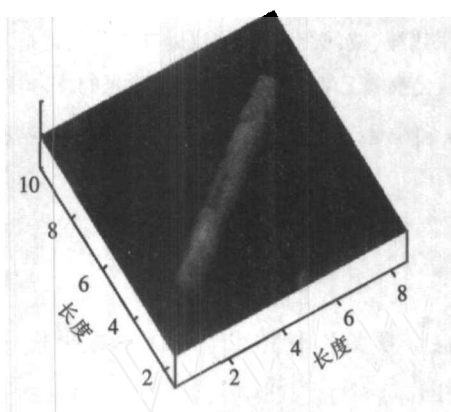


图 1 菌 X9 的原子力显微镜照片

Fig.1 AFM image of bacterium X9

2.2 菌株 X9 利用微晶纤维素(MC)和羧甲基纤维素钠(CMC)的产氢能力

从菌株 X9 的筛选和准备试验中了解到 X9 具有降解纤维素发酵产氢的能力,为了进一步了解菌株 X9 利用微晶纤维素(MC)和羧甲基纤维素钠(CMC)作为发酵底物,进行发酵产氢特性和纤维素降解的能力,进行了第一组试验的研究。试验结果见图 2 ~ 图 4。由图 2 可看出, X9 以微晶纤维素(MC)作为发酵底物发酵产氢时最大的体积产氢量(Y_{H_2})、比产氢率(Y_{H_2}/s)和纤维素降解率分别可达到 780 mL H_2 /L-culture、5.1 mmol H_2 /g-cellulose 和 69.6%。X9 以羧甲基纤维素钠(CMC)为底物发酵产氢时最大的体积产氢量(Y_{H_2})、比产氢率(Y_{H_2}/s)和纤维素降解率分别为 693 mL H_2 /L-culture、4.3 mmol H_2 /g-cellulose 和 57.6%,前者比后者分别提高 87 mL H_2 /L-culture、0.8 mmol H_2 /g-cellulose 和 12%。这说明微晶纤维素(MC)更容易被 X9 利用发酵产氢,且具有较高的纤维素降解和发酵产氢的能力。这一点也可以从图 3

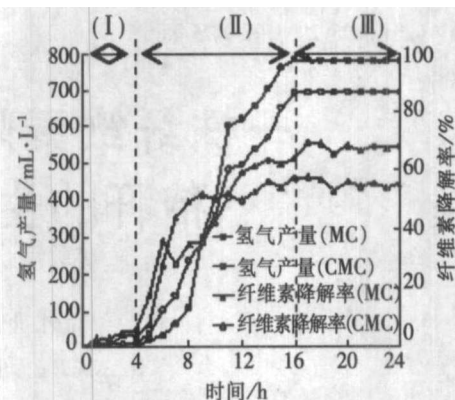


图 2 X9 利用(MC)和(CMC)底物发酵产氢的氢气产量和纤维素降解率

Fig.2 H_2 production and cellulose hydrolysis ratio of strain X9 from (MC) and (CMC)

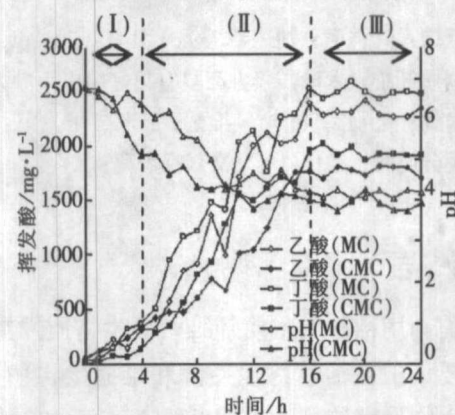


图 3 X9 利用(MC)和(CMC)底物发酵产氢的液相末端产物和 pH 变化

Fig.3 Accumulated terminal liquid products by strain X9 from (MC) and (CMC) and pH variation

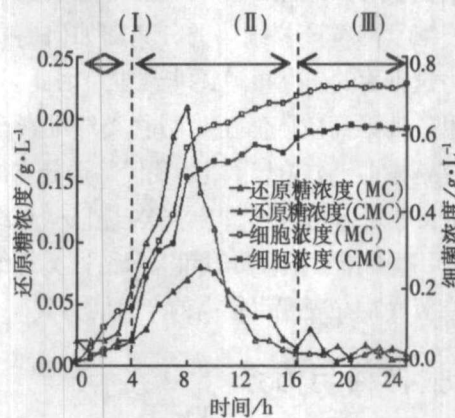


图 4 X9 利用(MC)和(CMC)底物发酵产氢的还原糖含量和细胞浓度

Fig.4 Reductive saccharides and cellular concentration in the test from (MC) and (CMC)

中得到验证。一般来说,随着纤维素降解率的提高,其发酵液体系中的液相末端产物的酸化率也就会越高。图 3 表明,在以微晶纤维素(MC)底物发酵产氢的体系中末端液相产物乙酸和丁酸的含量分别为 2393、2589mg/L,这远高于以羧甲基纤维素钠(CMC)底物发酵产氢的体系中末端液相产物乙酸和丁酸的含量(1800、2022mg/L),还可以看到此时的纤维素降解率也相应的从 57.6% 提高到 69.6%。

结合图 2~图 4, X9 在两种发酵底物体系发酵产氢的过程中,从降解发酵时间和产氢能力的变化过程看基本都存在 3 个阶段:(I)发酵产氢启动期、(II)发酵产氢加速期和(III)发酵产氢停滞期。(I)发酵产氢启动期是指在发酵产氢 0~4h 阶段,这时 X9 菌株处于适应发酵液生态环境的过程,菌体生长也处于相应的延滞期。同时,体系中用来维持细菌正常生长的营养物质浓度水平也较低,这些因素都直接阻碍了菌株 X9 降解纤维素产氢生物活性的发挥,从而导致这个阶段的产氢量和纤维素降解率都增长缓慢;(II)发酵产氢加速期是指在发酵产氢 4~16h 阶段, X9 在这个阶段降解纤维素产氢的能力得到了迅速提高,达到了最佳发酵产氢状态。其产氢量(Y_{H_2})、纤维素降解率、末端液相产物乙酸和丁酸分别从 2mL H_2 /L-culture、4.0%、312mg/L 和 371mg/L 提高到接近各自的最大值 780mL H_2 /L-culture、64.0%、2393mg/L 和 2530mg/L。这个阶段 X9 的细胞浓度也从 0.15g/L 增长到 0.70g/L,这表明 X9 已经逐步适应发酵生态环境,并进入了菌株的生物对数生长期, X9 生长旺盛必然导致其产能代谢加快,降解纤维素和产氢活性的提高。此时体系中也检测到还原糖出现阶段性的累积,这从另一方面说明 X9 产能代谢活性的提高,发酵体系产生了大量(或者说是“过剩”)还原糖的积累,这都有利于 X9 利用其提高产氢能力,增加产氢量;(III)发酵产氢停滞期是指在发酵产氢 16~24h 阶段, X9 在这个阶段降解纤维素产氢能力不再明显提高,基本保持相对稳定的水平。菌株 X9 也开始进入生物生长的稳定期和衰亡期,细胞浓度不再有明显提高。同时体系中液相末端产物(主要是乙酸和丁酸)的含量也随发酵时间逐渐增高, pH 值也从 7.0 迅速下降到 4.2。这对菌株 X9 的生物生长和产氢活性都产生了抑制作用,从而导致这个阶段的 X9 产氢量和纤维素降解率不再提高而是保持平稳。另外,体系中的可供菌株 X9 正常生

长,进行产能代谢的营养底物(如还原糖)已消耗殆尽,进而影响了菌株 X9 降解纤维素产氢的能力。因此可以说,发酵 16h 后 X9 的发酵产氢过程基本停止。

2.3 菌株 X9 利用玉米秸秆的产氢能力

2.3.1 预处理方法的确定

由于秸秆类原料的组成成分复杂,一般要借助化学或者物理的方法对秸秆进行预处理,目前秸秆类纤维素的预处理方法主要有物理法、化学法和综合法^[9-11]。本试验选择采用 4 种预处理方法:①酸(H_2SO_4)预处理(0.2%、0.5%、1.0%);②碱(NaOH)预处理(0.5%、1.0%、2.0%);③氨水($NH_3 \cdot H_2O$)预处理(2.0%、5.0%、10.0%),以上 3 种方法条件均为固液比为 1:10,室温常压浸泡 24h,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;④酸化汽爆预处理(将玉米秸秆经植物粉碎机粉碎成粉末状。称取 15g 秸秆粉末置于 500mL 瓶中,并以 1g 秸秆粉末/10mL 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 121℃ 高压锅内汽爆 2h 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 pH 至 6.5~7.0,然后于 80℃ 烘干至恒重)。然后 X9 分别以 4 种预处理产物为发酵产氢底物进行产氢特性研究。试验结果(表 1)表明 X9 利用经采用酸化汽爆预处理方法的玉米秸秆最有利于

表 1 玉米秸秆 4 种预处理方法对 X9 产氢能力和纤维素降解能力影响的比较

Table 1 H_2 production capabilities and cellulose degradation from corn stalks with four different pretreatment methods

预处理方法	浓 度	Y_{H_2} /mL H_2 / L-culture	纤维素降 解率/%
酸 H_2SO_4 /% (w/v)	0.2	125	45.9
	0.5	150	38.5
	1.0	113	40.1
碱 NaOH /% (w/v)	0.5	72	42.2
	1.0	80	45.0
	2.0	57	38.3
氨水 $NH_3 \cdot H_2O$ /% (w/v)	2.0	77	32.5
	5.0	45	43.2
	10	52	42.1
酸化汽爆预处理 H_2SO_4 /% (vol)	0.5	195.5	47.8

进行发酵产氢作用,酸化汽爆预处理方法是玉米秸秆发酵产氢的最佳预处理方法,在此条件下 X9 最大的产氢量 (Y_{H_2}) 和纤维素降解率分别可达到 195.5 mL H_2 /L-culture 和 47.8%。

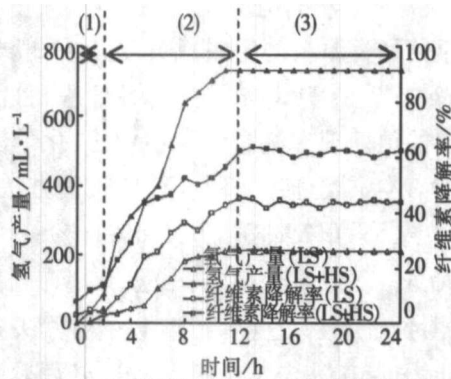


图 5 X9 利用 (LS) 和 (LS+HS) 底物发酵产氢的氢气产量和纤维素降解率

Fig. 5 H_2 production and cellulose hydrolysis ratio of strain X9 from (LS+HS) and (LS)

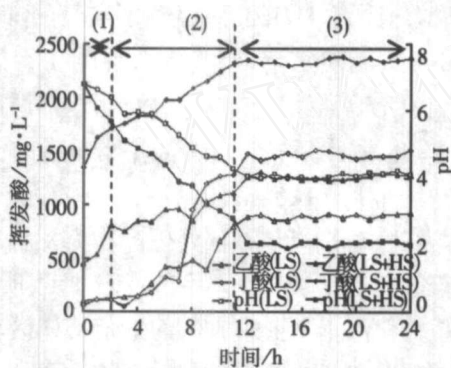


图 6 X9 利用 (LS) 和 (LS+HS) 底物发酵产氢的液相末端产物和 pH 的变化

Fig. 6 Accumulated terminal liquid products by strain X9 from (LS) and (LS+HS) and pH variation

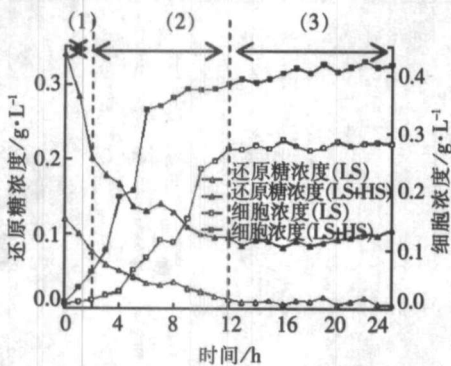


图 7 X9 利用 (LS) 和 (LS+HS) 底物发酵产氢的还原糖含量和细胞浓度

Fig. 7 Reductive saccharides and cellular concentration in test from (LS) and (LS+HS)

2.3.2 X9 利用酸化汽爆预处理玉米秸秆的产氢能力

为了进一步了解菌株 X9 利用预处理玉米秸秆

的产氢能力,进行了第二组试验:单独利用酸化汽爆预处理后纤维素固体 (LS) 和利用纤维素固体 (LS) 与洗脱液 (HS) 的混合液作为发酵底物产氢和纤维素降解的能力,试验结果见图 5~图 7。

由图 5 可知, X9 以纤维素固体 (LS) 与洗脱液 (HS) 的混合液为底物发酵产氢时最大的体积产氢量 (Y_{H_2})、比产氢率 (Y_{H_2}/s) 和纤维素降解率分别可达到 730 mL H_2 /L-culture、4.3 mmol H_2 /g-cellulose 和 64%。X9 单独利用纤维素固体 (LS) 为底物发酵产氢时最大的体积产氢量 (Y_{H_2})、比产氢率 (Y_{H_2}/s) 和纤维素降解率分别为 213.0 mL H_2 /L-culture、3.7 mmol H_2 /g-cellulose 和 45.6%。前者比后者分别提高 517 mL H_2 /L-culture、4.5 mmol H_2 /g-cellulose 和 18.4%。这说明 X9 更容易利用玉米秸秆酸化汽爆预处理后的纤维素固体 (LS) 和洗脱液 (HS) 的混合液进行发酵产氢。作者认为,在酸化汽爆预处理的洗脱液 (HS) 中,含有菌株 X9 可以利用发酵产氢的营养物质(水解的还原糖),有利于 X9 的细胞生长对纤维素的降解产氢,所以在图 4 中反映出 X9 利用 (LS+HS) 底物发酵比 (LS) 底物发酵的产氢能力有很大提高。

同时结合图 5~图 7 可以看出,与前面第一组试验具有类似的发酵产氢规律, X9 在这组试验利用预处理玉米秸秆为发酵底物的发酵产氢过程中,也相应存在 3 个阶段:发酵产氢启动期、发酵产氢加速期和发酵产氢停滞期。发酵产氢启动期是在发酵产氢 0~2h 阶段,但与第一组试验不同的是,这时的启动期明显缩短了,这可以从图 6 中找到原因,即在第二组两种不同底物发酵产氢体系中的初始还原糖的含量分别为 0.34 g/L (LS+HS) 和 0.12 g/L (LS)。这部分还原糖是在玉米秸秆酸化汽爆预处理过程中产生的,并残留在处理后的洗脱液 (HS) 和纤维素固体 (LS) 中,这部分还原糖有利于 X9 的菌体生长和产能代谢,使其尽快适应发酵产氢体系,从而较第一组试验缩短了发酵产氢的启动时间;发酵产氢加速期是在发酵产氢 2~12h 阶段,相对第一组试验这一阶段时间也有所减少,最大产氢量和纤维素降解率分别较第一组少了 50 mL H_2 /L-culture 和 5.6%。这是因为一方面酸化汽爆预处理可以提高反应速率,显著提高纤维素水解和半纤维素的溶解,使之分解成单糖等可溶性糖类,半纤维素的去除也使得纤维素水解生成葡萄糖的产率大大提高,这都有利于 X9 发酵产氢能力的提高。另一方面处理后分解的一部分糖

转化成有毒的脱氢化合物——糖醛、羟甲基糖醛和大量香豆酸、香草醛、香草酸等物质,这些物质又进一步转化成丁酸、乙酰丙酸、甲酸和己酸,这些物质对微生物都具有不同程度的毒性和抑制作用。当这些抑制物的浓度高于一定水平时,又会促使微生物朝着消耗溶剂以产酸的方向发展,从而降低了产氢的能力。结果表明,在纤维素固体(LS)发酵产氢体系中初始挥发酸丁酸和乙醇的浓度比第一组试验的初始水平分别高出 60 和 90mg/L;在纤维素固体(LS)与洗脱液(HS)的混合液体体系中初始挥发酸丁酸和乙醇的浓度比第一组试验的初始水平分别高出 1350 和 450mg/L。这部分挥发酸在对 X9 发酵产氢产生抑制的同时也使得(LS + HS)反应体系的 pH 值从 7.0 迅速下降到 2.0,这较(LS)反应体系和第一组试验的 pH 值变化都要剧烈和明显。而纤维素降解酶的活性适应的最佳 pH 值一般在 5.0,所以较低的 pH 值水平和变化幅度都将给纤维素降解酶的活性发挥带来影响,阻碍了纤维素的进一步降解糖化,进而影响了 X9 降解玉米秸秆和发酵产氢的能力。12h 时(LS)和(LS + HS)反应体系的细胞浓度分别只有 0.27 和 0.41g/L,这较第一组的试验细胞浓度(0.70g/L)明显少了很多,这也正说明了反应体系中存在的毒性物质对 X9 的生长产生显著的抑制作用,阻碍了反应体系中生物量的有效增长,也就在很大程度上影响了 X9 降解玉米秸秆和发酵产氢的能力。再有体系中伴随预处理对纤维素、半纤维素和木质素降解过程中产生了一定量的重金属离子,其中的一些重金属离子对纤维素降解酶、半纤维素降解酶和氢酶都产生一定毒性和抑制作用,这也导致这个时期较第一组试验 X9 降解玉米秸秆和发酵产氢的能力有所下降。以上原因都加大了 X9 降解玉米秸秆和发酵产氢抑制性因素的累积效应,从而对 X9 的纤维素降解能力和产氢能力都产生了一定影响,并较早结束了发酵产氢的进程,减少了氢气的产量;发酵产氢停滞期是在发酵产氢 12 ~ 24h 阶段,和第一组试验相比也表现出提前结束发酵产氢进程。其原因是:一方面,预处理后的玉米秸秆成分复杂,X9 可直接用来进行发酵产氢的营养组分有限;另一方面,预处理后的玉米秸秆残留的抑制 X9 发酵产氢的影响因素逐渐增多累积。

可以推测,如果可以采取连续流生物纤维素降解发酵产氢的反应器,随着代谢终产物的流出,降低

对 X9 的抑制作用,X9 很有可能得到持续较高的发酵产氢能力和纤维素的降解能力。

3 结 论

1)从活性污泥中分离出了一株高效纤维素降解产氢细菌。通过形态特征分析、16S rDNA 测序和菌株系统发育分析,X9 很可能被确定是一株新种,将其命名为 *Clostridium* sp. X9;

2)菌株 X9 利用微晶纤维素(MC)和羧甲基纤维素钠(CMC)进行降解发酵产氢。X9 获得最大的单位体积产氢量(Y_{H_2})、比产氢率(Y_{H_2}/s)和纤维素降解率分别为 780mL H_2 /L-culture、5.1 mmol H_2 /g-cellulose 和 69.6%;

3)菌株 X9 利用纤维素固体与洗脱液的混合液(LS + HS)为底物发酵产氢时比单独利用(LS)底物的产氢量和纤维素降解率都有明显提高。 Y_{H_2} 、 Y_{H_2}/s 和纤维素降解率分别达到 730mL H_2 /L-culture、4.3 mmol H_2 /g-cellulose 和 64%。同时酸化汽爆预处理方式是 X9 利用玉米秸秆发酵产氢的最佳预处理方式。

[参考文献]

- [1] Hansel A, Lindblad P. Mini-review: towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 50: 153—60.
- [2] Datar R, Huang J, Maness P, et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32: 932—939.
- [3] Wyman C. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19: 254—262.
- [4] Dwierra E, Kenji M, et al. Conversion of Chitinous Wastes to Hydrogen Gas by *Clostridium parapatricum* M-21[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 4: 339—343.
- [5] Oh Y K, Seol E H. Fermentative biohydrogen production by a new chemo heterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19[J]. Int J Hydrogen Energy, 2003, 28: 1353—1359.
- [6] 李永峰,任南琪,李建政,等. 发酵产氢细菌分离培养技术的改良[J]. 21 世纪太阳能新技术, 2003, 814—818.
- [7] Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strictanaerobes[J]. Methods in Microbiology, 1969, 2: 117—132.

- [8] 任南琪, 王宝贞. 有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994.
- [9] Liu H, Walter H, Vogt G, Vogt H, et al. Steam pressure disruption of municipal solid waste enhances anaerobic digestion kinetics and biogas yield[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77: 121—120.
- [10] Glazer A, Nikaido H. *Microbial biotechnology-fundamentals of applied microbiology*[M]. New York, New York and Basingstoke Copyright, 2002, 12—19.
- [11] Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood[J]. *Journal of Applied Microbiology & Biotechnology*, 2002, 618—628.

SIMULTANEOUS BIO-HYDROGEN PRODUCTION AND PRETREATED CORN STALK DEGRADATION BY A NEW CELLULOSE-DEGRADATION BACTERIUM

Bao Hongxu, Ren Nanqi, Wang Aijie

(School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: In this study, *Cellulolyticum* sp. X9, anaerobic high efficiency cellulose degrading and hydrogen producing bacterium, was isolated from a continuous-flow H_2 producing reactor(ZL92114474.1). Experimental results showed that strain X9 has high hydrogen yield (Y_{H_2}) of 780 ml H_2 /L-culture, specific H_2 production rate (Y_{H_2}/s) of 5.1 mmol H_2 /g-cellulose and cellulose degradation degree of 69.6% feeding with microcrystalline cellulose (MC). Then, strain X9 was adopted to investigate H_2 production capabilities directly from corn stalks fermentation following with four different pretreatment methods. Of which, steam explosion pretreatment showed the highest H_2 yield (Y_{H_2}) and corn stalk degradation degree. This indicated that *Cellulolyticum* sp. X9 has great potential for fermentative H_2 production from lignocellulose biomass like corn stalks after effective pretreatment.

Keywords: bio-hydrogen; H_2 producing bacteria; corn stalks; pre-treatment; cellulose degradation