

文章编号:1006-7736(2008)02-0041-04

预处理方法对细菌降解玉米秸秆产氢能力的影响^{*}

包红旭,王爱杰,任南琪

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院,哈尔滨 150090)

摘要:为提高细菌降解玉米秸秆产氢能力,实验研究了酸化汽爆预处理、硫酸预处理、氢氧化钠预处理和氨水预处理 4 种预处理方法对细菌 *Clostridium* sp. X₉ 降解玉米秸秆发酵产氢能力的影响。结果表明,酸化汽爆为最佳的预处理方式。在酸化汽爆预处理条件为硫酸体积分数 1%、汽爆温度 121 和汽爆时间 2 h 时,纤维素降解产氢细菌 *Clostridium* sp. X₉ 利用酸化汽爆玉米秸秆产氢获得的最大产氢率和玉米秸秆降解率分别为 6.4 mmol/g 和 47.8%。液相代谢末端产物主要为丁酸、乙酸和乙醇。

关键词:生物制氢;玉米秸秆;预处理;产氢细菌;降解

中图分类号:S216

文献标志码:A

Effects of pretreatment methods on bio-hydrogen production from corn stalk by *Clostridium* sp. X₉

BAO Hong-xu, WANG Ai-jie, REN Nan-qi

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

Abstract: Four different pretreatment methods including steam explosion pretreatment, H₂SO₄ pretreatment, NaOH pretreatment and NH₃·H₂O pretreatment were tested to improve bio-hydrogen production from corn stalk. *Clostridium* sp. X₉ was used to investigate H₂ production directly from corn stalks fermentation. Results show that steam explosion pretreatment is the best one. Under the optimal pretreatment conditions ((H₂SO₄) = 1%, 121, 2 h), the maximum yield of H₂ is 6.4 mmol/g and degradation rate of corn stalk is 47.8%. The liquid end-products mainly contain butyrate, acetate and ethanol.

Key words: bio-hydrogen; corn stalks; pretreatment; H₂-producing bacteria; degradation

0 引言

氢气是一种无二次污染物和环境友好的新兴能源。发酵法生物制氢技术以其可以有效利用生物质能源,减少农业废弃物对环境污染等特点已成为可再生能源领域的一个研究热点^[1]。现阶段研究工作主要集中在利用简单底物(单糖类)进行发酵产氢^[2]。研究表明,有的微生物也可以利用富含纤维素和半纤维素等复杂大分子的生物质作为发酵产氢的底物^[3-4],但菌种来源大多集中在堆肥和活性污泥等混合菌^[5-6]。玉米秸秆是一类来源广泛的木质纤维素原料,但玉米秸秆的成分复杂且结构紧密,很难被细菌直接降解,从而影响细菌利用其发酵产物进行产氢的效果。为此,必须对玉米秸秆进行预处理,不同的预处理方法由于其作用原理不同,必然会对玉米秸秆的降解效果和对细菌发酵产氢能力产生不同的影响^[7]。本文选取具有代表性的酸化汽爆预处理、硫酸预处理、氢氧化钠预处理和氨水预处理 4 种预处理方法,研究其对细菌 X₉ 利用玉米秸秆发酵产氢能力的影响。

1 材料与方法

1.1 玉米秸秆的来源和预处理

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。

(1) 酸化汽爆预处理

称取 15 g 秸秆粉末置于 500 mL 瓶中,并以固

* 收稿日期:2008-01-06.

基金项目:国家“九七三”重点基础发展规划项目(G2000026402);国家自然科学基金资助项目(30470054).

作者简介:包红旭(1976-),男,辽宁本溪人,博士研究生,E-mail:baohongxu@hit.edu.cn;

任南琪(1959-),男,黑龙江哈尔滨人,长江学者特聘教授,博士生导师,E-mail:rnq@hit.edu.cn.

液比 1 g 10 mL (秸秆粉末与硫酸水溶液) 的比例 (下同), 向瓶中加入体积分数为 1% 的硫酸水溶液, 混匀. 将瓶口密封, 置于高压锅内 (121 °C), 分别汽爆 1、2、3 h. 汽爆完成后, 高压锅温度降至 90 °C 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 为 6.5~7.0, 然后于 80 °C 烘干至恒重.

(2) 硫酸预处理

配制质量分数为 0.2%、0.5%、1.0% 的 H₂SO₄ 溶液, 固液比为 1:10, 室温浸泡 24 h; 处理后的玉米秸秆用水冲洗至 pH 为 6.5~7.0, 然后于 80 °C 烘干至恒重.

(3) 氢氧化钠预处理

配制质量分数为 0.5%、1.0%、2.0% 的 NaOH 溶液, 固液比为 1:10, 室温浸泡 24 h; 处理后的玉米秸秆用水冲洗至 pH 为 6.5~7.0, 然后于 80 °C 烘干至恒重.

(4) 氨水预处理

配制质量分数为 2.0%、5.0%、10.0% 的氨水溶液, 固液比为 1:10, 室温浸泡 24 h; 处理后的玉米秸秆用水冲洗至 pH 为 6.5~7.0, 然后于 80 °C 烘干至恒重.

1.2 菌种来源和培养基的配制

实验用菌株 *Clostridium* sp. X₉ (NCBI 注册号为 EU434651) 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, 对细菌 X₉ 的 16S rDNA 测序表明其很有可能是一个新种, 暂命名为 *Clostridium* sp. X₉, X₉ 是一株具有同步降解纤维素发酵产氢的新菌 (ZL200710071696.7), 其发酵类型为丁酸型.

细菌 X₉ 培养基的制备和实验操作采用改进的 Hungate 厌氧滚管技术^[8], 以高纯氮气为气相, 35 °C 常规培养.

液体培养基 (g/L) 成分如下: 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 1 000 mL. 培养基 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 实验装置

发酵产氢实验装置如图 1 所示. 将实验菌株接种于厌氧培养瓶中, 置于恒温振荡器中, 40 °C 下振荡培养.

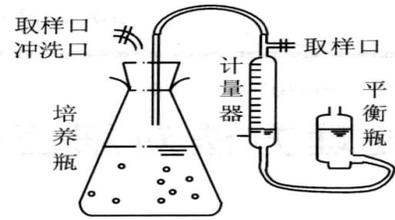


图 1 发酵产氢间歇实验装置

1.4 方法

1.4.1 液相代谢末端产物的分析

采用 GC122 型气相色谱仪分析发酵液相末端产物中挥发酸和醇类. 取 1 mL 培养液, 离心 4 000 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, 流速为 60 mL/min, 氢气流速为 50 mL/min, 空气流速为 490 mL/min, 汽化室 210 °C, 柱和检测室 190 °C. 氢气采用 SC 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 °C.

1.4.2 产氢能力的计算和玉米秸秆降解率的测定

$$Y_{H_2/S} = \text{累计产氢摩尔量} / \text{底物利用质量}$$

其中: $Y_{H_2/S}$ 为产氢率 (mol/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 玉米秸秆降解效率和氢气产量

菌株 X₉ 的接种量为 5 mL, 分别接种到经过 4 种不同预处理的玉米秸秆基质中, 各基质的底物浓度均为 15 g/L, 然后置于恒温振荡器中, 40 °C 下振荡培养.

图 2~5 为 4 种预处理方法对菌株 X₉ 降解玉米秸秆发酵产氢的产氢率和玉米秸秆降解率的影响. 可以看出, 酸化汽爆 (2 h) 预处理条件下, 菌株 X₉ 降解玉米秸秆产氢的能力较强, 其产氢率 ($Y_{H_2/S}$) 和玉米秸秆降解率分别为 6.4 mmol/g 和 47.8%; 在 H₂SO₄ (0.5%) 预处理条件下, 其 $Y_{H_2/S}$ 和玉米秸秆降解率分别为 5.3 mmol/g 和 38.5%; 在 NH₃·H₂O (2.0%) 预处理条件下, 其 $Y_{H_2/S}$ 和玉米秸秆降解率分别为 3.7 mmol/g 和 32.5%; 在 NaOH (1.0%) 预处理条件下, 其 $Y_{H_2/S}$ 和玉米秸秆降解率分别为 2.8

mmol/g 和 45.0%。对比 4 种预处理方法,酸化汽爆(2 h)为最佳的玉米秸秆预处理方法。

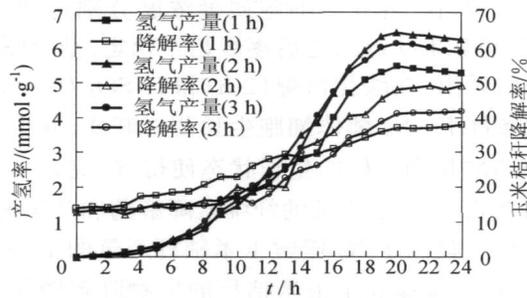


图 2 酸化汽爆预处理玉米秸秆的产氢率和降解率

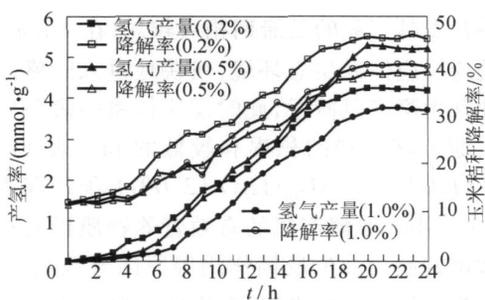


图 3 H₂SO₄ 预处理玉米秸秆的产氢率和降解率

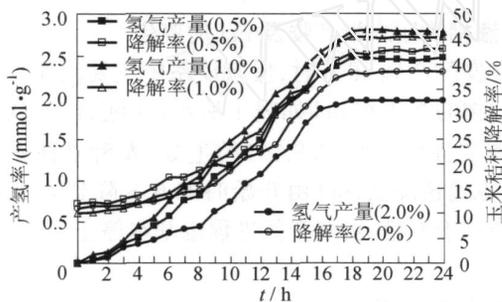


图 4 NaOH 预处理玉米秸秆的产氢率和降解率

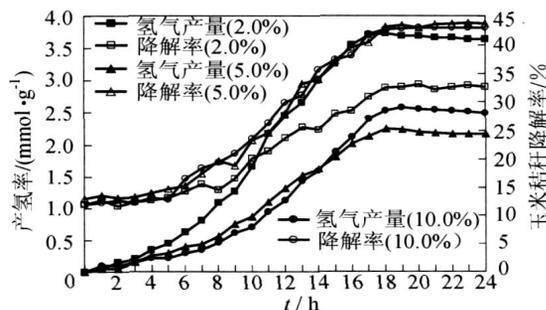


图 5 NH₃·H₂O 预处理玉米秸秆的产氢率和降解率

由图 2~5 还可以看出,采取酸化汽爆(2 h)和 H₂SO₄(0.5%)两种预处理方法可获得较理想的产氢率和玉米秸秆降解率,菌株 X₉表现出良好的降解纤维素产氢能力。不同的是,酸化汽爆预处理过程只需要 2 h,而 H₂SO₄ 预处理时间却需要 24 h。采用酸

化汽爆预处理方法时其产氢率较高且产氢过程稳定,玉米秸秆的降解率也较高,这是由于玉米秸秆在酸化后进行的汽爆处理过程中,高温高压水蒸气渗入到玉米秸秆纤维内部,通过降压放热,玉米秸秆纤维被内含水蒸气产生的巨大爆破力、机械摩擦与碰撞力压碎。汽爆对玉米秸秆纤维的物理结构和化学组成都产生了一系列的影响:处理后纤维之间的空隙率增加,内部的网状结构变得较为松散,更有利于菌株 X₉ 与玉米秸秆纤维的接触,从而使玉米秸秆降解糖化的活性和发酵产氢的能力都得到大幅度提高。

预处理过程中在 H₂SO₄ 的作用下,玉米秸秆纤维的糖苷键、酯键等连接键发生水解,使玉米秸秆纤维的网状结构疏松,易于渗入,可提高菌株 X₉ 产生的纤维素酶对纤维素的可及度。另外, H₂SO₄ 将部分半纤维素水解后,玉米秸秆内部产生一些孔穴,酶反应的结合点数量增加,使得 X₉ 更有利于对玉米秸秆纤维进行酶解糖化作用,进而提高了其发酵产氢的能力。此外,在酸化汽爆预处理条件下,预处理的温度比单独 H₂SO₄ 预处理时有很大的提高,从 H₂SO₄ 预处理的室温提高到 121℃,使得具有细胞结构的玉米秸秆纤维在高温、高压介质下气相蒸煮,纤维素和半纤维素发生一定程度降解,生成可溶性糖。同时由于吸水膨胀,大量高温水分子对纤维素链的冲击作用,使链分子间的氢键易于破坏而产生新的游离羟基,且高温高压的环境也可破坏木质素与碳水化合物的连接键(醚键和氢键等),木质素本身产生热软化,使复合胞间层的木质素软化和部分降解。从而削弱了纤维间的黏结,并产生纤维素链的类酸性降解、热降解和物理断裂,为爆破过程提供选择性的机械分离,使物料从胞间层解离成单个纤维细胞,从而有利于提高菌株 X₉ 利用其发酵产氢的能力^[9]。

图 4、5 说明在 NaOH(1.0%) 和 NH₃·H₂O(2.0%) 预处理条件下,其产氢率和玉米秸秆降解率均不理想。究其原因,一方面虽然 NaOH 和 NH₃·H₂O 预处理都具有较强的脱木质素和降低结晶度的能力,并在一定程度上使木质素的结构裂解,半纤维素部分溶解,纤维素因水化作用而膨胀,纤维素的结晶度也有所降低,但在脱木质素的同时,纤维素和半纤维素也被分解,致使损失太多;另一方面,经过 NaOH 和 NH₃·H₂O 预处理后的玉米秸秆可能残留一些毒性物质,其对菌株 X₉ 的生长和发酵产氢活性都可能产生了一定的抑制作用,从而降低了菌株 X₉

发酵产氢的能力^[10]。

2.2 发酵产氢体系中还原糖的积累和生物量变化

由图 6 可见,无论采用哪种预处理方法,发酵产氢体系中还原糖基本没有积累的过程,都是从原有预处理后的还原糖水平随着发酵产氢时间的推移而迅速减少。在 4 h 以后体系中基本检测不到还原糖,表明在发酵产氢体系中伴随着降解玉米秸秆产生的还原糖被菌株 X_9 利用进行菌体生长合成代谢和产能代谢,从而反映出整个过程中基本没有出现还原糖的积累。

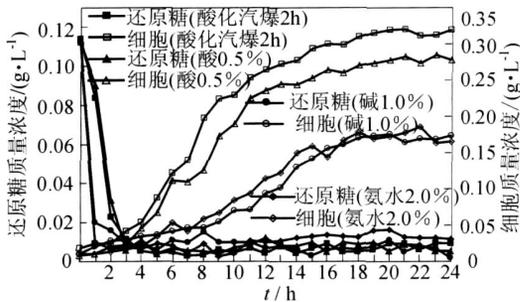


图 6 不同方法预处理玉米秸秆发酵产氢过程中还原糖和细胞质量浓度

图 6 也表明,在菌株 X_9 分别利用 4 种不同预处理方法进行玉米秸秆发酵产氢的过程中, X_9 的菌体细胞浓度随着发酵产氢时间的增加而逐步增大,在达到一定质量浓度后逐步趋于稳定。相应于玉米秸秆的降解和产氢过程变化, X_9 的菌体细胞生长呈现出从延滞期 对数生长期 稳定期的变化趋势。在酸化汽爆 (2 h) 和 H_2SO_4 (0.5%) 预处理条件下, 20 h 时细胞浓

度分别达到 0.315 g/L 和 0.273 g/L,之后逐步趋于稳定;在 NaOH (1.0%) 和 $NH_3 \cdot H_2O$ (2.0%) 预处理条件下,其在 20 h 时细胞质量浓度分别达到 0.173 g/L 和 0.169 g/L,之后逐步趋于稳定。结合图 2~5 可以看出,在酸化汽爆 (2 h) 和 H_2SO_4 (0.5%) 预处理条件下, X_9 菌体细胞生长相对旺盛,其生物量的快速增长和良好的生长状态使得 X_9 完善了自身的酶系统,产生了大量的纤维素降解酶和产氢酶,很大程度上提高了 X_9 降解玉米秸秆产氢的生物活性,从而进一步提高了玉米秸秆的生物降解糖化水平和发酵产氢能力。从图 6 中还可以看到, X_9 降解玉米秸秆发酵产氢的延滞期相对较短,在 4 h 后 X_9 逐步适应反应体系生态环境,较快地进入旺盛的生长代谢和发酵产氢阶段,此时反应体系中表现出大量的代谢末端产物的积累和较低的 pH (表 1)。在 NaOH (1.0%) 和 $NH_3 \cdot H_2O$ (2.0%) 预处理条件下,由于可用于发酵产氢的有效营养物质损失和预处理残留抑制物质的反馈作用等原因导致细菌 X_9 的生物量增长速度缓慢,从而影响了其发酵产氢的能力。

2.3 液相代谢末端产物及 pH 的变化

在发酵产氢 20 h 时,反应体系中主要液相代谢末端产物的组成和 pH 如表 1 所示。伴随着 X_9 代谢产物挥发性脂肪酸 (VFAS) 的生成,发酵液体系的 pH 值也迅速降低, pH 由开始时的 6.8 降到 4.3,随后逐步趋于平稳,发酵产氢进程也基本停止。

表 1 发酵产氢液相代谢末端产物的主要组成和 pH

预处理方法	乙醇/(mg L ⁻¹)	乙酸/(mg L ⁻¹)	丁酸/(mg L ⁻¹)	pH
酸化汽爆 (2 h)	47.0236	963.6582	1642.0231	4.3
H_2SO_4 (0.5%)	56.0012	879.3204	1435.4523	4.7
NaOH (1.0%)	26.2360	523.4130	726.2013	5.2
$NH_3 \cdot H_2O$ (2.0%)	42.5690	612.4516	684.4423	5.4

发酵液体系中的 pH 是影响 X_9 降解玉米秸秆发挥糖化代谢功能和产氢能力的重要生态因子之一。一方面 pH 的变化可以引起 X_9 细胞膜电荷变化和纤维素降解酶、产氢酶的活性及稳定性。酶的基本成分是蛋白质,是具有解离基团的两性蛋白质,因此 X_9 的酶系统只有在一定的 pH 范围内才是稳定的。低于这个 pH 范围,酶就变得不稳定,易变性失活。另外, pH 还能影响酶分子的活性中心上有关基团的解离或底物的解离,影响了酶与底物的结合,从而影响酶的活性,以及对营养物的吸收和对玉米秸秆糖化代谢过程。另一方面, pH 的变化也将影响透过

X_9 细胞膜的有机酸在细胞内部重新电离,改变胞内 pH,影响降解玉米秸秆发酵产氢生化反应的进行以及 ATP 的合成。同时 pH 的变化直接影响产氢代谢中 NADH/NAD⁺ 的循环再生和动态平衡,影响甚至改变发酵产氢 NADH 的代谢途径,进而反过来影响反应体系中代谢末端产物的组成和含量以及氢气的生成。通过实验可知,过低的 pH 会对 X_9 降解玉米秸秆发酵产氢产生抑制作用,导致 X_9 降解玉米秸秆糖化代谢活性和产氢能力的下降。

(下转第 52 页)

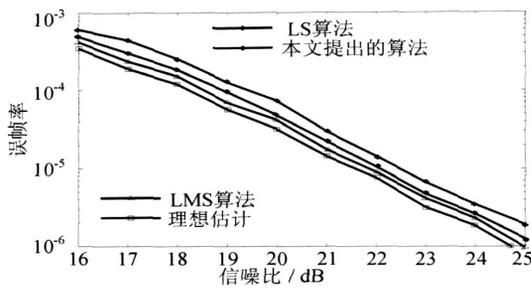


图 4 $f_d = 60$ Hz 时各种算法的 BER - SNR 曲线

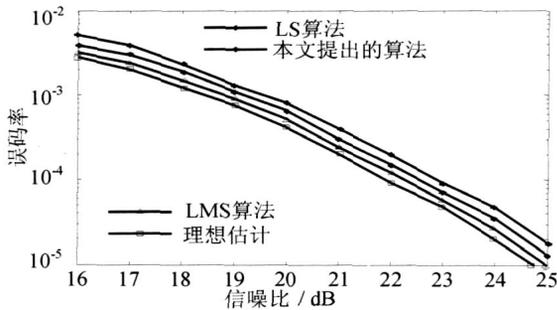


图 5 $f_d = 360$ Hz 时各种算法的 BER - SNR 曲线

Broadband MIMO - OFDM wireless communications [J].
Proceedings of IEEE, 2006, 92(2) : 271-294.

- [2] KOFFMAN I, ROMAN V. Broadband wireless access solutions based on OFDM access in IEEE 802.16 [J]. IEEE Communications Magazine, 2006, 40(4) : 96-103.
- [3] WON J G, KYUNG P H, YONG C S. An efficient channel estimation technique for OFDM systems with transmitter diversity [J]. IEICE Trans Commun, 2002, E84 - B (4) : 967-974.
- [4] DUBUC C, STARKS D, CREASY T, et al. A MIMO - OFDM prototype for next-generation wireless WANs [J]. IEEE Commun Mag, 2004, 42(12) : 82-87.
- [5] SHIN M, LEE H, LEE C. Enhanced channel-estimation technique for MIMO-OFDM systems [J]. IEEE Trans Veh Technol, 2004, 53(1) : 261-265.
- [6] MIAO H L, MARKKU J. Space-time channel estimation and performance analysis for wireless MIMO - OFDM systems with spatial correlation [J]. IEEE Transactions on Vehicular Technology, 2005, 54(6) : 2003-2016.
- [7] XIE Y, GEORGHIADES C N. Two EM-type channel estimation algorithms for OFDM with transmitter diversity [J]. IEEE Tran Commun, 2003, 51(1) : 106-115.
- [8] Van NEE R, PRASAD R. OFDM for Wireless Multimedia Communications [M]. Boston: ArtechHouse, 2003.
- [9] SCHOU KENS J, RENNEBOOG J. Modeling the noise influence on the Fourier coefficients after a discrete Fourier transform [J]. IEEE Trans Instrumentation and Measurement, 1996, LM - 35 : 278-286.

(上接第 44 页)

参考文献 (References) :

- [1] BARRETO L, MAKIHIRA A, RIAHI K. The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario [J]. Int J Hydrogen Energy, 2003, 28(3) : 267-284.
- [2] WANG Xiang-jing, REN Nan-qi, XIANG Wen-sheng. Magnesium improves hydrogen production by a novel fermentative hydrogen-producing bacterial strain B49 [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2005, 12(2) : 164-169.
- [3] SONG Jia-xiu, REN Nan-qi, XING De-feng. Prospect for inverting cellulose into hydrogen by biological technology [J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2007, 28(1) : 97-101.
- [4] ALAWI M A. Biohydrogen Production by Anaerobic Biological Fermentation of Agriculture Waste [M]. Holand: Springer Netherlands, 2007 : 177-185.
- [5] ZHANG Mao-lin, FAN Yao-ting, YAN Xing. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures [J]. Biomass Bioenergy, 2007, 31(4) : 250-254.
- [6] FANA Y T, ZHANG A Y H, ZHANG S F. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(3) : 500-505.
- [7] LI Xiang, WEI Xiur-ying, DONG Ren-jie. A study of degradat ion efficiency of corn straw p retreated with different methods [J]. Transact ions of the CSAE, 2006, 22(1) : 110-116.
- [8] HUNGATE R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes [C] // Methods in Microbiology. New York: Academic Press, 1969 : 117-132.
- [9] KIM T H, KIM J S. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia [J]. Bioresource Technology, 2003, 90 : 39-47.
- [10] YANG Dong-yan, LI Xiur-jin, GAO Zhi-jian, et al. Improving biogas production of corn stalk through chemical and biological pretreatment: a preliminary comparison study [J]. Transact ions of the CSAE, 2003, 19(5) : 209-213.