

# 光合菌群发酵玉米秸秆水解液产氢

崔宝臣\* 张国欣 宋军 李睿 刘淑芝 侯博 荆国林

(东北石油大学化学化工学院石油与天然气化工省重点实验室 黑龙江 大庆 163318)

**摘要:** 以玉米秸秆水解液作为产氢底物, 研究光合菌群产氢性能。考察了硫酸浓度、固液比、水解时间、水解温度等秸秆水解条件对产氢的影响, 确定了最佳水解条件, 并对不同脱毒方法进行了对比研究。结果表明, 最佳的水解条件为硫酸浓度 1%, 固液比 1:12, 水解时间 0.5 h, 水解温度为 110 °C。采用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  脱毒方法的产氢效果要优于其他 2 种脱毒方法;  $\text{NH}_4^+$  在一定浓度范围内对该光合菌群产氢有促进作用。

**关键词:** 玉米秸秆, 水解, 光合菌群, 产氢, 还原糖, 脱毒

## Hydrogen production from the hydrolysate of corn stalk by photosynthetic bacteria group

CUI Bao-Chen\* ZHANG Guo-Xin SONG Jun LI Rui LIU Shu-Zhi HOU Bo  
JING Guo-Lin

(Provincial Key Laboratory of Oil & Gas Chemical Technology, College of Chemistry & Chemical Engineering, Northeast Petroleum University, Daqing, Heilongjiang 163318, China)

**Abstract:** Hydrogen production of photosynthetic bacteria group was studied using corn stalk hydrolysate as hydrogen production substrate. The affects of sulfuric acid concentration, solid-liquid ratio, hydrolysis time and hydrolysis temperature on hydrogen production were investigated. The optimum process conditions were as follows: the sulfuric acid concentration was 1%, the solid-liquid ratio was 1:12, the hydrolysis time was 0.5 h and the hydrolysis temperature was 110 °C, respectively. Three hydrolysate detoxification methods were compared and the method of calcium hydroxide obtained the optimal detoxification effect.  $\text{NH}_4^+$  played a stimulatory role to the hydrogen production within certain concentration.

**Keywords:** Corn stalk, Hydrolysis, Photosynthetic bacteria group, Hydrogen production, Reducing sugar, Detoxification

农作物秸秆是一种资源十分丰富的生物质资源, 目前大部分未被有效加工利用, 具有巨大的开发潜力, 为微生物制氢底物的选择提供了新的思路。周俊虎等<sup>[1]</sup>以麦秆等为发酵底物进行厌氧发酵产氢研究。Galina 等<sup>[2]</sup>以甜高粱、甘蔗渣、小麦秸秆、玉米叶片和串叶松香草作为 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 菌种产氢的唯一碳源, 产氢量达 44.7 L/kg 干生物质。刘培旺等<sup>[3]</sup>考察了秸秆预处理方法对厌氧发酵产氢的影响。Sakchai 等<sup>[4]</sup>以甘蔗渣水解液作为底物, 厌氧发酵产氢量为 1.73 mol H<sub>2</sub>/mol 总糖。与厌氧发酵产氢相比, 光合细菌产氢具有底物转化效率高、产氢纯度高、能将产氢与太阳能利用及污染治理耦合在一起等优点, 是最具发展前景的生物产氢方法。目前, 利用秸秆水解液进行光合菌群产氢研究在国内外鲜有报道。本文创新性地采用玉米秸秆水解-光合菌群发酵制氢工艺, 考察了水解条件和脱毒方法对产氢性能的影响, 旨在为相关研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

菌种为课题组以前从花园土壤中分离出的混合光合菌群<sup>[5]</sup>。在秸秆水解液中加入富集培养基<sup>[5]</sup>中除碳源 CH<sub>3</sub>COONa 外的其它组分作为产氢培养基。

### 1.2 实验方法

将干燥的玉米秸秆粉碎, 用一定浓度的硫酸溶液浸泡秸秆粉末 12 h, 高温水解后将水解液过滤, 滤液用碱调节 pH 为 6.00, 再经脱毒处理、高温灭菌后, 用于制备产氢培养基。将光合菌群在富集培养基中培养 72 h 后, 按 10% 接种量接种于装有产氢培养基的血清瓶中, 在 50 °C 水浴中加热 30 min 驱赶瓶内空气, 密封, 在光照度为 7 000 lux 和 30 °C±0.5 °C 条件下培养 4 d 后, 抽取血清瓶内气体和培养尾液, 采用气相色谱仪测定气相产物中氢气含量, 采用 3,5-二硝基水杨酸分光光度法测定尾液中还原糖含量。

产氢量=血清瓶中气体体积×氢气浓度×1 000/培养基体积, 单位: mL H<sub>2</sub>/L 培养基。

## 2 结果与讨论

### 2.1 硫酸浓度的影响

在固液比为 1:12、水解时间为 0.5 h、水解温度为 121 °C 条件下, 改变秸秆水解的硫酸浓度, 考察浓度硫酸的影响, 结果如图 1 所示。

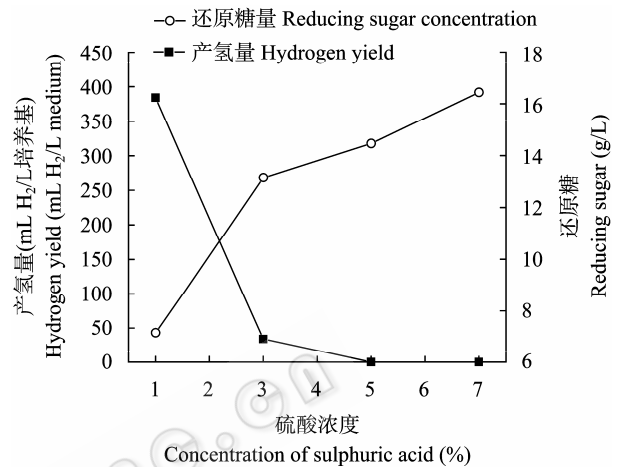


图 1 硫酸浓度的影响

Fig. 1 The influence of sulfuric acid concentration

由图 1 可以看出, 随着水解时硫酸浓度的增加, 产氢量减少, 还原糖浓度增加。当硫酸浓度为 1% 时, 光合菌群产氢量最高, 为 384 mL H<sub>2</sub>/L 培养基; 当硫酸浓度为 7% 时, 光合菌群利用秸秆水解液的发酵过程中基本上不产生氢气。这是由于在水解反应中硫酸浓度越高, 其降解半纤维素的机会也越多, 还原糖的浓度越高。光合菌群能够利用还原糖中的葡萄糖、木糖等作为碳源生长并产氢<sup>[6]</sup>, 但随着水解液中还原糖浓度的升高, 一方面水解产生的还原糖会进一步降解生成 5-羟甲基糠醛(HMF)、乙酰基丙酸和甲酸等影响产氢的有毒物质<sup>[7]</sup>; 另一方面, 实验测得在光合菌群产氢过程中水解液的 pH 值由 6.00 下降到了 4.20, 这说明光合菌群在生长过程中会分解部分还原糖而产生大量的有机酸, 造成了产氢培养基酸化。上述两方面因素的综合作用抑制了光合菌群的产氢活性, 最终导致产氢量下降。

### 2.2 固液比的影响

图 2 中产氢量随着固液比的减小而增加, 当固液比是 1:12 时, 产氢量最高; 当固液比是 1:8 时, 产

氢量甚微。硫酸量越多水解越充分,但是随着反应的进行,一部分还原糖发生降解生成可以被光合菌群利用的甲酸、乙酸等小分子,使氢气产量升高;另外还有一部分还原糖又缩合成了多糖<sup>[8]</sup>,导致还原糖浓度降低。

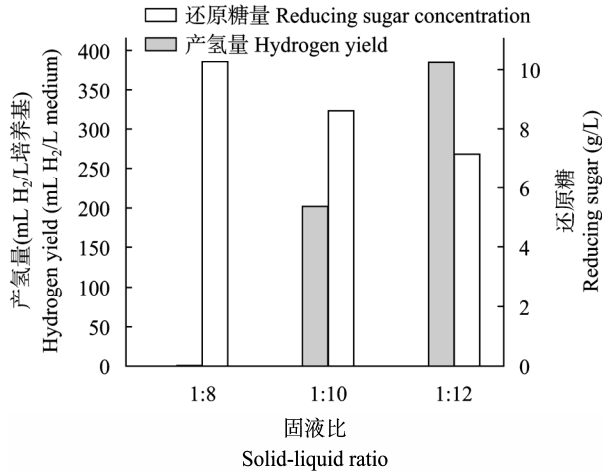


图2 固液比的影响

Fig. 2 The influence of solid-liquid ratio

### 2.3 水解时间的影响

由图3可以看出,随水解时间的增加产氢量减少,还原糖浓度增大。这是由于半纤维素是无晶体结构,聚合度比较低,随着时间的增加稀硫酸分子能够完全水解半纤维素,从而使还原糖量增加,但同时培养基中的发酵抑制成分也越来越高,影响光合菌群的活性,致使产氢量减少。

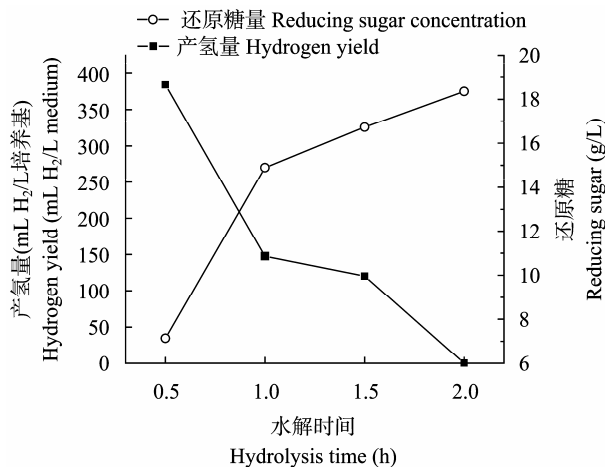


图3 水解时间的影响

Fig. 3 The influence of hydrolysis time

### 2.4 水解温度的影响

由图4可以看出,随着水解温度的升高,还原糖浓度呈上升的趋势。这说明水解温度越高,越有利于水解过程的进行。随着水解温度的升高,产氢量先升高然后降低再升高,当温度达到110℃时,还原糖浓度为0.81 g/L,此时产氢量最高为401.25 mL H<sub>2</sub>/L培养基。

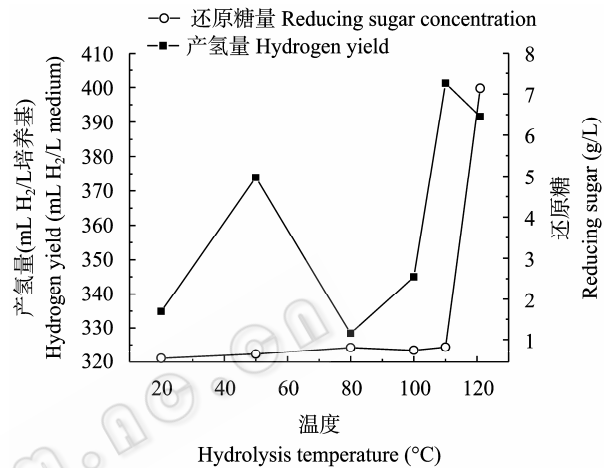


图4 水解温度的影响

Fig. 4 The influence of hydrolysis temperature

综上所述,在硫酸浓度为1%、固液比为1:12、水解时间为0.5 h、水解温度为110℃的条件下水解产氢效果最佳。当利用葡萄糖作为光合菌群产氢碳源时,产氢量为17.2 mL H<sub>2</sub>/L培养基<sup>[5]</sup>,而利用秸秆水解液作为产氢培养基时的产氢量,比单纯利用葡萄糖作为碳源时高出近24倍。由此可见,光合菌群利用秸秆水解液产氢不仅产氢量高,而且可以将生物物质的利用和氢能源的产生有机结合起来,具有产氢成本低、产氢速度快等优点。但是硫酸水解后的秸秆残渣中仍含有未被充分利用的生物物质能,并且残渣中含酸性大,这是光合菌群秸秆产氢亟待解决的问题。

### 2.5 水解液脱毒方法对产氢量的影响

秸秆水解产生还原糖的同时也产生了多种多样的有毒化合物<sup>[9-11]</sup>即抑制剂。这些抑制剂一部分是秸秆中半纤维素水解产生的,包括乙酸、萜烯和酒精;还有一部分是木质素降解的产物,包括芳香族化合物和多环芳烃化合物<sup>[10-11]</sup>。同时水解得到的部

分还原糖也会分解成糠醛、5-羟甲基糠醛、戊酮酸、甲酸和腐殖质<sup>[12]</sup>。水解液中的这些成分会抑制光合菌群活性,降低产氢量。为了消除其对光合菌群产氢的不利影响,对水解液采用表 1 所示的 3 种方法进行脱毒处理。

序号 No.	脱毒方法 Detoxification methods	产氢量(mL H <sub>2</sub> /L 培养基) Hydrogen yield (mL H <sub>2</sub> /L medium)
1	NaOH 调节 pH, 活性炭吸附	401.3
2	Ca(OH) <sub>2</sub> 调节 pH	472.2
3	氨水调节 pH	451.1

由表 1 可以看出,当用 Ca(OH)<sub>2</sub> 中和水解液中残余的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 时,产氢效果最好,产氢量为 472.2 mL H<sub>2</sub>/L 培养基,这与 Martinez 等<sup>[13]</sup>研究结果相类似。因为加入 Ca(OH)<sub>2</sub> 与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 反应形成的 CaSO<sub>4</sub> 沉淀,不但能吸附一部分酚类化合物和一小部分木糖醇,而且还能降低酮类化合物、糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度<sup>[12]</sup>,从而减少有毒物质对产氢的抑制;另外,Alfredo 等<sup>[14]</sup>研究表明,利用 Ca(OH)<sub>2</sub> 作为水解液脱毒剂时,水解液中甲酸、乙酸等小分子酸的浓度基本不变,这些低分子羧酸可以为光合菌群产氢提供能源;同时,Ca<sup>2+</sup>是酶的激活剂,可以提高固氮酶和氢酶的活性,从而促进光合菌群产氢。

利用氨水调节水解液 pH 的脱毒方法,产氢量也较高(表 1)。据朱建良等<sup>[15]</sup>报道,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对光合细菌产氢有抑制作用,能降低光合细菌的能量水平,但是在本实验中,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>在一定范围内反而起到了促进产氢的作用,因此 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对光合菌群产氢的影响不容忽视。为了研究分析 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对产氢的实质性影响,在 Ca(OH)<sub>2</sub> 脱毒后培养液中加入不同浓度的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>进行发酵产氢,结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出,产氢量随着 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度的增加而增加,当 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度为 2 g/L 时,产氢量达到最高,为 557.4 mL H<sub>2</sub>/L 培养基,说明 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度低于 2 g/L 时,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对产氢起到很好的促进作用,这同张立宏<sup>[16]</sup>和刘双江等<sup>[17]</sup>的研究结果相类似。当 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

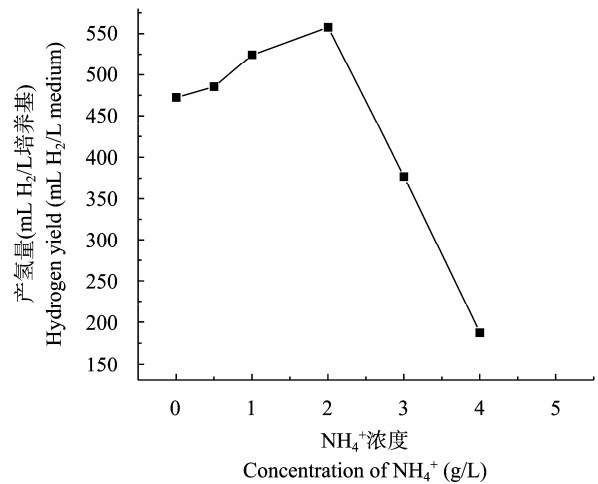


图 5 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度的影响

Fig. 5 The influence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration

浓度大于 2 g/L 时,产氢量骤然减少,说明随着 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度的继续增加,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>对固氮酶的抑制作用愈加明显,最终导致产氢量下降。

### 3 结论

实验研究结果表明,水解条件对光合菌群产氢有重要影响,通过对硫酸浓度、固液比、水解时间和水解温度 4 个方面的综合考察,得出最佳的水解条件为硫酸浓度为 1%,固液比为 1:12,水解时间为 0.5 h,水解温度为 110 °C。本实验考察了 3 种不同脱毒方法对产氢量的影响,其中采用 Ca(OH)<sub>2</sub> 中和脱毒时的产氢效果优于其他 2 种脱毒方法。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>浓度低于 2 g/L 时,对该光合菌群产氢有促进作用。

### 参考文献

- [1] 周俊虎, 戚峰, 程军, 等. 秸秆发酵产氢的碱性预处理方法研究[J]. 太阳能学报, 2007, 28(3): 329-333.
- [2] Ivanova G, Rákhely G, Kovács K. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(9): 3659-3670.
- [3] 刘培旺, 袁月祥, 闫志英, 等. 秸秆的不同预处理方法对发酵产氢的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(1): 125-129.
- [4] Patra S, Sangyoka S, Boonmee M, et al. Bio-hydrogen

- production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(19): 5256–5265.
- [5] 崔宝臣, 张国欣, 侯博, 等. 正交实验优选光合细菌混合菌群产氢的最佳条件[J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1871–1875.
- [6] 梁莹. 玉米秸秆稀硫酸预处理工艺研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007.
- [7] 庄军平, 林鹿, 庞春生, 等. 木质纤维素稀水解液脱毒研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(2): 19–23.
- [8] 林贝. 玉米秸秆酸解副产物对酒精发酵影响的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2007.
- [9] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review[J]. Bioresource Technology, 2004, 93(1): 1–10.
- [10] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 17–24.
- [11] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25–33.
- [12] Ranjan R, Thust S, Gounaris CE, et al. Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolyzates for improved ethanol yield and value-added product recovery[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2009, 122(1/3): 143–148.
- [13] Martinez A, Rodriguez ME, Wells ML, et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime[J]. Biotechnology Progress, 2001, 17(2): 287–293.
- [14] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(5): 526–536.
- [15] 朱建良, 冯有智. 固氮类微生物产氢机理研究进展[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2003, 25(1): 102–106.
- [16] 张立宏. 混合菌种生物技术 (MCB) 光合产氢的试验研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2008.
- [17] 刘双江, 孙燕, 杨慧芳, 等. 红假单胞菌 H 菌株生长细胞光照放氢条件的研究[J]. 微生物学通报, 1994, 21(5): 259–262.

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。