

嗜热厌氧菌共培养发酵玉米秸秆产氢的研究

黎霞*, 邹淑琦, 徐延亮, 贺静

(农业农村部成都沼气科学研究所, 农业农村部农村可再生能源开发利用重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 氢能是对环境无害且可以替代化石燃料的可持续性能源。利用嗜热厌氧菌暗发酵木质纤维素生产氢气是一种极具潜力的生物制氢技术, 具有清洁、高效和可再生的优势。构建解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌共培养体系, 考察两菌株接种比例、总接种量和底物浓度对玉米秸秆发酵产氢的影响。实验结果表明, 在发酵体系初始 pH 值 7.0, 培养温度 60 °C 条件下, 当解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌接种比例为 3:2, 菌种总接种量为 6%, 秸秆浓度为 15 g·L⁻¹ 时, 体系产氢能力最强。此时, 发酵体系产氢量累积达到 65.6 mL·g⁻¹ 秸秆, 氢气含量为 46.9%, 最大产氢速率为 1.47 mL·g⁻¹h⁻¹。

关键词: 嗜热厌氧菌; 秸秆; 发酵产氢; 产氢分析

中图分类号: S216.4; X712 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2024)01-0019-04

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.2024010019

A Study on Hydrogen Production from Corn Stran by Co-culture of Thermophilic Anaerobic Bacteria / LI Xia*, ZOU Shuqi, XU Yanliang, HE Jing / (Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China)

Abstract: Hydrogen energy is a sustainable energy source that is environmentally friendly and can replace fossil fuels. The use of thermophilic anaerobic bacteria for dark fermentation of lignocellulose to produce hydrogen is a highly promising biological hydrogen production technology, with the advantages of cleanliness, efficiency, and renewability. This study constructed a co-culture system of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, and then investigated effects of inoculation ratio of the two strains, total inoculation amount, and substrate concentration on hydrogen production during corn straw fermentation. The experimental results showed that under the conditions of initial pH 7.0 and cultivation temperature of 60 °C, hydrogen production capacity of fermentation system was strongest when inoculation ratio of the two strains was 3:2, total inoculation amount was 6%, and straw concentration was 15 g·L⁻¹. Under this condition, the hydrogen production reached 65.6 mL·g⁻¹-straw, and the hydrogen content was 46.9%, the maximum hydrogen production rate achieved 1.47 mL·g⁻¹h⁻¹.

Key words: thermophilic anaerobic bacteria; corn straw; fermentative hydrogen production; hydrogen production evaluation

石化资源的大量消耗和逐渐枯竭所引起的能源危机问题, 以及其燃烧所造成的环境污染和气候变化等问题日渐严重, 因此, 开发可持续利用的替代能源迫在眉睫^[1-2]。氢能由于其热值高、燃烧无污染等特征, 是全球公认的对环境无害且可以替代化石燃料的可持续性能源^[3]。

木质纤维素是地球上最丰富的可再生生物质资源, 主要成分是纤维素、半纤维素和木质素, 其中纤维素和半纤维素都是可发酵性碳水化合物。利用产

氢菌通过生物发酵将秸秆的纤维素和半纤维素转化为氢气, 可有效地将废弃物处理和可再生能源生产有机结合起来, 因此以秸秆等木质纤维素材料生产生物燃料受到越来越多的关注^[4]。

利用厌氧微生物暗发酵生物质制备氢气, 其发酵过程不依赖于光照, 反应温和, 产氢率高, 可利用多种固体废弃物和废水产氢, 兼具治污和产能等多重优越性。降解纤维素产氢细菌是影响木质纤维素发酵产氢效果的关键因素之一。目前, 能够直接降

收稿日期: 2023-06-29

项目来源: 四川省科技厅重点研发项目(2022YFS0479); 四川省区域创新合作项目(2023YFQ0030); 国家现代农业产业技术体系四川创新团队项目(ccxt-2020-7)。

作者简介: 黎霞(1979-), 女, 博士, 主要从事厌氧微生物及生物质废弃物资源化利用研究等工作, E-mail: lixia@caas.cn

通信作者: 黎霞, E-mail: lixia@caas.cn

解纤维素产氢的兼性厌氧菌或严格厌氧菌种类较少,主要包括梭菌属(*Clostridium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、热解纤维杆菌属(*Caldicellulosiruptor*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和嗜热厌氧菌属(*Thermoanaerobacterium*)等^[5]。据目前的研究报道,为了实现高效的氢气生产,需要开发一种协同共培养工艺,优化纤维素分解和制氢的组合微生物菌株,以同时提高木质纤维素的分解和氢气产生^[6]。解糖热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)具有丰富的、耐高温的纤维素酶,能高效降解未预处理的木质纤维素,并且能同时发酵 C5 和 C6 单糖,产氢得率极高(4 mol H₂·mol⁻¹葡萄糖),是一株极具生物制氢潜力的嗜热菌^[7]。热解糖厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)是一种高效产氢菌,能同时将木糖和葡萄糖转化为氢气,氢气产率达到 2.23 ~ 2.37 mol H₂·mol⁻¹糖^[8]。然而,这两株菌共培养发酵制氢还鲜有报道,其共培养发酵秸秆的工艺和产氢特性还不清楚。

本研究利用解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌共培养,开展两株菌株接种比例、总接种量和底物浓度对玉米秸秆联合生物发酵产氢的影响研究,得到产氢体系的最优发酵参数,并分析了最优条件下玉米秸秆的产氢趋势及代谢产物特征,以期对玉米秸秆暗发酵产氢技术的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株信息及实验方法

解糖热解纤维素菌(DSM 8903)购自德国微生物菌种保藏中心,热解糖厌氧杆菌购自中国普通微生物保藏管理中心(CGMCC 1.5209)。培养两株菌采用的基础培养基成分如下(L⁻¹):(NH₄)₂Cl 0.9 g, NaCl 0.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.4 g, CaCl₂·2H₂O 0.01 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄·3H₂O 1 g, FeCl₃·6H₂O (0.1% w/v in 0.2 N HCl) 2 mL, 酵母提取物 1 g, 蛋白胨 2 g, 半胱氨酸 0.5 g, 刃天青 0.001 g。

上述培养基各成分充分溶解于水,在持续通入氮气 30 分钟的情况下煮沸。待培养基冷却后分装 50 mL 至 120 mL 血清瓶,用丁基胶塞和铝盖密封,于 118 °C, 20 分钟高温灭菌。此外,活化菌种时在基础培养基中添加纤维二糖(1 g·L⁻¹)为解糖热解纤维素菌提供碳源,添加葡萄糖(2 g·L⁻¹)为热解糖厌氧杆菌提供碳源,产氢试验则采用玉米秸秆作为碳源。最终培养基的初始 pH 值调整至 7.0。

采集成熟期的玉米秸秆,自然晾干后用微型粉

碎机粉碎至长度 0.2 ~ 0.5 cm。秸秆主要成分包括:半纤维素,30.2%;纤维素,39.6%;木质素,10.5%,灰分,1.2%,可溶性糖 3.1%。

1.2 试验设计方案

设定解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌比例分别为 1:0, 1:1, 2:1, 2:3, 3:2, 3:1 和 1:2, 总接种量为 4% (v/v), 玉米秸秆添加量为 10 g·L⁻¹, 发酵温度为 60 °C, pH 值为 7.0, 研究菌株不同接种比例对秸秆产氢的影响。设定总接种量分别为 1%, 2%, 4%, 6% 和 8% (v/v), 解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌比例为 1:1, 玉米秸秆添加量为 10 g·L⁻¹, 发酵温度为 60 °C, pH 值为 7.0, 研究菌株不同接种量对秸秆产氢的影响。设定秸秆添加浓度分别为 5 g·L⁻¹, 7.5 g·L⁻¹, 10 g·L⁻¹, 15 g·L⁻¹ 和 20 g·L⁻¹, 解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌比例为 1:1, 总接种量为 4% (v/v), 发酵温度为 60 °C, pH 值为 7.0, 研究不同底物浓度对秸秆产氢的影响。

1.3 分析方法

采用安捷伦气相色谱仪(7820A)测定氢气含量,色谱柱为 Porapak Q 不锈钢填充柱,柱温 50 °C;热导检测器,检测温度 150 °C;进样量为 0.2 mL,进样口温度 150 °C;载气为氮气,流量为 30 mL·min⁻¹。采用安捷伦气相色谱仪(7890A)测定挥发性脂肪酸和乙醇含量,色谱柱为熔融二氧化硅毛细管柱(30 m × 320 μm × 0.25 μm),FID 检测器,入口温度为 210 °C,柱流速为 2.1 mL·min⁻¹,探测器温度为 250 °C。还原糖含量采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂法测定。乳酸含量通过高效液相色谱法(HPLC)测定^[9]。

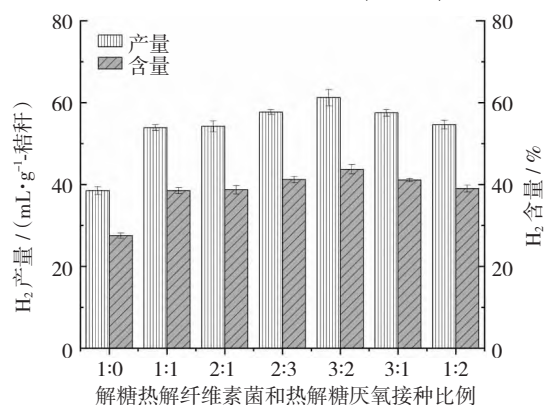


图1 菌株不同接种比例对玉米秸秆 H₂ 产量和 H₂ 含量的影响

2 结果与讨论

2.1 菌株接种比例对玉米秸秆产氢的影响

设置解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌不同

的接种比例,比较其对玉米秸秆 H_2 产量和 H_2 含量的影响。热解糖厌氧杆菌不能直接利用纤维素产生 H_2 ,因此只设置了解糖热解纤维素菌的单菌株发酵试验。

如图 1 所示,单菌株发酵体系氢气含量为 27.5%,而混合菌发酵体系的氢气含量普遍较高,达到 38.5%~43.7%。其中,当解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌的接种比例为 3:2 时,发酵体系的氢气含量达到最大值(43.7%)。发酵结束时,解糖热解纤维素菌发酵体系的产氢量为 $38.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆,混合菌发酵体系的产氢量为 $53.9 \sim 61.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆。当解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌的接种比例为 3:2 时,产氢量达到最大($61.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆),此时与单菌株发酵体系相比,混合菌发酵体系产氢量提高了 59%。上述结果表明,两株菌混合发酵能显著提高发酵体系的产氢量和氢气含量,解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌接种比例为 3:2 是发酵体系的最优选择。

2.2 菌株接种量对玉米秸秆产氢的影响

设置解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌在发酵体系中的不同接种量,比较其对玉米秸秆 H_2 产量和 H_2 含量的影响。

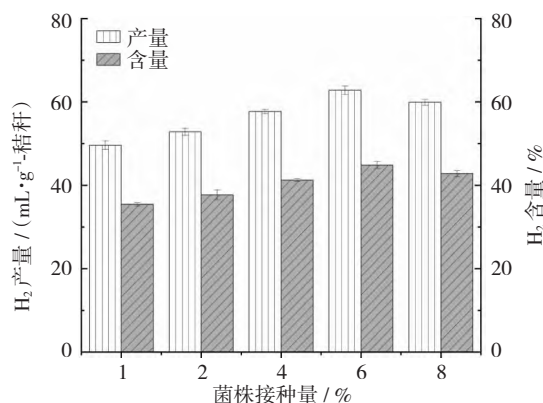


图 2 菌株不同接种量对玉米秸秆 H_2 产量和 H_2 含量的影响

图 2 实验结果表明,在菌株接种量为 1%~6% 范围时,发酵体系的产氢量和氢气含量与接种量呈正相关,其随着接种量的增加而升高。当接种量为 6% 时,发酵体系产氢量达到最大,为 $62.8 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆。此时,发酵体系的氢气含量也达到最高值(44.8%)。然而,当菌株接种量提高至 8% 时,发酵体系的产氢量和氢气含量略有下降,分别降低至 $59.8 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆和 42.7%。菌株接种量的大小会影响微生物的生长周期,在一定范围内,接种量的增加可以促进发酵效率的提升,缩短微生物发酵周期。但当接种量超过了合适的范围,反而会因营养物质

消耗和生长代谢抑制等因素而导致发酵效率降低^[10]。综上,解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌的总接种量为 6% 是最利于发酵产氢的条件。

2.3 底物浓度对玉米秸秆产氢的影响

设置不同的秸秆底物浓度,比较其对玉米秸秆 H_2 产量和 H_2 含量的影响。

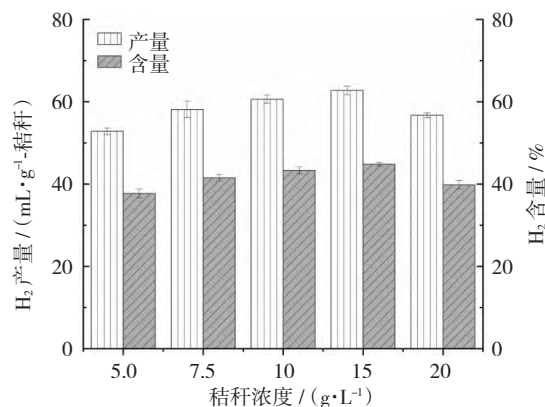


图 3 不同底物浓度对玉米秸秆 H_2 产量和 H_2 含量的影响

如图 3 所示,在底物浓度为 5~15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时,发酵体系的氢气含量随着底物浓度的增加而逐步升高。当底物浓度为 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,发酵体系氢气含量达到最大(44.6%)。随着底物浓度提高至 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,发酵体系的氢气含量降低至 39.8%。发酵体系的产氢量随着底物浓度的变化也呈现出相同的趋势。在底物浓度为 5~15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时,发酵体系的产氢量随着秸秆浓度的增加而升高。当底物浓度达到 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,发酵体系产氢量达到最大,为 $62.7 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆,其与底物浓度为 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比,产氢量分别提高 18.7%, 7.9% 和 4.6%。但随着底物浓度达到 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,发酵体系的产氢量下降至 $55.7 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ -秸秆。此时,底物浓度为 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 发酵体系的 pH 值低于 6.0,体系产氢量的降低可能是因为较高浓度的底物降解引起了酸积累,从而使解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌的产氢代谢受到抑制^[11-12]。因此,选择合适的底物浓度是有利于微生物发酵产氢。综上,15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秸秆浓度是发酵体系的最优选择。

2.4 发酵体系的产氢特征及代谢产物分析

单因素实验结果表明,发酵体系最优的工艺条件是解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌接种比例为 3:2,总接种量为 6%,玉米秸秆浓度为 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。进一步地,本研究分析了最优条件下发酵体系的产氢趋势及代谢产物特征。

如图 4 所示,发酵 12~48 h 期间,发酵体系的产氢量快速提升;发酵结束时(96 h),体系产氢量达

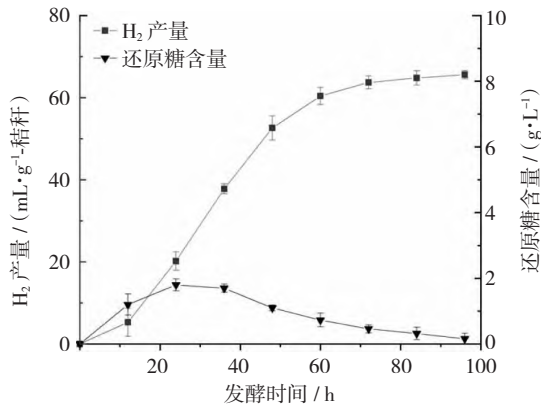


图4 发酵体系的氢气产量变化趋势

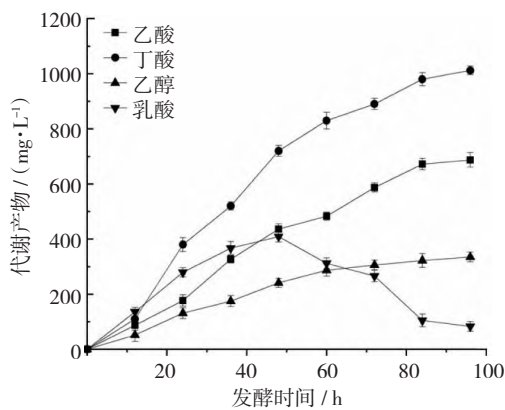


图5 发酵体系的代谢产物变化趋势

到 $65.6 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ -秸秆, 氢气含量达到 46.9% 。发酵 36 h 时, 体系产氢速率达到最大值, 为 $1.47 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。发酵 24 h 时, 还原糖含量累积到 $1.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 随后还原糖被微生物代谢利用产氢, 其含量逐步降低至 $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如图 5 可知, 发酵体系产生的液态代谢产物主要是乙酸、丁酸、乳酸和乙醇。乙酸、丁酸和乙醇含量的变化趋势相同, 随着发酵产氢过程的进行, 乙酸、丁酸和乙醇含量逐步增加。发酵过程结束时, 乙酸、丁酸和乙醇分别累积至 $687 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1012 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $335 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而, 乳酸含量的变化呈现出不同的趋势。在发酵 0~48 h 期间, 乳酸含量逐渐增加至 $409 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。随着发酵产氢过程的进行, 乳酸被微生物代谢利用, 其含量逐步降低至 $83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 结论

本研究利用解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌共培养发酵玉米秸秆产氢, 通过单因素实验确定最佳发酵参数: 解糖热解纤维素菌和热解糖厌氧杆菌接种比例为 3:2, 菌种总接种量为 6% , 秸秆浓度为 $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此条件下, 发酵体系产氢量达到 $65.6 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ -秸秆, 氢气含量为 46.9% , 最大产氢速

率为 $1.47 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。本研究通过构建纤维素分解和制氢的微生物共培养体系, 优化发酵体系产氢工艺参数, 将为玉米秸秆暗发酵产氢技术的研究提供理论参考。

参考文献:

- [1] SHUBA ES, KIFLE D. Microalgae to biofuels 'Promising' alternative and renewable energy, review [J]. *Renew Sustain Energy Rev*, 2018, 81: 743–755.
- [2] UNGLERT M, BOCKEY D, BOFINGER C, et al. Action areas and the need for research in biofuels [J]. *Fuel*, 2020, 268: 117227.
- [3] BOODHUN BSF, MUDHOO A, KUMAR G, KIM S, et al. Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production [J]. *Int J Hydrog Energy* 2017, 42: 27471–27481.
- [4] ZHU P, ABDELAZIZ OY, HULTEBERG CP, et al. New synthetic approaches to biofuels from lignocellulosic biomass [J]. *Curr Opin Green Sustain Chem*, 2020, 21: 16–21.
- [5] RITUPARNA SAHA, DEBALINA BHATTACHARYA, MAINAK MUKHOPADHYAY. Enhanced production of biohydrogen from lignocellulosic feedstocks using microorganisms: A comprehensive review [J]. *Energy Conversion and Management*, 2022, X (13): 100153.
- [6] QIAN LI, CHUN ZHAO LIU. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2012, 37, 10648–10654.
- [7] 孟冬冬, 张坤迪, 英瑜, 等. 极端嗜热厌氧菌 *Caldicellulosiruptor* 木质纤维素降解研究 [J]. *生物加工过程*, 2014, 12(1): 38–45.
- [8] GUANGLI CAO, NANQI RENA, AIJIE WANG, et al. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2009, 34: 7182–7188.
- [9] LIU Y, YU P, SONG X, et al. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 2927e33.
- [10] JINGRONG CHENG, MINGJUN ZHU. A novel anaerobic co-culture system for bio-hydrogen production from sugarcane bagasse [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 623–631.
- [11] LEI ZHAO, GUANG LI CAO, AI JIE WANG, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of fungal pretreated cornstalk for hydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 145: 103–107.
- [12] 明会会, 张靖楠, 昌行行, 等. 玉米秸秆暗发酵产氢研究 [J]. *云南化工*, 2021, 48(1): 21–25.