

发酵水稻秸秆产酸复合菌群的筛选与评价

李建政, 宋钧玲, 艾斌凌

哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090

摘要 为开发秸秆发酵生产有机挥发酸的微生物种子资源和研究材料, 以牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木以及猪粪堆肥和腐木混合物为接种物, 通过传代富集培养, 选育到发酵水稻秸秆产酸性能相对稳定的 5 个复合菌群, 即 FM_c 、 FM_d 、 FM_e 、 FM_w 和 $FM_{(d+w)}$ 。经测试, FM_w 具有最高的秸秆降解能力, 其秸秆降解率可达 46.4%; 菌群 $FM_{(d+w)}$ 发酵秸秆的总酸和丁酸比产率最高, 分别为 0.64 和 0.48g/g; 发酵秸秆产乙酸能力以菌群 FM_d 最为突出, 其乙酸比产率为 0.35g/g。5 个复合菌群均缺乏酸性纤维素酶活性, 极大限制了秸秆降解率和产酸率, 需要进一步的耐酸驯化和培养条件优化。

关键词 水稻秸秆; 发酵; 复合菌群; 有机挥发酸; 比产率

中图分类号 X703

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.35.008

Breeding and Selection of Mixed Bacterial Cultures for Volatile Fatty Acid Production by Rice Straw Fermentation

LI Jianzheng, SONG Junling, AI Binling

State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract To develop genetic resources for microorganisms and to study the volatile fatty acid production by rice straw fermentation, mixed bacterial cultures FM_c , FM_d , FM_e , FM_w and $FM_{(d+w)}$ were obtained by subculture with cow muck, pig compost soil, rotten wood, and mixture of pig compost soil and rotten wood as inoculums. Among the five mixed cultures, FM_w shows the highest straw degradation rate of 46.4%. The highest specific production rates of the total volatile fatty acid and the total butyric acid from rice straw are reached by the mixed culture $FM_{(d+w)}$ with a value of 0.64 and 0.48g/g, respectively. The mixed culture FM_d produces more acetic acid from rice straw than others with a specific yield of 0.35g/g. It is found that the five mixed bacterial cultures all lack the acidity glucanase, resulting in a great restriction in the degradation of rice straw and the fatty acid yield. In order to improve the mixed cultures with respect to their fatty acid yield, a domestication to fatty acids and an optimization of cultivation conditions are desirable.

Keywords rice straw; fermentation; mixed culture; volatile fatty acid; specific production rate

0 引言

短链脂肪酸是一类极为重要的有机化工产品,也是有机化工的重要原料,在化工、食品、医药、化妆品、畜牧、纺织等行业应用广泛^[1-2]。目前化工行业所用的短链脂肪酸,主要来自石油、煤炭和天然气的加工,而这些不可再生的资源的储量有限,其开采、运输和生产还会带来严重的环境问题,因而

是不可持续的^[3-4]。以可再生的生物质为原料,利用微生物的产酸代谢生产羧酸,具有原料广泛、对环境污染少、可持续等突出特点而引起广泛关注^[2,4]。

作物秸秆是最为丰富的生物质资源之一,大力提高秸秆资源利用率,保护生态环境,是中国农业可持续发展的一项战略措施^[5-6]。利用微生物发酵作用将秸秆转化为羧酸,则为

收稿日期: 2012-06-12; 修回日期: 2012-10-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51178136); 城市水资源与水环境国家重点实验室自主课题(2010DX06)

作者简介: 李建政, 教授, 研究方向为厌氧生物处理技术, 电子邮箱: ljz6677@163.com

有机化工的可持续发展提供了基本原料^[2-7]。秸秆成分比较复杂,如何进一步提高降解和目标产品的定向转化效率,一直是研究的热门课题。由多种细菌组成的复合菌群,可通过种间协同代谢机制,削弱中间产物的抑制效应,有效提高秸秆的降解和转化效率^[8-9]。然而,微生物种子资源的筛选和培育仍然是目前国内外利用微生物高效制造羧酸面临的关键科学问题之一^[24,7]。

本研究以牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木为接种物,通过传代富集培养,培育发酵秸秆产酸能力较强的复合菌系,并对其定向发酵产酸能力进行测试,以期从中筛选出总挥发酸、乙酸和丁酸产生能力强的复合菌系,为开发以秸秆为原料的有机酸发酵技术提供微生物种子资源和研究材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

发酵原料为经过预处理的水稻秸秆。水稻秸秆取自哈尔滨市郊区,以 10cm 的长度铡碎、烘干,称取 200g 加入盛有 3000mL 1% NaOH 溶液的烧杯中,搅拌均匀后用保鲜膜封口,50℃水浴 72h。水解残渣用自来水清洗至 pH 值呈中性,沥干后备用,测得其含水率为 80%。

用于培育发酵秸秆产酸菌群的原始接种物为取自哈尔滨市周边的养殖场和农场的牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木,含水率分别为 35%、50%、82%和 36%。

1.2 培 养 基

基础培养基:5g/L 蛋白胨,1g/L 酵母粉,5g/L NaCl,2g/L CaCO₃。秸秆培养基:在基础培养基中另加入 12g/L 经热碱预处理的秸秆(干重)。以上两种培养基均取自自然 pH 值,约为 7.5。

1.3 发酵菌群的富集培养与产酸能力测试

发酵菌群的初次富集:按照接种物的不同,构建 5 个培养体系,接种物分别为牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木,以及按等质量(湿重)比混合的猪粪堆肥与腐木。富集操作方法为:取 250mL 灭菌血清瓶,装入 100mL 秸秆培养基,以 0.5% (W/V,湿重)的接种量加入接种物;充高纯氮气 5min,胶塞密封,置于恒温空气浴振荡器(HZQ-C,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)中,120r/min 下 35℃恒温培养,每天定时以注射器测量并排气 1 次,直至发酵系统产气停止、挥发酸浓度不再变化,即达到稳定期为止。

发酵菌群的传代培养:取 250mL 灭菌血清瓶,装入 100mL 秸秆培养基,接种发酵菌群初次富集系统的上清液 5mL,充氮、密封,置于恒温空气浴振荡器中,在 120r/min 下 35℃恒温培养至稳定期(共 6d),每天定时以注射器测量并排气 1 次。按以上操作对发酵菌群进行传代培养,直至相邻两代达到发酵稳定期的时间趋于一致。

对不同来源发酵菌群的产酸能力测试,采用 2 只培养瓶平行进行,同时增设一组对照(不加秸秆),具体操作方法与发酵菌群的传代培养相同。

1.4 分析方 法

培养液的 pH 值采用国际标准方法测定^[10],有机挥发酸(VFAs)采用山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司的 SP-6890 气相色谱仪(FID 检测器)测定^[11]。发酵系统中的秸秆质量,依照 van Soest 等^[12]提供的方法进行检测,具体操作为:准确量取发酵液 10mL 置于 25mL 比色管中,加入 10mL 中性洗涤剂,放入高压蒸汽消毒器(YXQ-LS-SII,上海博迅实业有限公司医疗设备厂)中,100℃保温 1h,取出离心弃上清;加蒸馏水震荡,离心去上清,反复 3 次;残渣移入恒重后的坩埚,105℃烘干、恒重。

秸秆发酵产酸量均为实验组(秸秆发酵培养基)产量减去对照组(基础培养基)的产量,秸秆的比产酸率以降解单位质量秸秆产生的挥发酸质量计,秸秆失重率按如下公式计算:秸秆失重率=[(发酵初始秸秆干重-发酵终点秸秆干重)/发酵初始秸秆干重]×100%。相关数据均取 2 个平行反应系统的平均值。

2 结果与分 析

2.1 秸秆发酵系统的挥发酸产量

以牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木以及猪粪堆肥与腐木的混合物为接种物,在秸秆培养基中对其分别进行了传代富集培养,得到发酵秸秆产酸性能相对稳定的 5 个菌群,分别标记为 FM_c、FM_d、FM_s、FM_w 和 FM_(d+w)。这 5 个菌群无论是在基础培养基中培养还是在秸秆培养基中培养,均会产生大量 VFAs(图 1)。其中,乙酸、丁酸为大量产物(图 2、图 3),而丙酸、戊酸和己酸产量很低,其总和最高值只有 0.3—0.83g/L(详细数据省略)。

如图 1 所示,FM_c、FM_d、FM_s、FM_w 和 FM_(d+w) 菌群的秸秆发酵系统,其 VFAs 总量均在第 4 天达到峰值。其中,FM_c 在秸秆培养基中的 VFAs 产量高达 6.23g/L,FM_s、FM_(d+w)、FM_w 和 FM_d 菌群在秸秆培养基中的最高 VFAs 产量(第 4 天)依次为 6.08、5.73、5.72 和 5.13g/L。然而,以秸秆发酵培养系统的 VFAs 产量减去未投加秸秆培养系统的 VFAs 产量,即秸秆发酵产酸量为指标时,菌群 FM_c 的秸秆发酵产酸量为 1.95g/L,要低于 FM_(d+w) 菌群的 2.06g/L 和 FM_s 菌群的 1.98g/L。

在为期 6d 的发酵测试过程中(图 1),FM_c、FM_d、FM_s、FM_w 和 FM_(d+w) 菌群发酵秸秆产酸系统中的 VFAs 总量呈现出相似的变化规律,即在培养的第 4 天达到峰值后又出下降趋势。分析认为,这一变化规律的出现可能与复合菌群的组成有关。这 5 个菌群均是由取自不同环境的样品经传代富集培养而来,具有微生物多样性,各系统在培养后期出现的 VFAs 下降现象指示着系统中有消耗 VFAs 微生物的存在。

虽然经过同样的富集培养,由于接种物(初始群落)的不同,经传代培养最终形成的 5 个复合菌群的发酵秸秆产酸特征也表现出差异。如图 2 所示,5 个菌群在秸秆培养基中的最高乙酸浓度也都出现在第 4 天,从高到低依次 FM_c 为 3.03 g/L,FM_d 为 2.94g/L,FM_s 为 2.69g/L,FM_(d+w) 为 2.24g/L 和 FM_w

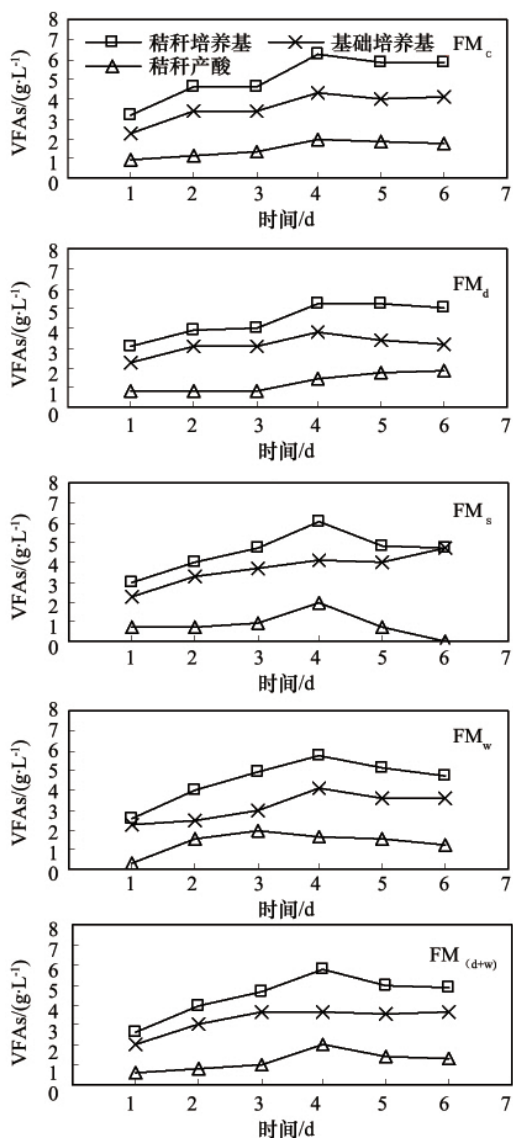


图1 发酵系统中总挥发酸浓度的历时变化
Fig. 1 Total volatile fatty acid in the mixed culture fermentation systems

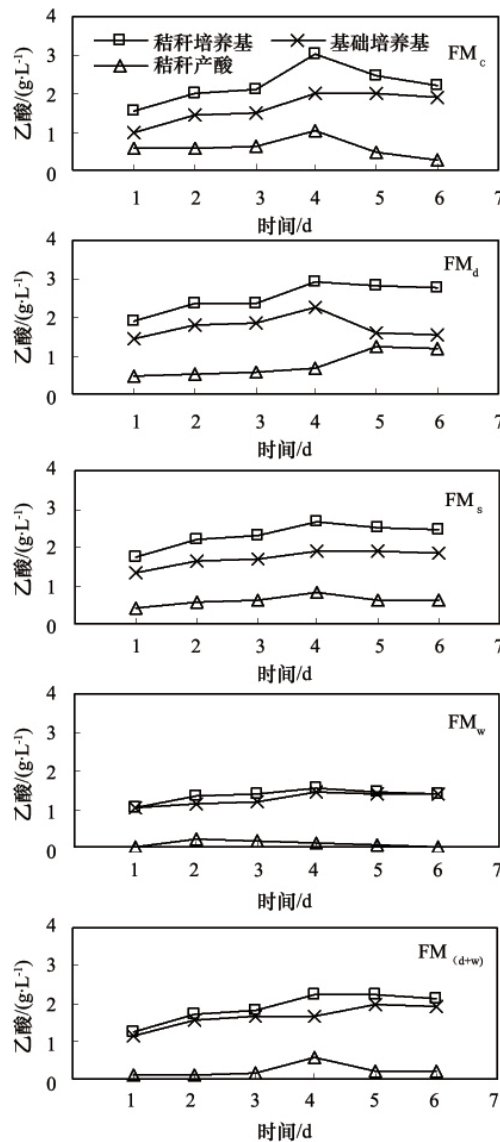


图2 发酵系统中乙酸浓度的历时变化
Fig. 2 Acetic acid in the mixed culture fermentation systems

为 1.55g/L。然而,各秸秆发酵系统中由秸秆发酵获得的最高乙酸浓度在出现时间上有所不同,FM_c、FM_s、FM_(d+w)出现在培养的第4天,而FM_d出现在第5天,FM_w则出现在第2天。其中,FM_c和FM_d的秸秆发酵产酸能力显著高于其他菌群,最高分别达到 1.05g/L(第4天)和 1.24g/L(第5天)。比较发现,尽管FM_d在秸秆培养基中获得的最高乙酸浓度要低于FM_c,但其秸秆发酵的乙酸产量却高于FM_c的 1.05g/L。

菌群FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)在秸秆培养基中的产丁酸能力也存在显著差异(图3),其中FM_d、FM_c、FM_w和FM_(d+w)发酵系统中的总挥发酸浓度均在第4天达到峰值,分别为 1.11、2.08、3.58和 2.05g/L,而FM_c菌群秸秆发酵系统的峰值 1.47g/L则出现在培养的第5天。发酵秸秆产丁酸能力以FM_w

最高,在培养的第4天达到 2.28g/L。FM_c菌群发酵秸秆产丁酸能力最差,在第5天达到峰值时也仅有 0.77g/L。

2.2 秸秆发酵系统的 pH 值

由于大量 VFAs 的产生和累积(图1),各发酵系统中的 pH 值持续降低(图4)。在秸秆发酵系统中,菌群FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)发酵系统在经过4天培养后,其总挥发酸产量达到最高,此时其系统中的 pH 值分别从第1天的 6.61、6.06、6.15和 6.08降至 5.93、5.91、5.9、5.53和 5.8。到第6天发酵结束时,FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)秸秆发酵系统中的 VFAs 总量虽均有所降低,但其 pH 值分别进一步降低到了 5.65、5.8、5.72、5.35和 5.73。系统 pH 值的降低,有可能直接影响到菌群对秸秆的降解和产酸发酵过程的进行^[13]。

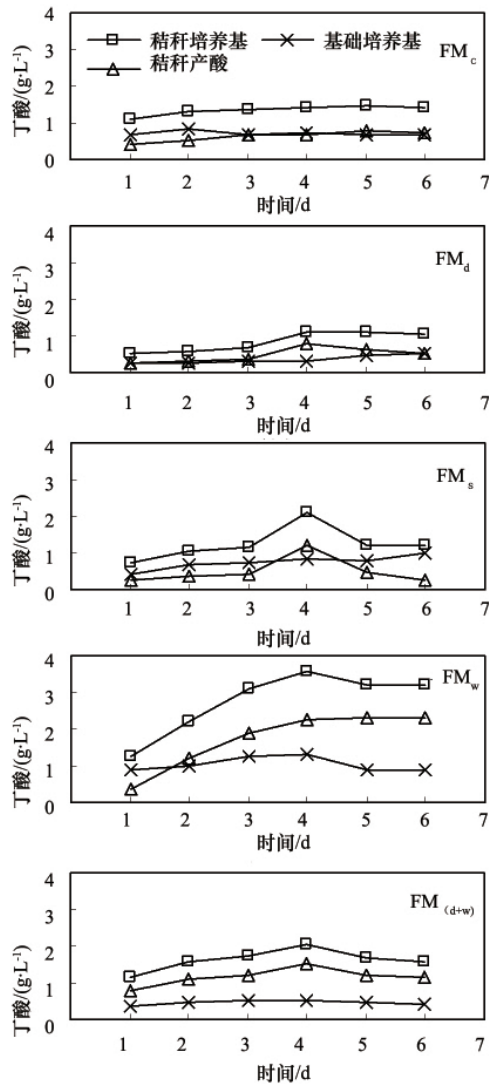


图3 发酵系统中丁酸浓度的历时变化

Fig. 3 Butyric acid yield in the mixed culture fermentation systems

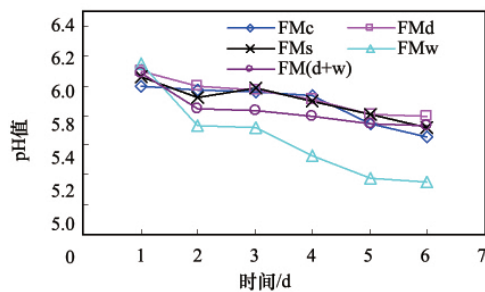


图4 秸秆发酵系统中的pH值历时变化

Fig. 4 pH in rice straw fermentation systems

2.3 秸秆失重率

如图5所示,经过6d的培养,FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)秸秆发酵系统中的秸秆质量由初始的1.2g分别降至

0.88,0.85,0.86,0.64和0.88g,其秸秆失重率分别为26.5%,29.1%,28.3%,46.4%和26.8%。显然,菌群FM_w比其他4个菌群具有更强的秸秆降解能力。

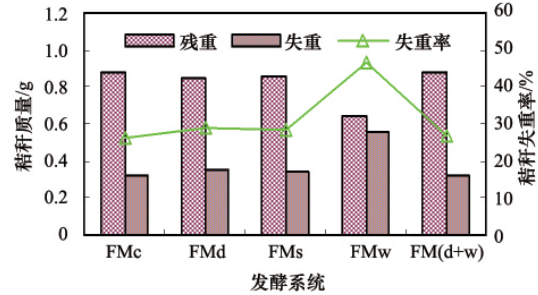


图5 发酵产酸系统中的秸秆失重率

Fig. 5 Rate of lost-straw in rice straw fermentation systems

2.4 发酵秸秆产酸性能综合分析

为优选出适合于秸秆发酵产酸(总挥发酸)、产乙酸和产丁酸的菌群,对复合菌群FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)降解单位质量秸秆的比产酸率进行了比较分析(表1)。结果表明,菌群FM_w对秸秆的降解能力最强,经6d发酵,其秸秆失重率达到了46.4%,而其他4个菌群均未能超过30%。尽管菌群FM_w表现出了很强的降解秸秆能力,但其利用秸秆发酵的产酸能力并不突出。所试5个菌群发酵秸秆产生总挥发酸的能力依次为FM_(d+w)>FM_c>FM_s>FM_d>FM_w,其降解单位质量秸秆的总挥发酸比产率最高分别为0.64,0.61,0.58,0.53和0.34g/g;产乙酸能力依次为FM_d>FM_c>FM_s>FM_(d+w)>FM_w,最高分别为0.35,0.33,0.23,0.18和0.04g/g;产丁酸能力为FM_(d+w)>FM_w>FM_s>FM_c>FM_d,最高分别为0.48,0.42,0.36,0.24和0.23g/g。因此,在5个菌群中,FM_(d+w)适宜于发酵秸秆产总挥发酸和丁酸,而FM_d则适合用于发酵秸秆产乙酸。

表1 秸秆发酵菌群的比产酸率

Table 1 Specific volatile fatty acid production rate of the mixed cultures

	发酵系统				
	FM _c	FM _d	FM _s	FM _w	FM _(d+w)
初始秸秆质量/g	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
秸秆失重/g	0.32	0.35	0.34	0.56	0.32
失重率/%	26.5	29.1	28.3	46.4	26.8
总挥发酸最高浓度/(g·L ⁻¹)	1.95	1.86	1.98	1.90	2.06
总挥发酸最大比产率/(g·g ⁻¹)	0.61	0.53	0.58	0.34	0.64
乙酸最高浓度/(g·L ⁻¹)	1.05	1.24	0.80	0.23	0.59
乙酸最大比产率/(g·g ⁻¹)	0.33	0.35	0.23	0.04	0.18
丁酸最高浓度/(g·L ⁻¹)	0.77	0.79	1.21	2.31	1.53
丁酸最大比产率/(g·g ⁻¹)	0.24	0.23	0.36	0.42	0.48

经热碱预处理后的稻草秸秆,其主要成分为纤维素和半

纤维素^[14-15]。微生物对纤维素的利用,首先需要分泌胞外纤维素酶对纤维素进行酶解。由于蛋白胨和酵母粉可为微生物增殖代谢提供较为全面的营养条件,所试5个菌群在基础培养基中均表现出了良好的代谢能力,产生大量的VFAs(图1)。菌群在秸秆培养基中培养时,首先会利用其中的蛋白胨增殖代谢并分泌包括纤维素酶在内的多种胞外酶,进而催化了纤维素的酶解并产生葡萄糖,而葡萄糖经不同的代谢途径被微生物进一步转化为乙酸、丁酸等多种有机挥发酸(图2、图3)。

葡萄糖是最容易被微生物吸收转化的碳源,发酵系统中一旦有葡萄糖产生就会被立即转化,因此纤维素的酶解是秸秆纤维素产酸发酵的限速步骤。按催化反应的最适pH值,纤维素酶可分为酸性纤维素酶、中性纤维素酶和碱性纤维素酶,其最适pH值分别为4.5—5.5,6—8和8—11^[16]。在本实验中,所有秸秆发酵系统在第6天培养结束时pH值大于5.3(图4),而秸秆失重率只有FM_w发酵系统达到46.4%,其余4个菌群发酵系统均不足30%(图5)。这一结果说明,所培育的5个复合菌群所分泌的纤维素酶主要是中性纤维素酶,而缺乏酸性纤维素酶。由图4可见,所有秸秆发酵系统的pH值在第2天已经降低到了6以下。在系统中VFAs不断积累和pH值逐渐下降的过程中,中性纤维素酶的活性被逐步抑制,纤维素的酶解也随之停止。而在缺乏葡萄糖的条件下,复合菌群的一些细菌就会利用发酵产生的VFAs作为碳源进行增殖代谢,因此各发酵系统中的VFAs都在培养的最后2d出现了下降趋势。有趣的是,系统的pH值并未因此出现回升趋势(图4),其原因有待进一步的研究探明。

另外,利用现代分子生物学技术对产总酸和产丁酸能力最强的FM_(d+w)及产乙酸能力最强的FM_d进行菌群结构的解析是必要的,以此为指导,可有针对性地对菌群进行耐酸性的驯化(激发酸性纤维素酶),以及营养条件和环境条件的优化,达到进一步提高目标挥发酸得率的目的。

3 结论

(1) 以牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤、腐木以及猪粪堆肥与腐木的混合物为接种物,通过传代富集培养获得了5个秸秆发酵产酸复合菌群,即FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w),其中FM_w具有最高的秸秆降解能力,FM_(d+w)具有最高的总酸和丁酸生产能力,而FM_d在发酵秸秆产乙酸方面的性能比较突出。

(2) 复合菌群FM_(d+w)发酵秸秆可获得的最大挥发酸比产率和最大丁酸比产率分别为0.64g/g和0.48g/g,复合菌群FM_d发酵秸秆时的最大乙酸比产率为0.35g/g。

(3) FM_c、FM_d、FM_s、FM_w和FM_(d+w)菌群均缺乏酸性纤维素酶活性,极大限制了其秸秆降解率和秸秆的比产酸率,需要进一步的耐酸驯化和培养条件优化,以提高目标挥发酸的生产能力。

参考文献 (References)

[1] 周莺,尹新. 乙酸生产现状与市场分析[J]. 化学工业与工程技术, 2003,

24(2): 27-31.

Zhou Ying, Yin Xin. *Journal of Chemical Industry & Engineering*, 2003, 24(2): 27-31.

[2] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, et al. Microbial production of organic acids: Expanding the markets[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(2): 100-108.

[3] 沈菊华. 国内外醋酸生产应用及市场分析[J]. 石油化工技术经济, 2003, 19(6): 26-30.

Shen Juhua. *Techno-Economics in Petrochemicals*, 2003, 19(6): 26-30.

[4] 徐国强,刘立明,陈坚. 酿酒酵母生产羧酸的代谢工程策略[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1571-1577.

Xu Guoqiang, Liu Liming, Chen Jian. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1571-1577.

[5] 崔胜先,董仁杰. 农作物秸秆能源产品结构优化[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(11): 63-69.

Cui Shengxian, Dong Renjie. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(11): 63-69.

[6] 王凯,谢小来. 农作物秸秆复合处理技术的研究进展[J]. 饲料博览, 2012, 2: 14-17.

Wang Kai, Xie Xiaolai. *Feed Review*, 2012, 2: 14-17.

[7] Ekman A, Börjesson P. Environmental assessment of propionic acid produced in an agricultural biomass-based biorefinery system[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2011, 19(11): 1257-1265.

[8] Binod P, Sindhu R, Singhania R R, et al. Bioethanol production from rice straw: An overview[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4767-4774.

[9] 李玉英,胡雪竹,李晓明,等. 不同秸秆沼气发酵高效产酸复合菌系的筛选[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(11): 6670-6672.

Li Yuying, Hu Xuezhuzhu, Li Xiaoming, et al. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(11): 6670-6672.

[10] Greenberg A E. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. 19th ed. Washington D C: American Public Health Association, 1995.

[11] 李建政,王卫娜,马超,等. 丁酸甲烷发酵优势菌群的选育及其丁酸降解特性[J]. 科技导报, 2008, 26(11): 49-52.

Li Jianzheng, Wang Weina, Ma Chao, et al. *Science & Technology Review*, 2008, 26(11): 49-52.

[12] van Soest P J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin [J]. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 1963, 46: 829-835.

[13] 李定龙,戴肖云,赵宋敏,等. pH对厨余垃圾厌氧发酵产酸的影响[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(4): 125-128.

Li Dinglong, Dai Xiaoyun, Zhao Songmin, et al. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(4): 125-128.

[14] 覃国栋,刘荣厚,孙辰. NaOH预处理对水稻秸秆沼气发酵的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(S1): 59-63.

Qin Guodong, Liu Ronghou, Sun Chen. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(S1): 59-63.

[15] 陈广银,郑正,罗艳,等. 碱处理对秸秆厌氧消化的影响[J]. 环境科学, 2010, 31(9): 2208-2213.

Chen Guangyin, Zheng Zheng, Luo Yan, et al. *Environmental Science*, 2010, 31(9): 2208-2213.

[16] 魏艳丽,李红梅,李纪顺,等. 产碱性纤维素酶芽孢杆菌ZA-05的分离及功能基因克隆[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(18): 3859-3863.

Wei Yanli, Li Hongmei, Li Jishun, et al. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(18): 3859-3863.

(责任编辑 岳臣)