

CO厌氧发酵制氢过程中的微生物特性及其影响因素*

赵亚^{1,2} 刘志军^{1**} 刘凤霞¹ GUIOT Serge R²

(¹大连理工大学化工与环境生命学部 大连 116024)

(²加拿大科学研究院生物技术研究所 蒙特利尔 H4P 2R2)

摘要 以发酵液中溶解的一氧化碳(CO)为底物,研究高温嗜热菌(*Carboxythermus hydrogenoformans*)厌氧发酵制氢的工艺过程.通过*C. hydrogenoformans*菌的生长规律、絮凝能力和反应特性等实验研究,建立菌株的生长规律模型,得出微生物衰减系数和最大比生长速率.结果表明,*C. hydrogenoformans*菌产氢率高,絮凝效果好,用于连续CO生物发酵制氢工艺是可行的.对发酵制氢过程的影响因素进行考察,得出最佳食微比及CO对发酵制氢过程的抑制浓度等过程参数,为有效开发CO厌氧生物发酵制氢的工艺路线提供了参考依据.图4 表2 参17

关键词 生物制氢;厌氧发酵;嗜热微生物;一氧化碳;底物抑制

CLC TK91:TQ920.1

Microbial Characteristics and Influence Factors During Anaerobic Fermentation for Biohydrogen Production from CO*

ZHAO Ya^{1,2}, LIU Zhijun^{1**}, LIU Fengxia¹ & GUIOT Serge R²

(¹Faculty of Chemical & Environmental & Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

(²Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal H4P 2R2, Canada)

Abstract The biohydrogen production from anaerobic fermentation was studied with thermophilic bacterium *Carboxythermus hydrogenoformans* using carbon monoxide (CO) dissolved in fermentation broth as the substrate. Bacterium growth model, decay efficient and the maximum specific growth rate were observed based on the experimental study of biomass growing, flocculation and microbial characteristics. The results indicated the feasibility of continuous anaerobic fermentation for hydrogen production from CO with *C. hydrogenoformans* due to its good hydrogen yield and flocculation ability. Furthermore, by investigating the effect of procedure parameters during CO fermentation, the optimal feed/microorganism was proposed and the maximum CO concentration was observed to avoid CO inhibition which was the key factor to consider in the study of continuous biohydrogen production from CO fermentation. Fig 4, Tab 2, Ref 17

Keywords biohydrogen production; anaerobic fermentation; thermophilic bacterium; CO; substrate inhibition

CLC TK91:TQ920.1

氢气作为一种清洁能源,由于具有热值高、可再生等优点,成为国内外新能源的研究热点^[1-3].目前,发酵法生物制氢技术日益受到人们的关注,许多研究学者利用不同微生物及发酵底物对制氢效果进行研究,得出了一些有价值的研究成果^[4].但在微生物厌氧发酵制氢领域仍然存在很多限制因素,例如,菌种繁殖条件苛刻、反应速率慢、产氢效率低等问题,制约了该技术的推广和应用^[5-7].对厌氧发酵制氢过程

中微生物特性及影响因素等进行深入研究是十分必要的.

高温嗜热菌*Carboxythermus hydrogenoformans*属于一氧化碳自养菌,能在厌氧环境中以一氧化碳(CO)作为生长碳源和代谢能源,代谢产物为氢气.在其代谢过程中,能够以CO作为电子供体,把水中的H⁺还原为H₂,同时氧化CO为CO₂.利用*C. hydrogenoformans*催化CO生物制氢,氢气得率(Yield)最高能达到95%以上,其代谢底物只有微量的挥发性脂肪酸和酒精等物质^[8-11].

我们对CO厌氧发酵制氢过程进行批次实验,研究嗜热菌*C. hydrogenoformans*的生长规律及菌株在形成固态生物膜过程中的絮凝能力.由于发酵底物CO在液相中的溶解度很低,气液传质能力受到一定的限制,据此,我们还研究了进料

收稿日期: 2011-08-31 接受日期: 2011-10-08

*加拿大科学研究院-中国教育部联合培养博士生奖学金项目(No. 2008NMFP)资助 Supported by the Canada NRC - China MOE Research and Post-doctoral Fellowship Program (No. 2008NMFP)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: liuzj@dlut.edu.cn)

量与微生物量之比 (F/M) 以及不同操作压力条件下CO在液相中的溶解度变化等因素对氢气比生产率 (SHPR) 和CO转化速率 (R) 的影响规律, 找出CO厌氧发酵生物反应抑制动力学的特性.

1 材料与方法

1.1 菌种培养及驯化

用于CO厌氧发酵的嗜热菌 *C. hydrogenoformans* 来自德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). 首先把配制好的营养液置入密闭实验瓶中, 再接入 *C. hydrogenoformans* 菌种, 放在 70 °C 的恒温摇床上进行培养, 转速为 100 r min⁻¹. 实验瓶的顶部空间不断充入新鲜的CO气体, 通过实验寻求得到最优的生长条件后, 嗜热菌逐渐适应以溶解于营养液中的CO为底物, 利用CO作为生长碳源和代谢底物不断繁殖分裂, 达到菌株的驯化.

营养液的组成 (g L⁻¹): NH₄Cl (1.0)、MgCl₂·6H₂O (0.102)、CaCl₂·2H₂O (0.015)、KH₂PO₄·H₂O (0.078)、Na₂HPO₄ (0.074)、NaHCO₃ (0.36)、Na₂S·9H₂O (0.70)、NiCl₂·6H₂O (0.01)、酵母提取液 (0.05)、刃天青 (0.000 5); 微量元素和维生素培养液各 10 mL. 其中营养液、微量元素以及微生物培养液都采用去离子水配置.

1.2 研究内容和方法

1.2.1 菌株生长规律 菌株的生长规律通过牺牲样品进行实验测定, 分别在 0 h、8 h、24 h、32 h、48 h、70 h 和 84 h 对悬浮液中的菌株浓度及顶部空间的气体进行采样分析, 并绘制发酵反应曲线和微生物的生长曲线.

1.2.2 食微比对SHPR的影响 由于CO在液相中的溶解度很低, 菌株在嗜热条件下通过液相对微溶的CO进行发酵, 产氢速率往往受到气相CO和液相H₂O之间的传质阻力影响.

在CO进料量与微生物量之比F/M不同的条件下分别对SPHR进行实验测试. 设定了5组条件, 分别标记为X₁、X₂、X₃、X₄和X₅, 详见表1, 其中, V_l为密闭实验瓶中加入的液相体积; V_g为密闭实验瓶中液面上部的气相空间体积; X₀为生物菌的初始浓度; F为气相CO底物进料量; M为液相中的微生物量.

1.2.3 CO溶解度对CO转化速率的影响 由亨利定律可知, CO在液相中的溶解度随着CO气相分压P_{CO}的增大而增大. 设定P_{CO}的变化范围为0~200 kPa, 相应的CO在液相中的溶解度S_{CO}在0~1.0 mmol L⁻¹范围内变化 (表2). 实验中, 对应各组不同实验参数分别测试CO的转化速率R.

1.2.4 微生物的絮凝能力 微生物在载体上的滞留、增殖的缓慢和菌群絮状体形成能力的高低, 是关系到微生物能否在反应器内被有效截流和繁殖的关键因素, 也是影响生物强化作用的一个重要因素^[12]. 本研究通过扫描电镜 (SEM) 观察 *C. hydrogenoformans* 菌群生长的表面形貌及细胞间的结合状况, 分析菌体在培养过程中的絮凝能力.

1.3 分析与测试

定时取样分析气相组分和发酵液成分的变化. 气相组分用HP-GC6890型气相色谱仪 (Hewlett Packard, Palo Alto, California) 进行分析, 采用Supelco填充柱 (Bellafonte, Pennsylvania), 毛细管柱 11 m × 3.2 m, 硅藻土粒径 60~80目; 采用热导检测器进行分析, 进样点、色谱柱、检测器的温度分别为 125 °C、50 °C 和 150 °C; 载气为氩气, 流速为 20 mL min⁻¹. 发酵液中微生物浓度由COD检测仪测定, 测得的COD数据转化为细胞干密度, 标准转化曲线根据微生物的化学组成式 (CH_{1.86}O_{0.6}N_{0.16}) 制定^[13]. SEM分析采用加拿大Mcgill大学的扫描电子显微镜, 型号为S-2600 N (日立公司).

2 结果与分析

2.1 菌株生长以及反应曲线

图1-A为菌株生长曲线, 其悬浮液底物中细胞干密度随

表1 F/M对SHPR影响的实验条件参数
Table 1 Testing conditions of F/M effect on SHPR

参数 Parameter	微生物浓度 Biomass concentration (X/mg L ⁻¹)				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
液相体积 Liquid volume (V _l /mL ⁻¹)	30.50	32.90	32.80	31.50	33.20
气相体积 Gas volume (V _g /mL ⁻¹)	28.90	28.50	27.80	29.50	28.30
微生物初始浓度 Original biomass concentration [X ₀ /mg ⁻¹ (VSS) L ⁻¹]	4.60	7.00	10.50	16.50	23.00
进料量 Feed (F/mmol ⁻¹)	1.30	1.30	1.20	1.50	1.20
微生物量 Biomass [M/mg ⁻¹ (VSS)]	0.13	0.20	0.29	0.49	0.65
食微比 Food to microorganism ratio [(F/M)/mol g ⁻¹ (VSS)]	9.50	6.30	4.20	3.00	1.90

表2 S_{CO}对CO转化速率影响的实验条件参数
Table 2 Testing conditions of S_{CO} effect on CO conversion rate

参数 Parameter	试验次数 Times									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CO分压 Partial pressure of CO (P _{CO} /kPa)	14	34	52	68	84	100	120	134	151	200
CO底物浓度 Substrate concentration of CO (C _{CO} /mmol L ⁻¹)	0.07	0.17	0.26	0.34	0.42	0.50	0.59	0.67	0.76	1.00

反应时间的变化由COD数据换算得到。

从图1中可以看出: 菌株接种后, 经历了适应期(0~24 h, I), 迟缓期(24~32 h, II), 指数生长期(32~70 h, III), 最后进入稳定期和衰亡期(70~84 h, IV)。菌株刚被接种至新鲜的培养基时, 菌种不但没有进行细胞的繁殖增长, 反而出现微生物数量的衰减现象, 根据微生物的比生长速率与底物消耗速率的关系式^[14]以及图1中微生物生长适应期的衰减数据计算, 得出*C. hydrogenoformans*菌的衰减系数 b 为 0.022 h^{-1} 。

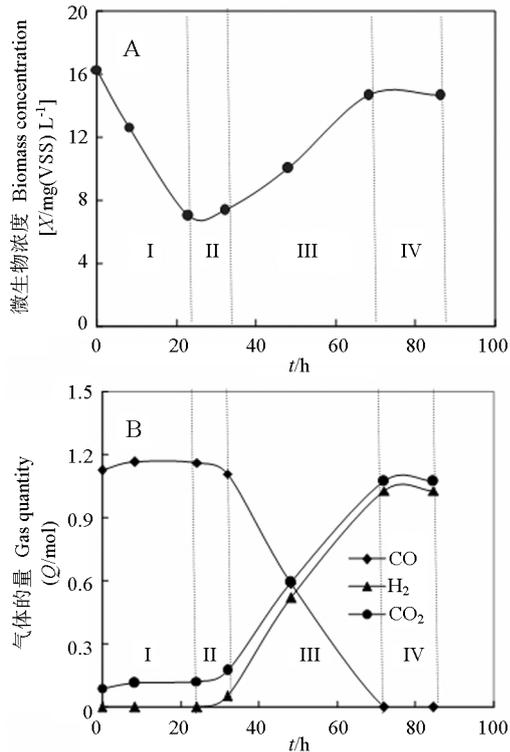


图1 菌株生长以及CO发酵反应曲线

Fig. 1 Bacterium growth and CO fermentation curve

$$\mu = Yk - b \quad (1)$$

式中: μ ——微生物比生长速率, h^{-1} ; k ——底物比消耗速率, $\text{g}(\text{CO}) \text{g}^{-1}(\text{VSS}) \text{h}^{-1}$; b ——微生物的衰减系数, h^{-1} ; Y ——微生物的生长得率, $\text{g}(\text{VSS}) \text{g}^{-1}(\text{CO})$ 。

微生物植入后经过适应期和迟缓期后, 迅速到达指数生长期。在这一阶段中, 由于培养基中的营养底物比较充足, 微生物活性比较高, 有害代谢物很少, 微生物的生长不受限制, 微生物的浓度随着培养时间呈指数增长趋势。比生长速率通过指数生长期微生物细胞数量的变化曲线, 由公式(2)进行计算:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} \quad (2)$$

$$\text{积分整理得} \quad X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

式中: X_0 ——初始微生物浓度, $\text{mg}(\text{VSS}) \text{L}^{-1}$; X_t —— t h后微生物浓度, $\text{mg}(\text{VSS}) \text{L}^{-1}$ 。

由图1微生物对数生长期内的浓度变化, 计算得出 $\mu =$

0.017 h^{-1} 。比较微生物适应期的衰减系数和对数生长期的比生长速率可知, 在*C. hydrogenoformans*菌接种的初始阶段, 其衰减速度很快, 由于内源呼吸而消耗的微生物量接近微生物初始浓度的一半。因此, 在菌株生长的适应期, 筛选出能够更好地适应CO底物的活性菌, 并经过指数生长期加速生长繁殖, 对反应器内实现连续发酵工艺的微生物培养和驯化是非常重要的。

牺牲样品实验中, 气体组分随着时间的变化曲线见图1-B。从图中可以看出: 在微生物接种的最初24 h内, 气体组分保持不变, 没有发生底物转化, 微生物未表现出生物活性, 生物催化反应处于停滞期(I)。微生物在接种初期, 由于溶液的稀释以及微量氧气的渗入等影响, 致使厌氧微生物生长的适应期延长。CO发酵反应在24 h之后开始进行, 并很快被微生物催化转化, 同时检测到 H_2 和 CO_2 发酵产物的产生(II和III)。经过70 h后, 发酵反应完成, CO被完全转化为同摩尔的 H_2 和 CO_2 (IV)。由图1的发酵反应曲线计算得出, SHPR为 $4.0 \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS}) \text{d}^{-1}$, 氢气得率为92.3%。

2.2 F/M对SHPR的影响

由于70 °C时CO在水中的溶解度很低, 气液传质过程成为氢气生产速率的限制性因素, 尤其是当微生物生长达到较高细胞密度时, 气液传质速率低于微生物反应速率, 微生物得不到充足的营养底物供应, 从而使微生物的活性受到抑制。图2为F/M对氢气比生产速率SPHR的影响变化曲线。F/M从0变化到 $6.3 \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS})$ 时, SHPR随F/M的增大而增大, 表明相对于单位微生物量的CO进料量越大, 供给液相中微生物的营养底物量就越大, 单位微生物量的产氢速率就越高。当 $F/M = 6.3 \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS})$ 时, 得到最大的 $\text{SHPR} = (4.6 \pm 0.8) \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS}) \text{d}^{-1}$ 。当F/M大于 $6.3 \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS})$ 时, F/M的增加对SHPR不再产生影响。表明当CO进料充足时, CO在液相中的传质速率大于微生物的反应速率, SHPR主要取决于微生物反应速率。由此可知, 最佳的F/M值应维持在 $6.3 \text{ mol g}^{-1}(\text{VSS})$ 以上, 以

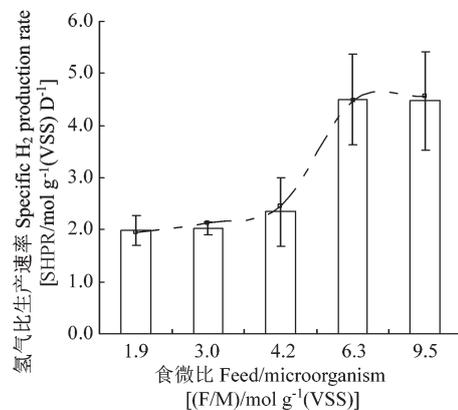


图2 F/M对SHPR的影响

Fig. 2 Effect of F/M on SHPR

防止CO底物进料量不足而引起对SHPR的限制。

2.3 CO浓度对转化速率的影响

增强气液传质速率的途径有两条，其一是增大摇床的搅动速度，通过增大气液接触面积从而提高气液传质效率^[15]；其二是增大CO的气相分压，通过增大CO在液相中的溶解度而提高气液传质效率。但在生物反应中，需要考虑的一个重要因素是底物浓度对反应速率的抑制作用^[16-17]。

本文实验中，控制CO气相分压 P_{CO} 从0~200 kPa范围内改变时，相应的CO在液相中的浓度 C_{CO} 在0~1.0 mmol L⁻¹范围内变化，分别测试不同 C_{CO} 下CO的转化速率 R ，绘制出的CO生物转化反应动力学曲线，见图3。由图3可以看出，当 C_{CO} 在0~0.5 mmol L⁻¹范围内变化时， R 随 S_{CO} 的增加而增加；当 $C_{CO} = 0.5$ mmol L⁻¹时达到峰值(4.6 ± 0.5) mol g⁻¹(VSS) d⁻¹。当 C_{CO} 大于0.5 mmol L⁻¹后， R 随着 C_{CO} 的增加而减小，当 C_{CO} 增大到1.0 mmol L⁻¹， R 下降至(1.5 ± 0.3) mol g⁻¹(VSS) d⁻¹。这表明当 P_{CO} 大于100 kPa时，即 C_{CO} 大于0.5 mmol L⁻¹时，CO在液相中的浓度对微生物的活性产生了抑制，进而降低了CO的转化速率。

2.4 微生物在载体上生长的扫描电镜图片

厌氧发酵菌*C. hydrogenogens*在反应器内的有效富集和增殖是强化生物反应过程的关键因素。为了观察菌株生

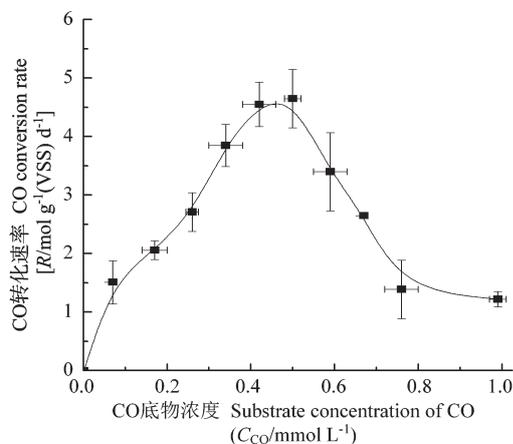


图3 CO浓度对CO转化速率的影响

Fig. 3 Effect of CO concentration on CO conversion rate

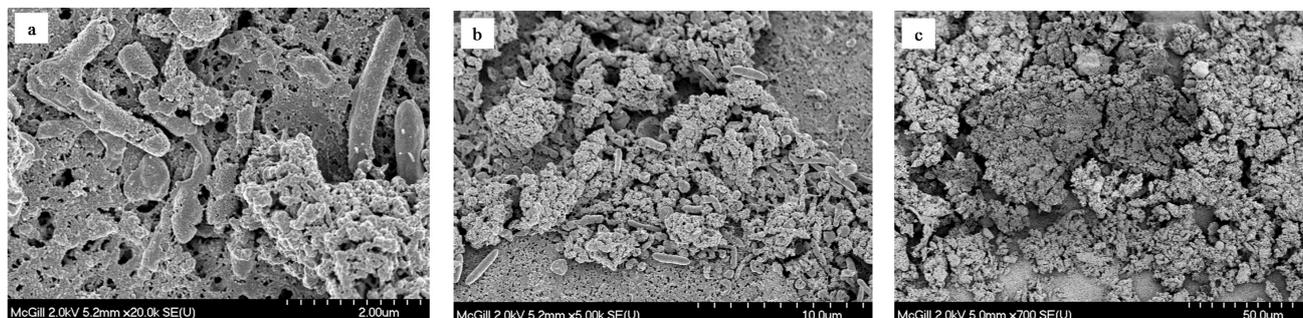


图4 *C. hydrogenoformans*生物膜的SEM分析 (a: 2×10⁴×; b: 5×10³×; c: 7×10²×)

Fig. 4 SEM of *C. hydrogenoformans* biofilm (a: 2×10⁴×; b: 5×10³×; c: 7×10²×)

物膜的自然团聚和在载体上的附着效果，取一定量的絮状微生物进行微观结构表征，用电子显微镜进行观察，发现*C. hydrogenogens*菌在培养过程中可形成致密的絮状体结构，有利于菌体在反应器中的滞留和快速密集。图4为*C. hydrogenoformans*菌在接种至膜反应器4个月后的SEM分析，其中膜材料为聚偏二氟乙烯，微生物在膜材料的外壁生长。由图4结果可知，载体表面附着的菌株形态明显，不但形成了均匀的生物膜，而且生物膜呈现高度组织化的多细胞群体结构。*C. hydrogenogens*菌分泌很多大分子胞外多聚物，并吸附了营养物质、代谢产物以及裂解产物，从而使菌群细胞之间紧密联结且具有较好的絮凝性，形成结构均匀的菌群絮状体，牢固地附着在载体的表面。*C. hydrogenogens*菌的这一特性不但增加了微生物在反应器内的密度，而且可以避免菌体的流失，从而实现菌体在反应器内有效滞留和增殖，强化了反应器内厌氧发酵制氢过程的稳定性。

3 结论

本文研究CO厌氧发酵制氢过程中*C. hydrogenoformance*菌的生长规律，得出了菌株的衰减系数和最大比生长速率分别为0.022 h⁻¹和0.017 h⁻¹。实验证明，在菌株生长的适应期，能够迅速筛选出适应CO底物的活性菌，并经过指数生长期加速其繁殖聚集。*C. hydrogenoformance*菌在发酵制氢反应过程中，絮凝效果好。

本文分析了CO厌氧发酵过程中CO进料量与微生物量之比F/M对氢气比生产速率和CO转化速率的影响，得出最佳的过程参数F/M为6.3 mol g⁻¹(VSS)。通过实验发现，液相中CO对厌氧发酵制氢反应的抑制浓度为0.5 mmol L⁻¹，相应的操作压力为100 kPa。

References

- 1 Azbar N, Dokgoz FTC. The effect of dilution and l-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor. *Inter J Hydrogen Energy*, 2010, 35 (10): 5028-5033

- 2 Wang YZ, Liao Q, Zhu X, Tian X, Zhang C. Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor. *Bioresour Technol*, 2010, **101** (11): 4034~4041
- 3 XU LY (许丽英), Ren NQ (任南琪), Wang XZ (王兴祖), LI YF (李永峰), Zhang Y (张颖), XU H (徐慧), Chen GX (陈冠雄). Nitrogen nutrient and metabolic characteristics of hydrogen-producing novel species-*Ethanoligenes harbinense* B49. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 007, **13** (2): 265~269
- 4 Wang JL, Wei W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Inter J Hydrogen Energy*, 2009, **34** (2): 799~811
- 5 Chen GY (陈冠益), Gao WX (高文学), Ma WC (马文超). Review on hydrogen-rich gas production from biomass. *Acta Energetica Solaris Sin* (太阳能学报), 2006, **27** (12): 1276~1284
- 6 Zhang JC (张继春), Huang B (黄兵), Cao DF (曹东福). Progress on biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Yunnan Chem Technol* (云南化工), 2007, **34** (2): 66~70
- 7 Wang YZ (王永忠), Liao Q (廖强), Zhu X (朱恂), Tian X (田鑫), Wang ZK (王中康), Zhang P (张攀), Zhang BP (张宝鹏). Isolation and identification of photosynthetic bacteria and their hydrogen-producing abilities. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (5): 673~677
- 8 Henstra AM, Stams AJM. Novel physiological features of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* and *Thermoterrabacterium ferrireducens*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (12): 7236~7240
- 9 Svetlitchnyi V, Dobbek H, Meyer-Klaucke W, Meins T, Thiele B, Römer P, Huber R, Meyer O. A functional Ni-Ni-[4Fe-4S] cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (2): 446~451
- 10 Zhao Y, Cimpoia R, Liu ZJ, Guiot S. Kinetics of CO conversion into H₂ by *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 2011, **91** (6): 1677~1684
- 11 Zhao Y, Cimpoia R, Liu ZJ, Guiot S. Orthogonal optimization of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* culture medium for hydrogen production from carbon monoxide by biological water-gas shift reaction. *Inter J Hydrogen Energy*, 2011, **36** (17): 10655~10665
- 12 Qin Z (秦智), Ren NQ (任南琪), Li JZ (李建政). Bioaugmentation of hydrogen producing bacteria on operation of biohydrogen producing reactor. *Environ Sci* (环境科学), 2007, **28** (12): 2843~2848
- 13 Heijnen JJ. Bioenergetics of Microbial Growth. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, 1999
- 14 Guiot S, Podrutzny MF, McLean DD. Assessment of macroenergetic parameters for an anaerobic upflow biomass bed and filter (UBF). *Biotechnol Bioeng*, 1989, **34** (10): 1277~1288
- 15 Henstra AM. CO metabolism of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* and *Archaeoglobus fulgidus*: [Doctor Degree Dissertation]. Wageningen University, 2006
- 16 Soboh B, Linder D, Hedderich R. Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing: H₂-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (22): 5712~5721
- 17 Hursta KM, Lewis RS. Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochem Eng J*, 2010, **48** (2): 159~166