

文章编号:1671-2021(2008)03-0463-05

新菌 X_9 协同 B_{49} 同步发酵纤维素产氢能力分析

包红旭,任南琪,王爱杰

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:目的 为了加快生物制氢工业化进程,分析纤维素降解产氢新菌 *Clostridium* sp. X_9 (梭杆菌,NCBI注册号:EU434651,简称 X_9) 协同 *Ethanoigenens harbinense* B_{49} (哈尔滨产乙醇杆菌,NCBI注册号:AF481148,简称 B_{49}) 同步发酵纤维素产氢的能力.方法 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 X_9 和一株实验室已有的高效乙醇型发酵产氢细菌 B_{49} ,采用两菌种复合培养方式同步降解酸化汽爆玉米秸秆发酵产氢.结果 复合菌种 X_9 和 B_{49} 比单一菌种具有更高的降解玉米秸秆产氢的能力,两菌种间存在协同降解产氢效应.两菌种以体积比(1:1)复配,接种量10%,40 复合培养,协同降解玉米秸秆产氢24 h的最大单位体积产氢量(Y_{H_2})和玉米秸秆降解率分别为1530 ml/L和61.8%.结论 复合菌种 X_9 和 B_{49} 在利用玉米秸秆类可再生生物质纤维素发酵产氢方面具有很好的工业化应用潜力.

关键词:生物制氢;菌种复配;玉米秸秆;同步发酵;梭杆菌 X_9 ;乙醇杆菌 B_{49} ;协同作用

中图分类号:S216

文献标识码:A

氢能是高效、清洁和可再生的能源,在能源可持续发展中起到显著的作用,并将对全球生态环境产生巨大的影响^[1-2].近年来发酵法生物制氢技术以其稳定性好,产氢能力高和环境友好等特点已经成为可再生能源领域的一个新兴研究热点^[3].但现阶段主要是集中在单一菌种纯培养利用简单发酵底物产氢的实验室研究^[4].玉米秸秆是一类来源广泛,储量巨大和价格低廉的木质纤维素原料,若能将其用于发酵产氢,将为大幅度降低生物制氢工艺成本,实现生物制氢产业化奠定重要的基础^[5].目前,关于能够有效利用玉米秸秆类纤维素发酵产氢的高效产氢细菌分离和有效产氢方法方面的研究报道却很少^[6].试验采用菌种 X_9 和 B_{49} 复合培养方式,进行复合菌种协同降解玉米秸秆产氢试验.试验结果获得了较为理想的玉米秸秆降解率和氢气产量,表现出良好的实际应用潜力.

1 试验材料与方法

1.1 菌种来源和培养基配制

试验用菌株 X_9 和 B_{49} .两株细菌都是从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. X_9 发酵类型为丁酸型, B_{49} 发酵类型为乙醇型.

细菌培养基的制备和实验操作采用改进的 Hungate 厌氧滚管技术^[7],以高纯氮气为气相,35 常规培养.

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.试验对玉米秸秆采用酸化汽爆预处理方法,在预处理试验中,要先将玉米秸秆经植物粉碎机粉碎成颗粒直径为0.3~0.5 mm的粉末.称取15 g 秸秆粉末置于500 ml 瓶中,将秸秆粉末(g)和硫酸水溶液(ml)以固液比为1:10混合,加入硫酸水溶液的体

收稿日期:2007-03-01

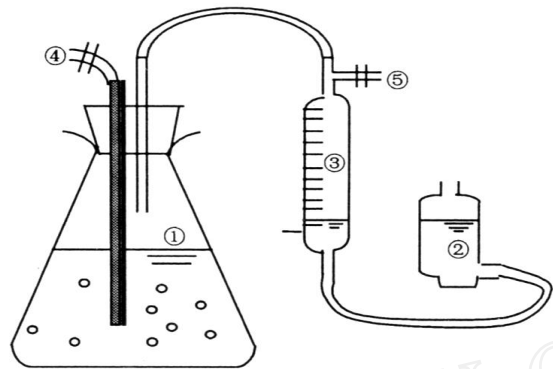
基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(G2000026402);国家自然科学基金资助项目(30470054)

作者简介:包红旭(1976—),男,博士研究生,主要从事环境生物技术、废水生物处理和生物质能等研究.

积分数为 1%,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,备用.

1.3 试验装置

发酵产氢实验装置如图 1 所示.



1 培养瓶; 2 平衡瓶; 3 产氢量计量器; 4 取样口; 气体取样口
1. 培养液; 2. 平衡瓶; 3. 产氢量计量器;
4. 取样口; 5. 气体取样口

图 1 发酵产氢间歇实验装置

1.4 液相代谢末端产物的分析方法

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.

氢气采用 SC 型气相色谱仪测定^[8].

1.5 产氢能力和玉米秸秆降解率的计算方法

单位体积产氢量(Y_{H_2}) = 累计产气量 × 氢气比例 / 培养基体积 ; (ml/L).

用减重法测定玉米秸秆的降解率.在相同条件下准确称取发酵前后玉米秸秆的质量,质量损失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损失来表征玉米秸秆的降解率.

1.6 葡萄糖(还原糖)质量浓度和细胞生长量测定

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 0.45 g/L 干物质(细胞干重).

2 结果与讨论

2.1 菌种复配方案

自然界中不同的微生物体之间存在许多相互作用,基本上可分为正向^[9](协同作用)的和负

向^[10](抑制作用)的相互作用.试验对供试菌株 X_9 和 B_{49} 进行混合复配,进行协同降解玉米秸秆产氢特性的研究.试验考察了菌株 X_9 和 B_{49} 的不同复合方式的组合降解玉米秸秆产氢效果,试验结果见表 1.

表 1 复合细菌的复配组合试验

试验号	菌株接种量/ ml		产氢量/ (ml L ⁻¹)	降解率/ %
	X_9	B_{49}		
1	1.0	-	201	19.1
2	5.0	-	634	32.2
3	10.0	-	786	45.6
4	-	1.0	7	1.8
5	-	5.0	18	2.3
6	-	10.0	21	3.1
7	1.0	1.0	512	20.6
8	1.0	3.0	643	24.9
9	1.0	5.0	681	27.4
10	3.0	1.0	923	37.0
11	3.0	3.0	1 001	41.6
12	3.0	5.0	1 124	44.4
13	5.0	1.0	1 241	49.3
14	5.0	3.0	1 374	57.2
15	5.0	5.0	1 530	61.8

在发酵产氢间歇试验中,底物质量浓度为 15 g/L,体积 100 ml,置于恒温振荡器中,40℃振荡培养.由表 1 结果可见,在第 1 ~ 6 组试验中,为菌株 X_9 和菌株 B_{49} 分别单独利用玉米秸秆发酵产氢的情况.随着单一菌株接种量的增加,单一菌株 X_9 的产氢能力和降解率都有明显的提高,而单一菌株 B_{49} 却没有明显的变化;在第 7 ~ 15 组试验中,以不同接种量组合的复合菌种接种方式时,整体相对于单一菌种接种时的产氢能力和降解率都有很大的提高,考虑到工业化应用成本等问题,当菌株 X_9 和菌株 B_{49} 的接种量分别为 5 ml 时,达到较为理想的产氢量和玉米秸秆降解率.同时也表现出菌株 X_9 和 B_{49} 之间在降解玉米秸秆产氢过程中存在协同促进作用.另外,在不同的复配方案中,随着复合菌种中菌株 X_9 接种量的增加其产氢能力和降解率的提高都较为显著,说明菌株 X_9 是“主导菌株”;而菌株 B_{49} 随着在复合菌种中接种量的增加其产氢能力和降解率的提高不是很明显,说明菌株 B_{49} 是“辅助菌株”.

2.2 复合菌种降解玉米秸秆协同产氢能力

菌株 X_9 和 B_{49} 接种量各为 5 ml 进行复配(单一菌种产氢试验的接种量为 10 ml),接种到经过预处理的玉米秸秆基质中,底物质量浓度为 15 g/L,体积 100 ml,置于恒温振荡器中,40 °C 振荡培养。 X_9 和 B_{49} 降解玉米秸秆的产氢量与降解率如图 2 所示。

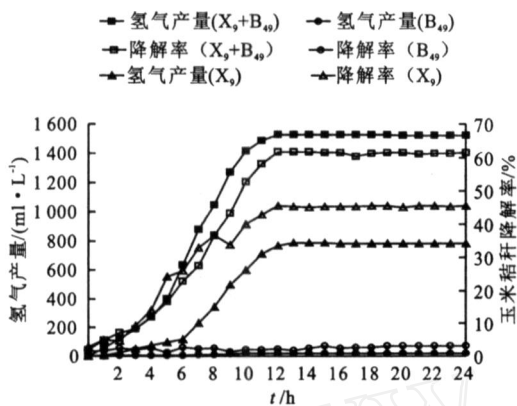


图 2 X_9 和 B_{49} 降解玉米秸秆的氢气产量和降解率

从图 2 的氢气产量变化曲线可以看出,菌株 X_9 单独降解玉米秸秆产氢时,在发酵产氢的启动期 0 ~ 4 h 阶段,菌株 X_9 生长处于延滞期,从而导致这个阶段的产氢量增长缓慢,产氢量 (Y_{H_2}) 仅为 76 ml/L;在发酵产氢的加速期 4 ~ 12 h 阶段,氢气产量开始呈现增加的趋势,并在 12 h 达到最大值,其产氢量 (Y_{H_2}) 为 786 ml/L. 12 ~ 24 h 阶段发酵产氢过程进入停滞期,菌株 X_9 氢气产量不再明显提高,基本保持相对稳定的水平,发酵产氢过程基本结束;菌株 B_{49} 在单独降解玉米秸秆产氢时,氢气产量很少,最大的产氢量 (Y_{H_2}) 只能达到 21 ml/L. 这说明 B_{49} 基本没有利用玉米秸秆发酵产氢;在菌株 X_9 和 B_{49} 复合培养条件下,发酵产氢的启动期缩短为 0 ~ 2 h 阶段,其产氢量 (Y_{H_2}) 也较快达到 121 ml/L. 在 2 ~ 12 h 进入发酵产氢加速期,在 12 h 达到最大值,其产氢量 (Y_{H_2}) 为 1 530 ml/L. 12 ~ 24 h 阶段进入发酵产氢停滞期。

同时由图 2 也可见,在玉米秸秆降解的过程中也存在类似氢气产量变化的趋势,两者存在对应关系. 单一菌株 X_9 在启动期 0 ~ 4 h 阶段,玉米秸秆的降解效率很低. 在加速期 4 ~ 12 h 阶段,在 12 h 达到玉米秸秆降解率的最大值 45.6 %, 12 ~ 24 h 阶段进入停滞期,玉米秸秆的降解率趋于平稳;单一菌株 B_{49} 在整个发酵过程基本没有降解

玉米秸秆作用,复合菌种 X_9 和 B_{49} 在启动期 0 ~ 2 h 阶段对玉米秸秆的降解率增长缓慢. 在 2 ~ 12 h 的加速期,12 h 达到玉米秸秆降解率的最大值 61.8 %. 12 ~ 24 h 阶段进入停滞期。

在整个降解玉米秸秆产氢过程中,笔者得出在发酵产氢的启动期,菌株 X_9 和 B_{49} 都处于适应发酵体系生态环境的过程,菌体生长也相应的处于延滞期. 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,菌株需要进行调整 and 适应,以合成多种功能酶,包括纤维素降解酶和氢酶,逐步完善体内的酶系统和细胞的其他成分,从而导致这个阶段的产氢量增长缓慢和玉米秸秆的降解效率很低. 由于两菌种 X_9 与 B_{49} 之间存在菌体生长的共生关系,两菌株互为促进,较快地完成了适应发酵生态环境,菌体恢复生长并迅速增殖,从而进行协同降解玉米秸秆发酵产氢过程. 在发酵产氢加速期阶段,复合菌株 X_9 和 B_{49} 在降解玉米秸秆产氢过程中表现出明显的协同促进作用,其产氢量 (Y_{H_2}) 和玉米秸秆降解率迅速提高到各自最大值 1 530 ml/L 和 61.8 %,复合菌株的产氢能力和玉米秸秆降解率比单一菌株 X_9 分别提高了 94.7 %和 35.5 %. 试验结果也表明,菌株 X_9 是一株高效降解玉米秸秆产氢的细菌. 另外,菌株 B_{49} 在前期试验中已经证明是一株高效乙醇型发酵产氢细菌,其发酵底物以单糖物质为主,且表现出理想的产氢效果^[11]. 菌株 B_{49} 不能直接利用纤维素类复杂多糖底物发酵产氢. 所以单一菌株 B_{49} 在试验中表现出基本没有降解玉米秸秆产氢的作用。

2.3 液相代谢末端产物及 pH 值变化

在发酵产氢过程中,液相代谢末端产物及 pH 值变化如图 3 所示。

图 3 可看出,在 12 h 时发酵过程基本趋于平稳,单一菌株 X_9 发酵产氢体系中液相代谢末端产物主要为乙酸、丁酸和乙醇,其质量浓度分别为 907 mg/L、1 508 mg/L 和 54 mg/L,是丁酸型发酵;单一菌株 B_{49} 发酵体系中液相代谢末端产物主要为乙酸、丁酸和乙醇,其质量浓度分别为 118 mg/L、62 mg/L 和 278 mg/L,是乙醇型发酵;复合培养体系中液相代谢末端产物主要为乙酸、丁酸和乙醇,其质量浓度分别为 1 260 mg/L、1 440 mg/L 和 1 340 mg/L,是混合酸型发酵。

结合图 2 和图 3,一般来说,随着玉米秸秆降

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相应的越高.复合菌株 X_9 和 B_{49} 降解玉米秸秆产氢过程中产生的挥发性脂肪酸(VFAs)总量比 X_9 和 B_{49} 单独降解时要大得多,分别提高 63.6% 和 782.1%. 这也正说明由于两菌株 X_9 和 B_{49} 间存在的协同促进作用,很大程度的促进了降解玉米秸秆的发酵产氢过程.

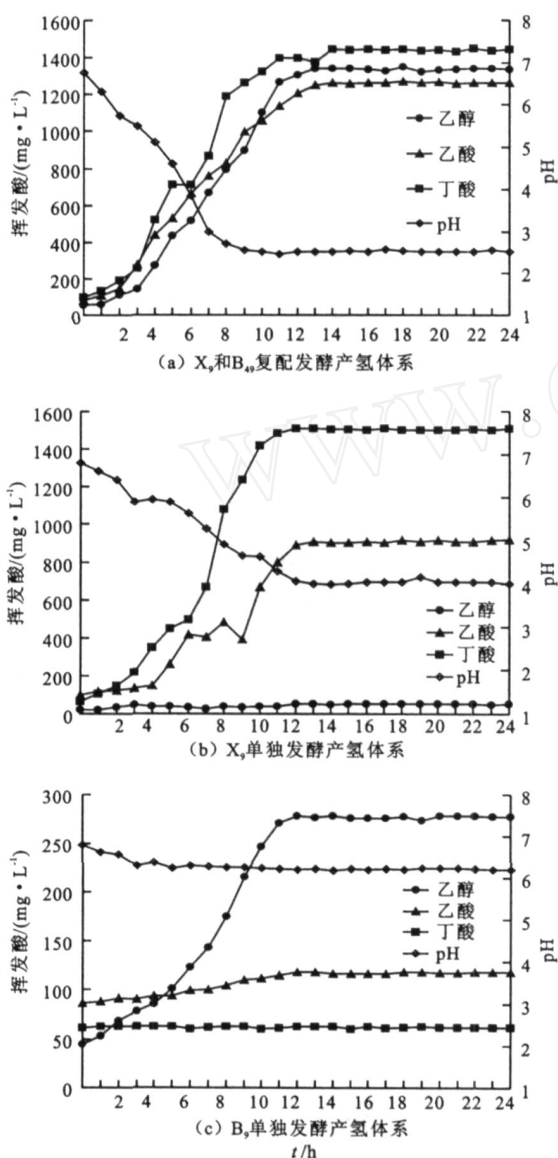


图3 降解产氢过程中液相末端产物和pH的变化

同时由图3也可见,单一菌株 X_9 降解玉米秸秆产氢过程中,pH随发酵时间逐渐下降,在13h pH由开始时的6.8降到4.0,并趋于平稳;单一菌株 B_{49} 的pH在发酵过程0~6h阶段也有小幅度下降,在6h时pH由开始时的6.8降到6.2,整个过程中pH变化较为平稳;复合菌株 X_9 和 B_{49} 降解玉米秸秆产氢过程中,pH在13h由始时

的6.8降到2.5,下降幅度较大.这一点可以结合图2得到验证,这是由于复合菌株 X_9 和 B_{49} 间的协同作用促进了降解玉米秸秆发酵产氢的进程和程度,使得玉米秸秆的降解发酵程度大幅提高和发酵液体系中的液相末端产物的酸化率的提高,从而表现为较单一菌株降解产氢体系pH下降幅度要大得多.

2.4 还原糖的积累和生物量的变化

还原糖是细菌可直接用来进行菌体生长合成代谢和产能代谢的基本物质,同时也是影响发酵产氢性能的关键因素之一.降解产氢过程中还原含糖和细胞质量浓度变化如图4所示.

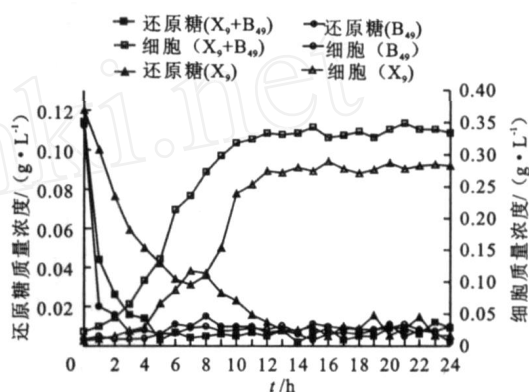


图4 降解产氢过程中还原糖含量和细胞质量浓度的变化

由图4可见无论是复和培养还是纯培养,发酵体系中还原糖基本没有积累的过程,都是随着发酵时间逐步减少.单一菌株 X_9 在12h时体系中基本检测不到还原糖;复合菌株和单一菌株 B_{49} 在4h时体系中就基本检测不到还原糖,这一方面说明, B_{49} 是一株高效利用单糖类物质发酵产氢的细菌.另一方面也说明,在复和培养中 B_{49} 协同 X_9 更有效的利用了还原糖,从而提高了氢气的产量.体系中起始的还原糖含量为预处理后残留在玉米秸秆表面带入的含糖量.

图4也表明单一菌株 X_9 降解玉米秸秆产氢过程中,菌株 X_9 菌体细胞质量浓度随着发酵产氢过程逐步增大,在16h时细胞浓度达到0.28 g/L,之后逐步趋于稳定,并且相应于玉米秸秆的降解和产氢过程变化,菌株 X_9 的生长也对应出现从延滞期→对数生长期→稳定期的变化趋势;单一菌株 B_{49} 由于不能降解玉米秸秆获得菌体自身生长的所需的营养物质,所以其细胞浓度始终停留在很低的水平;复合菌株 X_9 和 B_{49} 也存在一个生长从延滞期到稳定期的变化趋势,同时由于两菌

种在生长合成代谢和产能代谢等方面的共生,互益关系,使得复合菌种的菌体细胞浓度较单一菌株 *X₉* 有所提高,在 16 h 时复合菌种的菌体细胞质量浓度达到 3.4 g/L,这也促进了其发酵玉米秸秆协同产氢能力的提高。

3 结 论

(1) 复合菌种降解玉米秸秆产氢的最佳组合为 *Clostridium* sp. *X₉* (5 ml) 和 *Ethanoigenens harbinense* *B₄₉* (5 ml)。

(2) 复合菌种 (*Clostridium* sp. *X₉* 和 *Ethanoigenens harbinense* *B₄₉*) 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,最大产氢量 (Y_{H_2}) 和玉米秸秆降解率分别为 1 530 ml/L 和 61.8 %。

参考文献:

- [1] Bockris J. OM. The Origin of Ideas on a Hydrogen Economy and Its Solution to the Decay of the Environment[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27: 731 - 740.
- [2] Goltsov V A, Veziroglu T N. From Hydrogen Economy to Hydrogen Civilization[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2001, 26: 909 - 915.
- [3] Datar R, Huang J, Maness P, et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stove biomass pre-treated with a steam - explosion process[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32: 932 - 939.
- [4] 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.
- [5] Dwierra E, Kenji M. Conversion of Chitinous Wastes to Hydrogen Gas by *Clostridium paraputrificum* M - 21 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 4: 339 - 343.
- [6] Wyman C. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power [J]. Biotechnology Progress, 2003, 19: 254 - 262.
- [7] Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes [C]. New York: Academic Press, 1969. 117 - 132.
- [8] 林明. 高效产氢发酵菌种的产氢机理及生态学研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 2002.
- [9] Shan J Y, Jia Y, Liu Y, et al. Two pseudomonas act on hydrocarbon and their synergistic effect [J]. Microbiology, 2002, 29(4): 55 - 58.
- [10] Jing L, Xie S Q, Gu Z L, et al. Isolation and Identification of lubricating oil - degrading strains and their degradation capability[J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol, 1999, (5S): 127 - 129.
- [11] Xing D F, Ren N Q, Q B Li, et al. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses waste water[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 2006, 56(4): 755 - 760.

Analysis of Bio-Hydrogen Production Capacity of the Cellulose Degradation by *Cellulolyticum* sp. *X₉* and *Ethanoigenens Harbinense* *B₄₉*

BAO Hongxu, REN Nanqi, WANG Aijie

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

Abstract: As advanced renewable energy, hydrogen is attracted more and more attention. Corn stalks are produced in huge amount throughout the world, which could serve as ideal raw materials for fermentative bio-hydrogen production. In this study, *Cellulolyticum* sp. *X₉* and *Ethanoigenens harbinense* *B₄₉*, anaerobic high efficiency cellulose degrading and hydrogen producing bacterium, were isolated from a continuous-flow H_2 producing reactor (ZL92114474. 1). The compound bacteria was more preponderant than *X₉* or *B₄₉* for fermentative bio-hydrogen production. The conditions of fermentative bio-hydrogen production are: inoculum ratio 1:1, inoculum size 10 %, temperature 40.0 °C, mixed culture time 24 h. Experimental results showed that compound strain *X₉* and *B₄₉* has high hydrogen yield (Y_{H_2}) of 1530 ml/L and corn stalks degradation degree of 61.8 % feeding with pre-treatment corn stalks. This indicated that compound bacteria *Cellulolyticum* sp. *X₉* and *Ethanoigenens harbinense* *B₄₉* has great potential for fermentative H_2 production from corn stalks after effective pretreatment.

Key words: bio-hydrogen; multiple bacteria; corn stalks; simultaneous fermentation; *Cellulolyticum* sp. *X₉*; *Ethanoigenens harbinense* *B₄₉*; synergistic effect