秸秆混菌厌氧链延长生产中链脂肪酸: pH调控作用

朱孔云, 党超, 张雷*, 李爱民

大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024

* 联系人, E-mail: zhanglei78@dlut.edu.cn

2020-07-09 收稿, 2020-08-04 修回, 2020-08-04 接受, 2020-08-06 网络版发表

国家自然科学基金(51978123)资助

摘要 混菌发酵系统中微生物菌群和代谢路径有效调控是制取中链脂肪酸的关键. 本研究以厌氧发酵重要参数pH为调控因子, 考察pH对秸秆初次和二次厌氧发酵中有机酸生成的影响规律, 并采用16S rRNA高通量测序分析微生物群落变化, 解析pH调控与产酸性能和微生物群落之间的关系. 结果表明, pH调控对秸秆初次发酵产酸性能有显著影响, 酸性和中性条件有利于链延长反应, 产物以丁酸和己酸为主(80%以上). 然而, 碱性条件严重抑制链延长反应, 产物以乙酸(93.2%)和丙酸(5.5%)为主, 无己酸生成. 二次发酵结果表明, 在酸性条件下(pH 5.6)二次发酵链延长无法进行, 而pH从5.6调至7.0后, 己酸浓度从1.88 g/L快速升高到11.8 g/L. 微生物群落分析表明, 链延长直接相关的菌属, 如*Clostridium IV*, *Clostridium XI*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, *Clostridium XVIII*和*Clostridium sensu stricto*等, 在中性和酸性条件下的丰度显著高于碱性条件. 另外, 二次发酵中pH调节并未显著改变链延长相关菌群的丰度, 表明链延长微生物活性恢复是产己酸的诱因. 本研究发现可为混菌发酵体系内复杂微生物群落的定向调控生产中链脂肪酸提供借鉴.

关键词 秸秆, 链延长, 中链脂肪酸, pH影响, 微生物群落

近来, 以废弃生物质为原料通过生物转化制备高附加值液体燃料和化学品引起广泛关注^[1-3]. 基于羧酸平台(carboxylate platform)的混菌厌氧产酸发酵, 与传统以乙醇发酵为代表的糖平台(sugar platform)和纯菌发酵比, 其优势在于可直接利用复杂的或非糖类的有机物, 不仅拓展了原料来源, 也大幅降低了酶解处理和灭菌操作的费用, 可实现高效、低成本生产有机酸的目的^[2,3]. 厌氧酸发酵产物可作为污水生物脱氮除磷工艺的碳源和生产可降解塑料(polyhydroxyalkanoates, PHA)的原料^[1], 或分离提纯后, 通过MixAlco等化学催化工艺转化成液体燃料^[3]. 然而, 目前发酵产物多局限于乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs), 由于混合酸组分复杂、碳链短、能量

密度低、水溶性高, 有机酸提取成本高, 加之产品附加值偏低, 整个工艺的经济性仍有待提高.

着眼于提高厌氧酸发酵经济性, 一种*Clostridium kluyveri*菌通过厌氧发酵链延长反应(chain elongation, CE)将SCFAs与电子供体结合转化成中链脂肪酸(medium-chain fatty acids, MCFAs)的过程逐渐引起重视. 厌氧发酵链延长过程实质上是传统厌氧甲烷化降解过程中 β 氧化的逆过程. 在逆 β 氧化过程中, 当乙醇做电子供体时, 乙醇转化为乙酰辅酶A, 乙酰辅酶A与乙酸化过程的产物乙酸盐结合形成丁酸盐. 丁酸盐再进一步与乙酰辅酶A结合形成己酸盐, 以此类推, 碳链上每次增加2个碳原子^[4]. 最终产品MCFAs是碳链长度为6~12个碳的饱和脂肪酸, 如己酸(C₆), 庚酸(C₇), 辛酸(C₈),

引用格式: 朱孔云, 党超, 张雷, 等. 秸秆混菌厌氧链延长生产中链脂肪酸: pH调控作用. 科学通报, 2020, 65: 2903-2913

Zhu K Y, Dang C, Zhang L, et al. Anaerobic chain elongation of cornstalk for MCFAs production via mixed culture: pH regulation (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 2903-2913, doi: 10.1360/TB-2020-0855

癸酸(C₁₀)等. MCFAs是一种功能性化学品, 可用作各种应用的结构单元, 如溶剂、燃料、润滑剂、食品添加剂、塑料和染料, 因此它被广泛应用于食品、医药、工业等多个领域, 应用价值极高. 该厌氧链延长过程的引入不仅大幅提高了产品的附加值, 而且从技术角度, 随着碳链的增长, 其疏水性增加, 进而降低后续的产物分离成本, 具有较好的技术和经济前景.

混菌厌氧发酵中对发酵过程和产物的定向代谢调控, 是实现高转化率和高选择性制取MCFAs的关键. 相对于纯菌发酵链延长, 混菌厌氧发酵链延长反应制取MCFAs更具实际价值. 对于开放的混菌发酵系统来说, 体系内微生物种类极为丰富, 加之通常底物多为复杂的有机物, 底物的代谢路径也多样化, 如不能进行有效调控, 将导致厌氧发酵的中间产物和最终产品种类繁多. 从制取目标产品的角度来说, 将降低产品的附加值和增加后续的分离提纯成本. 另外, 高浓度有机酸和乙醇抑制微生物菌群的活性, 导致生产效率低, 需要有效的调控手段提高活性^[5].

pH作为厌氧发酵过程中的一个重要因素, 在微生物菌群富集和代谢调控中发挥重要作用. 首先, pH对混菌发酵过程中的微生物菌群具有直接选择性. 不同的微生物菌群具有差异化的最适pH, 例如产甲烷菌的最适pH范围在6.5~7.5, 而发酵菌的pH范围较广, 在pH 4.0~10.0皆可保持较高产酸活性^[6]. 目前研究表明, 以乙醇为电子受体时, *Clostridium kluyveri*在pH 6.4~7.5之间皆可保持较高的链延长活性^[7]. 其次, pH可通过改变环境中物质的存在形态及其毒性, 而对菌群产生筛选作用. 在pH为7时, 厌氧发酵系统中以非解离形式存在的有机酸不足1%; 而当pH为6时, 非解离有机酸占到5%~7%; 当pH降到5时, 非解离有机酸的含量增加到36%~44%^[8]. 非解离态羧酸盐的毒性显著大于解离态羧酸盐, 从而可对菌群结构产生明显影响^[7]. 最后, pH可通过影响微生物细胞内酶的活性和稳定性, 而影响微生物细胞的代谢途径和代谢活性^[9]. 例如, 根据pH的不同, 酸化产酸过程可分为pH 5.5~6.5的丁酸发酵、pH 4.5~5.5的混合酸发酵和pH 4.0~4.5的乙醇发酵^[10]. 厌氧发酵链延长过程作为一个新兴领域, 目前仍缺乏系统的研究, 而且在混菌发酵体系内, pH对复杂微生物群落的富集筛选和代谢路径的调控可能产生更深远的影响.

本研究以废弃秸秆为原料, 采用新型的混菌厌氧发酵链延长方法制备高附加值的MCFAs, 具体考察pH调控对秸秆初次厌氧发酵和二次发酵链延长过程中有

机酸浓度变化和频谱分布的影响, 并采用16S rRNA高通量测序手段分析典型条件下微生物群落的变化规律, 建立pH调控与链延长产酸性能和微生物群落之间的响应关系.

1 实验

(i) 实验材料. 玉米秸秆取自辽宁省大连市郊区某玉米田, 原料秸秆经105℃烘干24 h后, 进行破碎、筛分, 取100目以下均质物料, 常温密封保存备用. 玉米秸秆的挥发分含量为90.4%, C、H和N元素含量分别为43.81%、5.67%和0.92%. 接种泥取自大连市某污泥厌氧消化处理厂, 初始pH 7.6±0.1, 总固体(total solid, TS)和挥发性固体(volatilile solid, VS)含量分别为(72.6±0.1)和(34.7±0.2) g/L.

(ii) pH对秸秆初次厌氧发酵产有机酸性能的影响. 实验采用160 mL血清瓶作为厌氧发酵反应器, 以玉米秸秆为底物, 乙醇为电子供体, 设置底物浓度为50 g/L, 乙醇浓度为10 g/L, 接种泥浓度为7 g/L. 装瓶结束后, 利用5.0 mol/L NaOH和5.0 mol/L的HCl将厌氧发酵体系pH分别调至5.6和9.0. 另外, 设置pH不调组(中性条件)做对照. 最后, 用丁基胶塞和铝盖密封, 并用氮气吹扫1 min后, 倒置放入37.0℃恒温摇床(转速150 r/min). 每24 h调节一次各体系pH, 同时取发酵污泥混合液, 测定上清液中有有机酸浓度. 所有条件进行两次平行实验. 具体实验设计和流程见图1.

(iii) pH对二次厌氧发酵链延长过程的影响. 为进一步验证二次补料过程中pH的影响, 在20 d初次发酵实验结束后, 将pH 5.6条件下初次发酵液的平行样品进行混合并分成两组. 一组仍维持在pH 5.6, 另一组将pH调至中性(7.0), 并按照电子供体和丁酸摩尔当量比1.2的比例重新加入4.72 g/L乙醇. 每24 h调节一次体系pH, 同时取发酵污泥混合液测定有机酸浓度变化.

(iv) 分析测试方法. 液体样品的TS、VS依照美国公共卫生协会发布的《水和废水分析的标准方法》(2017年版)^[11]进行测定. 固体样品的挥发分采用自动工业分析仪(HNGYFX-610, 鹤壁市华能电子科技有限公司)进行测定. 样品中的C、H、N等元素组成采用德国Elementar公司的Vario EI III型元素分析仪进行测定. pH采用PB-10型pH计(德国赛多利斯公司)测量.

发酵液中的乙醇和有机酸采用气相色谱法测量. 首先, 发酵污泥混合液在14000 r/min条件下离心10 min, 取100 μL上清液, 分别加入400 μL去离子水、

图1 秸秆厌氧发酵链延长实验设计和流程

Figure 1 Experimental design and process in anaerobic chain elongation fermentation with stalk

100 μL H_3PO_4 溶液(20wt%, 质量比)、100 μL 2-乙基-丁酸溶液(1 g/L, 内标), 于 -20°C 冷冻保存待测. 制备的样品采用气相色谱仪(GC7900, TECHCOMP, 上海)进行测定, 此仪器配置氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)和FFAP(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)型毛细管柱, 以高纯氮气为载气. 气相色谱进样口和检测器温度分别设为250和260 $^\circ\text{C}$. 柱箱温度采用程序升温: 初始温度60 $^\circ\text{C}$ 停留1 min, 然后以5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升至200 $^\circ\text{C}$ 并保持1 min.

(v) 16S rRNA高通量测序. 将4 mL发酵污泥液体样品, 分多次加入2 mL灭菌离心管中, 在10000 r/min室温条件下离心3 min, 弃置上层液体后, 倒置于吸水纸上1 min, 至无液体流出. 离心后的污泥样品采用OMEGA公司的E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit DNA提取试剂盒进行基因组DNA提取. 利用Qubit 3.0 DNA检测试剂盒对提取DNA进行精确定量, 以确定聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的DNA加入量. 以341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')为扩增引物, 对V3-V4区域进行PCR扩增. 扩增产物采用Transgen公司的MagicPure Size Selection DNA Beads纯化试剂盒进行DNA纯化回收, 并利用Qubit 3.0 DNA检测试剂盒对回收DNA进行精确定量. 最后, 经定量混样后, 采用Illumina Miseq平台进行高通量测序. 此过程由生工生物工程(上海)股份有限公司帮助完成. 进行高通量测序的样品包括接种污泥、一次厌氧发酵链延长样品(pH 不调、pH 5.6、pH 9.0)和二次厌氧发酵链延长样品(pH

5.6和pH 7.0).

(vi) 非解离态有机酸浓度计算. 厌氧发酵链延长过程中非解离态有机酸的浓度计算:

$$[A] = [A^-] + [HA], \quad (1)$$

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} = 10^{-\text{p}K_a}, \quad (2)$$

$$[HA] = \frac{[H^+]}{[H^+] + [K_a]}[A], \quad (3)$$

其中, $[A]$ 为有机酸浓度, $[A^-]$ 为解离态有机酸浓度, $[HA]$ 为非解离态有机酸浓度, $[H^+]$ 为氢离子浓度($10^{-\text{pH}}$), K_a 为有机酸的解离常数, $\text{p}K_a$ 为 $\log K_a$. 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸 $\text{p}K_a$ 分别为4.756, 4.87, 4.83, 4.83, 4.85, 4.89和4.89^[8].

2 结果与讨论

2.1 pH对秸秆初次厌氧发酵产有机酸性能的影响

图2和3分别表示不同pH条件下秸秆厌氧发酵产生的偶数碳和奇数碳有机酸浓度变化. 当不调pH时(近中性), 乙酸浓度在前3 d内逐渐增加, 第3 d时达到(7.50 $\pm$ 0.09) g/L, 随后保持稳定; 在第5~8 d, 乙酸浓度开始逐渐下降, 第8 d时降为(1.85 $\pm$ 0.31) g/L. 与此同时, 丁酸的浓度从第5 d开始逐渐增加, 第8 d增至(8.55 $\pm$ 0.38) g/L. 己酸浓度同样从第5 d开始明显增加, 第8 d增至(3.49 $\pm$ 0.17) g/L. 作为电子供体的乙醇浓度在前5 d缓慢降低, 在第5~8 d之间, 下降速度明显加快, 第

图2 不同pH下秸秆厌氧发酵中乙醇(a)、乙酸(b)、丁酸(c)和己酸(d)浓度变化

Figure 2 The concentration of ethanol (a), acetate (b), butyrate (c) and caproate (d) in anaerobic fermentation of cornstalk with pH control

8 d时几乎消耗完. 经过8 d的初次发酵反应后, 乙酸、丁酸和己酸浓度均趋于稳定. 由乙酸、丁酸和己酸的浓度变化与乙醇消耗的对应关系可见, 初始pH不调时, 秸秆初次发酵产物以乙酸为主, 随后生成的乙酸以乙醇为电子供体通过厌氧链延长形成丁酸和己酸, 当电子供体乙醇消耗完后, 各有机酸浓度趋于稳定. 对于以丙酸为代表的奇数碳有机酸也呈现类似的链延长特性. 经过8 d的反应时间, 丙酸、戊酸和庚酸的浓度分别达到 (0.850 ± 0.003) 、 (0.237 ± 0.024) 和 (0.0624 ± 0.0146) g/L. 以上结果表明, 在初始为中性条件下, 秸秆经过初次发酵可生成较高浓度的己酸 (3.49 ± 0.17) g/L, 而且也有一定浓度更高碳数的庚酸生成.

当pH 5.6时, 乙酸在前6 d内缓慢增加, 第6 d时达到 (3.42 ± 0.31) g/L, 在第6~13 d内逐渐降低, 之后基本保持稳定. 丁酸和己酸在第6~13 d则明显增加, 最大值分别达到 (6.94 ± 0.33) 和 (1.82 ± 0.17) g/L, 之后基本保持稳定. 乙醇浓度在前6 d缓慢降低, 第6~8 d内降低速度明显加快, 之后基本保持稳定. 乙醇、乙酸浓度的降低与丁酸、己酸的增加有明显的对应关系, 证明乙酸和乙醇通过链延长反应生成丁酸和己酸. 丙酸的浓度变化与乙酸类似, 在前6 d内缓慢增加, 第6 d时达到最大值

(0.139 ± 0.006) g/L, 第6~13 d内逐渐降低, 之后保持稳定. 对应的戊酸在7~13 d内稍有增加, 最大值为 (0.0850 ± 0.0022) g/L. 然而, 并未发现有庚酸产生. 以上结果表明, 酸性条件下(pH 5.6), 秸秆发酵同样产生乙酸和丙酸, 产生的乙酸和丙酸以乙醇为电子供体通过链延长反应进一步生成丁酸、己酸和戊酸. 但是, 与初始pH为中性相比, SCFAs和MCFAs的产生均受到一定程度抑制, 其中, 秸秆初次发酵产生的乙酸和丙酸浓度明显降低, 且链延长产生丁酸、己酸和戊酸的时间滞后, 最终产物浓度也明显降低.

当初始pH 9.0时, 乙酸在前4 d内快速增加, 在第4 d时达到 (13.9 ± 0.4) g/L, 随后增加速度变缓, 但是从第7 d开始乙酸浓度再次快速上升, 第11 d时达到最大值 (17.1 ± 0.9) g/L, 之后基本保持稳定. 整个初次发酵期间, 乙酸浓度并未出现降低的现象. 丙酸浓度同样持续增加, 第17 d时达到最大值 (1.03 ± 0.02) g/L. 虽然乙醇在整个过程中逐渐降低, 第17 d时降至 (3.21 ± 1.88) g/L, 但几乎没有丁酸、己酸、戊酸和庚酸产生. 以上结果表明, 碱性条件下秸秆初次发酵的产酸特性与酸性条件和近中性条件下有显著差异, 可产生更高浓度的以乙酸和丙酸为代表的SCFAs, 但不能产生高碳的丁酸、戊

图3 不同pH下秸秆厌氧发酵中丙酸(a)、戊酸(b)、庚酸(c)浓度变化
Figure 3 The concentration of propionate (a), valerate (b) and heptanoate (c) in the anaerobic fermentation of cornstalk with pH control

酸、己酸,表明碱性条件下链延长反应无法有效进行。

图4所示为不同pH下,秸秆发酵产生的总有机酸浓度及各有机酸分布情况。由图4可知,最终总有机酸浓度随着初始pH的升高而升高,初始pH 5.6时,总有机酸的浓度为10.0 g/L,初始pH为中性时,总有机酸的浓度为15.9 g/L,进一步升高初始pH 9.0时,总有机酸的浓度高达18.8 g/L。此结果表明,酸性条件不利于有机酸的产生,而碱性条件则对有机酸的产生具有促进作用。这可能是由于产生的有机酸在不同pH条件下的存在形态

图4 不同pH下秸秆厌氧发酵中总挥发性脂肪酸浓度及各脂肪酸频谱分布
Figure 4 The concentrations of total volatile fatty acids and spectra of fatty acids in anaerobic fermentation of cornstalk with pH control

对厌氧发酵微生物产生了差异化的影响,研究表明非解离态有机酸对细胞的毒性作用比解离态有机酸更强^[5]。理论计算结果发现,在酸性条件下(pH 5.6)的非解离有机酸浓度为1.45 g/L,而碱性条件下(pH 9)的非解离有机酸浓度为0.00108 g/L,仅为酸性条件下的1/1343。此外,碱性条件促进秸秆中木质素与纤维素和半纤维素的解构,使其生物可利用性得到明显提高,可能是秸秆产酸提高的另一个原因^[12]。

同样, pH对有机酸产物的频谱分布产生显著影响。当初始pH 5.6时,丁酸为主要产物,其含量达到75.8%,其次为己酸(19.5%)、乙酸(1.9%)、辛酸(1.1%)、戊酸(0.9%)和丙酸(0.7%)。表明酸性条件下,链延长过程产生的丁酸和己酸所占比例较高(95.3%)。当初始pH为中性时,丁酸是主要产物,其含量达到55.3%,其次为己酸(25.0%)、乙酸(11.0%)、丙酸(5.5%)、戊酸(1.6%)、辛酸(1.3%)和庚酸(0.4%),该条件下丁酸和己酸占比达80.9%。进一步提高初始pH 9.0时,乙酸为主要产物,在产生的有机酸中占比高达93.2%,其次为丙酸(5.5%)和丁酸(1.0%),未检测到链延长产物己酸和庚酸。该结果表明,通过厌氧发酵体系pH的调控可实现定向生产特定种类的有机酸。

综上,在初始酸性和中性条件下,秸秆初次发酵可产生大量乙酸和丙酸,并通过以乙醇为电子供体的链延长反应进一步转化成丁酸、己酸和戊酸、庚酸等,而碱性条件虽然促进了总有机酸的产生,但抑制了链延长反应,导致秸秆初次发酵产物以短链的乙酸和丙酸为主。

2.2 pH对二次厌氧发酵链延长过程的影响

考虑到秸秆初次发酵后期生成大量的乙酸、丙酸和丁酸等有机酸,而电子供体乙醇已消耗殆尽,为了获得更高浓度的己酸等中长链有机酸,通过补给乙醇进行了二次发酵链延长反应.为进一步验证二次补料过程中pH的影响,以pH 5.6条件下20 d初次发酵液为原料液,将初次发酵液分成两组,一组仍维持在pH 5.6,另一组将pH调至中性(pH 7.0),并补加4.72 g/L乙醇作为电子供体进行二次厌氧发酵链延长.二次厌氧发酵过程中的有机酸浓度变化如图5所示.未进行pH调节的酸性发酵液(pH 5.6),乙醇浓度仅缓慢降低,而乙酸浓度也仅仅略有增加,可能由于部分乙醇氧化成了乙酸^[13].另外,丁酸和己酸浓度则基本保持不变,表明链延长反应未能有效发生.这可能是由于酸性条件下,产生高浓度己酸及其他有机酸对链延长微生物产生严重的抑制作用.此结果表明,虽然酸性条件下秸秆初次发酵可以发生链延长反应,但是随着产物积累,产物抑制逐渐加强,二次厌氧发酵链延长过程受到严重抑制.

当二次发酵初始pH调为7.0以后(图5(b)),乙醇在前6 d内快速从4.72 g/L降低到0.186 g/L,同时丁酸浓度也快速从6.92 g/L降低到3.01 g/L,而己酸则相应迅速从1.88 g/L逐渐增加到10.6 g/L,且在第12 d时达到最高浓度11.8 g/L.通过对整个二次发酵过程中乙醇、乙酸、丁酸和己酸摩尔浓度变化进行计算,发现乙醇和丁酸的消耗量分别为11.5和4.64 mmol,乙酸产量增加了0.808 mmol,而己酸的产量达到8.25 mmol.己酸产量明显高于乙醇和丁酸消耗产生的理论己酸量,这意味着乙醇不仅仅用于碳链延长的电子供体,还氧化为乙酸^[13],新生成的乙酸也进行链延长反应生成己酸.同时推测第一阶段后期的发酵液中可能有大量链延长中间产物如乙酰辅酶A等物质存在,这部分乙酰辅酶A等物质在酸性条件下不能被微生物利用与丁酸结合成己酸,只有当pH调高至中性时,微生物才将这部分乙酰辅酶A与丁酸结合产生己酸.这可能是由于酸性条件下的游离有机酸的底物抑制作用,使链延长过程无法继续进行,当pH调到中性条件后,非解离态的有机酸向低毒性的解离态有机酸转化,抑制作用得到缓解,链延长过程得以继续进行.游离有机酸的理论计算结果也证明了此种猜测.比如,当pH 5.6时,反应器中非解离脂肪酸浓度为1.30 g/L,而当pH调到7.0以后,非解离脂肪酸的浓度降至0.06 g/L.以上结果表明,在酸性条件下即

图5 pH对二次厌氧发酵链延长性能的影响. (a) 在pH始终为5.6条件下,链延长发酵中乙醇消耗和SCFAs浓度变化; (b) pH从5.6调至7.0前后厌氧发酵链延长中乙醇消耗和SCFAs浓度变化; (c) pH调节前后己酸浓度变化

Figure 5 Effect of pH on two-stage anaerobic fermentation for chain elongation. (a) Concentrations of ethanol and short-chain fatty acids in the fermentation process at a constant pH 5.6; (b) concentrations of ethanol and short-chain fatty acids in the chain elongation fermentation before and after the pH change from 5.6 to 7.0; (c) the concentration of caproate before and after pH adjustment

使加入乙醇作为电子供体,受限于有机酸对微生物的抑制作用,导致链延长反应仍然无法发生;而将pH调至中性可有效激活链延长微生物的活性,促进二次厌

氧发酵链延长反应的发生,从而达到获取高选择性、高浓度己酸等中链有机酸的目的。值得注意的是,碱性条件下,产酸效率最高,是否也可以通过初次发酵产生高浓度的短链有机酸,然后再通过pH调节和乙醇补加的二次发酵链延长达到高效生产MCFAs的目的,值得进一步研究。

2.3 pH对秸秆混菌厌氧发酵系统中微生物群落的影响

不同pH下的微生物相对菌群丰度如图6所示。原始接种污泥中,厚壁菌门(*Firmicutes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌群。pH不调时(中性条件),经20 d的初次厌氧发酵链延长, *Firmi-*

cutes、*Chloroflexi*和*Proteobacteria*依然是优势菌群,其中*Firmicutes*得到明显富集,相对菌群丰度从31.5%升至49.9%。*Firmicutes*在复杂有机物如脂类、蛋白质和大分子碳水化合物水解和酸化中发挥重要作用^[14,15]。此外,*Firmicutes*是链延长过程的重要参与者,目前已发现的主要链延长菌株均属于*Firmicutes*^[16]。*Firmicutes*菌群中,*Clostridia*是主要菌群,其相对丰度达到40.3%,远高于其他反应器(接种泥中为18.3%, pH 5.6中为26.3%, pH 9.0中为28.1%)。据报道, *Clostridia*菌群能够利用各种碳水化合物,将其转化为小分子有机酸,包括复杂纤维素、己糖和戊糖等^[17,18]。当pH 5.6时, *Firmicutes*、*Chloroflexi*和*Proteobacteria*同样为优势菌群,但与初始pH为中性的相比, *Firmicutes*和*Chloroflexi*的菌群丰度

图6 不同pH下一次厌氧发酵链延长(a)和二次厌氧发酵链延长(b)中微生物菌群在门水平和纲水平的相对丰度

Figure 6 The relative abundances of microbial community at the phylum and class levels at different pH in the first stage (a) and second stage (b)

有所降低,分别为36.6%和14.8%,而*Proteobacteria*的菌群丰度有所增加,为20.4%。在pH 9.0时,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)相对丰度明显增加,菌群丰度达到40.7%,成为优势菌群之一。据报道,*Bacteroidetes*的发酵细菌,可以抵抗极端pH条件,在碱性条件有机物水解和发酵过程中发挥重要作用^[19]。以上菌群的差异可能是导致秸秆初次发酵过程中产生有机酸差异较大的原因,特别是碱性条件下,*Firmicutes*丰度的降低可能是无链延长反应发生的原因。

在电子供体乙醇加入情况下的二次厌氧发酵链延长过程中,pH 5.6条件下,*Firmicutes*和*Chloroflexi*的菌群丰度进一步降低,而*Proteobacteria*的菌群丰度则进一步增加,分别达到23.7%、9.6%和34.3%,说明酸性条件不利于*Firmicutes*和*Chloroflexi*的生长。当pH调为7.0时,*Firmicutes*和*Chloroflexi*的菌群丰度得到一定程度恢复(28.6%、12.3%),表明中性条件适合该类微生物的生长和活性恢复。pH调节前后微生物群落结构的变化也与二次厌氧发酵链延长过程中的产酸性能有很好的对应关系。

为进一步深入了解pH对厌氧发酵链延长过程的影响,对链延长直接相关的微生物进行了鉴别和定量分析。据报道,梭菌属(*Clostridium*)是链延长反应器中广泛富集的菌属^[14,15],其中*Clostridium IV*, *Clostridium XI*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, *Clostridium XVIII*和*Clostridium sensu stricto*被报道与链延长过程直接相关^[20],以上6种菌属的相对丰度如图7所示。在中性条件和酸性条件下,这6种菌属得到明显富集,其在原始接种泥中的总相对丰度仅为0.2%,而在中性和酸性条件下的总相对丰度分别为2.6%、4.1%。碱性条件下(pH 9.0),这6种菌属的总相对丰度与接种污泥比并未发生明显变化,仍为0.2%。以上结果表明,秸秆初次厌氧发酵链延长过程中链延长相关菌群的生长对链延长过程的发生起关键作用,在酸性和中性条件下可促进其富集生长,而在碱性条件下限制其繁衍。

在乙醇添加条件下的二次厌氧发酵链延长过程中,比较pH 5.6和pH 7.0条件下的菌群结构,上述6种链延长相关菌属的总相对丰度依然较高,且较为相似,分别为3.1%和2.9%。但是,pH 5.6条件下未发生链延长过程,而pH调到中性之后链延长效率大幅提高。该结果表明,除了体系内链延长功能微生物的丰度外,相关微生物的活性也起到重要作用。在酸性条件下,发酵产物中有机酸绝大部分以非解离的形态存在,非解离有机酸可

图7 不同pH下链延长相关菌属的相对丰度

Figure 7 Relative abundance of genus participating in chain elongation at different pH

严重抑制链延长菌的活性^[21,22]。在酸性条件下,虽然经过初次发酵富集链延长功能的微生物,但到反应后期由于非解离酸抑制导致其进入类似休眠状态,当pH从酸性调节到中性,非解离酸抑制消除后这部分微生物快速复活,促使厌氧发酵链延长快速重启。

与文献[4]比较,除了上述6种链延长相关菌群,一些纯菌培养生产MCFAs的典型菌株,如*Clostridium kluyveri*、*Eubacterium pyruvativorans*、*Clostridium* sp. BS-1、*Eubacterium limosum*、*Megasphaera elsdeni*、*Rhodospirillum rubrum*等,在所有反应器中均未检测到,表明其在微生物群落中缺失或丰度极低。这可能是因为混合培养发酵过程中,这些纯菌种的竞争力不如其他微生物^[16,20,23]。由此可见,混菌发酵中的链延长微生物菌群具有不同于纯菌发酵的特点,不同菌群间可能存在更为密切的协同作用关系。

3 结论

本研究以厌氧发酵的重要参数pH为调控因子,考察pH对秸秆初次厌氧发酵和二次发酵链延长过程中有机酸生成和频谱分布的影响,并采用16S rRNA高通量测序手段分析不同pH条件下微生物群落的变化规律,研究得到以下结论。(1) pH调控对秸秆初次厌氧发酵产酸效能和产物的频谱特性有显著影响。总有机酸从酸性pH(pH 5.6)的10.0 g/L逐渐升高到中性(pH 7.0)的15.9 g/L和碱性(pH 9.0)的18.8 g/L;酸性和中性条件有利于链延长反应,产物以丁酸和己酸为主(80%以上),尤其在中性条件下己酸浓度高达(3.49±0.17) g/L;而碱

性条件严重抑制了链延长反应,产物以乙酸(93.2%)和丙酸为主(5.5%),无己酸生成。(2) pH对于二次厌氧发酵链延长产生高浓度MCFAs更为关键。在酸性条件下,即使短链有机酸和电子供体充足也不能促进二次发酵链延长反应发生,而当二次发酵pH从5.6调至7.0以后,链延长反应可高效进行,己酸浓度从1.88 g/L迅速升高到11.8 g/L。(3) 在初始pH中性的条件下,产酸微生物 *Firmicutes* 占比达49.9%,且 *Firmicutes* 中的 *Clostridia* 占40.3%,远高于酸性和碱性条件。而且,链延长过程直

接相关的菌属,如 *Clostridium III*, *Clostridium IV*, *Clostridium IV*, *Clostridium XI*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, *Clostridium XVIII* 和 *Clostridium sensu stricto*, 在中性和酸性条件下的丰度显著高于碱性条件下(2.6%, 4.1% vs. 0.2%)。(4) 二次厌氧发酵过程中pH的调节并未显著改变链延长相关的菌群,表明酸性条件下非解离酸使链延长菌群处于类似休眠的状态,当pH从酸性调节到中性后,非解离酸抑制消除后这部分微生物快速恢复活性,促使厌氧发酵链延长快速重启。

参考文献

- Crutchik D, Frison N, Eusebi A L, et al. Biorefinery of cellulosic primary sludge towards targeted short chain fatty acids, phosphorus and methane recovery. *Water Res*, 2018, 136: 112–119
- Agler M T, Wrenn B A, Zinder S H, et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. *Trends Biotechnol*, 2011, 29: 70–78
- Smith A D, Landoll M, Falls M, et al. Chemical production from lignocellulosic biomass: Thermochemical, sugar and carboxylate platforms. In: Waldron K, ed. Bioalcohol Production. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2010. 391–414
- Angenent L T, Richter H, Buckel W, et al. Chain elongation with reactor microbiomes: Open-culture biotechnology to produce biochemicals. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 2796–2810
- Lonkar S, Fu Z, Holtzapple M. Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113: 2597–2604
- Yuan H, Chen Y, Zhang H, et al. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 2025–2029
- San-Valero P, Abubakar H N, Veiga M C, et al. Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production. *Bioresour Technol*, 2020, 300: 122659
- Dhaese C. Chain elongation by mixed microbial community: Key parameters for high value products generation. Master Dissertation. Ghent: Ghent University, 2015
- Yuan Y, Hu X, Chen H, et al. Advances in enhanced volatile fatty acid production from anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Sci Total Environ*, 2019, 694: 133741
- Srisowmeya G, Chakravarthy M, Nandhini D G. Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste—A review. *Renew Sustain Energy Rev*, 2020, 119: 109587
- Rice E W, Baird R B, Eaton A D, et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017
- You Z, Zhang S, Kim H, et al. Effects of corn stover pretreated with NaOH and CaO on anaerobic co-digestion of swine manure and corn stover. *Appl Sci*, 2019, 9: 123
- Spirito C M, Richter H, Rabaey K, et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 27: 115–122
- Zhao Z, Li Y, Quan X, et al. Improving the co-digestion performance of waste activated sludge and wheat straw through ratio optimization and ferrous oxide supplementation. *Bioresour Technol*, 2018, 267: 591–598
- De Vrieze J, Saunders A M, He Y, et al. Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Res*, 2015, 75: 312–323
- Wu Q, Bao X, Guo W, et al. Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: Current advances and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2019, 37: 599–615
- Song Z, Zhang C. Anaerobic codigestion of pretreated wheat straw with cattle manure and analysis of the microbial community. *Bioresour Technol*, 2015, 186: 128–135
- McDonald J E, Houghton J N I, Rooks D J, et al. The microbial ecology of anaerobic cellulose degradation in municipal waste landfill sites:

- Evidence of a role for fibrobacters. [Environ Microbiol](#), 2012, 14: 1077–1087
- 19 Tan R, Miyanaga K, Toyama K, et al. Changes in composition and microbial communities in excess sludge after heat-alkaline treatment and acclimation. [Biochem Eng J](#), 2010, 52: 151–159
- 20 Wu Q, Guo W, Bao X, et al. Upgrading liquor-making wastewater into medium chain fatty acid: Insights into co-electron donors, key microflora, and energy harvest. [Water Res](#), 2018, 145: 650–659
- 21 Vasudevan D, Richter H, Angenent L T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to *n*-caproate with reactor microbiomes. [Bioresour Technol](#), 2014, 151: 378–382
- 22 Ge S, Usack J G, Spirito C M, et al. Long-term *n*-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. [Environ Sci Technol](#), 2015, 49: 8012–8021
- 23 Kucek L A, Spirito C M, Angenent L T. High *n*-caprylate productivities and specificities from dilute ethanol and acetate: Chain elongation with microbiomes to upgrade products from syngas fermentation. [Energy Environ Sci](#), 2016, 9: 3482–3494

Summary for “秸秆混菌厌氧链延长生产中链脂肪酸: pH调控作用”

Anaerobic chain elongation of cornstalk for MCFAs production via mixed culture: pH regulation

Kongyun Zhu, Chao Dang, Lei Zhang^{*} & Aimin Li

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering (Ministry of Education), School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

^{*} Corresponding author, E-mail: zhanglei78@dlut.edu.cn

Anaerobic fermentation of waste biomass via microbial chain elongation for producing medium-chain fatty acids (MCFAs) is becoming an emerging and economically viable technology. However, due to the large abundant of microbial species and great diversity of microbial metabolic pathways in open cultures, how to achieve the high yields of MCFAs is an important topic. In this study, the effect of pH, as an important parameter for process control, on the production and composition of volatile fatty acids (VFAs) in two cycles of anaerobic chain elongation process with cornstalk as feedstock was investigated, and the 16S rRNA high throughput sequencing was employed to elucidate the mechanism of pH affecting chain elongation process. The results showed that pH significantly influenced the VFAs production and their spectra. At pH 5.6, the VFAs production was 10.0 g/L, which was increased to 15.9 g/L at pH 7.0, and was further increased to 18.8 g/L at pH 9.0. In addition, the metabolic pathways and the VFAs composition in anaerobic fermentation were greatly changed with pH regulation. Under acidic and neutral conditions (pHs of 5.6 and 7.0), the chain elongation was enhanced, and butyrate and caproate were the major products accounting for more than 80%. Specially, under the neutral condition, the caproate concentration reached (3.49±0.17) g/L. However, the pH of 9.0 seriously inhibited the chain elongation, and the major fermentation products were acetate (93.2%) and propionate (5.5%). The second-cycle fermentation with supplementing additional ethanol as an electron donor indicated that pH played the more important role in the chain elongation process for a high level MCFAs production. In the second cycle, the chain elongation reaction did not occur under the acidic conditions. However, when the pH was adjusted from 5.6 to 7.0, the chain elongation reaction was significantly stimulated, and the caproate concentration quickly increased from 1.88 to 11.8 g/L. The results of microbial community analysis showed that the fermentative bacteria of *Firmicutes* were the dominate population under the neutral pH condition accounting for 49.9%, which was far higher than those under the acidic and alkaline conditions. The strains relating to the chain elongation, such as *Clostridium IV*, *Clostridium XI*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, *Clostridium XVIII* and *Clostridium sensu stricto*, were enriched under the neutral and acidic conditions, but not under the alkaline condition. It should be noted that the well-known pure culture bacteria relating to chain elongation, such as *Clostridium Kluyveri*, were not found in this study. In the second cycle, no significant difference on the relative abundance of strains relating to chain elongation was found between neutral and acidic conditions, suggesting that these strains could survive under the acidic conditions but their activity was inhibited. When the pH was adjusted from 5.6 to 7.0, their activities could quickly recover to produce caproate. The above findings provided an effective regulating strategy for selective production of MCFAs from waste biomass with open cultures of microbial consortia.

cornstalk, chain elongation, medium chain fatty acids, pH effects, microbial community

doi: [10.1360/TB-2020-0855](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0855)