

马铃薯发酵产氢的菌株培养基改良研究

谢斌飞, 程军, 周俊虎, 宋文路, 刘建忠, 岑可法
(浙江大学能源清洁利用国家重点实验室, 310027, 杭州)

摘要: 为了促进马铃薯发酵产氢, 研制了改良培养基驯化产氢菌株并使用淀粉生物酶降解马铃薯. 将活性污泥煮沸后作为产氢菌株的接种体富集培养, 使用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良传统培养基消除了传统发酵产氢的启动滞留期(约 12 h), 单位最大产氢速率从 $703.4 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 提高到 $800.5 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$, 最大产氢潜力从 $205.2 \text{ mL}/\text{g}$ 增加到 $218.2 \text{ mL}/\text{g}$. 通过 α 淀粉酶和糖化酶处理进一步提高了马铃薯的发酵产氢能力, 单位最大产氢速率进一步提高到 $944.7 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$, 最大产氢潜力进一步提高到 $267.2 \text{ mL}/\text{g}$. 生物气中氢气的体积分数为 $43\% \sim 69\%$, 无甲烷.

关键词: 产氢; 发酵; 培养基; 酶解

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2008)06-0774-05

Improvement of Bacteria Substrate for Hydrogen Production from Potatoes by Anaerobic Fermentation

XIE Binfei, CHENG Jun, ZHOU Junhu, SONG Wenlu, LIU Jianzhong, CEN Kefa
(State Key Laboratory of Clean Energy Utilization, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: In order to improve the hydrogen production from potatoes, the bacteria substrate was improved to domesticate H_2 -producing bacteria and potatoes are degraded by enzyme. The boiled activated sludge was used as H_2 -producing bacteria inoculum. While using the improved substrate, in which Cl^- was used to substitute for SO_4^{2-} , a lag-phase time (about 12 h) vanished, the maximum specific hydrogen production rate increased from $703.4 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$ to $800.5 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$ and the maximum hydrogen yield increased from $205.2 \text{ mL}/\text{g}$ to $218.2 \text{ mL}/\text{g}$. When potatoes were pretreated by a amylase and glucoamylase, the hydrogen production was further enhanced. The maximum specific hydrogen production rate was then increased to $944.7 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})$ and the maximum hydrogen yield was increased to $267.2 \text{ mL}/\text{g}$. It is found that the hydrogen composition of the biogas is about $43\% \sim 69\%$ and no methane is detected.

Keywords: hydrogen production; fermentation; improved substrate; enzyme pretreatment

利用微生物生理代谢作用分解生物质从而产生氢气新能源, 对发展清洁高效的可再生能源和减少环境污染具有重要意义. 传统的方法是利用厌氧发酵技术, 将有机物转化成沼气(主要成分为 CH_4 和 CO_2)^[1-4]. 近年来, 不少研究人员致力于发酵制氢气的研究, 这方面的研究也取得了很大的进展, Lay 等

人^[5]研究了不同产氢菌株对厨余垃圾污泥混合物的发酵制氢的影响, 获得的最大产氢潜力为 $180 \text{ mL}/\text{g}$. 香港大学张彤等人^[6]研究了淀粉的质量浓度和 pH 值对发酵制氢的影响, 发现 $\text{pH}=6$ 时可获得最大产氢潜力 $92 \text{ mL}/\text{g}$. 中科院刘光臻等人^[7]同时研究了 pH 值、金属离子浓度、 NH_4HCO_3 质量浓度和

收稿日期: 2007-08-24. 作者简介: 谢斌飞(1981—), 女, 博士生; 程军(联系人), 男, 教授, 博士生导师. 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50406022, 50525620); 国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA05Z122); 教育部高等学校全国优秀博士学位论文专项基金资助项目(200437); 霍英东高校青年教师基金资助项目(104021); 浙江省科技攻关计划资助项目(2006C33049).

淀粉质量浓度对发酵制氢的影响,发现当淀粉的质量浓度为 2 g/L 时可获得最高产氢潜力 194 mL/g. Khanal 等人^[8]也得到了淀粉产氢潜力 125 mL/g 的实验结果.

针对传统产氢培养基中的 SO_4^{2-} 含量较高易使发酵产物含大量 H_2S 气体而降低产氢率的问题,本文首次提出使用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良培养基,并采用 α 淀粉酶和糖化酶处理马铃薯以促进其高效降解,从而使单位最大产氢潜力和产氢速率获得明显提高.

1 实验材料和方法

1.1 发酵底物

采用富含淀粉的新鲜马铃薯为发酵底物,探索其发酵产氢的反应特性.采用标准方法^[9]测定其总挥发性固体(TVS)的质量分数为 19.5%.

马铃薯的淀粉酶处理方法:在发酵瓶中加入 50 g 马铃薯,加入 50 mL 去离子水配制成质量分数为 50%的马铃薯溶液,加入淀粉酶 0.05 g,调节 pH 值至 4~4.5,60 °C 酶解 2 h 后灭活.

马铃薯的糖化酶处理方法:在经过淀粉酶处理的发酵瓶中继续添加糖化酶 1 g、 CaCl_2 0.1 g,调节 pH 值至 6,80 °C 酶解 12 h 后灭活.

1.2 接种产氢菌

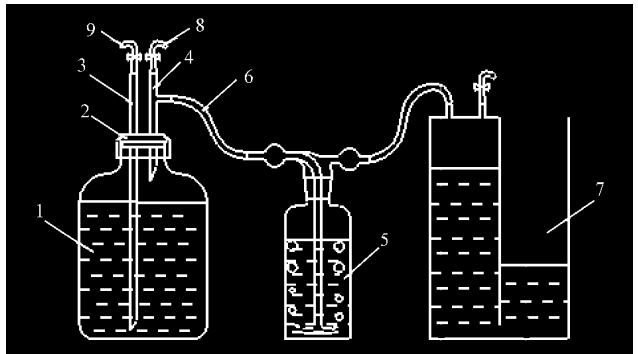
采用取自沼气发酵池的活性污泥,经过煮沸 30 min 后,使用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良传统的产氢菌培养基^[10],培养基成分为:马铃薯(20 g/L);蛋白胨(4 g/L);牛肉膏(2 g/L);酵母汁(1 g/L);L-半胱氨酸(0.5 g/L); NaCl (4 g/L); MgCl_2 (0.1 g/L); FeCl_2 (0.1 g/L); K_2HPO_4 (1.5 g/L);维生素液(10 mL);微量元素液(10 mL);刃天青(质量分数 0.2%,2 mL).其中,维生素液的组成如下:钴氨酸(0.01 g/L);抗坏血酸(0.025 g/L);核黄素(0.025 g/L);柠檬酸(0.02 g/L);叶酸(0.01 g/L);对氨基苯甲酸(0.01 g/L);肌酸(0.025 g/L).微量元素液的组成如下: MnCl_2 (0.01 g/L); ZnCl_2 (0.05 g/L); H_3BO_3 (0.01 g/L); CaCl_2 (0.01 g/L); Na_2MoO_4 (0.01 g/L); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L); $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (0.01 g/L); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g/L).

富集培养的方法:取煮沸处理后的活性污泥 200 mL,加入 500 mL 改良产氢培养基,使用恒温 35 °C 在厌氧操作箱中(气氛条件为 $\varphi(\text{H}_2)=10\%$, $\varphi(\text{CO}_2)=10\%$,剩余气体为 N_2)培养 3 d,弃去上清液后加入改良产氢培养基,继续在厌氧操作箱内培

养 3 d.如此富集培养 3 次.
采用标准方法^[9]测定实验中使用的接种混合菌株的挥发性悬浮固体物(VSS)的质量分数约为 3.5%.

1.3 实验装置和方案

发酵装置如图 1 所示,反应主体装置为一个容积为 800 mL 的自制发酵瓶,发酵液容积为 500 mL,剩余空间用氮气填充.产生的气体通过装有 4 mol/L NaOH 溶液的洗气瓶收集到带刻度的集气装置中.



1:发酵瓶;2:密封胶塞;3,4:穿刺钢针;5:NaOH 洗气瓶;
6:硅胶管;7:集气装置;8:气体取样口;9:液体取样口

图 1 发酵装置

实验方案如表 1 所示,实验时每个发酵瓶内装入去皮搅碎后的新鲜马铃薯 50 g,添加去离子水至 450 mL,灭菌,接种 50 mL 混合菌株启动实验.使用恒温水域锅控制反应温度为 35 °C,使用 pH 自动调节装置控制 pH 值为 6.实验主要考察产氢菌培养方式和底物预处理方式对马铃薯发酵产氢的影响,研究马铃薯发酵的最大产氢潜力和最大产氢速率.

表 1 实验方案

实验组	菌种培养基	底物预处理
1	传统培养基 ^[5]	
2	改良培养基	
3	改良培养基	α 淀粉酶
4	改良培养基	α 淀粉酶+糖化酶

1.4 分析方法

1.4.1 气相成分分析 发酵产氢过程生物气的主要成分为 H_2 、 CO_2 .采用北分 SP3400 气相色谱仪检测气相成分,检测色谱柱型号为 5A,规格为 $\varnothing 3\text{ mm} \times 3\text{ m}$.参数设置为:柱温 50 °C,注样器温度 50 °C,热导检测器温度 100 °C,桥电流温度 160 °C,载气为

He, 流速 30 mL/min.

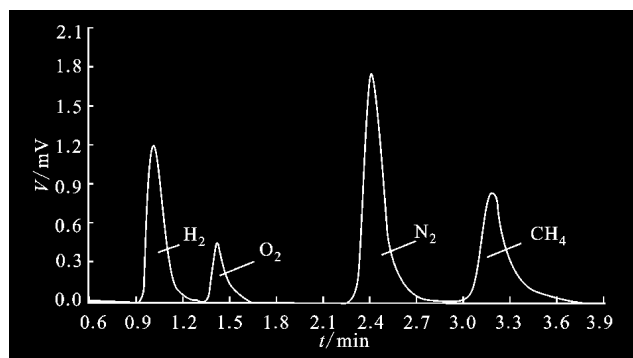
1.4.2 液相成分分析 液相成分中挥发性脂肪酸(VFA)的组成和含量由 TRACE 2000 GC 气相色谱仪(美国 Thermo Finigan 公司)测定. 色谱柱为 DB-Waxtre, 规格为 $\varnothing 5\text{ mm} \times 2\text{ m}$.

实验程序升温方法: 初始温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 初始时间 5 min, 升温速率 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 终止温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, 终温停留时间 6 min. 参数设置: 载气 He 流量 50 mL/min, H_2 流量 35 mL/min, 空气流量 350 mL/min; 氢火焰离子检测器温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$, 柱温 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$. 样品的 pH 值调至 2 左右, 进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$.

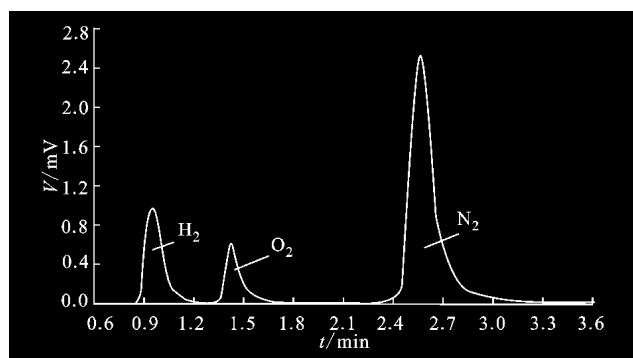
2 结果和讨论

2.1 培养基改良对发酵产氢的影响规律

实验共进行了 6 d, 每 12 h 记录一次数据并进行气体成分分析. 使用实验取样气体的色谱峰面积与标准气体峰面积对比获得气体浓度. 标准气体和实验中典型的生物气的气体色谱图如图 2 所示. 气体成分检测结果显示, 生物气中氢气的体积分数在 43% 至 69% 之间.



(a) 标准气体



(b) 典型的生物气
图 2 气体色谱图

实验中各组马铃薯发酵产氢过程均有一个明显的产气高峰期, 如图 3 所示. 使用传统培养基得到的产氢细菌用于发酵产氢反应时, 产氢代谢存在一个明显的时间迟滞期, 大约经过 12 h 发酵反应开始启

动, 之后发酵产氢速率逐渐升高, 经过 48 h 产氢速率达到最高值 $46\text{ mL}/\text{h}$, 然后随时间增加产氢速率逐渐下降, 经过 96 h 产氢反应基本停止, 发酵过程经历的反应周期为 84 h. 传统培养基出现产氢迟滞主要有 3 个原因: ①接种污泥没有经过预热处理, 这种情况下污泥中产氢菌并不是占据绝对优势地位, 污泥中尚含有产甲烷菌和硫酸盐还原细菌等菌种, 导致在发酵过程中会产生甲烷和 H_2S 气体; ②混合菌株没有经过富集培养, 使得在接种菌株中产氢菌浓度不够, 并且菌株存在一个适应环境的过程, 即迟滞期; ③在污泥预热处理后采用 SO_4^{2-} 浓度较高的培养基, 这使得硫酸盐还原细菌同时被富集, 在发酵初期就存在竞争关系, 极易生成 H_2S 气体并且溶于发酵液, 加速溶液酸化从而抑制了产氢菌的活性, 产生迟滞期. 本文用改良的培养基富集驯化经加热处理后的污泥, 克服了以上 3 种产生迟滞期的可能性, 当使用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良传统培养基后, 产氢代谢的时间迟滞期消失(提前了 12 h), 产氢速率达到峰值的时间明显提前(由 48 h 提前到 36 h), 产氢反应结束的时间也由 96 h 提前到 84 h.

本文将传统含 SO_4^{2-} 培养基(表 1 第 1 组)与第 2、3、4 组对比实验, 由图 3 可见, 第 1 组发酵产氢的迟滞期约为 12 h, 启动较慢, 并且经 48 h 小时后产氢速率最高值仅为 $46\text{ mL}/\text{h}$, 而使用改良培养基的第 2、3、4 组都不存在迟滞期, 启动很快, 并且经 36 h 后产氢速率明显提高(峰值分别为 $49\sim 64\text{ mL}/\text{h}$). 因此, 第 2、3、4 组实验具有启动快和产氢速率高的特点. 因为第 2 组与第 1 组实验的惟一区别就是培

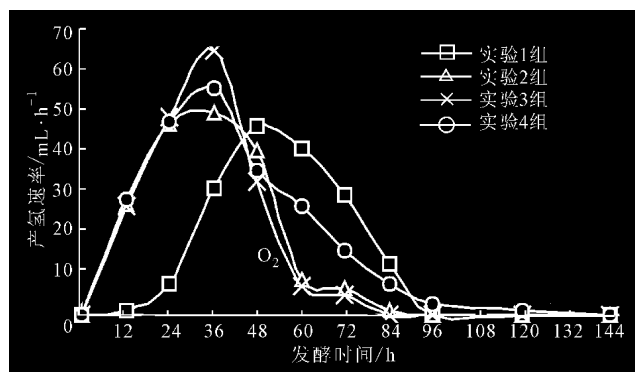


图 3 产氢速率

培养基不同, 故能推断用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良传统培养基有利于富集启动快、产氢速率高的优势产氢菌株. 第 2、3、4 组产氢速率的峰值较之第 1 组均有不同程度的提高.

2.2 酶解处理对发酵产氢的影响规律

累积产氢量结果(见图 4)表明, 第 4 组累积产

氢量较高,第2、3组的累积产氢量基本类似,而第1组的累积产氢量较低.这说明通过 α 淀粉酶和糖化酶处理将马铃薯中的淀粉转化为葡萄糖,有助于产氢菌对底物的利用,而只采用 α 淀粉酶水解处理马铃薯的方法,只将淀粉分解为低聚的糊精,而不能水解为葡萄糖,对于提高发酵产氢量效果不明显.采用改良培养基培养的产氢菌对底物的利用率较高.

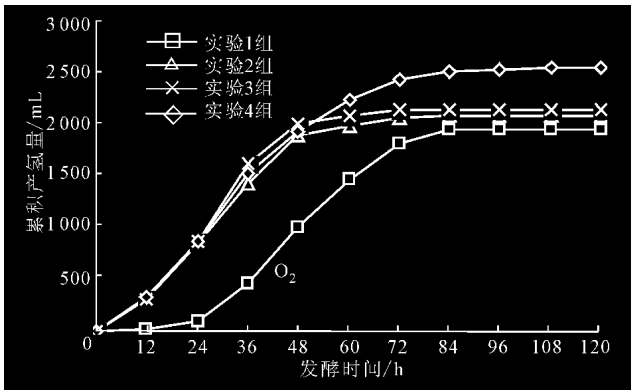


图4 累积产氢量

2.3 动力学模型分析

采用 Lay 等人^[2]提出的模型对实验数据进行处理,模型公式为

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中: H 为累积产氢量; P 为最大产氢量; R_m 为最大产氢速率; λ 为滞留时间; $e=2.718$ 为自然对数的底.

使用 Matlab 6.5 最佳拟合算法计算得到 P 、 R_m 和 λ ,如表2所示,最大产氢潜力采用实验数据累计产氢量除以新鲜马铃薯的淀粉 TVS 总量得到,单位最大产氢速率由 R_m 除以活性污泥的 VSS 总量得到.用计算所得 P 值与实验累计产氢量作比较,计

表2 动力学分析结果

实验组	P/mL	$R_m/\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$	λ/h	实验累计产氢量/ mL	最大产氢潜力/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	单位最大产氢速率/ $\text{mL} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$
1	2 066.3	50.7	27.1	2 001	205.2	703.4
2	2 157.4	57.7	8.3	2 127	218.2	800.5
3	2 218.6	67.8	9.6	2 193	224.9	940.6
4	2 613.6	68.1	9.7	2 605	267.2	944.7

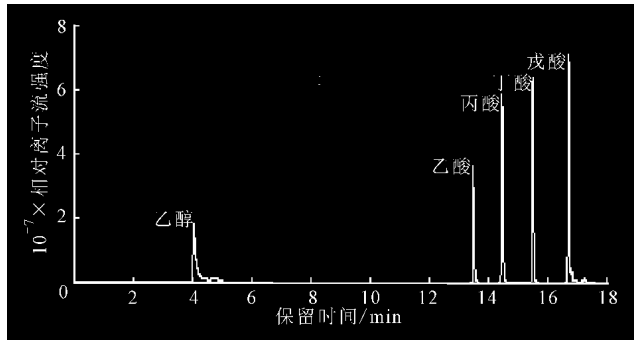
表3 液相分析结果

实验组	$\varphi(\text{乙醇})/\%$	$\varphi(\text{乙酸})/\%$	$\varphi(\text{丙酸})/\%$	$\varphi(\text{丁酸})/\%$	$\varphi(\text{戊酸})/\%$
1	0.05	0.23	0.01	0.58	0.00
2	0.05	0.46	0.00	0.79	0.00
3	0.03	0.38	0.02	0.59	0.00
4	0.00	0.31	0.00	0.60	0.00

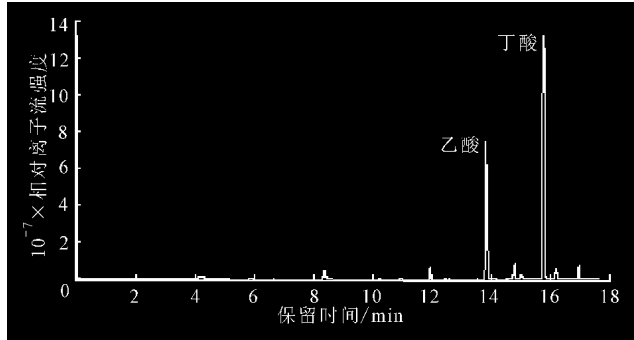
算出最大计算误差为 3.27%.

2.4 发酵液相成分分析

用实验取样液体的色谱峰面积与标准液体峰面积对比获得液相成分及浓度.体积分数分别为 0.05% 的乙醇、乙酸、丙酸、丁酸和戊酸标准溶液的色谱图和产氢阶段结束后典型液相(稀释 6 倍)成分色谱图如图 5 所示.通过对比各相应主峰面积得到产物浓度.



(a)标准溶液



(b)典型液相

图5 液相分析色谱峰图

液相成分检测结果(如表3所示)表明,马铃薯产氢发酵的液相VFAs成分主要为丁酸和乙酸,分别占 VFAs 的 57.8%~66.7%和 26.4%~37.3%,

另外还有少量乙醇和丙酸生成,无乳酸等其他成分。这些液相成分结合气相成分产生大量氢气,表明本次实验均属于丁酸型发酵。

3 结 论

通过使用 Cl^- 代替 SO_4^{2-} 改良传统产氢菌培养基可基本消除传统产氢的启动滞留期(约 12 h),单位最大产氢速率从 703.4 提高到 800.5 $\text{mL}/(\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$,最大产氢潜力从 205.2 增加到 218.2 mL/g 。通过 α 淀粉酶和糖化酶处理能提高马铃薯发酵的产氢效果,单位最大产氢潜力由 218.2 提高到 267.2 mL/g ,单位最大产氢速率由 800.5 提高到 944.7 $\text{mL}/(\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$,而只采用 α 淀粉酶水解处理马铃薯的方法对于提高发酵产氢量效果不明显。生物气中氢气的体积分数为 43%~69%,无甲烷。发酵末端产物中液相 VFAs 成分主要为丁酸和乙酸,分别占 VFAs 的 57.8%~66.7%和 26.4%~37.3%。

参考文献:

- [1] BOUALLAGUI H, TOUHAMI Y, BEN C, et al. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(3/4): 989-995.
- [2] DE B L. Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art [J]. *Water Science and Technology*, 2000, 41(3): 283-290.
- [3] KALIA V C, JOSHI A P. Conversion of waste biomass (pea-shells) into hydrogen and methane through anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 53(2): 165-168.
- [4] KIM J K, OH B R, CHUN Y N, et al. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(4): 328-332.
- [5] LAY J J, LEE Y J, NOIKE T, et al. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste [J]. *Water Research*, 1999, 33(11): 2579-2586.
- [6] TONG Zhang, LIU Hong, FANG H H P, et al. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition [J]. *Journal of Environmental Management*, 2003, 69(2): 149-156.
- [7] LIU Guangzhen, SHEN Jianquan. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 98(4): 251-256.
- [8] KHANAL S K, CHEN W H, LI L, et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29(11): 1123-1131.
- [9] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. 19th ed. Washington DC, USA: American Public Health Association, 1995.
- [10] 林明,任南琪,马沙平,等.产氢发酵细菌培养基的选择和改进[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2003, 35(4): 398-402.
LIN Ming, REN Nanqi, MA Xiping, et al. Selection and improvement of culture for hydrogen producing bacteria [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2003, 35(4): 398-402.

(编辑 刘杨 赵大良)

[文摘预登]

强发射电流反铁电冷阴极材料实验研究

盛兆玄^{1,2}, 冯玉军¹, 徐卓¹, 孙新利², 黄璇¹

(1. 西安交通大学电子材料研究所, 710049, 西安; 2. 第二炮兵工程学院 103 教研室, 710025, 西安)

采用固态烧结工艺制备了位于反铁电/铁电相界附近的 $\text{PbLa}(\text{Zr}, \text{Sn}, \text{Ti})\text{O}_3$ (PLZST) 反铁电陶瓷样品。通过测定样品在快速单脉冲电压激励下的电子发射特性,得到了激励电压对发射电流的影响规律,发射电流随激励电压增加而增加,当激励电压大于 1.5 kV 时,发射电流趋于饱和。在单脉冲激励下进行电子发射实验,得到如下结果:在激励电压为 800 V、抽取电压为 0 V 的条件下,发射电流密度为 1.27 A/cm^2 ;当抽取电压增加到 4 kV 时,获得了 1 700 A/cm^2 的大发射电流密度。研究表明:室温下掺镧锆锡钛酸铅反铁电陶瓷可在较低激励电压下实现电子发射,发射电流密度大,能够工作于 4 Pa 低真空环境中。