

末端产物对乙醇型发酵菌群产氢能力及代谢进程的影响

任南琪¹, 宋佳秀¹, 安东², 张汝嘉¹

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 上海市自来水市北有限公司, 上海 200086)

摘要: 利用连续流搅拌槽式反应器(CSTR)在一定条件下驯化成功的乙醇型产氢发酵菌群, 通过静态培养实验, 以葡萄糖为碳源, 利用缓冲液控制反应体系 pH 值, 通过不同的 pH 值环境使产氢发酵菌群末端产物生成比例发生改变, 考察了不同的末端产物生成比例对菌群产氢能力的影响。结果表明, 在液相末端产物总量相当的情况下, 乙醇生成比例高时氢气产量也较高。通过外加乙醇和乙酸进行静态产氢实验发现, 乙醇对发酵产氢的抑制作用不明显, 同对照组相比, 外加 40 mmol/L 时氢气产量仅下降了 34%, 而乙酸的存在对菌群的发酵产氢有较强的抑制, 外加乙酸浓度为 10 mmol/L 时即对产氢发酵产生明显抑制, 浓度为 40 mmol/L 时产氢量较对照组降低了 84.3%, 液相末端产物也大幅降低, 混合菌群最终形成乙醇型发酵应是菌群自然选择的结果。

关键词: 生物制氢; 乙醇型发酵菌群; 液相末端产物

中图分类号: X382 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1608-05

Effects of Terminal Products on Hydrogen Production by Ethanol Hydrogen-Producing Microflora

REN Nanqi¹, SONG Jiaxiu¹, AN Dong², ZHANG Rujia¹

(1. School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Shanghai Shibei Waterworks Co. Ltd., Shanghai 200086, China)

Abstract: The effects of terminal products on hydrogen production were conducted in continuously stirred tank reactor (CSTR) by the acclimated ethanol hydrogen-producing bacteria. Glucose was added as carbon source and different ambient pH was carried out by buffer solution. High ethanol production was simultaneously achieved with high hydrogen production. The addition of 40mol/L ethanol or acetic acid can result in the reduction of hydrogen production, the former was 34% and the latter was 84.3%. The ethanol fermentation formation for mixed microflora was attributed to the natural selection.

Key words: hydrogen production; ethanol fermentation microflora; aqueous terminal production

当前, 能源短缺及环境污染使能源问题成为制约我国乃至世界经济发展的瓶颈, 因此, 作为化石能源的替代品, 可再生清洁能源——氢能日益到世人的重视。常规的制氢方法均需消耗大量的不可再生的能源, 已不再适应社会发展的需求。而微生物发酵法制氢技术具有双重功效和可持续的特点^[1], 成为近几年世界各国的研究热点^[2~7]。

不同的产氢发酵类型的产氢能力有较大差别, 目前认为, 乙醇型发酵具有较好的稳定性和较高的产氢能力, 为产氢发酵的首选发酵类型^[8,9]。当前, 很多学者利用产酸反应器进行生物制氢的研究多集中在 pH 值、氧化还原电位(ORP)、水力停留时间(HRT)、有机负荷、金属离子及底物种类等方面^[10~12], 对发酵代谢产物的影响研究不多。林明在研究代谢产物对产氢高效纯菌 B49 的影响^[13]发现, 乙醇对 B49 的产氢抑制最弱, 乙酸次之, 丙酸和丁酸对其有很强抑制。对产氢发酵细菌来说, 自身的代谢产物和其它微生物的代谢产物均能对微生物的

代谢产生重要影响, 进而影响菌群的产氢能力, 而液相末端产物作为可检测参数对于实现发酵过程的控制有重要的指导作用。在产氢反应器的工程应用中, 自固定的混合菌群为氢气的生产者, 菌群的特性直接决定着氢气的产生, 因此, 有必要对末端产物的影响进行深入研究。本文以具有较高产氢能力的乙醇型发酵菌群为研究对象, 考察了液相末端产物的生成比例及浓度对乙醇型发酵菌群产氢能力的影响, 并对其作用机理进行了分析。

1 材料与方法

1.1 混合菌种来源

实验所用混合菌种取自稳定运行 3 个月的连续流搅拌槽式生物制氢反应器(CSTR), 有效容积 6L,

收稿日期: 2005-09-19; 修订日期: 2005-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470054); 国家高新技术研究发展计划(863)项目(2001AA515030)

作者简介: 任南琪(1959~), 男, 博士生导师, 特聘教授, 主要研究方向为环境微生物学、废水生物处理发酵法生物制氢, E-mail: rnq@hit.edu.cn

连续搅拌, 反应器操作温度控制在 $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, HRT 为 3h. 反应器内 pH 稳定在 4.1~4.39 之间, ORP 为 $-450\text{mV} \sim -480\text{mV}$. 采用人工配水, 以葡萄糖为唯一碳源, 补充 N、P、维生素和微量元素, 进水葡萄糖浓度为 $4\,000 \sim 5\,000\text{mg/L}$. 反应器内呈典型的乙醇型发酵, 液相末端产物为乙醇 46%、乙酸 33.6%、丙酸 11.9%、丁酸 8.4%、戊酸 0.1%, 产气量稳定在 30L/d , 氢气含量为 42%~49.5%.

混合菌种取出时反应器 pH 值为 4.3, ORP 为 -485mV . 混合菌种取出反应器后经 $4\,000\text{r/min}$ 离心 5min 后去除上清液, 用生理盐水稀释至原体积, 反复淘洗 3 次, 再稀释备用.

1.2 间歇实验装置与方法

间歇实验装置如图 1 所示. 实验 1 为 12 组反应瓶, 每组 3 个平行样, 结果取平均值. 分别按比例加入 0.1mol/L 的磷酸氢二钠和柠檬酸溶液, 使溶液呈现不同的 pH 值. 所用培养液成分主要为葡萄糖、氯化铵、磷酸氢二钾、微生物及微量元素等. 实验时, 各培养瓶分别加入 10mL 培养液, 10mL 混合菌种和 30mL 不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 混合后溶液的葡萄糖浓度为 10g/L . 实验 2 为 17 组反应瓶, 每组 3 个平行样, 分别按比例加入乙醇或乙酸, 其中 1 组不加以以上物质, 为对照组, 所加培养液及混合菌种同上, 所加缓冲液 pH 均为 6.0. 以上实验装瓶时均用无氧氮气吹脱, 密封后将反应瓶放入恒温气浴振荡器中培养, 转速 120r/min , 温度控制在 $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

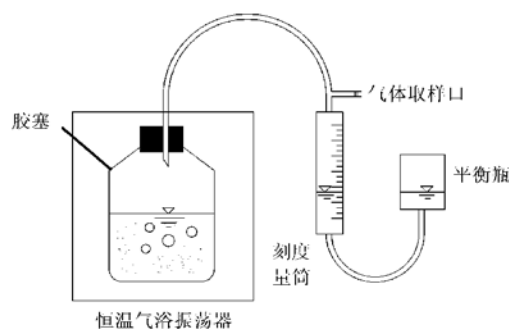


图 1 间歇实验装置

Fig. 1 Intermittent batch test

1.3 分析方法

挥发酸和醇类测定: GC122 型气相色谱仪, 不锈钢色谱填充柱长 2m , 担体 GDX103, $60 \sim 80$ 目, 氢火焰检测器, 氮气作载气, 流速 30mL/min , 氢气流速 30mL/min , 空气流速 490mL/min . 汽化室温度 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, 柱室和检测室温度 $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. 反应结束后, 取反

应液离心 5min , $4\,000\text{r/min}$, 取上清液进样.

氢气和二氧化碳测定: 发酵气体组分采用 SC-II 型气相色谱仪, 柱长 2m , 担体 Porapak Q, $50/80$ 目. 热导池检测器 (TCD), 氮气作载气, 流速为 20mL/min . 用 1mL 注射器抽气进样.

2 结果与讨论

2.1 产物生成比例对产氢的影响

乙醇型发酵菌群在以葡萄糖为碳源时的液相末端产物主要为乙醇和乙酸以及少量的丙酸、丁酸和戊酸, 并释放发酵气体氢气和二氧化碳.

通过缓冲液控制反应体系内 pH 值, 使菌群的末端产物发生代谢转移, 从而考察不同产物生成比例对产氢的影响(参见图 2). 在不同的反应瓶内, 乙醇型发酵菌群的液相末端产物的含量及氢气产率有明显差别. 从液相产物总量上看, 除 $\text{pH} \leq 4.2$ 的几个反应瓶外, 其它反应瓶液相末端产物总量基本持平, 发酵进程相当, 只是产物生成比例有所差别. 在 pH 为 3.4~3.8 时, 由于体系 pH 值过低, 超出菌群的耐受限度, 菌群生长受到抑制, 底物利用不完全, 液相末端只有少量乙酸、乙醇和丙酸, pH 为 4.2 时才开始出现少量的丁酸和戊酸, 此时氢气产量不高. 在 pH 为 ≥ 4.4 后, 液相产物增多, 发酵进行的较为完全. 在 pH 为 4.4~5.4 时, 氢气产量一般, 此时乙酸产量明显高于乙醇, 同时丙酸产量也较多, 最多达到 11.6mmol/L . 在 pH 为 5.8~7.4 时, 氢气产量达到较高水平, 且差别不大, 此时乙醇产量高于乙酸, 丙酸产量明显减少, 在 pH 为 5.8 时得到最高产气量为 $1\,413\text{mL/L}$ 培养液, 液相末端产物分别为乙醇 62.8mmol/L 、乙酸 32.7mmol/L 、丙酸 6.2

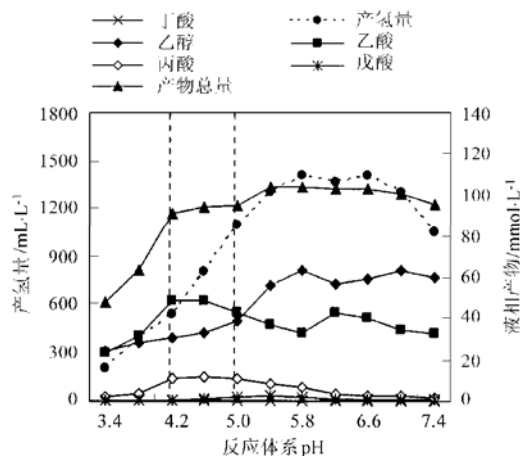


图 2 液相产物生成量与氢气产率关系

Fig. 2 Relationship between aqueous productions and hydrogen production yield

mmol/L、丁酸 0.6 mmol/L、戊酸 1.9 mmol/L。

2.2 产物浓度对产氢的影响

乙醇型发酵菌群的主要液相末端为乙醇和乙酸, 占总液相产物的 70% 以上, 通过外加不同浓度的乙醇或乙酸, 考察二者对菌群产氢的影响, 结果参见图 3 和图 4。对照组的氢气产率平均为 1 530 mL/L 培养液, 同对照组相比, 外加乙酸和乙醇对菌群产氢均有一定的抑制, 但乙醇浓度对产氢的抑制并不明显, 氢气产量最多下降了 34.1%, 且在浓度较高时也未见氢气产量的明显下降。而在外加乙酸实验组中, 乙酸浓度对产氢发酵有明显的抑制, 并随乙酸浓度的增加氢气产量下降明显。乙酸浓度为 10 mmol/L 时即对产氢产生较强抑制, 浓度为 40 mmol/L 时产氢量降低了 84.3%, 只有微弱的产氢能力。一般认为, 乙酸为酸性产物, 过多的乙酸会降低体系 pH 值而对产氢发酵产生抑制, 而乙醇为中性产物, 不会引起体系 pH 变化而对产氢发酵过程抑制较小。在本实验中, 反应发生在缓冲液中, pH 环境稳定, 因此氢气的产生并非是由于反应体系的 pH 下降而受到抑制, 而是产物本身对产氢过程产生了抑制。

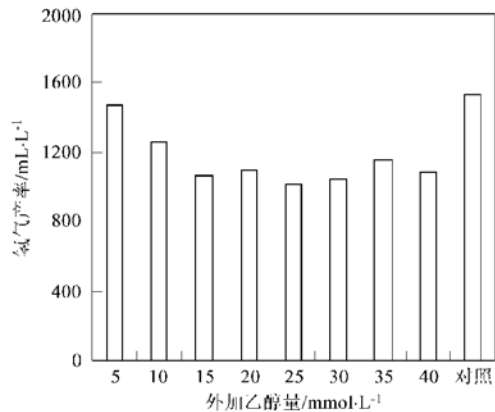


图 3 外加乙醇对产氢的影响

Fig. 3 Effect of hydrogen production by adding ethanol

检测各反应瓶内反应结束后的液相末端产物浓度(参见表 1 和表 2), 并同对照样相比较发现, 外加乙醇对发酵进程的影响不大, 挥发酸产量随乙醇浓度的增加降低不多, 各类产物生成比例没有明显变化。而外加乙酸很明显的抑制了菌群的发酵进程, 同对照样相比, 生成的液相产物随乙酸浓度的增多有大幅度降低, 同时由于乙酸的反馈作用, 发酵微生物通过自身的代谢调节, 使丙酸的含量有明显增加, 最多为对照样的 7 倍。同时测定氢气含量并加以比较

(参见表 3) 发现, 外加乙醇实验组氢气含量未见明显降低, 均在 37% 以上, 而外加乙酸实验组随乙酸浓度的增加氢气含量降低明显, 最低为 18.1%, 分析认为, 这种现象并非偶然。

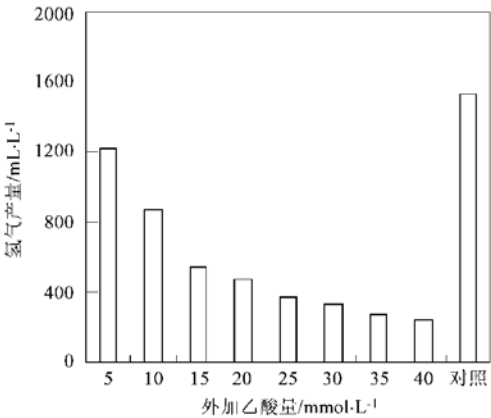


图 4 外加乙酸对产氢的影响

Fig. 4 Effect of hydrogen production by adding acetic acid

表 1 乙醇浓度对末端产物产量的影响

Table 1 Effect of ethanol concentrations on terminal production yields

外加乙醇量 / mmol·L ⁻¹	液相末端产物总量/ mmol·L ⁻¹				
	乙醇	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
5	38.8	6.96	0.94	0.22	0.02
10	39.34	8.06	0.96	0.24	—
15	47.04	8.7	0.78	0.18	0.018
20	55.04	7.38	0.9	0.28	—
25	67.7	8.44	0.86	0.16	0.02
30	73.86	8.58	0.78	0.22	0.024
35	73.2	7.72	0.76	0.24	0.02
40	76.3	9.98	0.74	0.16	—
对照	41.1	8.97	1.23	1.22	0.09

表 2 乙酸浓度对末端产物产量的影响

Table 2 Effect of acetic acid concentrations on terminal production yields

外加乙酸量 / mmol·L ⁻¹	液相末端产物总量/ mmol·L ⁻¹				
	乙醇	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸
5	29.78	16.38	0.9	1.15	—
10	30.82	20.66	2.54	1.16	0.24
15	14.1	28.64	8.64	1.26	0.38
20	12.8	31.24	7.48	1.34	0.36
25	9.6	39.8	5.52	1.92	0.44
30	8.84	47.4	4.52	1.2	0.76
35	11.24	53.34	2.4	1.52	—
40	9.12	54.18	3.38	1.24	0.52
对照	41.1	8.97	1.23	1.22	0.09

在有 2 种或 2 种以上的末端产物的分支代谢途径中, 其共同的特点是每个分支途径的末端产物反馈控制分支点后的第一个酶^[14]。在葡萄糖转化为氢气的代谢途径中, 葡萄糖经 EMP 途径生成丙酮酸,

表 3 外加不同浓度产物所产气体氢气含量
Table 3 Hydrogen percentage in producing gases by
adding different concentration products

外加乙酸或乙醇 浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	外加乙醇组氢气 含量/%	外加乙酸组氢气 含量/%
5	44	40.2
10	44.5	33
15	42.7	21
20	37.6	20.1
25	41.2	19
30	42.3	19.7
35	41.7	18.1
40	40.4	21.4
对照	44.5	

并从丙酮酸开始产生代谢分支,生成不同的末端产

物,如乙醇、乙酸、丙酸、丁酸等.而丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的酶为丙酮酸脱氢酶,丙酮酸脱氢酶与产氢途径密切相关,其脱氢产生的电子直接交给铁氧还蛋白酶(Fd),而铁氧还蛋白酶是参与催化产生氢气的重要的酶,决定着氢气的产生.发酵末端产物对丙酮酸脱氢酶存在累积反馈抑制,即任何一种末端产物过量时都能对共同途径的第一个酶起抑制作用,但抑制的作用大小有所差别,本研究认为乙酸对丙酮酸脱氢酶有较强的抑制,而乙醇的抑制作用较小,因此当体系乙酸含量较多时氢气的产生受到抑制,并通过反馈作用使菌群自身通过代谢调节倾向产生较多的丙酸,因为产生丙酸过程不经过丙酮酸脱氢过程,没有氢气的产生.乙醇型产氢发酵微生

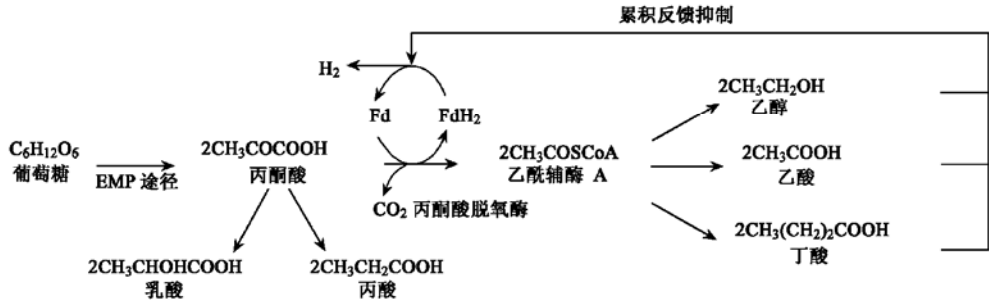


图 5 产氢发酵细菌代谢产物累积反馈抑制模式^[8]

Fig. 5 Feedback inhibited mode for the cumulation of metabolic products by hydrogen-producing fermentative bacteria^[8]

物倾向于产生较多的乙醇可能是自身的代谢调节的一种表现,因为乙醇的抑制作用小.在产氢发酵的启动过程中,菌群经一系列发酵类型最终形成乙醇型发酵应是微生物自身生理代谢调节的结果.

2.3 讨论

在产氢发酵过程中,液相末端产物作为影响因子直接影响着产氢发酵进程.在本实验中,通过缓冲液控制反应体系 pH 值,对乙醇型发酵菌群进行间歇产氢实验,使末端产物发生代谢转移,从而考察不同产物生成比例对产氢的影响.结果认为,高的乙醇生成比例伴随着高的氢气产率,直接证实了连续流实验的结果.这在连续流产氢发酵的工程应用有较重要的指导价值,可通过调节适宜的参数(如 pH 值 ORP HRT、有机负荷等)维持反应器内高的乙醇生成比例,进而保证高的氢气产率.

在产氢发酵过程中,液相末端产物的积累均对发酵的进行存在不同程度的抑制,在间歇产氢实验中,向反应体系投加液相产物(乙醇和乙酸),提前产物反馈作用,考察二者对产氢发酵的影响.结果发现,乙酸作为主要液相末端产物对产氢发酵存在较

强的抑制,相比较而言,乙醇的抑制作用较弱.在工程应用中,应设法将乙酸从反应器内抽提,解除乙酸的反馈抑制,进而提高反应器的产氢能力.

3 结论

- (1) 在不同 pH 体系中,产氢发酵菌群的液相末端产物产量有较大差异,其生成比例关联菌群的产氢能力,高的乙醇生成比例有利于氢气的产生.
- (2) 液相末端产物对产氢发酵存在不同程度的抑制,乙酸作为主要的液相产物对菌群的产氢有较强的抑制作用,而乙醇的抑制作用不明显,对于乙醇型发酵产氢反应器来说,若要达到持续高效产氢,应避免乙酸的大量积累.

参考文献:

[1] Lay J J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen[J]. Biotechnol. Bioeng. , 2000, 68(3): 269~ 278.
[2] Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation[J]. Water Research, 2003, 37: 2789~ 2793.

- [3] Oh Y K, Seol E H, Jung R K, *et al.* Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2003, **28**: 1353~ 1359.
- [4] Zhang Tong, Liu Hong, Herbert H P, *et al.* Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition [J]. *Journal of Environmental Management*, 2003, **69**: 149~ 156.
- [5] Changa J S, Leeb K S, Linb P J. Biohydrogen production with α -bed bioreactors [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1167~ 1174.
- [6] Han S K, Shin H S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**: 569~ 577.
- [7] Chang, F Y, Lin C Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**: 33~ 39.
- [8] 任南琪, 王宝贞. 有机废水发酵法生物制氢技术——原理与方法 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994. 24~ 29.
- [9] 任南琪, 秦智, 李建政. 不同产酸发酵菌群产氢能力对比分析. *环境科学* [J]. 2003, **24**(2): 70~ 75.
- [10] Debabrata D, Nejat V. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature [J]. *Hydrogen Energy*, 2001, **26**: 13~ 18.
- [11] 丁杰, 任南琪, 刘敏, 等. Fe 和 Fe^{2+} 对混合菌群产氢发酵的影响 [J]. *环境科学*, 2004, **25**(4): 48~ 53.
- [12] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, *et al.* Hydrogen production by immobilized cells of aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39 [J]. *Ferment. Bioeng.*, 1997, **83**(5): 481~ 484.
- [13] 林明. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2002.
- [14] 沈萍. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.