

马欢, 刘伟伟, 刘士清. 2009 不同阴离子在生物质发酵产氢中的作用研究 [J]. 环境科学学报, 29(1): 124-131

Ma H, Liu W W, Liu S Q. 2009 Effect of anions on hydrogen fermentation in a mixed anaerobic culture system [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(1): 124-131

不同阴离子在生物质发酵产氢中的作用研究

马欢^{1,2}, 刘伟伟^{1,3}, 刘士清^{1,*}

1 云南师范大学能源与环境科学学院, 昆明 650092

2 中科院等离子体物理研究所离子束生物工程重点实验室, 合肥 230031

3 安徽农业大学工学院, 合肥 230061

收稿日期: 2008-02-26 修回日期: 2008-05-21 录用日期: 2008-10-24

摘要: 为揭示不同阴离子在生物质发酵产氢中的作用规律, 以混合菌群发酵产氢为研究对象, 采用正交试验设计的方法考察了 6 种不同的阴离子及添加尿素对发酵产氢过程的影响. 通过对不同阴离子浓度及相互关系对发酵产氢的影响的综合比较, 获得以下结论: 促进混合菌群发酵产氢的阴离子组成为: SO_4^{2-} 1.5 g L^{-1} , Cl^- 0 g L^{-1} , NO_3^- 0 g L^{-1} , $\text{M}_0\text{O}_{24}^{6-}$ 0.1 g L^{-1} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 1 g L^{-1} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 5 g L^{-1} , $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ 0 g L^{-1} ; 以 PDB(马铃薯水解液)为基质发酵原料, H_2 最高含量和平均含量分别比对照组提高了 21.4% 和 24.1%; 平均产氢速率由对照组的 $36.79 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 提高到 $96.25 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; 氢气产率由对照组的 $0.76 \text{ mol mol}^{-1}$ 提高到 $1.17 \text{ mol mol}^{-1}$. 研究同时证明, 尿素对 H_2 的产生具有显著的抑制作用, $\text{M}_0\text{O}_{24}^{6-}$ 则可促进混合微生物对原料的利用和转化; 阴离子 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 的交互作用显著, 说明两者同时使用可改善发酵产氢. 从理论上对上述结果进行了分析探讨.

关键词: 发酵产氢; 阴离子; 正交试验; 影响因子; 脱氢酶

文章编号: 0253-2468(2009)01-124-08 中图分类号: X703 文献标识码: A

Effect of anions on hydrogen fermentation in a mixed anaerobic culture system

MA Huan^{1,2}, LU Weiwei^{1,3}, LU Shiqing^{1,*}

1 School of Energy & Environmental Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092

2 Key Laboratory of Ion Beam Biengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031

3 Technology School of Anhui Agricultural University, Hefei 230061

Received 26 February 2008; received in revised form 21 May 2008; accepted 24 October 2008

Abstract In the present study, an $L_{27}(3^3)$ orthogonal test was performed in order to investigate the individual and interactive effects of six anions and urea on biohydrogen production in a mixed anaerobic culture system. Certain components were found to promote hydrogen production, including SO_4^{2-} 1.5 g L^{-1} , Cl^- 0 g L^{-1} , NO_3^- 0 g L^{-1} , $\text{M}_0\text{O}_{24}^{6-}$ 0.1 g L^{-1} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 1 g L^{-1} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 5 g L^{-1} , and $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ 0 g L^{-1} . Verification experiments demonstrated that the maximal and the average hydrogen content in the mixed anaerobic cultures increased by 21.4% and 24.1% in presence of the above components. The average hydrogen generation rate and hydrogen yield increased from $36.79 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $96.25 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and from $0.76 \text{ mol mol}^{-1}$ to $1.17 \text{ mol mol}^{-1}$, respectively. The results also showed that urea significantly inhibited hydrogen generation, while $\text{M}_0\text{O}_{24}^{6-}$ enhanced the sugar digestibility of the anaerobic microorganisms. Interestingly, the interactive effect of $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ improved hydrogen production. Finally, the possible mechanisms underlying the interactive effects of these anions and urea are discussed.

Keywords hydrogen fermentation; negative ions; orthogonal test; factors; dehydrogenase

1 引言 (Introduction)

环境与能源问题的日益突出, 使得生物制氢技

术已成为人们关注的一个热点 (Kosourov *et al.*, 2002; 朱核光等, 2002; 肖本益等, 2004; Ike *et al.*, 1999; Melis *et al.*, 2000). 对于生物质发酵产氢技

基金项目: 云南省自然科学基金 (No. 2007E049M)

Supported by the Yunnan Natural Science Foundation (No. 2007E049M)

作者简介: 马欢 (1982-), 女, 博士生, E-mail: huanhuan_hua@yaho.com.cn * 通讯作者 (责任作者), E-mail: bclishiqing@yahoo.com.cn

Biography: MA Huan (1982-), female, ph. D. candidate, E-mail: huanhuan_hu@yaho.com.cn * **Corresponding author** E-mail: bclishiqing@yahoo.com.cn

术,国内外大量的研究主要集中在影响微生物发酵产氢的因素,如氧化还原电位、酸碱 pH 值、温度、底物成分、水力停留时间等方面,关于厌氧微生物群体产氢过程的环境影响因子的研究已成为国际性的前沿课题.美国在 20 世纪 60 年代开始了金属离子对厌氧微生物发酵影响的研究,但主要针对厌氧产甲烷菌 (Peguin 1995; Speece 2001).近年来,也有一些关于金属元素对发酵产氢的研究报道 (Lee *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Fascetti *et al.*, 1998).事实上,除了金属元素之外,不同的阴离子对发酵产氢的过程也有着不可忽视的影响.因为含有不同阴离子的无机或有机盐可为微生物提供除碳、氮源以外的各种重要元素.这些元素是微生物生长不可缺少的,在产氢过程中可作为辅助因子参与生理和生物化学反应,或是作为酶的活性中心离子与激活剂;然而也有的阴离子所起的作用恰恰相反,对产氢过程的抑制甚至是致命的.投加适宜的无机或有机离子可以提高生物活性从而有效地提高整个发酵系统的效率.然而,对于阴离子在生物质发酵产氢中的作用研究国内外还没有相关的报道.通过前期对不同金属离子在发酵产氢过程中的作用研究 (Speece 2001; 马欢等, 2005)表明,我们认为有必要在这一方面进行深入研究.本研究中以混合菌群发酵产氢为研究对象,采用正交试验设计考察了 6 种不同阴离子及添加尿素对发酵产氢过程的影响,综合比较了不同浓度阴离子及其交互作用对产氢的影响,获得了促进混合菌群发酵产氢的阴离子组合,为后继的发酵产氢研究打下了良好基础.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料

2.1.1 菌种 取厌氧消化后的活性污泥 (主要为正常发酵产沼气的底泥混合菌种),经连续驯化一段时间后以 TTC 为底物测定其脱氢酶活力,结果显示,酶活力 $\geq 50 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 将此驯化后的活性污泥以约 1 cm 厚度的液体石蜡封隔液面空气,保藏备用 (刘士清等, 2007; 2008).

2.1.2 培养基及发酵用糖液 将市售新鲜马铃薯适当切碎,按质量比加入 1:1 的水量,用高速组织捣碎机打浆,加入 α -淀粉酶 (投加量为 $10 \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$,以 TS 计,下同), $80 \sim 85^\circ\text{C}$ 下保温液化 2 h 再加入糖化酶 ($100 \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$), $60 \sim 65^\circ\text{C}$ 下保温糖化 2 h 用一层纱布挤滤,滤液为马铃薯水解液,简记为 PDB. 备用.

2.2 实验装置

实验中所用的基本装置参见文献 (马欢等, 2005).

2.3 实验方法

以产气总量、 H_2 产量和发酵残留还原糖为指标,按表 1 以 3 水平设计各实验所用阴离子和尿素用量.为减少干扰均采用铵盐作氮源,并考虑部分交互作用,分析离子间的综合作用及影响.采用 $L_{27}(3^3)$ 正交表,研究不同阴离子对生物质发酵产氢的影响,其中第 13 列空列作为误差估计,因子在 $L_{27}(3^3)$ 正交表中的实验安排参见表 2 设计,具体实验条件参见表 3 实验用产氢生物反应器容积为 1 L,装入 400 mL PDB 液后按表 3 中对应各实验号分别加入所需的离子液、灭菌,接入 2.1.1 节中备用的菌种 100 mL,在 30°C 下恒温发酵.

表 1 正交试验因子及水平设计表

因子	水平 1	水平 2	水平 3
A: $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$	0	4.29	42.90
B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	0.75	1.50
C: NH_4Cl	0	0.10	1.00
D: NH_4NO_3	0	0.10	1.00
E: $(\text{NH}_4)_6\text{M}_2\text{O}_7$	0	0.10	1.00
F: $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	0	0.10	1.00
G: $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0	0.50	5.00

注:各水平浓度以 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 计量,除尿素 $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ 是物质浓度外,其它均为阴离子的浓度.

表 2 正交试验 $L_{27}(3^3)$ 表头因子安排

因子	A	B	C	D	E	F	G						
列号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

注:13 列为空列做误差估计,3、4、6、7 和 8 列是因子的交互列.

2.4 测试项目及方法

气体分析:采用标定了校准体积刻度的浮罩在饱和 NaCl 水溶液中通过排水积气法收集并计量总气体;用奥氏气体分析仪和 HP5890 气相色谱测定气体中 CO_2 和 H_2 的含量.

原料和发酵结束残留的还原糖含量测定:采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法 (Miller G L, 1959),于 490nm 测定并计算还原糖百分含量.

pH 值:采用 pH 计测定.

3 结果 (Results)

3.1 生物质 PDB 发酵产氢结果

以 $L_{27}(3^3)$ 正交表设计进行发酵产氢实验,至

所有产氢生物反应器不产气为止,实验共进行了 7 d 在发酵过程中记录产气量,并取样分析 H₂和 CO₂含量,分别计算出 H₂和 CO₂的产量,并将各天 H₂和

CO₂的产量分别相加累计得出发酵 7 d 的总产量.发酵产氢结束后取样测定残糖,计算出混合菌群对糖的利用率,结果参见表 3

表 3 L₂₇(3³)正交设计及不同阴离子(因子)下发酵结果

Table 3 The results of the orthogonal test after fermentation with different anions

实验号	因子及水平							实验结果			
	A	B	C	D	E	F	G	总产气量 /L	H ₂ /L	CO ₂ /L	糖利用率
1	1	1	1	1	1	1	1	7.98	3.322	4.658	54.287%
2	1	1	2	2	2	2	2	8.22	3.085	5.135	74.130%
3	1	1	3	3	3	3	3	11.55	3.633	7.917	50.110%
4	1	2	1	2	2	3	3	11.50	3.140	8.360	17.740%
5	1	2	2	3	3	1	1	13.01	4.199	8.811	51.150%
6	1	2	3	1	1	2	2	6.33	2.808	3.522	9.910%
7	1	3	1	3	3	2	2	1.18	0.417	0.763	42.800%
8	1	3	2	1	1	3	3	10.49	4.128	6.362	9.910%
9	1	3	3	2	2	1	1	6.51	2.209	4.301	45.930%
10	2	1	1	2	3	1	2	7.19	2.796	4.394	13.040%
11	2	1	2	3	1	2	3	1.36	0.542	0.818	10.950%
12	2	1	3	1	2	3	1	5.90	2.402	3.498	25.050%
13	2	2	1	3	1	3	1	7.47	2.739	4.731	8.340%
14	2	2	2	1	2	1	2	11.47	3.393	8.077	28.180%
15	2	2	3	2	3	2	3	8.96	2.145	6.81	29.330%
16	2	3	1	1	2	2	3	10.36	4.480	5.88	4.160%
17	2	3	2	2	3	3	1	9.46	2.390	7.07	29.230%
18	2	3	3	3	1	1	2	1.40	0.188	1.212	12.520%
19	3	1	1	3	2	1	3	9.31	2.310	7.000	33.400%
20	3	1	2	1	3	2	1	5.00	1.435	3.565	50.590%
21	3	1	3	2	1	3	2	4.62	1.527	3.093	44.890%
22	3	2	1	1	3	3	2	5.23	1.942	3.288	54.290%
23	3	2	2	2	1	1	3	0.10	0.031	0.069	27.140%
24	3	2	3	3	2	2	1	0.94	0.561	0.379	6.250%
25	3	3	1	2	1	2	1	3.32	1.143	2.177	22.960%
26	3	3	2	3	2	3	2	1.01	0.276	0.734	7.300%
27	3	3	3	1	2	1	3	4.24	1.383	2.857	0.100%

为全面考察各铵盐对主体产物指标氢气产生的影响,将表 3 中的各结果两两组合,以其中之一分段作为对另一组结果划分亚组的指标,采用单因子统计分析方法,分析各结果间的关系及影响(施南华等, 1998). 如: H₂与总气量、CO₂和糖利用率的关系,以 H₂排列大小顺序后,分成 H₂量 0.031~1.942 L 为第一亚组,第二亚组 2.145~2.808 L,第三亚组

3.085~4.480 L,相对应实验号的总气量、CO₂和糖利用率的结果数值分别归入不同亚组,对亚组间的数值进行统计分析.经表 4 分析得出:①H₂量的变化与 CO₂和总气量的变化有显著差异;②CO₂与总气量也有显著差异;③H₂、CO₂和总气量与糖的利用率之间关系不显著.

表 4 氢气量与二氧化碳、总气量和糖利用率之间的方差分析

Table 4 Results of analysis of variance

主要指标	氢气		二氧化碳		总气量	
	F 值	显著性	F 值	显著性	F 值	显著性
二氧化碳	43.678253	显著				
总气量	48.8091	显著	52.2184	显著		
糖利用率	0.47431	不显著	0.77713	不显著	0.4574	不显著

注: $F_{0.10}(2, 24) = 2.54$, $F_{0.05}(2, 24) = 3.40$, $F_{0.01}(2, 24) = 5.61$.

3.2 不同的阴离子对发酵产物的影响

3.2.1 因子及其交互作用对 H₂产生量的影响 对表 3 中的 H₂量进行统计分析结果见表 5. 由极差可得出对发酵产氢影响的因子从大到小顺序依次为: (H₂N)₂CO > NO₃⁻ > M₀₇O₂₄⁶⁻ > C₂O₄²⁻ > C₆H₅O₇³⁻ > Cl⁻ > SO₄²⁻. 经 F 方差检验分析: (H₂N)₂CO 的 F 值为 101.4 大于 F_{0.01}(2, 2) = 99.00 说明 (H₂N)₂CO 对发酵过程中 H₂的产生具有显著的影响; 其余因子

对 H₂的产量也同样有显著影响. 交互作用分析显示: 在本实验设计的范围内, SO₄²⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ (B × G)、NO₃⁻ 和 M₀₇O₂₄⁶⁻ (D × E)、C₂O₄²⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ (F × G) 的交互作用显著地影响 H₂的产生; NO₃⁻ 和 C₂O₄²⁻ (D × F)、M₀₇O₂₄⁶⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ (E × G) 的交互作用也分别对产氢有一定的影响. 相关的交互作用分析见表 6~8.

表 5 不同因子及水平下对 H₂量影响的统计结果

Table 5 Statistical results of the influence of different anion salts on H₂ yield

Table with 10 columns: 来源, 离差, 自由度, 均方离差, F 值, K1, K2, K3, 极差 R, 显著性. Rows include A: (H2N)2CO, B (NH4)2SO4, C NH4Cl, BxG, Dx E, Dx F, Ex G, Fx G, D: NH4NO3, E (NH4)6M07O24, F (NH4)2C2O4, G: (NH4)3C6H5O7, and Qe.

注: F_{0.10}(2, 2) = 9.00 F_{0.05}(2, 2) = 19.00 F_{0.01}(2, 2) = 99.00 F_{0.10}(4, 2) = 9.24 F_{0.05}(4, 2) = 19.25 F_{0.01}(4, 2) = 99.25 Qe 为误差项.

表 6 因子 SO₄²⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ 的交互作用对氢气产量影响的分析结果

Table 6 The interactive effect of SO₄²⁻ and C₆H₅O₇³⁻ on hydrogen yield in orthogonal tests L

Table with 4 columns: SO4 2- (B1, B2, B3), C6H5O7 3- (G1), C6H5O7 3- (G2), C6H5O7 3- (G3). Rows show values for each combination.

表 8 因子 C₂O₄²⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ 交互作用对氢气产量影响的分析结果

Table 8 The interactive effect of C₂O₄²⁻ and C₆H₅O₇³⁻ on hydrogen yield in orthogonal tests L

Table with 4 columns: 水平, C6H5O7 3- (G1), C6H5O7 3- (G2), C6H5O7 3- (G3). Rows show values for C2O4 2- (F1, F2, F3).

表 7 因子 M₀₇O₂₄⁶⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ 的交互作用对氢气产量影响的分析结果

Table 7 The interactive effect of M₀₇O₂₄⁶⁻ and C₆H₅O₇³⁻ on hydrogen yield in orthogonal tests L

Table with 4 columns: 水平, C6H5O7 3- (G1), C6H5O7 3- (G2), C6H5O7 3- (G3). Rows show values for M07O24 6- (E1, E2, E3).

比较分析表 5 中的因子水平产氢值 K₁、K₂、K₃: (H₂N)₂CO 3 个水平下 H₂的产生量与 (H₂N)₂CO 浓度水平增加成反比, 即无 (H₂N)₂CO 加入时产氢量最多, 在发酵体系中不能添加 (H₂N)₂CO. 由此也说明, 以厌氧消化后的活性污泥的混合菌群为接种物发酵产氢, (H₂N)₂CO 会对发酵产氢过程产生高度显著的抑制; 同样 NO₃⁻、Cl⁻ 都选择 1 水平 0 g L⁻¹ 时, 产氢效果最佳; 虽然因子 SO₄²⁻ 单独使用时对产氢有一定的抑制作用, 但依据表 6 的 SO₄²⁻ 和 C₆H₅O₇³⁻ 的交互作用选择 B3 G3 组合为好. 由表 7

交互作用结果对应表 5 结果可以看出: $M_{07}O_{24}^{6-}$ 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 的交互作用在 E2 G3 组合时对产氢的叠加效应比 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 、 $C_6H_5O_7^{3-}$ 单独使用的效果好. 因此, 应该考虑将 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 同时添加进入混合菌群发酵产氢体系中, 这是以往文献中都没有报道过的. 通过表 8 的交互作用分析, 选择 F3 G3 组合所对应的产氢值 (32 704 L) 均大于 $C_2O_4^{2-}$ 因子 F3 (22 18 L) 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 因子 G3 (21 79 L) 最高产氢值. 同样对 NO_3^- 和 $M_{07}O_{24}^{6-}$ (D × E)、 NO_3^- 和 $C_2O_4^{2-}$ (D × F) 的交互作用进行分析后得出最好的组合分别为 D1、E2 和 D1、F3 更进一步说明 NO_3^- 对 H_2 的产生有抑制作用, 不宜加入混合菌群发酵产氢体系中.

3.2.2 因子及其交互作用对 CO_2 产生量的影响
总产气量中气体的主要组成是氢气和 CO_2 , 由 3.1 节中对各指标之间显著性的分析已知总产气量、 CO_2 量与 H_2 都是呈现显著差异. 因此, 为了在试验设计范围内较全面深入地了解阴离子及其水平对整个发酵体系的影响, 对产氢过程中产生的 CO_2 量进行统计分析. 结果显示: $(H_2N)_2CO$ 3 个水平下 CO_2 的产生量与 $(H_2N)_2CO$ 浓度水平增加成反比, 即无 $(H_2N)_2CO$ 加入时 CO_2 产量最多, 这与 3.2.1 节中其对 H_2 的影响相同, 说明 $(H_2N)_2CO$ 既对 H_2 产生抑制, 同时也减少 CO_2 的产生. 由此揭示, 以厌氧消化后的活性污泥混合菌群为接种物发酵产氢, $(H_2N)_2CO$ 的加入会对整个发酵体系的气体产生形成显著的负面影响. 与 3.2.1 节相比, Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 对 CO_2 的产生无显著影响; 而 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 的因子及交互作用对 CO_2 与对 H_2 的影响结果一致, $M_{07}O_{24}^{6-}$ 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 离子浓度分别为 0.1 g L^{-1} 和 5 g L^{-1} 在该混合菌群发酵过程中对气体的代谢产生都有显著促进作用.

虽然 SO_4^{2-} 单独作用时对 CO_2 无直接影响, 但其与 $C_6H_5O_7^{3-}$ 存在交互作用, 当 SO_4^{2-} 为 B3 $C_6H_5O_7^{3-}$ 为 G2 时 CO_2 产量最小; 但本着总气量一定时, H_2 多、 CO_2 少的标准, 结合 3.2.1 节各因子对氢气产量的影响结果, 最佳组合应选择 SO_4^{2-} 为 B3 (1.5 g L^{-1})、 $C_6H_5O_7^{3-}$ 为 G3 (5 g L^{-1}), 此时 H_2 产量最大, 而 CO_2 的产量又小于 B2 G3 组合时 CO_2 的最大产量.

3.2.3 因子及其交互作用对糖利用率的影响
在 3.1 节分析中, 发酵体系对糖的利用率没有直接的影响, 因此, 有必要对其独立分析. 以表 3 中的糖利用率结果进行统计分析, 结果见表 9 由极差可得出, 因子对糖利用率的影响从大到小顺序依次为: $(H_2N)_2CO > SO_4^{2-} > C_6H_5O_7^{3-} > M_{07}O_{24}^{6-} > NO_3^- > Cl^- > C_2O_4^{2-}$. 经 F 方差检验分析, $(H_2N)_2CO$ 和 SO_4^{2-} 的 F 值分别为 6.45、5.80 都大于 $F_{0.05}(2, 6) = 5.14$ 说明 $(H_2N)_2CO$ 和 SO_4^{2-} 对发酵过程中糖利用率具有显著影响; $C_6H_5O_7^{3-}$ 、 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 、 NO_3^- 、 Cl^- 和 $C_2O_4^{2-}$ 离子的 F 值均小于 $F_{0.05}(2, 6) = 5.14$ 说明它们单独作用时对糖利用率无显著影响. 对表 10 ~ 12 交互作用分析显示: 在本实验设计范围内, 因子 Cl^- 和 $C_2O_4^{2-}$ 、 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 和 NO_3^- 、 $C_6H_5O_7^{3-}$ 和 $C_2O_4^{2-}$ 的交互作用分别对糖的利用率有显著影响.

比较分析表 9 中的因子水平对糖利用率的值 K_1, K_2, K_3 : $(H_2N)_2CO$ 3 个水平下糖利用率 $K_1 > K_3 > K_2$, 即 $(H_2N)_2CO$ 在水平 1 时发酵体系对糖的利用率最大, 在水平 3 时糖的利用率虽比水平 2 时的高, 但仍然比不加入 $(H_2N)_2CO$ 时糖利用率要低; 由此也说明, 以厌氧消化后的活性污泥的混合菌群为接种物进行发酵产氢时, $(H_2N)_2CO$ 对体系中糖的利用有一定的抑制作用; SO_4^{2-} 对糖利用率也呈现出抑制作用, 即 $K_1 > K_2 > K_3$. 尽管 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 因子对糖利用率无显著影响, 但在试验设计的范围内, 存在随 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 浓度的增加糖的利用率呈上升的趋势, 且 NO_3^- 和 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 的交互作用 (D × E) 对糖的利用率有一定的影响 (见表 11), 当 NO_3^- 因子在 D2 水平、 $M_{07}O_{24}^{6-}$ 因子在 E2 水平组合时, 糖利用率最高. Cl^- 浓度水平在 C2 时糖的利用率大于 Cl^- ; 随着 $C_2O_4^{2-}$ 浓度水平的增加, 糖的利用率呈下降趋势, 由表 10 的 Cl^- 和 $C_2O_4^{2-}$ 交互作用可知, 两者叠加效应有一定的促进糖利用的作用, 比在表 9 中 $C_2O_4^{2-}$ 、 Cl^- 单独的效果好, 即选择 C2 F2 组合, Cl^- 离子浓度 0.1 g L^{-1} 、 $C_2O_4^{2-}$ 离子浓度 0.1 g L^{-1} 所对应的糖利用率最高. 由表 12 结合表 9 可以看出: 因子 $C_6H_5O_7^{3-}$ 和 $C_2O_4^{2-}$ 的交互作用与它们单独作用对糖利用率的影响有相似之处, 即 $C_6H_5O_7^{3-}$ 和 $C_2O_4^{2-}$ 都选择水平 1, 不加入时糖利用率最高.

表 9 不同因子及水平对糖利用率影响的统计结果

Table 9 Statistical results of different ions' influences on glucose utilization

来源	离差	自由度	均方离差	F 值	K_1	K_2	K_3	极差 R	显著性
A: $(H_2N)_2CO$	2125.90	2	1062.95	6.45	355.97	160.80	246.92	195.17	显著
B: $(NH_4)_2SO_4$	1913.30	2	956.65	5.80	356.45	232.33	174.91	181.54	显著
C: NH_4Cl	233.10	2	116.55	0.71	251.02	288.58	224.09	64.49	
C × D	1567.14	4	391.79	2.38					
C × F	2578.49	4	644.62	3.91					显著
D × F	2791.09	4	697.77	4.23					显著
F × G	2125.86	4	531.47	3.22					显著
D: NH_4NO_3	424.20	2	212.10	1.29	236.48	304.93	222.82	81.57	
E: $(NH_4)_6M_6O_{24}$	822.20	2	411.10	2.49	200.91	242.14	320.64	119.73	
F: $(NH_4)_2C_2O_4$	21.80	2	10.90	0.07	265.75	251.08	246.86	18.89	
G: $(NH_4)_3C_6H_5O_7$	859.90	2	429.95	2.61	293.79	287.06	182.84	110.95	
Q _e	989.00	6	164.83						

注: $F_{0.10}(2, 6) = 3.46$, $F_{0.05}(2, 6) = 5.14$, $F_{0.01}(2, 6) = 10.92$, $F_{0.10}(4, 6) = 3.18$, $F_{0.05}(4, 6) = 4.53$, $F_{0.01}(4, 6) = 9.15$; Q_e 为误差项。

表 10 因子 Cl^- 和 $C_2O_4^{2-}$ 的交互作用对糖利用率影响的分析结果

Table 10 The interactive effect of Cl^- and $C_2O_4^{2-}$ on sugar digestibility in the orthogonal test

水平	Cl^- (C1)	Cl^- (C2)	Cl^- (C3)
$C_2O_4^{2-}$ (F1)	33.58%	35.49%	35.84%
$C_2O_4^{2-}$ (F2)	23.31%	45.22%	15.16%
$C_2O_4^{2-}$ (F3)	26.79%	15.48%	40.02%

表 11 因子 $M_6O_6^{6-}$ 和 NO_3^- 的交互作用对糖利用率影响的分析结果

Table 11 The interactive effect of $M_6O_6^{6-}$ and NO_3^- on sugar digestibility in orthogonal test

水平	$M_6O_6^{6-}$ (E1)	$M_6O_6^{6-}$ (E2)	$M_6O_6^{6-}$ (E3)
NO_3^- (D1)	24.70%	19.13%	34.99%
NO_3^- (D2)	31.66%	48.02%	23.87%
NO_3^- (D3)	10.60%	15.63%	45.93%

表 12 因子 $C_2O_4^{2-}$ 和 $C_6H_5O_7^{3-}$ 交互作用对糖利用率影响的分析结果

Table 12 The interactive effect of $C_2O_4^{2-}$ and $C_6H_5O_7^{3-}$ on sugar digestibility in orthogonal test

水平	$C_6H_5O_7^{3-}$ (G1)	$C_6H_5O_7^{3-}$ (G2)	$C_6H_5O_7^{3-}$ (G3)
$C_2O_4^{2-}$ (F1)	50.46%	17.91%	20.21%
$C_2O_4^{2-}$ (F2)	26.60%	42.28%	14.81%
$C_2O_4^{2-}$ (F3)	20.87%	35.49%	25.92%

3.3 验证实验

基于对以上结果的综合分析, 得到能够促进产氢的阴离子组成: SO_4^{2-} $1.5 g \cdot L^{-1}$, Cl^- $0 g \cdot L^{-1}$, NO_3^- $0 g \cdot L^{-1}$, $M_6O_6^{6-}$ $0.1 g \cdot L^{-1}$, $C_2O_4^{2-}$ $1 g \cdot L^{-1}$, $C_6H_5O_7^{3-}$ $5 g \cdot L^{-1}$, $(H_2N)_2CO$ $0 g \cdot L^{-1}$. 在 2.3.2 节中所述的实验材料和方法下, 在原料预处理和发酵操作工艺路线及条件不变的前提下, 进行混合菌群发酵马铃薯水解液产氢的验证试验. 各组产氢情况见表 13.

表 13 验证实验的结果

Table 13 The results of verification experiments

组别	H_2 产量 / L	产 H_2 得率 / (mol mol ⁻¹)	最大产 H_2 速率 / (mL $L^{-1} h^{-1}$)	平均产 H_2 速率 / (mL $L^{-1} h^{-1}$)	最大 H_2 含量	平均 H_2 含量
对照组	4.27 ± 0.31	0.76 ± 0.09	331 ± 20	36.79 ± 3.1	(50.0 ± 1.8)%	(40.5 ± 1.5)%
验证组	6.65 ± 0.45	1.17 ± 0.12	450 ± 36	96.25 ± 4.0	(60.7 ± 1.5)%	(50.2 ± 1.3)%

注: 对照组: 不加入阴离子混合液. 验证组: 加入上述阴离子混合液. 每组 3 个平行样.

实验结果表明: 发酵气体产生比对照组提前了 7 h 而且 H_2 最高含量达 60.7%, 平均含量 50.2%, 分别比对照组提高了 21.4% 和 24.1%; 平均产氢速率由对照组的 36.79 mL $L^{-1} h^{-1}$ 提高到 96.25

mL $L^{-1} h^{-1}$; 氢气产率由对照组的 0.76 mol mol⁻¹ (马铃薯水解液按葡萄糖的量来计) 提高到 1.17 mol mol⁻¹.

4 讨论 (Discussion)

本研究结果表明, 尿素 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 在一定浓度范围内对生物质发酵产氢过程中的糖利用率、 CO_2 和 H_2 的产量都有不同程度的抑制作用. 有文献报道 (李连华等, 2007), 脲酶是对尿素水解起决定性作用的酶. 对于混合菌群而言, 在发酵过程中, 特别是沼气发酵过程中, 脲酶普遍存在 (另文专述), 随着尿素的加入脲酶的活性也相对增加; 脲酶的活性增强导致尿素水解过快, 会造成体系内局部 NH_4^+-N 浓度过高. 这会引起微生物菌种中毒或促使微生物合成蛋白的加强, 使目的产物的 C、H 元素固定在发酵液中, 最终影响了整个生物质发酵产氢的代谢过程, 抑制了 H_2 和 CO_2 的产量. 另外, 如同光合产氢中固氮酶在缺少 N_2 和 NH_4^+ 时能产生 H_2 一样 (高培基等, 2004), 那么加入脲素减少了研究中 H_2 的产量是可理解的, 因为在以混合菌群生物发酵产氢体系中也存在具有固氮功能的克雷伯氏菌属微生物 (刘士清等, 2004).

此外, 在一定浓度范围内 $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$ 与 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 存在的叠加交互作用对发酵产氢起良好促进作用; 同时单一的 $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$ 阴离子能够促进混合微生物对原料利用的增加和转化. 这是因为 Mo 在硝酸还原酶活性体现的构像变化方面有重要组成作用, 它直接影响 N 代谢, 对氨基酸、生物碱和碳水化合物等物质的合成代谢与运输具有调控作用 (李建政, 2003; Martinoia *et al.*, 1981; 门中华等, 2005). 因此, 在混合群落的生物质发酵产氢体系中加入 $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$, 可促进菌体的生长活性, 提高原料的利用率, 同时可加强有机物质的代谢和运输, 从而在整体上促进生物质发酵产氢的产生效率.

同时, $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 的交互作用也对生物质发酵产氢过程中氢气的产生具有一定的促进作用. 根据实验研究结果, 结合物质能量代谢理论, 三羧酸循环是微生物物质代谢的重要途径, 它在物质分解代谢矿化和合成中都占有枢纽的地位 (周群英, 2000), 柠檬酸和草酰乙酸是三羧酸循环过程中的重要中间物. 研究表明, 在以混合菌群发酵产氢中人为地加入铵盐态的 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 阴离子, 它们的交互作用显著促进了 H_2 的产生. 因此, 结合产氢方面的现代理论报道 (左宜等, 2004) 推测, 从生物质 (葡萄糖为代表) 到 H_2 的途径存在葡萄糖经过 EMP 代谢途径后生成的丙酮酸, 由于受 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 阴离子对交互作用的调节, 丙酮酸进入或不进入 TCA 循环的途径方式被改变, 引起了电子供给变化; 而起吸氢作用的氢化酶逆向催化充当了部分脱氢酶的角色, 弱化了氢化酶对 H_2 的氧化作用, 也保障了产氢脱氢酶的作用活性, 最后使游离 H_2 得以大量稳定产生.

综上所述, 脱氢酶和氢化酶应是作用相反的偶联酶催化对, 在一定条件下它们的功能会发生逆转, 即氢化酶的吸氢作用弱化, 为放氢过程创造了良好的环境, 从而提高了产氢速率和氢气的产量. 另外, 本研究同时揭示 C/N 比对发酵产氢过程的影响不容忽视, 因为 NH_4^+-N 等 N 含量过高亦会对微生物菌群产生致命的危害.

5 结论 (Conclusions)

1) 实验设计的范围内, 以混合菌群微生物的生物质进行发酵产氢, 获得了对产氢有促进剂作用的阴离子组成为: SO_4^{2-} 1.5 g L^{-1} , Cl^- 0 g L^{-1} , NO_3^- 0 g L^{-1} , $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$ 0.1 g L^{-1} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 1 g L^{-1} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 5 g L^{-1} , $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ 0 g L^{-1} .

2) 在实验获得的阴离子组成下, 以 PDB 液为基质发酵原料进行验证试验, 结果表明: 发酵气体产生比对照组提前了 7 h 而且 H_2 最高含量达 60.7%, 平均含量 50.2%, 分别比对照组提高了 21.4% 和 24.1%; 平均产氢速率由对照组的 $36.79 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 提高到 $96.25 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 氢气产率由对照组的 $0.76 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ (马铃薯水解液按葡萄糖的量来计) 提高到 $1.17 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$.

3) 尿素 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 在一定浓度范围内对生物质发酵产氢过程中的糖利用率、 CO_2 和 H_2 的产量都有不同程度的抑制作用.

4) 在一定浓度范围内 $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$ 与 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 的存在对发酵产氢起良好促进作用的叠加交互作用; 同时单一的 $\text{M}_07\text{O}_{24}^{6-}$ 阴离子促进了混合微生物对原料利用的增加和转化.

5) 一定浓度范围内 SO_4^{2-} 与 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 的交互作用对生物质发酵产氢过程产生良好的影响, 显著促进氢气产生的同时对 CO_2 却有一定的抑制作用.

6) $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 和 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 的交互作用也对生物质发酵产氢过程中氢气的产生具有一定的促进作用.

责任作者简介: 刘士清 (1964—), 副研究员, 硕士生导师, 主要从事环境微生物学与环境生物技术、生物质能与环境工程

等方向的研究. Tel (86) 0871-5517126 E-mail belishiqing@ yahoo. com. cn

参考文献 (References):

- Fascetti E, D'Addario E, Todini O, *et al*. 1998. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(9): 753-760
- 高培基, 许平. 2004 资源环境微生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 120-135
- Gao P J, Xu P. 2004 *Microbiotechnology of Environment & Resource* [M]. Beijing Chemical Industrial Press 120-135 (in Chinese)
- Ke A, Murakawa T, Kavaguchi H, *et al*. 1999 Photoproduction of hydrogen from raw starch using a halophilic bacteria community [J]. *J Biosci Bioeng* 88(1): 72-79
- Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M, *et al*. 2002 Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* Effects of culture parameters [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 78(7): 731-740
- Lee Y J, Miyahara T, Noike T. 2001 Effect of iron concentration on hydrogen fermentation [J]. *Bioresour Technol*, 80(3): 227-231
- 李连华, 马隆龙, 袁振宏, 等. 2007. 农作物秸秆厌氧消化试验研究 [J]. *农业环境科学学报*, 26(1): 335-338
- Li L H, Ma L L, Yuan Z H, *et al*. 2007 Study on anaerobic digestion of straw stalk [J]. *Journal of Agro-Environment Science* 26(1): 335-338 (in Chinese)
- 李建政. 2003. 环境工程微生物学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 110-140
- Li J Z. 2003 *Environmental Microbiology* [M]. Beijing Chemical Industrial Press 110-140 (in Chinese)
- 刘士清, 李文鹏, 廖昌珑, 等. 2004 沼气料液对木聚糖酶活性的影响 [J]. *中国沼气*, 22(3): 8-10
- Liu S Q, Li W P, Liao C L, *et al*. 2004. Effects of biogas broth on activities of xylanases from different microbes [J]. *China Biogas* 22(3): 8-10 (in Chinese)
- 刘士清, 张无敌, 马欢. 2007. 生物质发酵产氢串并联多级复合装置及方法 [P]. 发明专利, ZL 200510048651. 9, 2007-11-14
- Liu S Q, Zhang W D, Ma H. 2007. A multistep device and technique in series or parallel connection for hydrogen fermentation [P]. Invention Patent ZL 200510048651. 9, 2007-11-14 (in Chinese)
- 刘士清, 张无敌, 马欢. 2008. 生物质发酵产氢的一种固定化技术方法 [P]. 发明专利, ZL 200510011085. 4, 2008-04-09
- Liu S Q, Zhang W D, Ma H. 2008. A immobilized technology for hydrogen fermentation [P]. Invention Patent ZL 200510011085. 4, 2008-04-09 (in Chinese)
- 马欢, 李建昌, 刘士清, 等. 2005 乙酸对发酵产氢过程的抑制影响 [J]. *可再生能源*, (4): 23-25
- Ma H, Li J C, Liu S Q, *et al*. 2005. Inhibiting effect of acetic acid concentration on hydrogen production [J]. *Renewable Energy*, (4): 23-25 (in Chinese)
- Martinoia E, Heck U, Wienken A. 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves [J]. *Nature* 289: 292-294
- Melis A, Zhang L P, Forestier M, *et al*. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol* 122: 127-136
- 门中华, 李生秀. 2005 钼对冬小麦硝态氮代谢的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 11(2): 205-210
- Men Z H, Li S X. 2005. Effects of molybdenum on nitrate metabolism of winter wheat [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* 11(2): 205-210 (in Chinese)
- Miller G L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*, 31: 426
- Peguin S, Soucaille P. 1995. Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition [J]. *Appl Environ Microbiol* 61: 403-405
- 施南华, 刘士清, 乔敏, 等. 1998. 多项结果指标间的相互制约关系对丙三醇发酵的影响 [J]. *云南大学学报*, 20(2): 105-107
- Shi N H, Liu S Q, Qiao M. 1998. Effecting of interacting relationships among multiple-result parameters on fermentation of propanetriol [J]. *Journal of Yunnan University*, 20(2): 105-107 (in Chinese)
- Speece R E (著), 李亚新 (译). 2001. 工业废水的厌氧生物技术 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 228-257
- Speece R E. 2001. *Anaerobic biotechnology of industrial wastewater* [M]. Beijing China Architecture & Building Press 228-257 (in Chinese)
- 肖本益, 魏源送, 刘俊新. 2004. 微生物发酵产氢的影响因素分析 [J]. *微生物学通报*, 31(3): 130-135
- Xiao B Y, Wei Y S, Liu J X. 2004. Factors of affecting microbial fermentative hydrogen production [J]. *Microbiology*, 31(3): 130-135 (in Chinese)
- Zhang Y F, Liu G Z, Shen J Q. 2005. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 855-860
- 周群英, 高延耀. 2000. 环境工程微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 97-108
- Zhou Q Y, Gao Y Y. 2000. *Environmental Microbiology* [M]. Beijing Higher Education Press 97-108 (in Chinese)
- 朱核光, 史家琛. 2002. 生物产氢技术研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 8(1): 98-104
- Zhu H G, Shi J L. 2002. Process of biological hydrogen production [J]. *Chin J Appl Environ Biol* 8(1): 98-104 (in Chinese)
- 左宜, 左剑丞, 张薇. 2004. 利用有机物厌氧发酵生物制氢的研究进展 [J]. *环境科学与技术*, 27(1): 97-99
- Zuo Y, Zuo J E, Zhang W. 2004. Review of Research on Biological Hydrogen Production by Anaerobic Fermentation of Organic Waste [J]. *Environmental Science and Technology*, 27(1): 97-99 (in Chinese)