

秸秆发酵产氢的影响因素研究

周俊虎, 戚峰, 程军, 谢斌飞, 刘建忠, 岑可法

(浙江大学能源清洁利用国家重点实验室, 杭州 310027)

摘要:以加热预处理的厌氧活性污泥为接种物, 以秸秆(稻草、麦秆)为发酵底物进行微生物产氢实验, 研究了不同秸秆粒径、纤维素酶用量、预处理方法、发酵液 pH 值对秸秆发酵产氢速率以及产氢气量的影响. 其中颗粒粒径为 170 μm 的稻草经过 NaOH 预处理, 按照底物与纤维素酶用量 1:1 的比例酶解, 进而发酵产氢的单位总产氢量为 90.5 mL/g, 最大单位产氢速率为 0.58 mL/(h·g).

关键词: 氢气; 发酵; 稻草; 厌氧活性污泥

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1153-05

Influence Factors of Hydrogen Production in Straw Fermentation

ZHOU Jun-hu, QI Feng, CHENG Jun, XIE Bin-fei, LIU Jian-zhong, CEN Ke-fa

(State Key Laboratory of Clean Energy Utilization, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Biohydrogen production from straw by anaerobic fermentation of digested sludge was studied. The influence of the main parameters such as particle size, the ratio of substrate to cellulase, pretreatment method and pH on the straw fermentation was investigated. With NaOH pretreatment, the rice straw with average particle size of 170 μm was fermented after hydrolyzed by cellulase with the ratio of substrate to cellulase as 1:1. And its maximal velocity and the total volume of hydrogen are respectively 0.58 mL/(h·g) and 90.5 mL/g.

Key words: hydrogen production; fermentation; rice straw; digested sludge

化石燃料(石油、煤、天然气等)的使用会对环境带来污染, 同时也受到资源储量的限制. 而氢气以其燃烧热值高、清洁无污染、适用范围广等诸多优点, 作为一种可以替代化石能源的未来清洁能源, 受到世界范围内越来越多的关注. 人们已通过热化学分解、电解水、水煤气转化和甲烷裂解等方法获得了氢气, 但这些方法要消耗大量能源, 并且产生较多污染. 近年来, 由于生物制氢技术可以克服常规制氢方法的诸多缺陷而倍受关注. 目前微生物制氢主要有 2 个研究方向: 光合法和发酵法^[1], 其中发酵法制氢具有产氢能力高、无需光源、发酵底物来源广等优点^[2,3]. 20 世纪 90 年代末期, 日美等国家开始用天然厌氧微生物直接制取生物氢气^[4]. 除了简单的葡萄糖外, 富含纤维素和半纤维素等复杂大分子的生物物质也可以作为微生物发酵的底物^[5,6].

作为生物质能源的一种, 秸秆的资源十分丰富. 我国的各类农作物秸秆年产量达 7 亿多 t^[7], 其中大部分未被加工利用. 而当前国内外对秸秆的利用主要集中在发酵制沼气和燃料乙醇, 对于秸秆制氢气的研究很少. 利用丰富的秸秆资源通过微生物发酵法制取氢气, 对能源的清洁利用及可持续发展将起到重要的促进作用. 而目前国内外微生物发酵制氢的底物主要集中在糖类、淀粉等相对容易降解的物质, 对于秸秆的发酵产氢研究比较少^[8].

秸秆的微生物发酵产氢, 其难点主要在于秸秆的有效水解糖化. 秸秆的主要成分为纤维素、半纤维素和木质素. 目前常用的秸秆水解糖化方法有酸水解和酶水解. 其中酸水解包括稀酸水解^[9]和浓酸水解^[10]. 酸水解具有以下缺点: ①反应速度较慢; ②反应器腐蚀严重; ③需要回收酸以及废水处理等. 与之相比, 温和的酶水解具有反应环境温和、能耗少、产率高等优点. 因此, 本研究采用酶水解糖化方法, 以稻草和麦秆作为秸秆的代表物, 初步探讨了秸秆微生物发酵产氢的影响因素及其最佳条件.

1 材料与方法

1.1 发酵样品的预处理

将稻草切碎后烘干, 实验样品编号为 1~5 号, 其中 1 号、3~5 号样品筛至 170 μm , 4 号样品筛至 770 μm . 将麦秆切碎后烘干, 筛至 170 μm , 实验样品编号为 6 号.

在纤维素酶水解前, 本研究对实验样品采用了 NaOH 和 H₂SO₄ 2 种预处理方法. ①NaOH 预处理方

收稿日期: 2006-05-12; 修订日期: 2006-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(50406022); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA05Z122); 全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(200437); 霍英东高等院校青年教师优选项目(104021); 浙江省科技攻关计划项目(2006C33049)

作者简介: 周俊虎(1962~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为催化洁净配煤燃烧, E-mail: enejhzhou@public.zju.edu.cn

法^[5]:将编号 1~3 号、5~6 号的实验样品浸泡在 120 g/L 的 NaOH 溶液中,在 70 ℃下持续浸泡 4 h.将残余 NaOH 冲洗至 pH 中性,45 ℃下烘干备用;② H₂SO₄ 预处理方法:将 6 号实验样品浸泡在 100 mL/L 的稀 H₂SO₄ 溶液中,在 121 ℃下爆破 20 min.将残余 H₂SO₄ 冲洗至 pH 中性,45 ℃下烘干备用.

将预处理后的实验样品各 10 g 投入纤维素酶液中酶解 3 d,选用湖南优特公司生产的纯纤维素酶

粉.其中 3 号实验样品与纤维素酶质量比为 1:2,其余 5 个实验样品与纤维素酶质量比为 1:1.酶水解条件为 pH 值 4.5~5.0,温度 50~55 ℃,水解时间 72 h.采用 DNS 方法测量还原糖含量,并以此作为评价水解好坏的标准.糖化率计算公式为:

糖化率 = $\frac{\text{增加的糖量} \times 0.9}{\text{底物质量}}$ × 100%

各个实验样品的预处理条件及微生物发酵制氢的实验方案列于表 1.

表 1 秸秆微生物发酵制氢实验方案
Table 1 Experimental program for hydrogen production by straw fermentation

指标	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号
底物	稻草	稻草	稻草	稻草	稻草	麦秆
颗粒大小/ μm	170	770	170	170	170	170
样品预处理	NaOH	NaOH	NaOH	H ₂ SO ₄	NaOH	NaOH
样品:纤维素酶用量(质量比)	1:1	1:1	1:2	1:1	1:1	1:1
pH 控制	6	6	6	6	4.5	6

1.2 产氢菌种

取沼气池厌氧活性污泥,煮沸 30 min,扩大培养,培养基 pH 值为 6.0~6.4 之间.培养基采用文献[11]中所用的培养基.

1.3 产氢实验方法

采用 500 mL 的烧瓶作为发酵产氢反应器,如图 1 所示.将高压灭菌后的 250 mL 纤维素酶解液和接种物按照 1:1 的比例混合于发酵器中.将发酵器置于恒温水浴锅内,保持发酵温度为 37 ℃.在反应过程中,通过添加 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节发酵液的 pH 值.其中 4 号实验样品,在发酵过程中控制 pH 为 4.5,而其余的实验组在发酵过程控制 pH 值为 6.采用容积为 1 L 带有精确刻度的集气装置通过排除 1

mol/L 的 NaOH 溶液的方法收集发酵产生的气体,定期取气体样,利用 TRACE 2000 GC 气相色谱仪分析生物气的气体成分及含量.由于在发酵液 pH < 6.2 的酸性状态下产甲烷菌受到抑制,导致产甲烷反应停止,故测出本实验发酵产生的生物气体为 H₂ 和 CO₂.

2 结果与讨论

2.1 样品预处理后的还原糖

秸秆中木质素与细胞多糖之间紧密的物理化学结合,限制了水解酶与细胞壁多糖的接触,导致秸秆的分解过程比较缓慢.为了加速秸秆的降解,需去除与纤维素紧密相连的木质素,从而降低纤维素的结晶程度,故本研究在酶解前分别采用了稀酸预处理和强碱预处理方法.经稀酸如 H₂SO₄ 预处理后,秸秆中的半纤维素可水解成单糖,虽然木质素含量基本不变,但可以降低纤维素的平均聚合度.而强碱如氢氧化钠(NaOH),其 OH⁻ 能削弱纤维素和半纤维素之间的氢键,皂化半纤维素和木质素之间的酯键,分离半纤维素和木质素的醚键,溶解半纤维素,从而利于酶和纤维素的接触^[12~14].各个样品经过稀酸、强碱预处理后,再经过纤维素酶解后的还原糖值见图 2.

从图 2 可以看出,1、5 号样品,即 170 μm 粒径的稻草,经过 NaOH 预处理后,样品与纤维素酶用量为 1:1 时,酶解的还原糖糖量最高.经过 H₂SO₄ 预处理的 4 号样品与经过 NaOH 预处理 1 号样品相比,还原糖糖量较低.这主要是由于稀酸预处理虽然可以

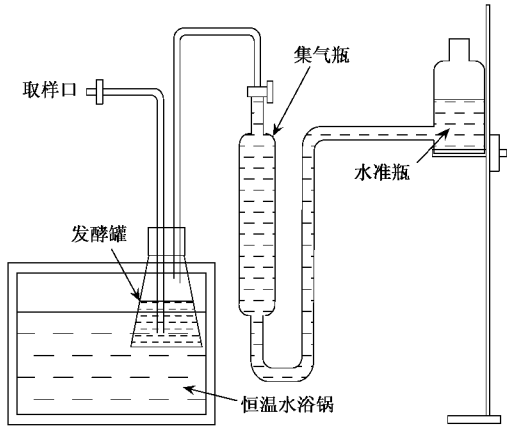


图 1 厌氧发酵产氢实验装置
Fig.1 Apparatus for hydrogen production by anaerobic fermentation

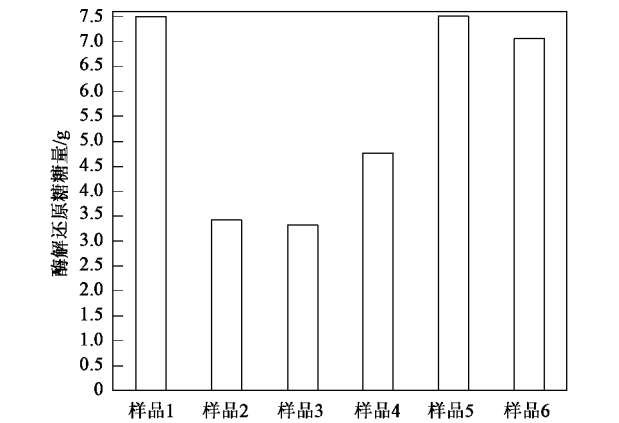


图 2 酶解还原糖糖量(以 10 g 样品计)

Fig.2 Reducing sugar by enzymolysis

使得稻草的薄壁组织结构变得清晰,但是稻草的整体骨架结构仍然十分紧密,并且 H_2SO_4 预处理主要是作用于稻草中的半纤维素,而对稻草中的木质素以及纤维素的作用不明显.因此与强碱预处理方法相比,稀酸预处理后酶解的效果比较差.而对于同样经过 NaOH 预处理的样品,2 号样品和 3 号样品的还原糖糖量相对较低.其中 2 号样品的粒径较大,因此纤维素酶无法与稻草中的纤维素充分接触,从而影响了酶解的效果.对于 3 号样品,纤维素酶用量提高,使得在酶解初始阶段,水解速率加快,抑制纤维素酶进一步作用的抑制物,如纤维二糖等也快速累计,反而限制了稻草的酶解.通过 HPLC 测得,酶解后的还原糖中主要为葡萄糖和木糖.对于 6 号样品,由于麦秆中的纤维素、半纤维素、木质素含量与稻草相差不大,因此酶解后还原糖含量与稻草差距不大.

2.2 发酵气体分析

2.2.1 不同粒径对稻草发酵产氢的影响

与 2 号样品相比,1 号样品的稻草平均粒径要小于 $170\text{ }\mu\text{m}$.如图 3,在其它实验条件相同的情况下,2 号样品在实验进行到 128 h 时达到产氢气速率高峰,即 $0.23\text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$;1 号样品在 241 h 时产氢气速率达到最大值 $0.58\text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$.2 号样品的总产氢量(315 mL)远小于 1 号样品的总产氢量(905 mL).这主要是由于粒径的减小增大了稻草的比表面积,从而增大了强碱中 OH^- 离子以及纤维素酶与稻草中各个组分的作用几率,使水解率得到提高,而还原糖含量的增加提高了稻草发酵的氢气产量.

2.2.2 纤维素酶用量对稻草发酵产氢的影响

3 号样品中的纤维素酶用量是样品 1 号的 2 倍,但是 3 号样品的最大产氢气速率 [0.22

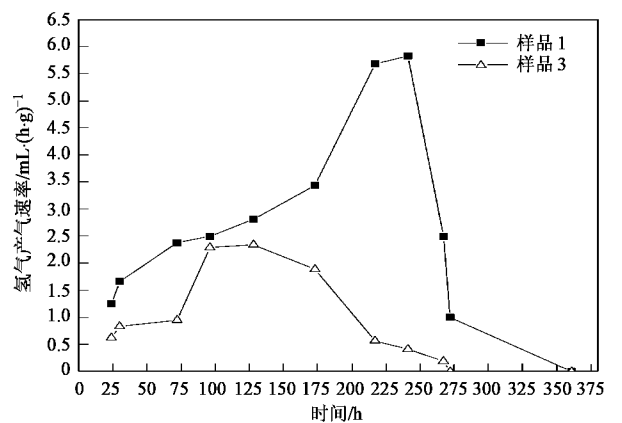


图 3 不同粒径对稻草发酵产氢速率的影响

Fig.3 Impact of particle size on the velocity of hydrogen production by straw

$\text{mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$]和总氢气产量(305 mL)均小于 1 号样品,如图 4.纤维素酶作为一种生物催化剂,与底物的吸附作用具有一定的饱和度;当纤维素酶用量达到饱和时,增加酶用量对稻草水解作用影响不大.相反,由于酶用量的增加,使得在酶解初始阶段,稻草水解速率加快,纤维二糖的累计速度也加快,从而抑制了纤维素酶的进一步作用.因此,过量的纤维素酶会限制稻草的发酵产氢.

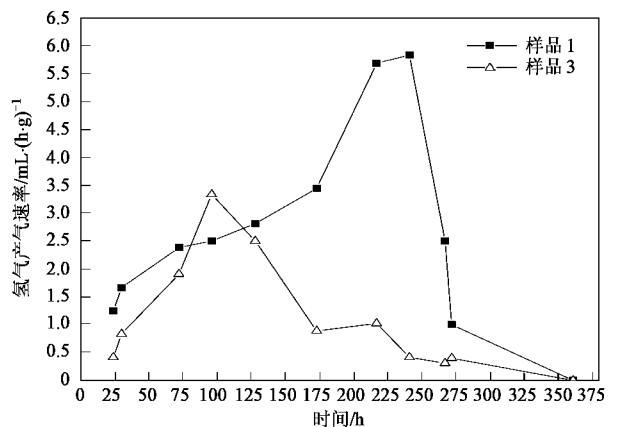


图 4 纤维素酶用量对稻草发酵产氢速率的影响

Fig.4 Impact of cellulase dosage on the velocity of hydrogen by straw

2.2.3 不同预处理方法对稻草发酵产氢的影响

不同预处理方法对稻草发酵产氢的影响见图 5.经过 H_2SO_4 预处理的 4 号样品在第 173 h 达到产氢气速率高峰 $0.56\text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$,总氢气产量为 680 mL .与经过 NaOH 预处理的 1 号样品相比,可见,以经过纤维素酶酶解后的稻草发酵产氢气总量作为评

价指标,NaOH 预处理方法要优于 H_2SO_4 预处理,但 2 种预处理方法对产氢气速率影响不大.此外,虽然 2~4 号样品的还原糖糖量相差不多,但是 4 号样品的产氢气速率和总产氢气量却是 2、3 号样品的 2 倍多.这主要是由于经过 H_2SO_4 预处理,稻草中的半纤维素直接转化为单糖,而单糖更加有利于发酵产氢.因此,除还原糖糖量外,稻草纤维素酶水解液中还原糖的种类也是影响稻草发酵产氢的重要因素.

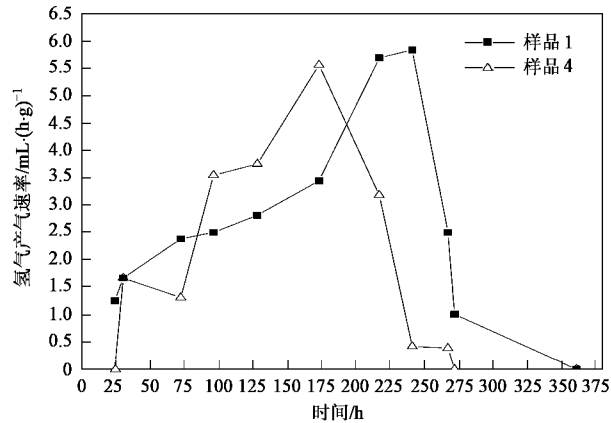


图 5 不同预处理对稻草发酵产氢的影响

Fig.5 Impact of pretreatment method on the velocity of hydrogen production by straw

2.2.4 pH 值对稻草发酵产氢的影响

在厌氧氢发酵过程中,氢化酶的活性对于 pH 值十分敏感.正确控制反应体系的 pH 值是影响稻草发酵产氢的一个关键因素.pH 值对稻草发酵产氢的影响见图 6.在其它实验参数相同的情况下,5 号样品 ($\text{pH} = 4.5$) 的产氢气速率最大值为 $0.39 \text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$,总产氢气量为 640 mL ;而 1 号样品 ($\text{pH} = 6$) 的产氢气速率最大值为 $0.58 \text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$,总产氢气

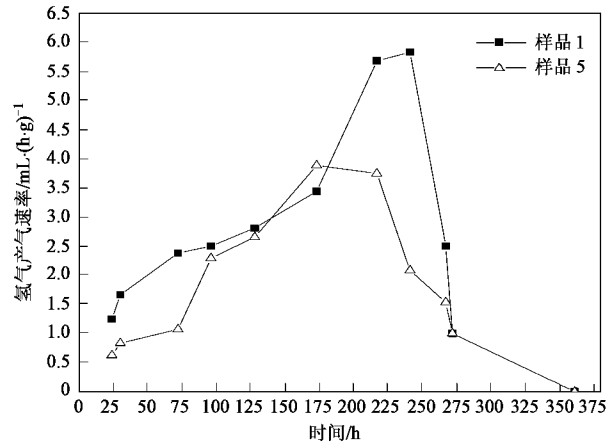


图 6 pH 值对稻草发酵产氢的影响

Fig.6 Impact of pH on the velocity of hydrogen by straw

量为 905 mL .可见调节与控制 pH 为 6 左右可以为微生物降解有机物、产生氢气创造良好的条件,提高稻草的产氢气速率.

2.2.5 不同底物对发酵产氢的影响

各个实验组氢气总产量的对比结果如表 2 和图 7 所示.

表 2 各个实验组氢气总产量

Table 2 Total hydrogen production of each experiment sample		
实验样品编号	单位总产氢量 /mL·g ⁻¹	最大单位产氢速率 /mL·(h·g) ⁻¹
样品 1	90.5	0.58
样品 2	31.5	0.23
样品 3	30.5	0.22
样品 4	68.0	0.56
样品 5	64.0	0.39
样品 6	102.2	0.63

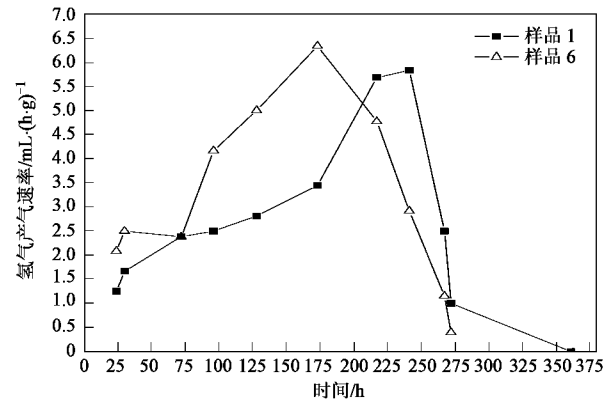


图 7 不同底物对发酵产氢的影响

Fig.7 Impact of different kinds of straw on the velocity of hydrogen production

稻草、麦秆的主要成分见图 8.从图 8 中可以看出,两者的主要成分纤维素、半纤维素以及木质素相差不多.由于麦秆的半纤维素和木质素高于稻草,因此麦秆经纤维素酶酶解后的还原糖少于稻草.但是

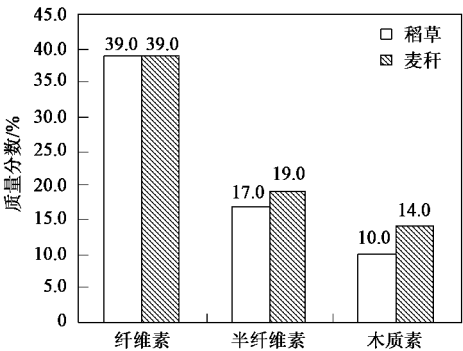


图 8 稻草和麦秆的主要成分^[15]

Fig.8 Main composition of rice straw and wheat straw

麦秆的最大产氢速率[0.63 mL/(h·g)]和总产氢量(1 022 mL)均高于稻草的最大产氢速率[0.58 mL/(h·g)]和总产氢量(905 mL). 引起这种反差的原因可能是由于麦秆的半纤维素含量高于稻草, 而半纤维素经过水解形成的单糖更利于微生物的发酵.

3 结论

(1) 较小的稻草粒径可以增大稻草的比表面积, 优化稻草的酶解效果, 并增加稻草发酵的氢气产量. 当稻草粒径由 770 μm 降为 170 μm 时, 最大产氢速率由 0.23 mL/(h·g) 提高到 0.58 mL/(h·g), 单位总产氢量也由 31.5 mL/g 提高到 90.5 mL/g.

(2) 过量的纤维素酶用量限制了稻草的发酵产氢. 当纤维素酶用量加倍后, 稻草单位总产氢量由 90.5 mL/g 降至 30.5 mL/g, 最大单位产氢速率由 0.58 mL/(h·g) 降至 0.22 mL/(h·g).

(3) 与稀酸相比, 强碱预处理方法更加有利于稻草的微生物发酵产氢. 在其它试验条件相同的情况下, 经过 NaOH 预处理的稻草单位总产氢量为 90.5 mL/g, 而经过 H₂SO₄ 预处理的稻草稻草单位总产氢量仅为 68.0 mL/g. 但是预处理方法对稻草发酵的最大产氢速率影响不大.

(4) 发酵反应体系的 pH 值是影响稻草发酵产氢的一个关键因素. 与 pH 值为 4.5 时相比, 调节与控制 pH 为 6 左右可以为微生物降解有机物、产生氢气创造良好的条件, 提高稻草的产氢气速率.

参考文献:

[1] Hwang M H, Jang N J, Hyun S H, *et al.* Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, **111**: 297 ~ 309.

[2] 任南琪, 李建政. 生物制氢技术[J]. *太阳能学报*, 2003, **2**: 4 ~ 6.

[3] 李冬敏, 陈洪章, 李佐虎. 生物制氢技术的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2003, **4**: 1 ~ 5.

[4] Lay J J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **68**(3): 269 ~ 278.

[5] de Vrijie T, de Haas G G, Tan G B, *et al.* Pretreatment of miscanthus for hydrogen production by thermotoga elfii [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1381 ~ 1390.

[6] Lay J J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **74**: 280 ~ 287.

[7] 邢廷钰. 秸秆饲料的有效利用[J]. *饲料研究*, 1995, **9**: 2 ~ 3.

[8] 卢怡, 张无敌, 宋洪川, 等. 稻草发酵产氢潜力的研究[J]. *新能源及工艺*, 2003, **2**: 26 ~ 28.

[9] Korbitz W. Biodiesel Production in Europe and North America, an Encouraging Prospect [J]. *Renewable Energy*, 1999, **16**: 1078 ~ 1083.

[10] Jamshid Iranmahbooba, Farhad Nadima, Sharareh Monemib. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2002, **22**: 401 ~ 404.

[11] 王相晶, 任南琪, 向文胜. 发酵条件对发酵产氢细菌 B49 产氢的影响[J]. *太阳能学报*, 2005, **26**: 99 ~ 103.

[12] 梁新红, 常景玲. 作物秸秆生产单细胞蛋白的研究概况[J]. *山西食品工业*, 2003, **3**: 5 ~ 9.

[13] Gould J M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, **27**(3): 225 ~ 231.

[14] Gould J M. Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, **27**(6): 893 ~ 896.

[15] 史央, 蒋爱芹, 藏传超, 等. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. *微生物学杂志*, 2002, **22**: 47 ~ 50.