

于雷,李晓蒙,张作明,等. 硫源对高温厌氧产氢菌 *Caldicellulosiruptor changbaicum* 发酵产氢的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):326-328.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.106

硫源对高温厌氧产氢菌 *Caldicellulosiruptor changbaicum* 发酵产氢的影响

于雷¹, 李晓蒙¹, 张作明², 高猛¹

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林大学生命科学学院分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林长春 130112)

摘要:以从长白山温泉中筛选到的高温厌氧产氢菌 *Caldicellulosiruptor changbaicum* 为菌种,研究硫源对其发酵纤维素产氢的影响。先以 Na_2S 、 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为硫源进行单因素试验,考察硫源对菌株生长和产氢的影响。然后在生物反应器中分别以 Na_2S 和 Na_2S 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 混合物为硫源进行厌氧发酵试验。结果在以 $\text{Na}_2\text{S}:\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3=1:2$ 的混合物为产氢菌提供硫元素时,发酵液 pH 值呈稳定下降趋势,产气稳定时的平均速率为 $90\sim100\text{ mL}/(\text{L}\cdot\text{h})$,氢气的转化效率达到 7.73 mmol/g VS ,说明 Na_2S 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 混合硫源有利于该高温厌氧菌发酵纤维素产氢。

关键词:高温厌氧产氢菌; *Caldicellulosiruptor changbaicum*; 纤维素; 硫源; 氢气; 生物反应器; 发酵产氢

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0326-03

进入 21 世纪以来,从石油、煤炭等矿产资源开采量的不断上升以及储存量的不断减小,到人们对可替代能源的追求与探索,能源问题已经成为了全世界共同关注的焦点问题^[1]。氢气作为一种可燃的气体,有着诸多方面的优点。例如环保,氢气燃烧后的产物除了水之外没有其他任何物质,是绝对无污染的;另外,氢气的燃烧值最高,达到了 $3\,042\text{ cal}/\text{m}^3$,且燃烧的热转化效率也很高。因此,关于制氢技术的研究成为了近年来人们关注的热点^[2]。

在所有的制氢技术中,生物制氢以其反应条件温和、节能、可再生,还可以治理工业污染等诸多优点,逐渐成为了研究的热门领域^[3]。生物制氢主要分为两大类,一类为光合微生物发酵;另一类为厌氧微生物发酵。其中,厌氧微生物发酵生物质制氢具有治理污染、环保和高产能等特点,有着非常广阔的开发前景,越来越多的厌氧产氢菌已经被发现并应用到富含纤维素污染物的处理当中^[4]。高温厌氧微生物在所有发酵产氢的厌氧微生物中,由于其发酵环境的温度较高,发酵过程中产生的气体不需要再经过后继操作就可以快速溢出,因此在一定程度上降低了生产成本。而且氢气的快速溢出,

也减小了氢气对发酵过程的抑制作用,从另一角度提升了发酵制氢的速率^[5]。相对于其他厌氧产氢菌,高温菌更易得到高的产氢效率^[6-7],理论最大产氢量可以达到每消耗 1 mol/L 菌葡萄糖产 4 mol/L H_2 ^[8],因此利用高温厌氧菌发酵产氢具有较大的生产潜力。

在利用高温厌氧产氢菌制氢的过程,影响其生长和产氢的因素很多^[9],如培养温度、培养基 pH 值、培养所利用碳源、氮源的种类和金属离子的影响等等。除上述因素以外,硫源对该类细菌的生长和制氢有着非常大的影响,该类细菌的生理生化特性表明硫元素为新陈代谢过程中的电子受体,因此硫元素是该类细菌生长所必须的元素之一^[10-11]。本试验主要研究硫源对分离自长白山温泉的高温厌氧产氢菌 *Caldicellulosiruptor changbaicum* 的生长以及产氢的影响,从而为其发酵产氢的应用提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及来源

高温厌氧产氢菌由吉林大学分子酶学教育部重点实验室提供,通过 16S rRNA 全序列比对及系统发育学分析,发现这株菌属于热解纤维素果汁杆菌属,命名为 *Caldicellulosiruptor changbaicum*。

1.2 培养基

传代培养基: $0.33\text{ g NH}_4\text{Cl}$, $0.33\text{ g KH}_2\text{PO}_4$, 0.33 g KCl ,

收稿日期:2014-03-20

基金项目:吉林省科技发展规划项目(编号:20100563)。

作者简介:于雷(1973—),男,吉林长春人,博士,副教授,研究方向为食品科学与发酵工程。E-mail:leiuyjl@sina.com。

[16]朱为菊,王全喜. 滴水湖浮游植物群落结构特征及其水质评价[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2011,40(4):405-410.

[17]邓迪勇,卢伟,陶敏. 硅藻在水环境监测中的指示作用及研究进展[J]. 环境科学与技术,2009,32(12):222-225.

[18]胡芳,刘桢. 湘江长沙段浮游藻类动态监测与水质评价[J]. 环境科学与管理,2012,37(2):111-113.

[19]邓洪平,陈锋,王明书,等. 嘉陵江下游硅藻群落结构及物种多样性研究[J]. 水生生物学报,2010,34(2):330-335.

[20]辛晓云,杨文杰,张红,等. 内蒙古岱海水质的硅藻生物指数评价[J]. 山西大学学报:自然科学版,2000,23(3):263-266.

[21]辛晓云. 河南南湾水库浮游硅藻的种群结构与水质污染评价初步研究[J]. 生态学杂志,2003,22(5):125-126.

[22]高亚辉,虞秋波,齐雨藻,等. 长江口附近海域春季浮游硅藻的种类组成和生态分布[J]. 应用生态学报,2003,14(7):1044-1048.

[23]杨清良. 台湾海峡西侧浮游硅藻类的种类组成与分布[J]. 海洋学报,1995,17(2):99-107.

0.33 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g CaCl_2 , 1.0 mL 金属离子, 10.0 mL 维生素, 1.5 g NaHCO_3 , 0.5 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g 刃天青, 0.5 g 酵母粉, 5.0 g 滤纸, 1 000 mL 去离子水。灭菌条件: 115 $^{\circ}\text{C}$, 20 min。其中金属离子、维生素、 NaHCO_3 、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、刃天青和滤纸单独灭菌, 在传代时再分别加入; 滤纸用组织捣碎机捣碎后再灭菌后利用。

金属离子的配制: 10.00 mL HCl (25%), 1.5 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 70.00 mg ZnCl_2 , 10.00 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6.00 g H_3BO_3 , 190.00 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.00 mg $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 24 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 36 g NaMoO_4 , 990 mL 去离子水。

维生素的配制: 2.00 mg 维生素 H, 2.00 mg 维生素 B_9 , 10.00 mg 维生素 B_6 , 5.00 mg 维生素 $\text{B}_1 - \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.00 mg 维生素 B_2 , 5.00 mg 烟酸, 5.00 mg 泛酸盐, 0.10 mg 维生素 B_{12} , 5.00 mg 对氨基苯甲酸, 5.00 mg ZnSO_4 , 1 000.00 mL 去离子水。

发酵培养基: 发酵培养基与传代培养基除硫源不相同以外, 其他成分均相同。

1.3 硫源单因素试验

利用 250 mL 的厌氧瓶进行培养, 培养基的体积为 200 mL, 接种量为 3%, 利用 N_2 、 CO_2 体积比为 4 : 1 的混合气来提供厌氧环境, (75 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养。

试验分别利用含相同硫元素浓度的 Na_2S 、 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 来提供硫环境, 并以不加任何硫元素的培养基为对照, 来研究高温厌氧菌的生长及产氢的现象。

1.4 生物反应器发酵

如图 1 所示, 利用 2.0 L 的生物反应器进行发酵产氢试验, 发酵培养基的体积为 1.7 L, 接种量为 12%^[12], 利用连接 75 $^{\circ}\text{C}$ 循环水浴的皮管套控制发酵温度, 利用磁力搅拌器对发酵液进行搅拌, 转速为 300 r/min; 培养基的碳源为 0.5% 的滤纸。通过“1.3”的试验结果可以得到发酵产氢最佳的硫化物或者混合物, 然后以它们为硫源进行发酵试验, 从而确定最佳的硫源。

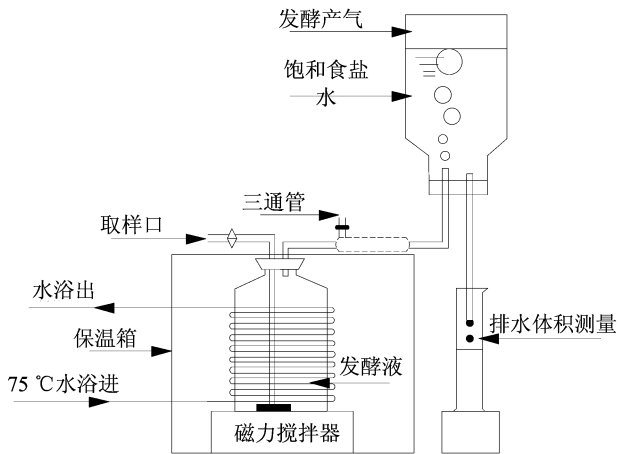


图1 发酵试验装置

1.5 分析方法

发酵液中还原糖利用 DNS 法测定^[13]; 发酵产生的气体 (H_2 、 CO_2 、 CH_4 等) 利用气相色谱法测定^[14], 具体条件: 用的柱子为 3 m Hayesep Q 色谱柱, 并利用热导检测器。进样针和

柱子的温度分别为 110、130 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 高温厌氧菌对硫源的选择性

在相同的试验条件下分别利用不同硫源对高温菌进行培养, 结果如表 1 所示。

表1 高温厌氧菌对硫源的选择性

硫源	长势
Na_2S	++
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	++
Na_2SO_4	+
Na_2SO_3	-
不加硫化物	-

注: “++”表示长势良好; “+”表示长势一般; “-”表示不生长。

试验结果表明, 对于高温厌氧产氢菌 *Cal. changbaicum* 来说, 硫是该类细菌正常生长所必需的元素, 在硫元素缺乏的条件下, 细菌不能生长。由表 1 可见, Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 是硫元素的最佳提供者, 细菌长势良好。因此, 在后面的生物反应器发酵试验中, 就以这 2 种化合物为发酵培养基提供硫元素。

但是在利用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为单一的硫源、培养基排氧时间与添加其他硫元素的培养基相同时, 培养基的颜色为红色, 说明培养基中含有氧气, 厌氧菌无法生长。如果继续使用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为硫源, 那么对培养基进行排氧处理的时间就要相应地加长, 一般排氧时间会在 1 h 左右, 因此从排氧时间角度考虑, 单独利用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 硫源不十分理想。而当培养基中添加 Na_2S 时, 排氧的时间只需要 5 min 左右, 可见 Na_2S 可以起到快速去除培养基中痕氧的作用。因此, 在下面的反应器发酵过程中, 分别选择 Na_2S 和 Na_2S 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合物作为硫源进行对比发酵试验。

2.2 生物反应器发酵过程中硫源的选择

2.2.1 以 Na_2S 为硫源发酵产氢 以 Na_2S 为唯一的硫源, 利用 0.5% 滤纸为碳源进行发酵产氢试验, 发酵过程中产气速率与发酵液 pH 值的变化如图 2 所示。

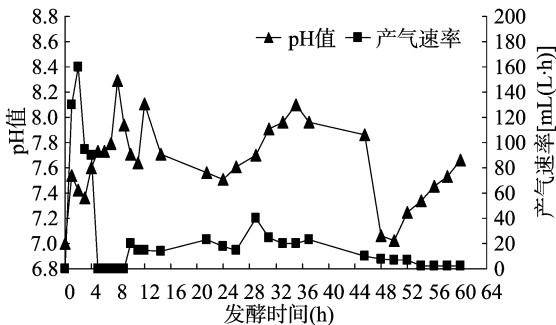


图2 以 Na_2S 为硫源的发酵试验

由图 2 可知, 当以滤纸作碳源、 Na_2S 为唯一的硫源时, 厌氧菌一直没有得到很好的发酵效果, 产气速率一直维持在 15 mL/(L · h) 左右, 发酵产生的气体总量只有 1 200 mL 左右。

在发酵的前 3 h, 有大量的气体溢出, 经测定其中大部分为 H_2S , 进而使得培养基的硫元素大量溢出, 致使硫元素缺失, 从而导致该菌无法正常生长。

另外,大量的 H_2S 溢出也导致了在发酵的起始阶段发酵液的 pH 值由 7.0 左右快速升高到 8.4。虽然之后发酵液的 pH 值有所下降,但也都在 7.6 以上,而该菌最适 pH 值在 6.5~7.5 之间,使得该菌在偏碱性的 pH 条件下不能够快速生长并产气。

目前国外高温厌氧菌发酵产氢的研究中,培养基硫源大多是直接由 Na_2S 来提供的,其他硫化物基本上都没有用到。笔者所在课题组在试验过程中发现单独使用 Na_2S 作为培养基的硫源并没有得到较好的产氢效果。

2.2.2 以 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合物为硫源发酵产氢 由“2.2.1”的试验结果可知,硫环境对发酵产氢起着非常重要的作用,单独使用 Na_2S 提供硫环境时,并没有得到比较好的试验结果,因此将试验改为以 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合物来提供硫环境。

Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的添加的方法为在对培养基进行排氧的同时缓慢添加 Na_2S ,直到培养基的颜色变为无色后,培养基所必需的剩余的硫元素再由 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 提供,按照硫含量的比例得出 $\text{Na}_2\text{S}:\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为 1:2。

如图 3 所示,在以 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合物为硫源后,虽然在发酵前的 5 h 仍然有大量的 H_2S 溢出,发酵液的 pH 值也有所升高,但由于此次利用的硫源为 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合物,细菌表现出仍然可以正常生长并产气,因此在发酵进行 5 h 后,产气速率又开始缓慢上升,发酵 15 h 左右产气速率开始逐渐趋向稳定,一直到 33 h 左右产气速率仍一直维持在 90 mL/(L·h) 左右。

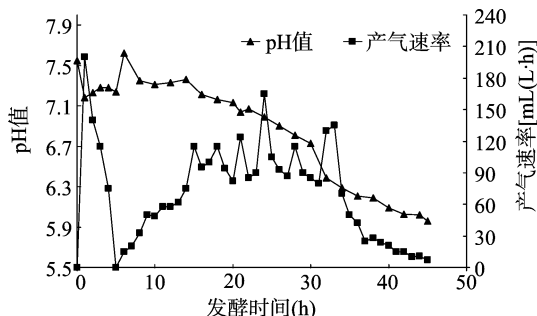


图3 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为硫源发酵产氢

此次发酵共产生了 3 253 mL 的气体,经测定,氢气的含量在 40% 左右,由此发酵共产生了 58 mmol H_2 ;得到的氢气的转化率达到 7.73 mmol/g VS,与 Carver 等试验中利用的高温厌氧产氢菌的转化率相当^[15],达到了较高的转化率,从而表明高温厌氧菌 *Cal. changbaicum* 具有广阔的应用前景。可见,在利用 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 混合物作为硫源时,既可以快速排除培养基中的氧气,减小培养基中的痕氧对细菌生长产生的不利影响,同时还可以保证培养基中有效的硫环境,实现高温厌氧产氢菌的正常生长和产氢。

3 结论

试验结果表明,在高温厌氧菌 *Cal. changbaicum* 的生长环境中没有硫元素的存在时,细菌无法正常生长,说明硫元素是此类细菌的生长过程中的必需元素之一。高温厌氧菌对硫源存在着一定的选择性,通过厌氧瓶培养得到生长和产氢的

最佳硫源为 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 种化合物。当以 Na_2S 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 混合物作为硫源在生物反应器中发酵时,氢气的转化效率高达 7.73 mmol/g VS,这说明混合的硫源对高温厌氧产氢菌发酵纤维素产氢具有明显影响,从而为该菌的进一步利用提供了良好的理论和技术依据。

参考文献:

- [1] 黄天香. 我国规划新能源:未来 15 年三步走[N]. 中国改革报, 2006-04-27(2).
- [2] 杨艳,卢慎楠,李春,等. 面向 21 世纪的生物能源[J]. 化工进展,2002,21(5):299-302,322.
- [3] 康铸慧,王磊,郑广宏,等. 微生物产氢研究的进展[J]. 工业微生物,2005,35(2):41-49.
- [4] Lo Y C, Huang C Y, Fu T N, et al. Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(15): 6189-6200.
- [5] Kadar Z, De Vriek T, Van Noorden G E, et al. Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 113(16): 497-508.
- [6] Fang H H P, Li C L, Zhang T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry[J]. Hydrogen Energy, 2006, 31: 68-92.
- [7] Chou C J, Shockley K R, Connors S B, et al. Impact of substrate glycoside linkage and elemental sulfur on bioenergetics, of and hydrogen production by the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6842-6853.
- [8] de Vrije T, Mars A E, Budde M, et al. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(6): 1358-1367.
- [9] Wang J L, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production; a review[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(2): 799-811.
- [10] Pender S, Toomey M, Carton M, et al. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors[J]. Water Research, 2004, 38(3): 619-630.
- [11] Willquist K, Zeidan A A, van Niel Ed W J. Physiological characteristics of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: an efficient hydrogen cell factory[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9: 89.
- [12] Yokoyama H, Ohmori H, Waki M, et al. Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(1): 64-66.
- [13] 曹正明. 生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [14] Basile M A, Dipasquale L, Gambacorta A, et al. The effect of the surface charge of hydrogel supports on thermophilic biohydrogen production[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(12): 4386-4394.
- [15] Carver S M, Hulatt C J, Thomas D N, et al. Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H_2 production[J]. Biodegradation, 2011, 22(4, SI): 805-814.