

# 产气肠杆菌厌氧发酵产氢工艺实验\*

张全国 赫倚风 胡建军 王毅 刘瑞

(河南农业大学农业部可再生能源新材料与装备重点实验室, 郑州 450002)

**摘要:**以产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)为纯菌种,葡萄糖(G)为发酵底物,分别选取25、30、35、38℃的发酵温度,初始pH值为3.5、4.5、5.5、6.5的酸碱度,葡萄糖与蛋白酶消化物的质量比为2、3、6的碳氮比的实验条件进行厌氧发酵产氢工艺及其代谢调控途径的实验。实验结果表明,产气肠杆菌具有一定的耐酸性,耐酸范围为pH值4.5~7.0;不同工艺条件下产气肠杆菌发酵产氢的周期在68~156h之间。产气肠杆菌发酵产氢周期最短为68h的最优化发酵工艺条件为温度35℃、pH值6.5、碳氮质量比3,其氢气产率达261.5 mL/g,氢气转化率为2.1 mol/mol。

**关键词:**生物制氢 产气肠杆菌 厌氧发酵 工艺优化

**中图分类号:**TK91;TK6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1298(2014)02-0176-06

## 引言

氢气,因其可再生性、燃烧清洁且能量密度高(是烃燃料2.75倍以上)<sup>[1]</sup>,被认为是一种可行的替代燃料<sup>[2]</sup>。然而,氢气作为燃料也面临着制氢成本高的难题;造成生物制氢成本高的原因主要是原料转化率低,使实现规模化制氢还有一段距离<sup>[3]</sup>。

近年来,生物制氢研究主要集中在厌氧发酵制氢和光合发酵制氢方向<sup>[4-6]</sup>。Favaro等研究了城市垃圾中不同有机废物的产氢特性<sup>[7]</sup>,任南琪等对厌氧发酵制氢进行了研究<sup>[8]</sup>,张全国等则对光合细菌发酵制氢开展了大量的研究<sup>[9-11]</sup>,这些多是基于活性污泥富集菌群的研究,纯菌种因自身可利用底物单一等原因被学者忽略,有关研究相对较少,Hu等研究了巴氏梭菌等4种厌氧菌纯培养产氢的特性<sup>[12]</sup>。产气肠杆菌作为产氢主要菌属之一,适应温度范围广(15~40℃),能够利用葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露醇、蔗糖、麦芽糖、淀粉、纤维素等进行厌氧发酵制氢,主要产生乙醇、3-羟基丁醇和有机酸<sup>[13]</sup>。张晓蓉等仅对产气肠杆菌与光合细菌协同产氢特性进行了初步研究<sup>[14]</sup>。有关其工艺方面的研究相对较少,本文主要研究影响产气肠杆菌厌氧发酵产氢的工艺因素及其最优条件。

## 1 实验

### 1.1 实验菌种及材料

实验所用菌种为产气肠杆菌(*Enterobacter*

*aerogenes* AS1.489),棒状,菌体长1.2~3.0 μm、宽0.6~1.0 μm,为革兰氏阴性的兼性厌氧杆菌,不产孢子且具有小的荚膜,有周鞭毛,可以活动,菌种源自南京便诊生物科技有限公司。实验用葡萄糖为分析纯,购自天津瑞金特化学品有限公司。

### 1.2 实验装置

实验装置如图1所示,由发酵瓶、集气瓶、贮水瓶即体积计量瓶及恒温培养箱等组成,其最大发酵容积为200 mL。发酵瓶、集气瓶和体积计量瓶之间通过直径为6 mm的乳胶管连接。待接入适量的处于对数生长期的产气肠杆菌后,用橡胶塞密封,并在瓶口处涂上适量的石蜡,为使产氢反应能在稳定的环境中进行,将反应瓶置于恒温箱中,以保证恒温箱内的温度和反应瓶内的温度有最小的温差。导气管插入反应瓶上部的余留空间,并在导气管上安装一阀门,产生的气体采用排水法收集。

### 1.3 实验方法

实验以在35℃下培养24 h后处于对数期的产气肠杆菌为接种物,接种量为20%;量取10 g/L的葡萄糖150 mL为发酵底物,使用一定浓度的甲酸和KOH进行酸碱度调控,使用混合有机氮作为补充氮源,进行碳氮比的调配,其中胰蛋白酶消化物(N质量分数大于等于12.5%)与大豆蛋白消化物(N质量分数大于等于9%)的质量比为3:1。采用如图1所示的装置,分别进行产气肠杆菌厌氧发酵产氢实验,并在固定时段测定产气量和动态pH值,以及气

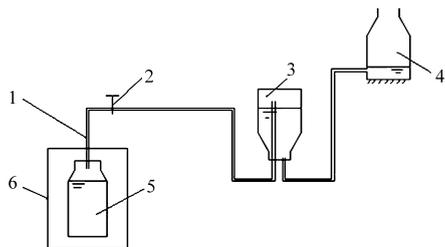


图1 产氢实验装置图

Fig.1 Experimental apparatus for hydrogen production

1.导气管 2.阀门 3.贮水瓶 4.集气瓶 5.反应瓶 6.恒温培养箱

体中氢气和二氧化碳的体积分数。

实验中生成气体成分及其氢气含量采用美国安捷伦公司生产的 Aligent 6820GC - 14B 型气相色谱仪,检测器为热导池,5A 分子筛填充柱,高纯氮气为载气,柱温 80℃,检测器温度 150℃,进样量 500 μL;产气肠杆菌发酵液的酸碱度采用上海立达仪器厂生产的快速 pH 值测定仪(测量精度为 0.01)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 碳氮比对产气肠杆菌产氢效果的影响

根据前期培养实验选定本组单因素实验的培养温度为 35℃,设定 3 组对比实验发酵液的碳源(葡萄糖)和氮源(混合蛋白酶消化物)的质量比分别为 2、3、6;根据产气肠杆菌最适于生长在 pH 值为 7 的环境下,实验采用配比后自然状态下的酸碱度(pH 值为 6.5 左右)进行厌氧发酵产氢的第 1 组发酵实验,实验结果如图 2 和图 3 所示。

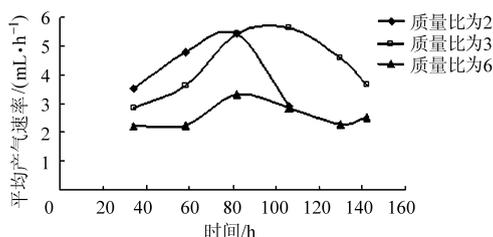


图2 不同碳氮质量比的平均产气速率

Fig.2 Average gas production rate with different C: N value

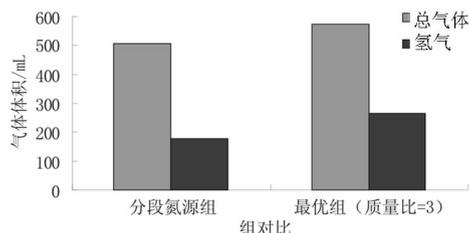


图3 不同的碳氮质量比的产气量

Fig.3 Total gas production with different C: N value

由图3可以看出,碳氮质量比值为 3 的实验组其总产气量和总产氢量均为最高,当碳氮比偏低时,总

产气量相对也较高,但总产氢量即氢气所占的百分比比较小,这是因为此时有机氮源偏高,产气肠杆菌生长代谢活动旺盛,而生产氢气的代谢活动相对减弱。由图 2 也可看出,碳源一定(葡萄糖均为 1.5 g)、氮源比例偏高时微生物生长迅速,发酵周期短,前期平均产气速率能够很快达到较高水平,但同时又会很快下降,直至不再产气;氮源比例偏低则不能满足产气肠杆菌生长需要,前期微生物生长缓慢,致使产气速率提高缓慢,产气周期拉长,高峰期不明显,整体产气速率和总产气量均较低。

为了进一步验证氮源对产气肠杆菌生长和产气的影响,本文做了进一步的验证实验:35℃,pH 值为 6.5,先以碳氮质量比为 7.5 的实验条件进行产氢,记录至不再产气 24 h 后再加入 0.5 g 的胰蛋白酶消化物,即碳氮质量比为 3 的条件下继续进行发酵产氢,记为验证组。实验结果如图 4 和图 5 所示。

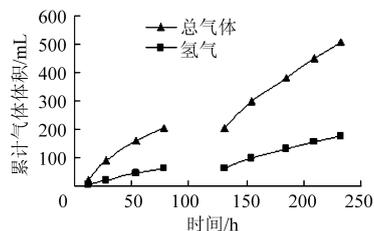


图4 验证组累计产气量的变化

Fig.4 Gas production of verification group

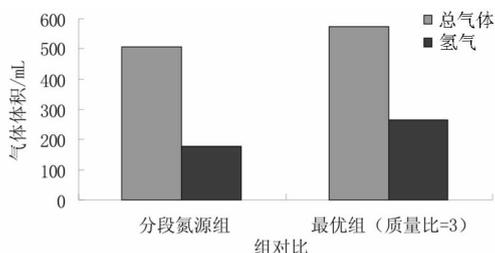


图5 验证组与碳氮因素最优组总产气量对比

Fig.5 Total gas comparison between verification group and optimization group

由图 4 可见,氮源过低(前段,碳氮质量比为 7.5)时,反应进行缓慢,产气量低,且很快中止;进一步补充氮源(后段,碳氮质量比为 3)后,反应可以继续进行,但会增加 25 h 左右的缓冲期,其发酵周期由正常情况下的 140 h 延长至 253 h。由图 5 也可以看出,分段加入氮源与本因素中的最优组相比总产气量和产氢量均有所减少,但差别很小。

因此,有机氮源对产气肠杆菌的生长和代谢产氢有着至关重要的影响,且碳氮源的调节可以在反应中间阶段根据实际情况进行调节,但会略微影响总产气量。且当葡萄糖与混合蛋白酶消化物的质量比为 1.5 g:0.5 g,既碳氮质量比为 3 时最有利于产氢,产气量达到 574 mL,氢气的平均体积分数达到

46.5%。

## 2.2 不同反应温度对产气肠杆菌产氢效果的影响

本组单因素实验各组选定 pH 值为 6.5, 碳氮质量比为 3, 温度选择 25、30、35、38℃ 4 个水平, 这是根据产气肠杆菌适应温度 15~40℃ 的大范围, 经前期培养实验知其最适生长温度范围为 30~35℃, 当温度低于 25℃ 时, 产气产杆菌虽仍能生长, 但偏低的温度会抑制其活性; 40℃ 是其温度上限, 且此菌种是人体肠道菌, 故选定高出人体温度 1℃ 的 38℃ 水平来研究其在偏高温度的产气规律, 结果如图 6、图 7 所示。

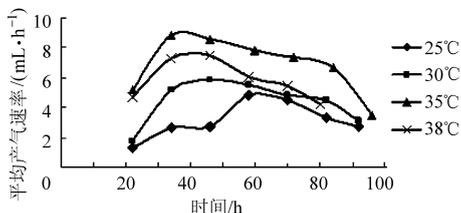


图 6 不同温度环境下平均产气速率

Fig. 6 Average gas production rate in different temperatures

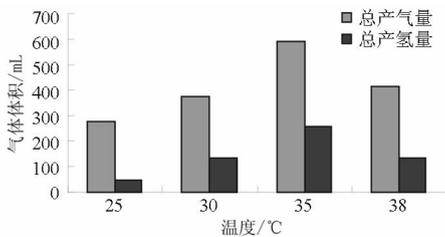


图 7 不同温度环境下的产气量

Fig. 7 Gas production in different temperatures

由图 6 可以看出, 35℃ 时, 产气肠杆菌在整个产气过程中的平均产气速率均为最高。由图 7 结果可以看到, 35℃ 时的累计总产气量和总产氢量也是最高; 30℃ 的变化趋势跟 35℃ 时的大致相同但累计产气量、产氢量以及平均产气速率均低于 35℃; 38℃ 和 25℃ 时产气速率和累计产气量均较低。由图 6 可以看到, 38℃ 组前期的平均产气速率相对较接近于 35℃ 组, 之后便迅速下降, 周期相对较短, 这是因为温度越高, 微生物的代谢活动越旺盛; 但当温度过高时, 微生物种群则会加快衰亡, 不利于产氢代谢的继续; 而 25℃ 组前期的平均产气速率则非常低, 之后开始提高, 这是因为温度影响微生物的生长代谢, 前期微生物菌体浓度低, 产氢效率低, 而且温度偏低, 产气肠杆菌的生长、代谢活动受到抑制, 发酵过程的缓冲期长, 同时周期也会相应延长。

## 2.3 不同初始 pH 值对产气肠杆菌产氢效果的影响

本组单因素实验选取碳氮质量比为 3, 培养温度为 35℃; 为了找到产气肠杆菌发酵产氢的最适初始 pH 值范围, 同时确定产气肠杆菌的耐酸范围, 选

取 pH 值为 6.5、5.5、4.5、3.5 4 个水平进行第 3 组的发酵产氢, 实验结果如图 8~10 所示。

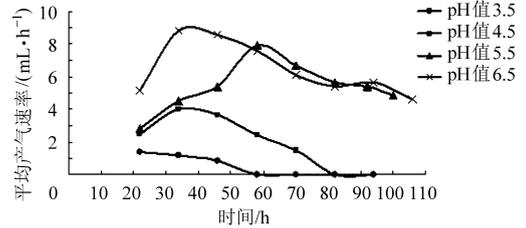


图 8 不同初始 pH 值时的平均产气速率

Fig. 8 Average gas production rate under different initial pH value

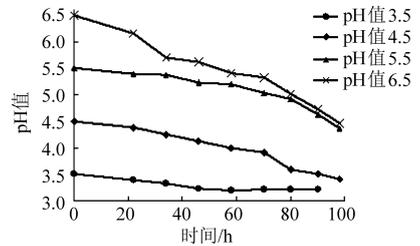


图 9 不同初始 pH 值下动态 pH 值的变化

Fig. 9 Change of dynamic pH value under different initial pH value

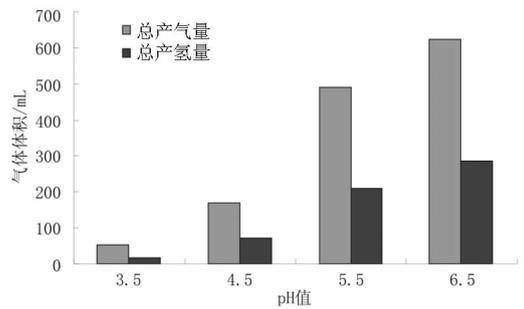


图 10 不同初始 pH 值下累计总产气量对化

Fig. 10 Cumulative total gas production under different initial pH value

由图 9 可知, 不同初始 pH 值下各组的动态 pH 值均为下降趋势, 初始 pH 值越高, 动态 pH 值下降速度越快, 但是就整体来说, 其 pH 值的变化并不是太大, 整个周期中的 pH 值降均在 1 左右, 这说明产气肠杆菌发酵产氢过程是一个不断产酸的过程, 但该产物酸并不会明显影响到发酵液的 pH 值。在发酵后期, 随着有机酸的积累产气速率逐渐下降, 当 pH 值为 3.5 时, 发酵产氢反应几乎不再进行。由图 9 和 10 可以看出, 虽然产气肠杆菌最适于中性环境生长, 但在 pH 值为 5.5~6.5 的偏酸性环境中, 仍能较好地生长代谢, 且有较为理想的产气量和产氢量, 这说明产气肠杆菌的耐酸范围较宽, 适应性相对较强。

## 2.4 产气肠杆菌产氢工艺优化

依据产气肠杆菌厌氧发酵产氢工艺的单因素实验结果, 选取温度 35℃、pH 值 6.5、碳氮质量比 3 的

工艺参数进行产气肠杆菌厌氧发酵产氢工艺优化实验研究,结果如图 11~13 所示。

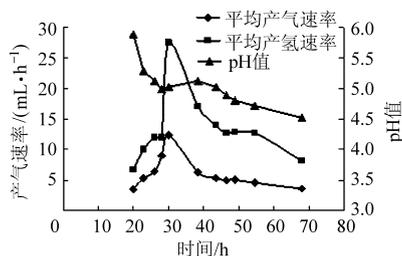


图 11 优化组产气速率、产氢速率和动态 pH 值的变化

Fig. 11 Total gas production rate, H<sub>2</sub> production rate and dynamic pH value of optimal group

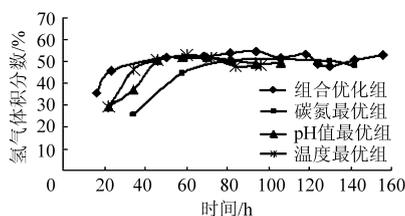


图 12 不同组别 H<sub>2</sub> 体积分数对比

Fig. 12 Comparison of percentage of H<sub>2</sub> in different groups

从各组产气速率随时间的变化曲线可以发现,不同的工艺条件,产气肠杆菌发酵产氢的周期差别很大,在 68~156 h 之间变动,缓冲时间也有差别,在 10~20 h 之间变动。而由图 11 可以看到,优化后实验组周期缩短至 68 h。

表 1 纯培养条件不同菌种以葡萄糖为底物时的产氢情况

Tab. 1 Hydrogen yield using glucose as substrate by pure cultures

微生物菌属	培养模式	产氢量/(mol·mol <sup>-1</sup> )	文献
阴沟肠杆菌 ( <i>E. cloacae</i> IIT - BT08)	批次	2.2	[15]
产气肠杆菌 ( <i>E. aerogenes</i> HU - 101wt)	批次	0.6	[13]
拜氏梭状芽孢杆菌 ( <i>C. beijerinckii</i> RZF - 1108)	批次	2.0	[16]
拜氏梭状芽孢杆菌 ( <i>C. beijerinckii</i> DSM 791)	批次	0.6~1.6	[12]
丁酸梭状芽孢杆菌 ( <i>C. butyricum</i> CWBHI009)	批次	1.7	[17]
丁酸梭状芽孢杆菌 ( <i>C. butyricum</i> SC - E1)	连续	1.4~2.3	[18]
巴氏梭状芽孢杆菌 ( <i>C. pasteurianum</i> DSM 525)	批次	1.5	[19]
巴氏梭状芽孢杆菌 ( <i>C. pasteurianum</i> DSM 525)	批次	1.8~3.0	[12]
柠檬酸杆菌 ( <i>Citrobactersp.</i> Y19)	批次	2.49	[20]
产气肠杆菌 ( <i>E. aerogenes</i> AS1. 489)	批次	2.1	本文结果

### 3 结论

(1) 产气肠杆菌发酵产氢耐酸范围为 pH 值 4.5~7.0, 其中最适产氢温度为 35℃、最适 pH 值范围为 5.5~7.0、最佳碳氮比值为 3 时最有利于产气肠杆菌产氢, 氢气产率最高为 261.5 mL/g, 氢气转化率达到 2.1 mol/mol。

(2) 有机氮源对产气肠杆菌的生长和代谢产氢至关重要, 碳氮源的调节可以在反应中间阶段根据实际情况进行调节, 但会使总产气量有所降低。

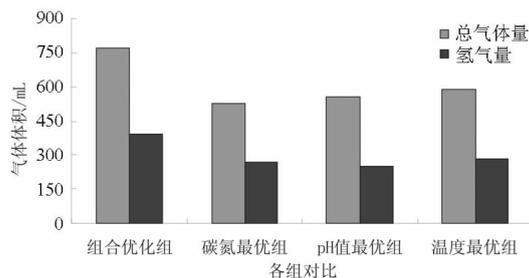


图 13 不同组别总产气量对比

Fig. 13 Comparison of total gas production in different groups

由图 11 可知, 优化后, 产气肠杆菌产氢过程中的动态 pH 值为由初始的 6.5 逐渐下降至 4.5 以下, 平均产气速率和平均产氢速率的变化规律保持一致, 其原因可从图 12 得到解释。由图 12 可知, 在各组实验中, 除了起始阶段之外, 其余过程 H<sub>2</sub> 体积分数都保持稳定一致的 50% 左右, 剩余气体为 CO<sub>2</sub>。这说明纯菌种产气肠杆菌利用葡萄糖产氢的生理生化过程稳定单一。而起始段 H<sub>2</sub> 体积分数低于 50% 的原因则是发酵前预留空气中氮气的存在对其的影响。结合图 13 可知, 各工艺优化后的实验组在总产气量和总产氢量上具有明显优势, 最高产气量达到 770 mL, 产氢量为 392 mL, 氢气的平均体积分数达到 50.9%, 产氢能力为 261.5 mL/g, 氢气转化率达到 2.1 mol/mol, 这与同类研究相比也很有优势, 对比结果如表 1 所示。

(3) 在各组实验过程中, 纯菌种产气肠杆菌所产生的气体中 H<sub>2</sub> 的体积分数都保持稳定一致的 50% 左右, 产生的气体中 H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 基本为 1:1 的关系。这说明纯菌种产气肠杆菌利用葡萄糖产氢的生理生化过程稳定单一; 反应过程是有机酸的积累过程, 体现在反应液的 pH 值均呈下降趋势。

(4) 产气肠杆菌在 pH 值为 5.5~6.5 的偏酸性环境中, 仍能较好地生长代谢, 且有较为理想的产气量和产氢量, 这说明产气肠杆菌的耐酸范围相对较宽, 适应性较强。

## 参 考 文 献

- 1 Guo X M, Trably E, Latrille E, et al. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation [J]. *Hydrogen Energy*, 2010, 35(10): 660 – 673.
- 2 Linb C N, Wu S Y, Lee K S, et al. Integration of fermentative hydrogen process and fuel cell for on-line electricity generation [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 32: 802 – 808.
- 3 申翔伟, 周雪花, 杜金宇, 等. 生物制氢技术发展历程及其特征 [J]. *太阳能学报*, 2010, 31(1): 22 – 25.  
Shen Xiangwei, Zhou Xuehua, Du Jingyu, et al. The development and characteristics of bio-hydrogen production technology [J]. *Acta Energetica Sinica*, 2010, 31(1): 22 – 25. (in Chinese)
- 4 Levin D B, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29(2): 173 – 185.
- 5 Pallavi S, Anjana P. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36: 7460 – 7478.
- 6 张全国, 王毅. 光合细菌生物制氢技术研究进展 [J]. *农业机械学报*, 2013, 44(6): 156 – 161.  
Zhang Quanguo, Wang Yi. Research progress of hydrogen production technology with photosynthetic bacteria [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(6): 156 – 161. (in Chinese)
- 7 Favaro Lorenzo, Basaglia Marina. Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38(27): 11774 – 11779.
- 8 包红旭, 任南琪, 王爱杰. 新菌 X9 协同 B49 同步发酵纤维素产氢能力分析 [J]. *沈阳建筑大学学报*, 2008, 24(3): 465 – 467.  
Bao Hongxu, Ren Nanqi, Wang Aijie. Analysis of bio-hydrogen production capacity of the cellulose degradation by cellulolyticum sp. X9 and ethanogenicum harbinense B49 [J]. *Journal of Shenyang Jianzhu University*, 2008, 24(3): 465 – 467. (in Chinese)
- 9 张全国, 张相锋, 王毅, 等. 光合产氢混合菌群的碳源代谢实验研究 [J]. *太阳能学报*, 2012, 33(2): 253 – 257.  
Zhang Quanguo, Zhang Xiangfeng, Wang Yi, et al. Hydrogen yield of photosynthetic bacteria flora under different carbon sources [J]. *Acta Energetica Sinica*, 2012, 33(2): 253 – 257. (in Chinese)
- 10 张全国, 雷廷富, 尤希凤, 等. 影响天然混合红螺菌产氢因素的实验研究 [J]. *太阳能学报*, 2005, 26(2): 248 – 252.  
Zhang Quanguo, Lei Tingzhou, You Xifeng, et al. Study on hydrogen production influence factor [J]. *Acta Energetica Sinica*, 2005, 26(2): 248 – 252. (in Chinese)
- 11 张全国, 王素兰, 尤希凤. 光合菌群产氢量影响因素的研究 [J]. *农业工程学报*, 2006, 22(10): 182 – 185.  
Zhang Quanguo, Wang Sulan, You Xifeng. Effects of the influencing factors of photosynthetic bacteria group on hydrogen production [J]. *Transactions of the CSAE*, 2006, 22(10): 182 – 185. (in Chinese)
- 12 Hu Chengcheng, Giannis Apostolos, Chen Chia-Lung, et al. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38(35): 15686 – 15692.
- 13 Mahyudin A R, Furutani Y, Nakashimada Y, et al. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes* [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(4): 358 – 363.
- 14 张晓蓉, 龚双娇, 廖惠敏, 等. 光合细菌与产气肠杆菌协同产氢特性分析 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1471 – 1475.  
Zhang Xiaorong, Gong Shuangjiao, Liao Huimin, et al. Characteristic analysis of cooperation hydrogen production using *Rhodospseudomonas sp.* DT and *Enterobacter Aerogenes* [J]. *Microbiology*, 2009, 36(10): 1471 – 1475. (in Chinese)
- 15 Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT – BT 08 [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(6): 589 – 593.
- 16 Zhao X, Xing D, Fu N, et al. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF – 1108 [J]. *Biosource Technology*, 2011, 102(18): 8432 – 8436.
- 17 Masset J, Hiligsmann S, Hamilton C, et al. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009 [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(8): 3371 – 3378.
- 18 Brosseau J D, Zajic J E. Hydrogen-gas production with *Citrobacter intermedim* and *Clostridium pasteurianum* [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1982, 32(3): 496 – 502.
- 19 Ferchichi M, Crabbe E, Hintz W, et al. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(6 – 7): 855 – 862.
- 20 Evvyernie D, Karita S, Morimoto K, et al. Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M – 21 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(4): 339 – 343.

## Bio-hydrogen Production by Anaerobic Fermentation of *Enterobacter aerogenes* in Pure Culture

Zhang Quanguo He Yifeng Hu Jianjun Wang Yi Liu Rui

(Key Laboratory of New Materials and Facilities for Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture,  
Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Experiments were carried out to investigate anaerobic fermentation hydrogen production process and its metabolic regulation ways with taking *Enterobacter aerogenes* as pure strains and using glucose as substrate. The experiments were conducted to study at different temperatures (25°C, 30°C, 35°C, 38°C), initial pH values (3.5, 4.5, 5.5, 6.5), mass ratio of glucoses (G) and protease digestion (2, 3, 6). The results showed that *Enterobacter aerogenes* had a certain acid-resisting in the pH value range of 7.0 to 4.5. Moreover, fermentative hydrogen production cycles of *Enterobacter aerogenes* was very variable (between 68 h to 156 h) under different technical conditions. The optimum conditions of the shortest fermentative hydrogen production cycle of 68 h were as follows: the temperature was 35°C, the pH value was 6.5, meanwhile, the carbon - nitrogen ratio was 3. Based on these conditions, hydrogen production rate and hydrogen conversion rate could reach to the value of 261.5 mL/g and 2.1 mol/mol.

**Key words:** Bio-hydrogen production *Enterobacter aerogenes* Anaerobic fermentation Process optimization