

初始底物浓度及 pH 对丁酸梭菌 T4 发酵木糖产氢的影响

邱颀, 许继飞, 任南琪

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: 本研究采用间歇培养方式对丁酸梭菌 T4 发酵木糖进行产氢研究, 考察初始 pH 和初始底物浓度对其产氢特性的影响。结果表明, 菌株 T4 在初始 pH 5.0~8.5 及初始底物浓度 5~40 g/L 时均可以产氢, 其累积产氢量和最大比产氢速率随着 pH 及底物浓度的增加均呈现先增加后减少的趋势。在 pH 6.5 和底物浓度 20 g/L 时, 比产氢速率和累积产氢量达到最大, 分别为 4.26 L/L 和 18.86 mmol-H₂/h g-DCW, 而后随着 pH 或者底物浓度的增加二者均呈现减少的趋势; 在 pH 6.5 和底物浓度 15 g/L 时, 得到最大值比产氢量为 2.17 mol/mol-木糖。而在不同的 pH 下, 发酵产生的液态产物主要是乙酸和丁酸, 其中在 pH 小于 6.0 时, 有少量的丙酸生成, 而在 pH 大于 6.0 时, 则有乙醇生成。

关键词: 发酵产氢, 丁酸梭菌 T4, 木糖, 初始 pH, 底物浓度

Effect of initial substrate concentrations and pH on hydrogen production from xylose with *Clostridium butyricum* T4

Jie Qiu, Jifei Xu, and Nanqi Ren

State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract: We studied the effect of initial pH and substrate concentrations on the conversion of xylose to hydrogen by *Clostridium butyrium* T4 at pH 5.0–8.5 and substrate concentrations 5–40 g/L. The cumulative hydrogen volume and the specific hydrogen production rate increased and then decreased with increasing initial pH or substrate concentrations. At initial pH 6.5 and substrate concentration 20 g/L, the cumulative hydrogen production and the specific hydrogen production rate reached the maximum value of 4.26 L/L and 18.86 mmol-H₂/h g-DCW (dry cell weight).

Keywords: fermentative hydrogen, *Clostridium butyrium* T4, xylose, initial pH, substrate concentration

目前, 全球的能量需求主要都来自于化石燃料, 其需求量占总能量需求的 80%, 这将导致有限的化石燃料在不久的将来被耗尽, 而且化石燃料的利用不可避免地造成严重的环境污染, 开发和利用新能源已经成为科技工作者迫在眉睫的课题^[1,2]。氢以其清洁、高效、安全、可持续的特性, 被视为本世纪

最具发展潜力的清洁能源。制氢方法有很多, 但是相比之下, 生物制氢有其独特的优势。生物制氢技术反应条件温和、能耗低、生物气成分简单(仅生成氢气和二氧化碳), 分离提纯容易, 且可以以废弃的生物质资源或有机废水为原料, 能够妥善地解决能源与环境的矛盾, 因而成为各国科学家聚焦的热点

Received: March 15, 2009; **Accepted:** May 4, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30470054).

Corresponding author: Nanqi Ren. Tel: +86-451-86282110; E-mail: rnq@hit.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30470054)资助。

研究领域^[3-5]。

自然界中大量可再生的木质纤维类生物质丰富且廉价,如果能够解决利用木质纤维素作为原材料最终获取氢气这个关键问题,它将使得获取廉价氢气和实现产业化成为可能。木质纤维素主要由木质素、纤维素和半纤维素组成,纤维素和半纤维素的水解成分主要是单糖和少量的简单聚糖,其中单糖主要是以葡萄糖为主的六碳糖约占 60%~70%,以木糖为主的五碳糖约占 30%~40%^[6,7],其实最理想的是直接利用纤维素和半纤维素进行生物发酵产氢,但是由于现今发现的微生物对纤维素及半纤维的降解速率都很缓慢,不具备实用价值。所以一般需要经过化学或物理处理,将纤维素及半纤维素水解为葡萄糖和木糖等简单的糖类,然后再进行利用。葡萄糖作为一种易发酵且大量存在的单糖,其发酵产氢特性的研究相对成熟;而木糖等五碳糖,由于其主要存在于木质纤维素类生物质之中,因此对其发酵产氢特性方面的研究并未深入^[8,9],尤其对于纯菌发酵木糖产氢特性方面的研究较少^[10-14]。

Clostridium butyrium T4 是一株能够高效利用木糖发酵产氢的细菌,通过研究初始底物浓度和 pH 对产氢菌 *Clostridium butyrium* T4 生长及产氢的影响,有助于了解产氢菌 T4 的产氢特性,以便采取较为合理的培养条件,从而提高其对底物的利用率及产氢效率。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以本实验室分离得到的 *Clostridium butyrium* T4 为试验菌株。所使用木糖为纯度 99% 的化学试剂。

1.2 培养基及条件

液体发酵产氢培养基(L): KH_2PO_4 1.5 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.2 g、 NH_4Cl 0.5 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g、酵母提取物 2.0 g、半胱氨酸 0.5 g、刃天青(0.1%)1.0 mL,木糖根据需要另行添加。产氢发酵试验在温度为 37°C,转速为 135 r/min 的空气浴恒温振荡器内完成。

1.3 试验方法

1.3.1 产氢发酵

采用间歇培养,100 mL 的血清瓶中装有 80 mL 液体发酵培养基,接入产氢菌,反应装置如图 1 所示。

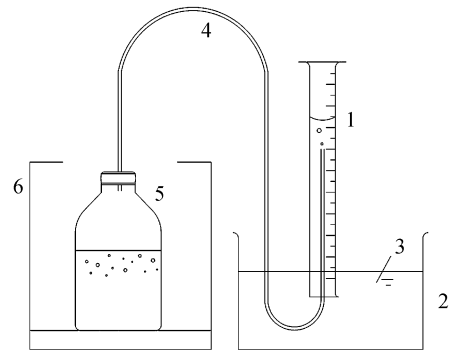


图 1 静态产氢装置

Fig. 1 Schematic of pure batch-culture reactor. 1: gas collector; 2: water tank; 3: water; 4: tube; 5: hydrogen producer; 6: oscillator.

1.3.2 总产气量的测定

用 250 mL 的精密量筒,通过排水法(水的 pH 在 4.0 以下,防止发酵生成的 CO_2 溶解)收集生物发酵产生的气体。

1.3.3 氢气和二氧化碳测定^[15]

使用 SC-2 气相色谱(上海分析仪器厂)仪测定气体的组成,柱长 2 m,担体 TDS01,60~80 目,热导池检测器,不锈钢填充柱,载气氮气,流速 70 mL/min,柱和检测室 150°C。

1.3.4 微生物生长量测定^[15]

将发酵液在 4000 r/min 下离心 10 min,弃去上清,用 pH 7.0 的磷酸缓冲液冲洗 2 次,置于 105°C 下烘干至恒重。

1.3.5 木糖的测定

测定采用 DNS 法^[16]。

1.3.6 产氢量的计算

在一定时间间隔内,以排出倒置量筒内水的体积来表示发酵产生的气体体积。累积产氢量按下述公式计算^[17]:

$$V = V_0 \gamma_i + \sum V_i \gamma_i \quad (1)$$

其中:公式(1)中 V 表示累积产氢量 (mL); V_0 表示反应器液面上空的体积 (mL); V_i 表示第 i 次抽出气体的体积(mL); γ_i 表示第 i 次抽出气体中氢气浓度。

2 结果与讨论

2.1 初始 pH 对菌株 T4 发酵木糖生长及产氢量的影响

试验用 2 mol/L 盐酸或者 2 mol/L 氢氧化钠调

节产氢发酵培养基的初始 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 共 10 个梯度。初始木糖浓度为 10 g/L, 接种量 2%。

图 2 为菌株 T4 在不同初始 pH 时的细菌生长情况及累积产氢量。由图 2 可知, 木糖的利用率、菌体生物量和累积产氢量均随着初始 pH 的增大而呈先增大后减小的趋势。当初始 pH 7.5 时, 木糖利用率最大为 98.7%; 初始 pH 继续增加, 木糖利用率稍有降低, 但均维持在较高水平, 约为 95%。当初始 pH 4.0 时, 菌株 T4 未见有明显生长, 这时由于过低的 pH 已经严重抑制了 T4 的生长, 使 T4 休眠或者死亡。初始 pH 4.5 时, 菌株 T4 虽然可以生长, 但其生物量很小, 仅为 16 mg/L, 并且没有氢气释放出来。初始 pH 6.5 的时候, 累积产氢量最大, 为 3.05 L/L; 初始 pH 大于 6.5 时, 累积产氢量呈减少的趋势, 生物量却继续呈现增加趋势; 在 pH 8.0 时生物量达到最大, 为 660.33 mg/L。这种最佳生长 pH 和最佳产氢 pH 的不一致可能是由于高的碱性环境所致。例如, 当初始 pH 7.0 时的木糖利用率高于初始 pH 6.5 时的木糖利用率, 而产氢量却低于 pH 6.5 的产氢量, 可以得出在此初始 pH 条件下, 更多的木糖用于了其他作用, 而不是用于产氢, 而初始 pH 6.5 时转化的木糖则更多的用于产氢。再者, 当初始 pH 4.5 时, 没有氢气放出, 而此时的干细胞产率为 16 mg/L, 木糖利用率为 8%, 虽然底物有消耗, 但是并未用于产生氢气。这表明菌株 T4 产氢量的多少不仅与其底物利用率和生物量有关, 而且还受到发酵环境的制约。

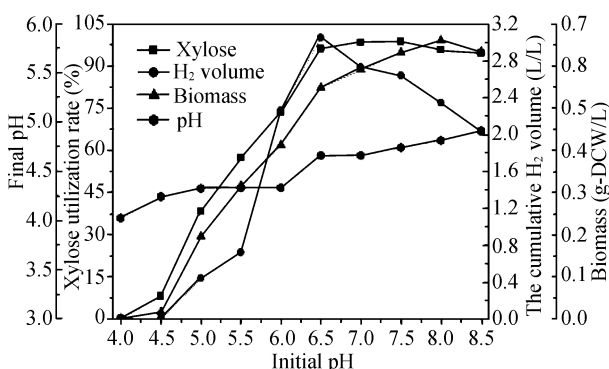


图 2 丁酸梭菌 T4 在不同初始 pH 条件下其木糖利用率、生物量、末端 pH 及累积产氢量

Fig. 2 Effect of initial pH on xylose utilization rate, biomass, final pH and the cumulative H₂ production.

2.2 初始 pH 对菌株 T4 发酵木糖的比产氢速率及氢气含量的影响

图 3 表示菌株 T4 在不同初始 pH 条件下的最大比产氢速率及氢气含量。可以看出, 当初始 pH 7.0 时氢气含量最高, 可达 72.8%, pH 升高或降低, 氢气含量都会降低, 而在初始 pH 6.5 时, 具有最大的比产氢速率, 为 13.85 mmol-H₂/h g-DCW。

2.3 初始 pH 对菌株 T4 发酵木糖的末端产物乙醇及挥发酸产量的影响

图 4 表示菌株 T4 在不同初始 pH 条件下, 发酵产生的乙醇及挥发酸含量的变化。由图 4 可知, *Clostridium butyrium* T4 发酵末端的液态产物主要有乙酸和丁酸, 伴随有少量的乙醇和丙酸。随着 pH 的升高, 发酵产生的乙酸始终保持增加趋势, 而丁酸的量则先增加后减少, 在初始 pH 6.5 时达到最多, 为 1721.75 mg/L。初始 pH 6.0 时是乙醇和丙酸分别开始产生与结束的分水岭, 而丙酸是随着 pH 的增大逐渐减少, 乙醇则是由小到大, 在初始 pH 6.0 时未检测到丙酸, 随着初始 pH 增大, 在 pH 6.5 时, 乙醇开始产生, 在初始 pH 为 8.5 时达到最大为 127.55 mg/L。

2.4 初始底物浓度对菌株 T4 发酵木糖生长及累积产氢量的影响

分别设置产氢发酵培养基的初始底物浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40 g/L 共 8 个梯度。初始 pH 6.56, 接菌量为 2%。

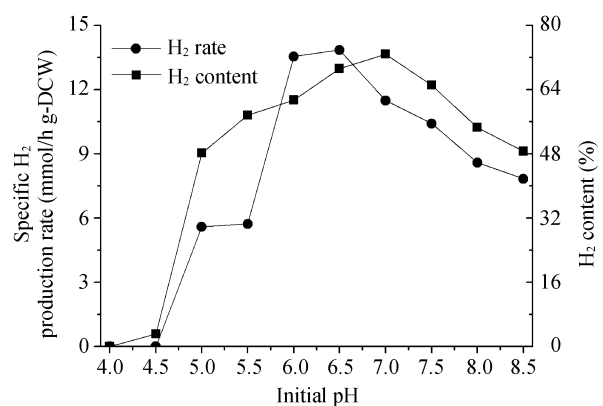


图 3 丁酸梭菌 T4 在不同初始 pH 条件下其最大比产氢速率和氢气含量

Fig. 3 Effect of initial pH on the maximum specific H₂ production rate and H₂ content.

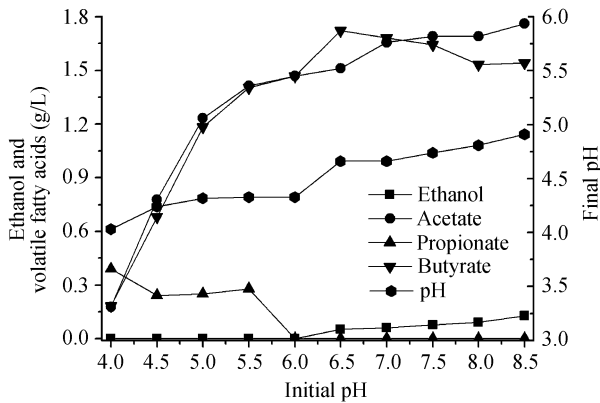


图4 丁酸梭菌 T4 在不同初始 pH 条件下, 发酵末端产物乙醇及挥发酸的变化

Fig. 4 Effect of initial pH on ethanol and volatile fatty acid.

图5为菌株 T4 在不同初始底物浓度时的木糖利用率、生物量及累积产氢量。从图5中可以看出, 随着木糖浓度的增加, 其木糖利用率呈现下降的趋势。当木糖浓度为 5 g/L 时, 其利用率可达 100%; 当木糖浓度增加到 20 g/L 时, 其利用率降低到了 83.4%; 木糖浓度继续增加到 40g/L 时, 木糖的利用率只有 30%。虽然木糖的利用率在高浓度时不断降低, 但其利用量却变化不大, 维持在 10~12 g 之间。菌体生物量和累积产氢量均随着底物浓度的增大先增加后减小, 在木糖浓度为 20 g/L 时达到最大, 分别为 963.9 mg/L 和 4.26 L/L。出现这样的结果一方面是由木糖浓度的不同引起的, 而另一方面则是由于发酵环境 pH 的降低所引起的, 因为 T4 发酵完毕后末端 pH 基本维持在 4.0 左右, 由 2.1 的结果可知, 此时 pH 对菌的生长代谢产生了强烈的抑制作用。

2.5 初始底物浓度对菌株 T4 发酵木糖的最大比产氢速率、氢气含量及比产氢量的影响

图6是 T4 在不同木糖浓度下的最大比产氢速率、最大氢气浓度及比产氢量。最大比产氢速率和比产氢量均随着木糖浓度的增加先增大后减小, 当木糖浓度为 20 g/L 时, 比产氢速率达到最大, 为 18.86 mmol-H₂/h g-DCW; 在木糖浓度 15g/L 时, 有最大的比产氢量 2.17 mol/mol-木糖; 二者在木糖浓度 40 g/L 时都最小, 分别为 6.82 mmol-H₂/h g-DCW 和 0.92 mol/mol-木糖。氢气含量在木糖浓度介于 5~20 g/L 之间时, 都维持在 70% 以上。而随着木糖浓度的增加, 氢气含量逐渐降低。木糖浓度为 40 g/L 时, 氢气含量降到了 40.6%。

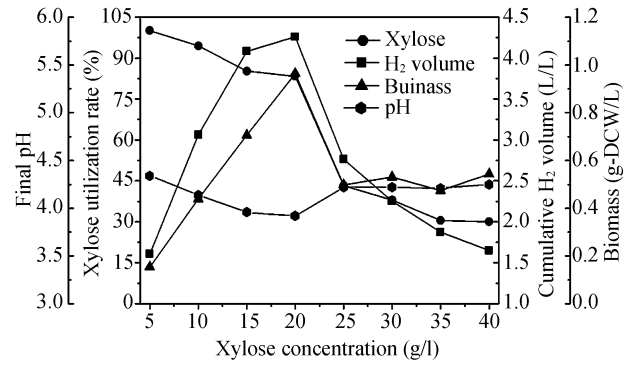


图5 丁酸梭菌 T4 在不同初始底物浓度下其木糖利用率、累积氢气产氢、末端 pH 及生物量

Fig. 5 Effect of xylose concentrations on xylose utilization rate, biomass, final pH and the cumulative H₂ production.

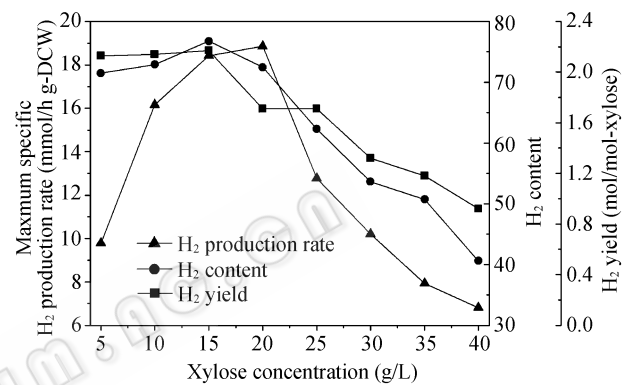


图6 丁酸梭菌 T4 在不同底物浓度下其最大比产氢速率、氢气含量及比产氢量

Fig. 6 Effect of substrate concentrations on the maximum specific H₂ rate, H₂ content and H₂ yield.

3 结论

初始底物浓度和 pH 对丁酸梭菌 T4 利用木糖生长及产氢均具有显著的影响。菌株 T4 的生长及产氢对初始 pH 的要求并不相同, 其最佳生长初始 pH 为 8.0, 而最佳产氢初始 pH 为 6.5, 此时有最大的累积产氢量和比产氢速率, 分别为 3.05 L/L 和 13.85 mmol-H₂/h g-DCW; 当初始 pH 4.0 和 4.5 时, 菌的生长受到严重的抑制; 当 pH 7.0 以上时, 更有利于细胞的合成, 而不利于代谢物的生成。随着初始木糖浓度的增加, 菌株 T4 的累积产氢量和生物量先增加后逐渐减少, 在木糖浓度为 20g/L 时, 有最大的累积产氢量、比产氢速率和生物量, 分别为 4.26 L/L, 18.86 mmol-H₂/h g-DCW 和 963.9 mg/L; 但是最大的比产氢量 2.17 mol-H₂/mol-xylose 出现在木糖浓度为 15 g/L 时。

REFERENCES

- [1] Bockris JO. The origin of ideas on hydrogen economy and its solution to the decay of the environment. *Int J Hyd Energy*, 2002, **27**: 730–740.
- [2] Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hyd Energy*, 2001, **26**: 13–18.
- [3] Ke SZ, Ma JW. Progress of biological hydrogen production. *Chem Ind Eng Progr*, 2006, **25**(9): 1001–1010.
柯水洲, 马晶伟. 生物制氢研究进展. *化工进展*, 2006, **25**(9): 1001–1010.
- [4] Lu WY, Liu MH, Chen Y, *et al.* Research process of anaerobic fermentative hydrogen production and its development future. *China Biotechnol*, 2006, **26**(7): 99–104.
卢文玉, 刘铭辉, 陈宇, 等. 厌氧发酵法生物制氢的研究现状和发展前景. *中国生物工程学杂志*, 2006, **26**(7): 99–104.
- [5] Hallenbeck PC, Ghosh D. Advances in fermentative biohydrogen production: The way forward? *Trends Biotechnol*, 2009, **27**(5): 287–297.
- [6] Fikret K, Rukiye O, Hidayet A. Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter* sp.. *Int J Hyd Energy*, 2009, **34**(5): 2201–2207.
- [7] Gomez X, Cuetos MJ, Prieto JI, *et al.* Biohydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*, 2009, **34**(4): 970–975.
- [8] Lin CY, Cheng CH. Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int J Hyd Energy*, 2006, **31**: 832–840.
- [9] Lin CY, Hung CH, Chen CH, *et al.* Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Proc Biochem*, 2006, **41**: 1383–1390.
- [10] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, *et al.* Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No. 2. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 228–233.
- [11] Taguchi F, Mizukami N, Saito-Taki T, *et al.* Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No. 2. *Can J Microbiol*, 1995, **41**: 536–540.
- [12] Lo YC, Chen WM, Hung CH, *et al.* Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Res*, 2008, **42**: 827–842.
- [13] Ren NQ, Cao GL, Wang AJ, *et al.* Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int J Hyd Energy*, 2008, **33**(21): 6124–6132.
- [14] Kongjan P, Min B, Angelidaki I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70°C) by mixed culture fermentation. *Water Res*, 2009, **43**(5): 1414–1424.
- [15] Xing D, Ren NQ, Li QB, *et al.* *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**: 755–760.
- [16] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**: 420.
- [17] Zhang SF, Pan CM, Fan YT, *et al.* Conversion of corncob into biohydrogen by anaerobic fermentation. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(6): 1085–1090.
张淑芳, 潘春梅, 樊耀亭, 等. 玉米芯发酵法生物制氢. *生物工程学报*, 2008, **24**(6): 1085–1090.